



Università degli Studi di Pisa

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

Corso di Laurea Specialistica in Scienze e Tecnologie Biomolecolari

TESI DI LAUREA SPECIALISTICA

Estrazione e purificazione di proteine enzimatiche dal terreno: studi preliminari e approccio metodologico

Candidato:

Mariarita Arenella

Relatore:

Dott.ssa Grazia Masciandaro

Correlatori:

Prof. Pierluigi Ipata

Prof. Giovanni Cercignani

Anno Accademico 2007–2008

Ai miei genitori

Sommario

L'ecosistema suolo è ricco di proteine enzimatiche che possono essere raggruppate in due classi: proteine enzimatiche intracellulari e proteine enzimatiche extracellulari.

L'attività degli enzimi intracellulari dipende dalla proliferazione microbica a differenza dell'attività di quelli extracellulari che vengono secreti nella fase acquosa del terreno da cellule microbiche e vegetali metabolicamente attive o in fase di lisi. Tali enzimi possono trovarsi liberi o stabilizzati dalla formazione di complessi con le sostanze umiche e le argille del terreno, sono considerati una riserva di materia ed energia biochimica del suolo in quanto la loro attività si svolge anche in condizioni proibitive per i microrganismi e, per questo, sono stati proposti come le ultime difese biologiche del suolo esposto a processi di degradazione irreversibili come la desertificazione.

Il loro isolamento richiede studi laboriosi a causa della complessa matrice rappresentata dal terreno e a causa dell'eventuale formazione dei suddetti complessi.

In questo lavoro di tesi si mira alla messa a punto di tecniche atte ad estrarre e purificare tali proteine dal terreno, con lo scopo ultimo di saggiare la presenza e l'attività dell'enzima idrolitico β -glucosidasi. Questo enzima catalizza l'idrolisi del cellobiosio in glucosio (ultimo step della via catabolica della cellulosa) ed è quindi importante per il ciclo del carbonio e per la "qualità" del suolo in generale.

La metodologia utilizzata ha previsto l'estrazione delle proteine extracellulari libere e di quelle legate alla componente umica attraverso l'impiego di due estrattanti. La componente microbica è stata allontanata dall'estratto attraverso filtrazione su membrana batteriologica $0,22\mu\text{m}$. Per favorire la rottura dei complessi formati tra proteine e sostanze umiche, l'estratto è stato sottoposto a trattamenti fisici (shock termico). In seguito è stato desalificato attraverso membrane da dialisi e concentrato tramite ultrafiltrazione.

A questo punto per allontanare le sostanze uniche in eccesso dall'estratto è stato effettuato un passaggio di purificazione utilizzando il polimero polivinilpirrolidone. Il successivo step ha previsto la precipitazione delle proteine con il metodo che utilizza deossicolato e acido tricloroacetico (DOCTCA).

Infine sono state applicate elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti e non denaturanti (SDS-PAGE e NATIVE-PAGE) per visualizzare le proteine estratte nella forma denaturata e nativa con lo scopo ultimo di ricercare la presenza dell'attività β -glucosidasica.

SDS-PAGE e NATIVE-PAGE, in gel sottoposti a colorazione, hanno evidenziato la presenza di bande a diverso peso molecolare.

L'activity stain, per la ricerca dell'attività β -glucosidasica, non ha dato risultati probabilmente a causa dell'inadeguatezza del metodo applicato.

Abstract

Soil is a complex in which enzymes carry out the biochemical reactions making the soil a dynamic system.

Soil enzymes can be classified in: *intracellular* and *extracellular* proteins.

Intracellular enzymes activity depends on microbial proliferation, while extracellular enzymes are released from microorganism and plant cells metabolism, from lytic cells and from cell debris in soil solution. They can be free or in association with humic colloids and clay minerals; it is well known that extracellular enzymes represent a sink of organic matter and biochemical energy for soil because they can be active even under conditions limiting microbial activity. For this reason stabilized enzymes are considered as the last biological protection from soil degradation.

Isolation of extracellular proteins is very difficult because soil is a complex matrix and because proteins are immediately degraded by soil microbes, or became associated with clay minerals and humic colloids.

The aim of this work is to develop a method of extraction and purification of these proteins, and to verify the presence of the hydrolytic enzyme β -glucosidase.

β -glucosidase catalyzes the hydrolysis of cellobiose in glucose (in the final step of cellulose catabolic way) and its role is fundamental in carbon cycle and for soil "quality".

Free and associated extracellular proteins extracted from soil with two different extractants. Soil extracts were then filtered through a 0.22 μ m millipore membrane to remove bacterial cells. To break protein-humic colloid interactions a denaturing/naturing procedure was applied. After that the extract was dialysed, against distilled water, and concentrated by an Amicon PM-10 diaflomembrane under a N atmosphere.

Polyvinylpyrrolidone was used to remove humic substance in a step of purification. Then, the extract was precipitated by the DOC-TCA (Na deoxycholate

detergent) method.

Finally, polyacrylamide gel electrophoresis, under denaturing and not denaturing conditions (SDS-PAGE and NATIVE-PAGE), was performed to separate extracted proteins with the final aim to search β -glucosidase activity. SDS-PAGE and NATIVE-PAGE, in stained gels, showed the presence of spots with different molecular weights.

Activity stain get no results, probably for the method inadequacy.

Indice

1	Introduzione	1
1.1	Sostanza organica	3
1.2	Attività enzimatiche nel terreno	8
1.2.1	Gli enzimi come bioindicatori	9
1.3	La biologia molecolare nel suolo	10
1.4	Le tecniche elettroforetiche per lo studio delle proteine del terreno	12
1.5	Le proteine enzimatiche nel terreno	13
1.6	Evidenze a favore della presenza degli enzimi stabilizzati nel suolo	15
1.7	Fattori che influenzano il legame delle proteine ai colloidi del terreno	15
1.8	Caratteristiche e ruolo degli enzimi stabilizzati nel suolo	16
1.8.1	Ruolo degli enzimi stabilizzati nella vita microbica	17
1.9	Estrazione delle proteine enzimatiche dal terreno	18
1.10	Activity stain	20
1.11	La β -glucosidasi	22
1.12	La β -glucosidasi e il sequestro del carbonio nel terreno	23

2	Materiali e metodi	25
2.1	Campione di suolo	25
2.2	Estratti impiegati nelle analisi chimiche	25
2.2.1	Estratti acquosi	25
2.2.2	Estratti in pirofosfato di sodio alcalino	26
2.3	Estratti impiegati nelle analisi biochimiche	26
2.3.1	Estratti in pirofosfato di sodio neutro	26
2.3.2	Estratti in solfato di potassio	27
2.4	Parametri chimici	27
2.4.1	pH e conducibilità	27
2.4.2	Azoto totale (TN)	27
2.4.3	Carbonio organico totale (TOC)	28
2.4.4	Carbonio idrosolubile (WSC)	29
2.4.5	Carbonio estraibile totale (TEC)	29
2.4.6	Acidi fulvici (FA)	30
2.4.7	Acidi umici (AU)	30
2.5	Metodologie biochimiche	30
2.5.1	Deidrogenasi	30
2.5.2	Fosfatasi	31
2.5.3	β -glucosidasi	32
2.5.4	Ureasi	34
2.5.5	Proteasi BAA	35
2.6	Tattamento del campione con applicazione dell'elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)	36
2.6.1	Filtrazione su membrana batteriologica	36
2.6.2	Tattamento fisico	36

2.6.3	Desalificazione	37
2.6.4	Concentrazione	37
2.6.5	Purificazione	37
2.6.6	Precipitazione	38
2.6.7	Corsa elettroforetica	38
2.7	Trattamento del campione con applicazione dell'elettroforesi in condizioni non denaturanti (Discontinus Native-Page) . . .	41
2.8	Silver staining	43
2.9	Metodo di Bradford	46
2.9.1	SCHEMA DI LAVORO	47
3	Risultati e discussione	49
3.1	Campione di suolo	49
3.2	Estrazione proteica	53
3.3	Tecniche elettroforetiche applicate	57
3.4	Risultati delle corse elettroforetiche	58
3.4.1	Campioni estratti in solfato di potassio	58
3.4.2	Campioni estratti in pirofosfato di sodio neutro	60
3.4.3	Native-Page	63
3.5	Activity stain	66
4	Conclusioni	69

Capitolo 1

Introduzione

Il suolo rappresenta una risorsa le cui qualità intrinseche sono difficilmente rinnovabili e recuperabili. La sua qualità è stata definita come: capacità sostenibile del suolo ad accettare, immagazzinare e riciclare acqua, nutrienti ed energia (Anderson and Gregorich, 1983).

Tuttavia si parla di un complesso ecosistema, ricco di variabili soggette a continui cambiamenti e in parte determinate dal pullulare di forme di vita che concorrono alla sua trasformazione.

Non è ancora possibile parlare di un indicatore univoco e standardizzabile dello stato di qualità di un terreno poiché un'ampia quantità di componenti di diversa sensibilità ed influenza partecipano alla determinazione del suo stato di salute.

La necessità di servirsi di un elemento che indichi tale stato di salute nasce dal problema sempre più grave ed incalzante della degradazione dei suoli. Quando si parla di degradazione di un suolo, ci si riferisce ad un processo che implica una regressione da uno stato di qualità più elevato ad uno inferiore, presupponendo una perdita, da parte del suolo stesso, della capacità di produrre biomassa (FAO and PNUMA, 1984). Questo calo della biomassa è dovuto ad un peggioramento delle proprietà chimiche, fisiche e biologiche

del terreno legate, soprattutto, ad una non corretta gestione del suolo stesso (Lal and Steward, 1990).

I processi degenerativi si verificano in modo particolare dove sussistono fattori predisponenti collegati a specifiche tipologie territoriali e caratteristiche ambientali. La degradazione rappresenta un evento dovuto ad un peggioramento delle capacità fisiche, chimiche e biologiche del terreno sia per cause naturali che antropologiche.

Temperatura, intensità degli agenti atmosferici, frequenza delle precipitazioni, sono alcuni dei fattori naturali che influenzano la condizione di un terreno e nel momento in cui questo si verifica in modo negativo si può andare incontro alla perdita della biodiversità che popola il terreno con notevoli ripercussioni sulle sue caratteristiche benefiche.

Ad ogni modo le cause di degradazione di origine naturale possono essere tollerate da un terreno; diversa è la situazione che si propone quando la depauperazione di un suolo si verifica a causa del suo sfruttamento intensivo, fenomeno che comporta la rapida assimilazione dei suoi nutrienti non seguita dal loro rimpiazzo. Lo svolgimento di lavorazioni agricole inadeguate, l'irrigazione con acque saline, l'utilizzo di fertilizzanti chimici e fitofarmaci non biodegradabili sono delle pratiche che hanno come unico risultato quello di rendere inerte il suolo.

La conseguenza principale della degradazione dei terreni è sicuramente la *desertificazione*, una delle più incombenti emergenze ambientali. Essa può essere considerata come uno stadio irreversibile di degrado del terreno, dovuto all'accrescimento del degrado stesso, con progressiva riduzione del suo potenziale biologico.

Alla luce di queste considerazioni diviene ancor più evidente la ragione per cui è necessario monitorare lo stato di salute del suolo e di avere un indicatore che integri parametri di diversa natura, cioè chimica, fisica e biologica (Doran and Parkin, 1994): monitorare lo stato dei suoli potrebbe essere un

buon accorgimento per preservarne la qualità.

1.1 Sostanza organica

Nella comunità scientifica c'è accordo nel ritenere che il contenuto di sostanza organica sia tra i migliori indicatori della qualità di un suolo, in quanto la sua presenza si riflette sulle proprietà chimiche, fisiche e biologiche del terreno. Essa svolge un ruolo centrale nell'ecosistema suolo, il suo funzionamento può essere considerato "circolare" poiché è punto di partenza e di arrivo per l'evoluzione degli elementi che popolano il suolo stesso: è fonte di nutrizione per organismi e microrganismi costituendo una sorgente di C, N, P e S. Tale facoltà a sua volta permette agli organismi e microrganismi in questione di operare la demolizione e la trasformazione del materiale organico, fondamentale per lo sviluppo di un terreno e, indirettamente, per lo svolgimento del ciclo degli elementi.

In molti terreni la popolazione microbica, grazie all'azione che svolge nel turnover della materia organica e nel ciclo dei nutrienti, diviene fondamentale per il mantenimento della qualità del suolo (Doran and Parkin, 1994). La funzione biologica della sostanza organica nel terreno si intreccia profondamente con le attività della microflora e della microfauna, e dal punto di vista fisico la sua azione influenza positivamente la struttura del suolo (Rus- sel, 1973).

La sostanza organica inoltre, è responsabile della sostenibilità di molti agro-ecosistemi, essa è coinvolta nell'elasticità e nella capacità di resilienza del suolo, ossia rende il sistema in grado di ritornare allo stato originario, o ad uno stato simile a quello iniziale, dopo che interventi esterni ne hanno alterato il naturale equilibrio (Lal e Stewart, 1994).

La sostanza organica è un complesso sistema di componenti che include

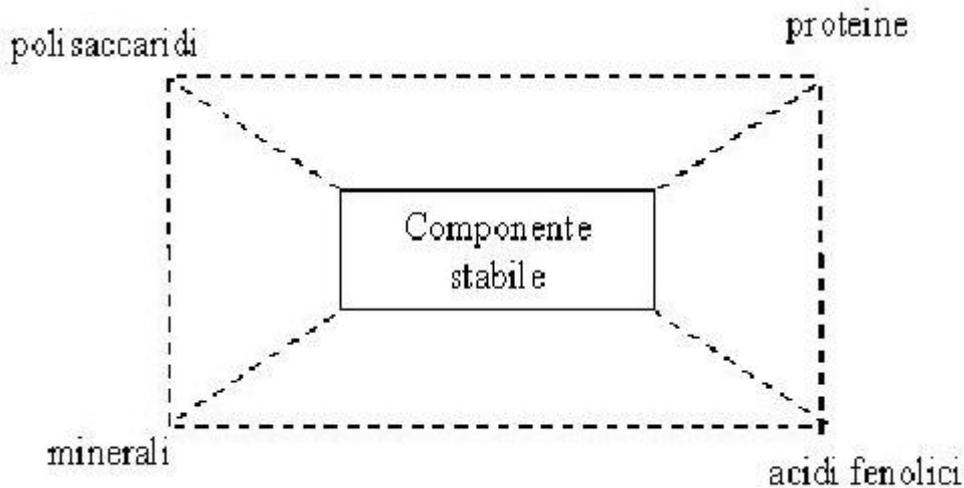


Figura 1.1: Rappresentazione schematica della sostanza organica proposta da Haworth, 1971

residui di piante, di animali, microrganismi e di sostanze a vari stadi di decomposizione rilasciate dalla popolazione vivente del terreno.

Due principali gruppi di composti caratterizzano la sostanza organica e si distinguono per la loro diversa sensibilità alla decomposizione: *sostanze non umiche* e *sostanze umiche propriamente dette*.

Le sostanze non umiche costituiscono la componente più labile della sostanza organica, sono elementi d'immediata metabolizzazione; le sostanze umiche propriamente dette sono più stabili e maggiormente resistenti alla degradazione chimica e biologica (Tate, 1987).

Tali componenti, chimicamente, sono costituite da un nucleo stabile, di natura polifenolica, formato da acidi umici e fulvici, refrattario a denaturazioni chimico-fisiche.

Gli acidi umici e fulvici presentano una struttura polimerica con pesi molecolari variabili tra 500 e oltre 100.000 Dalton (Swift and Postner, 1971).

Si tratta di un pool di sostanze facilmente mineralizzabili e rapidamente disponibili come substrato per i microrganismi del suolo. Essi costituiscono

la componente, labile e reattiva, al livello della quale avvengono l'accumulo, lo scambio ed il riadattamento delle innumerevoli sostanze prodotte dalle popolazioni batteriche, dagli organismi animali e dagli essudati radicali delle piante (Ceccanti et al., 1994; Ceccanti et al., 1997).

Queste sostanze, convenzionalmente, vengono definite come una serie di sostanze organiche eterogenee ad alto peso molecolare, di derivazione naturale, colorate da marrone a nero e formate attraverso una serie di reazioni secondarie di sintesi (Stevenson, 1982; Aiken, 1985). Sono prodotte a seguito della decomposizione di residui di origine animale o vegetale (Mac Carthy, 2001) e sono state ritrovate in tutti gli ambienti sia acquatici sia terrestri (Thurman, 1985), pertanto sono considerate una delle più abbondanti forme di sostanza organica presenti sulla superficie terrestre (Woodwell and Houghton, 1977; Woodwell et al., 1978, Anderson, 1979).

La caratterizzazione chimica della sostanza organica risulta complessa e articolata poiché le sostanze umiche e non umiche condividono, spesso, gli stessi tipi di gruppi funzionali oltre che alcune caratteristiche chimiche e quindi sono difficilmente separabili. Inoltre la bassa solubilità e la complessità chimica che le caratterizza rende difficoltoso studiarle in sito.

Per essere studiate, allora, le sostanze umiche vengono estratte e purificate dal terreno attraverso l'utilizzo di soluzioni estraenti.

Un eccellente estraente è rappresentato dal pirofosfato di sodio alcalino (pH 11) (Stevenson, 1994). L'acidificazione dell'estratto fino a pH 2 permette che gli acidi umici in esso presenti precipitino (Hayes et al., 2001).

Sulla base di analisi spettrofotometriche sono stati attribuiti alle sostanze umiche diversi ipotetici modelli strutturali, uno dei quali è riportato nella figura 1.2.

