

**Relazione scientifica Short term mobility 2010**

**Studio della biodiversità microbica strutturale e funzionale del suolo**

**DONI SERENA**

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
<b>MATERIALI</b>	<b>4</b>
<b>METODI</b>	<b>5</b>
<b>STUDIO DELLE PROTEINE</b>	<b>5</b>
ESTRAZIONE DELLE PROTEINE IN SOLFATO DI POTASSIO	5
FILTRAZIONE SU CARTA RAPIDA	6
FILTRAZIONE SU MEMBRANA BATTERIOLOGICA	6
DESALIFICAZIONE	6
CONCENTRAZIONE	6
PRECIPITAZIONE METODO DOC/TCA/ACETONE	6
ELETTROFORESI	6
SDS-PAGE	6
COLORAZIONE DELLE PROTEINE CON COOMASSIE COLLOIDALE	8
SILVER STAINING	8
<b>STUDIO DEL DNA</b>	<b>10</b>
ESTRAZIONE DEL DNA	10
PCR	12
SEQUENZIAMENTO DEL DNA (METODO DEL PIROSEQUENZIAMENTO)	13
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>15</b>
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>19</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>20</b>

## Introduzione

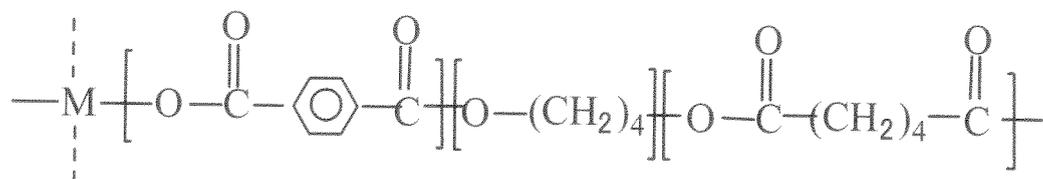
La collaborazione, iniziata nel 2004, tra il gruppo di ricerca dell'ISE del CNR di Pisa coordinato dal Dr. Brunello Ceccanti e dalla Dr. Grazia Masciandaro e il gruppo dell'università di Warwick coordinato dalla Prof. Elizabeth M. H. Wellington, ha contribuito in modo essenziale alla difficile messa a punto delle metodologie per lo studio della struttura, funzione e regolazione dell'espressione proteica dei microrganismi del suolo. Anche se ad oggi le proteine espresse dai microrganismi non sono mai state identificate in campioni di suolo nella condizione "reale", a causa della complessità della matrice suolo stessa, gli studi intrapresi ci hanno consentito di estrarre le proteine extracellulari da campioni di suolo e di purificare tali proteine mediante SDS-PAGE.

Nell'ambito della presente short term mobility le tecniche di metaproteomica e di genomica del suolo sono state implementate ed applicate con lo scopo di comprendere la relazione tra la biodiversità microbica strutturale del suolo e le specie di microrganismi effettivamente coinvolte nei processi di biotrasformazione.

In particolare tali studi sono stati applicati a campioni di suolo trattati in una sperimentazione di laboratorio in mesocosmo con due diversi biomateriali, cellulosa e *Ecoflex*, ed al relativo controllo (terreno non trattato), con lo scopo di valutare il possibile effetto dei due bio-materiali sulle proprietà biologiche del terreno.

Il bio-materiale *Ecoflex*, utilizzato nel settore agricolo come biofilm, è un copoliestere alifatico-aromatico ritenuto biodegradabile in poche settimane a seguito dell'esposizione a fattori ambientali.

La struttura chimica di *Ecoflex* è la seguente:



Gli studi di letteratura sulla biodegradazione di *Ecoflex* sono stati condotti per lo più in campioni di compost in condizioni termofile, mettendo in evidenza una sua completa degradazione dopo 21 giorni (Kleeberg et al., 1998; Witt et al., 2001). Altri studi eseguiti in laboratorio utilizzando specifici microrganismi coinvolti nella degradazione di *Ecoflex*, in condizioni ambientali moderate, hanno però evidenziato solo una sua parziale degradazione dopo 21 giorni di incubazione (Trinh

Tan et al., 2008). Questa è una considerazione molto importante visto che l'utilizzazione di Ecoflex nel settore agricolo ne prevede la degradazione in condizioni mesofile piuttosto che ad alte temperature.

Per lo studio della biodiversità funzionale, il solfato di potassio 0,5 M pH 6,6, è stato utilizzato, unitamente all'EDTA 10 mM (inibitore delle metallo proteasi), come estraente delle proteine extracellulari. Dopo l'estrazione, i campioni sono stati filtrati mediante membrane da 0,22  $\mu$ m, dializzati mediante membrane da 3.500 PM ed infine sottoposti a concentrazione mediante membrane Amicon PM-10. La frazione con peso molecolare superiore a 10.000 Dalton è stata quindi sottoposta a SDS-page. Per lo studio della biodiversità microbica strutturale sono state utilizzate le tecniche di genetica molecolare che si basano sull'estrazione del DNA, la sua amplificazione mediante PCR ed il pirosequenziamento delle sequenze amplificate.

## Materiali

Il campione di terreno utilizzato nella presente sperimentazione è stato prelevato a Peccioli (Toscana). Le sue caratteristiche chimiche, chimico-fisiche e biologiche sono di seguito riportate (tabella 1).

