Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
119° (2001), Vol. XXV, pp. 545-552

PAOLO NANNIPIERI * – MARIA TERESA CECCHERINI *
LORETTA LANDI * – GIACOMO PIETRAMELLARA *
GIANCARLO RENELLA *

Le agrobiotecnologie e la qualità del suolo **

Introduzione

Il suolo svolge un ruolo essenziale nella biosfera non solo per la sua capacità a fornire gli elementi nutritivi alle piante ed ad assicurare quelle proprietà chimiche, fisiche e biologiche adatte per la vita delle stesse piante ma anche perché assicura e mantiene la qualità di tutto l'ambiente e la salute degli animali, uomo incluso. Oggi, infatti, più che di fertilità del suolo (termine che riguardava solamente le relazioni tra piante e suolo), si parla di «qualità del suolo», che, secondo Doran e Parkin (1995), è definita come la capacità del suolo a funzionare entro i confini dell'ecosistema per sostenere la produttività, mantenere la qualità dell'ambiente a promuovere la salute delle piante e degli animali.

Il suolo è uno dei sistemi biologici più affascinanti della biosfera. La sua complessità è tale che è problematico isolare le cellule microbiche (da cui dipende in gran parte l'ampia attività metabolica del suolo) e simulare in laboratorio le condizioni che determinano l'attività di questi microorganismi *in situ*. La qualità del suolo, dipende in gran parte dalla sua attività metabolica. Oggi è possibile con approcci biotecnologici modificare la composizione o l'attività della microflora del suolo per scopi pratici come l'ottimizzazione della resa delle colture, la sviluppo del risanamento di suoli contaminati, la prevenzione dell'attacco di germi patogeni per la pianta e la conservazione della fertilità del suolo. Infatti, secondo Lynch (1983) la biotecnologia del suolo è definita come la manipolazione di processi metabolici e della popolazione microbica del suolo per ottimizzare la crescita delle colture, il risanamento dei suoli contaminati o conservare la salute del suolo.

* Dipartimento della Scienza del Suolo e Nutrizione della Pianta, Facoltà d'Agraria, Università degli Studi di Firenze, P.le delle Cascine 28, 50144 Firenze.

** Relazione presentata al Primo Convegno Nazionale della U.N.A.S.A. su «Biotecnologie agroalimentari, industriali, ambientali: problemi e prospettive», Roma, 1-2 ottobre 2001.

MANIPOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ METABOLICA DEL SUOLO CAMBIANDO LA COMPOSIZIONE DELLA MICROFLORA

L'attività metabolica del suolo può essere manipolata per fini pratici cambiando la composizione della microflora od agendo sui processi metabolici svolti dalla microflora stessa. Nel primo caso si può promuovere la crescita di microorganismi indigeni benefici, quelli che favoriscono l'attività della pianta, mentre nel secondo caso si può inibire processi metabolici dannosi per l'ambiente od esaltare l'attività di processi benefici per lo sviluppo della coltura.

In condizioni pedoclimatiche diverse (terreni canadesi contaminati dopo la rottura di tubazioni e quelli del Kuwait, contaminati durante la «Guerra del Golfo» del 1990), la contaminazione del suolo da petrolio è stata eliminata attraverso l'attività di una popolazione microbica indigena capace di degradare il complesso miscuglio d'idrocarburi del petrolio. Nei suoli contaminati da petrolio si forma uno strato superficiale di colore scuro altamente impermeabile alla penetrazione dell'aria. La lavorazione, e quindi la rottura di questo strato superficiale ed impermeabile, e l'aggiunta di notevoli quantità di fertilizzanti, stimolano l'attività della popolazione microbica indigena che degrada gli idrocarburi (Nannipieri *et al.*, 2000). Esiste una relazione empirica che consente di calcolare, conoscendo la quantità di petrolio che contamina il suolo, la quantità di fertilizzante da aggiungere al fine di dimezzare il contenuto di contaminante dopo un anno. Questa quantità è data dall'equazione (McGill *et al.*, 1981):

$$\text{Kg N ha}^{-1} = (\%\text{ in peso di petrolio nello strato di suolo di 0-5 cm})\ (190) - 140$$

Per una contaminazione di suolo del 7% in peso, sono necessari 1170 kg di N per ettaro per ridurre la concentrazione del petrolio al 3,5% dopo un anno. Naturalmente l'aggiunta di fertilizzanti azotati deve essere eseguita dopo la lavorazione del suolo.