Escludendo i cosiddetti terreni organici, generalmente il contenuto di sostanza organica nei suoli oscilla tra l'1 e il 2% ([http : //www.sito.regione.campania.it/AGRICOLTURA/pedologia/pdf/sostanzaorganicaparte1](http://www.sito.regione.campania.it/AGRICOLTURA/pedologia/pdf/sostanzaorganicaparte1)), e nono-

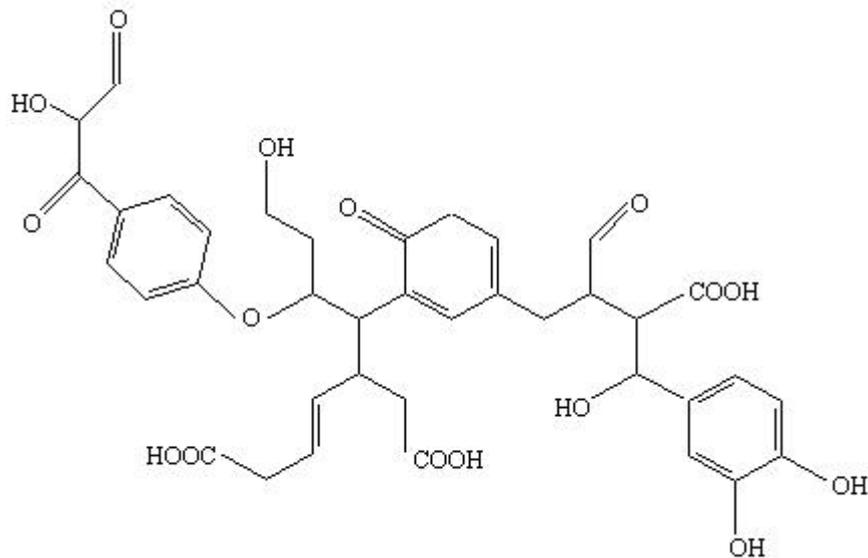


Figura 1.2: Struttura ipotetica della sostanza umica (Stein et al.,1997)

stante il contenuto di sostanze umiche rappresenti lo 0,1 - 1% della fase solida esse svolgono numerose e importanti funzioni di carattere fisico, chimico e biochimico.

Le funzioni di tipo fisico svolte dalle sostanze umiche si riflettono sulle caratteristiche fisiche del terreno, esse ne influenzano la porosità aumentandola e incrementano la coesione tra gli elementi minerali poiché si complessano con la componente argillosa del suolo. La sostanza organica ha quindi un ruolo determinante nella strutturazione del terreno, essa ne limita i rischi di erosione e ne aumenta la capacità di assorbimento dei componenti organici e dell'acqua: i composti organici riescono a creare un'opposizione alla corsa dell'acqua verso gli strati profondi, trattenendola in modo reversibile e rendendola disponibile; la loro azione favorisce l'equilibrio tra aria, acqua e parti solide del terreno, indispensabile per l'azione di contenimento ai fenomeni di erosione, compattamento e formazione di croste.

Nei terreni sabbiosi, dove il contenuto di sostanza organica è così esiguo da

non consentire la formazione di aggregati stabili, l'aggiunta di materiale umificato determina un miglioramento della struttura con una conseguente maggior persistenza dei menischi dell'acqua tra le particelle. Nei terreni limosi ed argillosi, nei quali si osserva comunemente la formazione delle croste superficiali che impediscono l'infiltrazione dell'acqua e degli scambi gassosi tra terreno ed atmosfera, l'aggiunta di sostanza organica umificata riduce l'incidenza di tali croste, grazie proprio al crearsi di aggregati stabili (Chaney and Swift, 1986; Sequi, 1986).

Dal punto di vista chimico la sostanza organica è caratterizzata da elevata capacità di scambio cationico grazie all'elevato contenuto strutturale di gruppi funzionali, acidi e fenolici, con carica negativa. Questa proprietà le conferisce la capacità di regolare dinamicamente la disponibilità e l'assorbimento degli elementi nutritivi: è in grado di ritenere i sali riducendone l'effetto dannoso; aumenta l'adsorbimento di nutrienti cationici (H^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , K^+); è in grado di conservare e rendere più solubili i microelementi del terreno chelando; ecc.

Un esempio dell'azione positiva della sostanza organica si può osservare nei terreni acidi, in essi la maggior solubilità dei metalli pesanti potrebbe indurre più facilmente fenomeni di tossicità, le sostanze umiche però contribuiscono a diminuire la concentrazione del metallo presente in fase liquida, tamponando gli effetti della contaminazione.

Dal punto di vista biochimico la sostanza organica ha la capacità di complessarsi a molecole enzimatiche extracellulari formando i cosiddetti " *complessi umo-enzimatici* ", macromolecole biochimicamente attive, singolari ed essenziali per il terreno come verrà descritto in seguito.

1.2 Attività enzimatiche nel terreno

Probabilmente la maggior parte delle reazioni biologiche che avvengono nel terreno, e che permettono lo svolgersi del ciclo degli elementi sono catalizzate da molecole enzimatiche. La loro estrazione dal terreno è estremamente complessa per una serie di fattori che saranno illustrati in seguito, tuttavia un metodo indiretto per la loro determinazione nel suolo può essere lo studio della loro attività, nonostante questa rappresenti una risultante di diverse attività collegate alla componente biotica e abiotica del terreno (Burns, 1982). Le proteine enzimatiche presenti nel suolo seguono la cinetica di Michaelis e Menten, ma essendo il terreno un sistema estremamente eterogeneo, dove specie animali, vegetali e microbiche producono una moltitudine di isoforme per uno stesso enzima, il risultato è che gli enzimi in questione catalizzeranno una stessa reazione in maniera diversa con una cinetica differente.

Le classi enzimatiche prese in considerazione sono generalmente le idrolasi e le ossidoreduttasi, esse indicano la condizione metabolica del terreno attraverso l'attività che esercitano su sostanze organiche (cellulosa, lignina) e su elementi nutritivi (N, P, S e C).

Le *proteasi* sono gli enzimi che catalizzano le reazioni di rottura dei legami peptidici; frammentano le proteine in peptidi e amminoacidi liberi esocellulari. Sono coinvolte nel ciclo dell'N, infatti permettono che l'azoto proteico venga trasformato in azoto ammoniacale che andrà incontro al processo di nitrificazione operato dai batteri nitrificatori e nitratori.

Le *ureasi* rappresentano un'altra classe di enzimi correlata al ciclo dell'azoto, esse catalizzano l'idrolisi dell'urea in ammoniaca e anidride carbonica, lo studio della attività ureasica è di notevole interesse poiché l'urea costituisce un comune fertilizzante.

Le *deidrogenasi* rappresentano l'attività della biomassa microbica di un terreno, si tratta di enzimi prevalentemente intracellulari che catalizzano la

reazione di ossidazione di composti organici servendosi del NAD^+ e del $NADP^+$ come cofattori.

Le *fosfatasi* permettono che si verifichi il processo di mineralizzazione dal fosforo organico ad inorganico (forma internalizzata da piante e microrganismi). Si tratta di enzimi extracellulari che vengono liberati da vegetali e microbi nel mezzo contenente i nutrienti.

Infine le *β -glucosidasi* sono gli enzimi che catalizzano la reazione di idrolisi del cellobiosio in glucosio nell'ultimo step della via catabolica della cellulosa. Il ciclo del C è notevolmente condizionato dall'attività di questa classe di enzimi, che per questo motivo può riflettere lo "stato di qualità" di un terreno.

1.2.1 Gli enzimi come bioindicatori

Gli enzimi del terreno possono essere considerati degli indicatori biologici dello suo stato di qualità, sono degli ottimi rilevatori della condizione in cui versa il suolo (Dick et al., 1988; Ceccanti et al., 1994; Nannipieri et al., 1994; Masciandaro et al., 1998).

Essi rispondono in tempi rapidi ai cambiamenti chimico-fisici e biologici, sono analiticamente semplici, economici, misurabili, di facile interpretazione, attendibili, riproducibili e scientificamente validi.

Il biomonitoraggio è continuo, poco costoso e non complesso, gli enzimi sono dei magnifici indicatori dello stato di salute di un terreno grazie alla elevata specificità di riconoscimento dei propri substrati, alla sensibilità analitica e al fatto che sono in grado di rilevare la tossicità di mix di inquinanti le cui singole concentrazioni sono al di sotto dei livelli di allarme.

Per esempio in Garcia et al. (1994) viene mostrato come l'attività deidrogenasica indichi lo stato dell'attività microbica nel suolo in aree semiaride. Nel lavoro, infatti, viene dimostrato che in aree soggette a processi degradativi

l'attività delle deidrogenasi è molto scarsa.

1.3 La biologia molecolare nel suolo

È ormai conclamato che anche nella microbiologia del suolo è necessario andare oltre la sola analisi del DNA per comprendere meglio le funzionalità del suolo stesso (Nannipieri et al 2003).

Lo studio della proteomica del terreno si sta diffondendo e sviluppando sempre di più in supporto agli studi genetici di caratterizzazione degli acidi nucleici della popolazione microbica del suolo.

Le proteine hanno ruolo sia funzionale che strutturale in questo ecosistema, esse sono presenti in grandi quantità come molecole extracellulari, fatto che rende ancor più complesso lo studio dell'espressione genica dei microrganismi.

La proteomica è una branca della biologia molecolare che ha preso il sopravvento sulla genomica per svariati motivi; banalmente si può considerare che la sequenza di una proteina non corrisponde perfettamente alla semplice traduzione della sequenza delle triplette del gene da cui deriva, inoltre è oramai notoriamente confutata la teoria "un gene una proteina", poiché è chiaramente risaputo che dalla trascrizione alla sintesi della proteina funzionante la molecola in questione va incontro ad un'ampia serie di modificazioni. Tali modificazioni sono di tipo post-trascrizionale (splicing alternativo dell'mRNA, mRNA editing, ecc.) e post-traduzionale (glicosilazione, fosforilazione, tagli proteolitici, ecc.), e hanno come esito la generazione di varie isoforme di una stessa molecola proteica.

Nella post-genomica si mira all'analisi del prodotto completo (la proteina matura) piuttosto che a quella del produttore (il gene da cui la proteina deriva), lo studio allora può risultare più informativo considerando che tra

”prodotto” e ”produttore” ci sono notevoli passaggi di modificazione.

Le tecniche di biologia molecolare utilizzate finora per lo studio del DNA dei microrganismi presenti nel terreno hanno messo in evidenza la presenza di una proliferante biodiversità (Adams 1954; Chandler 1999; Dierksen 2002); tuttavia la tipizzazione microbica in un terreno non è molto informativa per quello che concerne l'attività dei microrganismi in questione, si tratta di una mera individuazione o caratterizzazione della componente microbica che non può fornire indicazioni su ruoli e caratteristiche che questi organismi ricoprono nell'ecosistema che abitano.

Diversa è la situazione se si considera di valutare i prodotti che i microrganismi generano, la loro analisi quantitativa e qualitativa dà sicuramente più informazioni sull'attività microbica nel terreno.

Una notevole potenzialità della ricerca delle proteine rispetto a quella degli acidi nucleici è rappresentata proprio dalla possibilità di identificare le specie microbiche biochimicamente attive in un terreno: le proteine vengono prodotte solo se il microrganismo è attivo e ne necessita, vengono messe a disposizione esclusivamente quando ne è richiesta l'attività, a differenza degli acidi nucleici che persistono anche in fasi di inattività microbica.

Le proteine costituiscono un eccellente strumento di analisi, la loro individuazione e il successivo esame sono agevolati dalla disponibilità di svariate tecniche collaudate.

Lavori che mostrano la molteplicità microbica nel terreno sono per esempio Moreno et al. 2008 e Hofman e Dusek 2003.

1.4 Le tecniche elettroforetiche per lo studio delle proteine del terreno

Il termine elettroforesi descrive la migrazione di particelle cariche sotto l'influenza di un campo elettrico (Wilson e Walker, 2002).

L'SDS-PAGE è un tipo di elettroforesi su gel di poliacrilammide che viene svolta in condizioni denaturanti; essa fornisce un'analisi qualitativa di miscele di proteine e permette la loro separazione in base alle dimensioni che presentano. Le proteine da separare corrono sotto l'azione di un campo elettrico attraverso le maglie di poliacrilammide del gel che agiscono come un setaccio molecolare.

I campioni da analizzare vengono dapprima trattati con un sample buffer contenente SDS (sodio dodecilsolfato) e β -mercaptoetanolo o DTT. L'SDS è un detergente anionico che si lega fortemente alle proteine e le denatura; il β -mercaptoetanolo e il DTT destabilizzano, invece, la loro struttura terziaria rompendo i ponti disolfuro.

Dopo il trattamento con il sample buffer le proteine assumono una forma filamentosa e si circondano di molecole di SDS cariche negativamente: il risultato è la loro migrazione attraverso le maglie del gel, verso l'anodo, in base alle proprie dimensioni e non alla propria carica in quanto completamente schermata dal detergente.

Nel buffer utilizzato è presente un colorante, il blu di bromofenolo, che permette di seguire l'avanzamento del fronte durante la corsa elettroforetica.

Le proteine presenti nel campione vengono visualizzate come *bande* in seguito alla colorazione del gel. Vari tipi di colorazione possono essere effettuati a seconda delle esigenze, la più diffusa si serve del Blu di Coomassie, un colorante che è in grado di rivelare fino a 0,1 μg di proteina per banda (Bollag 2nd ed., 1996).

Tuttavia in alcuni casi è possibile che la concentrazione proteica nel campione

in esame sia molto bassa, e che la colorazione precedentemente citata non sia abbastanza sensibile. In questi casi ci si può servire della colorazione con nitrato d'argento (Silver Stainig).

Il Silver Staining è una colorazione estremamente sensibile, ha un range di sensibilità che va dagli 0,3 ai 10 ng di proteine per banda, a seconda del protocollo utilizzato.

Anche in questo caso le proteine presenti nel campione vengono visualizzate come bande nel gel in seguito a corsa elettroforetica; quello che si verifica è che gli ioni Ag^+ legano le catene laterali degli amminoacidi, principalmente gruppi sulfidrilici e carbossilici (Switzer et al, 1979; Oakley et al., 1980; Merrill et al., 1981; Merrill et al., 1986), e si riducono ad argento metallico libero (Rabilloud, 1990; Rabilloud, 1999).

1.5 Le proteine enzimatiche nel terreno

Nella matrice suolo lo stesso enzima può avere diversa localizzazione. Adottando un'ampia visione gli enzimi del terreno possono essere divisi in due gruppi fondamentali: enzimi intracellulari ed enzimi extracellulari.

I primi possono avere localizzazione citoplasmatica, periplasmatica (nei batteri gram-negativi) o possono essere adesi alla superficie esterna di cellule metabolicamente attive.

Gli enzimi a localizzazione extracellulare possono trovarsi come enzimi liberi nel suolo, rilasciati nella fase acquosa del terreno come prodotti del consueto ciclo vitale cellulare, o possono trovarsi complessati con i costituenti propri del terreno come i colloid minerali (le argille) e colloid organici (le sostanze umiche) (Burns 1982). Questo stato conferisce agli enzimi la caratteristica di essere decisamente resistenti alla denaturazione, all'attività proteolitica e alla degradazione in generale, a differenza degli enzimi extracellulari liberi

soggetti ad una rapida decomposizione ad opera di proteasi, microbi (Burns 1982; Nannipieti et al., 2002) ed altri fattori tipici della complessa matrice in cui si trovano.

Lo studio degli enzimi a localizzazione extracellulare, ed in particolare di quelli complessati (complessi umo-enzimatici), risulta essere particolarmente interessante in virtù delle caratteristiche citate di queste macromolecole e grazie alla loro indipendenza dalla proliferazione microbica.

I complessi umo-enzimatici sono il risultato della formazione di legami deboli e covalenti tra le proteine enzimatiche e le sostanze umiche del terreno. Questi complessi sono stabili e biochimicamente attivi, una preziosa caratteristica che li qualifica è rappresentata dal fatto che la loro attività può svolgersi anche in terreni le cui condizioni siano proibitive per i microrganismi che li popolano (Nannipieri et al., 1996) e non sono soggetti a fattori di regolazione che ne reprimono o promuovono l'attività.

Per questo motivo i complessi umo-enzimatici sono stati proposti come le ultime difese biologiche del suolo sempre più esposto a processi di degradazione irreversibili come la desertificazione.

La componente umica del terreno con attività biologica può essere considerata un indicatore ottimale del livello di degradazione di un terreno, è connessa alla sua resilienza, e può quindi indicare la capacità del suolo di essere recuperato.

I complessi umo-enzimatici possono essere considerati una sorta di "registratori" della storia del suolo; essi ne riflettono il passato, per la presenza dei complessi umici, ed il presente, per l'azione catalitica che svolgono e per il ruolo che rivestono nel ciclo dei nutrienti (Masciandaro et al 1998). Rappresentano un "punto di transizione" tra i processi chimici e microbiologici del terreno (Ceccanti et al., 1997).

1.6 Evidenze a favore della presenza degli enzimi stabilizzati nel suolo

L'evidenza più importante a sostegno della presenza degli enzimi stabilizzati nel terreno deriva da studi sulla distribuzione dell'azoto nel suolo esaminato attraverso idrolisi acida dello stesso (Bremner, 1965), si osservino i seguenti dati:

- **Amminoacidi:** dal 30 al 45% dell'N totale (Stevenson 1986; Schulten e Schnitzer, 1998)
- **N minerale:** 2% di quello totale (Stevenson, 1986)
- **N derivante da masse microbiche:** 4% di quello totale (Jenkinson, 1988)

Ragionando su questi valori e considerando che l'idrolisi acida rompe i legami peptidici, non rappresenta un'ipotesi azzardata considerare che la maggior parte dell'azoto amminoacidico negli idrolisati del suolo derivi da proteine extracellulari stabilizzate dai colloidi (Bremner, 1985).

1.7 Fattori che influenzano il legame delle proteine ai colloidi del terreno

- **Argilla:** area superficiale, capacità di scambio ionico, ioni superficiali residenti, idratazione.
- **Proteina:** massa molecolare, punto isoelettrico, numero di siti di legame, solubilità, concentrazione.

- **pH:** nel mezzo di reazione, all'interfaccia solido/liquido.
- **Acqua nel terreno:** umidità, forza ionica, composizione ionica, viscosità.

1.8 Caratteristiche e ruolo degli enzimi stabilizzati nel suolo

I complessi umo-enzimatici, come tracciato in precedenza, derivano dalla formazione di legami tra le sostanze umiche e le argille con enzimi liberi e sono considerati una riserva di materia e di energia biochimica del suolo. Essi sono attivi anche in condizioni proibitive per l'attività dei microrganismi come ad elevate forze ioniche, valori estremi di pH e temperatura; sono in grado di neutralizzare sostanze tossiche per le forme di vita (anche grazie all'associazione con la componente umica che agisce da chelante) e garantiscono il procedere dei cicli degli elementi (C, P, N, S).

