

Giornata di studio

La chimica del suolo ieri, oggi e domani

Giornata in ricordo di Paolo Sequi

13 ottobre 2022

Relatori

Paolo Nannipieri, Gianniantonio Petruzzelli, Maria De Nobili,
Claudio Ciavatta, Stefano Mocali, Giancarlo Renella, Carlo Emanuele Gessa

PAOLO NANNIPIERI¹

Le attuali conoscenze partendo dalle sette domande proposte da Waksman

¹ Professore Emerito della Università degli Studi di Firenze e vicepresidente Fondazione per il Clima e la Sostenibilità

INTRODUZIONE

Il tema di questo contributo, dedicato al prof. Paolo Sequi, riguarda lo stato di avanzamento delle conoscenze relative alle sette grandi questioni che il prof. A. Waksman propose nel 1927 nel suo libro *Principle of Soil Microbiology* (Williams & Wilkins, Baltimore). Secondo Waksman le risposte a queste domande avrebbero portato a comprendere il funzionamento del suolo, che dipende in gran parte dall'attività degli organismi che ci abitano. Le sette domande erano:

1. What organisms are active under field conditions and in what ways?
2. What associative and antagonistic influences exist among soil microflora and fauna?
3. What relationships exist between soil organic matter (SOM) transformations and soil fertility?
4. What is the meaning and significance of energy balance in soil, in particular with reference to C and N?
5. How do cultivated plants influence soil transformations?
6. How can one modify soil populations and to what ends?
7. What interrelationships exist between physicochemical conditions in soil and microbial activities?

Il prof. Waksman vinse il premio Nobel nel 1952 perché aveva scoperto la streptomicina, un antibiotico efficace contro la tubercolosi e prodotto da un microorganismo del suolo *Streptomyces griseus*. È anche conosciuto per i suoi studi di microbiologia e biochimica del suolo. Per esempio, propose la

teoria del complesso ligno-proteico per spiegare la umificazione del suolo: le molecole umiche erano il prodotto della interazione tra proteine sintetizzate dai microrganismi con la lignina modificata.

Lo stato delle conoscenze delle sette domande fu esaminato dal prof. McLaren nel 1977 e, come vedremo in seguito, McLaren è stato importante nello sviluppo della biochimica del suolo, un argomento che Paolo Sequi aveva previsto essere molto importante per comprendere le funzioni del suolo. Successivamente lo stato delle conoscenze relative alle sette domande è stato discusso da Van Elsas e Nannipieri nel 1919 con lo scopo di evidenziare la storia degli studi sul funzionamento del suolo. Lo sviluppo storico delle conoscenze è importante nella attuale fase caratterizzata da indagini bibliografiche che si limitano spesso a quanto è raggiungibile con i sistemi elettronici ignorando quanto pubblicato in precedenza.

SEMINARIO DI MCLAREN A PISA NEL 1972 E INIZIO DEGLI STUDI DI BIOCHIMICA DEL SUOLO

Ho iniziato la mia carriera scientifica sotto la supervisione di Paolo Sequi a Pisa presso il Laboratorio per la Chimica del Terreno del CNR. Essendo un biochimico avevo delle perplessità nel condurre ricerche sul suolo che fossero attinenti alla mia preparazione. Il suolo era per me qualcosa di inerte. Tuttavia, Sequi mi spiegò che esisteva la biochimica del suolo ed ebbe la geniale idea di invitare a Pisa gli studiosi di allora che erano "top scientists" nella scienza del suolo. Il primo a essere invitato fu il prof. McLaren della Università di Berkeley, padre della "Soil Biochemistry"; McLaren tenne un seminario dal titolo "Consecutive biochemical reactions in soil with particular reference to the nitrogen cycle", di cui conservo la pubblicazione a cura del Laboratorio per la Chimica del Terreno. In particolare, il prof. McLaren parlò dell'attività ureasica e delle diverse locazioni che questo enzima poteva avere nel suolo. Questo intervento mi fece capire che potevo applicare le mie conoscenze di biochimica anche al suolo, che era un sistema biologico complesso e affascinante.