**Tabella 1.** Caratteristiche chimiche, chimico-fisiche e biologiche del terreno utilizzato nella presente sperimentazione.

Parametri	Terreno
pH	8.00
Conducibilità elettrica ( $\mu$ S/cm)	210
Carbonio organico totale (%)	2.5
Azoto totale (%)	0.322
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/kg)	235
NH <sub>4</sub> <sup>-</sup> (mg/kg)	3.0
Attività deidrogenasi (mgINTF/kg h)	2,75
Attività $\beta$ -glucosidasi (mgPNP/g h)	580
Cu tot (mg/kg)	142
Zn tot (mg/kg)	120
Fe tot (mg/kg)	8395

<b>K tot</b> (mg/kg)	6067
<b>Mn tot</b> (mg/kg)	704
<b>Cu disponibile</b> (mg/kg)	77.8
<b>Zn disponibile</b> (mg/kg)	17.48
<b>Fe disponibile</b> (mg/kg)	19.4
<b>K disponibile</b> (mg/kg)	323
<b>Mn disponibile</b> (mg/kg)	108

Tale campione è stato trattato con due diversi biomateriali in polvere in un esperimento di laboratorio in mesocosmi (contenitori di plastica).

I mesocosmi allestiti sono stati i seguenti:

1. 1 kg di terreno non trattato (Controllo) (mesocosmi CP1 e CP2)
2. 1 kg di terreno ammendato con cellulosa allo 0,1% in peso (mesocosmi CTP1 e CTP2)
3. 1 kg di terreno ammendato con Ecoflex allo 0,1% in peso (mesocosmi ETP1 e ETP2)

In ogni mesocosmo è stata aggiunta acqua in modo da ottenere una capacità di ritenzione idrica del 50%. Ai mesocosmi sottoposti a trattamento sono stati inoltre aggiunti 100 semi di *Avena sativa*.

La sperimentazione ha avuto una durata di quattro settimane durante le quali è stata valutata la capacità di germinazione dei semi e crescita delle piante. Al termine di tale periodo sono stati prelevati i campioni di terreno da sottoporre agli studi di proteomica e genomica.

## Metodi

I campioni di terreno sono stati omogeneizzati e setacciati a 2mm con lo scopo di rimuovere radici e pietre e conservati a 4°C. Tutti i trattamenti e le analisi dei suoli sono state condotte in doppio.

### Studio delle proteine

#### Estrazione delle proteine in solfato di potassio

Il solfato di potassio ( $K_2SO_4$ ) (0,5M pH 6,6) è stato aggiunto al suolo in rapporto 1:3 (w/v), l'estrazione è stata condotta a temperatura ambiente per 1h in agitazione in incubatore termostatico a 150 oscillazioni per minuto (Masciandaro et al., 2008). Come inibitore di metallo proteasi è stato aggiunto EDTA 10mM (Tabatabai e Fu, 1992).

Dopo l'estrazione il campione è stato centrifugato per 15 min a 9000 rpm ed il surnatante, privo della frazione solida dell'estratto, costituita da terreno, è stato recuperato.

#### **Filtrazione su carta rapida**

Con lo scopo di separare la componente solida del suolo dall'estratto (surnatante) è stata effettuata una filtrazione su carta rapida (Whatman 541).

#### **Filtrazione su membrana batteriologica**

Con lo scopo di rimuovere la componente cellulare gli estratti sono stati filtrati attraverso membrane batteriologiche 0,22  $\mu\text{m}$  (Masciandaro e Ceccanti 1999).

#### **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 ponendo circa 20 litri di acqua all'esterno.

#### **Concentrazione**

L'estratto dializzato è stato concentrato di 600 volte rispetto al volume iniziale (300 ml) 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).

#### **Precipitazione metodo DOC/TCA/ACETONE**

0,1ml di estratto concentrato è stato sottoposto ad una precipitazione DOC/TCA/ACETONE. Il DOC (acido deossicolico) al 2% è stato aggiunto all'estratto in rapporto 1:100 v/v ed incubato per 1h a 4 °C; successivamente è stato aggiunto il TCA (acido tricloroacetico) al 100% (454 ml H<sub>2</sub>O/kg TCA) in rapporto 1:10 v/v, la precipitazione è stata condotta a -20 °C per tutta la notte. Dopo tale periodo di incubazione il campione è stato centrifugato a 14600 xg (12500 rpm) per 15 min a 4 °C e il surnatante è stato rimosso. Il pellet è stato lavato con 1 ml di acetone freddo e posto a -20 °C per 1h. Dopo un'ulteriore centrifuga nelle stesse condizione della precedente il pellet ottenuto è stato risospeso in 20  $\mu\text{l}$  di NaOH 100 mM.

