

**Collana di metodi analitici per l'agricoltura
diretta da Paolo Sequi**

**MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI
Osservatorio Nazionale Pedologico e per la Qualità del suolo**

**Metodi di
ANALISI MICROBIOLOGICA
DEL SUOLO**

**Coordinatori:
Giovanni Picci e Paolo Nannipieri**

In collaborazione con

**International Union of Soil Sciences
Società Italiana della Scienza del Suolo**

Commissione III – Biologia
Commissione IV – Fertilità del Suolo e Nutrizione delle Piante

Franco Angeli

**Collana di metodi analitici per l'agricoltura
diretta da Paolo Sequi**

Indice

Presentazione

Introduzione

- I. Prelievo, preparazione e conservazione del campione da sottoporre ad analisi microbiologiche e biochimiche
 1. Campionamento, preparazione e conservazione

- II. Valutazione delle cariche microbiche e gruppi generici
 1. Valutazione delle cariche microbiche e gruppi generici
 2. Procedimento generale per le conte per via colturale
 3. Gruppi generici di microrganismi

- III. Gruppi fisiologici di microrganismi
 1. Gruppi fisiologici di microrganismi
 2. Microrganismi del ciclo dell'azoto. Batteri azotofissatori liberi aerobi ed anaerobi
 3. Batteri in associazioni diazotrofe (*Azospirillum*)
 4. Batteri in associazione simbiotica diazotrofa (Rizobi)
 5. Attinomiceti azotofissatori del genere Frankia
 6. Batteri proteolitici e ammonificanti
 7. Batteri nitrificanti
 8. Batteri denitrificanti
 9. Gruppi fisiologici del ciclo del carbonio
 10. Ciclo dello zolfo

- IV. Microflora fotosintetica ossigenica
 1. Microflora fotosintetica ossigenica
 2. Metanobatteri
 3. Metodi di studio delle micorrize arbuscolari nel suolo

Presentazione

Anche se lo studio del suolo rappresenta un impegno dell'uomo antico quanto la storia della scienza, solo in epoca recente si è iniziato a normalizzare ed a raccogliere in manuali scientifici i metodi richiesti per alcune analisi del suolo di primaria importanza, oltre che specialistiche. Pochi anni fa, con il primo volume di questa collana l'Italia si poneva al secondo posto fra i Paesi di tutto il mondo che si erano cimentati nella raccolta dei metodi dedicati alle analisi fisiche del suolo, subito dopo gli Stati Uniti d'America. Non certo dissimile è il caso di queste analisi microbiologiche del suolo, che, già apparse in rassegne straniere come settore specialistico di opere più complesse, rappresentano forse il primo caso al mondo dello sforzo di condensare in un'opera specialistica metodologie di importanza strategica anche dal punto di vista applicativo.

E' con soddisfazione pertanto che presento questo volume, destinato a divenire un testo importante nella collana dei metodi analitici per l'agricoltura. L'opera fu programmata fin dalla fine degli anni '80 nell'ambito della Società Italiana della Scienza del Suolo ad opera di due personalità scientifiche di valore indiscusso, i professori Picci e Nannipieri, che ricoprivano allora cariche presidenziali nelle specifiche Commissioni della Società, ma fu solo alla fine degli anni '90 che essa fu ripresa e resa possibile dall'intervento tecnico-scientifico ed anche finanziario dell'Osservatorio Nazionale Pedologico e per la Qualità del Suolo, che affidò all'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante l'incarico di raccogliere materialmente i metodi, presentarli per l'ufficializzazione e predisporli per la stampa.

Fra le iniziative più qualificanti avviate dal Ministero sotto l'egida dell'Osservatorio si possono citare il monitoraggio della cartografia pedologica italiana, la realizzazione di itinerari per la costituzione dei servizi pedologici nelle regioni che ne sono prive, la stesura delle specifiche per la realizzazione della carta dei suoli d'Italia alla scala 1:250.000 e la redazione di un atlante degli indicatori della qualità del suolo, tuttora in corso. Ma la normalizzazione dei metodi e la loro presentazione in forma di volumi stampati per l'uso da parte dei tecnici del settore costituisce un fiore all'occhiello di cui tutti sottolineano con favore la grande importanza applicativa.

Questo volume, che viene licenziato per la stampa nel 2002, appare ad un anno di distanza da quello di analisi delle acque, a due anni da quello di analisi chimica del suolo e a ben cinque da quello di analisi fisica del suolo, che risale addirittura al 1997. Nel dare il benvenuto all'opera, sento di dovere sottolineare che una corretta pratica agricola, così come la garanzia delle condizioni di sicurezza per gli operatori e di salute per i consumatori, possono dipendere anche dalla messa a punto e dalla standardizzazione dei metodi di indagine. Non posso pertanto che confermare il pieno appoggio ad una più rapida pubblicazione dei metodi, che dovrà seguire la loro normalizzazione ed ufficializzazione¹.

Il mio Dicastero intende così porsi con fermezza al servizio di tutti coloro che perseguono gli obiettivi più avanzati dell'agricoltura sostenibile e polifunzionale, ossia delle forme di agricoltura che risultano pienamente compatibili con le necessità della società di oggi.

Con il prof. Giovanni Picci ed il prof. Paolo Nannipieri, che hanno coordinato la stesura dell'opera, desidero esprimere il mio più vivo apprezzamento al prof. Paolo Sequi che dirige la collana e a tutti coloro che in varia misura hanno contribuito al lavoro.

Giovanni Alemanno

Ministro delle Politiche Agricole e Forestali

¹ L'approvazione dei Metodi ufficiali di analisi microbiologica del suolo è apparsa sul Supplemento Ordinario alla Gazzetta Ufficiale n. 179 del 1° agosto 2002, che riporta il D.M. del 8 luglio 2002. L'ufficializzazione dei metodi di analisi microbiologica del suolo segue quella dei Metodi di analisi fisica del suolo (1997), della seconda edizione aggiornata dei Metodi di analisi chimica del suolo (1999) e dei Metodi di analisi delle acque per uso agricolo e zootecnico (2000).

Introduzione

Paolo Sequi

Ergo umor ex his non universus ingurgitans diluensque, sed quomodo sicut distillans velut ex ubere, alit omnia, quae non inundat. Tellus quoque illo modo fermentescit, et sui plena, a lactescentibus satis non effeta, cum tempus aperit, tepidis adridet horis.

Plinio, *Naturalis historia*, XVII, 15

Due millenni fa, considerando i processi di scioglimento delle nevi che mettono a disposizione delle piante la loro umidità, *non spandendola tutta insieme né in modo vorticoso, ma lasciandola bere goccia a goccia, come da una mammella, così da alimentarle senza sommergerle*, Plinio non poté fare a meno di notare che *in quel modo fermenta anche la terra, piena della sua sostanza. La terra che non si esaurisce* per le piante *che le succhiano l'umore, e che quando la stagione si apre sorride ai tepori primaverili*. Ma che è quella "sostanza" della terra, l'unico comparto ambientale (lo sottolinea sempre Plinio, *II, 154*) cui noi diamo l'appellativo di madre? Quella sostanza è la vita. Oggi noi possiamo non solo considerare il suolo come un mondo vivente, ma anche presentare dei metodi per caratterizzarne gli organismi viventi.

Questo è l'obiettivo che si è posto il manuale dei metodi di analisi microbiologica del suolo. Originariamente previsto come manuale di metodi di microbiologia e biochimica del suolo, esso si è poi opportunamente ridimensionato per ricomprendere i soli metodi microbiologici, affidabili a più specifiche competenze professionali. I contenuti del manuale appaiono per certi versi classici, e riguardano argomenti che vanno dalle modalità di campionamento, trattamento e conservazione dei suoli da analizzare alle metodologie per la determinazione delle cariche microbiche, dei gruppi fisiologici e di gruppi microbici particolari. Un obiettivo davvero strategico: vediamo di ricapitolare il perché.

Come è noto, la fertilità dipende dalle proprietà fisiche, chimiche e biologiche del suolo e viene perciò spesso distinta in fertilità fisica, chimica e biologica.

La fertilità biologica del suolo viene però spesso dimenticata ed in ogni caso è assai meno studiata rispetto alle altre. Essa è collegata all'attività dei microrganismi, dai quali dipendono gli equilibri dei cicli degli elementi nutritivi, primi fra tutti l'azoto, il fosforo e lo zolfo. La fertilità biologica è correlata strettamente alla sostanza organica, la principale fonte energetica e di nutrimento dei microrganismi. Un suolo senza fertilità biologica è sterile e non garantisce più le condizioni per lo sviluppo delle specie vegetali: ma si potrebbe affermare senza tema di smentita che un vero suolo senza fertilità biologica non esiste.

I parametri analitici in grado di definire la fertilità biologica del suolo sono molteplici. La respirazione, la determinazione delle attività enzimatiche (deidrogenasi, ureasi, fosfatasi, ecc.), la mineralizzazione dell'azoto organico, i test di ammonificazione e nitrificazione potenziale ed il coefficiente metabolico sono alcune delle metodologie il cui uso può essere considerato di indubbia utilità. È assodato infatti che i parametri che dipendono dall'attività microbiologica rispondono più velocemente di quelli chimici o fisici ai cambiamenti prodotti da cause naturali o antropiche delle condizioni evolutive o di utilizzazione del suolo. Essi inoltre si sono rivelati ottimi indicatori di impatto sulla qualità del suolo da parte di numerose sostanze xenobiotiche. A titolo di esempio, possono occorrere anche anni perché si possa accertare una variazione significativa nel contenuto di sostanza organica del suolo (parametro comunemente associato al concetto di fertilità), mentre una variazione nel contenuto della biomassa microbica può essere significativa già nel breve termine; la spiegazione è piuttosto intuitiva, in quanto la biomassa microbica svolge un ruolo fondamentale nei cicli biogeochimici degli elementi nutritivi, e viene influenzata da qualunque loro alterazione. L'ostacolo maggiore alla diffusione di queste metodologie tra quelle comunemente eseguite per la definizione della

fertilità è costituito dalle procedure di prelevamento e manipolazione dei campioni, lunghe e laboriose, nonché dall'interpretazione non sempre immediata dei risultati. Attualmente purtroppo, non esiste alcun laboratorio d'analisi pubblico o privato, se si accettano pochi istituti di ricerca specializzati, in grado di effettuare questo tipo di determinazioni.

Da tempo il mondo scientifico stava compiendo notevoli sforzi nella divulgazione delle conoscenze relative agli sviluppi della biologia del suolo e auspicava una standardizzazione di metodi di analisi ufficiali di microbiologia e biochimica del suolo a livello nazionale. La prima iniziativa fu dovuta ad un gruppo di esperti di scienza del suolo appartenenti all'Università, al Consiglio Nazionale delle Ricerche ed agli Istituti Sperimentali del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, operanti nell'ambito della Commissione III (Biologia del suolo) e della Commissione IV (Fertilità del suolo) della Società Italiana della Scienza del Suolo (SISS).

Il progetto di realizzazione dell'opera iniziava oltre dodici anni or sono grazie a Giovanni Picci e Paolo Nannipieri, allora rispettivamente presidenti della III e IV Commissione della SISS, con l'obiettivo di produrre un manuale di metodi di microbiologia classica, riconducibile oggi al primo dei due volumi. Nominato un comitato di redazione al quale appartenevano tra gli altri Luigi Allievi, Franco Favilli e Anna Maria Ferrari, si procedeva all'individuazione delle tematiche ed alla stesura dei testi. In corso d'opera, anche grazie al dibattito avutosi all'interno delle due commissioni SISS, ci si rendeva ben presto conto che in realtà, per una corretta valutazione della fertilità biologica del suolo, non si poteva prescindere dalla conoscenza approfondita dei metodi biochimici e nel successivo triennio, sotto la presidenza delle due commissioni SISS di Brunello Ceccanti (Commissione III) e ancora Paolo Nannipieri (Commissione IV), veniva scelto e redatto un limitato numero di metodi biochimici. Liliana Gianfreda e Anna Benedetti, presidenti della III e IV Commissione dal 1997 ad oggi, hanno poi completato l'opera, riorganizzando e ampliando la parte di biochimica. Senza nulla togliere a tutti coloro che hanno partecipato alla realizzazione dell'opera il mio ringraziamento particolare va soprattutto ad Anna Benedetti senza la cui costanza e tenacia i manuali non sarebbero mai andati in porto. Con il contributo determinante di Liliana, Anna ha meticolosamente riadattato alle nuove esigenze editoriali i testi dei metodi, e, soprattutto, dato un taglio moderno e applicativo ai contenuti. Desidero anche tributare un riconoscimento particolare a Marco Nuti, impareggiabile revisore del contenuto di questo volume.

Il manuale si è poi operativamente concretizzato sotto l'egida dell'Osservatorio Nazionale Pedologico e per la Qualità del Suolo del Ministero per le Politiche Agricole e Forestali. L'Osservatorio ha discusso, recepito ed ufficializzato i metodi; il Ministero, cui tutti gli esperti del settore esprimono viva gratitudine, ha assicurato il contributo finanziario per la realizzazione e la diffusione del manuale. Unitamente agli esperti dell'Osservatorio desidero ringraziare Gianfranco Loffredo e Giuseppe Serino, i colleghi del Ministero che più di tutti gli altri si sono contraddistinti per il loro apporto a quest'opera. Gianfranco Loffredo, da sempre impegnato nei lavori dell'Osservatorio Nazionale Pedologico ed attuale dirigente della Divisione che ne porta il nome, ha da subito voluto appoggiare la realizzazione del Decreto di ufficializzazione dei metodi e poi del manuale, che ha voluto seguire con attenzione ed interesse costante. E non posso dimenticare l'incoraggiamento affettuoso di Giuseppe Serino, oggi Direttore Generale per le Politiche Strutturali e lo Sviluppo Rurale, che ha assicurato anche il reperimento, non ultimo davvero per importanza, dei fondi necessari alla pubblicazione.

Dal punto di vista tecnico, il manuale è un esempio di trasposizione di metodiche analitiche "non convenzionali" da un livello specialistico ad un livello semplificato, tenendo in considerazione la "manualità" di laboratorio, l'attendibilità e il significato del dato ottenuto. Si auspica che davvero tutti i laboratori sia pubblici che privati, dotati di una comune strumentazione analitica e normali capacità professionali, siano in grado di accedere alle metodiche.

I contenuti del manuale riguardano ovviamente i metodi di microbiologia classica, previsti fin dalla sua prima progettazione, come ad esempio la determinazione delle cariche microbiche, dei gruppi fisiologici, e di particolari funzioni microbiche. Vengono puntualmente descritte le modalità di campionamento, trattamento e stoccaggio dei campioni di suolo da analizzare. Di appositi volumi faranno parte invece le metodologie biochimiche e quelle più moderne di biologia molecolare.

I. Prelievo, preparazione e conservazione del campione da sottoporre ad analisi microbiologiche e biochimiche

| | | |
|--|---|----|
| 1. Campionamento, preparazione e conservazione | « | 9 |
| 1.1. <i>Introduzione</i> | « | 9 |
| 1.1.1. Metodologie e considerazioni statistiche | « | 10 |
| 1.1.2. Precauzioni da adottare per analisi microbiologiche e biochimiche | « | 10 |
| 1.2. <i>Epoca di campionamento</i> | « | 10 |
| 1.3. <i>Profondità del prelievo</i> | « | 11 |
| 1.4. <i>Scheda di campagna</i> | « | 11 |
| 1.5. <i>Preparazione del campione</i> | « | 13 |
| 1.5.1. Premessa | « | 13 |
| 1.5.2. Oggetto e campo di applicazione | « | 13 |
| 1.5.3. Principio | « | 13 |
| 1.5.4. Materiali ed apparecchiature | « | 13 |
| 1.6. <i>Uso del campione di terreno fresco</i> | « | 14 |
| 1.6.1. Premessa | « | 14 |
| 1.6.2. Oggetto e campo di applicazione | « | 14 |
| 1.6.3. Principio | « | 14 |
| 1.6.4. Procedura consigliata | « | 14 |
| 1.6.4.1. Materiali ed apparecchiature | « | 14 |
| 1.6.4.2. Procedimento | « | 15 |
| 1.6.2.3. Osservazioni | « | 15 |
| 1.7 <i>Essiccazione all'aria del campione</i> | « | 15 |
| 1.7.1. Premessa | « | 15 |
| 1.7.2. Oggetto e campo di applicazione | « | 15 |
| 1.7.3. Principio | « | 16 |
| 1.7.4. Procedura consigliata | « | 16 |
| 1.7.4.1. Materiali ed apparecchiature | « | 16 |
| 1.7.4.2. Procedimento | « | 16 |
| 1.7.4.3. Osservazioni | « | 16 |

| | | |
|--|---|----|
| 1.8. <i>Condizionamento mediante preincubazione dei campioni</i> | « | 16 |
| 1.8.1. Premessa | « | 16 |
| 1.8.2. Oggetto e campo di applicazione | « | 17 |
| 1.8.3. Principio | « | 16 |
| 1.8.4. Procedura consigliata | « | 17 |
| 1.8.4.1. Materiali ed apparecchiature | « | 17 |
| 1.8.4.2. Procedimento | « | 17 |
| 1.8.4.3. Osservazioni | « | 18 |
| | | |
| 1.9. <i>Conservazione dei campioni di terreno</i> | « | 18 |
| 1.9.1. Premessa | « | 18 |
| 1.9.2. Oggetto e campo di applicazione | « | 19 |
| 1.9.3. Principio | « | 19 |
| 1.9.4. Procedura consigliata | « | 19 |
| 1.9.4.1. Materiali ed apparecchiature | « | 19 |
| 1.9.4.2. Procedimento | « | 20 |
| 1.9.4.3. Osservazioni | « | 20 |
| | | |
| 1.10. <i>Bibliografia</i> | « | 22 |

1. Campionamento, preparazione e conservazione

Luigi Allievi, Anna Benedetti e Flavia Pinzari

1.1. Introduzione

Uno degli ostacoli principali alla divulgazione dei metodi di analisi microbiologiche e biochimiche del suolo riguarda le tecniche di campionamento, manipolazione e conservazione del campione da analizzare.

