

## SOILSINK (FISR): Cambiamenti Climatici e Sistemi Produttivi Agricoli e Forestali: Impatto sulle Riserve di Carbonio e sulla Diversità Microbica del Suolo

### Unità Operativa 04: Batteri coltivabili

Lo studio della composizione e biodiversità delle comunità microbiche che contribuiscono al mantenimento di un'elevata fertilità del suolo

*Responsabile: Dr. Annamaria Bevivino ENEA Casaccia, Roma*

**Collaboratori alla ricerca: Claudia Dalmastrì, Silvia Tabacchioni, Luigi Chiarini, Silvia Cesarini, Luisa Pirone**

### Sito sperimentale di Agugliano (AN): campionamento suolo - ottobre 2006

Variabili prese in esame

- lavorato (arato tradizionale) vs sodo (non lavorato)
- fertilizzato (+ NO<sub>3</sub>) vs non fertilizzato (- NO<sub>3</sub>)

Per ogni campione preso in esame (campione I: non lavorato - NO<sub>3</sub>, campione II: non lavorato + NO<sub>3</sub>, campione III: lavorato - NO<sub>3</sub>, campione IV: lavorato + NO<sub>3</sub>), sono state presi in esame 5 sottocampioni, che rappresentano 5 repliche per ogni condizione, per studiare la variabilità intrinseca di ogni campione.

CAMPIONI	TIPO LAVORAZIONE	Concimazione NO <sub>3</sub> Kg ha <sup>-1</sup>
<b>CAMPIONE I</b>		
2.2.1	non lavorato	0
2.2.2	non lavorato	0
4.1.1	non lavorato	0
4.1.2	non lavorato	0
4.1.3	non lavorato	0
<b>CAMPIONE II</b>		
2.1.1	non lavorato	90
2.1.2	non lavorato	90
4.3.1	non lavorato	90
4.3.2	non lavorato	90
4.3.3	non lavorato	90
<b>CAMPIONE III</b>		
3.2.1	arato tradizionale	0
3.2.2	arato tradizionale	0
5.3.1	arato tradizionale	0
5.3.2	arato tradizionale	0
5.3.3	arato tradizionale	0
<b>CAMPIONE IV</b>		
3.3.1	arato tradizionale	90
3.3.2	arato tradizionale	90
5.1.1	arato tradizionale	90
5.1.2	arato tradizionale	90
5.1.3	arato tradizionale	90

## PROCEDURA SPERIMENTALE

### RECUPERO DEI BATTERI TOTALI COLTIVABILI: CRESCITA E CONSERVAZIONE

Il recupero dei batteri dai campioni di suolo è stato eseguito seguendo la metodica di Smalla et al. (*Applied Env Microbiol* vol.67, pag. 4742-4751, 2001), apportando alcune modifiche.

- 5 g. di suolo in 14 ml PBS: omogeneizzare in Stomacher 30'' a bassa velocità
- Centrifugare la sospensione 600 x g, 2' e recuperare 12 ml di soprannatante
- Ripetere la centrifugazione e recuperare 10 ml di soprannatante
- Riunire i soprannatanti e centrifugare 10.000 x g, 30'.
- Eliminare il soprannatante e aggiungere il volume di soluzione fisiologica (3-5 ml) necessario per risospendere il pellet (vol. finale ca. 7-8 ml)
- Fare diluizioni in soluzione fisiologica per semina su 0.1 TSA + cicloesimide 100 mg/ml
- Seminare le diluizioni da  $10^{-5}$  (6 diluizioni/campione x 2 repliche/diluizione)
- Incubare a 28°C per 10 giorni e contare le colonie cresciute ogni giorno

L'isolamento dei batteri totali coltivabili è stato eseguito seguendo la metodica di Duineveld et al. (*Applied Env Microbiol* vol. 64, pag. 4950-4957, 1998), apportando alcune modifiche.

- Dopo 6 giorni di crescita, sono state prese in considerazione le piastre con ca. 1000-3000 colonie (due repliche/campione)
- Aggiungere 3 ml di TE ad ogni piastra e sospendere i batteri
- Unire le sospensioni e aliquotarle in 3 eppendorf (1.5 ml cad.)
- Cfr. 8.000 x g, 10' ed eliminare il soprannatante
- Aggiungere al pellet 1.5 ml di PBS e conservare in glicerolo 30% a -80°

### DENSITÀ MICROBICA

Questo parametro è stato determinato attraverso la conta dei batteri totali cresciuti su piastra, dopo sei giorni d'incubazione. Il numero dei batteri totali, espresso in unità formanti colonie (cfu) per grammo di suolo, è stato analizzato dopo trasformazione logaritmica dei dati calcolati (Log cfu/gr).