Potremo definire il prof. McLaren anche un chimico agrario perché nei suoi studi si occupò non solo della biochimica e microbiologia del suolo ma anche di reazioni abiotiche della pianta indotte dalla luce. Quindi fu un ricercatore che pose al centro dei suoi studi il sistema suolo-pianta, i cui aspetti chimici e biochimici sono tra le competenze della Chimica Agraria. Il prof. Giovanni Ferrari, fondatore della Società di Chimica Agraria, trascorse un periodo di ricerca nel laboratorio di Berkeley diretto dal prof. McLaren.

RIASSUNTO DI QUANTO GIÀ RIPORTATO PER LE PRIME TRE DOMANDE

La presentazione delle domande proposte da Waksman e lo stato delle attuali conoscenze relative agli argomenti proposti nelle prime tre domande sono stati discussi in quattro brevi articoli pubblicati dal Notiziario di Informazione dell'Accademia dei Georgofili. Oggi si ritiene il suolo un comparto essenziale non solo per il suo ruolo nella fertilità ma anche per la salute dell'ambiente terrestre e dell'uomo. Quindi si usa il termine qualità del suolo che ha un significato più ampio del termine fertilità del suolo. L'uso di isotopi ha permesso di quantificare le reazioni dei principali elementi nutritivi e il destino dei fertilizzanti nel sistema suolo-pianta. Le tecniche molecolari basate sulla estrazione di acidi nucleici e sul loro sequenziamento hanno permesso di caratterizzare meglio la diversità e le funzioni delle comunità microbiche, dalle quali dipende principalmente il funzionamento del suolo. La biomassa microbica è molto elevata. Phil Brokes, comparando la biomassa degli organismi animali che vivono sulla superficie terrestre con la biomassa microbica del suolo, calcolò che mediamente la biomassa microbica del suolo era equivalente a quella di 100 pecore mentre quella animale sulla superficie terrestre di ettaro era pari a 2 pecore (Nannipieri, 2020). Tuttavia, solamente un volume pari all'1% di quello totale è occupato dalle popolazioni microbiche, perché pochi microambienti offrono le condizioni necessarie per la vita microbica. La diversità microbica è elevata; infatti, in un grammo di suolo vivono migliaia di specie microbiche diverse. In alcuni microambienti occupati le specie microbiche sono attive perché dispongono dei nutrienti; ad esempio, i microambienti della rizosfera, il suolo che circonda la radice. In altri microambienti carenti di nutrienti le specie microbiche sono inattive. Molecole biologiche importanti come gli enzimi e gli acidi nucleici possono persistere nell'ambiente extracellulare se adsorbiti dalle superfici di particelle solide con le quali interagiscono, e ciò caratterizza il suolo per un'attività enzimatica e una carica genomica extracellulare indipendente dall'attività microbica (Nannipieri, 2020). Infine, oggi si comprende meglio il funzionamento del sistema suolo-pianta di quanto fosse possibile ai tempi di Waksman. Ad esempio l'uso combinato di isotopi stabili e tecniche molecolari come la tecnica "Stable Isotope Probes (SIP)" permette di monitorare il destino degli essudati radicali prodotti dalla fissazione dell'isotopo ^{13}C dell'anidride carbonica: le comunità microbiche che usano tali essudati sintetizzano il DNA pesante, cioè quello che contiene l'isotopo ^{13}C che è separato dal quello leggero che contiene il ^{12}C per ultracentrifugazione (fig. 1).

