

Progetto SOILSINK

Linea 4 – Carbon sink e cicli biogeochimici

UO 8 - Flussi di carbonio ed azoto nelle comunità microbiche, attività 6, 7 e 8.

Dott.ssa Daniela Lippi - Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale, CNR, Roma.

Relazione I anno di attività

Il gruppo di Microbiologia del Suolo dell'Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale del CNR, responsabile dott.ssa Daniela Lippi, studia le comunità microbiche del suolo che, pur dotate di un equilibrio interno naturale, possono essere parzialmente alterate dal variare delle condizioni climatiche, ambientali e dalle pratiche agronomiche. Poter valutare l'impatto dei cambiamenti climatici sui microrganismi del suolo in termini di alterazioni funzionali, soprattutto in relazione ai principali cicli biogeochimici, è importante dato che l'esistenza complessiva dell'ecosistema suolo si basa sulle comunità microbiche.

L'attività e gli obiettivi specifici dell'UO 8, come previsti nel progetto, sono indirizzati:

1) allo studio degli effetti della variazione delle fonti nutritive sulla crescita e sulle attività metaboliche di comunità microbiche modello costituite da ceppi batterici rappresentativi, isolati e caratterizzati da altre unità operative, dei quali si studieranno anche il profilo metabolico, le richieste nutrizionali e i principali parametri di crescita (attività 6).

2) alla valutazione della capacità delle specie batteriche costituenti il modello di mantenere la vitalità e le proprie caratteristiche fisiologiche durante periodi, anche lunghi, di assoluta carenza nutrizionale, dal momento che la sopravvivenza dei microrganismi dipende dalla loro versatilità nell'adattarsi alle fluttuazioni dell'ecosistema (attività 7).

3) allo studio di attività enzimatiche del suolo; attività 8, per la quale si rimanda alla allegata relazione del Prof. Grego.

Metodologie

1) Studio dei parametri di crescita di popolazioni batteriche

In attesa di ottenere i ceppi batterici isolati dai siti di campionamento, sono state definite le metodiche per studiare la capacità dei batteri di utilizzare come unica fonte di Carbonio diversi composti organici presenti negli essudati radicali. Sono stati utilizzati un ceppo di collezione, *Azospirillum brasilense* Cd (ATCC 29710), e due ceppi di batteri della rizosfera del sorgo, *Pseudomonas putida* C2 e *Klebsiella terrigena* C6 (Lippi *et al.*, 2004).

A) In un primo step, i ceppi sono stati fatti crescere in colture batch su terreno minerale B7⁺ contenente (g/l):

K ₂ HPO ₄	1,77
KH ₂ PO ₄	0,68
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
NaCl	0,14
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,132
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,20

Estratto di lievito	0,08
Biotina	20 µg
FeSO ₄ • 7H ₂ O	2,5 mg
H ₃ BO ₃	2,9 mg
CoSO ₄ • 7H ₂ O	1,2 mg
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,1 mg
MnCl ₂ • 4H ₂ O	0,09 mg
Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	2,5 mg
ZuSO ₄ • 7H ₂ O	1,2 mg

e addizionato delle fonti di Carbonio riportate in Tabella 1 nella quantità di 5g/l. Dopo 48 ore sono state valutate la densità ottica, la biomassa totale, il contenuto proteico e il numero di cellule su Nutrient Agar.

Tabella 1. Fonti di Carbonio utilizzate

Carboidrati	Acidi organici	Aminoacidi
1 - Fruttosio	6 - Malico	9 - Ac. glutammico
2 - Glucosio	7 - Piruvico	10 - Alanina
3 - Ribosio	8 - Succinico	
4 - Saccarosio		
5 - Xilosio		

B) Le curve di crescita dei microrganismi sulle diverse fonti di Carbonio sono state ottenute facendo crescere le colture nel terreno colturale B7⁺ in un termoturbidimetro aerato collegato ad un data logger per la registrazione continua dell'incremento della densità ottica delle colture. Per ottenere i relativi parametri di crescita (tempo di latenza, tempo di duplicazione, velocità massima), i dati sono stati elaborati con il software MicroFit (ver. 1.0) utilizzando il modello matematico di Baranyi *et al.* (1994).