#### **Elettroforesi**

##### **SDS-PAGE**

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 in condizioni denaturanti*

*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%	4,0 ml
_ APS 10%	50 $\mu$ l
_ TEMED	5 $\mu$ 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 $\mu$ l
_ TEMED	10 $\mu$ l

Soluzioni

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

*Sample Buffer 5x (10 ml)*

Tris-HCl 0,5M pH 6,8	6ml
SDS	1 g
Glicerolo	4 ml
Blu di bromofenolo	0.25 g

DTT 7.7%

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

Tris base 30,3 g

SDS 10,0 g

Glicina 144,0 g

**Colorazione delle proteine con coomassie colloidale**

*5% Coomassie Blu G-250 stock*

Sciogliere 0,5 g di Coomassie Blue G-250 in 10 ml di acqua milli Q

*Colloidal Coomassie Blu G-250 due stock solution*

50 g Solfato di ammonio (pm 132.1)

6 ml Acido fosforico 85%

10 ml 5% Coomassie Blue G-250 stock

Portare a 500 ml con acqua milli Q

*Colloidal Coomassie Blue G-250 working solution*

400 ml Colloidal Coomassie Blu G-250 due stock solution

100 ml metanolo

Lasciare colorare il gel in blanda agitazione per almeno due ore.  
Decolorare con acqua in leggera agitazione con cambi della soluzione decolorante fino alla scomparsa del colore di fondo.

**Silver staining**

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

***Fissativo***

Etanolo al 30%

Acido orto fosforico al 2%

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 (il gel può restare in questa soluzione anche più giorni).

### ***Soluzione 1***

etanolo 40%

acido acetico 10%

acqua 50%

Successivamente nella soluzione 2 per 2 h (il gel può restare in questa soluzione anche tutta la notte).

### ***Soluzione 2***

etanolo 5%

acido acetico 5%

acqua 90%

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 gluteraldeide per 30 min.

### ***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.

Sono seguiti tre lavaggi in acqua di 10 minuti ciascuno.

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

### ***Soluzione contenente nitrato d'argento ammoniacale***

**A:** sciogliere 0,8g di  $\text{AgNO}_3$  in 4 ml di acqua

**B:** unire 21 ml di acqua, 1 ml 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.

Quattro lavaggi in acqua di 4 minuti 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.

### ***Soluzione di sviluppo***

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

La soluzione deve essere preparata giornalmente.

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

### ***Soluzione bloccante***

Acido acetico al 5%

### **Soluzioni**

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

## **Studio del DNA**

### **Estrazione del DNA**

L'estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando un kit specifico per campioni di suolo "FastDNA SPIN Kit for Soil" (MP Biomedical). La procedura ha previsto:

1. aggiunta di 0,5 grammi di terreno al "Lysing Matrix E tube" e la successiva lisi del campione utilizzando lo strumento "FastPrep" per 40 secondi ad una velocità di 6,0
2. aggiunta di 980 µl di tampone fosfato di sodio a pH 7,0 e di 122 µl di tampone "MT"
3. omogeneizzazione del campione utilizzando lo strumento "FastPrep" per 40 secondi ad una velocità di 6,0

4. centrifugazione a 14,000xg per 10 minuti per consentire la precipitazione delle cellule lise
5. trasferire il surnatante in nuovi tubi da micro centrifuga da 2,0 ml ed aggiungere 250 µl di PPS (Protein Precipitation Solution) e miscelare agitando i tubi a mano per 10 volte
6. centrifugazione a 14,000xg per 5 minuti
7. trasferire il surnatante in tubi da 15 ml
8. aggiungere 1 ml di "Resuspended Binding Matrix", agitare a mano per 2 minuti per consentire il legame del DNA e lasciare riposare per 3 minuti per consentire la precipitazione della matrice silicea
9. rimuovere 500 µl di surnatante facendo attenzione per evitare di prelevare la Binding Matrix
10. trasferire approssimativamente 600 µl di Binding Matrix in tubi "SPIN Filter" e centrifugare a 14,000xg per 1 minuto
11. svuotare i tubi e continuare ad aggiungere il Binding Matrix fino ad esaurimento
12. aggiungere 500 µl di SEWS-M e risondere il pellet con la forza del puntale (Il SEWS-M che si trova all'interno del kit è in polvere e deve essere risospeso in 100 ml di etanolo al 100%)
13. centrifugare per 1 minuto a 14,000xg e svuotare il tubo
14. senza nessuna aggiunta di liquido centrifugare una seconda volta a 14,000xg per 2 minuti per consentire la completa rimozione della soluzione di lavaggio
15. buttare il tubo e sostituire con uno nuovo
16. seccare all'aria lo SPIN Filter per 5 minuti
17. delicatamente risospendere il Binding Matrix in 100 µl di DES (DNase/Pyrogen-Free Water)
18. centrifugare a 14,000g per 1 minuto per eluire il DNA nei nuovi tubi
19. Conservare a -20°C per lunghi periodi o a 4°C prima dell'uso.

Il DNA è quindi pronto per la PCR.

#### *Preparazione del gel di agarosio*

Sciogliere 1 g di agarosio (DNA grade) in 100 ml di TEA 1x (Tris EDTA-Acetato) in microonde per circa due minuti facendo attenzione che il liquido non fuoriesca, aggiungere 5 µl di bromuro di etidio\* e lasciar riposare per 12 minuti.

\*10 mg/ml (1 g di bromuro di etidio in 100 ml di acqua). Attenzione il bromuro di etidio è mutageno e tossico. Indossare maschera e guanti nella preparazione e nel maneggiamento.

Trasferire tutto il liquido sulla piastra per gelificare inserendo il pettine per il caricamento dei campioni ed aspettare circa 15 minuti.

