

## **Progetto**

**Cambiamenti Climatici e Sistemi Produttivi Agricoli e Forestali: Impatto sulle Riserve di Carbonio e sulla Diversità Microbica del Suolo.**

**Acronimo: SOILSINK**

**Linea 4: Carbon sink e cicli biogeochimici (Capofila Dr.ssa Anna Benedetti).**

**UO 08 - Flussi di carbonio ed azoto nelle comunità microbiche.**

**Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale, CNR, Roma.**

**Responsabile scientifico: Dott.ssa Daniela Lippi**

**Partecipanti: Dott.ssa Maria Rita De Paolis e Sig. Giovanni Ippoliti (IBAF) per le attività 6 e 7.**

**Prof. Stefano Grego e collaboratori (Università degli Studi della Tuscia, Dipartimento Agrobiologia e Agrochimica) per l'attività 8.**

### **Relazione sulle attività svolte nel 2° anno di attività (01/07/2007-30/06/2008)**

Le attività dell'UO 08 previste nel progetto sono:

- 1) 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 per i principali parametri di crescita, per il profilo metabolico e per le richieste nutrizionali (attività 6).
- 2) valutazione della capacità delle specie batteriche isolate di mantenere la vitalità e le proprie caratteristiche fisiologiche durante periodi di assoluta carenza nutrizionale (attività 7).
- 3) studio di attività enzimatiche del suolo (attività 8).

**Attività 6: Crescita e attività di popolazioni batteriche del suolo.**

#### Isolamenti r/K

La costruzione di comunità batteriche modello richiede una selezione diretta di specie caratteristiche che può essere effettuata sulla base delle condizioni ambientali **r/K** che si determinano in seguito alle variazioni nella quantità e nella composizione dei substrati disponibili. 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.

Pertanto, sulla base del concetto di selezione r/K sono state allestite colture continue Carbonio-limitate (0,3g/l di glucosio nel terreno minerale B7<sup>+</sup>) utilizzando come inoculo i campioni mediati dei suoli di Berchidda, come descritto nella relazione del primo anno del progetto.

Alle colture, dopo 72 ore di crescita in batch, è stato imposto un flusso di terreno alla velocità di diluizione  $D = 0,02 \text{ h}^{-1}$  per la selezione delle popolazioni K-strategiste o, alternativamente, alla velocità  $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$  per la selezione delle popolazioni r-strategiste.

I campionamenti allo steady state, effettuati dopo il passaggio di non meno di 10 volumi di coltura e quando la densità ottica della coltura stessa si manteneva costante per almeno tre giorni, hanno mostrato la presenza di vari ceppi batterici. I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 1.

**Tab. 1. Steady-states dei suoli di Berchidda cresciuti in coltura continua glucosio-limitata alle velocità di diluizione  $D = 0,02 \text{ h}^{-1}$  (selezione k) e  $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$  (selezione r).**

	Selezione	D.O. ( $A_{580\text{nm}}$ )	CFUx10 <sup>6</sup> ml <sup>-1</sup>	Proteine ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
<b>Sughereta</b>	k	0,022	29,6 ± 0,74	78,5 ± 2,5
	r	0,440	261,3 ± 19,6	745,1 ± 13,3
<b>Pascolo</b>	k	0,045	58,3 ± 0,63	125,1 ± 4,3
	r	0,225	289 ± 11,8	193 ± 7,1
<b>Erbaio</b>	k	0,095	152 ± 25	165,4 ± 7,7
	r	0,125	244 ± 18	169,6 ± 5,1
<b>Vigneto inerbito</b>	k	0,095	176,8 ± 13,6	122,1 ± 9,2
	r	0,200	174 ± 4	200,6 ± 5,6
<b>Vigneto lavorato</b>	k	0,100	246,3 ± 11,4	127,5 ± 3,3
	r	0,115	107 ± 10,5	144,6 ± 2,6

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

Dagli steady states ottenuti con la serie dei 5 campioni di Berchidda sono stati isolati ceppi morfologicamente diversi, per un totale di 20 ceppi r-strategisti e di 15 ceppi K-strategisti.