### STRUTTURA DELLA COMUNITÀ MICROBICA

La struttura della comunità microbica del suolo è stata caratterizzata suddividendo i batteri totali in base al concetto di strategia r/K (De Leij et al., 1994, *Microb Ecol* 13: 249-258). I batteri sono stati suddivisi in r e K-strateghi secondo il tempo impiegato dalle loro colonie a rendersi visibili su terreno di coltura. Sono stati definiti batteri a crescita rapida (r-strateghi), i batteri le cui colonie apparivano entro le 48 ore dal piastramento (classi CI e CII); tutti i batteri che producevano colonie oltre le 48 ore di incubazione sono stati invece considerati come batteri a crescita lenta (K-strateghi, classe CIII). Le piastre sono state incubate a 28° C e la conta delle colonie cresciute sulle piastre è stata fatta a diversi giorni (1, 2, 6) dal piastramento (rispettivamente, classi: CI, CII, CIII). Ogni conta è stata dunque considerata rappresentativa di una determinata classe di microrganismi. Il numero di batteri d'ogni classe è stato espresso come una porzione (%) della conta totale. I dati ottenuti sono stati normalizzati mediante trasformazione Logit secondo la formula  $\text{Log } P/1-P$  (trasformazione Logit). La struttura della comunità microbica è stata ulteriormente caratterizzata mediante la determinazione dell'indice ecofisiologico (EP-index), proposto da Lynch (Lynch et al., 1994 In *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganism*. O'Gara, F. et al. (eds). VHC Weinheim, pp. 49-55). L'indice ecofisiologico (EPI) mostra il grado di distribuzione dei batteri nelle varie classi (descritte precedentemente) e il grado di diversità all'interno della comunità microbica del suolo, in base alla capacità di crescita su terreno di coltura. L'EPI inoltre, consente di ottenere informazioni, in termini eco-fisiologici, sulla composizione della comunità batterica. L'indice ecofisiologico è stato calcolato secondo l'equazione:  $\text{EP-index} = -\sum ( p_i \bullet \text{Log}_{10} p_i )$ ,  $p_i$  = colonie della classe i / colonie totali (i valori dell'indice  $0 < \text{EP-index} > 1$ ). Le classi si riferiscono al giorno di conta in cui le colonie appaiono su piastra. Indici con valori che si avvicinano al limite superiore, esprimono una ripartizione più uniforme dei batteri fra le varie classi analizzate.

## RISULTATI

### MORFOLOGIA COLONIE SU 0.1 TSA

Le colonie cresciute su 0.1 TSA hanno presentato le seguenti morfologie:

- A: PUNTIFORMI BIANCHE
- B: PICCOLE BIANCHE MUCOSE (2 mm)
- C: MEDIE BIANCHE MUCOSE (4 mm)
- D: PICCOLE BIANCHE (1 mm)
- E: PICCOLE BIANCHE TRASPARENTI (1 mm)
- F: PICCOLE GIALLI (2mm)
- G: PICCOLE BEIGE (2 mm)
- H: MEDIE GIALLI (4 mm)

In tabella 1 è riportato il tipo di morfologie osservato nei diversi campioni.

TABELLA 1

CAMPIONI	SIGLA ENEA	Morfologia colonie su 0.1 TSA	CAMPIONI	SIGLA ENEA	Morfologia colonie su 0.1 TSA
2.2.1	I 1	6 diverse morfologie: A-B-C-D-E-F	3.2.1	III 1	5 diverse morfologie: A-B-C-D-E
2.2.2	I 2		3.2.2	III 2	
4.1.1	I 3		5.3.1	III 3	
4.1.2	I 4		5.3.2	III 4	
4.1.3	I 5		5.3.3	III 5	
2.1.1	II 1	8 diverse morfologie: A-B-C-D-E-F-G-H	3.3.1	IV 1	5 diverse morfologie A-B-C-D-E
2.1.2	II 2		3.3.2	IV 2	
4.3.1	II 3		5.1.1	IV 3	
4.3.2	II 4		5.1.2	IV 4	
4.3.3	II 5		5.1.3	IV 5	

Su tutti i campioni analizzati sono state trovate colonie dalle morfologie A-B-C-D-E, soltanto nel campione non lavorato e non fertilizzato (in blu) è stata osservata la morfologia F, mentre nel campione non lavorato e fertilizzato (in verde) le morfologie G e H.