### *Preparazione del campione*

Trasferire in nuovi tubi da 0,5 ml 5  $\mu$ l di DNA Loading Dye 6x (Fermentas) e aggiungere 5  $\mu$ l di campione.

Caricare tutto il campione nel pozzetto del gel (circa 10  $\mu$ l) e mettere nel primo pozzetto 5  $\mu$ l di marker (Fermentas, Gene Ruler 1kb DNA Ladder 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l, 50  $\mu$ g).

Impostare il voltmetro a 120V e lasciare per circa 30 minuti (controllare la migrazione del campione nel tempo).

### PCR

La PCR è stata eseguita utilizzando i primer per il DNA ribosomiale 16S

#### Mix di reazione

Master mix (Taq polimerasi, dNTP, MgCl <sub>2</sub> ,...)	25 $\mu$ l
Dimetil solfossido (DMSO)	5.0 $\mu$ l
BSA (10 mg/ml)	2.0 $\mu$ l
Primer forward (PA) (10-15 pmoli/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Primer reverse (PB) (10-15 pmoli/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
DNA	1.0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	17.5 $\mu$ l
Volume fiale	50 $\mu$ l

#### Amplificazione del DNA

##### 3 steps

- 1) Denaturazione iniziale 95°C per 2 min
- 2) 20-40 cicli di denaturazione
  - a. Denaturazione 95°C per 30 sec
  - b. Primer annealing 55°C per 30 sec
  - c. Estensione del primer 72°C per 30 sec
- 3) Estensione finale 72°C per 1 min

Dopo l'estensione finale i campioni sono immediatamente messi in ghiaccio o conservati a 4°C.

Nella fase 2) se la temperatura di denaturazione è troppo bassa si può avere la separazione incompleta delle doppia elica di DNA mentre se i tempi sono lunghi o la temperatura è troppo alta si può avere una diminuzione dell'attività della polimerasi. Anche la temperatura di annealing è molto critica e deve essere ottimizzata empiricamente.

Per verificare se c'è stata amplificazione del DNA viene eseguita una elettroforesi in gel di agarosio preparato come descritto sopra.

#### **Sequenziamento del DNA (Metodo del pirosequenziamento)**

Questo metodo si basa sul dosaggio del pirofosfato liberato in seguito all'attacco di un dNTP al filamento polimerizzato (Ronaghi et al., 1996; Ronaghi et al., 1998).

La tecnica di pirosequenziamento consta di 5 passaggi principali:

1. La sequenza da analizzare, dopo essere stata amplificata con la PCR, viene incubata come singola elica insieme agli enzimi DNA polimerasi, ATP solforilasi, luciferasi e apirasi e ai substrati adenosinolfosfato (ASP) e luciferina
2. Uno dei quattro dNTP è aggiunto alla reazione. La DNA polimerasi catalizza l'aggiunta di tale base solo se è complementare con il residuo del template. In tal caso si ha concomitante liberazione di pirofosfato inorganico PPI
3. Il PPI così prodotto viene trasformato in ATP, ad opera della solforilasi usando l'ASP come substrato. L'ATP ottenuto consente la conversione della luciferina ad ossiluciferina ad opera della luciferasi con produzione di un segnale luminoso che viene rilevato da un'apposita camera fotosensibile (CCD).
4. L'enzima apirasi degrada il dNTP che non è stato incorporato, e l'ATP prodotto dalla solforilasi. Solo quando la degradazione è terminata si aggiunge un secondo dNTP per far progredire la reazione di polimerizzazione (ritornando allo step 1)
5. Si aggiungono ciclicamente tutti e 4 i d(NTP) fino alla deduzione completa della sequenza

Il segnale luminoso prodotto ogni volta dalla luciferina viene registrato in un apposito "pirogramma". Il segnale sarà proporzionale all'ATP prodotto e quindi al nucleotide inglobato; un picco di intensità doppia, ad esempio, rileva che nello stesso ciclo sono stati inglobati 2 dNTP (ripetizione della stessa base sul template). Viceversa un segnale nullo indica che il dNTP aggiunto in quel ciclo non è complementare.

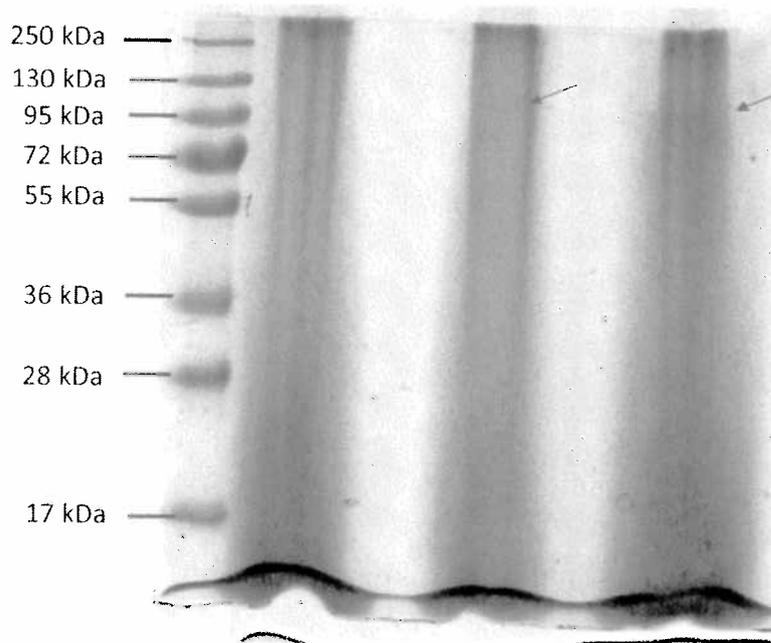
Si noti che non si può utilizzare l'ATP come dNTP da introdurre per la polimerizzazione, altrimenti non si riuscirebbe a capire se il segnale rilevato proviene da una corretta incorporazione del nucleotide o dall'attività intrinseca dell'ATP. Si utilizza in alternativa l'adenosina-tio-trifosfato, che è riconosciuta dalla DNA polimerasi come se fosse ATP, ma non dalla luciferasi.