Entrambi i modelli proposti da Mayauon e Burns (e modificati da Burns nel 1982), dal punto di vista chimico descrivono l'enzima ancorato direttamente o attraverso un rivestimento di silicati amorfi ad argilla cristallina. L'enzima sarebbe immobilizzato e protetto da una maglia di sostanze fenoliche (Nannipieri, 2006) i cui pori sarebbero abbastanza larghi da permettere il passaggio di substrato e prodotto, ma allo stesso tempo preserverebbero la proteina da molecole ad alto peso molecolare (come le proteasi).

Gli enzimi stabilizzati potrebbero essere delle glicoproteine (Getzin e Rosefiel, 1971; Satyanarayana e Getzin, 1973) più resistenti alla degradazione termica e proteolitica.

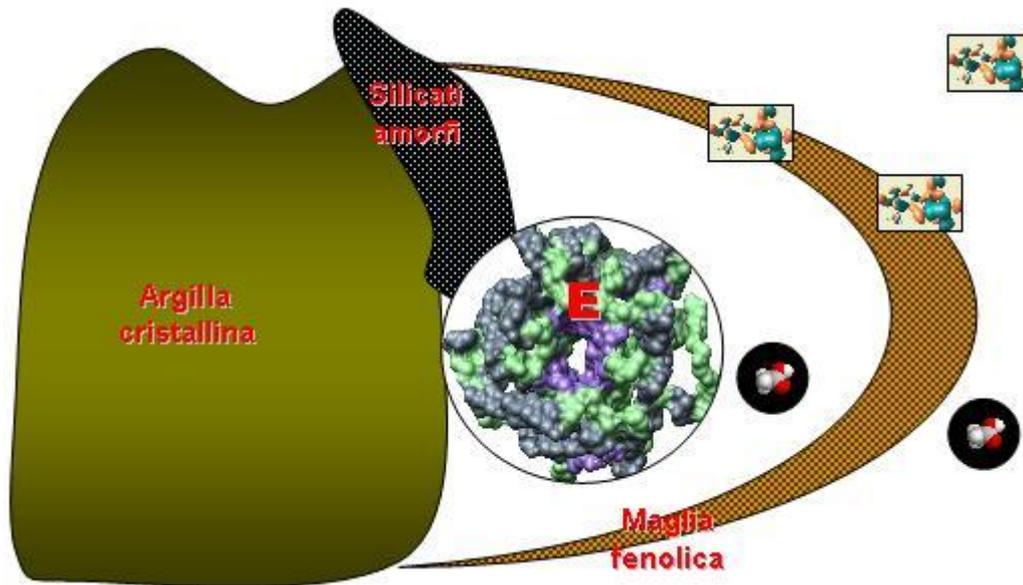


Figura 1.3: Modello proposto da Mayaudon e Burns, 1982

1.8.1 Ruolo degli enzimi stabilizzati nella vita microbica

Ipotesi formulate descrivono i complessi uomo-enzimatici come i principali fattori della strategia nutrizionale dei microrganismi nel suolo (Burns, 1982), vale a dire che essi permetterebbero ai microrganismi in questione di individuare i nutrienti come substrati e di internalizzarli come prodotti.

Grandi quantità di macromolecole insolubili sono presenti nel suolo (cellulosa, lignina, amido, lipidi, proteine, ecc.), i microrganismi li degradano e li utilizzano come fonti energetiche e fattori di crescita.

La strategia nutrizionale che un microrganismo attua si distinguerebbe in quattro momenti:

- individuazione del substrato
- attivazione di un meccanismo di degradazione

- degradazione
- assimilazione dei prodotti

L'enzima stabilizzato catalizza la trasformazione di specifici substrati in prodotti, i quali possono poi essere internalizzati dalle cellule. La sua funzione può essere quella di *chemoattrattore*, permettendo alle cellule di muoversi verso i substrati; o *induttore* stimolando la produzione dell'enzima stesso che dovrà entrare in contatto con il substrato disponibile. Probabilmente è lo stesso enzima, presente a basse concentrazioni nel terreno come forma costitutiva, che libera l'induttore, cioè il prodotto, dal substrato poco diffusibile. L'induttore a questo punto stimola la produzione di elevati livelli di enzima che continuano a fornire alla cellula la sostanza d'interesse.

Tale strategia regolatoria permette di ottenere nutrimento con il minimo dispendio di energia, la cellula invia un "emissario" rappresentando da impulsi di enzima a basse concentrazioni e attende un informatore che indica se ci sono condizioni favorevoli alla sintesi enzimatica.

1.9 Estrazione delle proteine enzimatiche dal terreno

La letteratura fornisce valide informazioni relative alle modalità di estrazione della componente proteica dal suolo. Utili sono le pubblicazioni che descrivono efficacia e caratteristiche delle soluzioni utilizzate come estraenti delle proteine dal terreno: *pirofosfato di sodio*, *tampone fosfato*, *solfo di potassio*, *citrato*, o sali in generale.

Tabatabai e Fu, 1992, Nannipieri et al., 1980 e 1996, sono solo alcune delle pubblicazioni da cui possono essere reperite informazioni autorevoli per l'estrazione proteica dal terreno.

Nel lavoro di Busto e Perez-Mateos, 2000, si affronta la caratterizzazione dell'enzima β -glucosidasi attraverso lo studio della sua attività in differenti frazioni di suolo. L'estrante utilizzato è il pirofosfato di sodio a pH 7,1.

In Murase et al. 2003 viene descritta una metodica per l'isolamento di proteine da campioni provenienti da serra. Per l'estrazione delle molecole proteiche gli autori si sono serviti di tampone fosfato a pH 6, l'aumento del valore di pH comporta l'estrazione di grandi quantità di materiale organico non proteico (affermazione valida anche per altri tipi di estratti).

Dai lavori citati, e non solo, si evince che per l'estrazione degli enzimi dal terreno vengono utilizzati per lo più pirofosfato di sodio e tampone fosfato a pH neutro. In particolare, il pirofosfato di sodio è un valido estrante degli enzimi stabilizzati, in quanto più efficiente nella capacità di estrazione della sostanza umica rispetto ad altri estranti (Nannipieri et al., 1974; Ruggiero e Radogna, 1984).

Il pirofosfato di sodio a pH alcalino è in grado di estrarre in maniera eccellente la frazione umica del terreno, un inconveniente per lo studio dell'attività enzimatica nasce dal fatto che l'elevato valore di pH non mantiene l'attività stessa delle proteine, e per questo motivo viene generalmente utilizzato *pirofosfato di sodio a pH 7,1*, valore che comunque permette una discreta estrazione dei complessi umici (Masciandaro e Ceccanti, 1999; Ceccanti e Masciandaro, 2003; Clapp and Hayes, 1999); col calo del pH cala l'efficacia di estrazione di quest'ultimi.

Altri tipi di estranti, come il *solfato di potassio* o il *tampone fosfato a pH 6* si rendono utili per l'estrazione delle proteine extracellulari libere in particolare (Masciandaro et al., 2007).

L'estrazione e la successiva purificazione delle molecole proteiche dal terreno rappresentano dei procedimenti abbastanza laboriosi poiché il terreno è una matrice estremamente complessa e ricca di interferenti. Per esempio la determinazione della concentrazione proteica extracellulare con i metodi

colorimetrici classici (es. colorazione di Bradford) risulta essere difficoltosa a causa dell'elevata presenza di interferenti, in più la formazione degli stessi complessi umo-enzimatici se da un lato può mantenere più a lungo un'attività biochimica, dall'altro ostacola l'isolamento delle macromolecole d'interesse. Molti dati riportati in letteratura mostrano l'efficacia di purificazione del polivinilpirrolidone (PVP) dalle sostanze umiche (Ceccanti et al., 1978; Biederbeck and Paul, 1973). Il passaggio attraverso una colonna di PVP di un estratto, o la sua incubazione con il polimero in polvere può dimostrarsi efficace per rimuovere la sostanza umica presente.

Una ulteriore accortezza per aumentare l'efficienza di estrazione è l'aggiunta di inibitori di proteasi durante l'estrazione stessa. L'EDTA rappresenta un noto inibitore di metallo proteasi grazie alla sua azione chelante, esso deve essere aggiunto al campione durante l'estrazione (Tabatabai e Fu, 1994).

Lo studio delle macromolecole enzimatiche del terreno si rivela ancora più misterioso se si considera che sono pochi i lavori che ne descrivono le tecniche di purificazione, di isolamento, e di caratterizzazione in generale. Alcuni dati sono riportati in Masciandaro et al., 2007, il lavoro ha esaminato l'efficacia d'estrazione di tre differenti estraenti: pirofosfato di sodio a pH 7,1, tampone fosfato a pH 6 e solfato di potassio. Sugli estratti ottenuti, da due diversi campioni, si è poi saggiata la presenza di proteine tramite SDS-PAGE e si è ricercata l'attività dell'enzima β -glucosidasi.

1.10 Activity stain

L'activity stain è una tecnica estremamente sensibile e versatile che permette di individuare la presenza di un'attività enzimatica di interesse *in situ*, in seguito a corsa elettroforetica. Essa si basa sulla specificità di catalisi delle proteine enzimatiche che in contatto con un analogo del loro substrato

naturale catalizzano una reazione che viene visualizzata grazie allo sviluppo di un prodotto fluorescente in corrispondenza delle bande che contengono l'enzima (si evidenzia tramite un transilluminatore a UV); oppure si può sviluppare contrasto tra lo sfondo del gel e le bande che esibiscono attività. Il risultato ottenuto si visualizza, in pratica, grazie alla capacità della molecola substrato di essere trasformata in un prodotto che si può colorare.

Per facilitare l'operazione di caratterizzazione della proteina può essere utile caricare dei duplicati del campione nel gel per poter effettuare in parallelo alla caratterizzazione per via biochimica anche una classica colorazione tramite silver o altro metodo di colorazione.

I vantaggi dell'activity stain sono:

- **rapidità:** nel giro di poche ore dalla fine della corsa è possibile visualizzare il risultato.
- **sensibilità:** varia a seconda dei protocolli applicati, in generale è più sensibile della colorazione con il silver.
- **versatilità:** il gel può essere incubato in una soluzione contenente il substrato riconosciuto dall'enzima; in alternativa il substrato può essere incubato in un gel di agarosio che ricopre quello di poliacrilammide o caricato direttamente nei pozzetti del gel insieme al campione.

Alcuni lavori riportati in letteratura sono addirittura stati svolti eseguendo elettroforesi in condizioni denaturanti con successiva rinaturazione delle proteine prima di valutare l'attività su banda (Kee-Hong et al., 2007).

1.11 La β -glucosidasi

Come descritto in precedenza la β -glucosidasi è un enzima di fondamentale importanza per il ciclo del carbonio e per la "qualità" del suolo in generale in quanto catalizza l'ultima reazione della via catabolica della cellulosa, idrolizzando il cellobiosio in glucosio, e rendendo quindi disponibile questo nutriente alle forme di vita che popolano il suolo.

Dalla letteratura si può venire a conoscenza del fatto che nel terreno ne esi-

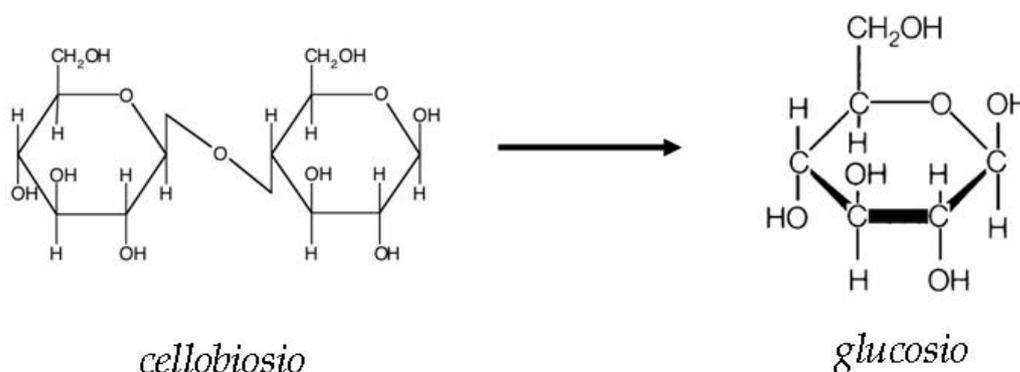


Figura 1.4: Reazione catalizzata dalla β -glucosidasi nel suolo.

stano varie isoforme prodotte da diversi microrganismi (Turner et al., 2002; Busto e Perez-Mateos, 2000; Tabatabaei et al., 2003).

Busto e Perez-Mateos (1995) dimostrarono che la β -glucosidasi extracellulare presente nel terreno è stabilizzata dall'associazione con le sostanze umiche.

Varie metodiche sono state adottate con lo scopo di purificare e caratterizzare la forma extracellulare di questo enzima, e l'elettroforesi su gel di poliacrilamide potrebbe essere una tecnica molto utile per affrontare questo studio grazie alla sua relativa semplicità, alla sua capacità di separazione e alla sua versatilità; inoltre lo svolgimento di elettroforesi in condizioni non denaturanti, permettendo il mantenimento dell'attività enzimatica, potrebbe fornire informazioni valide e precise sulle proteine oggetto dello studio.

L'applicazione di tecniche elettroforetiche potrebbe permettere di purificare, identificare e nella migliore delle ipotesi sequenziare (tramite spettrometria di massa) le eventuali isoforme della β -glucosidasi presenti nei terreni esaminati, con la possibilità di confrontare i risultati tra campioni con diverse caratteristiche (contenuto di sostanza organica, livello di degradazione e di inquinamento).

Di contro assai pochi sono i dati disponibili sull' SDS-PAGE e NATIVE-PAGE applicata alle proteine extracellulari del terreno.

Di qui la necessità di mettere a punto una metodica che permetta al meglio di aggirare queste complicazioni, affinando i metodi fin'ora utilizzati e individuando nuove strade da seguire.

1.12 La β -glucosidasi e il sequestro del carbonio nel terreno

Una parte della comunità scientifica, negli ultimi tempi, sta mostrando interesse verso un nuovo tema che si sta sviluppando sempre di più: intrappolare il carbonio nel suolo per prevenirne la perdita e contrastare l'intensificazione dell'effetto serra.

L'anidride carbonica è il gas che maggiormente contribuisce allo sviluppo dell'effetto serra (www.lenntech.com/italiano/effetto-serra/meccanismo), il suo aumento nell'atmosfera è probabilmente dovuto all'utilizzo dei combustibili fossili (per la generazione principalmente di energia elettrica) che la rilasciano in seguito al processo di combustione.

Le piante, le alghe e il fitoplancton oceanico catturano l'energia solare tramite fotosintesi, e la usano per convertire l'anidride carbonica in carbonio (ciclo del carbonio).

Nel ciclo naturale del carbonio, circa metà della CO_2 atmosferica viene scambiata con le foreste e il suolo e metà con gli oceani, mantenendo un equilibrio che non comporta nessun aumento del carbonio nell'atmosfera.

Nel ciclo perturbato del carbonio, imputabile all'aumento dei gas serra nell'atmosfera, circa un quarto della CO_2 va al suolo e alla vegetazione, un quarto agli oceani e metà si accumula nell'atmosfera (www.lenntech.com/italiano/effetto-serra/meccanismo).

Uno studioso delle scienze del suolo dell'Università dello Stato dell'Ohio, Rattan Lal (www.lenntech.com/italiano/effetto-serra/meccanismo), ha affermato che la perdita di carbonio da parte di piante e terreno da quando l'agricoltura ha cominciato a svilupparsi si aggira intorno ai 140 bilioni di tonnellate, di cui 80 sono state perse direttamente da suolo.

Una soluzione proposta da molti studiosi per fermare tutti i problemi correlati al "declassamento" del carbonio è proprio quella di intrappolare questo elemento nel terreno. Questa manovra può essere condotta in diversi modi: l'interruzione dell'agricoltura intensiva, che potrebbe permettere ad un acre di terreno di immagazzinare circa una tonnellata di CO_2 in un anno; l'aggiunta di composti ricchi di carbonio al suolo; l'impiego di colture di copertura (cover crops) per una parte dell'anno, ecc.

Alla luce di quanto detto la β -glucosidasi, in quanto strettamente coinvolta nel ciclo del carbonio, sviluppa una funzione considerevole; la conoscenza approfondita delle sue caratteristiche chimiche e biochimiche, delle vie di sintesi che portano alla sua formazione, delle modalità con cui "opera" potrebbe costituire un aiuto più che valido per l'applicazione di un piano di "ripristino" del carbonio e del suo ciclo.

Capitolo 2

Materiali e metodi

2.1 Campione di suolo

Il campione prelevato utilizzato per lo studio condotto rappresentava un terreno in buone condizioni, con un contenuto di sostanza organica pari a circa il 5 %.

Il campione di terreno è stato omogeneizzato e setacciato con lo scopo di rimuovere radici e pietre e conservato a 4 °C.

2.2 Estratti impiegati nelle analisi chimiche

2.2.1 Estratti acquosi

In tubi di plastica da centrifuga sono stati posti campione e acqua distillata in rapporto 1:10 w/v. I tubi sono stati messi ad agitare in bagno termostatico (tipo Doubnoff) a 37 °C o a 60 °C per 1 ora. Gli estratti sono stati quindi centrifugati a 9000 rpm per 15 minuti ed il surnatante è stato filtrato su carta rapida.

Gli estratti a 37 °C sono stati utilizzati per eseguire le analisi di pH e conducibilità elettrica, mentre sull'estratto a 60°C è stato determinato il carbonio idrosolubile.

2.2.2 Estratti in pirofosfato di sodio alcalino

In tubi di plastica da centrifuga è stato messo il campione e la soluzione di pirofosfato di sodio alcalino ($Na - PPi/H_3PO_4$) 0,1 M a pH 11, in rapporto 1:10 w/v. I tubi sono stati posti ad agitare in bagno termostatico a 60 °C per 4 ore. Gli estratti sono stati quindi centrifugati a 9000 rpm per 15 minuti e il surnatante è stato filtrato su carta rapida.