### ANALISI DELLA STRUTTURA DELLA COMUNITA' MICROBICA

- NON LAVORATO concimazione 0 vs concimazione 90  
Analizzando la struttura della comunità microbica, mediante il concetto di strategia r/K è stato osservato che nel primo campione (non lavorato - NO<sub>3</sub>) i batteri a crescita rapida (r-strateghi) si sviluppano come quelli a crescita lenta (K-strateghi); nel secondo campione (non lavorato + NO<sub>3</sub>) i batteri a crescita rapida prendono il sopravvento su quelli a crescita lenta.
- ARATO TRADIZIONALE concimazione 0 vs concimazione 90  
Analizzando la struttura della comunità microbica, mediante il concetto di strategia r/K è stato osservato che nel terzo campione (lavorato - NO<sub>3</sub>) i batteri a crescita rapida (r-strateghi) si sviluppano maggiormente rispetto a quelli a crescita lenta (K-strateghi); nel quarto campione (lavorato + NO<sub>3</sub>) i batteri a crescita lenta prendono il sopravvento su quelli a crescita rapida (P=0.0172).

TABELLA 2

	CI (CFU/g suolo)	%	CII (CFU/g suolo)	%	CIII (CFU/g suolo)	%	TOT (CFU/g suolo)	EPI
<b>CAMPIONE I NON LAVORATO</b>	1,21 x10 <sup>6aA</sup> (8,70 x10 <sup>5</sup> )	36,42	1,10 x10 <sup>6aA</sup> (1,12x10 <sup>6</sup> )	32,76	1,04 x10 <sup>6aA</sup> (5,18 x10 <sup>5</sup> )	31,036	3,35 x10 <sup>6</sup> (2,05x10 <sup>6</sup> )	0,41 <sup>a</sup> (0,05)
<b>CAMPIONE II NON LAVORATO CON AZOTO</b>	5,74 x10 <sup>6aA</sup> (6,34 x10 <sup>6</sup> )	49,62	3,96x10 <sup>6aA</sup> (5,21x10 <sup>6</sup> )	34,22	1,87x10 <sup>6aA</sup> (1,18x10 <sup>6</sup> )	16,2	1,16 x10 <sup>7</sup> (1,11x10 <sup>7</sup> )	0,38 <sup>a</sup> (0,10)
<b>CAMPIONE III ARATO</b>	1,08x10 <sup>6aA</sup> (1,17x10 <sup>6</sup> )	44,75	7,35x10 <sup>5aA</sup> (3,87x10 <sup>5</sup> )	30,31	6,05x10 <sup>5aA</sup> (2,51x10 <sup>5</sup> )	24,9	2,42x10 <sup>6</sup> (1,43x10 <sup>6</sup> )	0,38 <sup>a</sup> (0,04)
<b>CAMPIONE IV ARATO CON AZOTO</b>	1,75x10 <sup>5aB</sup> (1,42x10 <sup>5</sup> )	22,12	2,37x10 <sup>5aAB</sup> (1,66x10 <sup>5</sup> )	29,99	3,78x10 <sup>5aAC</sup> (2,13x10 <sup>5</sup> )	47,9	7,89x10 <sup>5</sup> (4,06x10 <sup>5</sup> )	0,41 <sup>a</sup> (0,06)

In parentesi sono indicate le standard deviation (S. D.). Le lettere minuscole diverse indicano differenze statisticamente significative ( $P < 0.05$ ) all'interno di ciascuna colonna, per ogni classe r/K; le lettere maiuscole diverse indicano differenze statisticamente significative ( $P < 0.05$ ) lungo ciascuna riga.

## CONCLUSIONI

Data la grande variabilità osservata all'interno di ogni campione, i risultati ottenuti dalle analisi di tipo fisiologico-quantitativo non hanno messo in evidenza significative alterazioni della struttura della microflora indigena in seguito alla lavorazione e/o alla fertilizzazione del suolo; la presenza di concimazione nel suolo non lavorato ha favorito i batteri r-strateghi, mentre nel suolo arato ha favorito la crescita dei batteri K-strateghi. Questa situazione non si rileva quando consideriamo l'indice ecofisiologico EPI; infatti, la presenza di concimazione e/o il tipo di suolo non alterano la distribuzione dei batteri all'interno delle classi r/K.