E' noto quanto i microrganismi del suolo rispondano tempestivamente a tutte le variazioni di temperatura ed umidità, pertanto i microbiologi, qualora non sia possibile realizzare l'analisi direttamente in campo, devono cercare di operare nelle condizioni più vicine a quelle in cui il suolo si trova prima di venire campionato.

Normalmente, per le analisi di tipo microbiologico viene consigliato di utilizzare un campione di suolo fresco e poco manipolato in cui la struttura e le proprietà metaboliche delle comunità microbiche presenti siano poco o affatto alterate. A tale fine il materiale da sottoporre ad analisi dovrebbe raggiungere il laboratorio in tempi brevi rispetto al momento del prelievo. Molto spesso questo non è realizzabile e, affinché i metodi di analisi sulle attività biochimiche e microbiologiche del suolo risultino di diffusa e generalizzata applicabilità, è importante poter disporre di metodi standard di prelievo, trattamento e conservazione dei campioni, che siano semplici e validi anche per la valutazione di altre tipologie di parametri. Si tratta di un approccio fondamentale per l'applicazione dei metodi microbiologici e biochimici nella definizione e nel controllo della qualità dei suoli, agrari o forestali che siano.

Precisando che per ciascun metodo riportato nel manuale verrà specificata la tipologia di trattamento del campione, vengono di seguito espone alcune osservazioni di carattere generale sul campionamento e sulla conservazione del campione.

1.1.1. Metodologie e considerazioni statistiche

Una corretta procedura di campionamento deve assicurare che il campione che verrà analizzato sia quanto più possibile "rappresentativo" del sistema oggetto di studio. In presenza di una possibile disomogeneità è preferibile analizzare singolarmente i diversi prelievi, evitando i "campioni medi".

Per ottenere un campione medio, effettivamente rappresentativo di un appezzamento di suolo, la procedura più corretta prevede una scelta puramente casuale dei diversi punti di prelievo. Si utilizzano le tabelle dei numeri casuali (o randomizzati) facilmente reperibili, assieme alle modalità di utilizzo, sui testi di statistica (p. es., Lison, 1961), oppure i generatori di numeri casuali ormai disponibili anche su calcolatori tascabili. Ad esempio, l'appezzamento di suolo considerato, escludendo i bordi, può essere diviso su una pianta in scala in numerose zone di uguali dimensioni, che vanno numerate progressivamente. La Tabella dei numeri casuali verrà utilizzata per stabilire quali di queste sub-parcelle andranno campionate, asportando da ognuna una quantità uguale di suolo per formare il campione medio. La validità di tale procedura si basa sul fatto che ogni zona dell'intero appezzamento ha le identiche probabilità di contribuire a rappresentare il tutto.

Un'alternativa più semplice è quella di utilizzare una distribuzione regolare dei punti di prelievo. Ad esempio su un appezzamento rettangolare possono essere tracciate le diagonali e quattro punti di prelievo individuati a metà di ogni semi-diagonale. È da notare che, contrariamente a quanto possa sembrare, una distribuzione casuale normalmente non coincide con una regolare, pur potendo quest'ultima essere considerata sufficientemente valida dal nostro punto di vista, specie nel caso di una zona omogenea. Per quanto riguarda la dimensione verticale, cioè la profondità di prelievo, ci si deve riferire al profilo del suolo, se ancora distinguibile, oppure alla coltura e/o alla modalità di aratura adottata, i quali interessano a seconda dei casi una particolare profondità.

Per il dettaglio delle procedure di campionamento e della relativa strumentazione si rimanda al Cap. 1 del Manuale di Fisica del Suolo di questa stessa collana (Castrignanò, 1997).

1.1.2. Precauzioni da adottare per analisi microbiologiche e biochimiche

Varie specie di microrganismi sono presenti nel suolo non come cellule isolate omogeneamente disperse, ma in microcolonie costituite anche da centinaia di individui, distribuite disomogeneamente e associate in prevalenza alle particelle di materiale organico del suolo (Florenzano, 1983). Ai fini di un campionamento per analisi di attività della biomassa microbica del suolo è importante tenere presente gli effetti di questa eterogeneità di distribuzione dei microrganismi nel suolo, a livello non solo microscopico. Questa disomogeneità, verificabile anche in scala ben superiore al micron o alle decine di micron, può ripercuotersi in sensibili differenze qualora si sottopongano ad analisi quantità troppo esigue di suolo. Per fornire un criterio di riferimento, è bene non effettuare mai una singola analisi su una quantità di suolo inferiore al grammo. In ogni caso si consiglia di prelevare in campo campioni di suolo di almeno un ettogrammo, per ottenerne uno medio di almeno un chilo (salvo una riduzione di tali valori nel caso si disponga di ridotte quantità di suolo). Ogni singola analisi dovrebbe poi riguardare qualche grammo di suolo.

Un'ulteriore fonte di disomogeneità è "l'effetto rizosfera". La microflora è più abbondante, anche di più ordini di grandezza, e più attiva nelle immediate vicinanze (millimetri) delle radici, ciò a causa dell'effetto stimolante dei composti organici, essudati in diversa misura dalle radici stesse (Florenzano, 1983). È opportuno evidenziare che a livello microbiologico può essere interessante studiare sia la distribuzione microbica nel suolo rizosferico (suolo adeso intorno all'apparato radicale) che quella nel suolo non rizosferico indicato di solito in letteratura come "bulk soil". Nel secondo caso, per evitare sovrastime dell'attività microbica per l'effetto rizosfera, si cercherà di campionare il suolo a debita distanza dalla vegetazione.

I campioni da sottoporre ad analisi microbiologiche devono essere prelevati e mantenuti in condizioni tali da evitare eccessive contaminazioni con microrganismi estranei, compresi quelli presenti nell'aria, oltre che con sostanze chimiche potenzialmente dannose. Questo si ottiene usando strumenti e contenitori perfettamente puliti anche se non sterilizzati ed evitando il prolungato contatto diretto con l'aria dell'ambiente. L'elevata carica microbica normalmente presente nel suolo può giustificare una ridotta applicazione delle precauzioni. Una limitata contaminazione non ha, infatti, complessivamente effetti rilevabili su determinazioni quantitative riguardanti gruppi microbici molto diffusi nel suolo quali quelli oggetto della presente opera. È quindi sufficiente lavare accuratamente tutto ciò che nelle varie fasi viene a contatto con il campione di suolo, sciacquare con acqua potabile di rete e non asciugare con materiali che potrebbero apportare contaminazione. È assolutamente da evitare l'impiego di sostanze disinfettanti persistenti come p. es. i sali d'ammonio quaternario.

Qualora siano oggetto di indagine gruppi anaerobi, non sono necessarie particolari precauzioni, tranne che in casi particolari come nello studio dei Metanobatteri, che comprendono forme con spiccata intolleranza all'ossigeno molecolare, per i quali si rimanda al capitolo specifico per l'intera procedura d'analisi.

1.2. Epoca di campionamento

Per quanto riguarda il periodo in cui effettuare il prelievo, si deve tenere presente che la microflora subisce delle oscillazioni quali-quantitative legate alle condizioni ambientali, alla temperatura, alle precipitazioni, ecc. Converrà quindi riferirsi, ad esempio, ad una situazione media o comunque non estrema. Si eviterà di campionare dopo un periodo di particolare siccità o piovosità. Qualora si voglia determinare il parametro microbiologico e biochimico in condizioni normali ci si dovrà altresì cautelare riguardo a possibili ripercussioni sulla microflora e sulla sua attività da parte di alcuni tipici trattamenti del suolo (fumigazioni, applicazioni di fertilizzanti organici o inorganici e di fitofarmaci, ecc.) per almeno un periodo di 30 giorni.

Un'altra importante conseguenza delle oscillazioni della microflora prima menzionate è che, se si eseguono confronti fra trattamenti del suolo, i relativi campionamenti non possono essere effettuati in tempi diversi. È opportuno infatti in questo caso prendere in considerazione, su un appezzamento sufficientemente omogeneo, sia parcelle non trattate (controllo) sia trattate ove procedere a campagne di prelievo sincrone.

Per quanto riguarda le analisi biochimiche, è anche possibile lavorare su suolo essiccato all'aria e successivamente condizionato in laboratorio. In questo caso l'epoca di prelevamento è relativa esclusivamente alla maggiore praticità delle operazioni, è infatti sufficiente evitare i periodi in cui i suoli da

campionare sono intrinseci di acqua o quando sono troppo asciutti. In genere si procede con un successivo riannaffiamento a condizioni standard che permette il confronto biochimico di suoli campionati in periodi diversi dell'anno o addirittura in anni diversi (confronta §1.7. e 1.8. di questo capitolo).

1.3. Profondità del prelievo

Solitamente è consigliato che il prelievo di suolo destinato ad analisi microbiologiche e biochimiche sia eseguito alla profondità di 0-15 cm poiché, di norma, è questo lo strato di suolo maggiormente colonizzato dai microrganismi. Si tratta comunque di un approccio non sempre valido dal momento che la distribuzione della biomassa microbica lungo il profilo di un suolo è regolata da molteplici fattori e differisce anche in base al tipo di gestione da parte dell'uomo. A parità di tipo di suolo, infatti, un prato naturale polifita ed un campo arato devono essere campionati in modo differente; nel primo si avrà in linea di massima una biomassa localizzata nei primi 5 cm di profondità, nel secondo sarà necessario campionare anche gli strati più profondi. Avviene infatti che nei suoli agrari i microrganismi risultino distribuiti piuttosto uniformemente lungo tutto il fronte dell'aratura (p. es. 0-40 cm). Inoltre, una coltura con apparati radicali molto sviluppati (p. es. *Zea mais*) influirà ulteriormente sulla distribuzione della microfauna e della microflora del terreno, la quale si spingerà a profondità maggiori in funzione della presenza di sostanza organica e di essudati radicali. In queste situazioni sarà pertanto necessario, come già accennato, effettuare un campionamento mirato che permetta di condurre le analisi sia dello strato di suolo interessato dall'aratura (0-30/0-40 cm) che dello strato in cui si spingono gli apparati radicali (circa 30-60 cm).

In alcuni studi è invece necessario seguire uno schema di campionamento differente. Primo fra tutti è il caso in cui vengono effettuate le analisi del suolo secondo la classificazione pedologica in cui si richiede un'accuratezza assai maggiore di quella finora esposta. Per un profilo di un suolo con copertura forestale può essere necessario il prelievo di un elevato numero di campioni, pari al tipo di stratificazione incontrata e quindi alla particolare struttura pedologica del suolo stesso. Appare pertanto chiaro come la metodica di campionamento da seguire debba riflettere le finalità dell'indagine e, allo stesso tempo, rispettare le caratteristiche del suolo in esame.

Lo studio dell'attività di alcuni gruppi particolari di organismi del suolo, infine, può comportare l'utilizzo di procedure di campionamento assai particolari. È il caso ad esempio dei microrganismi anaerobi che non necessitano di ossigeno né di luce e che pertanto possono colonizzare in alcuni suoli anche gli strati profondi, proibitivi per altre forme di vita microbica.

In sintesi dunque è bene seguire le seguenti regole generali:

- nei suoli arativi soggetti a rovesciamento o rimescolamento, prelevare il campione alla massima profondità di lavorazione del suolo ed eventualmente, distinguendo i due campioni, anche lo strato immediatamente sottostante al limite di lavorazione;
- nei suoli a prato naturale e a pascolo è necessario eliminare attentamente la cortina erbosa, per poi campionare lo strato interessato dagli apparati radicali delle specie erbacee. In generale, per le analisi biochimiche è comunque sufficiente campionare a profondità di 0-10 o 0-20 cm;
- nei suoli forestali prelevare più strati seguendo il profilo pedologico ed avendo particolare cura nel campionamento degli orizzonti organici ed eventualmente della lettiera, sia fresca che parzialmente decomposta. In genere, anche nel caso dei suoli forestali, essendo la biomassa microbica localizzata nei primi 0-10/0-20 cm di suolo, non è necessario spingersi con il campionamento molto oltre questa profondità, salvo particolari esigenze di studio.

1.4. Scheda di campagna

È buona norma, soprattutto se ad effettuare i campionamenti non è lo stesso analista, avere cura di allegare al campione una breve scheda di campagna che riassume le osservazioni di campo ed i dati essenziali relativi allo stesso prelievo di suolo. I campioni, accompagnati ciascuno dalla propria scheda, potranno così raggiungere il laboratorio di analisi ed essere "giudicati" anche sulla base di quel bagaglio di informazioni che senza la scheda andrebbe perso. L'interpretazione di molti dati analitici, specie se di tipo microbiologico, non può infatti prescindere talvolta dalla conoscenza delle caratteristiche del sito di campionamento (nel caso dei suoli forestali il tipo di copertura vegetale, la sua età, l'esposizione, la vicinanza

di centri abitati, ecc.).

Di seguito viene fornito un modello-base di scheda di campagna che potrà costituire lo schema su cui costruire delle schede finalizzate a specifici interessi.

La scheda di campagna potrà comprendere anche degli schemi o dei disegni raffiguranti l'ubicazione nell'area d'esame dei siti di campionamento. Ciò risulta particolarmente utile nel caso in cui il campionamento preveda la miscelazione in laboratorio di suolo prelevato da più punti per la formazione di un campione medio. In mancanza di un sistema di georeferenziazione una mappa con un sufficiente numero di punti di riferimento (punti cardinali, edifici, alberi isolati, tralicci ecc.), permette infatti di ripetere nel tempo lo stesso tipo di campionamento o di verificare, per un'area definita, le fluttuazioni del dato sperimentale per cause pedologiche o microclimatiche.

SCHEDA DI CAMPAGNA

| | | | |
|--|---|--|-----------------------|
| 1) Dati generali | | Campione N° | |
| Oggetto: | | Data del rilievo | |
| Rilevatore | | Coordinate chilometriche della stazione | |
| Località | | Regione/Provincia/Comune | |
| 2) Descrizione della stazione | | | |
| Esposizione | | | |
| Pendenza % | | Quota m.s.l.m. | |
| Rocciosità | | | |
| a) qualità | | | |
| b) quantità % | | | |
| Pietrosità | | | |
| a) qualità | | | |
| b) quantità % | | | |
| 3) Descrizione del suolo | | | |
| Profondità del prelievo in cm: | | | |
| Radici: | | dimensioni: | |
| | | quantità: | |
| 4) Precipitazioni | | | |
| Pioverse: | | Nevose: | Medie mensili: |
| Temperature dell'aria (medie mensili): | | | |
| | | | |
| Esposizione: | | | |
| | | | |
| Venti dominanti: | | | |
| | | | |
| Vicinanza di centri urbani, industriali, autostrade, ecc.: | | | |
| | | | |
| Tipo di vegetazione e approssimativamente % di copertura: | | | |
| Prato | Alto fusto (specificare l'essenza) | Colture | Altro |
| | | | |
| Uso del suolo (agricolo, pascolamento, fruizione turistica, ceduo, riserva naturale ecc.) | | | |
| | | | |
| Descrizione della superficie del terreno al momento del prelievo del campione (colore, presenza di croste superficiali, affioramento di materiali particolari come metalli, plastiche, frammenti di cemento e laterizi) | | | |
| | | | |
| ALTRE NOTE: | | | |
| | | | |

Particolare cura dovrà inoltre essere riposta nel confezionamento in campo del campione: una busta in plastica capiente e resistente dovrà recare in modo univoco il nome del campione, sia scritto direttamente su di essa con un pennarello indelebile (non idrosolubile e adatto ad ogni superficie) che segnato su un cartellino inserito in una bustina trasparente di plastica ed aggiunto al suolo al suo interno. Un altro cartellino

sarà fissato saldamente all'esterno della busta. La busta dovrà chiaramente risultare ben chiusa (sono in commercio degli appositi sistemi di chiusura dentati, ma anche dei semplici fili di metallo ricoperti da plastica).