Su tali estratti è poi stato determinato il carbonio estraibile totale (TEC) e gli acidi fulvici (AF).

2.3 Estratti impiegati nelle analisi biochimiche

2.3.1 Estratti in pirofosfato di sodio neutro

Estrazione con Pirofosfato di sodio neutro 0,1M pH 7,1

Il sodio pirofosfato ($Na - PPi/H_3PO_4$) è stato aggiunto in rapporto 1:5 (w/v), l'estrazione è stata condotta a 37 °C per 24 h in agitazione in bagno termostatico con 200 oscillazioni per minuto (Masciandaro a Ceccanti 1999).

Come inibitore di metallo proteasi è stato aggiunto EDTA 10mM.

2.3.2 Estratti in solfato di potassio

Estrazione con solfato di potassio 0,5M pH 6,6

Il solfato di potassio (K_2SO_4) è stato aggiunto in rapporto 1:3 (w/v), l'estrazione è stata condotta a RT per 1h in agitazione in bagno termostatico con 200 oscillazioni per minuto (Murase et al.,2003; Hofman and Dusek 2003). Come inibitore di metallo proteasi è stato aggiunto EDTA 10mM.

Alcune estrazioni sono state condotte aggiungendo direttamente all'estrante, durante l'estrazione, polivinilpirrolidone (PVP) al 2% e sodiododecilsolfato (SDS) all' 1% rispetto al peso del campione di terreno.

2.4 Parametri chimici

2.4.1 pH e conducibilità

pH e conducibilità elettrica sono stati determinati sugli estratti acquosi a 37 °C. Le misure di pH sono state eseguite tramite un Titroprocessor 672 della Methron (Switzerland), con scala di 0,01 unità, dotato di un elettrodo a vetro combinato Methron AG CH-9100 Herisau. Prima delle misure l'apparecchio è stato tarato con due soluzioni tampone rispettivamente a pH 4 e 7. La conducibilità elettrica è stata determinata mediante l'utilizzo di un conducimetro tascabile modello Conmet 2 (Hanna Instruments Italia).

2.4.2 Azoto totale (TN)

La determinazione dell'azoto totale è stata effettuata su 60-80 mg di campione setacciato molto fine, attraverso l'utilizzo di un analizzatore elementare FP-528 PROTEIN/NITROGEN DETERMINATOR (Leco). Il metodo è

fondato sulla completa ed istantanea ossidazione del campione per flash combustion (900 °C), con conseguente conversione di tutte le sostanze organiche ed inorganiche in prodotti gassosi. Tutte le forme di azoto sono convertite (atmosfera ossidativa) in ossidi di azoto (NO_x), raccolte ed infine ridotte ad azoto molecolare (N₂). Tra i prodotti della combustione sono presenti anche CO₂ e H₂O che sono eliminati grazie alla presenza di due trappole. La quantità dell'azoto viene rilevata da una cella a conduttibilità termica ed espressa in percentuale. L'apparecchio viene calibrato con EDTA con concentrazione di azoto pari a 9,57%.

2.4.3 Carbonio organico totale (TOC)

La determinazione del carbonio organico totale è stata effettuata su 50-100 mg di campione setacciato molto fine, attraverso l'utilizzo di un analizzatore elementare RC-412 MULTIPHASE CARBON (Leco).

Il metodo è fondato sulla completa ed istantanea ossidazione del campione per flash combustion con conseguente conversione di tutte le sostanze organiche ed inorganiche in prodotti gassosi. Durante la combustione del campione, in atmosfera ossidativa, tutte le forme di carbonio (ad eccezione di qualche carburo simile a SiC) sono convertite in CO₂.

Il campione è stato introdotto all'interno di una fornace impostata per passare da una temperatura di 300 °C ad una di 950 °C. Con l'aumentare della temperatura si ha la combustione delle diverse forme del carbonio: per la parte organica il range di temperatura di ossidazione-volatilizzazione è compreso fra i 300 °C e i 650 °C, mentre per la frazione inorganica tra i 650 °C e i 950 °C. La CO₂ prodotta viene trasportata tramite un flusso di ossigeno fino ad una cella IR, dove, attraverso un sistema di spettrometria infrarossa, lo strumento è in grado di determinare l'identità e la quantità delle molecole residenti all'interno della cella.

Il quantitativo di carbonio viene espresso in percentuale.

L'apparecchio viene calibrato con EDTA con concentrazione di carbonio pari a 40,9%.

2.4.4 Carbonio idrosolubile (WSC)

Il carbonio idrosolubile è stato determinato sugli estratti acquosi a 60°C. Prove: 2ml di estratto + 1ml di $K_2Cr_2O_7$ 2N + 2ml di H_2SO_4 concentrato. Le prove vengono riscaldate a 150 °C per 2 ore. Una volta raffreddate sono state effettuate le letture spettrofotometriche alla lunghezza d'onda di 590 nm contro un bianco ottenuto nelle stesse condizioni sperimentali delle prove, ma in assenza di campione.

Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni, ed espresse in $\mu\text{gC/gss}$, mediante una retta standard ricavata da concentrazioni note di carbonio (glucosio), trattato nelle stesse condizioni.

2.4.5 Carbonio estraibile totale (TEC)

Il carbonio estraibile totale è stato determinato sugli estratti in pirofosfato alcalino pH 11.

Prove: 2 ml di estratto + 1 ml di $K_2Cr_2O_7$ + 2 ml di H_2SO_4 concentrato. Le prove sono state scaldate alla temperatura di 150°C per due ore. Dopo il raffreddamento sono state effettuate le letture spettrofotometriche alla lunghezza d'onda di 590 nm, contro un bianco ottenuto nelle stesse condizioni sperimentali delle prove, ma in assenza di campione.

Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni, ed espresse in $\mu\text{gC/gss}$, mediante una retta standard ricavata da concentrazioni note di carbonio (glucosio) trattato nelle stesse condizioni.

2.4.6 Acidi fulvici (FA)

La determinazione degli acidi fulvici viene eseguita sull'estratto in pirofosfato alcalino dopo acidificazione, fino a pH 2, con H_2SO_4 concentrato. A questo pH infatti, gli acidi umici precipitano, mentre gli acidi fulvici rimangono in soluzione.

Prove: 2 ml di estratto + 1 ml di $K_2Cr_2O_7$ + 2 ml di H_2SO_4 concentrato. Le prove sono state scaldate alla temperatura di $150^\circ C$ per due ore. Dopo raffreddamento sono state effettuate le letture spettrofotometriche alla lunghezza d'onda di 590 nm, contro un bianco preparato nelle stesse condizioni sperimentali, ma in assenza di campione. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni, ed espresse in $\mu gC/gss$, mediante una retta standard ricavata da concentrazioni note di carbonio (glucosio) trattato nelle stesse condizioni.

2.4.7 Acidi umici (AU)

La determinazione avviene per differenza tra il carbonio estraibile totale (TEC) dell'estratto in pirofosfato alcalino e gli acidi fulvici (AF) dello stesso estratto.

2.5 Metodologie biochimiche

2.5.1 Deidrogenasi

Le deidrogenasi sono enzimi intracellulari appartenenti al gruppo delle ossidoreduttasi che catalizzano l'ossidazione di composti organici. Il substrato della reazione è costituito dalla sostanza organica, mentre il co-fattore sintetico utilizzato per la misura dell'attività deidrogenasica è costituito dall'INT

(p-Iodio-Nitro-Tetrazolium-chloride), che per riduzione forma un prodotto colorato: INTF (p-Iodo-Nitro-Tetrazolium-Formazano), determinabile per via spettrofotometrica. Questa attività enzimatica è stata determinata secondo il metodo messo a punto da Masciandaro et al., (2000). I campioni sono stati preparati in provette di plastica da 10 ml.

- Prove: 0,5 g di terreno + 0,2 ml di substrato INT allo 0,4% (in acqua bidistillata) + 0,1 ml d'acqua bidistillata (per portare il campione al 60% della capacità di campo).
- Controlli: 0,5 g di terreno + 0,3 ml d'acqua bidistillata (per portare il campione al 60% della capacità di campo).

Prove e controlli sono stati lasciati riposare per 20 ore al buio, non occorre tappare le provette perchè l'INT prevale sull'ossigeno (il naturale substrato della deidrogenasi), nell'accettare gli elettroni. L'INTF, prodotto della reazione di ossido-riduzione, è stato estratto mediante aggiunta di 5 ml di una soluzione estraente composta da tetracloroetilene e acetone (1:1,5 v/v). I campioni sono stati agitati meccanicamente per circa 1 minuto e successivamente centrifugati a 3500 rpm per 10 minuti. Le letture spettrofotometriche sono state effettuate sul surnatante alla lunghezza d'onda di 490 nm, contro un bianco contenente la sola soluzione estraente. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni, espresse in $\mu\text{g INTF/gss}^*\text{h}$, mediante una retta standard ottenuta con concentrazioni note di INTF.

2.5.2 Fosfatasi

La fosfatasi catalizza l'idrolisi degli esteri fosforici a fosfato ed è, quindi, un enzima rappresentativo del ciclo del fosforo. Il metodo è basato sulla determinazione per via colorimetrica del Para-Nitro-Fenolo (PNF), prodotto

dall'idrolisi del Para-Nitrofenil-Fosfato-esaidrato (PNP), che è il substrato impiegato in questo saggio enzimatico (Nannipieri et al., 1980).

Sono state utilizzate provette di plastica da 10 ml.

- Prove: 0,5 g di terreno + 2 ml di tampone maleato 0,1M pH 6,5 + 0,5 ml di substrato PNP 0,12 M.
- Controlli: Controlli: 0,5 g di terreno + 2 ml di tampone maleato 0,1 M pH 6,5.

I campioni sono stati posti in agitazione in un bagno termostatico per 1 ora e 30 minuti a 37 °C. Una volta terminato il periodo d'incubazione, sono stati aggiunti anche ai controlli 0,5 ml di substrato (PNP) ed i campioni sono stati posti a raffreddare a 4°C per 10 minuti, per bloccare la reazione. A questo punto sono stati aggiunti 0,5 ml di $CaCl_2$ 0,5 M (per la dispersione dei colloidali che interferirebbero con la lettura) e 2 ml di NaOH 0,5 M (per salificare il prodotto, conferendogli un colore giallo). I campioni sono stati portati ad un volume finale di 10 ml con acqua bidistillata e successivamente centrifugati per 10 minuti a 3500 rpm. Il surnatante è stato letto allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 398 nm. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni mediante una retta standard ottenuta con soluzioni di PNF a concentrazione nota. I risultati sono stati espressi in $\mu\text{gPNF/gss}\cdot\text{h}$.

2.5.3 β -glucosidasi

E' un enzima rappresentativo del ciclo del carbonio, in quanto catalizza l'idrolisi del cellobiosio (dimero derivante dalla degradazione della cellulosa) a glucosio. La determinazione dell'attività di questo enzima si basa sul metodo di Masciandaro et al., 1994. Tale metodo consiste nella determinazione per via colorimetrica (lunghezza d'onda di 398 nm) del rilascio del Para-

Nitro-Fenolo (PNF), dopo l'incubazione dei campioni con Para-Nitrofenil-Glucopiranoside (PNG).

Nelle provette di plastica da 10 ml sono stati preparati sia le prove che i controlli.

Campione di terreno

- Prove: 0,5 g di terreno + 2 ml di tampone maleato 0,1 M pH 6,5 + 0,5 ml di substrato PNG 0,05 M.
- Controlli: 0,5 g di terreno + 2 ml di tampone maleato 0,1 M pH 6,5.

Estratto in pirofosfato neutro e solfato di potassio

- Prove: 1 ml di estratto + 2 ml di tampone maleato 0,1 M pH 6,5 + 0,5 ml di substrato PNG 0,05 M.
- Controlli: 1 ml di estratto + 2 ml di tampone maleato 0,1 M pH 6,5.

In seguito all'estrazione il campione su cui è stata testata l'attività enzimatica è stato trattato come descritto nel paragrafo precedente (2.5.3).

Prove e controlli sono stati posti in agitazione in un bagno termostatico per 2 ore a 37°C. Una volta terminato il periodo d'incubazione, nei controlli sono stati aggiunti 0,5 ml di substrato (PNG) e tutti i campioni sono stati posti a raffreddare a 4°C per 10 minuti, per bloccare la reazione. Sono stati aggiunti poi 0,5 ml di $CaCl_2$ 0,5 M (per la dispersione dei colloidi che interferirebbero con la lettura) e 2 ml di NaOH 0,5 M (per salificare il prodotto, conferendogli un colore giallo). Si porta ad un volume finale di 10 ml con acqua bidistillata e in seguito si centrifuga per 10 minuti a 3500 rpm. Il surnatante è stato letto allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 398 nm. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni mediante

una retta standard ottenuta con concentrazioni note di PNF. I risultati sono espressi in $\mu\text{gPNF/gss}\cdot\text{h}$.

2.5.4 Ureasi

L'ureasi è un enzima idrolitico, legato al ciclo dell'azoto, presente in molte piante superiori, animali e numerosi microrganismi. La stima dell'attività ureasica si basa sulla determinazione dell'ammoniaca quale prodotto dell'idrolisi enzimatica dell'urea (Nannipieri et al., 1980). In provette di plastica da 10 ml sono stati preparati sia le prove che i controlli. Prove: 1g di terreno + 4 ml di tampone borato pH 10 + 0,5 ml di urea 6,4%. Controlli: 1 g terreno + 4 ml di tampone borato pH 10. Prove e controlli, una volta preparati, vengono tappati e messi ad agitare in bagno termostatico a 37 °C per 2 ore. Terminata l'incubazione, anche al controllo si aggiunge 0,5 ml di urea allo 0,48%. Successivamente alle prove e ai controlli si aggiunge 6 ml di KCl (7,4%) e si agita per 30 min a temperatura ambiente. Dopo 10 minuti di centrifugazione a 3500rpm vengono prelevati 0,5 ml di estratto chiaro (non più di 1 ml) dalle prove e dai controlli, trasferendolo in nuove provette da 10 ml. Vengono aggiunti 2,5 ml di soluzione di salicilato-Na/NaOH, 1 ml di dicloisocianurato di sodio e si porta a volume (10 ml). Si agita e si lascia riposare per 30 minuti al buio. Il salicilato di sodio forma un indofenolo di colore blu in presenza di ammoniaca e ipoclorito (quest'ultimo prodottosi in soluzione alcalina dall'idrolisi dell'acido dicloroisocianurico) caratterizzato da un massimo di assorbimento a 690 nm. La presenza di sodio nitroprusiato, rende più veloce la reazione e migliora l'intensità e la riproducibilità della formazione del composto colorato. I campioni sono letti allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 690 nm. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni mediante una retta standard ottenuta con concentrazioni note di NH_3 . I risultati sono stati espressi

come $\mu\text{gNH}_3/\text{gss}^*\text{h}$.

2.5.5 Proteasi BAA

Le proteasi sono un gruppo di enzimi idrolitici legati al ciclo dell'azoto, ed hanno la funzione di catalizzare l'idrolisi di proteine, oligopeptidi e dipeptidi, fino alla liberazione di ammoniaca.

La stima dell'attività proteasica si basa sulla determinazione dell'ammoniacca, quale prodotto dell'idrolisi enzimatica del substrato BAA (N- -Benzoil-L- -Arginammide-Hydrochloride) (Nannipieri et al., 1980).

Sono state utilizzate provette di plastica da 10ml. Prove: 0,5 g di terreno + 2 ml di tampone fosfato 0,1 M a pH 7 + 0,5 ml di substrato BAA (N- -Benzoil-L- -Arginammide-Hydrochloride) 0,03 M.

Controlli: 0,5 g di terreno + 2 ml di tampone fosfato 0,1 M a pH 7. Si incuba a 40°C per un'ora e mezzo. Terminata l'incubazione, si aggiunge anche ai controlli 0,5 ml di substrato BAA. Successivamente, sia le prove sia i controlli vengono portati a volume (10 ml) con acqua bidistillata.

Si centrifuga a 3500 rpm per 10 minuti e si esegue poi lo stesso procedimento per la determinazione dell'ammonio per l'attività ureasica: vengono prelevati 0,5 ml di estratto chiaro (non più di 1ml) dalle prove e dai controlli, trasferendolo in nuove provette da 10 ml. Vengono aggiunti 2,5 ml di soluzione di salicilato-Na/NaOH, 1 ml di dicloisocianurato di sodio e si porta a volume (10 ml). Si agita e si lascia riposare per 30 minuti al buio.

I campioni sono letti allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 690 nm. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni mediante una retta standard ottenuta con concentrazioni note di NH_3 . I risultati sono stati espressi come $\mu\text{gNH}_3/\text{gss}^*\text{h}$.

2.6 **Trattamento del campione con applicazione dell'elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)**

Protocollo A

Dopo l'estrazione (in pirofosfato neutro o in solfato di potassio) il campione è stato centrifugato per 15 min a 9000 rpm per recuperare un surnatante privo della frazione solida dell'estratto costituita da terreno.

2.6.1 **Filtrazione su membrana batteriologica**

Con lo scopo di rimuovere la componente cellulare gli estratti sono stati filtrati attraverso membrane batteriologiche 0,22 μm (Masciandaro e Ceccanti 1999).

2.6.2 **Trattamento fisico**

In seguito alla filtrazione su membrana batteriologica, e prima della desalinizzazione, una parte del campione è stata sottoposta ad un trattamento che mirava a rompere le interazioni tra proteine e fenoli.

L'estratto è stato riscaldato per circa 5 min a 70 °C; subito dopo è stato raffreddato in un bagno ghiacciato ed infine congelato a -20 °C per 72 ore con scongelamento del campione ogni 24 ore per breve periodo e successivo ricongelamento (Barcelò, Munoz, Sabater 1987).

2.6.3 Desalificazione

L'estratto diluito di circa quattro volte, con lo scopo di rimuovere i sali in eccesso, è stato dializzato attraverso l'utilizzo di membrane da dialisi 3.500 Da.

2.6.4 Concentrazione

L'estratto dializzato è stato concentrato di circa cinque volte rispetto al volume iniziale tramite membrane Amicon PM-10 sotto pressione d'azoto; questo ha comportato l'allontanamento dal campione della frazione con peso molecolare inferiore ai 10.000 Da (Ceccanti et al.,1989).