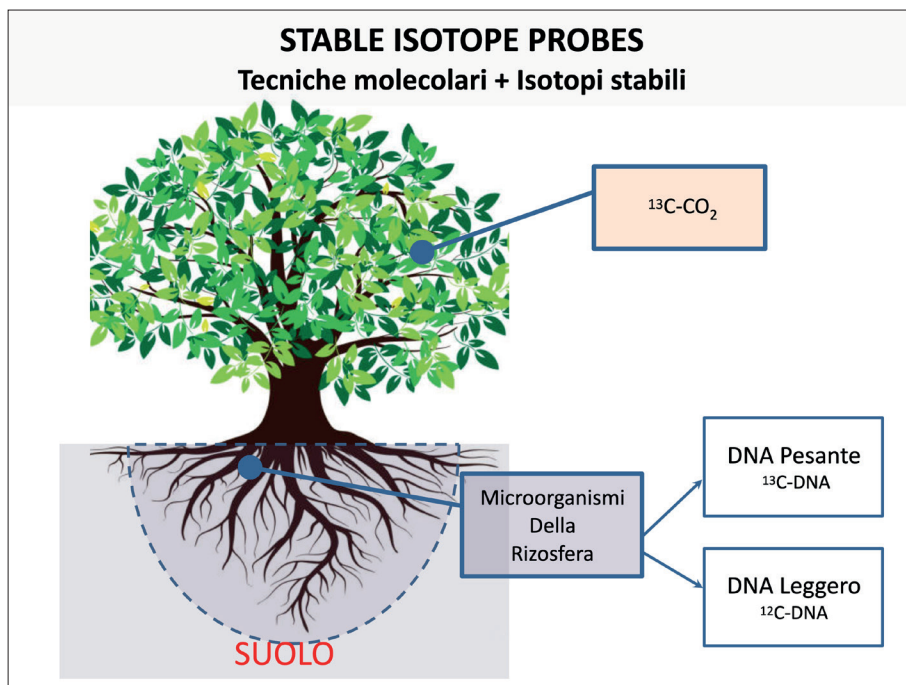


Fig. 1 Applicazione della tecnica "Stable Isotope Probes" al sistema pianta-suolo per monitorare il percorso del carbonio fotosintetizzato dalla pianta alla popolazione microbica del suolo

LA QUARTA DOMANDA: WHAT IS THE MEANING AND SIGNIFICANCE OF ENERGY BALANCE IN SOIL, IN PARTICULAR WITH REFERENCE TO C AND N?

La quarta domanda pone in relazione il flusso energetico con i cicli di due importanti elementi quali il carbonio e l'azoto. Si tratta di tre temi complessi. Tuttavia le dinamiche del carbonio e dell'azoto sono oggi più complesse di quanto fosse conosciuto al tempo di Waksman. Sappiamo che le necromasse microbiche formano il 70-80% della sostanza organica perché i residui vegetali e animali sono in genere degradati dal microbioma, la cui morte genera la sostanza organica, da cui dipende la fertilità dei suoli. Le tecniche che favoriscono l'aumento di sostanza organica nei suoli sono anche importanti perché, attraverso lo "stoccaggio del carbonio" nel suolo, si può contrastare l'aumento di concentrazione di anidride carbonica nell'atmosfera, che è ritenuta la principale causa dell'innalzamento della temperatura. L'aumento delle superfici forestali con tecniche agro-forestali aumenta il contenuto di sostanza organica specialmente negli orizzonti del suolo più profondi. Infatti, il contenuto di so-

stanza organica diminuisce secondo la profondità del suolo e quindi i margini di aumento sono maggiori dove il contenuto è minore.

Il ciclo dell'azoto è oggi più complesso di quanto lo fosse al tempo di Waksman perché le forme azotate possono dare origine a reazioni che erano sconosciute, come la reazione anaerobica ossidativa dello ione ammonio. Oggi sappiamo che il suolo è abitato da popolazioni microbiche allora sconosciute, come la *Nitrosospira*, che contiene gli enzimi responsabili della ossidazione di ammoniaca a nitrito e quelli che catalizzano la ossidazione del nitrito a nitrato. Al tempo di Waksman si conoscevano popolazioni microbiche che effettuavano solo uno dei due processi.

L'energia arriva al suolo in genere sotto forma di composti organici, costituiti principalmente da residui vegetali o rizodeposizioni, cioè essudati radicali e residui radicali. Questi apporti al suolo non sono continui e quindi il suolo si caratterizza non solo per una variabilità spaziale dell'attività microbica ma anche per una variabilità temporale connessa alle variazioni degli inputs energetici.