## Risultati e discussione

### SDS-Page

I campioni, dopo la concentrazione di 600 volte con membrane di taglio molecolare di 10.000 Da, risultavano molto scuri a causa della presenza di sostanze umiche co-estratte. La corsa elettroforetica in condizioni denaturanti, condotta con il campione così ottenuto, ha messo in evidenza la presenza di poche bande proteiche appena visibili con la colorazione con coomassie colloidale (fig. 1). Con lo scopo di rimuovere gli interferenti è quindi stata eseguita la precipitazione delle proteine con il metodo del DOC/TCA senza però ottenere nessun miglioramento del pattern elettroforetico (immagine del gel non riportata).

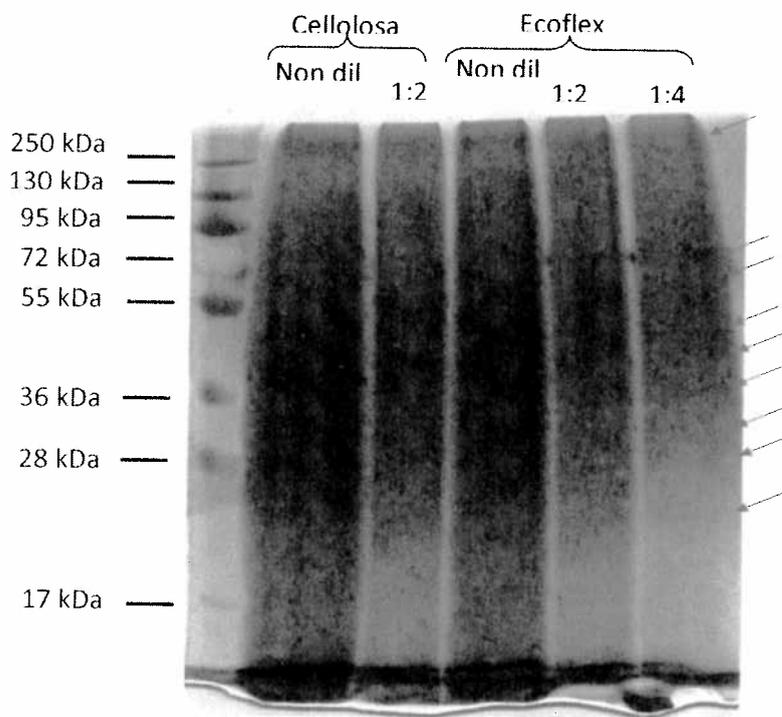
**Figura 1.** SDS-page e colorazione con coomassie colloidale. Da sinistra: pesi molecolari, controllo, trattamento con cellulosa e trattamento con Ecoflex.



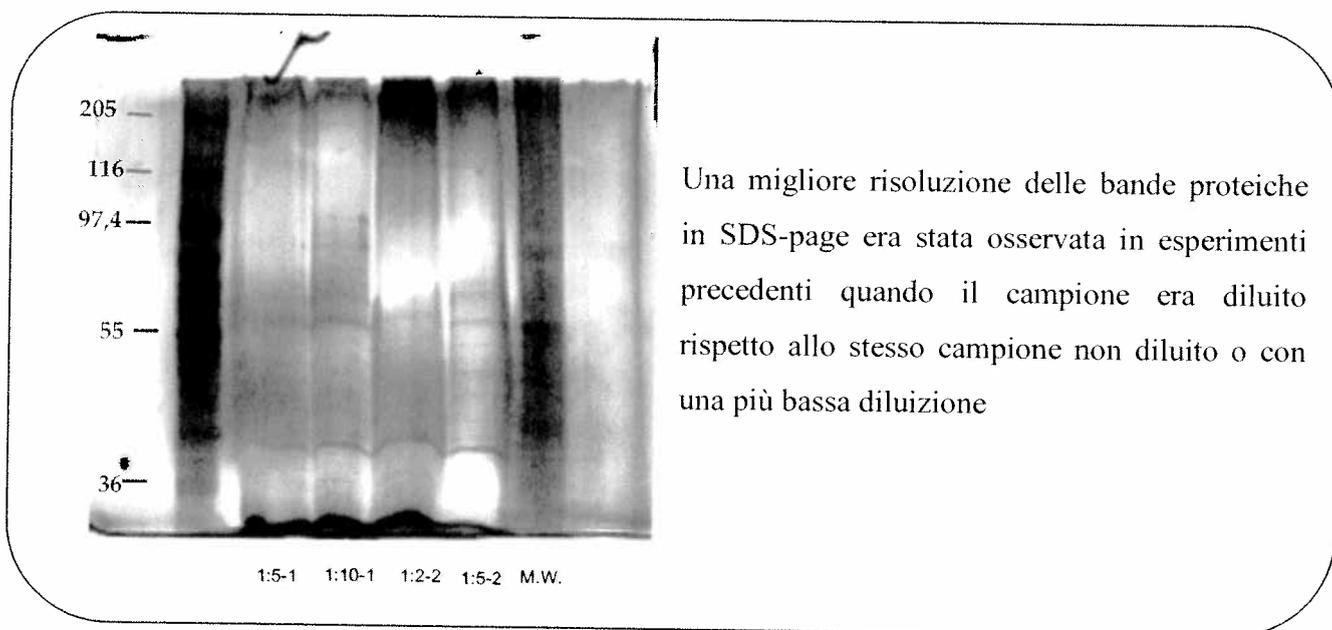
La bassa concentrazione di proteine, inferiore al limite di rilevabilità con il coomassie, ha quindi reso necessaria la colorazione del gel di poliacrilammide con “silver staining”.