In assenza di una scheda pre-stampata del tipo di quella riportata successivamente sarà cura di chi effettuerà il prelevamento di campioni di appuntare in modo chiaro per ogni sito almeno le seguenti osservazioni: numero del campione, località (eventualmente posizionamento su carta georeferenziata), data, nome dell'operatore, copertura vegetale, uso del suolo, pendenza, vicinanza di centri abitati od insediamenti industriali, trattamenti subiti (se suolo agrario o rimboschito), esposizione, profondità del prelievo ed una descrizione di massima del suolo (consistenza, colore, presenza e dimensioni di apparati radicali, ecc.).

1.5. Preparazione del campione

1.5.1. Premessa

Anche per questa fase, modifiche particolari alla procedura possono essere previste nei capitoli specifici.

Per motivi legati alla praticità, rappresentatività del campione e possibilità di effettuare più analisi o di replicarle in caso di dubbi, è consigliabile prelevare un campione totale di almeno un chilogrammo. La singola analisi viene poi condotta su di una quantità minore, per cui si ripresenta in questo sub-campionamento il problema della rappresentatività. In questa fase si può ricorrere ad un preliminare accurato rimescolamento dell'intero campione, cui si accoppia la frantumazione delle zolle e la setacciatura con maglie da 2 mm che allontana i residui vegetali e lo scheletro. E' evidente che tali operazioni vanno effettuate sull'intera massa del campione, prima dei prelievi per le analisi.

Quando si deve operare su un campione fresco le condizioni di umidità del suolo possono rendere difficoltosa e lenta la setacciatura: si deve comunque evitare un'eccessiva asciugatura (evitare ad esempio di lasciare a lungo in uno strato sottile il suolo setacciato). Può risultare utile far precedere la setacciatura a 2 mm da una a 5 mm.

Le precauzioni riguardanti contaminazioni di cui si è già discusso possono essere sufficientemente rispettate anche in questa fase utilizzando strumenti accuratamente puliti. Può risultare più comodo e veloce utilizzare direttamente le mani per la setacciatura, impiegando in tal caso guanti in gomma sterili o almeno preventivamente lavati.

1.5.2. Oggetto e campo di applicazione

Il presente metodo si applica a tutte le tipologie di suolo per la determinazione di parametri microbiologici e biochimici atti a rilevare le attività metaboliche della biomassa microbica in condizioni sperimentali standard (non di campo).

1.5.3. Principio

Il metodo si basa sulla scelta di procedure atte all'ottenimento di uno o più campioni da utilizzare in laboratorio, rappresentativi del livello medio e/o della variabilità del suolo da sottoporre ad analisi in condizioni standard.

1.5.4. Materiali ed apparecchiature

In generale, per il prelievo viene utilizzata la medesima attrezzatura consigliata nel manuale dei metodi per la chimica del suolo (cfr. Violante P., coordinatore: Metodi di Analisi Chimica). A seconda poi che si scelga di condurre le analisi su campioni freschi o seccati all'aria sono necessarie delle precisazioni ulteriori.

1.6. Uso del campione di terreno fresco

1.6.1. Premessa

Come già ricordato nell'introduzione del capitolo, il suolo è un habitat estremamente eterogeneo in cui fasi diverse (minerale, organica, gassosa, liquida) interagiscono a formare microambienti che differiscono enormemente fra loro, pur distando pochi millimetri. Se a questo si aggiunge la rapidità con cui i parametri micro-ambientali possono variare appare chiaro come le popolazioni microbiche nel suolo costituiscano delle comunità necessariamente plastiche, in grado cioè di fluttuare in funzione dell'ambiente. La formazione di spore resistenti o l'attuazione di strategie mirate a sfruttare situazioni puntuali offerte dallo specifico microambiente (p. es. strategie r/K , competizioni, simbiosi, capacità di attivare vie metaboliche alternative, ecc.) fanno delle comunità microbiche del suolo un sistema in continua evoluzione. Analizzare aspetti funzionali "reali" delle comunità microbiche del suolo, ovvero attività specifiche relative a momenti particolari della loro vita nel tempo o nello spazio, talvolta è utopico. Persino alcune delle misure di campo non rispecchiano la realtà (p. es. respirazione del terreno in campo) dal momento che "misurare" significa comunque alterare un equilibrio e quindi imporre un cambiamento. Premesso ciò, ritenere un campione di terreno "fresco" capace di riflettere a livello microbico le condizioni di campo non è realistico. Ciononostante per alcuni studi è necessario lavorare con campioni che non abbiano subito "traumi" eccessivi dal punto di vista della temperatura (congelamento) e dell'umidità (essiccazione). Sia il congelamento che l'essiccazione, infatti, inducono molti gruppi microbici a formare strutture di resistenza o permettono a specie più resistenti di prevalere, comportando pertanto un sensibile mutamento nella composizione della comunità. Chiaramente questi mutamenti possono avvenire anche naturalmente in un suolo che risulti, per motivi climatici stagionali, periodicamente congelato o seccato. L'uso di campioni di suolo freschi, avendo come prerogativa quella di rispecchiare il più possibile le condizioni di campo, richiedono più che mai accortezze che prevengano fluttuazioni di temperatura ed umidità. Sebbene non esista sufficiente letteratura sul confronto del comportamento di campioni di suolo di regioni climatiche diverse del Pianeta di fronte a fluttuazioni di temperatura e di umidità, è plausibile ritenere che, a livello di comunità microbica, per un terreno di climi caldo-aridi abbia un effetto maggiore un repentino raffreddamento che non una perdita di umidità. Vice-versa per un campione di suolo da un'area sottoposta naturalmente a gelate un riscaldamento può essere fatale.

1.6.2. Oggetto e campo di applicazione

Tale procedura è applicabile a tutti i tipi di suolo. L'uso di campioni di suolo fresco è consigliato in tutti quegli esperimenti in cui si vogliano determinare le attività della biomassa microbica nelle condizioni "di campo", ovvero il più possibile vicine a quelle riscontrabili all'atto del campionamento. Talvolta è necessario, prima di sottoporre il campione ad analisi, procedere comunque ad una fase di pre-incubazione per evitare che la misura dell'attività venga influenzata dal "disturbo" delle stesse operazioni di raccolta del campione.

1.6.3. Principio

Il metodo si basa sulla manipolazione e conservazione del campione nelle condizioni più vicine a quelle di campo.

1.6.4. Procedura consigliata

1.6.4.1. Materiali ed apparecchiature

- Vasi di vetro o sacchetti sterili;
- lacci di plastica per sigillare;
- contenitore da trasporto refrigerato;
- setacci a 5 e a 2 mm.

1.6.4.2. Procedimento

Introdurre il suolo campionato in vasi di vetro o sacchetti di plastica puliti o sterilizzati, sigillati accuratamente e completamente pieni per mantenere nel suolo le condizioni di umidità originarie. Tutti i recipienti ed i materiali che dovranno venire a contatto con il campione dovranno essere inerti, non dovranno cioè interagire chimicamente con alcuna delle componenti del campione stesso (in alcuni casi l'alluminio, ad esempio, è sconsigliato).

Se non è possibile portare in laboratorio a breve termine i campioni, trasportarli in contenitore refrigerato ma senza rischi di congelamento (vengono in genere utilizzati i frigoriferi portatili da picnic). Setacciare a 2 mm (eventualmente prima a 5 mm) e rimescolare accuratamente l'intera massa di ogni campione da sottoporre ad analisi, con le consuete cautele riguardo alle contaminazioni e limitando l'asciugatura del materiale. Radici e frazioni grossolane dello scheletro possono essere rimosse manualmente avendo cura di non inquinare il campione. Conservare poi i campioni al buio a circa +4°C. Prevedere tutte le analisi entro il più breve tempo possibile.

1.6.2.3. Osservazioni

Se lo scopo delle analisi è di indagare su differenze fra suoli (p. es. dovute a qualche trattamento) è opportuno curare la standardizzazione di tutta la procedura, dal campionamento all'analisi, per evitare che possibili alterazioni in queste fasi agiscano diversamente sui vari campioni, così da simulare una differenza non realmente esistente in campo: p. es. conservare i campioni nello stesso luogo, randomizzare la successione delle analisi, ecc.

1.7. Essiccazione all'aria del campione

1.7.1. Premessa

Per facilitare il compito di un analista, il requisito migliore che può avere un campione di suolo da analizzare, è quello di poter essere utilizzato per la determinazione del maggior numero possibile di parametri. A tal fine possono essere seguite le tecniche di campionamento e trattamento, standardizzate per i Metodi di Analisi Chimica del Suolo, con l'accortezza di essiccare il campione all'aria (non in stufa o in flusso d'aria) nel minor tempo possibile dalla raccolta, in ambiente buio ed aerato e comunque protetto da possibili fonti inquinanti (chimiche, fisiche o biologiche).

Trovandosi lontani dal proprio laboratorio sarà sufficiente utilizzare sacchetti di plastica più grandi del necessario, in modo da poter allargare sul fondo il campione di suolo (da evitare chiaramente sia la chiusura ermetica dei contenitori che la pratica, assai nociva, di lasciare il materiale campionato sotto al sole o in una vettura arroventata). Tale tecnica presenta l'indiscutibile vantaggio di poter omogeneizzare più efficacemente il campione, vagliandolo successivamente a 2 mm. Inoltre un subcampione, seccato e vagliato, potrà essere conservato in un barattolo di vetro scuro o di plastica opaca sigillato ermeticamente, anche per lunghi periodi. In questo modo sarà possibile ripetere con successo le analisi e contare sulla possibilità di effettuare verifiche successive.

Su tale campione andrà successivamente determinata sia l'umidità residua che la capacità di ritenzione capillare, al fine di poter riferire il dato analitico a 100 g di terreno secco a +105°C (cfr. Manuale di Analisi Chimica del Suolo n.c.n.) e di poter, in seguito, incubare il suolo in condizioni di umidità potenziali (cfr. in questo capitolo il paragrafo successivo sulla procedura di condizionamento).

1.7.2. Oggetto e campo di applicazione

Il presente metodo è applicabile a qualsiasi tipo di suolo in cui si vogliono misurare le attività microbiologiche in condizioni non di campo. Se ne consiglia l'uso qualora si abbia l'esigenza di ottenere informazioni sull'attività del suolo in condizioni standard per rilievi:

- puntiformi (in cui cioè è necessario avere una misura di potenzialità);
- confrontabili nel tempo;
- ininfluenti rispetto alle fluttuazioni dei parametri climatici, stagionali, ecc.

Se ne sconsiglia l'uso qualora siano richieste informazioni sulle attività in condizioni di campo e sull'attività reale della biomassa microbica.

1.7.3. Principio

Il metodo si basa sull'essiccazione all'aria di campioni di suolo secondo la procedura di seguito consigliata, finalizzata alla conservazione nel campione dell'attività microbiologica potenziale del suolo da cui proviene.

1.7.4. Procedura consigliata

1.7.4.1. Materiali ed apparecchiature

- Vaschette capienti in materiale inerte (vetro o plastica);
- macinino a palle;
- mortaio e pestello in ceramica;
- un setaccio a 2 mm;
- un ripiano in un luogo fresco, buio ed aerato;
- contenitori puliti, inerti ed ermetici dove conservare il terreno essiccato;
- etichette;
- pennarello indelebile per tutte le superfici.

1.7.4.2. Procedimento

Disporre il terreno campionato nelle bacinelle di materiale inerte, allargandolo in modo che sia distribuito su uno spessore di pochi centimetri (1-2). Sistemare le bacinelle su un ripiano, in un luogo fresco, buio ed aerato e lasciarlo essiccare, eventualmente rimescolandolo delicatamente ad intervalli di tempo per accelerare il processo.

Una volta essiccato il terreno dovrà essere vagliato a 2 mm, avendo cura di rimuovere manualmente lo scheletro e le radici. Nel caso di terreni con un'alta percentuale di argilla prima della setacciatura può essere necessario intervenire con una macinatura a mano (con pestello) o con un macinino meccanico o elettrico. In quest'ultima eventualità si dovrà avere cura di pulire accuratamente lo strumento fra un campione e l'altro per evitare contaminazioni.

Il terreno sarà quindi conservato chiuso in recipienti puliti, di materiale inerte, accompagnati da etichette per l'identificazione ed eventualmente dalla relativa scheda di campagna. I contenitori, a loro volta, dovranno essere mantenuti in un ambiente buio, asciutto e fresco.

1.7.4.3. Osservazioni

Riguardo al problema della rispondenza con la realtà di campo dei valori di attività della biomassa microbica ottenuti con campioni trattati secondo questo metodo, va specificato che le discussioni in ambito accademico sono varie e diversificate. In generale viene sottolineato come il tipo di stoccaggio e di condizionamento dei campioni di suolo siano determinanti ai fini della misura, dal momento che le comunità di microrganismi che si "risvegliano" non potranno mai corrispondere alle comunità reali. Si è visto comunque che nel caso di suoli di ambienti mediterranei, xerici o naturalmente soggetti a periodi di siccità e ad elevate temperature (in cui cioè i microrganismi sono adattati agli stress idrici), un blando essiccamento all'aria con un successivo oculato condizionamento a T °C ed U% definite, permette di stimare con successo le dimensioni delle comunità microbiche.

1.8. Condizionamento mediante preincubazione dei campioni

1.8.1. Premessa

Tutte le volte che un campione di suolo deve essere analizzato fresco, e questo non è realizzabile, è possibile ovviare al problema preincubando il suolo (conservato essiccato o congelato) alle condizioni richieste dalla procedura analitica specifica. Il procedimento di preincubazione dei campioni viene riportato

di seguito nella apposita scheda.

Nei casi in cui la procedura analitica richieda l'aggiunta di un substrato (come la caseina lattica, l'arginina, il glucosio, ecc.), l'aggiunta dovrà essere effettuata dopo circa 10 giorni di preincubazione (il tempo di preincubazione varia da suolo a suolo e dipende da molteplici fattori). Il suolo dovrà pertanto essere incubato in bacinelle di vetro o di materiale inerte ricoperte da un film di plastica forato sempre seguendo la procedura del controllo periodico dell'umidità, riumettendolo ogni volta in base alla pesata. Nel caso del condizionamento con aggiunta di substrato va sottolineata la necessità di condurre in parallelo il condizionamento di un "bianco" che serva da controllo per il campione addizionato. È indispensabile cioè disporre di un sub-campione in cui non sia stata effettuata l'aggiunta e che permetta pertanto di valutare, per differenza, il disturbo arrecato alla componente microbica dalla sostanza utilizzata. Il "bianco" dovrà subire tutti i passaggi riservati ai subcampioni addizionati di substrato (mescolamento, eventuale trasferimento in altri recipienti, ecc.) tranne, chiaramente, l'aggiunta del substrato. Poiché, inoltre, durante la manipolazione del suolo condizionato (preparazione dei subcampioni, ecc.) viene comunque alterato l'equilibrio raggiunto dal suolo durante la preincubazione, in alcune prove in cui si voglia misurare anche l'effetto di disturbo della manipolazione effettuata in laboratorio sul campione preincubato, può essere necessario un secondo bianco che non verrà mescolato né cambiato di recipiente. Si procederà, sin dall'inizio della prova, alla preparazione di un sottocampione che sarà incubato alle stesse condizioni ma che non sarà manipolato fino al momento dell'analisi.

1.8.2. Oggetto e campo di applicazione

La preincubazione si applica a tutti i campioni di terreno di cui si vogliono misurare attività microbiologiche e biochimiche. Si tratta di un procedimento necessario qualora i campioni siano stati conservati seccati all'aria, liofilizzati, refrigerati o congelati. È consigliabile comunque preincubare il terreno anche prima di procedere ad analisi su campioni di suolo fresco al fine di minimizzare, nel campione, l'effetto "disturbo" dovuto alla fase di prelievo e di setacciatura del campione.