La bibliografia riguardante l'impiego d'inoculanti microbici nel suolo è piuttosto ampia. Gli inoculi sono stati impiegati per migliorare la capacità del suolo a fornire nutrienti alla coltura, per combattere germi patogeni, per migliorare la struttura del suolo e per decontaminare i suoli inquinati. I risultati ottenuti sono contraddittori in quanto si è spesso assistito, nel caso della stessa specie microbica inoculata, ad effetti positivi, negativi od ad assenza di qualsiasi influenza sul processo considerato. Ciò dipende dal fatto che diversi fattori possono influenzare il comportamento della specie inoculata (Nannipieri *et al.*, 2000). Tra quelli di natura biotica i più importanti sono la predazione da parte di altri microorganismi quali i protozoi, o la competizione con la popolazione nativa del suolo, od il differente effetto che possono avere i composti rilasciati dalle radici sull'attività della specie inoculata rispetto a quella delle specie native (Figura 1). I meccanismi di predazione dei batteri da parte dei protozoi non sono del tutto chiari; ad esempio, quando l'umidità

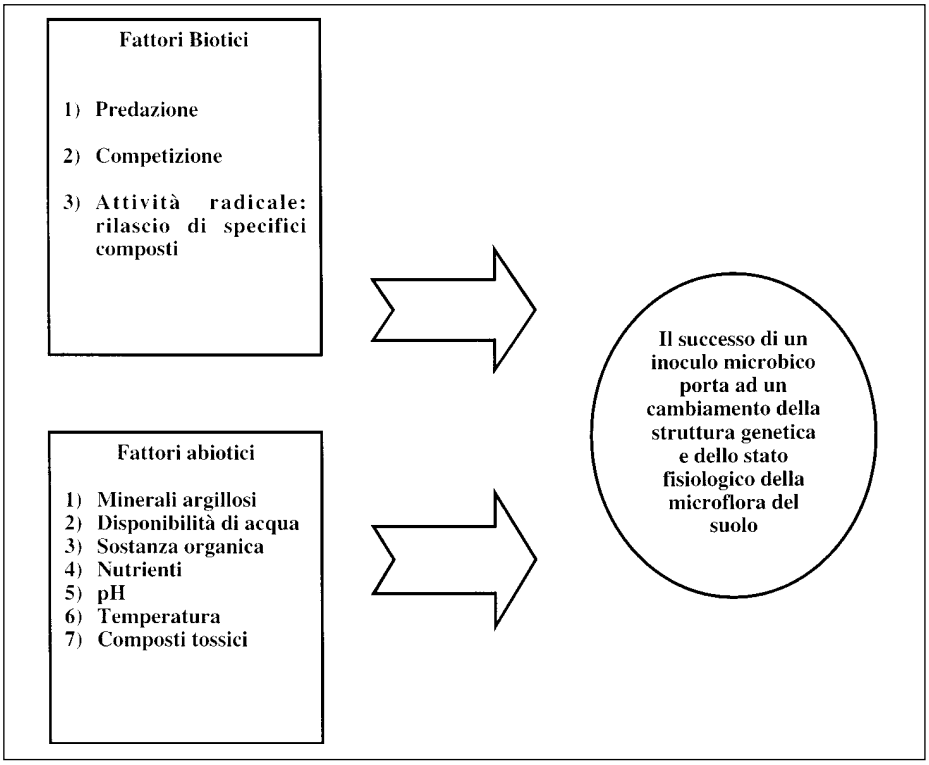

Fig. 1. Fattori biotici ed abiotici che influenzano la sopravvivenza degli inoculi microbici nel suolo (Modificato da Nannipieri *et al.*, 2000).

del suolo aumenta dopo un evento piovoso, si assiste ad una crescita dei batteri che è seguita da una crescita dei protozoi che predano tali batteri. Tuttavia, per un meccanismo ancora sconosciuto, l'attività predatoria dei protozoi si arresta quando il numero dei batteri diminuisce al di sotto di un certo valore, come se i predatori volessero impedire la scomparsa della preda nel sistema (Nannipieri e Badalucco, 2002). Tra i fattori abiotici, il contenuto di argilla, sostanza organica, elementi nutritivi e sostanze tossiche ed i valori di pH, temperatura ed umidità possono influenzare l'attività e la crescita della specie inoculata.