2.6.5 Purificazione

Per rimuovere, almeno in parte, le sostanze umiche dall'estratto concentrato, il campione è stato purificato grazie alla diretta aggiunta di polivinipirrolidone (PVP) in polvere in rapporto 1:10 (w/v).

L'incubazione si è svolta per 15 min a RT in agitazione

Sia PVP che campione erano stati precedentemente acidificati con H_2SO_4 rispettivamente 0,25 M e 0,025 M.

Il surnatante ottenuto è stato filtrato attraverso membrane batteriologiche 0,22 μm per allontanare i residui del polimero insolubile rimasti nell'estratto (Porteous e Armstrong 1991).

2.6.6 Precipitazione

Le proteine nell'estratto sono state precipitate tramite il metodo DOC-TCA (deossicolato e acido tricloroacetico) (HUJI, 2006).

DOC al 2% è stato aggiunto all'estratto in rapporto 1:100 v/v per 1 h a 4 °C.

Successivamente è stato aggiunto TCA al 100% (454 ml H_2O /kg TCA) in rapporto 1:10 v/v, la precipitazione è stata condotta a -20 °C O/N.

Dopo l'incubazione il campione è stato centrifugato a 14000 rpm per 15 min a 4 °C e il surnatante è stato rimosso.

Il pellet è stato risospeso in 10 ml di acetone freddo e posto a -20 °C per 1 h.

Dopo un'ulteriore centrifuga nelle medesime condizioni della precedente si è effettuato un ulteriore lavaggio in 1 ml di acetone freddo. Il campione è stato trasferito in eppendorf, centrifugato a 14.000 rpm per 15 min a 4 °C ed infine il pellet è stato risospeso in 30 μ l di sample buffer per SDS-PAGE (Leamli 1970).

2.6.7 Corsa elettroforetica

SDS-PAGE

Preparata la soluzione per il resolving gel una quantità sufficiente è stata colata tra le due lastine di vetro che fanno parte dell'apparecchio (5 ml in uno spessore di 1 mm), ed è stata lasciata a polimerizzare per il tempo necessario.

Uno strato d'acqua è stato aggiunto per creare un fronte di corsa omogeneo.

Successivamente l'acqua è stata asciugata con carta ed è stata ripetuta la stessa operazione per lo stacking gel (colato fino al limite della lastrina di vetro) versandolo alla sommità del gel di separazione. Per la formazione dei pozzetti è stato utilizzato l'apposito pettine.

Corsa elettroforetica

La camera superiore dell'apparecchio contenente il gel è stata immersa nella camera inferiore riempita con il tampone di corsa e i pozzetti sono stati caricati.

I campioni risospesi nel sample buffer sono stati riscaldati a 100 °C per 3 min, centrifugati per altri 3 minuti ed infine caricati direttamente nei pozzetti dello stacking gel.

Durante i primi 5 minuti di corsa è stato applicato un voltaggio di 80 V per permettere alle proteine di compattarsi nello stacking, successivamente il valore è stato portato a 150 V.

Preparazione del gel

Resolving: 12% (10 ml)

- Acqua 3,4 ml
- Tris-HCl pH 8,8 1,5 M 2,5 ml
- SDS 10% 0,1 ml
- Acrilammide/Bis 30% 4 ml
- APS 10% 50 μ l
- TEMED 5 μ l

Stacking gel: 4% (10 ml)

- Acqua 6,1 ml
- Tris-HCl pH 6,8 0,5 M 2,5 ml
- SDS 10% 0,1 ml
- Acrilammide/Bis 30% 1,3 ml
- APS 10% 50 μ l
- TEMED 10 μ l

Soluzioni

Per la preparazione di tutte le soluzioni e i lavaggi è stata utilizzata acqua bidistillata.

Sample Buffer (9,5 ml)

Acqua 3,55 ml

Tris-HCl 0,5M pH 6,8 1,25ml

SDS 10% (w/v) 3 ml

Glicerolo 2,5 ml

Blu di bromofenolo 0,5% (w/v) 0,2 ml

DTT 50 mM

Tampone di corsa 10x (Tris-Glicina) pH 8,3 (1 L)

Tris base 30,3 g

SDS 10,0 g

Glicina 144,0 g

2.7 Trattamento del campione con applicazione dell'elettroforesi in condizioni non denaturanti (Discontinus Native-Page)

Protocollo B

Il protocollo seguito per svolgere questo tipo di analisi si distingue da quello precedentemente descritto solo per i passaggi finali del protocollo A che non sono stati svolti.

Il protocollo B ha previsto:

- Estrazione in pirofosfato di sodio neutro o estrazione in solfato di potassio (par. 2.3.1 e 2.3.2).
- Filtrazione su membrana batteriologica 0,22 μm .
- Desalificazione (par. 2.6.3).

- Concentrazione (par. 2.6.4).
- Native-page.

NATIVE-PAGE

Preparata la soluzione per il resolving gel una quantità sufficiente è stata colata tra le due lastine di vetro che fanno parte dell'apparecchio (5 ml in uno spessore di 1 mm), ed è stata lasciata a polimerizzare per il tempo necessario. Uno strato d'acqua è stato aggiunto per creare un fronte di corsa omogeneo. Successivamente l'acqua è stata asciugata con carta ed è stata ripetuta la stessa operazione con lo stacking gel (colato fino al limite della lastrina di vetro) versandolo alla sommità del gel di separazione. Per la formazione dei pozzetti è stato utilizzato l'apposito pettine.

Prima della corsa al campione è stato aggiunto il sample buffer in rapporto 1:1.

Preparazione del gel

Resolving: 12% (10 ml)

- Acqua 4,5 ml
- Tris-HCl pH 8,8 1,5 M 2,5 ml
- Acrilammide/Bis 30% 3 ml
- APS 10% 50 μ l
- TEMED 5 μ l

Stacking gel: 4% (10 ml)

- Acqua 6,2 ml

- Tris-HCl pH 6,8 0,5 M 2,5 ml
- Acrilammide/Bis 30% 1,3 ml
- APS 10% 50 μ l
- TEMED 10 μ l

Soluzioni

Per la preparazione di tutte le soluzioni e i lavaggi è stata utilizzata acqua bidistillata.

Sample Buffer (10 ml)

Acqua 5,55 ml

Tris-HCl 0,5M pH 6,8 1,25ml Glicerolo 3 ml

Blu di bromofenolo 0,5% (w/v) 0,2 ml

Tampone di corsa 10x (Tris-Glicina) pH 8,3 (1 L)

Tris base 30,3 g

Glicina 144,0 g

2.8 Silver staining

Terminata la corsa elettroforetica il gel è stato posto in una *soluzione fissante* per fissare al gel le proteine per 30 min.

In seguito al passaggio nella soluzione fissante è stato effettuato un lavaggio in acqua di 5 min.

Il gel è stato messo nella *soluzione 1* per 1 h (fino a più giorni).

Successivamente nella *soluzione 2* per 2 h (fino a O/N).

Un lavaggio in acqua di 5 min ha pulito il gel dalle soluzioni 1 e 2 utilizzate

in precedenza.

A questo punto si è effettuata l'incubazione con la *soluzione contenente glutraldeide* per 30 min.

Sono seguiti tre lavaggi in acqua di 10 min ciascuno.

Il gel è stato posto nella *soluzione contenente nitrato d'argento ammoniacale* per 30 min.

Quattro lavaggi in acqua di 4 min ciascuno hanno rimosso la soluzione utilizzata in precedenza.

La *soluzione di sviluppo* in contatto con il gel per il tempo necessario ha permesso la visualizzazione delle bande. Il passaggio è stato veloce e al comparire delle bande il gel è stato posto nella soluzione successiva.

Il gel è stato posto nella *soluzione bloccante* per circa 30 secondi ed infine è stato reimmerso in acqua.

Soluzioni

Per la preparazione di tutte le soluzioni e i lavaggi è stata utilizzata acqua bidistillata poiché il tipo di colorazione risente anche della bassa presenza di sali.

Fissativo

Etanolo al 30%

Acido orto fosforico al 2%

Soluzione 1

etanolo 40%

acido acetico 10%

acqua 50%

Soluzione 2

etanolo 5%

acido acetico 5%

acqua 90%

Soluzione contenente gluteraldeide

Gluteraldeide 1% in acetato di sodio 6,8%

La soluzione di gluteraldeide deve essere preparata giornalmente diluendo la gluteraldeide in uguale volume di acqua (conservare a 4°C). Successivamente aggiungere all'acetato di sodio.

Soluzione contenente nitrato d'argento ammoniacale

A: sciogliere 0,8g di $AgNO_3$ in 4 ml di acqua

B: unire 21 ml di acqua, 1 di ammoniaca e 0,2 ml di NaOH 10 N

Unire le soluzioni A e B e aggiungere gocce d'ammoniaca fino a far scomparire il precipitato di argento. Portare ad un volume finale di 100 ml.

Soluzione di sviluppo

Formalina 0,25% in acido citrico 0,01%.

La soluzione deve essere preparata giornalmente.

Soluzione bloccante

Acido acetico al 5%

2.9 Metodo di Bradford

La legge di Lambert e Beer mette in relazione l'assorbanza con la concentrazione:

$$A = \varepsilon cd$$

Il metodo Bradford permette, quindi, di risalire alla concentrazione di proteine presenti in una soluzione partendo dall'assorbanza di quest'ultima. Si sfrutta la capacità del blu di comassie di complessarsi stabilmente agli amminoacidi basici delle catene polipeptidiche.

100 μ l di campione sono stati aggiunti ad 1 ml di Bradford, la determinazione della concentrazione proteica si è svolta tramite lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm.

2.9.1 SCHEMA DI LAVORO

Le figure 2.1 e 2.2 riassumono i passaggi fondamentali degli schemi di lavoro seguiti.

Il *protocollo A*, adottato inizialmente, è stato in seguito "semplificato", generando il *protocollo B* per effettuare la Native-page.

Tuttavia alcuni campioni sono stati sottoposti al protocollo B ed in seguito ad SDS-PAGE piuttosto che a NATIVE-PAGE.

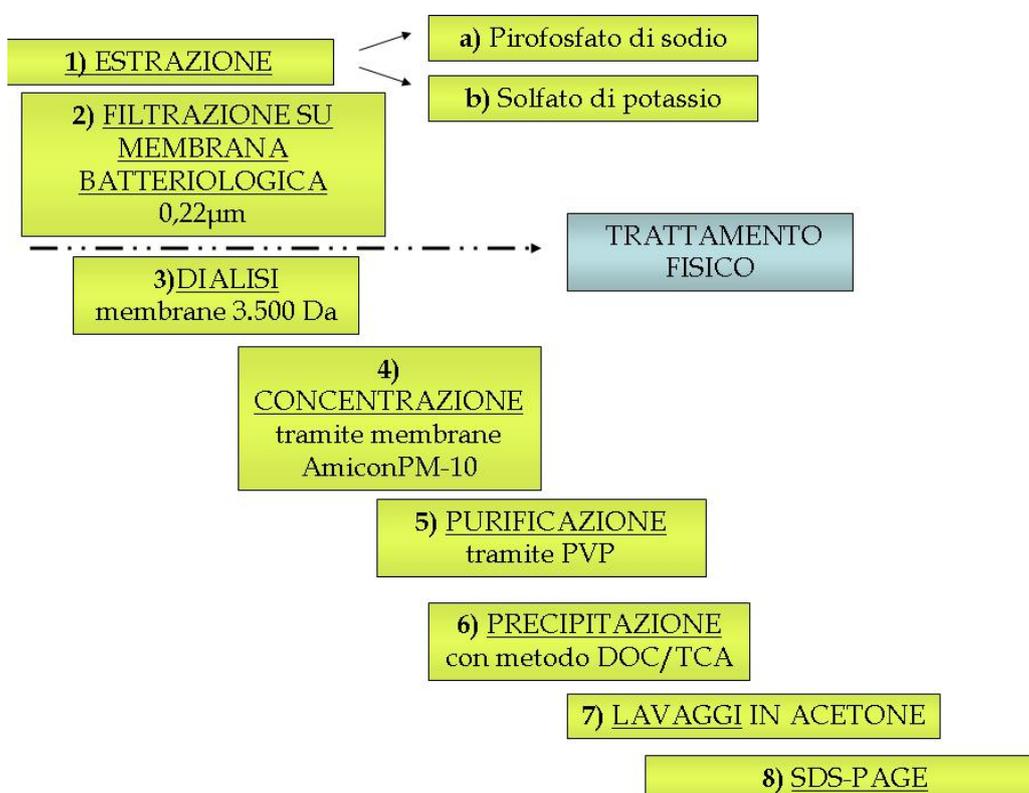


Figura 2.1: *Protocollo A con applicazione dell' SDS-PAGE*

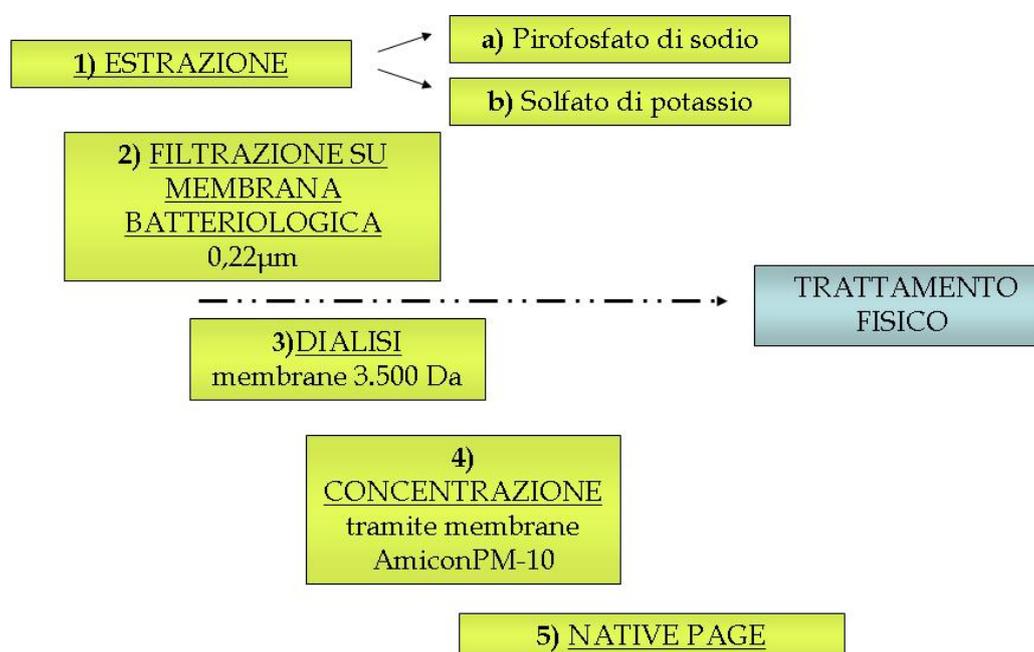


Figura 2.2: Protocollo B con applicazione della NATIVE-PAGE

Capitolo 3

Risultati e discussione

3.1 Campione di suolo

Il campione utilizzato per lo studio rappresentava un terreno estremamente ricco di sostanza organica, circa il 5%, non coltivato e non sottoposto ad azione antropica.

Di seguito sono riportate le sue caratteristiche chimiche (tab. 3.1).

I valori indicati si accordano con quelli riscontrati in terreni non coltivati che presentano vegetazione naturale (Caravaca et al. 2002). Nel lavoro di Caravaca et al. del 2002 i dati riportati per il TOC e il TN dei terreni non coltivati presentano come valori massimi rispettivamente 21.3 e 1.2 g Kg⁻¹, in perfetto accordo con quelli registrati per il campione utilizzato in questo studio (19.9 ± 0.6 e 1.26 ± 0.17 rispettivamente). Anche il contenuto di acidi umici e fulvici è indicativo del tipo di terreno utilizzato, rispettivamente 3.29 ± 0.13 e 3.68 ± 0.09 mgC g⁻¹.

Per quanto riguarda le caratteristiche biochimiche del campione, sono state effettuate analisi per la determinazione di varie attività enzimatiche totali (β -glucosidasi, fosfatasi, ureasi, proteasi, deidrogenasi).

Sulla porzione extracellulare dell'estratto ottenuto sia con pirofosfato di sodio

Caratteristiche fisico-chimiche			
pH	7.01 ± 0,04	E.C. (dS . m ⁻¹)	0.14 ± 0.00
HA (mgC . g ⁻¹)	3.29 ± 0.13	FA (mgC .g ⁻¹)	3.68 ± 0.09
TOC (mgC . g ⁻¹)	19.9 ± 0.6	TEC (mg . g ⁻¹)	6.97 ± 0.04
TN (mgN . g ⁻¹)	1.26 ± 0.17	WSC (mgC . g ⁻¹)	14.4 ± 0.4
PEC (mgC . g ⁻¹)	1.43 ± 0.05		
PEC < 10⁴Da (mgC . g ⁻¹)	0.63 ± 0.03bc		
PEC > 10⁴Da (mgC . g ⁻¹)	0.81 ± 0.08c		

Tabella 3.1: Caratteristiche chimiche del campione.

E.C.-conducibilità elettrica; TOC- carbonio organico totale; TN-azoto totale; WSC-carbonio idrosolubile;TEC-carbonio totale estraibile; HA-acidi umici FA-acidi fulvici; PEC-carbonio estraibili con pirofosfato

che con solfato di potassio è stata valutata l'attività β -glucosidasi.

Attività enzimatiche totali	
β -glucosidasi	155,6 μ gPNP/gss*h
Proteasi	4,7 μ gNH ₄ ⁺ /gss*h
Ureasi	22,8 μ gNH ₄ ⁺ /gss*h
Fosfatasi	108,5 μ gPNP/gss*h
Deidrogenasi	2,32 μ gINTF/gss*h

Tabella 3.2: Caratteristiche biochimiche del campione.

Anche nel caso delle caratteristiche biochimiche il confronto con altri lavori ha permesso di rilevare che le attività enzimatiche misurate riflettono le caratteristiche del terreno utilizzato come campione.