**Campionamento suolo 02.05.07**  
**Berchidda (SS), zona vermentino, graniti**

**Campioni di suolo**

**SUGHERA (SU)**

**ERBAIO AUTUNNO VERNINO (ER)**

**PASCOLO (PA)**

**VIGNETO INERBITO (Vi)**

**VIGNETO LAVORATO (VL)**

**PROCEDURA SPERIMENTALE**

**RECUPERO DEI BATTERI TOTALI COLTIVABILI: CRESCITA E CONSERVAZIONE**

- 1 g suolo + 10 ml PBS sterile in tubi Falcon da 50 ml
- omogeneizzare 30'', low speed 2 (Ultra-Turrax Thyristor Regle 50, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik)
- vortex 30'' e subito in ghiaccio
- trasferire la sospensione sterilmente in una beuta da 100 ml sterile, contenente 10 g di beads dal diametro di 0.2 mm
- agitare le beute a 180 r.p.m., 28°C, per 1 h
- recuperare la sospensione di suolo e metterla in una falcon da 15 ml
- calcolare il volume recuperato
- Fare diluizioni in soluzione fisiologica per semina su 0.1 TSA + cicloesimide 100 mg/ml
- 1.0 ml → diluizioni 1:10 per piastre di 0.1 TSA ( $10^{-1}$  -  $10^{-7}$ )
- seminare 100 µl su ogni piastra di 0.1 TSA+ cicloesimide 100 µg/ml ed incubare a 28°C

**Conta delle colonie**

- 24 h, 48 h e al 6° giorno (batteri R/K).

**Morfologia delle colonie**

Osservazione della morfologia delle colonie cresciute su 0.1 TSA dopo 48 h di crescita a 28°C (TABELLA 3).

- A. bianca sfrangiata molto grande, si estende sulla piastra
- B. bianca mucosa, diametro ca. 2-3 mm
- C. giallina mucosa, diametro ca. 2-3 mm
- D. bianca translucida, diametro < 1 mm, puntiforme
- E. bianca, diametro ca. 7 mm
- F. bianca mucosa, diametro ca. 5 mm, presente alle diluizioni alte ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ )
- G. giallina puntiforme
- H. bianca trasparente diametro ca. 2-3 mm
- I. gialla, diametro ca. 3 mm
- L. gialla brillante fosforescente mucosa, diametro ca. 2-3 mm
- M. bianca, diametro < 1 mm, puntiforme
- N. gialla sciamante, a 6 gg ricopre tutta la piastra
- O. bianca mucosa, diffonde su tutta la piastra
- P. arancione, diametro ca. 2-3 mm
- Q. bianca mucosa contorno irregolare, diametro ca. 5-6 mm
- R. rosa mucosa, diametro ca. 4 mm

TABELLA 3

Morfologia	Vi					VL					SU					ER					PA				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
A	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
B	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
C	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	
D	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
E	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x		x	x	x	x	x	
F	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x							
G	x	x	x	x	x						x	x	x		x	x	x		x	x	x	x		x	
H	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
I	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
L	x	x	x	x		x	x	x	x	x			x		x		x				x	x	x	x	
M	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
N						x	x	x	x	x				x											
O						x	x			x	x	x	x	x							x	x		x	
P											x	x	x	x	x		x		x	x				x	
Q											x	x	x		x	x									
R											x	x								x					

### DENSITÀ MICROBICA E STRUTTURA DELLA COMUNITÀ MICROBICA

La densità microbica è stata determinata attraverso la conta dei batteri totali cresciuti su piastra, dopo sei giorni d'incubazione. Il numero dei batteri totali, espresso in unità formanti colonie (cfu) per grammo di suolo, è stato analizzato dopo trasformazione logaritmica dei dati calcolati (Log cfu/gr) (TABELLA 4).