Manipolazione dell'attività metabolica del suolo modulando la velocità di processi microbici mediante aggiunta d'inibitori o di specifiche preparazioni enzimatiche

È possibile, come menzionato prima, influenzare l'attività di processi microbici che avvengono nel suolo. Specifici enzimi sono stati aggiunti al suolo per

aumentare la velocità di certe reazioni implicate nella degradazione di pesticidi, nel controllo dell'azione di germi patogeni o nel miglioramento della disponibilità di nutrienti alla pianta (Nannipieri *et al.*, 2000). Ad esempio, complessi umo simili contenenti l'enzima fosfatasi migliorano la disponibilità del fosfato per i germogli che si sviluppano da semi trattati con questi preparati enzimatici. Per un'efficace applicazione pratica, gli enzimi devono essere protetti dalla degradazione proteica, una volta aggiunti al suolo. A questo scopo si consiglia di immobilizzare gli enzimi su matrici di tipo umico, in modo da avere complessi con proprietà simili a quelli umo-enzimatici naturali. I complessi umo-enzima estratti dal suolo hanno una notevole resistenza alla degradazione proteica, alla denaturazione termica od alla denaturazione a valori estremi di pH (Nannipieri *et al.*, 1996). Per questo motivo si ritiene che questi complessi possono essere attivi anche in condizioni estreme che precludono l'attività microbica.

Infine, è possibile inibire, con composti specifici, processi quali la nitrificazione od attività enzimatiche come l'ureasi (Figura 2). Nel primo caso si diminuisce

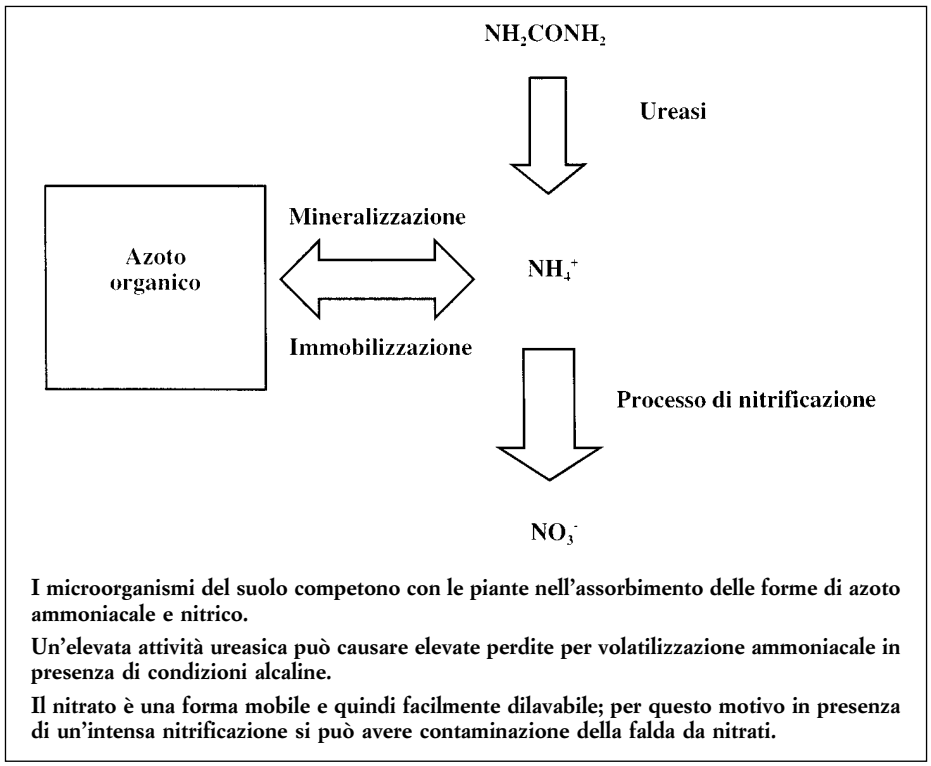

Fig. 2. Alcune reazioni del ciclo dell'azoto che possono essere inibite per aumentare l'assorbimento di azoto da parte della pianta o per eliminare effetti dannosi per l'ambiente.