L'attività β -glucosidasi è rappresentata da un valore elevato (155,6 μ gPNP g⁻¹h⁻¹), tipico di terreni indisturbati (Acosta-Martínez e Tabatabai, 2000), con buon contenuto di sostanza organica, non coltivati e non soggetti ad

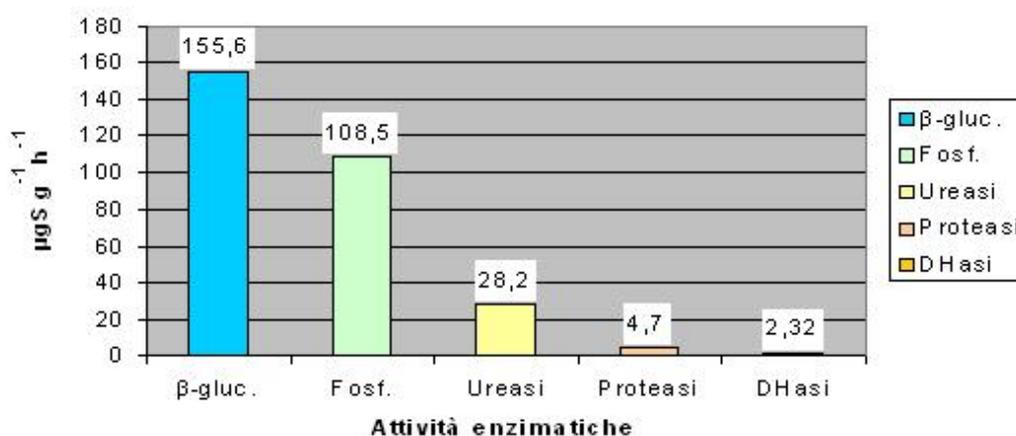


Figura 3.1: Attività enzimatiche totali valutate nel campione. ($\mu\text{g S}$: μg di substrato)

azione antropica (utilizzati in genere come controlli negli studi sulla degradazione del terreno).

Anche il valore registrato per l'attività fosfataseica ($108,5 \mu\text{gPNP g}^{-1}\text{h}^{-1}$) evidenzia una certa corrispondenza con i valori riportati nel lavoro di Acosta-Martínez e Tabatabai del 2000 relativi a campioni con stesso valore di pH del terreno utilizzato in questo studio (circa 7).

Le attività ureasica e deidrogenasica ($28,2 \mu\text{gNH}_4^+ \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ e $2,32 \mu\text{g INTF g}^{-1}\text{h}^{-1}$) hanno mostrato affinità con dati riportati in *Actividad microbiana de suelos y desertificacion* di C. Garcia-Izquierdo e M. Hernandez, ottenuti da campioni di terreno naturale e riforestato.

L'attività β -glucosidasica registrata sulla frazione extracellulare dell'estratto risulta essere discreta per gli estratti ottenuti in pirofosfato neutro e minima, ma comunque presente, per gli estratti ottenuti in solfato di potassio. La notevole differenza tra i due valori è probabilmente dovuta alla diversa capacità di estrazione della sostanza unica delle due soluzioni: sarebbe

Attività enzimatica sulla frazione extracellulari	
Estraente	Attività β -glucosidasica
Pirofosfato di sodio neutro	27,705 $\mu\text{gPNP/gss}^*\text{h}$
Solfato di potassio	0,0618 $\mu\text{gPNP/gss}^*\text{h}$

Tabella 3.3: Attività β -glucosidasica registrata sulla frazione extracellulare del campione

verosimile pensare che il pirofosfato grazie alla sua maggiore possibilità di estrarre le sostanze uniche estragga anche complessi umo-enzimatici permettendo di registrare una più rilevante attività β -glucosidasica, probabilmente dovuta anche alla più elevata resistenza all'azione proteolitica dei suddetti complessi.

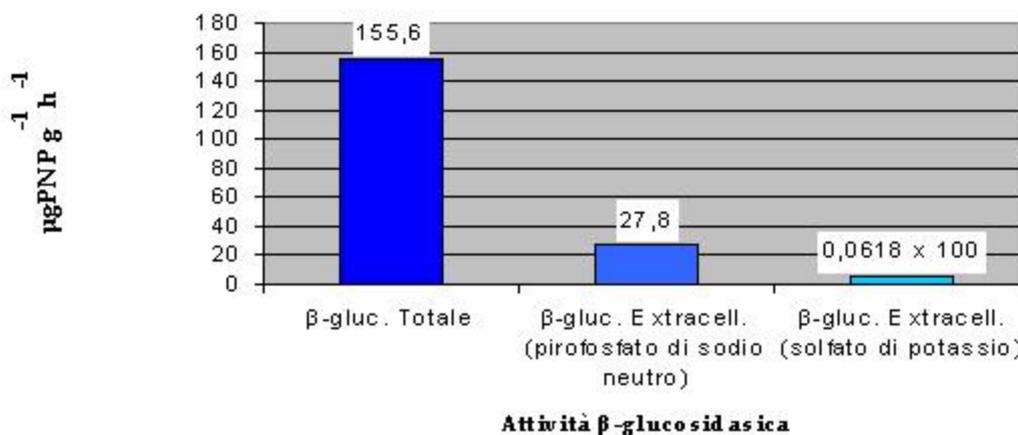


Figura 3.2: Attività β -glucosidasica totale; extracellulare con estrazione in pirofosfato di sodio neutro e solfato di potassio. (L'attività in solfato di potassio è stata moltiplicata per un fattore pari a 100 al fine di rendere i tre valori comparabili sul grafico).

L'esigenza di mettere a punto una metodica in grado di estrarre in maniera efficace proteine enzimatiche extracellulari dal terreno è nata dalla scarsa

disponibilità di dati relativi allo studio delle proteine presenti in matrici complesse come il suolo.

Lo studio condotto è prettamente di tipo applicativo poiché, servendosi di metodiche già confermate e sviluppando nuovi passaggi, mira a stilare un protocollo per rendere più efficace l'estrazione proteica dal terreno al fine di studiare le caratteristiche di tipo qualitativo che conferiscono al suolo in generale proprietà benefiche o meno (fertilità, capacità di resilienza ecc.). Per questo, come ultimo scopo, si è cercato di isolare la β -glucosidasi extracellulare, enzima coinvolto nel ciclo del carbonio e quindi indirettamente in tutti i fenomeni che interessano questo elemento (quantitativo di sostanza organica, attività microbica e ricchezza del terreno in generale).

3.2 Estrazione proteica

Due tipi di estraenti sono stati utilizzati: *pirofosfato di sodio neutro 0,1 M pH 7,1* e *solfo di potassio 0,5 M pH 6,6*.

Il pirofosfato è stato utilizzato per estrarre principalmente proteine complessate alle sostanze umiche, dalla letteratura infatti è noto che il pirofosfato di sodio a pH alcalino (pH 11) sia il principale estraente della sostanza umica dal terreno; tuttavia l'utilizzo del pirofosfato alcalino nel lavoro effettuato non è stato possibile poiché l'elevato valore di pH non avrebbe permesso il mantenimento dell'attività enzimatica, oggetto dello studio condotto. Per questo motivo è stato utilizzato pirofosfato a pH 7,1 valore che garantisce una buona estrazione della sostanza umica conservando comunque l'attività enzimatica .

Il solfo di potassio è stato utilizzato principalmente per l'estrazione delle proteine extracellulari libere (Masciandaro et al. 2007).

La filtrazione su membrana batteriologica 0,22 μm si è resa necessaria per

garantire di lavorare esclusivamente sulla frazione extracellulare del campione negli step successivi all'estrazione.

Il trattamento fisico effettuato mirava alla rottura dei legami tra proteine e fenoli, è stato compiuto sul 50% del volume del campione ottenuto in seguito alla filtrazione su membrana batteriologica. Lo scopo della sua applicazione era di rendere più libere le proteine presenti nell'estratto dalla presenza di interferenti e di ottenere quindi un campione di più agevole manipolazione. La dialisi ha assicurato la rimozione dei sali dall'estratto. Tale procedimento è di estrema importanza poiché l'elevato contenuto di questi elementi nel campione determina lo svilupparsi di notevoli interferenze. La diluizione di circa 4 volte dell'estratto ha impedito che l'elevata pressione osmotica spingesse all'esterno delle membrane da dialisi anche altre componenti oltre ai sali.

In seguito la concentrazione del campione si è resa necessaria non solo per riportare al volume iniziale l'estratto diluito, ma anche per concentrare le proteine presenti in quantità piuttosto bassa per unità di volume (dai 4 agli 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Lo step di purificazione dalle sostanze umiche è stato applicato all'estratto in seguito alla sua concentrazione. Questo passaggio ha comportato l'ottenimento di un campione visibilmente più limpido grazie alla capacità del polivinilpirrolidone (PVP) di legare le sostanze umiche in eccesso presenti nell'estratto. Tuttavia questo passaggio se da un lato ha permesso di avere un estratto più pulito su cui si potesse lavorare con maggiore facilità, dall'altro ha sicuramente comportato una perdita per il campione in termini di proteine legate alla componente umica del terreno.

Il trattamento dell'estratto con deossicolato (DOC) e acido tricloroaceticico (TCA) ha permesso di precipitare le proteine in esso presenti in maniera efficace, infatti tale metodo è particolarmente indicato per la precipitazione di molecole proteiche contenute in basse concentrazioni in un campione (HUJI,

2006).

La determinazione della concentrazione proteica si è effettuata tramite metodo colorimetrico, attraverso il saggio di Bradford (Bradford, 1976).

La colorazione scura dell'estratto avrebbe potuto interferire con la rilevazione proteica nel campione sovrastimandola, per questo si è cercato di aggirare il problema aggiungendo solo 100 μl di campione ad 1 ml di reattivo. In questo modo si è anche risolto il problema dell'eccessiva assorbanza dei soli estraenti miscelati con il Bradford.

Le rette di taratura sono state ottenute utilizzando standard di albumina di siero bovino (BSA) (con range di concentrazioni 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a causa della bassa presenza di proteine nei campioni) in pirofosfato di sodio neutro e solfato di potassio.

I due estraenti hanno dimostrato di avere la medesima assorbanza, infatti le due rette di taratura ottenute coincidevano (fig 3.3).

La determinazione proteica è stata compiuta sia sul solo estratto concentrato di circa cento volte, ottenuto seguendo il protocollo B (fig 2.2), che sul pellet formatosi in seguito alla precipitazione con DOC e TCA, come mostrato nel protocollo A (fig 2.1), e risospeso nel rispettivo estraente.

Per gli estratti in K_2SO_4 concentrati la massima concentrazione proteica registrata è stata di circa 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Per quanto riguarda quelli in pirofosfato di sodio neutro i valori determinati erano notevolmente più elevati ma da non ritenersi attendibili a causa dell'interferenza determinata dall'eccessiva colorazione scura del campione.

La determinazione della concentrazione proteica nel pellet ha dato dei valori sensibilmente più alti. Tali valori si sono dimostrati più variabili a causa di inevitabili differenze nel trattamento del campione.

Per i precipitati ottenuti in seguito ad estrazione in solfato di potassio la concentrazione proteica rinvenuta andava dai 7 agli 11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sia per il campione non sottoposto al trattamento fisico che per quello sottoposto al trattamento.

Invece per i precipitati ottenuti in seguito ad estrazione in pirofosfato di sodio neutro i valori determinati sono stati più elevati: circa $14 \mu\text{g/ml}$ per il campione non sottoposto a trattamento fisico e circa $25 \mu\text{g/ml}$ per il campione sottoposto al trattamento. Il fatto che questi ultimi valori siano più elevati per il pellet derivante dal campione sottoposto a trattamento fisico potrebbe essere giustificato in questo modo: il trattamento fisico, rompendo le interazioni proteine-fenoli, libera le macromolecole proteiche che restano in soluzione dopo il passaggio di purificazione in PVP. Al contrario nei campioni non sottoposti al trattamento il PVP, nello step di purificazione, potrebbe portare via dall'estratto una parte delle proteine complessate alla sostanza unica insieme alla sostanza unica stessa.

In ogni caso la maggiore presenza di proteine nel pellet derivante dall'estrazione in pirofosfato di sodio neutro si potrebbe attribuire alla maggiore capacità di estrazione della sostanza unica complessata a molecole enzimatiche da parte del pirofosfato.

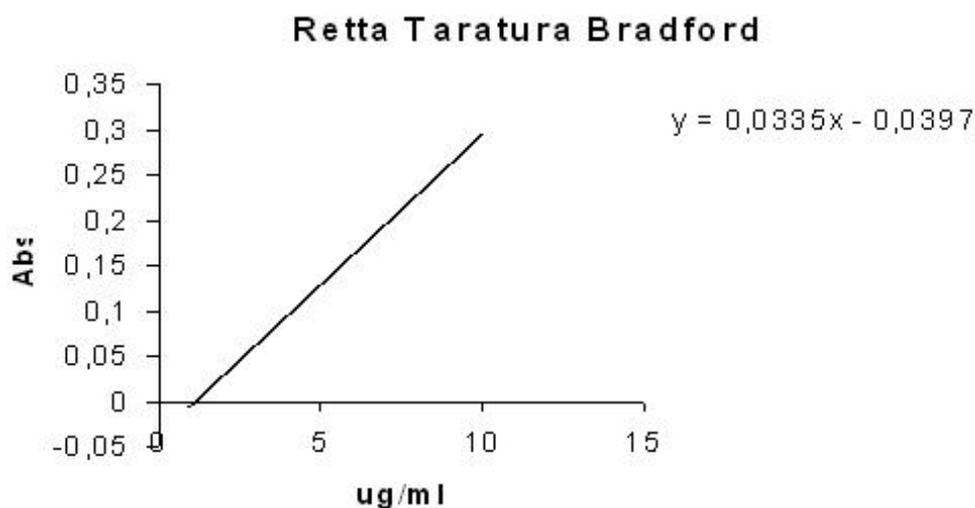


Figura 3.3: Retta di taratura del saggio di Bradford costruita per la determinazione della concentrazione proteica in campioni estratti in K_2SO_4

3.3 Tecniche elettroforetiche applicate

I campioni sono stati caricati direttamente nei pozzetti dello stacking gel, ossia un gel che, a causa della bassa percentuale del polimero presente nella sua formulazione, presenta ampie maglie. Esso ha una funzione di impaccamento delle proteine, lo scopo è di formare un sottile schieramento di queste molecole, allineate, pronte così ad entrare nelle maglie del resolving gel, ossia del gel di separazione. Esso è caratterizzato da maglie più strette a causa della percentuale di poliacrilammide maggiore rispetto allo stacking. Il campione caricato tende a depositarsi sul fondo del pozzetto a causa della presenza di glicerolo nel buffer che rende più densa la soluzione.

La scarsa concentrazione di proteine nel campione ha reso necessaria una tecnica di colorazione per i gel molto sensibile. Poiché la colorazione con Comassie non aveva dato risultati validi, si è utilizzata la colorazione con nitrato d'argento (Silver Staining).

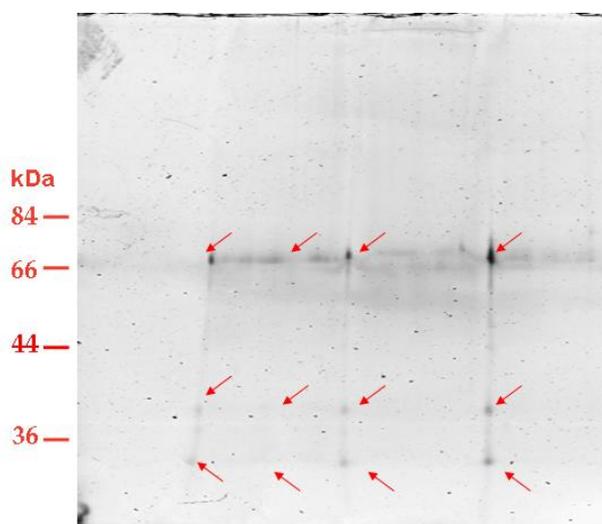


Figura 3.4: Estrazione in K_2SO_4 , campione non sottoposto a trattamento fisico.

3.4 Risultati delle corse elettroforetiche

3.4.1 Campioni estratti in solfato di potassio

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti effettuando un'estrazione in solfato di potassio, non sottoponendo e sottoponendo il campione a trattamento fisico.

Le bande sono state risolte attraverso elettroforesi su gel di poliacrilammide al 12% in condizioni denaturanti e usando la colorazione con nitrato di argento.

Nel campione non sottoposto a trattamento fisico (fig. 3.4) sono ben evidenti tre bande, quella più in alto circa all'altezza di 66 kDa, e due in corrispondenza di 36 kDa.

Nel caso del campione sottoposto al trattamento (fig. 3.5) sono ben evidenti

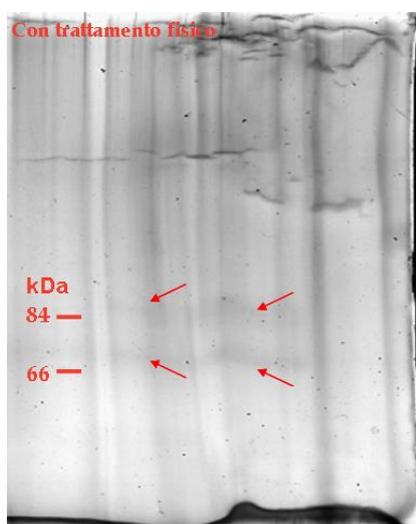


Figura 3.5: Estrazione in K_2SO_4 , campione sottoposto a trattamento fisico.

due bande all'altezza rispettivamente di 66 e 84 kDa.

I risultati ottenuti dalle due estrazioni sopracitate sono stati completati da quelli ottenuti aggiungendo SDS all'1% e PVP al 2%, rispetto al peso del

campione, durante l'estrazione.

I gel ottenuti in questo secondo caso sono più chiari e significativi; non si evidenziano nette differenze tra i campioni sottoposti e non al trattamento fisico.