Modello di crescita di Baranyi:

$$y = y_0 + \frac{y_1}{\ln(10)} + \frac{y_2}{\ln(10)}$$

dove

$$y_1 = \mu_m t + \ln \left[e^{-\mu_m t} - e^{-\mu_m(t+t_{lag})} + e^{-\mu_m t_{lag}} \right]$$

e

$$y_2 = \ln \left[1 + 10^{(y_0 - y_{max})} (e^{\mu_m(t-t_{lag})} - e^{-\mu_m t_{lag}}) \right]$$

essendo

y = numero cellule al tempo t ; y_0 = numero cellule iniziali; y_{max} = numero cellule finali; μ_m = velocità massima di crescita; t_{lag} = tempo di latenza.

2) Isolamenti dai siti di campionamento

A) A causa delle difficoltà incontrate nel reperire da altre unità operative ceppi batterici isolati dai campionamenti effettuati nei siti sperimentali prescelti di Agugliano (AN) e Berchidda (SS), il nostro programma di ricerca ha subito qualche cambiamento ed un conseguente inevitabile ritardo. Abbiamo, pertanto, utilizzato i campioni prelevati in primavera da altre UO nei due siti per valutare la carica microbica dei suoli in esame e per isolare alcuni ceppi.

I campioni sono stati utilizzati secondo il seguente schema:

Berchidda: campionamento effettuato il 2 Maggio 2007 nella serie vegetazionale costituita da vigneto lavorato, vigneto inerbito, erbaio, pascolo e sughereta. In ciascun sito della serie sono stati prelevati 5 campioni alla profondità di 0-20 cm, per un totale di 25 campioni.

Agugliano: campionamento effettuato il 18 Giugno 2007 nella sola coltura di mais a due livelli di lavorazione (non lavorato = S; convenzionale = T) e a due livelli di concimazione azotata (non concimato = 0; 90 Kg N ha⁻¹ = 1). Sono stati prelevati 6 campioni per ciascuna tesi alla profondità di 0-20 cm, per un totale di 24 campioni. Le analisi microbiologiche effettuate da altre UO con il campionamento precedente (Ottobre 2006) avevano evidenziato una notevole variabilità nei campioni della stessa tesi per cui si è ritenuto opportuno suddividere i campioni secondo due aree geograficamente diverse ed identificate come Monte e Valle (4 tesi x 2 aree x 3 repliche). Sarà necessario concordare con le altre UO le modalità di valutazione di questi campioni.

Preparazione del campione mediato

3 grammi di ciascun campione di suolo, sospesi in 27 ml di soluzione fisiologica sterile in presenza di palline di vetro (2-3mm ϕ), sono stati incubati su tavolo a scosse a 28°C per 30 min (diluizione 10⁻¹). Dalla prima diluizione delle repliche di ciascuna tesi è stata prelevata un certa aliquota per ottenere un campione mediato dal quale sono state effettuate le diluizioni seriali per le conte su piastra su Nutrient Agar, seguendo la tecnica tradizionale di Pochon (1954). Per ulteriori prove sperimentali sono stati congelati sia le prime diluizioni tal quali che i campioni mediati con l'aggiunta del 50% di glicerolo al 60%.

B) Una seconda via per la costruzione di comunità batteriche modello dei diversi siti sperimentali può essere quella di selezionare direttamente alcune specie caratteristiche sulla base delle condizioni ambientali **r/K** che si possono determinare in seguito alle variazioni nella quantità e nella composizione dei substrati disponibili, specialmente Carbonio e Azoto, da cui dipendono l'attività e la crescita delle comunità microbiche del suolo.

Una condizione **r** si stabilisce quando il rapporto ambiente/popolazione è tale che i membri della popolazione possono crescere alla loro massima velocità; la condizione **K** si ha, invece, quando i rapporti sono tali che il tasso di incremento della popolazione è vicino allo zero.

A tale scopo sono state allestite, e sono tuttora in corso, le prime colture continue Carbonio-limitate, basate sul concetto di selezione **r/K**, dei campioni mediati dei suoli di Berchidda e successivamente verranno analizzati i suoli di Agugliano.