la velocità di un processo che porta alla formazione di una forma mobile, il nitrato, facilmente dilavabile e quindi potenzialmente contaminante delle acque di falda. È inoltre diminuita la produzione di protossido d'azoto (che si forma sia durante la denitrificazione sia nel corso della nitrificazione), uno dei composti responsabili del cosiddetto «Effetto Serra» e della degradazione dello strato d'ozono nell'atmosfera superiore (Nannipieri *et al.*, 2000). Diversi composti sono capaci di inibire il processo di nitrificazione (Bundy e Bremner, 1973); Dicyan (nome commerciale della diaciadiamide) e Nitrapyrin (nome commerciale del 2-cloro-6-(tricloromethil) piridina) sono prodotti commerciali usati nella pratica agricola, anche se aumentano notevolmente i costi delle pratiche agronomiche.

Può essere necessario inibire l'idrolisi dell'urea, uno dei fertilizzanti azotati più usati nella pratica agronomica, quando l'attività ureasica del suolo è elevata. In questo caso si possono formare elevate concentrazioni d'azoto ammoniacale che, oltre ad essere tossiche per i germogli, possono causare perdite d'azoto ammoniacale per volatilizzazione in condizioni alcaline (Figura 2). Diversi composti sono capaci di inibire l'attività ureasica del suolo (Mulvaney e Bremenr, 1981) e tra questi le fosforoamidi sono quelli più efficaci (Held *et al.*, 1976).

La quantità d'azoto disponibile per le piante dipende dai processi di mineralizzazione ed immobilizzazione dell'azoto che avvengono simultaneamente e sono di natura microbica (Figura 2). La conversione dell'azoto ammoniacale ad aminoacidi (prima reazione del processo d'immobilizzazione) avviene attraverso la reazione catalizzata dalla glutammino-sintetasi microbica (Landi *et al.*, 1999). Perciò, inibendo questa reazione si potrebbe aumentare la disponibilità d'azoto ammoniacale, derivato dai fertilizzanti o dai processi di mineralizzazione dell'azoto, alle piante. La reazione catalizzata dalla glutammina-sintetasi può essere inibita dalla metionina solfosimina (MSX). Si è dimostrato, mediante l'impiego della tecnica della diluizione isotopica con un sale ammoniacale arricchito in ^{15}N, che l'MSX inibisce solo parzialmente il processo d'immobilizzazione, poiché è degradato dai microorganismi del suolo.

L'adsorbimento del DNA da parte dei colloidi del suolo ed il processo di trasformazione batterica

L'impiego d'organismi transgenici nella pratica agronomica richiede uno studio dettagliato del destino del DNA introdotto nel suolo. Il trasferimento dei geni tra microorganismi può avvenire mediante i processi di: 1) trasformazione, in cui il DNA extracellulare è preso da una cellula competente e poi integrato nel genoma microbico; 2) coniugazione, in cui il materiale genetico è trasferito da una cellula batterica ad un'altra dopo il loro contatto; 3) trasduzione, in cui il trasferimento di materiale genetico tra due cellule è mediato da un virus. Il DNA cromosomiale o plasmidico può essere adsorbito dai colloidi del suolo, ed essere in tal modo protetto