Sono visibili chiaramente quattro bande nel gel in figura 3.6: due all'altezza

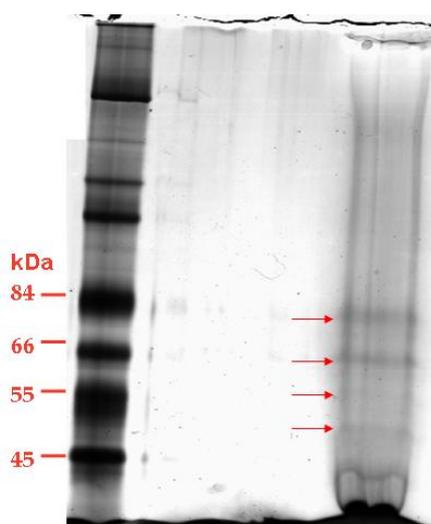


Figura 3.6: Estrazione in K_2SO_4 , campione non sottoposto a trattamento fisico; aggiunta di SDS all'1% e PVP al 2% durante l'estrazione.

di 66 e 84 kDa; una intorno a 55 kDa ed un'altra tra 55 e 45 kDa.

Per quanto riguarda il gel riportato nella figura 3.7 sono ben evidenti solo tre bande, il motivo potrebbe ricercarsi nella durata del tempo di sviluppo cui è stato sottoposto il gel (ossia il tempo necessario affinché la soluzione di acido citrico e formalina, in cui è immerso il gel in uno degli ultimi passaggi della colorazione, "colori" le bande), minore rispetto a quello del gel riportato in precedenza (fig. 3.6).

Anche in questo caso sono ben evidenti le due bande all'altezza di 66 e di 84 kDa; una terza banda si evidenzia ad un peso molecolare leggermente inferiore a 45 kDa.

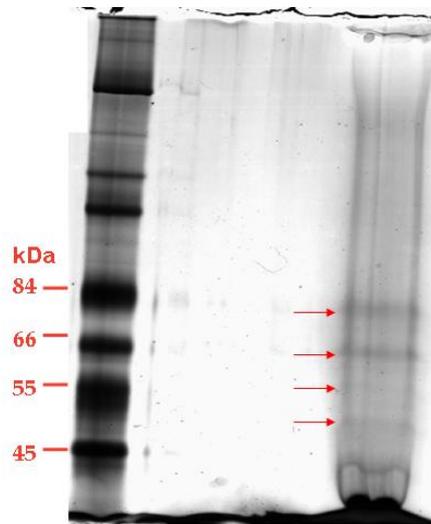


Figura 3.7: Estrazione in K_2SO_4 , campione sottoposto a trattamento fisico; aggiunta di SDS all'1% e PVP al 2% durante l'estrazione.

Nel gel in figura 3.8 si evidenziano in maniera chiara due sole bande, ancora all'altezza di 84 e 66 kDa.

3.4.2 Campioni estratti in pirofosfato di sodio neutro

Anche per i campioni ottenuti dall'estrazione in pirofosfato, come per il K_2SO_4 , l'esecuzione o meno del trattamento fisico non ha mostrato evidenti differenze nei risultati ottenuti (fig 3.9 e 3.10), sono ben evidenti due bande rispettivamente all'altezza di 84 e 66 kDa.

L'estrazione in pirofosfato ha dato complessivamente dei risultati meno efficaci rispetto a quella in K_2SO_4 ; infatti lavorare con gli estratti in pirofosfato è risultato più difficoltoso a causa della notevole presenza di sostanza umica in eccesso e di interferenti di varia natura (Murase et al., 2003).

L'estratto che si otteneva era molto scuro, i passaggi da effettuare hanno richiesto numerose prove per operare di volta in volta piccole modifiche.

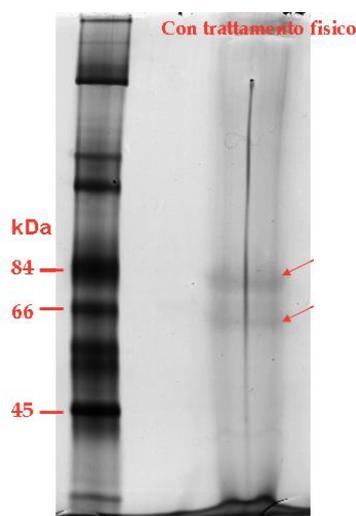


Figura 3.8: Estrazione in K_2SO_4 , campione sottoposto a trattamento fisico; aggiunta di SDS all'1% durante l'estrazione.

In seguito alla precipitazione col metodo del DOC-TCA il campione è stato sottoposto a dei lavaggi in acetone con lo scopo di allontanare l'acido tricloroacetico: si osservava spesso un precipitato acido probabilmente imputabile agli acidi umici, accompagnato da un precipitato scuro non proteico, entrambi dovevano accuratamente essere allontanati per evitare di ottenere campioni eccessivamente acidi da caricare per la corsa elettroforetica e in generale per cercare di ottenere gel il meno possibile "sporchi".

I risultati illustrati precedentemente potrebbero suggerire che effettivamente la presenza del PVP durante l'estrazione aiuti ad allontanare dal campione molecole interferenti, le quali, in assenza di PVP, sequestrando o comunque interagendo con le proteine ne impediscono la purificazione. Per quanto riguarda invece il trattamento fisico, i risultati presentati non mostrano differenze visibilmente significative; in realtà però è stato osservato che lavorare con il campione sottoposto a trattamento fisico risultava meno

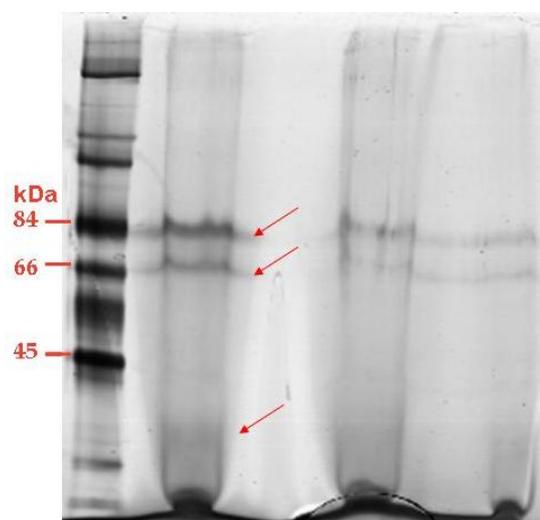


Figura 3.9: Estrazione in pirofosfato di sodio neutro, campione non sottoposto a trattamento fisico.

laborioso. Durante il passaggio di concentrazione del campione non sottoposto al trattamento (ottenuto mediante ultrafiltrazione su membrane Amicon PM 10), per esempio, la frazione con peso molecolare inferiore ai 10.00 Da risultava essere piuttosto scura (giallo scuro) per entrambi i tipi di estratto ma in particolare per quello in pirofosfato. Sottoponendo il campione al trattamento fisico invece si è ottenuta una frazione minore di 10^4 Da quasi trasparente per l'estratto in K_2SO_4 e molto più chiara per l'estratto in pirofosfato rispetto a quella del campione non sottoposto al trattamento, il tutto accompagnato da notevole riduzione del tempo impiegato per concentrare il campione.

Sono risultati più agevoli anche il recupero del pellet in seguito ai lavaggi praticati dopo la precipitazione in TCA e la preparazione del campione per la corsa elettroforetica in generale .

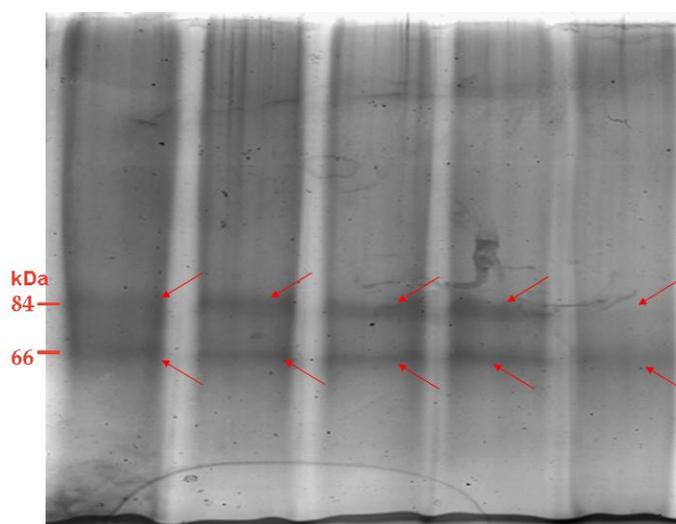


Figura 3.10: Estrazione in pirofosfato di sodio neutro, campione sottoposto a trattamento fisico.

3.4.3 Native-Page

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti non è applicabile nel caso in cui si volesse individuare una proteina (un enzima in particolare) in base alla sua attività biologica, in quanto la rottura della struttura proteica impedirebbe il mantenimento dell'attività da ricercare.

In questi casi il tipo di elettroforesi che si realizza, NATIVE-PAGE, è svolta in condizioni non denaturanti, in assenza di reagenti e trattamenti che andrebbero a rompere la struttura della proteina funzionante presente nel campione.

La Native Page è stata applicata con lo scopo di visualizzare le proteine nella loro forma nativa tramite silver staining, e successivamente di cercare di individuare la β -glucosidasi tramite la misurazione della sua attività direttamente sulle bande del gel.

Nella Native-Page le proteine vengono analizzate in base alla carica netta che presentano e al valore standard di pH del gel (8,8); quindi grazie alla

mobilità che sviluppano nel setaccio molecolare rappresentato dalle maglie di poliacrilammide.

La Native-Page quindi si presta bene alla determinazione dell'attività enzimatica su banda (Activity Stain).

Per effettuare questo tipo di elettroforesi sono state apportate delle modifiche al protocollo eseguito inizialmente per effettuare l'SDS-PAGE, *Protocollo A*; nel protocollo risultante, *Protocollo B*, le modifiche hanno previsto l'eliminazione di alcuni passaggi che, a causa dei trattamenti svolti e dei reagenti utilizzati, avrebbero potuto minare la conformazione della proteina; sono stati rimossi dal protocollo A:

- il trattamento fisico per la rottura dei legami proteina-fenoli, che avrebbe sicuramente comportato un'alterazione della struttura terziaria delle molecole proteiche a causa della shock termico cui venivano sottoposte;
- lo step di purificazione tramite polivinilpirrolidone, a causa della necessità di acidificare con H_2SO_4 campione e polimero;
- la precipitazione col metodo DOC-TCA e i successivi lavaggi in acetone, a causa delle caratteristiche potenzialmente denaturanti dei reagenti e delle incubazioni a $-20^\circ C$.

La figura 3.11 mostra un gel al 9% ottenuto in seguito a corsa elettroforetica compiuta in condizioni non denaturanti per le proteine (Native-Page), con campione sottoposto al protocollo B (p. 48 fig. 2.2). La colorazione con nitrato d'argento ha evidenziato la chiara presenza di molteplici bande.

In seguito campioni trattati seguendo il *protocollo B* sono stati sottoposti a SDS-PAGE (Fig. 1.10) con lo scopo di valutare eventuali differenze rispetto a quelli ottenuti applicando il *protocollo A* ed eseguendo l'SDS-PAGE; e rispetto ai risultati conseguiti seguendo il *protocollo A* ed effettuando la Native-Page.

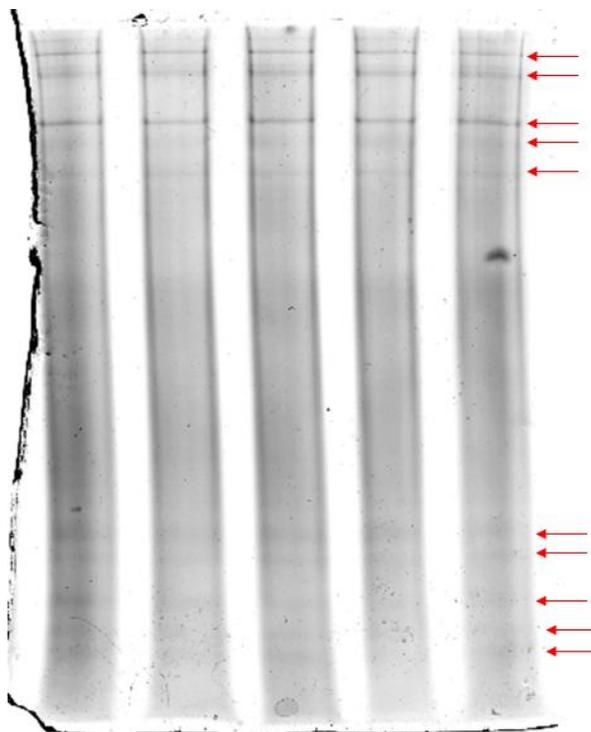


Figura 3.11: Native-PAGE del campione estratto in K_2SO_4 ottenuto seguendo il protocollo B.

Le prove effettuate hanno mostrato che i risultati ottenuti applicando il protocollo B ed eseguendo l' SDS-PAGE erano ripetibili; il Silver Staining ha evidenziato la presenza di molteplici bande, verosimilmente proteiche, con pesi molecolari da 36 a poco meno di 205 kDa.

Questo risultato lascia supporre che probabilmente nei passaggi di purificazione dalle sostanze umiche e di precipitazione col metodo DOC-TCA, successivi a quello di concentrazione, il campione perda un notevole quantitativo di proteine che a causa del limite di sensibilità della colorazione usata non sono visibili.

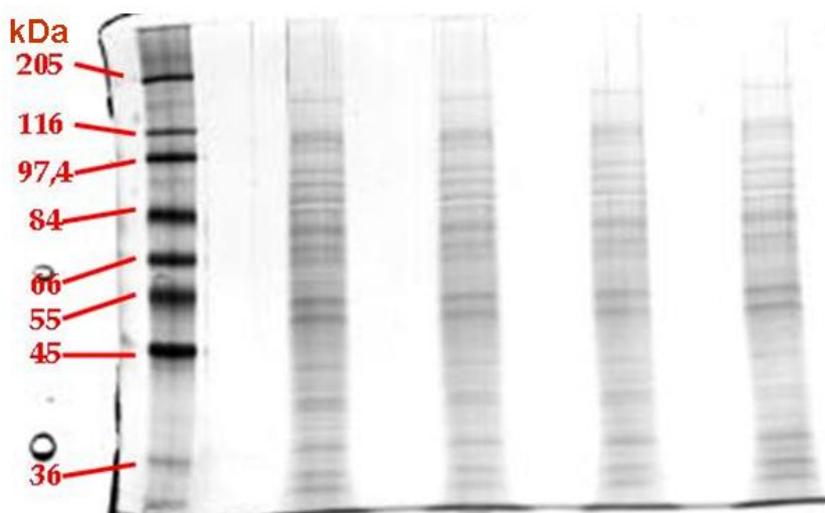


Figura 3.12: SDS-PAGE del campione estratto in K_2SO_4 e ottenuto seguendo il protocollo B.

3.5 Activity stain

L'attività su banda è stata valutata applicando al campione il protocollo B ed effettuando la Native-Page.

Il gel ottenuto è stato poi incubato in una soluzione di di acido succinico 50 mM contenente un substrato fluorescente dell'enzima β -glucosidasi, il *4-metilumbellifeil- β -D-glucopiranoside* (MUGlc) (Kee-Hong et al., 2007).

Il MUGlc è tipicamente usato per la ricerca dell'attività β -glucosidasica (Kee-Hong et al., 2007; Giebel and Dopierala, 2004), il *4-metilumbellifeil- β -D-glucopiranoside* viene trasformato dalla β -glucosidasi in *4-metilumbelliferone*, un prodotto in grado di emettere fluorescenza.

Lo studio condotto in questo caso però non ha dato risultati, le ragioni potrebbero essere di varia natura, bisogna considerare che il protocollo eseguito non rappresentava una metodica affermata bensì una prova introduttiva effettuata unicamente a scopo preparatorio per soddisfare una curiosità scien-

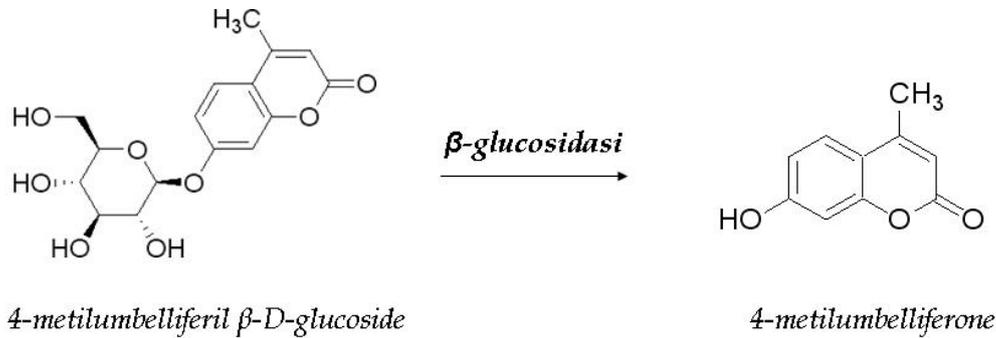


Figura 3.13: Reazione catalizzata dalla β -glucosidasi che porta alla formazione di un prodotto fluorescente.

tifica. Per di più la metodica è stata applicata esclusivamente a campioni estratti tramite solfato di potassio la cui attività β -glucosidasica extracellulare si è rivelata piuttosto bassa ($0,0618 \mu\text{gPNP/gss}\cdot\text{h}$).

Estratti in pirofosfato di sodio neutro non sono stati sottoposti al trattamento a causa dei risultati negativi ottenuti in seguito a Native-page e colorazione con nitrato d'argento (fig. 3.14).

Una ulteriore pecca dell'analisi di rilevazione dell'attività su banda è stata anche l'assenza di un controllo che potesse quantomeno validare l'adeguatezza del metodo seguito; uno sviluppo futuro potrebbe essere infatti servirsi di un enzima commerciale per un confronto: esso dovrebbe necessariamente reagire con il suo substrato (il MUGlc) dimostrando così la validità del protocollo seguito permettendo la visualizzazione del prodotto fluorescente.

Nel caso in cui questo *non* si dovesse verificare si potrebbe trarre la conclusione che la metodica sviluppata non sia in grado di permettere all'enzima di reagire in maniera efficace con il suo substrato.

I risultati ottenuti sono da ritenersi preliminari, in questo elaborato sono stati riportati solo quelli più indicativi che hanno guadagnato questa caratteristica grazie ai miglioramenti conseguiti e legati all'esperienza acquistata di prova in prova.