1.8.3. Principio

Il metodo si basa sull'incubazione del campione da analizzare a temperatura ed umidità ben definite, per un tempo sufficiente da indurre nella comunità microbica un adattamento alle condizioni imposte sperimentalmente. Tali condizioni potranno essere "potenziali", ovvero tarate per ottenere il massimo valore della risposta attesa (ciò cambierà da suolo a suolo in base alle caratteristiche specifiche come la ritenzione capillare, ecc.) oppure studiate per ottenere una risposta in funzione di fluttuazioni sperimentali di uno specifico parametro (p. es. temperatura, grado di saturazione, ecc.).

1.8.4. Procedura consigliata

1.8.4.1. Materiali ed apparecchiature

- Fogli in plastica pesante o bacinelle basse ed ampie sempre in plastica;
- spruzzatore per acqua;
- stufa termostata;
- recipienti per incubazione del suolo (specifici per ogni metodo: vials, beakers, ecc.);
- parafilm;
- pipette Pasteur;
- bilancia tecnica;
- pennarello per tutte le superfici e resistente all'acqua.

1.8.4.2. Procedimento

I campioni di suolo essiccati vengono:

- distesi su un foglio di plastica per uno spessore di 1 cm, quindi mediante uno spruzzatore umettati con tanta acqua quanta ne richiede per essere portato alla % della capacità di ritenzione capillare come da metodologia specifica (Klute, 1986);

- coperti con un altro foglio di plastica e lasciati riposare per 2-3 ore;
- sottoposti alle pesate necessarie alle successive procedure analitiche.

I recipienti contenenti le aliquote di suolo da analizzare (matracchi, beakers, buckners, vials, ecc.), di cui è fondamentale segnare il peso complessivo (recipiente + suolo + acqua), sono incubati alla temperatura desiderata (in genere specificata dal metodo) per 10 giorni, coperti da un film di plastica opportunamente forato (devono poter avvenire gli scambi gassosi, ma si deve nel contempo limitare la velocità di evaporazione dell'acqua).

Ogni due giorni è necessario controllare l'umidità pesando i singoli recipienti, dopo aver rimosso il film di plastica, ed aggiungendo con lo spruzzatore o con una pipetta Pasteur la quantità d'acqua idonea a ripristinare il peso segnato all'inizio dell'incubazione. Si deve avere cura di ricoprire ogni volta i recipienti con il film di plastica forato.

L'esubero di campione umettato potrà essere conservato in frigorifero, a circa +4°C per 1 mese, quindi riutilizzato. Se necessario si potrà ripetere su di esso l'intera procedura di condizionamento (pesata, preincubazione, ecc.).

1.8.4.3. Osservazioni

Il condizionamento del suolo può essere effettuato a differenti umidità e temperature, secondo lo scopo della ricerca. In generale si suggerisce di portare il suolo al 100% della capacità di ritenzione idrica capillare (ovvero di aggiungere tanta acqua quanta ne viene trattenuta dal suolo sottoposto ad una pressione di -33 kPa) e di condizionarlo alla temperatura richiesta dall'esperimento (p. es. +30°C è la temperatura valida per i suoli tipici dell'ambiente mediterraneo). Per realizzare ciò è necessario conoscere l'umidità (U%) del suolo seccato all'aria (l'essiccazione all'aria fa sì che il terreno trattienga comunque dell'acqua) e il valore della sua ritenzione idrica capillare (RC). Quest'ultima consiste nel volume percentuale di acqua trattenuta dal suolo sottoposto ad una pressione di -33 kPa con il metodo della piastra di Richards (Metodi di Analisi Fisica del Suolo, 1997). La quantità di acqua da aggiungere (H₂O) si calcola con la seguente espressione:

$$H_2O = RC\% - (X - 100)$$

dove:

$$X = 10.000 / CU\%$$

con X = quantità di terreno secco all'aria che deve essere pesato per avere 100 grammi di suolo secco a +105°C;
e dove:

$$CU\% = 100 - U\%$$

ovvero il "complemento a 100" dell'umidità del suolo essiccato all'aria.

Inoltre per esprimere i risultati delle analisi effettuate su suoli condizionati al 100% della capacità di ritenzione capillare in valori riferiti al secco a +105°C, come di norma, è necessario moltiplicarli per un fattore (F_{105°}) ottenuto dalla seguente espressione:

$$F_{105^\circ} = 100 / CU^*\%$$

dove CU*% è il complemento a 100 dell'umidità del campione condizionato. Quest'ultima si ottiene per gravimetria dopo aver essiccato un'aliquote del suolo condizionato a +105°C.

1.9. Conservazione dei campioni di terreno

1.9.1. Premessa

Fermo restando che la soluzione ideale, quando si debba lavorare su campione fresco, è l'analisi immediatamente successiva al prelievo (entro poche ore), è spesso inevitabile una più o meno lunga conservazione dei campioni di suolo. Si deve, in questo caso, tenere presente che l'oggetto delle indagini sono organismi viventi, i quali possono morire, o crescere, secondo le condizioni ambientali in cui vengono a trovarsi. Nel presente capitolo sono fornite prescrizioni di carattere generale; modifiche delle procedure

dovute ad esigenze particolari sono espone nei capitoli specifici.

La liofilizzazione, la surgelazione, il congelamento e l'essiccazione all'aria, comportano inevitabilmente la morte di numerose cellule microbiche (Jensen, 1962; Stotzky et al., 1962; West et al., 1986 e 1987). Ciononostante per molti suoli così conservati è possibile, attraverso un periodo di condizionamento a temperatura ed umidità controllate, ripristinare in laboratorio l'attività della biomassa microbica. Nel caso di studi di confronto e di procedure analitiche che lo consentono, è possibile conservare il suolo congelato o essiccato in modo da affrontare le analisi in tempi anche molto diversi da quelli in cui è stato effettuato il campionamento (alcuni suoli mantengono la capacità di riattivarsi per molti anni). Riguardo al problema della rispondenza con la realtà di campo dei valori d'attività ottenuti su terreni condizionati, è chiaro che le misure su suoli "risvegliati" saranno potenziali, ovvero relative alle specifiche condizioni di temperatura e umidità adottate in laboratorio. Questo approccio è consigliato nel caso non si voglia tenere conto delle fluttuazioni stagionali della biomassa microbica; esso infatti permette di prescindere dalle condizioni di campo e nel contempo di confrontare, in condizioni standard predefinite ed uniformi, l'attività di campioni differenti (Benedetti et al., 1992; Rossi et al., 1992).

Come già accennato, nel caso specifico dei suoli di ambienti mediterranei, abitualmente sottoposti a periodi di siccità e ad elevata temperatura si è visto che un blando essiccamento all'aria permette di conservare campioni in ottimo stato anche per lunghi periodi. Ai fini delle analisi biochimiche e di attività microbica su suoli conservati, come riportato nel paragrafo 1.8 di questo capitolo, è estremamente delicata la fase di "riattivazione" dei terreni conservati.

1.9.2. Oggetto e campo di applicazione

La tecnica può essere applicata a qualsiasi tipo di suolo. La conservazione dei campioni di suolo è necessaria ogni volta che si ritiene opportuno di dover ripetere nel tempo un'analisi sul medesimo campione (p. es. come controllo rispetto ad un trattamento), o più semplicemente quando le analisi non sono eseguibili direttamente sul luogo di campionamento.

1.9.3. Principio

Il principio su cui si basa questa tecnica consiste nel conservare in condizioni standard campioni di suolo per periodi di tempo variabili da poche ore a giorni ad anche anni.

1.9.4. Procedura consigliata

1.9.4.1. Materiali ed apparecchiature

Per la conservazione di campioni essiccati all'aria:

- recipienti di materiale inerte opachi alla luce e dotati di chiusura ermetica (barattoli in teflon, PVC, vetro, o sacchetti in plastica);
- ambiente fresco e asciutto dotato di scaffali o contenitori per un'ideale schedatura dei recipienti;
- etichette di cartoncino od altro materiale su cui poter scrivere (da evitare etichette adesive il cui collante può nel tempo perdere di adesività);
- penna o pennarello idoneo alla superficie del cartellino o del contenitore scelto.

Per i campioni da conservare refrigerati:

- recipienti di materiale inerte dotati di chiusura ermetica (barattoli in teflon, PVC, vetro, o sacchetti in plastica);
- refrigeratore (+4±2°C) capiente dotato di sistema di allarme per il controllo della temperatura;
- etichette di materiale idrofobo su cui poter scrivere (da evitare etichette adesive il cui collante può non resistere all'umidità e alle basse temperature);
- penna o pennarello idoneo alla superficie del cartellino o del contenitore scelto.

Per i campioni da conservare congelati:

- recipienti di materiale inerte dotati di chiusura ermetica resistenti alle basse temperature (barattoli in teflon, PVC, vetro, o sacchetti in plastica);
- congelatore (-40±2°C) capiente dotato di sistema di allarme per il controllo della temperatura;
- etichette di materiale idrofobo su cui poter scrivere (da evitare etichette adesive il cui collante può non resistere all'umidità e alle basse temperature);
- penna o pennarello idoneo alla superficie del cartellino o del contenitore scelto e con inchiostro resistente alle basse temperature.

1.9.4.2. Procedimento

Relativamente al procedimento di essiccazione all'aria dei campioni si rimanda al paragrafo 1.7. di questo capitolo.

Per la refrigerazione e per il congelamento è necessario seguire gli accorgimenti di preparazione del campione come indicato nel paragrafo sull'uso del campione fresco (§ 1.6.). I campioni devono poi essere riposti in contenitori in grado di resistere alle basse temperature. Nel caso specifico del congelamento alcune plastiche di uso comune si spaccano dopo poco tempo. Alcuni tipi di vetro possono pure non essere sufficientemente resistenti. Nei contenitori destinati al congelamento è bene riporre quantità di campione non eccessive, se il suolo contiene molta acqua si deve, infatti, tenere in considerazione l'aumento di volume di questa.

Particolare attenzione si deve avere nella scelta del tipo di pennarello da utilizzare poiché alcuni inchiostri acrilici dopo qualche tempo alle basse temperature depolimerizzano. E' bene pertanto mantenere unito al campione un cartellino d'identificazione che duri almeno quanto il campione stesso.

Per i campioni essiccati all'aria è necessario predisporre un ambiente fresco e non umido dove riporre i contenitori con i campioni. Questi ultimi devono essere a chiusura ermetica e di materiale scuro, in modo da non esporre il suolo alla luce.

1.9.4.3. Osservazioni

Esistono metodi diversi di conservazione, ciascuno dei quali possiede pro e contro. I più utilizzati sono la refrigerazione, il congelamento e l'essiccazione all'aria. Secondo il tipo d'esperimento, di analisi e di condizioni di lavoro è opportuno scegliere il metodo di conservazione dei campioni più idoneo.

Il principio da tenere in considerazione è che, secondo la provenienza dei suoli, è possibile ottenere risultati differenti dallo stesso trattamento. Come accennato in altri passaggi di questo capitolo, le comunità microbiche del suolo sono strutturate in funzione delle condizioni ambientali prima e microambientali poi, del particolare ambiente in cui vivono; imporre un regime di resistenza alla comunità (da freddo, nel caso della refrigerazione e del congelamento; da disidratazione, nel caso dell'essiccamento all'aria) è comunque un intervento drastico di cui si deve tenere conto nel corso di un esperimento. Nel caso di confronto fra campioni di diversa provenienza o campionati in tempi differenti, è bene utilizzare sempre lo stesso tipo di conservazione e comunque avere cura, sempre, di riportare (nei protocolli sperimentali, come nei lavori scientifici) gli eventuali metodi di conservazione utilizzati.

Il suolo essiccato all'aria potrà essere conservato, allo scopo di verificarne l'attività microbica, mediamente per cinque/sette anni. Tale periodo è estremamente variabile da suolo a suolo, ed in particolare dipende dal tipo di comunità microbica presente. Come accennato, un suolo di ambienti soggetti ad ampie oscillazioni climatiche sarà caratterizzato da specie di microrganismi in grado di mantenersi in vita in forme dormienti o di resistenza per lunghi periodi (anche dieci anni). Viceversa, suoli di aree temperate o comunque caratterizzate da umidità costante, passando attraverso questo metodo di conservazione, subiranno un trauma sicuramente maggiore e saranno "vitali" per tempi meno lunghi (anche solo due/tre anni ed in alcuni casi anche solo pochi mesi). Purtroppo esistono pochi studi sistematici sulla materia, certo è che sarà bene conservare il suolo unitamente ad una scheda dove saranno riportati i valori dei parametri biochimici e microbiologici di riferimento, corrispondenti cioè a determinazioni effettuate subito dopo la raccolta e la manipolazione (Grisi et al., 1998).

Il suolo refrigerato presenta problemi differenti, a +4°C infatti alcuni terreni continuano a respirare (terreni di climi temperati-freddi) e ad evolversi dal punto di vista della composizione della comunità microbica. I terreni di ambienti mediterranei ad esempio sono talvolta risultati particolarmente sensibili alla conservazione in frigorifero, mantenendosi vitali in questo modo per periodi relativamente brevi. Il tempo di

“vita” medio di un suolo conservato in frigorifero a circa +4°C è di circa due-tre mesi (Vance, 1987).

Per i campioni conservati congelati sono necessarie alcune accortezze specifiche:

- per evitare di scongelare e ri-congelare più volte il campione, qualora siano previste analisi a più intervalli, è buona norma predisporre più subcampioni rappresentativi in altrettanti contenitori, in modo da procedere allo scongelamento solo di alcuni di essi ed in occasione delle analisi;
- lo scongelamento deve avvenire in modo graduale e a temperatura ambiente, eventualmente mantenendo il recipiente ancora chiuso sotto un flusso d’acqua corrente fredda (in modo da accelerare il processo per mezzo dello scambio di calore con l’acqua) e mai riscaldando il campione congelato.

Posizione Italiana

Metodo Ufficiale n° I.1
Supplemento Ordinario G.U. n° 179
dell’1.08.2002

Posizione Internazionale

ISO 10381 – 6 (1993) (E)

1.10. Bibliografia

- Benedetti A., Rossi G., Dell'Abate M.T., Canali S. (1992), *Influenza dell'essiccazione all'aria del terreno sulla misura della respirazione e delle attività deidrogenasiche ed ureasiche*. Atti X Convegno della Società Italiana di Chimica Agraria, Roma, 209-216.
- Castrignànò A. (1997), 1. *Campionamento*. In: *Metodi di Analisi Fisica del Suolo*. (Pagliai M., Coordinatore). Franco Angeli Ed. Milano.
- Florenzano G. (1983), *Fondamenti di Microbiologia del Terreno*. REDA, Roma.
- Grisi B., Grace C., Brookes P.C., Benedetti A., Dell'Abate M.T. (1998), *Temperature effects on organic matter and microbial biomass dynamics in temperate and tropical soils*. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 30, No. 10/11, pp. 1309-1315.
- Jensen V. (1962), *Studies on the microflora of Danish beech forest soils. I. The dilution plate count technique for the enumeration of bacteria and fungi in soil*. *Zentralblatt für Bakteriologie-II Abteilung*, 116, 13-32.
- Klute A. (1986), *Water retention: laboratory methods*. In: *Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and Mineralogical Methods* (Klute A., Ed.), 2nd Edition. American Society of Agronomy, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. Publishers. Madison, Wisconsin USA, pp. 635-662.
- Lison L. (1961), *Statistica Applicata alla Biologia Sperimentale*. Ed. Ambrosiana, Milano.
- Pagliai M. coordinatore (1997), *Metodi di Analisi Fisica del suolo*. Franco Angeli Ed., Milano.
- Rossi G., Benedetti A., Dell'Abate M.T. (1992), *Effetto della variazione di temperatura ed umidità sulla respirazione e sul potere mineralizzante di suoli tipici italiani*. Atti X Convegno della Società Italiana di Chimica Agraria, Roma, 421-428.
- Stotzky G., Goos R.D., Timonin M.I. (1962), *Microbial changes occurring in soil as a result of storage*. *Plant and Soil*, 16, 1-18.
- Vance E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S. (1987), *An extraction method for measuring soil microbial biomass C*. *Soil Biology and Biochemistry*, 19, 703-707.
- Violante P., coordinatore (1999), *Metodi di analisi chimica del suolo*. Franco Angeli Ed. Milano.
- West A.W., Ross D.J., Cowling J.C. (1986), *Changes in microbial C, N, P and ATP contents, numbers and respiration on storage of soil*. *Soil Biology and Biochemistry*, 18, 141-148.
- West A.W., Sparling G.P., Grant W.D. (1987), *Relationships between mycelial and bacterial populations in stored, air dried and glucose-amended arable and grassland soils*. *Soil Biology and Biochemistry*, 19, 599-605.