## Curve di crescita

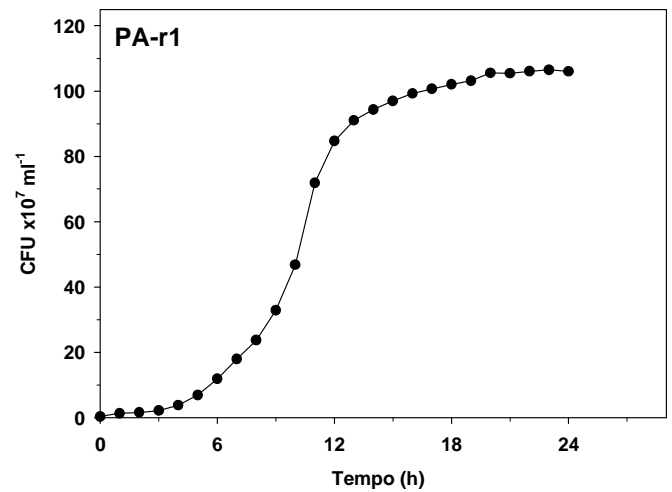
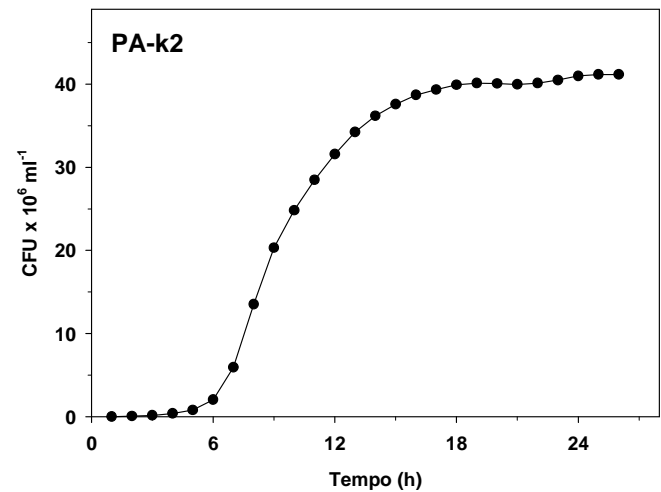
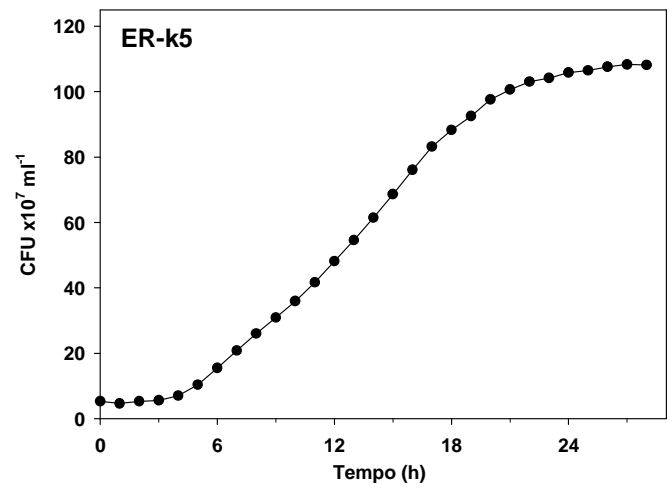
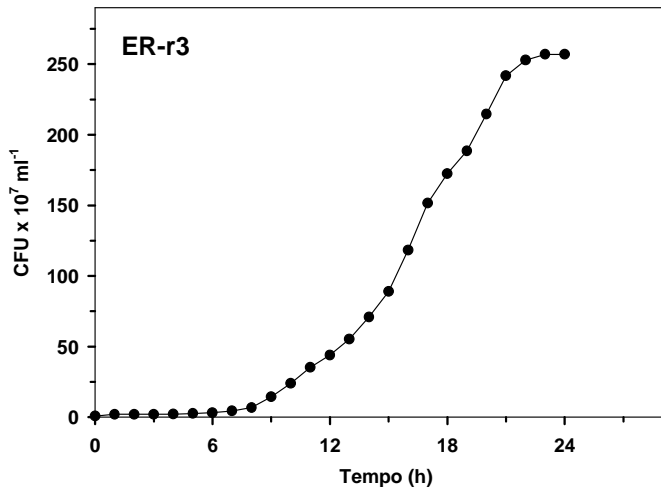
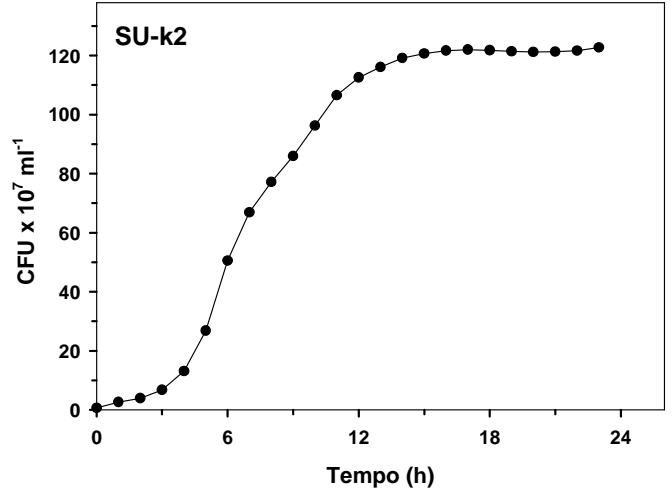
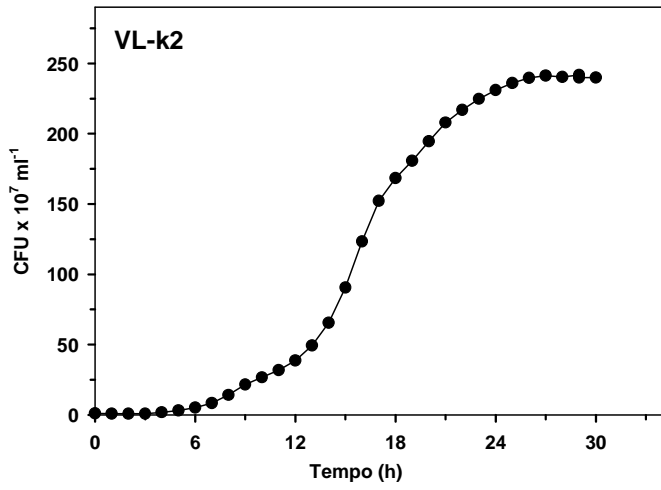
Lo studio delle curve di crescita viene effettuato facendo crescere i microrganismi nel terreno colturale GB7<sup>+</sup>, contenente 10g/l di glucosio, in un termoturbidimetro aerato collegato ad un data logger per la registrazione continua dell'incremento della densità ottica delle colture. Per ottenere i parametri di crescita (tempo di latenza, tempo di duplicazione, velocità massima), i dati raccolti sono elaborati con il software MicroFit (ver. 1.0) utilizzando il modello matematico di Baranyi *et al.* (1994), come riportato nella relazione dell'anno precedente.