Le colture di 100 ml di terreno GB₇⁺, contenente 0,3 g/l di glucosio e inoculate con 10 ml del campione mediato sono fatte crescere a 28°C, con aerazione di 100 ml/min e agitazione magnetica di 200 giri/min. Dopo 72 ore di crescita in batch inizia il flusso del terreno alla velocità di diluizione $D = 0,02 \text{ h}^{-1}$ per la selezione delle popolazioni **K** o, alternativamente, alla velocità $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ per la selezione delle popolazioni **r**. Il campionamento allo steady state viene effettuato dopo il passaggio

di non meno di 10 volumi di coltura quando la densità ottica si mantiene costante per almeno tre giorni. Dalle conte dei campioni steady-state si effettuano gli isolamenti dei ceppi batterici.

C) Per lo studio della capacità di sopravvivenza in condizioni di completa carenza nutrizionale (attività 7), i campioni steady-state vengono centrifugati, lavati e risospesi in ugual volume di tampone fosfato 0,033 M, pH 6,8. Le sospensioni batteriche vengono poi incubate a 28°C, con una leggera agitazione (70 giri/min) per diversi mesi, provvedendo con l'aggiunta di H₂O sterile a compensare l'evaporazione della sospensione. All'inizio del periodo di starvation e ad intervalli regolari vengono effettuate le conte su Nutrient Agar delle cellule coltivabili mentre le cellule metabolicamente attive vengono valutate dalla presenza del precipitato di formazano (Wrenn e Venosa, 1996) con le conte MPN su terreno GB₇⁺, contenente 10 g/l di glucosio, in microplates a 96 pozzetti, secondo il metodo descritto da Rowe *et al.* (1977).

Primi risultati ottenuti

1-A) I microrganismi prescelti per la standardizzazione delle metodiche sono cresciuti sui composti carboniosi selezionati come rappresentativi degli essudati radicali (Tab. 1) e nelle prove in batch sono state valutate la biomassa totale, il contenuto proteico e il numero di cellule coltivabili dopo 48 ore di crescita (Fig. 1). L'*Azospirillum* raggiunge dei buoni livelli di contenuto proteico e di biomassa anche se con un numero di cellule inferiore a quello degli altri microrganismi e l'acido malico viene confermato tra i suoi substrati preferiti insieme al succinato. La *Klebsiella* C6 è il microrganismo che raggiunge i valori più alti di CFU.