LA QUINTA DOMANDA: HOW DO CULTIVATED PLANTS INFLUENCE SOIL TRANSFORMATIONS?

La pianta può selezionare la popolazione microbica che circonda le radici attraverso il rilascio di essudati radicali. Tuttavia questi effetti sono transitori perché, come già menzionato, la popolazione microbica è resiliente. Sebbene la diversità microbica diminuisca passando dal suolo rizosferico a quello non rizosferico si è stimato che in media solo il 17% della diversità microbica del suolo rizosferico dipende dal tipo di pianta e il rimanente dal tipo di suolo (Nannipieri, 2020). L'effetto della pianta cresce al 40% in media nel determinare la diversità delle popolazioni microbiche endofite, cioè che vivono all'interno della pianta.

È chiaro che nelle policulture con differenti tipi di piante, le radici di diverse piante possono occupare diverse porzioni di suolo e aumentare in questo modo la qualità e la diversità degli essudati radicali e quindi gli effetti sul microbioma del suolo. Tuttavia non sempre si ha una sinergia che porta alla crescita delle diverse specie vegetali. Per esempio, un esperimento con la senape bianca (*Sinapis alba*), facelia di pizzo (*Phacelia tanacetifolia*), avena (*Avena strigosa*) e trifoglio egiziano (*Trifolium alexandrinum*) coltivati da soli o insieme in un suolo "silt loam" ha evidenziato la prevalenza della biomassa radicale della senape e della facelia (Heurmann et al., 2019). Tuttavia, la pratica agronomica pluriennale ha permesso di selezionare policulture che migliorano la fertilità del suolo e l'azione di controllo verso i germi patogeni ma alcuni relativi meccanismi non sono conosciuti e richiedono ulteriori ricerche.

LA SESTA DOMANDA: HOW ONE MODIFY SOIL POPULATIONS AND TO WHAT ENDS?

Modificare la diversità microbica del suolo favorendo quei microorganismi che possono favorire la resa delle colture e/o combattere i germi patogeni è uno degli scopi della agricoltura sostenibile suolo; è una sfida molto difficile da vincere perché il microbioma è resistente e dipende dalle proprietà del suolo come ho menzionato in precedenza (Van Elsas e Nannipieri, 2019). Perciò la modifica desiderata del microbioma del suolo si può avere non solo introducendo i microorganismi che effettuano le funzioni desiderate ma anche agendo sulle proprietà del suolo che migliorino le funzioni desiderate, ad esempio attraverso la fertilizzazione organica o l'aggiunta di materiali come il biochar che possono selezionare microorganismi aventi azioni benefiche sulla pianta. Sebbene siano stati fatti dei miglioramenti che favoriscono l'introduzione di microorganismi benefici nel suolo, come ad esempio l'uso di "carriers" che agiscono da microambienti favorevoli per l'inoculo microbico, la sopravvivenza dell'inoculo nel suolo è limitata e quindi l'azione desiderata è di breve durata.

LA SETTIMA DOMANDA: WHAT INTERRELATIONSHIPS EXIST BETWEEN PHYSICOCHEMICAL CONDITIONS IN SOIL AND MICROBIAL ACTIVITIES?

Le tecniche molecolari hanno permesso di identificare il valore di pH come una delle proprietà del suolo più importanti nel determinare l'attività microbica. Da tempo sappiamo che i batteri sono sensibili ai valori di pH acidi mentre i funghi sono più resistenti. Tuttavia, oggi abbiamo individuato le specie resistenti e quelle che sono sensibili a valori di pH lontani dalla neutralità (Van Elsas e Nannipieri, 2019).