Attualmente sono state studiate le curve di crescita di circa la metà dei ceppi batterici isolati ed è in corso il completamento dello studio. Nella Figura 1 sono riportate le curve ottenute da alcuni ceppi, sia r-strategisti che k-strategisti dei diversi suoli di Berchidda, dei quali sono stati anche definiti i parametri di crescita, come riportati nella Tabella 2.

I parametri di crescita, unitamente alle caratteristiche metaboliche dei ceppi, permetteranno un corretto allestimento e studio della coltura mista modello, rappresentativa dei diversi campioni di suolo.

**Tab. 2. Velocità massima di crescita ( $\mu_{\max}$ ), tempo di duplicazione ( $t_d$ ) e tempo di latenza ( $\lambda$ ) di ceppi isolati dai suoli di Berchidda e cresciuti al termoturbidimetro su glucosio.**

<b>Ceppo</b>	<b><math>\mu_{\max}</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>t_d</math> (h)</b>	<b><math>\lambda</math> (h)</b>
<b>SU-k2</b>	0,77±0,04	0,90±0,04	1,25±0,37
<b>PA-k2</b>	0,88±0,03	0,79±0,02	3,71±0,37
<b>PA-r1</b>	0,51±0,02	1,35±0,03	2,35±0,51
<b>ER-k5</b>	0,33±0,02	2,09±0,05	3,21±0,81
<b>ER-r3</b>	0,48±0,04	1,44±0,06	4,91±0,75
<b>VL-k2</b>	0,42±0,02	1,66±0,04	1,61±0,75



**Fig. 1.** Curve di crescita di ceppi di *Berchidda* cresciuti al termoturbidimetro aerato.

Al termine del secondo anno di attività è iniziato lo studio sul sequenziamento del 16SrDNA per la caratterizzazione tassonomica dei ceppi isolati e si avranno a breve termine i primi risultati. La definizione tassonomica dei ceppi consentirà di effettuare in modo più diretto, in collaborazione con altre U.O., lo studio del profilo metabolico dei ceppi stessi.