Inizialmente è stata eseguita la colorazione con silver dei trattamenti (cellulosa ed *Ecoflex*), sia non diluiti sia con la diluizione del campione (Figura 2).

**Figura 2.** SDS-page e colorazione con silver dei trattamenti. Da sinistra: pesi molecolari, trattamento con cellulosa, campione non diluito e diluito 1:2, trattamento con *Ecoflex*, campione non diluito e diluito 1:2 e 1:4.



Tale colorazione ha consentito di evidenziare un elevato numero di bande in entrambi i campioni; in particolare, bande più definite sono messe in evidenza nei campioni sottoposti a diluizione.

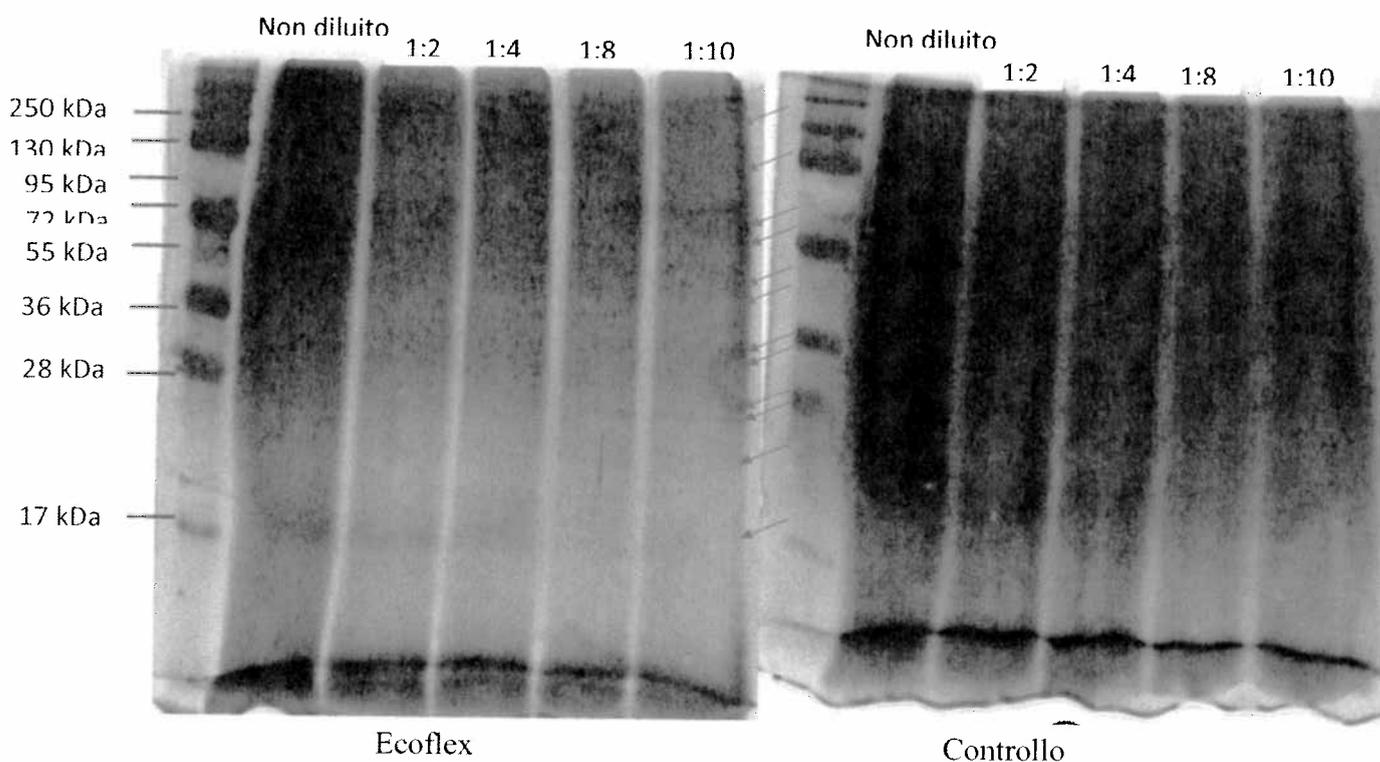


La diluizione del campione ha avuto quindi l'effetto di diminuire la concentrazione delle sostanze uniche e quindi di ridurre il background dovuto alle stesse.