La struttura della comunità microbica del suolo è stata caratterizzata suddividendo i batteri totali in base al concetto di strategia r/K (TABELLA 4). Sono stati definiti batteri a crescita rapida (r-strateghi), i batteri le cui colonie apparivano entro le 48 ore dal piastramento (classi CI e CII); tutti i batteri che producevano colonie oltre le 48 ore di incubazione sono stati invece considerati come batteri a crescita lenta (K-strateghi, classe CIII). Le piastre sono state incubate a 28° C e la conta delle colonie cresciute sulle piastre è stata fatta a diversi giorni (1, 2, 6) dal piastramento (rispettivamente, classi: CI, CII, CIII). Ogni conta è stata dunque considerata rappresentativa di una determinata classe di microrganismi. Il numero di batteri d'ogni classe è stato espresso come una porzione (%) della conta totale. I dati ottenuti sono stati normalizzati mediante trasformazione Logit secondo la formula  $\text{Logit } P/1-P$  (trasformazione Logit). La struttura della comunità microbica è stata ulteriormente caratterizzata mediante la determinazione dell'indice ecofisiologico EPI, che mostra il grado di distribuzione dei batteri nelle varie classi microbiche e il grado di diversità all'interno della comunità microbica. L'EPI inoltre, consente di ottenere informazioni, in termini eco-fisiologici, sulla composizione della comunità batterica. L'indice ecofisiologico è stato calcolato secondo l'equazione:  $\text{EP-index} = -\sum (p_i \cdot \text{Log}_{10} p_i)$ ,  $p_i$  = colonie della classe  $i$  / colonie totali ( $i$  valori dell'indice  $0 < \text{EP-index} < 1$ ). Le classi si riferiscono al giorno di conta in cui le colonie appaiono su piastra. Indici con valori che si avvicinano al limite superiore, esprimono una ripartizione più uniforme dei batteri fra le varie classi analizzate.

TABELLA 4

	<b>CI</b> (CFU/g suolo)	%	<b>CII</b> (CFU/g suolo)	%	<b>CIII</b> (CFU/g suolo)	%	<b>TOT</b> (CFU/g suolo)	<b>EPI</b>
<b>VIGNETO LAVORATO</b>	2.97x10 <sup>6</sup>	51	2.24x10 <sup>6</sup>	40	4.71x10 <sup>5</sup>	9	5.68x10 <sup>6</sup>	0,40
<b>VIGNETO INERBITO</b>	1.44x10 <sup>6</sup>	21	3.29x10 <sup>6</sup>	47	2.08x10 <sup>6</sup>	32	6.80x10 <sup>6</sup>	0,45
<b>PASCOLO</b>	5.28x10 <sup>6</sup>	26	1.02x10 <sup>7</sup>	48	3.67x10 <sup>6</sup>	26	1.91x10 <sup>7</sup>	0,44
<b>ERBAIO</b>	1.50x10 <sup>6</sup>	13	6.43x10 <sup>6</sup>	49	6.83x10 <sup>6</sup>	38	1.48x10 <sup>7</sup>	0,42
<b>SUGHERA</b>	1.01x10 <sup>6</sup>	21	2.0x10 <sup>6</sup>	45	1.49x10 <sup>6</sup>	34	4.50x10 <sup>6</sup>	0,37

### Isolamento totali coltivabili

L'isolamento dei batteri totali coltivabili è stato eseguito seguendo la metodica di Duineveld et al. (*Applied Env Microbiol* vol. 64, pag. 4950-4957, 1998), apportando alcune modifiche.

- Dopo 6 giorni di crescita, sono state prese in considerazione le piastre con ca. 1000-3000 colonie (due repliche/campione)
- Aggiungere 4 ml di SF (2+2 ml) ad ogni piastra e sospendere i batteri
- Unire le sospensioni e aliquotarle in 3 eppendorf (0.7 ml x 2, e 1.4 ml)
- Centrifugare a 8.000 rpm per 10'
- Eliminare il super e congelare i pellet delle eppendorf contenenti 0.7 ml a -80°C (per analisi DNA)
- Risospendere il pellet da 1.4 ml in 1 ml PBS: si ottengono ca. 600 µl di sospensione.  
Suddividere in due eppendorf contenenti 300 µl di glicerolo al 50% (per analisi batteri)

### Isolamento singole colonie:

L'isolamento è stato effettuato prelevando "random" singole colonie dalle piastre di terreno 0.1 TSA, attraverso l'utilizzo di opportune griglie a 50 riquadri. Le diluizioni impiegate, 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-2</sup> per producevano in media un numero di colonie compreso, rispettivamente, tra 50 e 400 unità formanti colonia (CFU). Sono state isolate circa 500 colonie pure prelevando circa 100 colonie da un campione e 20 colonie da ciascuna replica (1, 2, 3, 4, 5). Le colonie sono state, quindi, riseminate su piastre di 0.1 TSA fresco per due volte consecutive in modo da accertarne la purezza. Le colonie purificate sono state inoculate in 3 ml di NB, cresciute a 28° C, 200 rpm o/n e criopreservate a -80° C in glicerolo al 15%.

Campione Vi (1-2-3-4-5): 100 colonie

Campione VL (1-2-3-4-5): 100 colonie

Campione SU (1-2-3-4-5): 100 colonie

Campione ER (1-2-3-4-5): 100 colonie

Campione PA (1-2-3-4-5): 100 colonie