Si prevede a breve l'allestimento delle colture continue modello, inizialmente in condizioni di glucosio-limitazione.

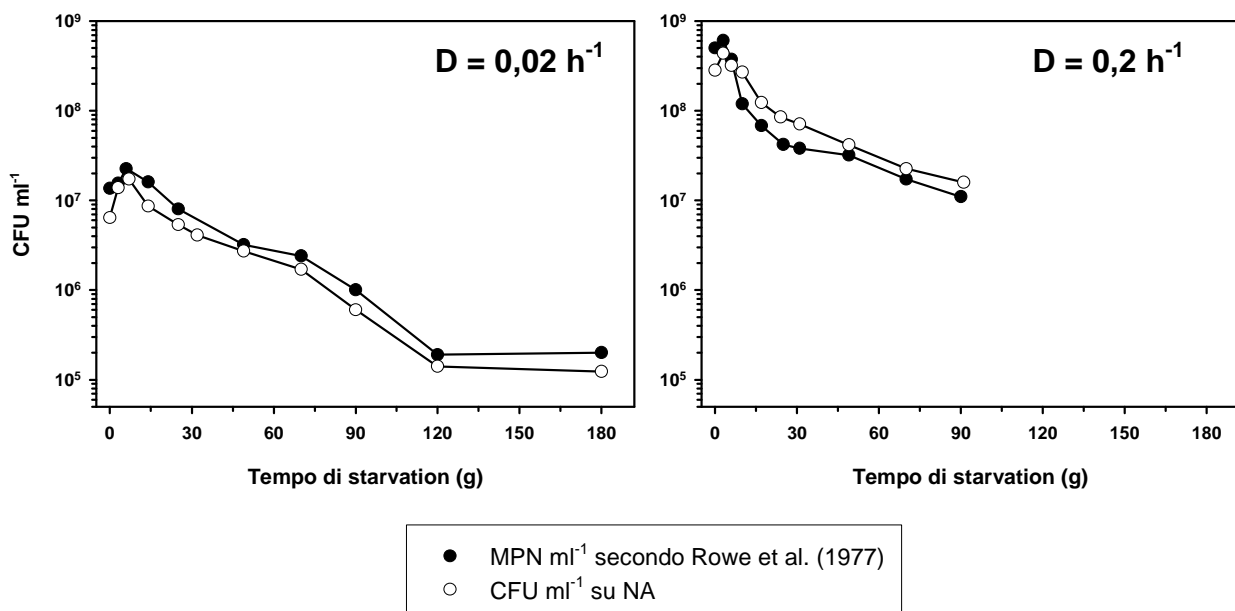
Inoltre è iniziato lo studio in coltura continua per gli isolamenti dei ceppi sui campioni di suolo di Agugliano.

### Attività 7: Sopravvivenza di popolazioni batteriche del suolo alla carenza nutrizionale.

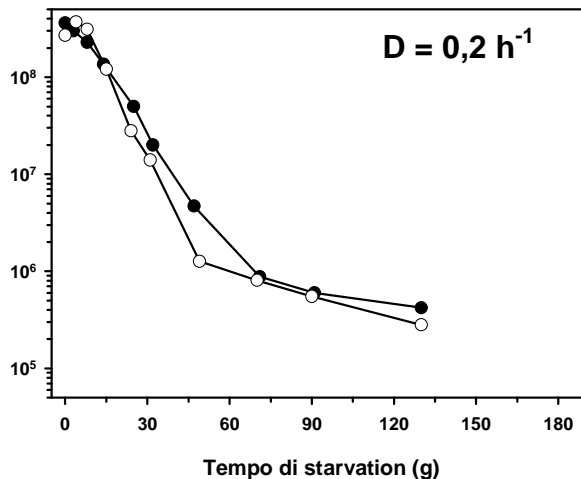
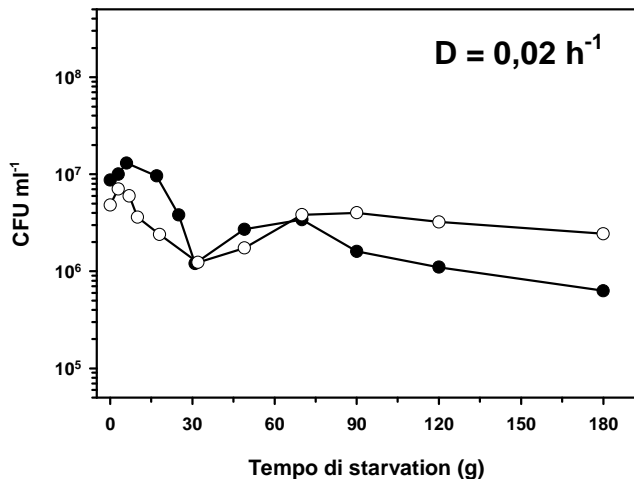
Per lo studio della capacità di sopravvivenza in condizioni di completa carenza nutrizionale, i campioni steady-state sono stati centrifugati, lavati e risospesi in ugual volume di tampone fosfato 0,033 M, pH 6,8. Le sospensioni batteriche sono state incubate a 28°C, con una leggera agitazione (70 giri/min) per diversi mesi, provvedendo con l'aggiunta di H<sub>2</sub>O sterile a compensare l'evaporazione della sospensione. All'inizio del periodo di starvation e ad intervalli regolari sono state effettuate le conte su Nutrient Agar delle cellule culturabili e le conte MPN, su terreno GB<sub>7</sub><sup>+</sup>, delle cellule metabolicamente attive, valutate dalla presenza del precipitato di formazano (Wrenn e Venosa, 1996) in microplates a 96 pozzetti, secondo il metodo descritto da Rowe *et al.* (1977).