Anche in questo caso, come osservato con la colorazione coomassie, nel trattamento con *Ecoflex* è possibile osservare la presenza di una banda ben definita con peso molecolare tra 95 e 72 KDa.

Data l'importanza della diluizione del campione sulla risoluzione delle bande proteiche, è stata eseguita la corsa elettroforetica dei campioni *Ecoflex* e del controllo a diverse diluizioni (fig. 3): campione diluito 1:2, 1:4, 1:8 e 1:10. Questo ha avuto lo scopo di individuare la concentrazione di campione con la migliore risoluzione delle bande, ovvero con il più basso background dovuto alle sostanze umiche.

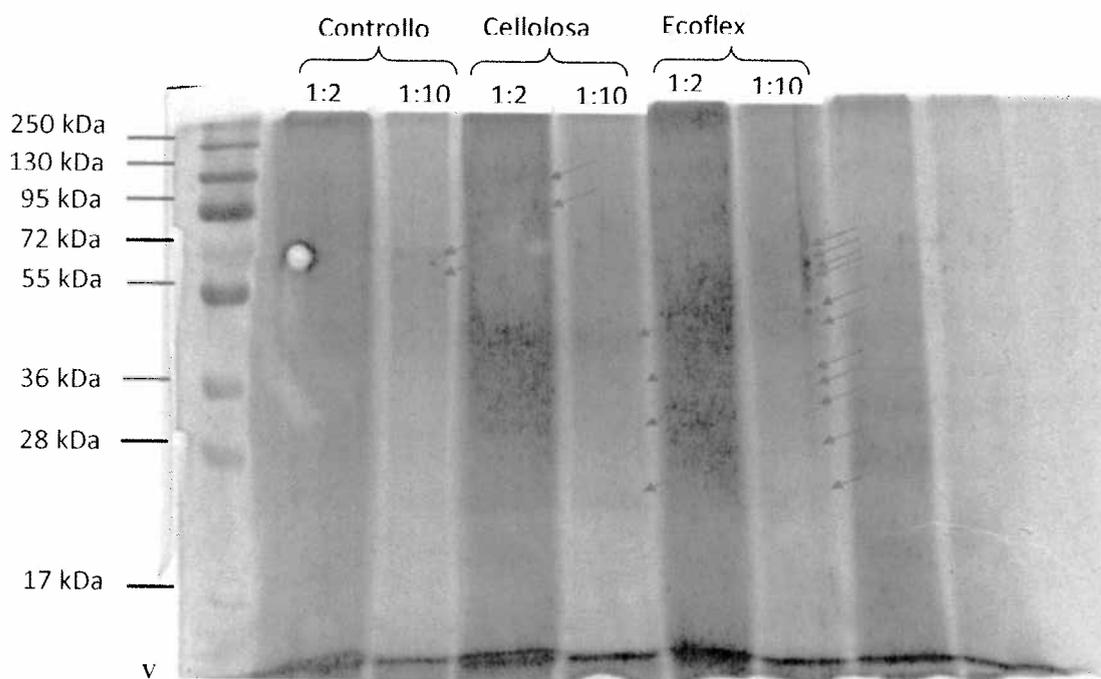
**Figura 3.** SDS-page e colorazione silver dei campioni trattamento con *Ecoflex* e controllo a diverse diluizioni.



Sulla base dei risultati ottenuti, l' SDS-page di tutti i campioni è stata eseguita alle diluizioni 1:2 e 1:10 (figura 4).

Contemporaneamente ai campioni oggetto di studio è stato caricato sul gel l'estratto proteico di un campione di terreno sabbioso con contenuto di carbonio organico minore dello 0,5%. Tale estratto ha mostrato una velocità di ultrafiltrazione notevolmente superiore al campione di Peccioli e, concentrato anch'esso di 600 volte (fino ad un volume di 500  $\mu$ l), risultava molto chiaro.

**Figura 4.** SDS-page e colorazione silver. Da sinistra controllo, 1:2 e 1:10, trattamento con cellulosa, 1:2 e 1:10, trattamento con *Ecoflex*, 1:2 e 1:10, terreno sabbioso, non diluito e diluito 1:10.



I risultati hanno confermato una migliore risoluzione delle bande in campioni con basso contenuto di sostanza organica.

Tra i trattamenti, il campione trattato con *Ecoflex*, ha mostrato un maggior numero di bande, suggerendo una stimolazione dell'attività dei microorganismi.

Il kit utilizzato per l'estrazione del DNA dai campioni di terreno ha permesso di ottenere un quantitativo elevato di DNA non degradato (10000 bp) (fig. 5). Tale DNA è stato quindi utilizzato per la PCR ed pirosequenziamento (analisi in corso).