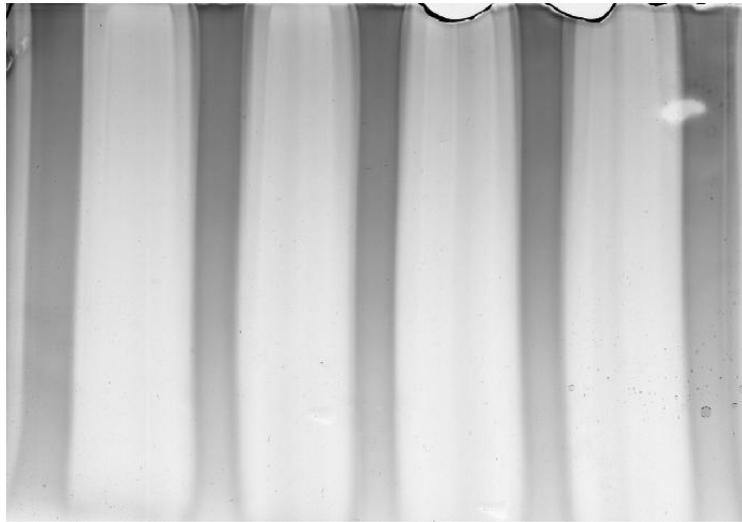


Figura 3.14: NATIVE-PAGE del campione estratto in pirofosfato di sodio e ottenuto seguendo il protocollo B.

L'analisi è stata effettuata utilizzando un solo campione di terreno, in quanto lo scopo del lavoro condotto non era di comparare o dimostrare, bensì di verificare la qualità e l'efficacia della metodica di estrazione e purificazione applicata.

Capitolo 4

Conclusioni

- La metodica utilizzata si è dimostrata efficace per estrarre e purificare molecole proteiche dal terreno.
- Sia il pirofosfato di sodio neutro che il solfato di potassio hanno permesso una adeguata estrazione di proteine dal campione; la loro capacità di estrarre proteine enzimatiche, e l'enzima β -glucosidasi in particolare, è stata provata dalla determinazione dell'attività di questo enzima negli estratti.
- Lavorare con estratti in pirofosfato di sodio neutro si è rivelato più laborioso rispetto al lavorare con estratti in solfato di potassio a causa della maggiore presenza di sostanze umiche ed interferenti.
- Il trattamento fisico a cui è stata sottoposta una parte dei campioni non ha evidenziato differenze da un punto di vista qualitativo o quantitativo nella purificazione delle proteine, ma ha semplificato la manipolazione dell'estratto, riducendo lievemente i tempi di lavorazione e migliorando la qualità del campione in generale.

- Le metodiche eseguite sono risultate idonee per l'applicazione di tecniche come l'elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti e non denaturanti, e hanno permesso quindi di visualizzare le molecole proteiche estratte sia in forma denaturata che nativa.
- L'individuazione dell'enzima β -glucosidasi tramite la determinazione della sua attività direttamente sulle bande del gel (activity stain) non è stata possibile, il motivo potrebbe essere ricercato nell'inadeguatezza del metodo sviluppato o nella scarsa concentrazione di enzima presente nell'estratto.
- Prospettive future: mettere a punto un protocollo per la determinazione dell'attività su banda, dimostrando o meno la validità di quello seguito in questo lavoro tramite l'utilizzo di un controllo; sperimentare l'utilizzo di altri estraenti con lo scopo di confrontare i vari risultati conseguiti; applicare la metodica a terreni con diverse caratteristiche e livello di degradazione; effettuare colorazioni per i gel compatibili con le analisi di spettrometria di massa, comassie (nel caso di elevata concentrazione proteica) o particolare silver staining, al fine di sequenziare le bande proteiche visualizzate e ricercare eventuali corrispondenze o analogie nelle banche dati.

Bibliografia

- [1] Acosta-Martínez and Tabatabai (2000). *Enzyme activities in a limed agricultural soil*. Biol Fertil Soils 31:85-91
- [2] Adams, Bartholomew, Clark (1954). *Measurement of Nucleic Acid Components in Soil*. Soil Sci Soc Am J 18:40-46.
- [3] Aiken G.R. (1985). *Isolation and concentration techniques for aquatic humic substances*. In Humic Substances in Soil, Sediment and Water: Geochemistry, Isolation and Characterization. G. R. Aiken, D. M. Mcknight, R.L. Wershaw and P. MaCharty (eds). Wiley, New York, pp.363-385.
- [4] Anderson D.W. (1979). *Processes of humus formation and transformation in soils of the Canada Great Plains*. J. Soil Sci. 30: 77-84.
- [5] Anderson D.W. and Grecorich E.G. (1983). *Effect of soil erosion on soil quality and productivity*. In: Soil Erosion and land Degradation Proc. 2nd Annual Western Prov. Conf. Rationalization of water and Soil Research and Management. Prov. Sask., Saskatoon, SK., pp.105-113.
- [6] Barcelo, Munoz, Sabater. 1987. *Lupin proxidases. Isolation and characterization of cell wallbound isoperoxidase activity*. Physiologia Plantarum, 71, 448-454

-
- [7] Biederbeck, V.O., Paul, E.A., 1973. *Fractionation of soil humate with phenolic solvents and purification of the nitrogen-reich portion with polyvinylpyrrolidone*. Soil Science, 115, 357-366
- [8] Bollag, Rozycki, Eldestain, *Protein methods*, Wiley Liss, New York, 2nd ed. 1996.
- [9] Bradford, M.M., 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry 72, 248-254.
- [10] Bremner JM (1965) *Organic forms of nitrose In Black CA* (ed) Methods of soil Analysis part2. American Society of Agronomy, Madison, Wi, pp 1238-1255
- [11] Burns (1982). *Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology*. Soil Biology and Biochemistry, Vol 14, pp. 423-427
- [12] Busto and Perez-Mateoz 2000, *Characterization of β -glucosidase extracted from soil fractions*. European Journal of Soil Science 51, 193-200
- [13] Caravaca, Masciandaro, Ceccanti (2002). *Land use in relation to soil chemical and biochemical properties in a semiarid Mediterranean environment*. Soil and tillage research 68, 23-30
- [14] Ceccanti, B., Nannipieri, P., Cervelli, S., Sequi, P., 1978. *Fraction of humus-urease complexes*. Soil Biology and Biochemistry 10, 39-45
- [15] Ceccanti, B., Bonmati-Pont, M., Nannipieri, P., 1989. *Microdetermination of protease activity in humic bands of different sizes after analytical isoelectric focusing*. Biology and Fertility of Soils 7, 202-206

- [16] Ceccanti B., Garcia C. and Masciandaro G. (1994). *Biomonitoring the environment and its functionality*. In: Ceccanti B., Garcia C. (Eds.), *Environment Biochemistry in Practice*, Vol. 1: Wastes and Soil Management, pp. 1-22
- [17] Ceccanti B., Garcia C., Nogales R., Benitez E. and Masciandaro G. (1997). *Attività e ruolo delle sostanze umiche nell' ambiente: aspetti chimico strutturali e biochimici. Dal suolo alla pianta dalla pianta al suolo. Le sostanze umiche come base della sostenibilità*. Il convegno nazionale del capitolo italiano dell' IHSS. pp.1-9
- [18] Chandler, Schuck, Brockman, Bruckner-Lea (1999). *Automated nucleic acid isolation and purification from soil extracts using renewable affinity microcolumns in a sequential injection system*. *Talanta*, Volume 49, Number 5, pp. 969-983(15).
- [19] Chaney K. and R.S: Swift (1986). *Studies on aggregate stability. The effect of humic substances on the stability of re-formed soil aggregates*. *Journal of Soil Science*, 37:337-343
- [20] Clapp, C.E., Hayes, M.H.B. (1999). *Characterization of humic substances isolated from clay- and silt-sized fractions of a corn residue-amended agricultural soil*. *Soil Science* 164, 899-913
- [21] Dick, Myrold, Kerle, E.A., 1988. Microbial biomass and soil enzyme activities in compacted and rehabilitated skid trail soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52, 512-516
- [22] Doran J.W. and Parkin T.B. (1994). *Defining and Assessing Soil Quality*. In: Doran J.W., Coleman D.C., Bezdicek D. F., Stewart B.A. (Eds.), *Defining soil quality for a sustainable environment*. Soil Science Society of America, Madison pp. 3-21.

- [23] Ierksen, Whittaker, Banowetz, Azevedo, Kennedy, Steiner, Griffith (2002). *High resolution characterization of soil biological communities by nucleic acid and fatty acid analyses*. Soil biology and biochemistry. Vol34, n12, pp.1853-1860
- [24] FAO and PNUMA (1984). *Directrices para el control de la degradación de suelos*. Roma
- [25] Garcia, Hernandez, Costa (1994). Microbial activity in soil under Mediterranean environmental conditions. Soil. Biol. Biochem 26, 1185-1191
- [26] Garcia-Irquerdo, Hernandez. *Actividad microbiana de suelos y desertificación*, 1ª ed.,2000.
- [27] Getzin e Rosefiel (1971). *Partial purification and properties of soil enzymes that degrades the insecticide malathion*. Biochim. Biophys. Acta 235. pp 442-453
- [28] Giebel and Dopierala (2004). *Pathogenesis of Potato Gangrene Caused by Phoma exigua var. foveata: II. Activities of some Hydrolases and Dehydrogenase*. J. Phytopathology 152, 399-403
- [29] Haworth R. D. (1971). *Chemical nature of humic acid*. Soil Science, 111:71-79
- [30] Hayes M.H.B. and Clapp C. Edward (2001). *Humic Substances: Considerations, Aspects of Structure, and Environmental Influences*. Soil Science, 166:723-737
Jenkinson DS (1988) determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil. In Wilson JR (ed) *Advanced in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems*. Cab International, Wallingford, pp 368-386

- [31] Hofman and Dusek (2003). *Biochemical analysis of soil organic matter and microbial biomass composition-a pilot study*. European Journal of soil Biology.217-224.
- [32] HUJI, 2006. *The protein purification facility. Protein purification protocol*. The Wolfson Centre for Applied Structural Biology. The Hebrew University of Jerusalem. (on line) <http://wolfson.huji.ac.il> (October 2007)
- [33] Kee-Hong, Brown, Harris, Langston, Cherry (2007). A proteomic strategy to discover β -glucosidases from *Aspergillus fumigatus* with two-dimensional page in-gel activity assay and tandem mass spectrometry. Journal of proteome research 6, 4749-4757
- [34] Lal R. and Steward B.A. (1994). *Sustainable land use system and soil resilience*. In: Greenland D.J., Szabolcs I. (Eds.), Soil resilience and sustainable land use. CAB International Wallingford, Oxon OX10 8DE, UK
- [35] Laemmli, U.K., 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227, 680-685
- [36] MacCarthy P. (2001). *The principles of humic substances: An introduction to the First Principle*. In: Humic Substances: Structures, Model and Functions. G. Davies and E. A. Ghabbour (eds). Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 17-28
- [37] Masciandaro G., Ceccanti B. and Gallardo-Lancho J.F. (1998). *Organic matter properties in cultivated versus set-aside arable soils*. Agriculture, Ecosystems and Environment 67: 267-274
- [38] Masciandaro and Ceccanti 1999. *Assessing soil quality in different agroecosystems through biochemical and chemico-structural properties of humic substance*. Soil and Tillage Research 51, 129-137 Masciandaro, Macci,

- Doni, Maserti, Calvo-Bado, Ceccanti, Wellington (2007). *Comparison of extraction methods for recovery of β -glucosidase in two different forest soil...*
- [39] Moreno, Vivas, Nogales, Macci, Masciandaro, Emilio Benitez (2008). *Restoring biochemical activity and bacterial diversity in a trichloroethylene-contaminated soil: the reclamation effect of vermicomposted olive wastes*
- [40] Murase, A., Yoneda, M., Ueno, R., Yonebayashi, K., 2003. *Isolation of extracellular protein from greenhouse soil*. Soil Biology and Biochemistry 35, 733-736
- [41] Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, S., Sequi, P., 1974. *Use of 0.1 M pyrophosphate to extract urease from a podzol*, Soil Biology and Biochemistry 6, 359-362.
- [42] Nannipieri, Sequi, Fusi 1996. *Humus and enzyme activity*. Piccolo, A. (Ed.), Humus substances in terrestrial ecosystems. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp 293-328
- [43] Nannipieri, Kandeler, Ruggiero, (2002). *Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil*. In Burns, RG Dick RP (eds) *Enzymes in the Environment. Activity, Ecology and applications*. Marcel Dekker, New York, pp 1-33
- [44] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietrameralla G, Renella G (2003) *Micobial diversity and soil functions*. Eur. J Soil Sci 1-1
- [45] Nannipieri, Smalla (2006). *Role of Stabilised Enzymes in Microbial Ecology and Enzyme Extraction from Soil with Potential Applications in Soil Proteomics*. Soil Biology, Nucleic Acids and Proteins in Soil 8, 75-94

- [46] Satyanarayana e Getzin (1973). Properties of a stable cell-free esterase from soil. *Biochem* 12. pp 1566-1572
- [47] Russel E. W. (1973). *Soils conditions and plant growth*, 10th ed., Longmans Green, New York, 1-22
- [48] Sequi P. (1986). *Sostanze umiche effetti sul terreno e sulle piante*. R.G. Burns, G. Dell'Agnola, S. Miele, S. Nardi, G. Savoini, M. Schnitzer, P. Sequi, D. Vaughan, S.A. Visser, (eds.), REDA, Roma, pp.30-36
- [49] Stevenson F.J. (1982). *Humus Chemistry. Genesis, composition, reaction* (Wiley J. and Sons, Inc. ed.). 5:120-145
- [50] Stevenson FJ (1986) Cycles of soil . *Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur and Micronutrients*. Jhon Wile and Sons, New York
- [51] Stevenson F.J. (1994). *Extraction, fractionation and general chemical composition of soil organic matter*. In: *Humus Chemistry, Genesis, Composition and Reactions*. Wiley and Sons, Inc. New York
- [52] Swift R.S. and Poster A.M. (1971). *Gel chromatography of humic acid*. *Journal of Soil Science*, 22:237-249
- [53] Tate R.L. III (1987). Source and transformation of readily metabolised organic matter. In: *Soil Organic Matter. Biological and Ecological Effects*. Wiley, pp.69-94
- [54] Tabatabai and Fu, 1992, *Extraction of enzymes from soil*. *Soil Biochemistry* 7, 197-227
- [55] Tatbatabaei, Khosravi, Nemati, Motlagh (2003). *Purification and characterization of two intracellular β -glucosidases from Neurospora Crassa mutant cell-1*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 79-84

-
- [56] Thurman E.M. (1985). *Organic Geochemistry of Natural Waters*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Boston
- [57] Turner, Hopkins, Haygarth, Ostle (2002). *β -glucosidase activity in pasture soils*. *Applied soil ecology* 20, 157-162 6
- [58] Woodwell G.M. and Houghton R.H. (1977). *Biotic influences on the world carbon budget*. In: *global Chemical Cycles and their alterations by Man*. W. Stumm (ed). Wiley, New York, pp.61-72
- [59] Woodwell G.M., Whittaker W.A., Reiners G., Likens E., Delwick C.C. and Botkin D.B. (1978). *The biota and the world carbon budget*. *Science*. 199:141-146.

Ringraziamenti

Dal mese di settembre del 2003 penso a quello che avrei scritto in questa sezione della tesi, allora mi sembrava un momento lontanissimo e incerto, eppure è arrivato.

Comincio ringraziando la Dottoressa Masciandaro che ha reso possibile lo svolgimento di questo lavoro di tesi presentandomi una sezione della scienza che ignoravo, e l'infinita disponibilità del Dottor Ceccanti e della Dottoressa Maserti.

Un enorme grazie va alle Dottoresse Serena Doni, Cristina Macci e Eleonora Peruzzi che mi hanno costantemente seguito con professionalità e simpatia; a tutti i ragazzi della stanza 26: la Sandra della Sardegna e la Sandra del Messico, Alessandra, Giulia, Arianna, Guido, Davide insieme a tutti coloro che hanno reso il laboratorio un ambiente sereno e confortevole e mi hanno aiutato in qualsiasi momento del mio lavoro di tesi, chi all'inizio e chi alla fine.

Il grazie più grande e sentito va ai miei magnifici genitori, che hanno sempre creduto in me più di quanto ci credessi io e al mio adorato "fratellino". Grazie a TUTTI i miei familiari ed in particolare a Isabella, Daniela, Ornella, Francesca e Gabriella; a zio Ennio e zia Stefania, a zia Rita, (zia) Annamaria e alle dolci nonnine che, in questi cinque anni, mi hanno costantemente inondato del loro affetto.

Ancora grazie alle fantastiche amiche/sorelle dell'università, Maria Giovan-

na, Daiana, Cristina e Antonella, che tra un 3'-5' UTR, una PCR e una birra, senza rivalità e malizia, hanno condiviso con me la totalità dell'essere una studentessa, la meraviglia di visitare nuovi luoghi e affrontare nuove esperienze; hanno condiviso il panico e la disperazione del pre-esame e il delirio di onnipotenza del post-esame; mi hanno stimolato quando ne avevo bisogno e mi hanno insegnato a festeggiare i successi e rendere sopportabili gli insuccessi; in maniera bizzarra e delicata mi sono state di compagnia rendendo uno spasso i lunedì sera più piovosi e insopportabili di gennaio.

Alle mie dolcissime coinquiline, Serena, Mariangela e Sara; alle mie favolose amiche Alessia, Ilaria, Concy e Rosannuzza; alle splendide sorelle Fusco Viviana e Vittoria, GRAZIE!, per essermi state accanto dall'inizio alla fine, per avermi fatto divertire e iniziato al borderline, per avermi sempre coccolato, accompagnato, consigliato e aiutato a crescere.

Un grazie con il cuore va a Luca, la cui presenza è stata adorabile e piacevole fin dal primo giorno di chimica generale, che in quest'ultimo anno ha modificato la mia vita aggiungendovi follia, simpatia e tenerezza.

Grazie infine ad Angelo, Giacomo, Alberto (Albicocca), Super, Eva, Chiara, Grazia e Gabriella, Fabio Candido, Ciccio Lam, Flora e Nicola (il superpanettiere) che in modi completamente diversi hanno preso parte alla mia vita e che per motivi completamente diversi mi sento di ringraziare.