Luigi Allievi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche
Sezione Microbiologia Agraria, Alimentare, Ecologica
Università degli Studi di Milano
Via Celoria, 2
20133 Milano

1^a ed. 2002
Coordinatori dei metodi:
Picci G., Nannipieri P.
Direttore della collana:
Paolo Sequi

Anna Benedetti

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Sezione di Nutrizione Azotata e Microbiologia del Terreno
Via della Navicella, 2
00184 Roma

Flavia Pinzari

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Sezione di Nutrizione Azotata e Microbiologia del Terreno
Via della Navicella, 2
00184 Roma

II. Valutazione delle cariche microbiche e gruppi generici

| | | |
|--|---|----|
| 1. Valutazione delle cariche microbiche e gruppi generici | « | 26 |
| 1.1. <i>Introduzione</i> | « | 26 |
| 1.2. <i>Bibliografia</i> | « | 27 |
| 2. Procedimento generale per le conte per via colturale | « | 28 |
| 2.1. <i>Introduzione</i> | « | 28 |
| 2.2. <i>Materiali ed apparecchiature</i> | « | 28 |
| 2.3. <i>Diluizioni successive del campione</i> | « | 29 |
| 2.4. <i>Semina in terreno colturale</i> | « | 30 |
| 2.5. <i>Incubazione</i> | « | 31 |
| 2.6. <i>Rilevamento dei risultati</i> | « | 31 |
| 2.6.1. <i>Conta in piastra</i> | « | 32 |
| 2.6.2. <i>Conteggio in terreni colturali liquidi (MPN)</i> | « | 32 |
| 2.7. <i>Elaborazione statistica dei risultati</i> | « | 34 |
| 2.8. <i>Bibliografia</i> | « | 35 |
| 3. Gruppi generici di microrganismi | « | 36 |
| 3.1. <i>Introduzione</i> | « | 36 |
| 3.2. <i>Batteri aerobi ed anaerobi</i> | « | 36 |
| 3.2.1. <i>Terreno colturale</i> | « | 36 |
| 3.2.2. <i>Procedura consigliata</i> | « | 37 |
| 3.3. <i>Attinomiceti</i> | « | 37 |
| 3.3.1. <i>Preparazione del campione</i> | « | 37 |
| 3.3.2. <i>Substrati di isolamento preferenziali</i> | « | 37 |
| 3.3.3. <i>Preparazione e inoculo delle piastre</i> | « | 38 |
| 3.3.4. <i>Conteggio delle colonie</i> | « | 38 |

| | | |
|--|---|----|
| 3.4. <i>Funghi filamentosi e lieviti</i> | « | 38 |
| 3.4.1. Terreno colturale | « | 38 |
| 3.4.2. Procedura consigliata | « | 38 |
| 3.5. <i>Bibliografia</i> | « | 40 |

1. Valutazione delle cariche microbiche e gruppi generici

di Luigi Allievi

1.1. Introduzione

La carica microbica rappresenta il numero di microrganismi, appartenenti ad un gruppo fisio-tassonomico generale (batteri filamentosi e non, lieviti, microfunghi, protozoi) oppure ad uno specifico gruppo fisiologico o funzionale, presenti in una determinata quantità, generalmente unitaria, del materiale studiato: nel caso del suolo, normalmente in un grammo di peso secco; rappresenta quindi una densità di popolazione. Tali cariche possono essere determinate essenzialmente per due vie:

- **diretta** (microscopica): in un volume esattamente misurato di una sospensione in liquido del suolo possono venir direttamente contate a seguito di un opportuno ingrandimento le cellule microbiche presenti; riportando il numero riscontrato al volume osservato ed alla diluizione effettuata si ottiene la carica (Bloem et al., 1995);
- **indiretta** (colturale): la presenza di cellule microbiche vitali viene evidenziata dalla crescita in opportuno terreno colturale (soluzione acquosa dei nutrienti necessari, eventualmente gelificata mediante aggiunta di agar); su suolo agarizzato ogni cellula microscopica si moltiplica in modo localizzato arrivando a formare una massa visibile ad occhio nudo che costituisce una colonia. In terreno colturale liquido si può rilevare la crescita, generalmente dispersa, osservando secondo i casi l'intorbidimento del liquido dovuto alle cellule in sospensione, oppure la produzione di particolari sostanze, evidenziabili mediante reattivi, o la produzione di gas che vengono raccolti.

Le conte dirette possono, almeno in linea teorica, permettere di contare realmente tutti i microrganismi, indipendentemente dal tipo e dalla possibilità di poterli coltivare; esistono infatti numerosi microrganismi vitali ma non coltivabili, viable but nonculturable = VBNC (Kell et al., 1998). Con tale tecnica gruppi particolari possono essere distinti generalmente solo su base morfologica, e non fisiologico/funzionale, a meno di ricorrere a tecniche complesse.

Le conte colturali viceversa non possono permettere di raggruppare al di là di un certo limite i microrganismi: date le differenziate esigenze nutritive di questi, non esiste un solo terreno ed una condizione colturale adatta indistintamente a tutti i tipi di microrganismi. Si dovranno quindi conteggiare distintamente, ad esempio, batteri aerobi, batteri anaerobi, eumiceti (funghi filamentosi o muffe, nonché lieviti), ecc. Esiste tuttavia la possibilità di differenziare i vari gruppi fisiologici.

L'inconveniente delle conte dirette applicate ad un sistema complesso quale il suolo risiede nella difficoltà di distinguere visivamente le cellule microbiche nella loro varietà di forme da altre particelle, nonché le cellule vive da quelle morte (che non contribuiscono all'attività biologica). Sono state in realtà messe a punto delle "colorazioni vitali", quale quella con arancio di acridina, che permettono entro certi limiti tale distinzione. Vengono contate le cellule microbiche, su opportuni filtri attraverso cui si è filtrata la sospensione del campione, che presentano una particolare colorazione.

Conte realizzate con tale accorgimento dovrebbero evidentemente essere alternative a quelle colturali, ma in realtà almeno nel caso dei batteri sembrano fornire cariche più elevate, a volte di più ordini di grandezza. Questo non sembra imputabile solamente a sottovalutazioni di varia origine nel caso dei metodi colturali. Molti autori ritengono piuttosto che possano esistere nel suolo dei microrganismi, vitali e debolmente attivi, in uno stato di quiescenza che non permetterebbe loro di avere una crescita attiva nel momento in cui dispongano degli opportuni nutrienti. Questa interpretazione, che si ricollega alla distinzione dei microrganismi del suolo in autoctoni e zimogeni, si interseca inoltre nella visione di alcuni autori col concetto di oligotrofi (della quale si accennerà più avanti) e risulta comunque non sufficientemente chiarita. Questa eventuale popolazione quiescente è generalmente considerata coincidente con i già citati VBNC, ed in vari casi risulterebbe superare il 99% dei microrganismi presenti nel suolo: date le dimensioni cellulari più ridotte e l'attività nettamente minore, secondo alcuni non avrebbe una soverchia importanza nell'ambito

dell'intera attività microbica presente nel suolo, nonostante la possibile maggioranza numerica (Kaczmarek, 1985 a/b; Olsen & Bakken, 1987; Kaszubiak & Muszynska, 1992).

L'inconveniente più grave delle cosiddette colorazioni vitali è che in realtà non sono in grado di distinguere con sicurezza fra cellule realmente vitali e quelle morte (Jones & Simon, 1975). Il dato che se ne ricava può comunque essere utilizzato per confronto fra suoli, senza pretendere di darne un significato assoluto. Quanto ora presente sul mercato ha, d'altra parte, reso più semplice questo tipo di determinazione. Si ritiene comunque, anche alla luce di quanto sopra esposto, di considerare tali metodi al di fuori degli scopi applicativi del presente manuale e si rimanda per ulteriori informazioni a testi più specialistici (Karl, 1986; Bloem et al., 1995).

Posizione Italiana

Assente

Posizione Internazionale

Assente

1.2. Bibliografia

- Bloem J., Bolhuis P.R., Veninga M.R., Wieringa J. (1995), *Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil*. In: Methods of Applied Soil Microbiology and Biochemistry (K. Alef and P. Nannipieri, Eds.), Academic Press, London, pp. 162-173.
- Jones J.G., Simon B.M. (1975), *An investigation of errors in direct counts of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy, with reference to a new method of dyeing membrane filters*. Journal of Applied Bacteriology, 39, 317-329.
- Kaczmarek W. (1985a), *Occurrence of autochthonous and zymogenous microflora in different soils of the Wielkopolska region. Part I - Interrelation between the soil type and the numbers of autochthonous and zymogenous microorganisms*. Zentralblatt für Mikrobiologie, 140, 263-270.
- Kaczmarek W. (1985b), *Occurrence of autochthonous and zymogenous microflora in different soils of the Wielkopolska region. Part II - Soil type and quantitative relations between autochthonous and zymogenous microorganisms*. Zentralblatt für Mikrobiologie, 140, 271-276.
- Karl D.M. (1986), *Determination of in situ microbial biomass, viability, metabolism, and growth*. In: Bacteria in Nature, Vol. 2 (J.S. Poindexter and E.R. Leadbetter, Eds.), Plenum Press, New York, pp. 85-176.
- Kaszubiak H., Muszynska M. (1992), *The occurrence of obligatory oligotrophic bacteria in the soil*. Zentralblatt für Mikrobiologie, 147, 143-149.
- Kell D.B., Kaprelyants A.S., Weichart D.H., Harwood C.R., Barer M.R. (1998), *Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues*. Antonie Van Leeuwenhoek, 73, 169-187.
- Olsen R.A., Bakken L.R. (1987), *Viability of soil bacteria: optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups*. Microbial Ecology, 13, 59-74.

Luigi Allievi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e
Microbiologiche
Sezione Microbiologia Agraria, Alimentare, Ecologica
Università degli Studi di Milano
Via Celoria, 2
20133 Milano

1^a ed. 2002

Coordinatori dei metodi:
Picci G., Nannipieri P.

Direttore della collana:
Paolo Sequi

2. Procedimento generale per le conte per via colturale

di Luigi Allievi

2.1. Introduzione

Le conte indirette, come già accennato, possono essere effettuate utilizzando terreni colturali agarizzati (normalmente in piastra) oppure liquidi. Il conteggio del numero di colonie cresciute in piastra permette una determinazione più precisa, quindi, se possibile, è da preferirsi. In vari casi, quali ad esempio per i nitrificanti, la crescita in piastra e la sua rilevazione sono problematiche e per tali motivi è necessario, o almeno consigliabile, il ricorso a terreni colturali liquidi, in cui non possono essere contate delle colonie. In tal caso la rilevazione, attraverso il metodo del MPN (Most Probable Number = numero più probabile), è solo una stima di tipo probabilistico, più imprecisa, della carica (Cochran, 1950).

L'intera procedura d'analisi può essere in ogni caso scomposta in varie fasi:

- allestimento delle diluizioni successive del campione di suolo;
- semina nel terreno colturale;
- incubazione delle colture;
- rilevazione del risultato.

La prima fase comporta la stessa procedura, indipendentemente dal tipo di terreno colturale (liquido o agarizzato). Il terreno colturale, le condizioni di incubazione e la rilevazione del risultato sono generalmente diverse secondo il gruppo microbico.

Se nella manipolazione del campione di suolo le precauzioni contro contaminazioni microbiche possono essere attenuate, in tutto il lavoro di analisi esse devono essere invece rigorose poiché l'influenza negativa della contaminazione ambientale può rivelarsi in questo caso determinante per la buona riuscita del metodo. Tutti gli strumenti ed i materiali impiegati devono essere quindi rigorosamente sterilizzati e si devono adottare le opportune procedure di lavoro per evitare contaminazioni, fino alla rilevazione dei risultati.

2.2. Materiali ed apparecchiature

- Bilancia tecnica;
- frigoriferostato regolabile almeno tra -5°C e $+70^{\circ}\text{C}$;
- tritatore a lame rotanti, oppure mortaio con pestello o altro apparato per l'omogenizzazione e dispersione del suolo a livello della prima diluizione decimale;
- girare per incubazione anaerobica: sono disponibili in commercio, assieme ai generatori di anaerobiosi al sodio boridruro (che richiedono un catalizzatore al palladio) o alla polvere di ferro ed agli indicatori di anaerobiosi al Blu di Metilene;
- provette o beute vuote per l'allestimento delle diluizioni decimali. Calcolare il volume di ogni diluizione necessario per l'inoculo del o dei terreni colturali; stabilire di conseguenza con quali volumi ottenere le diluizioni 1:10 (vedere successivo 2.3.) tenendo presente che una diluizione decimale può essere ottenuta non solo aggiungendo 9 mL di soluzione disperdente ad 1 mL del materiale, ma anche aggiungendo 18 mL a 2 mL, 27 a 3, ecc. Per volumi di 9 o 18 mL si possono usare provette, per quantità maggiori conviene impiegare delle beute, che tra l'altro permettono un più facile ed efficace rimescolamento del materiale. Per avere una precisione ottimale, la soluzione per effettuare le diluizioni va posta negli appositi recipienti non troppo tempo prima dell'analisi, per evitare diminuzione di volume per evaporazione. Vanno perciò preparati e sterilizzati da un lato i recipienti vuoti e dall'altro la soluzione salina prevista, che verrà trasferita sterilmente mediante pipetta;
- pipette graduate di appropriate dimensioni, per il trasferimento di soluzioni o sospensioni acquose. Per

curare la precisione della procedura d'analisi, ogni trasferimento va fatto, nei limiti del possibile, con un'unica pipettata e riempiendo il più possibile la pipetta: ad esempio, se si devono trasferire 9 mL si userà una pipetta da 10 mL, non da 25 o 5;

- soluzioni acquose, o acqua distillata, per effettuare le diluizioni decimali; vengono di seguito riportati alcuni esempi di soluzioni adatte allo scopo. Soluzione di pirofosfato: pirofosfato di sodio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) 1 g/L; portare a pH 7 mediante HCl e sterilizzare. Soluzione di Winogradsky diluita 20 volte: in 1 L di acqua distillata, K_2HPO_4 0,25 g; MgSO_4 0,125 g; NaCl 0,125 g; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 2,5 mg; MnSO_4 2,5 mg; portare a pH 7 e sterilizzare a $+121^\circ\text{C}$ per 15 minuti;
- terreni colturali liquidi, in provetta o altro contenitore più adatto secondo i casi;
- terreni colturali agarizzati. Possono essere preparati e stoccati sterili in beuta in quantità sufficiente per varie piastre, oppure in provette contenenti ognuna la quantità prevista per una piastra (generalmente 20 mL per piastre da 9-10 cm). Quest'ultima soluzione comporta un più consistente impiego di vetreria ma miglior precisione e protezione dall'inquinamento durante l'impiego, che risulta inoltre facilitato. Con lo stoccaggio si può verificare una diminuzione di volume per evaporazione: se necessario (indicativamente se il calo è maggiore del 10%) si può ripristinare il volume iniziale con acqua distillata sterile prima di sciogliere il terreno colturale;
- piastre Petri, normalmente da 9-10 cm, per la semina dei terreni colturali agarizzati;
- etichette adesive o pennarelli indelebili, per siglare piastre e provette.

2.3. Diluizioni successive del campione

Le cariche microbiche in molti substrati, quali il suolo, possono essere molto elevate. Se si ponesse una quantità anche molto ridotta del suolo direttamente nel terreno colturale, il numero di microrganismi sarebbe in ogni caso troppo elevato per poter, ad esempio, avere un numero di colonie contabili. Si ricorre perciò ad un espediente: si pongono in terreno colturale aliquote non solo del campione in esame tal quale ma anche dello stesso sempre più diluito in apposito liquido. Esclusivamente per comodità di calcolo si realizzano diluizioni decimali (1:10).

Si possono ottenere una serie di sospensioni-diluizioni del campione di suolo ponendo ad esempio 1 g di suolo in 9 mL di liquido diluente (diluizione 1:10 o 10^{-1}), rimescolando, prelevando 1 mL e ponendolo a sua volta in altri 9 mL di liquido (diluizione 1:100 o 10^{-2}) e così via. La prima diluizione dovrebbe in realtà essere ottenuta portando col diluente al volume prefissato (p. es. 10) la quantità pesata di campione di suolo (p. es. 1 g), in quanto il suolo (fase solida) non ha peso specifico 1; nel contesto dell'intera analisi l'imprecisione è tuttavia da considerarsi normalmente trascurabile.