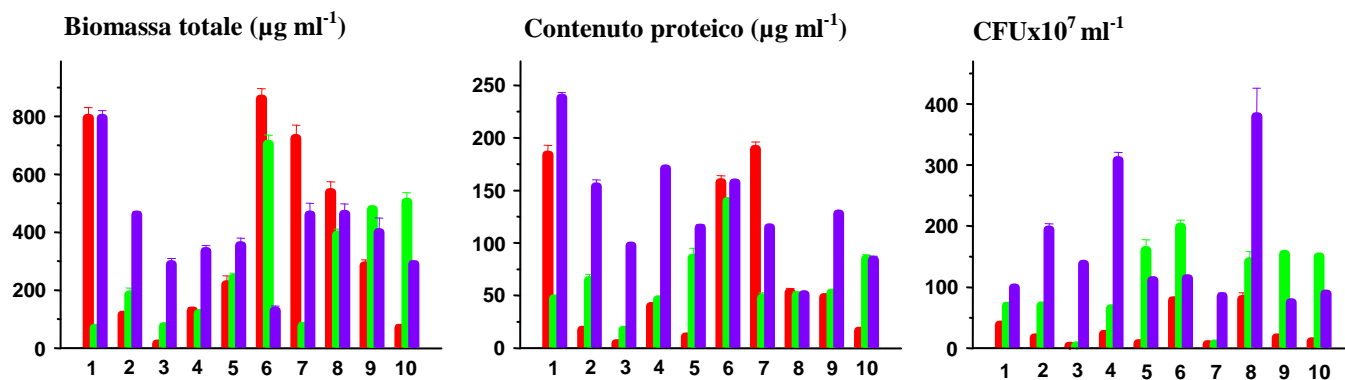


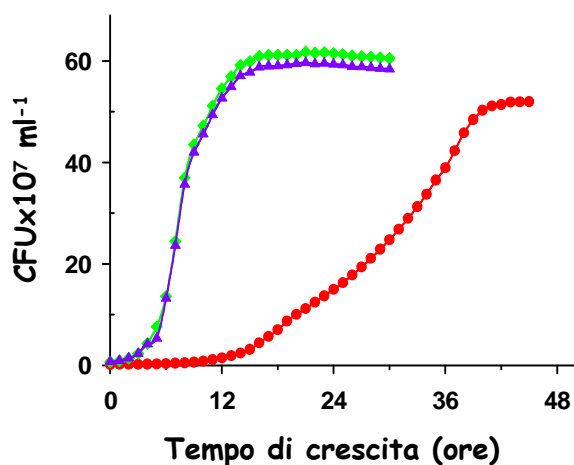
Figura 1. *A. brasilense* Cd ■, *P. putida* C2 ■, *K. terrigena* C6 ■ cresciuti 48 ore su diverse fonti di C.

1-B) Lo studio delle curve e dei parametri di crescita dei ceppi ha evidenziato che l'*Azospirillum* su acido malico e su succinato mostra una velocità di crescita paragonabile a quella di almeno uno degli altri microrganismi (Tabella 2) i quali, essendo microrganismi autoctoni, generalmente hanno mostrato μ_{max} assai più elevate. Solo sul saccarosio le μ_{max} dei tre batteri sono del tutto paragonabili, anche se il tempo di latenza della *Klebsiella* è significativamente superiore.

Tabella 2. Tempo di latenza (λ), velocità massima di crescita (μ_{\max}) e tempo di duplicazione (t_d) di *Azospirillum brasilense* Cd, *Pseudomonas putida* C2 e *Klebsiella terrigena* C6 cresciuti al termoturbidimetro su diverse fonti di Carbonio.

Fonte di C	<i>A. brasilense</i> Cd			<i>Pseudomonas</i> C2			<i>Klebsiella</i> C6		
	λ	μ_{\max}	t_d	λ	μ_{\max}	t_d	λ	μ_{\max}	t_d
Fruttosio	5,1±0,41	0,29±0,01	2,33±0,02	1,6±0,13	0,73±0,02	0,94±0,02	1,8±0,12	0,74±0,02	0,94±0,02
Saccarosio	7,9±1,14	0,19±0,01	3,61±0,04	1,3±0,63	0,25±0,01	2,74±0,02	24±2,38	0,21±0,05	3,28±0,16
Xilosio	6,0±0,62	0,22±0,01	3,16±0,02	10,5±0,15	0,85±0,06	0,82±0,05	5,2±0,52	0,45±0,02	1,55±0,04
Ac. malico	1,4±0,25	0,55±0,05	1,3±0,06	5,6±0,25	0,58±0,02	1,20±0,02	2,2±0,35	0,70±0,03	0,99±0,03
Succinato	6,1±0,07	0,44±0,02	1,58±0,01	4,3±0,03	0,73±0,02	0,96±0,02	4,8±0,16	0,42±0,01	1,52±0,02

Nella Figura 2, a puro titolo di esempio, si riportano le curve di crescita su fruttosio di *A. brasilense* Cd ■, *P. putida* C2 ■, *K. terrigena* C6 ■



2-A) Per valutare la carica microbica dei suoli oggetto di studio e per isolare alcuni ceppi batterici sono stati utilizzati i campioni secondo lo schema precedentemente descritto.

Nella Tabella 3 sono riportati i valori delle conte batteriche dei campioni mediati ottenuti dai prelievi effettuati a Maggio 2007 alla profondità 0-20 della serie vegetazionale costituita da vigneto lavorato (VL), vigneto inerbito (VI), erbaio (ER), pascolo (PA) e sughereta (SU) nel sito di **Berchidda**.

Tabella 3. Carica batterica dei campioni del sito di **Berchidda**.