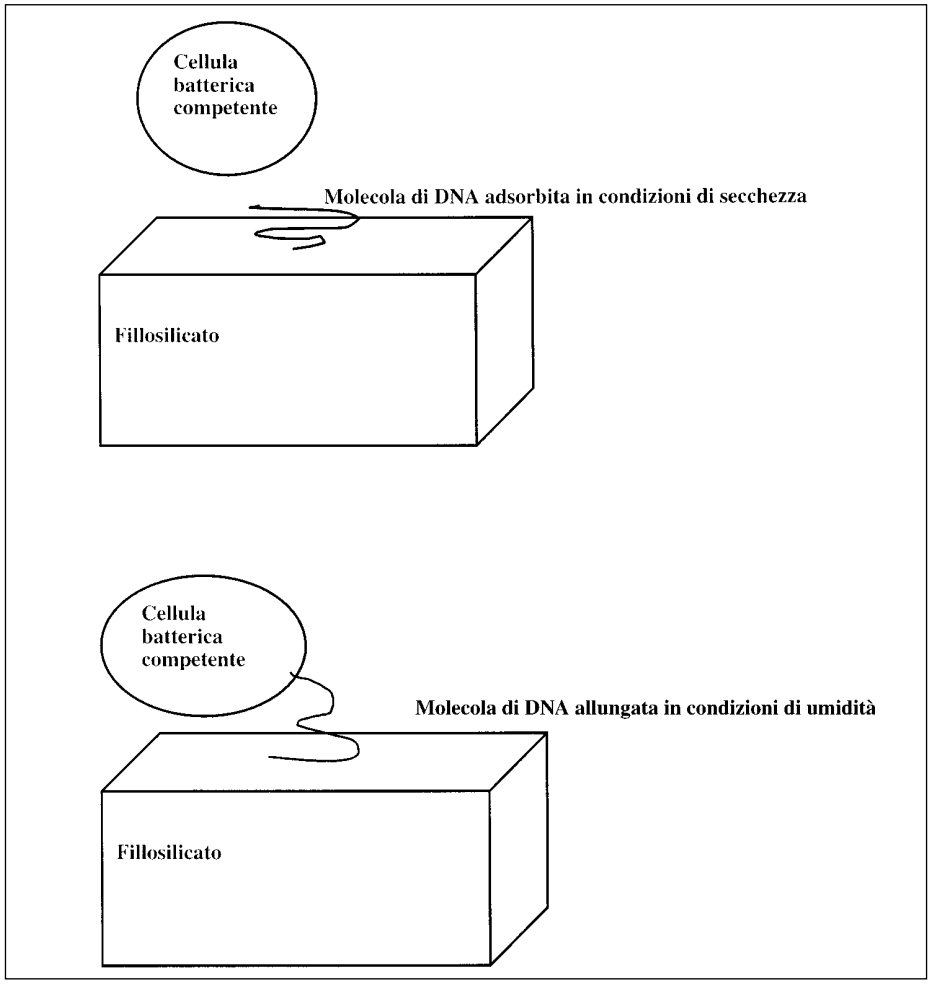

Fig. 3. La molecola di DNA è avvolta e non disponibile per la cellula batterica competente in condizioni di secchezza, mentre le condizioni umide provocano lo svolgimento della molecola di DNA che diviene così disponibile alla cellula batterica (Pietramellara *et al.*, 1997).

dalle nucleasi, ma tuttora disponibile per le cellule batteriche competenti che possono assorbirlo ed inserirlo nel loro patrimonio genetico (Pietramellara *et al.*, 1997).

In condizioni di secchezza la molecola di DNA adsorbita dai fillosilicati 1:1 o 2:1 non è disponibile alla cellula batterica (Figura 3); quando il complesso fillosilicato-DNA è umidificato, occorrono sei ore affinché la molecola possa essere utilizzata dalla cellula batterica competente (Pietramellara *et al.*, 1997). Si è ipotizzato che questo periodo è necessario alla molecola per passare dallo stato compatto a quello allungato

Conclusioni

La microflora del suolo può essere manipolata per aumentare specifiche attività, che possono promuovere un aumento di nutrienti per la pianta, il controllo di germi patogeni per le piante, il miglioramento della struttura del suolo o il risanamento di siti contaminati. Questi effetti sono ottenuti sia attraverso una diretta stimolazione della microflora indigena, attraverso un'inibizione di processi metabolici effettuati dai microorganismi o mediante aggiunta di specifici enzimi od inoculo di specifiche specie microbiche. Questi due ultimi approcci sono apparsi promettenti perché attraverso la manipolazione genetica è possibile ottenere dei prodotti mirati alle richieste. Tuttavia, il fatto che non sempre gli inoculi microbici hanno prodotto gli effetti desiderati, ha fatto sorgere il dubbio che quest'approccio non sia la via da seguire per un approccio biotecnologico alla fertilità del suolo (van Elsas e Heijnen, 1990). Si ritiene, tuttavia, che con l'impiego d'opportuni supporti, si può proteggere la specie microbica inoculata da predatori e dall'azione antagonista della microflora indigena.