La prima diluizione viene realizzata prelevando suolo dal campione previamente setacciato e rimescolato per evitare disomogeneità grossolane. In questa fase è essenziale che le cellule microbiche si separino fra loro ed anche da particelle d'altro tipo per limitare il più possibile sottostime della carica. Tale disgregazione a livello della prima sospensione-diluizione può essere favorita sia da azioni meccaniche che utilizzando particolari diluenti. Diffusa è la triturazione in mortaio seguita da agitazione, ma vengono seguite anche procedure quali l'impiego di rimescolatori meccanici, la sonicazione a determinati livelli, la sola agitazione manuale, ecc. È stata riscontrata l'efficacia nettamente maggiore dell'impiego di trituratori a lame rotanti (p. es., l'Omni-Mixer della Sorvall/Du Pont o i Waring Blenders), dal funzionamento simile ai "frullini" domestici, che accoppiano la triturazione ad un vigoroso rimescolamento, rispetto alla triturazione in mortaio (Allievi & Möller, 1992).

L'impiego di soluzioni di cationi monovalenti favorisce la dissociazione dei colloidali. Si può impiegare il sodio pirofosfato in soluzione acquosa, che tuttavia alla lunga risulta lievemente lesivo per alcune cellule microbiche. Dal punto di vista della salvaguardia della vitalità cellulare, altrettanto importante dell'effetto disgregante, un diluente efficace risulta essere la soluzione di Winogradsky, anche diluita, migliore dell'acqua distillata o di altre soluzioni saline quali quella di Ringer (Jensen, 1962; Olsen & Bakken, 1987).

In base alle considerazioni esposte, consigliamo la seguente procedura, anche se non si può escludere secondo i casi la validità di procedimenti alternativi:

- pesare 10 g del campione di suolo umido ed aggiungere 90 mL di soluzione di pirofosfato; volendo essere rigorosi si può valutare il peso specifico del suolo e stabilire di conseguenza il volume esatto di soluzione da aggiungere per arrivare a 100 mL;
- trattare per pochi minuti in un trituratore a lame rotanti;
- allestire le sospensioni-diluizioni 1:10 successive alla prima in soluzione di Winogradsky diluita;
- in ogni caso è importante standardizzare rigorosamente tutta la procedura d'analisi, specie se si devono

effettuare confronti fra vari campioni: differenze di procedura apparentemente trascurabili possono provocare insospettite differenze di risultato.

Per il trasferimento di liquidi vanno impiegate pipette graduate di opportuna capacità. Ogni pipetta può essere impiegata per pipettare, anche più volte, la stessa sospensione o soluzione e non può più essere impiegata per le altre. Ogni pipetta va "condizionata": quando si inizia ad usarla per una determinata sospensione si deve aspirare ad espellere il liquido almeno tre volte, per saturare le cariche elettrostatiche presenti sulla parete. Ogni sospensione va accuratamente dispersa prima dei prelievi, agitando il contenitore e/o soffiando vigorosamente sul fondo dello stesso con la pipetta per far gorgogliare il liquido. Le sospensioni-diluizioni devono essere allestite ed impiegate nel più breve tempo possibile (poche decine di minuti al massimo).

2.4. Semina in terreno colturale

Per i terreni colturali liquidi la procedura è invariabilmente il pipettaggio di aliquote normalmente unitarie (1 mL) di ogni diluizione in uno o più contenitori (p. es. provette) contenenti il terreno colturale. Per i terreni colturali agarizzati sono invece impiegabili principalmente due procedure:

- semina per inclusione (o diffusione): aliquote generalmente di 1 mL delle sospensioni-diluizioni vengono poste in piastre vuote; il terreno colturale agarizzato viene sciolto a +100°C, raffreddato a +45-50°C e versato nelle piastre; dopo delicato rimescolamento, muovendo la piastra in senso sia rettilineo che rotativo, si lascia solidificare l'agar;
- semina superficiale: il terreno colturale viene sciolto, posto in piastra e lasciato solidificare; aliquote delle diluizioni vengono poi sparse sulla superficie; per favorire il rapido assorbimento, in modo che le cellule microbiche, quando iniziano a dividersi, si trovino immobilizzate sul mezzo solidificato, si possono porre le piastre ad esempio a +37°C per almeno un giorno o a +60°C per circa un'ora prima della semina e seminare su ogni piastra soli 0,1-0,2 mL di una determinata diluizione.

In ogni caso le piastre (da una a tre per ogni diluizione) vanno poi capovolte per evitare ricaduta di condensa (Fig. 1). La semina superficiale dovrebbe garantire una più diretta ossigenazione dei microrganismi aerobi ed evitare ai microrganismi eventuali shock termici; una maggior complessità della procedura tuttavia non sembra portare significativi vantaggi, anche per batteri aerobi obbligati (Jensen, 1962; Hoben & Somasegaran, 1982), per cui proponiamo di riservare la semina superficiale a casi con esigenze particolari.

Per i terreni colturali liquidi (Fig. 2) si seminano normalmente tre o

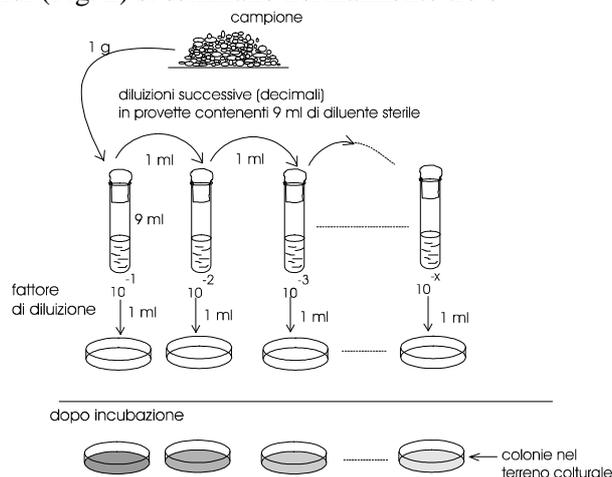


Fig. 1 - Schema di procedura per la conta in piastra

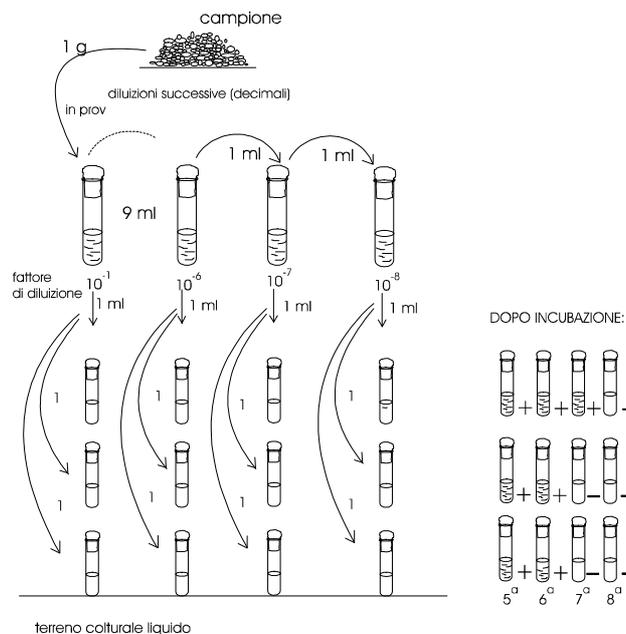


Fig. 2 - Schema di procedura per la determinazione della carica microbica con terreno colturale liquido ed esempio di un possibile risultato.

cinque provette per ogni diluizione. Più piastre o provette si seminano per ogni diluizione, maggiore è la precisione della determinazione finale, per elementari considerazioni di carattere statistico.

2.5. Incubazione

Le condizioni di incubazione (temperatura, tempo, presenza di aria o anaerobiosi, luce o buio) devono essere quelle ottimali per il gruppo microbico ricercato e quindi da esso dipendono. Si rimanda perciò alla trattazione specifica, in quanto non è possibile generalizzare se non per quanto riguarda la temperatura: il valore più opportuno secondo i vari autori risulta essere tra $+20$ e $+30^{\circ}\text{C}$; è preferibile non superare quest'ultimo livello. Particolarmente adatti secondo alcuni sarebbero i $+25^{\circ}\text{C}$, ma differenze di pochi gradi non sono significative (Jensen, 1962). Nei nostri suoli temperati sono evidentemente predominanti i microrganismi mesofili: quelli di origine ambientale hanno un optimum di temperatura attorno ai $+25^{\circ}\text{C}$ (per quelli di origine intestinale sono più adatti i $+36^{\circ}\text{C}$ circa) (Florenzano, 1983). Si consiglia perciò in linea di massima l'adozione dei $+28^{\circ}\text{C}$, già considerati in molti laboratori come valore standard per l'incubazione dei mesofili ambientali.

Nel caso di ambienti o di ricerche particolari, quando l'interesse sia rivolto non ai mesofili ma ad eventuali psicrofili o termofili, si deve tener conto che la temperatura ottimale per la crescita è diversa: circa $+15^{\circ}\text{C}$ per i primi (temperatura che d'altra parte permette la crescita di vari mesofili), circa $+55^{\circ}\text{C}$ per i secondi. Gli psicrofili sono comunque in grado di crescere anche a pochi gradi sopra lo zero (Florenzano, 1983).

Le stesse considerazioni circa condizioni particolari di crescita, valgono quando, in casi particolari, si abbia a che fare con "estremofili" quali gli alofili (che prediligono alta salinità), gli acidofili o alcalofili (riguardo al pH), ecc.

Nel caso di incubazioni prolungate, ed in ogni caso per le piastre, in cui lo spessore del terreno colturale è limitato a pochi millimetri, si deve evitare una sensibile disidratazione che può danneggiare la crescita ottimale e disturbare il conteggio delle colonie: è perciò necessario, una volta sicuri dell'evaporazione di eventuale condensa formatasi sul terreno colturale nelle prime ore di incubazione, incubare in presenza del 100% di umidità, pur dovendo garantire, nel caso degli aerobi, un continuo apporto di ossigeno.

2.6. Rilevamento dei risultati

Le modalità di rilevazione dei risultati di un'analisi per il calcolo della carica sono completamente diverse per i terreni colturali agarizzati rispetto a quelli liquidi. In ogni caso, se si è seminata in ogni piastra o

provetta un'aliquota diversa da 1 mL delle varie diluizioni, si deve correggere di conseguenza il valore di carica rilevato: p. es., se la semina è stata di 0,5 mL, cioè di 1/2 dell'aliquota unitaria, l'MPN o il risultato del conteggio in piastra riferito ad una certa diluizione va moltiplicato per 2.

La carica microbica, con qualunque via sia stata determinata, risulta riferita a grammo per peso umido, essendo il suolo in stato di inumidimento quando viene pesato per allestire la prima diluizione. Nel caso del suolo si usa tuttavia riferire il risultato a grammo di peso secco, per renderlo indipendente dal grado di umidità contingente. Questo è possibile determinando, in parallelo all'analisi, il grado di umidità del suolo, mediante essiccazione in stufa a +105°C per 24 ore.

2.6.1. Conta in piastra

2.6.1.a. Si rileva il numero di colonie cresciute dopo un periodo di incubazione sulle piastre dove le colonie non siano così numerose da sovrapporsi o anche solo così vicine da potersi ostacolare nella crescita. Il numero non deve essere troppo limitato poiché la variabilità statistica sarebbe molto alta (quindi la precisione della conta bassa) ed eccessiva l'influenza di qualche inquinante estraneo cresciuto. Molti manuali di microbiologia prescrivono come valido un numero tra 30 e 300: almeno nel caso di analisi del suolo, tali valori risultano spesso troppo elevati, in relazione anche alle dimensioni di alcune colonie. E' stato inoltre evidenziato il pericolo di competizione nella crescita già con 10-20 colonie/piastra (Olsen & Bakken, 1987). Si consiglia perciò di assumere come validi un numero di colonie attorno alla decina e non andare comunque oltre le poche decine per piastra. In ogni caso, il pericolo di sottovalutazione delle cariche può essere individuato confrontando piastre di diluizioni diverse (quello di eccessiva imprecisione di piccoli numeri, paragonando le varie piastre ottenute da una stessa sospensione-diluizione). Per verificare la buona esecuzione dell'analisi, controllare sempre la sufficiente omogeneità dei conteggi sulle diverse piastre della stessa diluizione, eventualmente per via statistica (Cavalli-Sforza, 1966) e confrontare le conte relative alle diverse diluizioni 1:10.

2.6.1.b. Una volta individuate le piastre da considerare, appartenenti ad una o più diluizioni, la formula più generale per calcolare correttamente la carica è:

$$\text{carica batterica} = \frac{\sum C}{\sum n \cdot z}$$

dove: C = numero di colonie contate sulle varie piastre considerate, indipendentemente dalla diluizione, z = fattore di diluizione (=10^{-x}) ed n = numero di piastre di ognuna delle diluizioni (Cavalli-Sforza, 1966). Per esempio, se si è deciso di calcolare la carica basandosi su due piastre della 10⁻⁶ e tre con 10⁻⁷, il denominatore sarà: 2 x 10⁻⁶ + 3 x 10⁻⁷. Nel caso si consideri una sola diluizione, l'applicazione della formula si risolve nel semplice calcolo della media aritmetica delle conte, da rapportare al fattore di diluizione.

2.6.2. Conteggio in terreni colturali liquidi (MPN)

2.6.2.a. La procedura è in questo caso più complessa. Si dovrà anzitutto rilevare, su ognuna delle provette inoculate con ognuna delle sospensioni-diluizioni di suolo, se si è verificata o no crescita dei microrganismi ricercati. Il criterio per assegnare tale positività o negatività di crescita varia secondo il gruppo ricercato e il terreno colturale (ved. capitoli specifici).

2.6.2.b. Si registra il risultato dell'analisi sotto forma di tabella inserendo i segni + e -. Per stimare la carica microbica si ricorre alla tecnica del MPN: si individua un codice numerico ("numero caratteristico"), che corrisponde biunivocamente alla tabella di positività e negatività, ed in base a tale codice una apposita tabella del MPN o di McCrady, diversa secondo il n° repliche/diluizione (Tabb. 1 e 2), fornisce la stima della carica riferita ad una determinata diluizione. Dividendo il dato per il fattore di diluizione (10^{-x}) si ottiene la carica (MPN) per grammo di suolo.

2.6.2.c. La procedura dettagliata è la seguente:

- individuare la diluizione più spinta per la quale tutte le repliche sono risultate + (nell'esempio in Fig. 2, la 10⁻⁶): questa è la diluizione di riferimento; nel caso che alla prima diluizione inocolata corrispondano già delle negatività, si adotta tale diluizione come riferimento;

- se ad una sola diluizione corrispondono provette sia + che -, ai fini del calcolo si considerano la diluizione di riferimento (tutta +) e le due successive; il numero caratteristico è formato dal numero di positività in queste tre diluizioni; la tabella del MPN in corrispondenza al numero caratteristico fornirà un numero di microrganismi, che andrà diviso per il fattore di diluizione corrispondente alla diluizione di riferimento per ottenere la carica (nel caso dell'esempio, in base alla tabella per 3 provette/diluizione la carica risulta: $4,5/10^{-6} = 4,5 \times 10^6/g$);
- se due diluizioni successive hanno ognuna provette sia + che -, si determina dapprima la carica in base alle tre diluizioni in cui è compresa l'ultima diluizione tutta +, con la procedura del punto precedente; si determina poi un secondo MPN, considerando le tre diluizioni, che differiscono dalle precedenti per un fattore di diluizione, in cui è compresa la prima diluizione tutta-; la carica ricercata è la media logaritmica di questi due MPN (generalmente tuttavia questi risultano coincidere e la procedura risulta così semplificata);
- se più di due diluizioni hanno + e - si devono sospettare inconvenienti o errori nell'esecuzione dell'analisi, che, se possibile, deve essere ripetuta; l'MPN non è comunemente calcolabile.

| Numero caratteristico | Numero di microrganismi | Numero caratteristico | Numero di microrganismi | Numero caratteristico | Numero di microrganismi |
|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 000 | 0,0 | 201 | 1,4 | 302 | 6,5 |
| 001 | 0,3 | 202 | 2,0 | 310 | 4,5 |
| 010 | 0,3 | 210 | 1,5 | 311 | 7,5 |
| 011 | 0,6 | 211 | 2,0 | 312 | 11,5 |
| 020 | 0,6 | 212 | 3,0 | 313 | 16,0 |
| 100 | 0,4 | 220 | 2,0 | 320 | 9,5 |
| 101 | 0,7 | 221 | 3,0 | 321 | 15,0 |
| 102 | 1,1 | 222 | 3,5 | 322 | 20,0 |
| 110 | 0,7 | 223 | 4,0 | 323 | 30,0 |
| 111 | 1,1 | 230 | 3,0 | 330 | 25,0 |
| 120 | 1,1 | 231 | 3,5 | 331 | 45,0 |
| 121 | 1,5 | 232 | 4,0 | 332 | 110,0 |
| 130 | 1,6 | 300 | 2,5 | 333 | 140,0 |
| 200 | 0,9 | 301 | 4,0 | | |

Tab. 1 - Tabella per la determinazione del MPN con 3 provette/diluizione. Il n° di microrganismi si riferisce ad 1 mL della diluizione di riferimento.