Nelle Figure sottostanti è riportata una prima elaborazione dei risultati ottenuti nel periodo di starvation nutrizionale, che in alcuni casi ha raggiunto, e superato, i 6 mesi di incubazione.

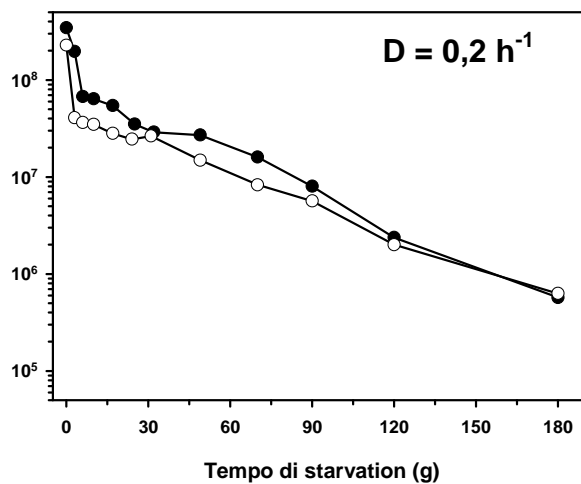
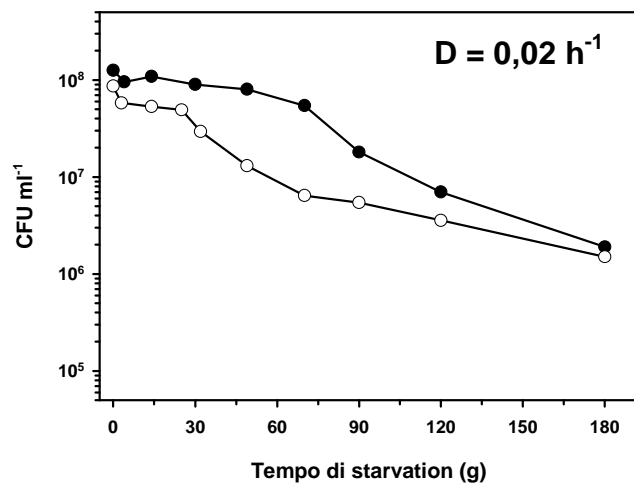
### Sughereta