Serie	CFU x 10 ⁶ ml ⁻¹ ± ES*
VL	23,2 ± 4,3
VI	18,2 ± 3,2
ER	19,4 ± 0,4
PA	22,2 ± 1,7
SU	15,6 ± 2,4

* Dati calcolati come medie ± Errore Standard di almeno 6 repliche

Nella Tabella 4 sono invece riportati i valori delle conte dei campioni prelevati nel sito di **Agugliano** a Giugno 2007 nella coltura di mais e secondo le lavorazioni: non lavorato (S); convenzionale (T); non concimato (0); 90 Kg N ha⁻¹ (1). I dati sono stati suddivisi nelle aree Monte e Valle come specificato precedentemente.

Tabella 4. Carica batterica dei campioni del sito di **Agugliano**.

Tesi	CFU x 10 ⁵ ml ⁻¹ ± ES*	
	Monte	Valle
S0	29,5 ± 5,8	15,9 ± 1,6
S1	21,2 ± 1,2	15,1 ± 1,9
T0	15,1 ± 1,7	12,7 ± 1,6
T1	13,6 ± 1,2	14,5 ± 2,2

* Dati calcolati come medie ± errore standard di almeno 6 repliche

Per ogni tesi sperimentale dei due siti sono state isolate dalle piastre circa 4-5 colonie batteriche morfologicamente diverse.

2-B) Sono state allestite, e sono tuttora in corso, le prime colture continue Carbonio-limitate a bassa velocità di crescita dei campioni mediati dei suoli di **Berchidda**.

Si è già ottenuto il primo steady state alla $D = 0,02 \text{ h}^{-1}$ del campione della sughereta che ha dato i seguenti risultati:

- densità ottica ($A_{580\text{nm}}$) = 0,022
- numero di batteri dopo 24 ore di incubazione = $44 \pm 4,7 \times 10^5 \text{ CFU/ml}$
- “ “ 48 ore “ = $60,6 \pm 5,2 \times 10^5 \text{ CFU/ml}$
- contenuto proteico = $118,8 \pm 5,2 \text{ } \mu\text{g/ml}$

In queste condizioni colturali si sono potute selezionare, riconoscere ed isolare almeno tre popolazioni K, formanti colonie morfologicamente diverse, con le quali si è iniziata la prima prova di starvation nutrizionale (2-C, attività 7).

Ad intervalli di pochi giorni sono state allestite nelle stesse condizioni le colture degli altri campioni. Nella coltura inoculata con il campione del pascolo si è ottenuto un notevolissimo sviluppo di forme fungine che hanno completamente sovrastato la crescita dei batteri e un tale esito si è avuto anche ripetendo la coltura una seconda volta in presenza di miconazolo. Nei campioni dell'erbaio e dei vigneti, così come per la sughereta, le forme fungine presenti durante la fase di crescita in batch sono state allontanate dalla coltura durante il periodo di crescita in continuo.

L'inoculo del campione del pascolo verrà ripetuto nelle colture che saranno allestite successivamente ad alta velocità di crescita, per la selezione r.

Bibliografia

Baranyi, J., Roberts, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology 23: 277-294.

- Lippi, D., De Paolis, M.R., Di Mattia, E., Pietrosanti, T., Cacciari, I. (2004). Influence of substrate composition and flow rate on growth of *Azospirillum brasilense* Cd in a co-culture with 3 sorghum rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 50: 861-867.
- Rowe, R., Todd, R., Waide, J. (1977). Microtechnique for most-probable-number analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 33: 675-680.
- Wrenn, B.A., Venosa, A.D. (1996). Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 252-258.
- Pochon, J. (1954). *Manuel technique d'analyse microbiologique du sol*. Masson et C^{ie}, Éditeurs, Paris.

Partecipazione a convegni

De Paolis, M.R. e Lippi, D. Crescita di *Azospirillum brasilense* e rizobatteri del sorgo su diverse sorgenti di carbonio presenti negli essudati radicali. 3° Bertinoro Meeting di Microbiologia Ambientale. 18-19 Maggio 2007, Bertinoro (FC), Italy. Poster n. 2.