| Numero caratteristico | Numero di microrganismi |
|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 000 | 0,0 | 203 | 1,2 | 400 | 1,3 | 513 | 8,5 |
| 001 | 0,2 | 210 | 0,7 | 401 | 1,7 | 520 | 5,0 |
| 002 | 0,4 | 211 | 0,9 | 402 | 2,0 | 521 | 7,0 |
| 010 | 0,2 | 212 | 1,2 | 403 | 2,5 | 522 | 9,5 |
| 011 | 0,4 | 220 | 0,9 | 410 | 1,7 | 523 | 12,0 |
| 012 | 0,6 | 221 | 1,2 | 411 | 2,0 | 524 | 15,0 |
| 020 | 0,4 | 222 | 1,4 | 412 | 2,5 | 525 | 17,5 |
| 021 | 0,6 | 230 | 1,2 | 420 | 2,0 | 530 | 8,0 |
| 030 | 0,6 | 231 | 1,4 | 421 | 2,5 | 531 | 11,0 |
| 100 | 0,2 | 240 | 1,4 | 422 | 3,0 | 532 | 14,0 |
| 101 | 0,4 | 300 | 0,8 | 430 | 2,5 | 533 | 17,5 |
| 102 | 0,6 | 301 | 1,1 | 431 | 3,0 | 534 | 20,0 |
| 103 | 0,8 | 302 | 1,4 | 432 | 4,0 | 535 | 25,0 |
| 110 | 0,4 | 310 | 1,1 | 440 | 3,5 | 540 | 13,0 |
| 111 | 0,6 | 311 | 1,4 | 441 | 4,0 | 541 | 17,0 |
| 112 | 0,8 | 312 | 1,7 | 450 | 4,0 | 542 | 25,0 |
| 120 | 0,6 | 313 | 2,0 | 451 | 5,0 | 543 | 30,0 |
| 121 | 0,8 | 320 | 1,4 | 500 | 2,5 | 544 | 35,0 |
| 122 | 1,0 | 321 | 1,7 | 501 | 3,0 | 545 | 45,0 |
| 130 | 0,8 | 322 | 2,0 | 502 | 4,0 | 550 | 25,0 |

| | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| 131 | 1,0 | 330 | 1,7 | 503 | 6,0 | 551 | 35,0 |
| 140 | 1,1 | 331 | 2,0 | 504 | 7,5 | 552 | 60,0 |
| 200 | 0,5 | 340 | 2,0 | 510 | 3,5 | 553 | 90,0 |
| 201 | 0,7 | 341 | 2,5 | 511 | 4,5 | 554 | 160,0 |
| 202 | 0,9 | 350 | 2,5 | 512 | 6,0 | 555 | 180,0 |

*Tab. 2 - Tabella per la determinazione del MPN con 5 provette/diluizione.
Il numero di microrganismi si riferisce ad 1 mL della diluizione di riferimento.*

2.6.2.d. Un caso particolare di impiego dell'MPN è quello del conteggio dei rizobi mediante test di inoculazione di piante sensibili, per il quale si rimanda al capitolo specifico.

2.7. Elaborazione statistica dei risultati

Ogni determinazione sperimentale non è altro che una stima del vero valore del parametro studiato, più o meno approssimata secondo il grado di precisione permesso dalla metodica utilizzata; essa è affetta in ogni caso da una ineliminabile variabilità statistica. Quando si effettuano delle determinazioni per confrontarne i risultati è indispensabile tener conto di questo; in altre parole ci si deve sempre chiedere: la differenza che è stata rilevata riflette una differenza reale o potrebbe essere dovuta solo alla variabilità casuale? E' necessario quindi giudicare alla luce della precisione della determinazione la differenza ottenuta sperimentalmente.

Se si analizza più volte ogni campione da confrontare con altri (p. es. un suolo trattato rispetto allo stesso non trattato) la variabilità statistica su cui basare il giudizio è calcolabile dai dati ottenuti ed esprimibile con parametri statistici quali deviazione standard, intervallo di confidenza, ecc. In tal caso si possono applicare, per il confronto, delle appropriate e sensibili tecniche statistiche quali l'analisi della varianza, per le quali si rimanda ai numerosi manuali di statistica.

Se si dispone di una sola determinazione per ogni campione, il confronto è più problematico perché non si può stimare dai propri dati sperimentali la variabilità casuale effettiva. Gli statistici tuttavia, in base all'esame delle metodiche sperimentali, hanno fornito delle procedure di calcolo della variabilità associabile ad una singola determinazione, ad esempio sotto forma di intervallo di confidenza (p. es., Cochran 1950 per l'MPN, Cavalli-Sforza 1966 per la conta in piastra). Il criterio per affermare che esiste una effettiva differenza può essere in tal caso di verificare la non sovrapposizione degli intervalli di confidenza dei due valori sperimentali ottenuti.

Tale valutazione su base teorica tuttavia non può normalmente tener conto di tutte le fonti di variabilità realmente in gioco (variabilità di campionamento, effetto combinato delle inevitabili imprecisioni nelle manipolazioni durante l'analisi, ecc.), che risultano viceversa stimabili nel caso che si disponga dei risultati di più repliche d'analisi. La variabilità reale rischia perciò di essere sottostimata ed il giudizio sull'effettivo significato delle differenze riscontrate risulta discutibile. Come criterio indicativo di riferimento, ed in base a calcoli statistici su dati di carica dell'ordine di milioni ottenuti nell'ambito della nostra esperienza pratica, si consiglia comunque di considerare come effettivamente differenti solo singole determinazioni che stiano fra loro in rapporto di almeno 2 o 3:1 se derivanti da conte in piastra, almeno 10 o 15:1 se sono MPN da quintupla o tripla serie di provette (Cavatorta et al., 1968).

Posizione Italiana

Metodo Ufficiale n° II.1
Supplemento Ordinario G.U. n. 179
dell'1.08.2002

Posizione Internazionale

Assente

2.8. Bibliografia

- Allievi L., Möller F. (1992), *A method based on plate count for enumerating N₂O/N₂-producing bacteria from nitrate in the soil*. Journal of Basic Microbiology, 32, 291-298.
- Cavalli-Sforza L. (1966), *Analisi Statistica per Medici e Biologi*. Boringhieri, Torino.
- Cavatorta L., Pasqualucci C.R., Setnikar I. (1968), *L'errore analitico*. Bollettino Chimico-Farmaceutico, 107, 218-228.
- Cochran W.G. (1950), *Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number"*. Biometrics, 6, 105-116.
- Florenzano G. (1983), *Fondamenti di Microbiologia del Terreno*. REDA, Roma.
- Hoben H.J., Somasegaran P. (1982), *Comparison of pour, spread, and drop plate methods for enumeration of Rhizobium spp. in inoculants made from pre-sterilized peat*. Applied and Environmental Microbiology, 44, 1246-1247.
- Jensen V. (1962), *Studies on the microflora of Danish beech forest soils. I-The dilution plate count technique for the enumeration of bacteria and fungi in soil*. Zentralblatt für Bakteriologie - II Abteilung, 116, 13-32.
- Olsen R.A., Bakken L.R. (1987), *Viability of soil bacteria: optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups*. Microbial Ecology, 13, 59-74.

Luigi Allievi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e
Microbiologiche
Sezione Microbiologia Agraria, Alimentare, Ecologica
Università degli Studi di Milano
Via Celoria, 2
20133 Milano

1^a ed. 2002

Coordinatori dei metodi:
Picci G., Nannipieri P.

Direttore della collana:
Paolo Sequi

3. Gruppi generici di microrganismi

di Luigi Allievi e Sergio Quaroni

3.1. Introduzione

Il presente capitolo tratta della determinazione per via colturale delle cariche dei due gruppi di microrganismi preponderanti come entità di popolazione nel suolo, cioè i batteri e gli eumiceti intesi come funghi filamentosi (o muffe, per usare un termine del linguaggio comune) e lieviti (Metting, 1993). Un terzo gruppo generico che molte volte viene considerato separatamente, quello degli attinomiceti in senso lato, è in realtà da considerare un sottogruppo dei batteri o schizomiceti (Autori vari, 1989). Come già accennato, date le diversificate caratteristiche fisiologiche dei microrganismi non si possono con metodi semplici effettuare conte totali più generali di quelle dei seguenti gruppi:

- batteri aerobi (batteri eterotrofi aerobi obbligati + batt. eter. anaerobi facoltativi);
- batteri anaerobi (batt. eter. anaerobi facoltativi + batt. eter. anaerobi obbligati);
- eumiceti (muffe e lieviti, eventualmente poi diversificati in base all'aspetto della colonia).

Il proposito di ottenere la crescita di tutti gli appartenenti ad un gruppo microbico su di un unico terreno colturale, per quanto accuratamente elaborato, può tuttavia escludere forme troppo specializzate fisiologicamente, ma soprattutto la modalità di crescita che si usa definire saprofitica esclude le forme obbligatoriamente parassite/predatrici (p. es. il batterio *Bdellovibrio*) o simbiotici. Per taluni di questi batteri o eumiceti si rimanda ai capitoli successivi.

I tre gruppi sopra citati (ed anche gli attinomiceti) possono essere conteggiati in piastra. Impiegando terreni colturali per batteri, incubando in aerobiosi (cioè in presenza d'aria) si conteggiano i "batteri aerobi", in anaerobiosi i "batteri anaerobi". In ogni caso nel suolo risultano dominanti gli aerobi sugli anaerobi, anche negli strati profondi (p. es.: Grant & Long, 1981; Allievi & Möller, 1992). Ricerche confermate anche in anni recenti indicano come normalmente i terreni colturali ottimali per i batteri del suolo siano quelli a base di estratto di suolo, adeguatamente povero di nutrienti (da un punto di vista quantitativo) per popolazioni microbiche più o meno spiccatamente "oligotrofe" (Olsen & Bakken, 1987). L'impiego di antifungini nelle conte di batteri del suolo è, secondo la nostra esperienza, non indispensabile.

Per quanto riguarda gli eumiceti filamentosi, cioè le muffe, occorre precisare che il loro "conteggio" perde pressoché completamente il consueto significato di "numero di cellule per grammo di suolo", data la particolare morfologia cellulare (Standard Methods APHA, 1992): si potrebbe addirittura ritenere che il numero ottenuto con la conta in piastra sia proporzionale più alla biomassa fungina che ad una vera carica microbica.

3.2. Batteri aerobi ed anaerobi

3.2.1. Terreno colturale

3.2.1.a. Estratto di suolo: si sceglie un suolo incolto o di giardino dal pH neutro, in buono stato e non trattato con sostanze estranee, quindi si addiziona acqua non inquinata o trattata con disinfettanti in rapporto 1:1 in peso; si tratta in autoclave a +130°C per 1 ora senza lasciare il miscuglio ad alta temperatura oltre il tempo necessario (Pochon & Tardieux, 1962). Si effettua dapprima una filtrazione su strato di cotone idrofilo, ripassando almeno una volta il primo filtrato sullo strato di suolo depositato sul cotone, poi si centrifuga a velocità sufficiente (p. es. 5000 rpm g per 20 minuti) per ottenere completa chiarificazione del filtrato.

3.2.1.b. Preparazione del terreno colturale: in 1 litro di estratto di suolo si sciolgono 1 g di D-glucosio, 1 g di estratto di lievito e 15 g di agar (Allievi & Möller, 1992), quindi si porta il valore del pH a 7,5 circa e si sterilizza a +121°C per 15 minuti; con la sterilizzazione il pH diminuisce.

3.2.2. Procedura consigliata

3.2.2.a. Sia per i batteri aerobi che per i batteri anaerobi, si seminano in piastra per inclusione aliquote di 1 mL delle diluizioni successive 1:10 del campione, normalmente dalla 10^{-4} alla 10^{-9} per gli aerobi e dalla 10^{-3} alla 10^{-8} per gli anaerobi, impiegando il terreno colturale all'estratto di suolo.

3.2.2.b. Incubare le piastre a +28°C capovolte, fino al raggiungimento del massimo numero di colonie cresciute. Se non è possibile prevedere periodiche rilevazioni, standardizzare il tempo di incubazione a 15-30 giorni. Per il totale anaerobi è necessario incubare in anaerobiosi rigorosa per evitare la crescita di aerobi microaerofili.

3.3. Attinomiceti

3.3.1. Preparazione del campione

3.3.1.a. Il campione di suolo fresco destinato alla conta degli attinomiceti (1 o 10 g da sospendere rispettivamente in 9 o 90 mL di acqua distillata sterile) deve essere essiccato a temperatura ambiente sino al raggiungimento del peso costante all'interno di un recipiente protetto con una garza in luogo areato e ombroso. Questo semplice trattamento riduce già in modo consistente la vitalità dei batteri unicellulari.

3.3.1.b. Un maggior abbattimento della componente batterica tradizionale può essere conseguito mediante trattamento termico del campione che può essere blando (1 ora a +55-58°C) o estremamente drastico (1 ora a +120°C a secco) quando sono ricercate particolari forme di questi organismi (Nonomura & Hayakawa, 1988).

3.3.2. Substrati di isolamento preferenziali

3.3.2.a. Terreno Agar Amido Caseina: amido solubile 10 g, caseina 0,30 g, KNO_3 2 g, NaCl 2 g, K_2HPO_4 2 g, MgSO_4 0,05 g, CaCO_3 0,02 g, FeSO_4 0,01 g, bacto-agar 18 g, 1 L di acqua distillata. Per il contenimento delle forme fungine vengono addizionati al substrato, già sterilizzato e prima della piastratura, nistatina e actidione alla dose di 50 ppm ciascuno. Soluzioni concentrate dei due antibiotici devono perciò essere previamente sterilizzate mediante filtrazione amicrobica con apposito filtro dalla porosità di 0,2 micron (Kuster & Williams, 1964).

3.3.2.b. Terreno Agar Chitina: per la preparazione di questo substrato 5 g di chitina vengono posti in 50 mL di HCl concentrato, agitati per 30 minuti e versati lentamente in 250 mL di acqua di rubinetto a +5°C. Quindi si filtra su carta Whatman n° 1 e si lava con acqua il residuo. La chitina recuperata sul filtro viene posta in 250 mL di acqua di rubinetto e ben agitata. Si procede quindi ad una ulteriore filtrazione. Questa operazione deve essere ripetuta più volte, sino a che il pH dell'acqua di lavaggio non raggiunge valori compresi tra 3,5 e 4. L'ultimo lavaggio è effettuato attraverso un setaccio con maglie di 0,5 mm. Si porta il filtrato a 1 L con acqua di rubinetto ed il pH viene corretto a 7. Si addizionano 12 g di bacto-agar e si sterilizza normalmente in autoclave. Prima della piastratura vengono addizionati gli antibiotici sopracitati con le stesse modalità.

3.3.2.c. Terreno Agar Acqua: si prepara fondendo 25-30 g di bacto-agar in un litro di acqua distillata e aggiungendo actidione e nistatina come nei substrati precedenti.

3.3.2.d. In condizioni operative normali il pH dei substrati deve essere neutro. L'impiego di substrati con pH molto acido (4,5-5) o molto alcalino (8,5-9) è previsto nella ricerca delle forme acidofile o alcalofile di questi organismi.

3.3.3. Preparazione e inoculo delle piastre

3.3.3.a. La ricerca degli attinomiceti è condotta generalmente alle diluizioni 10^{-4} - 10^{-7} del campione, ponendo l'aliquota delle relative diluizioni (0,1-0,2 mL) sulla superficie agarizzata della piastra e distribuendola uniformemente mediante una spatolina di vetro sterile. Al fine di contenere lo sviluppo dei batteri unicellulari è vantaggioso operare con la superficie agarizzata delle piastre asciutta. Pertanto le piastre Petri devono essere allestite almeno 24 ore prima dell'analisi e lasciate a temperatura ambiente sotto cappa a flusso laminare oppure si deve asciugarne la superficie ponendole in stufa a $+45$ - 50°C per alcune ore.

3.3.3.b. Sempre allo scopo di limitare lo sviluppo di batteri non desiderati, risulta utile un trattamento termico delle piastre ($+110^{\circ}\text{C}$ per 10 minuti) subito dopo la distribuzione delle sospensioni sulla superficie agarizzata (Agate & Bhat, 1963). Le piastre vanno poi incubate in termostato a $+26$ - 28°C ponendole capovolte per evitare la caduta di gocce di condensa dal coperchio sulle colonie.

3.3.4. Conteggio delle colonie

3.3.4.a. Le colonie degli attinomiceti sono tondeggianti, di diametro ridotto (2-5 mm) con aspetto polverulento e intensa e varia colorazione del micelio sia aereo che vegetativo, spesso associata alla produzione di pigmenti solubili. All'osservazione in trasparenza il margine della colonia risulta normalmente sfumato.