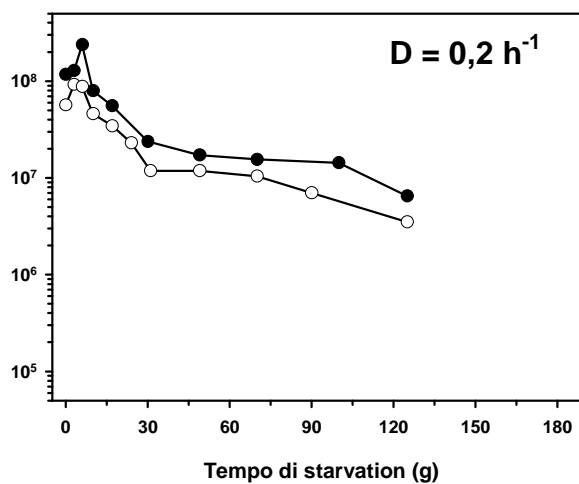
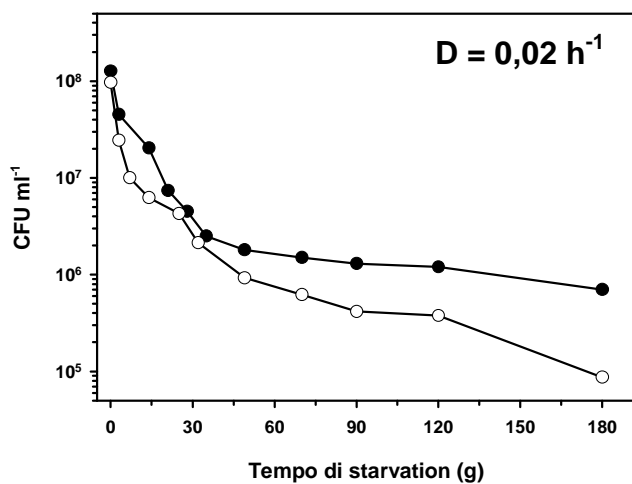
### Pascolo



### Erbaio

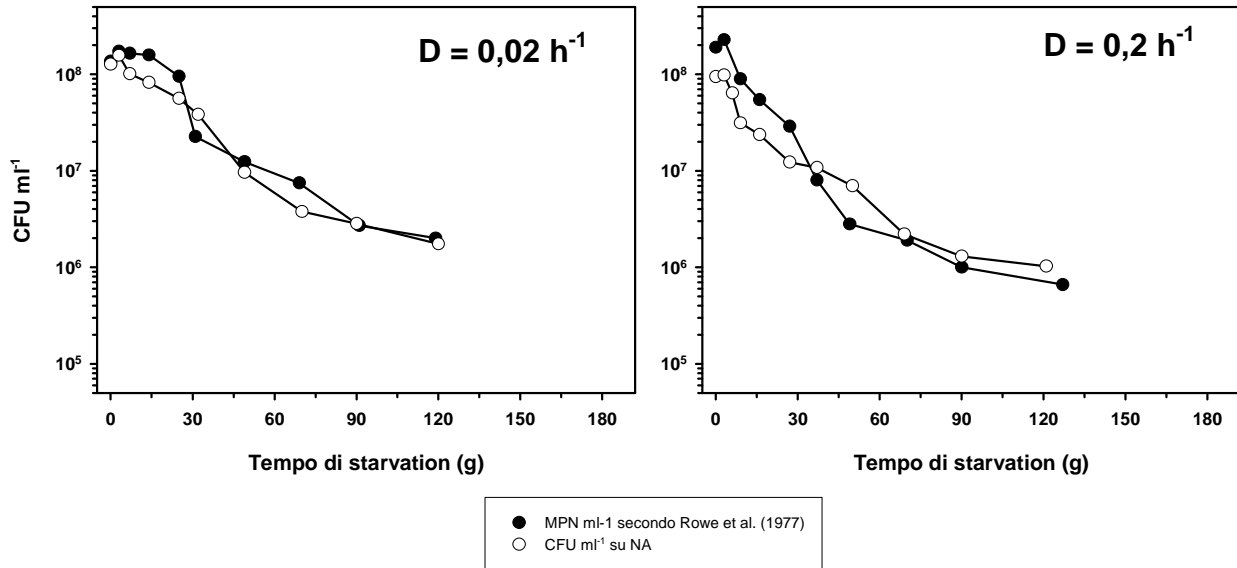


### Vigneto inerbito



- MPN ml<sup>-1</sup> secondo Rowe et al. (1977)
- CFU ml<sup>-1</sup> su NA

## Vigneto lavorato



I dati riportati mostrano, pur con una certa variabilità negli andamenti tra i diversi campioni, che nel periodo osservato si ha una perdita di culturabilità che si può valutare intorno ai due ordini di grandezza. Inoltre, come previsto, in quasi tutti i campioni le cellule metabolicamente attive sono superiori alle culturabili e nel lungo periodo i due valori tendono a coincidere, eccetto che nei ceppi k-strategisti del Vigneto lavorato. Un dato che dovrà essere valutato più attentamente è quello ottenuto nei ceppi K del Pascolo.

### Bibliografia

Baranyi, J., Roberts, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food.

International Journal of Food Microbiology 23: 277-294.

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.