Un'altra proprietà del suolo che gioca un ruolo importante nel determinare non solo l'attività ma anche la diversità microbica è l'umidità. La secchezza dei suoli causa una marcata riduzione dell'attività e della diversità microbica favorendo le specie resistenti alla limitazione di acqua. Invece nel caso di suoli saturi di acqua prevalgono condizioni di limitata disponibilità di ossigeno favorendo così il metabolismo anaerobico e le specie microbiche anaerobiche. Infine l'uso delle tecniche molecolari ha permesso di studiare le variazioni della diversità microbica del suolo in seguito alle modifiche delle proprietà indotte da pratiche agronomiche, come ad esempio le lavorazioni del suolo (Van Elsas e Nannipieri, 2019).

CONCLUSIONI

Nonostante l'avanzamento delle conoscenze sulle funzioni del suolo e sul ruolo che hanno gli organismi che lo abitano in queste funzioni, non siamo ancora capaci di comprendere e simulare quello che avviene a livello del microambiente. L'avanzamento delle conoscenze è stato ottenuto in gran parte con tecniche che si basano sulla estrazione di composti dal suolo; ad esempio le tecniche molecolari si basano sulla estrazione di acidi nucleici. I metodi di estrazione presentano alcuni inconvenienti, quali la non completa estrazione del composto, la non conoscenza della distribuzione eterogenea del composto e la possibilità di avere artefatti durante la estrazione. Anche le conoscenze acquisite con esperimenti semplici, quali, ad esempio, quelli che studiano l'adsorbimento di un composto da parte di un componente della fase solida del suolo, non considerano la complessità dell'ambiente suolo; ad esempio nel caso considerato il ruolo di altri componenti della fase solida o di altri composti in aggiunta a quelli considerati. Un ulteriore avanzamento delle conoscenze richiede a mio avviso di visualizzare quello che succede a livello del microambiente e di simulare tali condizioni con esperimenti di laboratorio. Il recente uso del NanoSIMS, un tipo di analisi di spettrometria di massa, ha mostrato il percorso del carbonio fotosintetizzato dalla pianta alle radici, dalle radici alle ife delle micorrize che infettano la radice e da queste ife ai microorganismi che sono vicini alle micorrize (Kaiser et al., 2015). L'impiego combinato di sezioni di suolo esaminate prima al microscopio elettronico di trasmissione e poi con il NanoSIMS ha evidenziato il percorso di residui vegetali marcati con ^{13}C nei lombrichi, dai lombrichi alla superficie di particelle solide (Vidal et al., 2019). Si tratta esperimenti innovativi che fanno ben sperare per comprendere quello che succede nei diversi microambienti del suolo.

RIASSUNTO

Ho iniziato la mia carriera scientifica sotto la supervisione di Paolo Sequi a Pisa presso il Laboratorio per la Chimica del Terreno del CNR. Essendo un biochimico avevo delle perplessità nel condurre ricerche sul suolo che fossero attenenti alla mia preparazione. Il suolo era per me qualcosa di inerte. Tuttavia, Paolo mi spiegò che esisteva la biochimica del suolo ed ebbe la geniale idea di invitare a Pisa gli studiosi di allora che erano "top scientists" nella scienza del suolo. Il primo ad essere inviato fu il Prof A.D. McLaren della Università di Berkeley, padre della "Soil Biochemistry"; McLaren tenne un seminario dal titolo "Consecutive biochemical reactions in soil with particular reference to the nitrogen cycle", di cui conservo la pubblicazione a cura del Laboratorio per la Chimica del Terreno. In particolare il prof McLaren parlò dell'attività ureasica e delle diverse locazioni che que-

sto enzima poteva avere nel suolo. Questo intervento mi fece capire che potevo applicare le mie conoscenze anche al suolo, che era un sistema biologico complesso ed affascinante. Il prof McLaren fu anche il primo che esaminò nel 1977 l'avanzamento delle conoscenze relative alle tematiche delle domande proposte da Waksman nel 1927 nel suo libro "Principle of Soil Microbiology" (Williams & Wilkins, Baltimore). Le risposte a queste domande avrebbero portato a comprendere il funzionamento del suolo, che dipende in gran parte dall'attività degli organismi che ci abitano.