Solamente alcune preparazioni enzimatiche sono state usate per scopi pratici. Ad esempio, tali preparazioni sono usate quando la reazione da loro catalizzata porta alla formazione di un prodotto meno tossico del pesticida contaminante (Nannipieri e Bollag, 1991). Se tale detossificazione richiede un numero maggiore di reazioni, è bene usare un inoculo microbico. Tuttavia, nell'impiego di preparati enzimatici è richiesta un'immobilizzazione dell'enzima su una matrice che ne prevenga la degradazione proteolitica senza impedire l'attività catalitica dell'enzima stesso.

Nel caso che le prove di laboratorio abbiano dimostrato l'efficacia dei preparati microbici od enzimatici è bene procedere alla prova in campo al fine di saggiarne l'efficacia del preparato *in situ*. Inoltre, l'uso commerciale della preparazione dovrebbe essere preceduto da un'analisi accurata dei costi e benefici.

Infine nell'era delle manipolazioni genetiche, mirate a produrre organismi che sappiano rispondere efficacemente ai diversi problemi pratici, è bene precedere l'impiego d'organismi transgenici da un'indagine sul destino del DNA transgenico nell'ambiente terrestre.

BIBLIOGRAFIA

Bundy L.G. & Bremner J.M. (1973). Inhibition of nitrification in soils. *Soil Science Society of American Proceedings*, *37*, 396-398.

Held P., Lang S., Tradier E., Klepel M., Drohne D., Hartbrich H.J., Rothe G., Scheler H., Grundmeier S. & Trautman A. (1976). Agent for reducing the loss of plant-available nitrogen in cultivated soil. *East German Patent* No 122, 177 (*Chemical Abstract*, *87*, 67315w).

Landi L., Barraclough D., Badalucco L., Gelsomino A. & Nannipieri P. (1999). L-methionine-sulphoximine affects N mineralization-immobilization in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *31*, 253-259.

Lynch J.M. (1983). *Soil Biotechnology.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, Greta Britain.

McGill W.B., Rowell M.J. & Westlake D.W.S. (1981). Biochemistry, ecology and microbiology of petroleum components in soil. In: *Soil Biochemistry* vol. 5, Paul E.A. & Ladd J.N., eds., Marcel Dekker, New York, pp. 229-296.

Mulvaney R.I. & Bremner J.M. (1981). Control of urea transformations in soil. In: *Soil Biochemistry* vol. 5, Paul E.A. & Ladd J.N., eds., Marcel Dekker, New York, pp. 153-196.

Nannipieri P. & Bollag J.-M. (1991). Use of enzymes to detoxify pesticide-polluted soils and waters. *Journal of Environmental Quality*, 20, 510-517.

Nannipieri P. & Badalucco L. (2002). Biological processes. In: D.K. Bembi & R,. Nieder, *Processes in the Soil-Plant System: Modelling Concepts and Applications.* The Haworth Press, Inc. Binghamton, NY, in press.

Nannipieri, P., Sequi P. & Fusi P. (1996). Humus and enzyme activity. In: *Humic substances in Terrestrial Ecosystems*, eds. A. Piccolo. Amsterdam, Netherlans: Elsevier, pp. 293-328.

Nannipieri P., Benedetti A. & Pietramellara G. (2000). Applications and risks in soil biotechnology. In: *Biotechnology of soil: monitoring, conservation and remediation,* Benedetti A., Tittarelli F., de Bertoldi S. & Pinzari F., eds., European Commission, COST Action 831, pp. 19-35.

Nannipieri P., Falchini L., Landi L. & Pietramellara G. (2000). Management of soil microbiota. In: *Biological Resource Management Connecting Science and Policy*, Balazs E., Galante E., Lynch J.M., Schepers J., Toutant J-P, Werner D. & Werry P.A.Th.J., eds., Springer Verlag, Berlin, pp. 237-259.

Pietramellara G., Dal Canto L., Vettori C., Gallori E. & Nannipieri P. (1997). Effects of air-drying and wetting cycles on the transforming ability of DNA bound on clay minerals. *Soil Biology and Biochemistry*, *29*, 55-61.

Van Elsas J.D. & Heijnen C. (1990). Methods for the introduction of bacteria in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils*, *10*, 127-133.