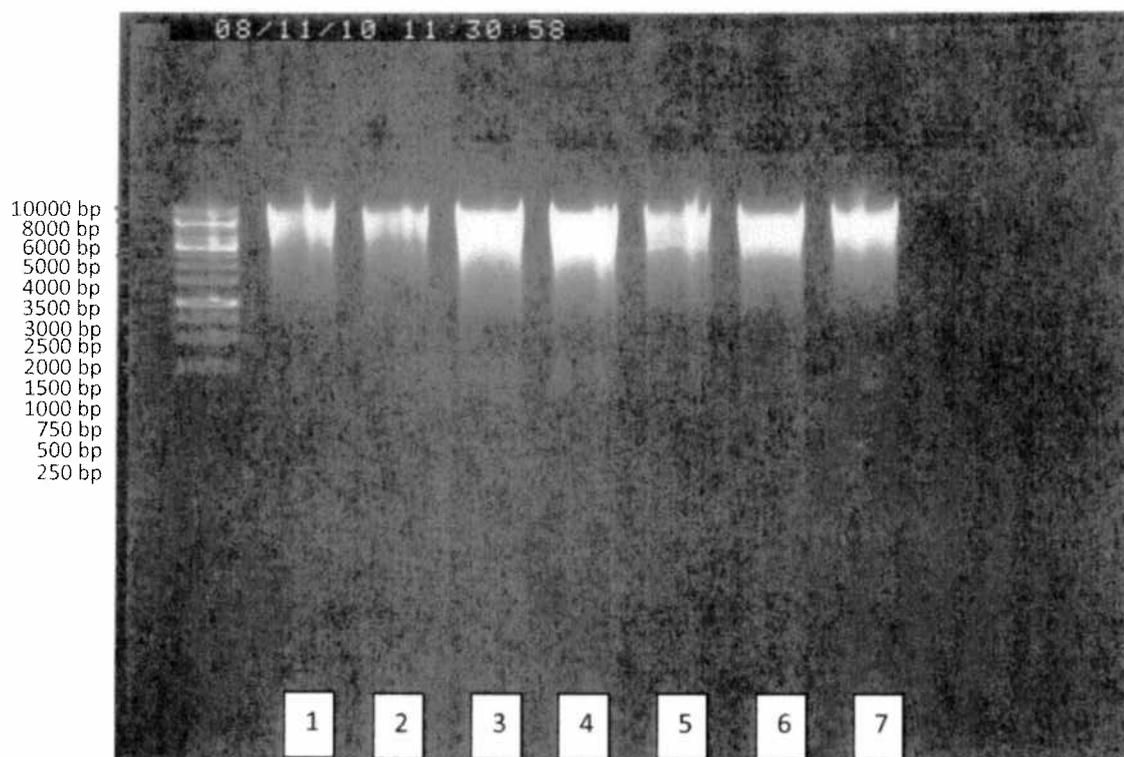


Figura 5. Gel di agarosio. Da sinistra: pesi molecolari, controllo (pozzetti 1, 2 e 3), trattamento con cellulosa (pozzetti 4 e 5) e trattamento con *Ecoflex* (pozzetti 6 e 7).

## Conclusioni

Le proteine costituiscono un eccellente strumento di analisi per l'identificazione delle specie microbiche biochimicamente attive nel terreno. Il loro isolamento richiede ancora studi approfonditi a causa della complessa matrice rappresentata dal suolo e a causa dell'eventuale formazione di complessi con la fase colloidale organica e minerale del suolo che ne ostacolano la purificazione. L'estrazione e purificazione delle proteine dal campione di terreno utilizzato nella presente sperimentazione è infatti risultata ostacolata dalla presenza di sostanza organica interferente. La visualizzazione di bande elettroforetiche in condizioni denaturanti è stata possibile grazie alla diluizione del campione che ha avuto l'effetto di diminuire la concentrazione delle sostanze umiche e quindi di ridurre il background dovuto alle stesse. Tra i trattamenti, il campione trattato con *Ecoflex*, ha mostrato un maggior numero di bande, suggerendo una stimolazione dell'attività dei microorganismi.

L'identificazione delle proteine e delle specie microbiche potranno sicuramente fornire importanti informazioni circa il ruolo svolto dai microrganismi sulla funzionalità del terreno e sulle variazioni della funzionalità legate a fenomeni di contaminazione e/o degradazione.

## Bibliografia

- Ceccanti, B., Bonmati-Pont, M., Nannipieri, P., 1989. Micro determination of protease activity in humic bands of different sizes after analytical isoelectric focusing. *Biology and Fertility of Soils* 7, 202-206.
- Kleeberg I, Hetz C, Kroppenstedt RM, Muller R-J, Deckwer W-D. Biodegradation of aliphatic–aromatic copolyesters by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates. *Appl Environ Microbiol* 1998;64(5): 1731–5.
- Masciandaro G., and Ceccanti B., 1999. Assessing soil quality in different agroecosystems through biochemical and chemico-structural properties of humic substance. *Soil and Tillage Reserch* 51, 129-137.
- Masciandaro G., Macci C., Doni S., Maserti B.E., Calvo-Bado L., Ceccanti B., Wellington E. 2008. Assessment of the extracellular  $\beta$ -glucosidase activity in forest sites through selective extractants. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1256-1261
- Ronaghi et al., 1996. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry* 242. PMID 8923969.
- Ronaghi et al., 1998. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281. PMID 9705713.
- Tabatabai and Fu, 1992. Extraction of enzymes from soil. *Soil Biochemistry* 7, 197-227.
- Witt U, Einig T, Yamamoto M, Kleeberg I, Deckwer W-D, Muller R-J. Biodegradation of aliphatic–aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. *Chemosphere* 2001;44(2):289–99.

Firma del fruitore del programma



Firma del proponente del programma