ABSTRACT

The present knowledge of the seven grand questions by Prof Salem Waksman. My scientific career has begun under the direction of Paolo Sequi at the "Laboratorio per la Chimica del Terreno, CNR in Pisa. Dealing my research thesis on biochemistry, I was perplexed to carry out studies on soil, that it was for me an inert system. Fortunately, Paolo Sequi explained me the existence of Soil Biochemistry and then he invited Prof A.D. McLaren of the University of Berkeley, the founder of "Soil Biochemistry"; McLaren gave a speech titled "Consecutive biochemical reactions in soil with particular reference to the nitrogen cycle", of which I keep the publication by the "Laboratorio per la Chimica del Terreno". In particular prof McLaren spoke about the urease activity and the different locations of the enzyme in the soil matrix. I understood that the soil was a complex and fascinating biological system. Prof McLaren was the first discussing the status of knowledge of the seven grand questions proposed by Prof Waksman in his book "Principle of Soil Microbiology" (Williams & Wilkins, Baltimore) published in 1927. According to Prof. Waksman, the answers to these questions would allow to understand and quantify soil functions.

BIBLIOGRAFIA

- HEUERMANN D., GENTSCH N., BOY J., SCHWENEKER D., FEUERSTEIN U., GROB J., BAUER B., GUGGENBERGER G., VON WIREN N. (2019): *Interspecific competition among catch crops modifies vertical root biomass distribution and nitrate scavenging in soils*, «Scientific Report», 9, p. 11531.
- KAISER C., KILBURN M.R., CLODE P.L., FUCHSLUEGER L., KORANDA M., CLIFF J.B., SOLAIMAN Z.M., MURPHY D.V. (2015): *Exploring the transfer of recent plant photosynthates to soil microbes: mycorrhizal pathway vs direct root exudation*, «New Phytologist», 205, pp. 1537-1551.
- McLAREN A.D. (1977): *The seven questions of Selman A. Waksman*, «Soil Biology and Biochemistry», 9, pp. 375-376.
- NANNIPIERI P. (2020): *Soil is still an unknown biological system*, «Applied Science», 10, p. 3717.
- NANNIPIERI P. (2022a): *Attività biologica del suolo: le conoscenze attuali partendo dalle sette domande di Waksman*, «Georgofili Info. Notiziario di Informazione a cura dell'Accademia dei Georgofili», 16 febbraio 2022.
- NANNIPIERI P. (2022b): *Attività biologica del suolo: le conoscenze attuali partendo dalle sette*

- domande di Waksman. La prima domanda: What organisms are active under field conditions and in what ways?*, «Georgofili Info. Notiziario di Informazione a cura dell'Accademia dei Georgofili», 23 marzo 2022.
- NANNIPIERI P. (2022c): *Attività biologica del suolo: le conoscenze attuali partendo dalle sette domande di Waksman. La seconda domanda: What relationships exist between soil organic matter (SOM) transformations and soil fertility?*, «Georgofili Info. Notiziario di Informazione a cura dell'Accademia dei Georgofili», 11 maggio 2022.
- NANNIPIERI P. (2022d): *Attività biologica del suolo: le conoscenze attuali partendo dalle sette domande di Waksman. La terza domanda: What relationships exist between soil organic matter (SOM) transformations and soil fertility?*, «Georgofili Info. Notiziario di Informazione a cura dell'Accademia dei Georgofili», 07 settembre 2022.
- VAN ELSAS J.D. e NANNIPIERI P. (2019): *The seven grand questions on soil microbiology (Selman A. Waksman, reexamined by Arthur D. McLaren)*, in *Modern Soil Microbiology*, Third Edition, Van Elsas J.D, Trevors J.T., Soares Rosado A., Nannipieri P., editori, CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 21-35.
- VIDAL A., WATTEAU F., REMUSAT L., MUELLER C.W., NGUYEN TU, BUEGGER F., DERENNE S., QUENEA K. (2019): *Earthworm cast formation and development: A shift from plant litter to mineral associated organic matter*, «Frontiers in Environmental Sciences», 7, p. 15.