3.3.4.b. Il conteggio delle colonie degli attinomiceti va eseguito due volte. La prima dopo 7 giorni di incubazione, segnando sul retro delle piastre le colonie presenti alla diluizione del campione a cui la lettura risulta ottimale (da 20 a 100 colonie per piastra). La seconda, possibilmente dopo 14 giorni di incubazione, allo scopo di individuare la presenza di eventuali colonie a crescita più lenta. Al numero delle Unità Formanti Colonie per grammo di campione (UFC/g) si risale applicando la procedura già descritta.

3.4. Funghi filamentosi e lieviti

3.4.1. Terreno colturale

3.4.1.a. Impiegare l'Agar Malto (disponibile anche già pronto in commercio): estratto di malto in polvere 30 g, agar 20 g, acqua distillata 1000 mL; regolare il pH a 5,4; sterilizzare a $+121^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti.

3.4.1.b. Se si usa cloramfenicolo come antibatterico, addizionarlo alla concentrazione di 100 mg/L al terreno colturale prima della sterilizzazione. Se si usa un prodotto sensibile al calore, va sterilizzato per filtrazione amicrobica e aggiunto in piastra prima di colare 15 mL di terreno di coltura agarizzato e raffreddato a circa $+50^{\circ}\text{C}$. Ad esempio, preparare una soluzione di clorotetraciclina in acqua distillata in rapporto di 3 mg di antibiotico per 1 mL H_2O , filtrare con apposito filtro con porosità di 0,2 micron e pipettare in ogni piastra 0,5 mL della soluzione sterile.

3.4.1.c. È da notare che per il conteggio degli eumiceti è diffusamente impiegato, perlomeno in ambiente medico, il Sabouraud Agar. In campo ambientale tuttavia esso non risulta fornire conte maggiori rispetto all'Agar Malto, che d'altra parte permette una migliore evidenziazione della morfologia eumicetica.

3.4.2. Procedura consigliata

3.4.2.a. Seminare in piastra per inclusione aliquote di 1 mL delle diluizioni successive 1:10 del campione, normalmente dalla 10^{-3} alla 10^{-7} , impiegando Agar Malto.

3.4.2.b. Incubare le piastre a $+28^{\circ}\text{C}$ capovolte. Effettuare un conteggio preliminare dopo 3 giorni, segnando sulla piastra con pennarello indelebile la posizione delle colonie, per invasività di alcune forme. Il conteggio definitivo va previsto ad una settimana d'incubazione, tempo normalmente sufficiente.

3.4.2.c. Se sono individuabili colonie che ricordano i lieviti (colonie simili alle batteriche, mucose se in superficie) se ne può effettuare una conta separata. E' comunque consigliabile qualche controllo microscopico per avere la sicurezza di avere a che fare effettivamente con lieviti: la loro cellula è tipicamente ovoidale, più o meno allungata, di dimensioni (decine di micron) nettamente maggiori di quella dei batteri e spesso mostra la tipica divisione per gemmazione (la cellula figlia che si forma e poi separa è di dimensioni minori di quella da cui origina). Esistono tuttavia anche delle forme fungine, definite comunemente "pseudolieviti", dalla morfologia intermedia fra i lieviti e la forma miceliare, dipendente anche dalle condizioni colturali.

Posizione Italiana

Metodo Ufficiale n° II.2
Supplemento Ordinario G.U. n. 179
dell'1.08.2002

Posizione Internazionale

Assente

3.5. Bibliografia

- Agate A.D., Bhat J.V. (1963), *A method for the preferential isolation of actinomycetes from soil*. Antonie van Leeuwenhoek, 29, 297-303.
- Allievi L., Möller F. (1992), *A method based on plate count for enumerating N₂O/N₂-producing bacteria from nitrate in the soil*. Journal of Basic Microbiology, 32, 291-298.
- Autori vari (1989), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 4 (S.T. Williams, M.E. Sharpe and J.G. Hold, Eds.). The William and Wilkins Co., Baltimore, MD, USA.
- Grant W.D., Long P.E. (1981), *Environmental Microbiology*. Blackie, Glasgow.
- Kuster E., Williams S.T. (1964), *Selection of media for isolation of streptomycetes*. Nature, 202, 928-929.
- Metting F.B. (1993), *Structure and physiological ecology of soil microbial communities*. In: Soil Microbial Ecology (F. B. Metting, Ed.), M. Dekker Inc., New York, pp. 3-26.
- Nonomura H., Hayakawa M. (1988), *New method for the selective isolation of soil actinomycetes*. In: Biology of Actinomycetes '88 (Y. Okami, T. Beppu and H. Ogawara, Eds.), Japan Scientific Press, pp. 288-293.
- Olsen R.A., Bakken L.R. (1987), *Viability of soil bacteria: optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups*. Microbial Ecology, 13, 59-74.
- Pochon J., Tardieux P. (1962), *Techniques d'Analyse en Microbiologie du Sol*. Editions De La Tourelle, St.Mandé, France.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th edn. (1992), American Public Health Association, Washington, pp. 9-118.

Luigi Allievi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche
Sezione Microbiologia Agraria, Alimentare, Ecologica
Università degli Studi di Milano
Via Celoria, 2
20133 Milano

1^a ed. 2002
Coordinatore dei metodi:
Picci G., Nannipieri P.

Direttore della collana:
Paolo Sequi

Sergio Quaroni

Istituto di Patologia Vegetale
Università degli Studi di Milano
Via Celoria, 2
20133 Milano

III. Gruppi fisiologici di microrganismi

| | | |
|---|---|----|
| 1. Gruppi fisiologici di microrganismi | « | 46 |
| 1.1. <i>Introduzione</i> | « | 46 |
| 1.2. <i>Bibliografia</i> | « | 47 |
| 2. Microrganismi del ciclo dell'azoto Batteri azotofissatori liberi aerobi ed anaerobi | « | 48 |
| 2.1. <i>Introduzione</i> | « | 49 |
| 2.1.1. Terreno colturale di Brown (Thompson, 1989) | « | 49 |
| 2.1.2. Terreno colturale secondo Augier (1957) | « | 49 |
| 2.1.3. Soluzione di oligoelementi (Pochon & Tardieux, 1962) | « | 49 |
| 2.1.4. Soluzione di Winogradsky (Pochon & Tardieux, 1962) | « | 49 |
| 2.1.5. Procedura consigliata per gli N-fissatori aerobi (<i>Azotobacter</i>) | « | 49 |
| 2.1.6. Procedura consigliata per gli N-fissatori anaerobi (<i>Clostridium</i>) | « | 50 |
| 2.2. <i>Bibliografia</i> | « | 51 |
| 3. Batteri in associazioni diazotrofe (<i>Azospirillum</i>) | « | 52 |
| 3.1. <i>Introduzione</i> | « | 52 |
| 3.2. <i>Materiali ed apparecchiature</i> | « | 52 |
| 3.3. <i>Procedura consigliata</i> | « | 53 |
| 3.3.1. Isolamento | « | 53 |
| 3.3.2. Quantificazione | « | 53 |
| 3.3.3. Osservazioni | « | 54 |
| 3.4. <i>Bibliografia</i> | « | 55 |
| 4. Batteri in associazione simbiotica diazotrofa (<i>Rizobi</i>) | « | 56 |
| 4.1. <i>Introduzione</i> | « | 56 |
| 4.2. <i>Prelievo dei campioni</i> | « | 57 |
| 4.3. <i>Stima del numero di rizobi nel suolo</i> | « | 58 |
| 4.4. <i>Test di nodulazione</i> | « | 58 |
| 4.5. <i>Test in tubo</i> | « | 58 |
| 4.6. <i>Inoculazione delle piante</i> | « | 60 |

| | | |
|---|---|----|
| 4.7. <i>Considerazioni</i> | « | 63 |
| 4.8. <i>Conta diretta</i> | « | 64 |
| 4.9. <i>Conta in piastra</i> | « | 64 |
| 4.10. <i>Identificazione dei ceppi</i> | « | 64 |
| 4.11. <i>Bibliografia</i> | « | 66 |
| 5. <i>Attinomiceti azotofissatori del genere Frankia</i> | « | 67 |
| 5.1. <i>Introduzione</i> | « | 67 |
| 5.2. <i>Metodi per evidenziare Frankia spp. nel suolo</i> | « | 68 |
| 5.2.1. <i>Campionamento</i> | « | 68 |
| 5.3. <i>Metodo qualitativo: DPBA (Direct Plant BioAssay) (Rodriguez-Barrueco, 1968)</i> | « | 68 |
| 5.3.1. <i>Premessa</i> | « | 68 |
| 5.3.2. <i>Materiali ed apparecchiature</i> | « | 68 |
| 5.3.3. <i>Reagenti</i> | « | 68 |
| 5.3.4. <i>Procedura consigliata</i> | « | 69 |
| 5.3.5. <i>Osservazioni</i> | « | 69 |
| 5.4. <i>Metodo Quantitativo: Metodo MPN-PBA (Most Probable Number-Plant BioAssay) (Smolander et al., 1988; Toomsan et al., 1984)</i> | « | 69 |
| 5.4.1. <i>Premessa</i> | « | 69 |
| 5.4.2. <i>Materiali ed apparecchiature</i> | « | 69 |
| 5.4.3. <i>Reagenti</i> | « | 70 |
| 5.4.4. <i>Procedura consigliata</i> | « | 70 |
| 5.4.5. <i>Osservazioni</i> | « | 70 |
| 5.5. <i>Metodo Quantitativo NC-PBA (Nodule Counting - Plant BioAssay) (Smolander e Sundman, 1987; Van Dijk, 1979; Van Dijk, 1984)</i> | « | 71 |
| 5.5.1. <i>Materiali ed apparecchiature</i> | « | 71 |
| 5.5.2. <i>Reagenti</i> | « | 71 |
| 5.5.3. <i>Procedura consigliata</i> | « | 71 |
| 5.5.4. <i>Osservazioni</i> | « | 72 |
| 5.6. <i>Isolamento di Frankia spp. dal suolo</i> | « | 72 |
| 5.7. <i>Metodo Diretto (Baker e O'Keefe, 1984)</i> | « | 72 |
| 5.7.1. <i>Materiali ed apparecchiature</i> | « | 72 |
| 5.7.2. <i>Reagenti</i> | « | 72 |
| 5.7.3. <i>Terreno di coltura minimale BAP di Murry et al., (1984) in g L⁻¹</i> | « | 72 |
| 5.7.4. <i>Procedura consigliata</i> | « | 73 |
| 5.7.5. <i>Osservazioni</i> | « | 73 |
| 5.8. <i>Metodi indiretti</i> | « | 73 |
| 5.9. <i>Microdissezione (Lalonde e Calvert, 1979)</i> | « | 74 |
| 5.9.1. <i>Materiali ed apparecchiature</i> | « | 74 |
| 5.9.2. <i>Reagenti</i> | « | 74 |
| 5.9.3. <i>Terreno di isolamento Qmod in g L⁻¹</i> | « | 74 |
| 5.9.4. <i>Procedura consigliata</i> | « | 74 |

| | | |
|--|---|----|
| 5.10. <i>Filtrazione Differenziale (Benson, 1982)</i> | « | 75 |
| 5.10.1. Materiali ed apparecchiature | « | 75 |
| 5.10.2. Reagenti | « | 75 |
| 5.10.3. Procedura consigliata | « | 75 |
| 5.10.4. Osservazioni | « | 76 |
| 5.11. <i>Diluizioni Seriali (Diem et al., 1982; Margheri et al., 1984)</i> | « | 76 |
| 5.11.1. Materiali ed apparecchiature | « | 76 |
| 5.11.2. Reagenti | « | 76 |
| 5.11.3. Terreno di isolamento Tween 80/NH ₄ ⁺ (Blom et al., 1980) in g L ⁻¹ | « | 76 |
| 5.11.4. Procedura consigliata | « | 77 |
| 5.11.5. Osservazioni | « | 77 |
| 5.12. <i>Frazionamento in Gradiente di Saccarosio (Baker e O'Keefe, 1984)</i> | « | 77 |
| 5.12.1. Materiali ed apparecchiature | « | 77 |
| 5.12.2. Reagenti | « | 77 |
| 5.12.3. Procedura consigliata | « | 77 |
| 5.12.4. Osservazioni | « | 77 |
| 5.13. <i>Bibliografia</i> | « | 79 |
| 6. Batteri proteolitici e ammonificanti | « | 81 |
| 6.1. <i>Introduzione</i> | « | 81 |
| 6.2. <i>Soluzioni, terreni colturali e reattivi</i> | « | 81 |
| 6.2.1. Soluzione di oligoelementi (Pochon & Tardieux, 1962) | « | 81 |
| 6.3. <i>Procedura consigliata per i proteolitici</i> | « | 82 |
| 6.4. <i>Procedura consigliata per gli ammonificanti</i> | « | 82 |
| 6.5. <i>Bibliografia</i> | « | 83 |
| 7. Batteri nitrificanti | « | 84 |
| 7.1. <i>Introduzione</i> | « | 84 |
| 7.2. <i>Soluzioni, terreni colturali e reattivi</i> | « | 84 |
| 7.2.1. Soluzione di Winogradsky (Pochon & Tardieux, 1962) | « | 84 |
| 7.2.2. Soluzione di oligoelementi (Pochon & Tardieux, 1962) | « | 84 |
| 7.2.3. Terreno colturale per nitrosanti (Pochon & Tardieux, 1962) | « | 84 |
| 7.2.4. Terreno colturale per nitricanti (Pochon & Tardieux, 1962) | « | 85 |
| 7.3. <i>Procedura consigliata</i> | « | 85 |
| 7.4. <i>Bibliografia</i> | « | 86 |
| 8. Batteri denitrificanti | « | 87 |
| 8.1. <i>Introduzione</i> | « | 87 |
| 8.2. <i>Vetriere, terreni colturali e reattivi</i> | « | 87 |
| 8.2.1. Terreno colturale per denitrificanti (Focht e Joseph, 1973) | « | 88 |
| 8.2.2. Reattivo di Bray per nitrati e nitriti (Bray, 1945) | « | 88 |
| 8.2.3. Reattivi per l'eliminazione dell'ossigeno nei contenitori ermetici | « | 88 |

| | | |
|---|---|----|
| 8.3. <i>Procedura consigliata</i> | « | 88 |
| 8.4. <i>Bibliografia</i> | « | 89 |
| 9. Gruppi fisiologici del ciclo del carbonio | « | 90 |
| 9.1. <i>Introduzione</i> | « | 90 |
| 9.2. <i>Cellulosolitici</i> | « | 90 |
| 9.2.1. Cellulosolitici aerobi: Conta su piastra a doppio strato (Kluepfe, 1988) | « | 90 |
| 9.2.1.1. Terreno colturale (Tansey, 1971) | « | 90 |
| 9.2.1.2. Procedura consigliata | « | 91 |
| 9.2.1.3. Risultati | « | 91 |
| 9.2.1.4. Osservazioni | « | 91 |
| 9.2.2. Conta su piastra con CMC (Kluepfel, 1988) | « | 91 |
| 9.2.2.1. Terreno colturale (Hankin et Anagnostakis, 1977) | « | 92 |
| 9.2.2.2. Procedura consigliata | « | 92 |
| 9.2.2.3. Risultati | « | 92 |
| 9.2.2.4. Osservazioni | « | 92 |
| 9.2.3. Saggio colorimetrico con Remazol Brilliant Blue per MPN (Moore e al.,1979; Poincelot e al., 1972) | « | 92 |
| 9.2.3.1. Terreno colturale | « | 92 |
| 9.2.3.2. Preparazione delle strisce di cellulosa | « | 93 |
| 9.2.3.3. Risultati | « | 93 |
| 9.2.3.4. Osservazioni | « | 93 |
| 9.3. <i>Cellulosolitici anaerobi</i> | « | 93 |
| 9.3.1. Stima del MPN in tubo (Pochon , 1954) | « | 93 |
| 9.3.1.1. Terreno colturale | « | 93 |
| 9.3.1.2. Procedura consigliata | « | 93 |
| 9.3.1.3. Risultati | « | 94 |
| 9.3.1.4. Osservazioni | « | 94 |
| 9.4. <i>Amilolitici</i> | « | 94 |
| 9.4.1. Conta su piastra (Wollum, 1982) | « | 94 |
| 9.4.1.1. Terreno colturale | « | 94 |
| 9.4.1.2. Procedura consigliata | « | 94 |
| 9.4.1.3. Risultati | « | 94 |
| 9.4.1.4. Osservazioni | « | 95 |
| 9.5. <i>Microtecnica per MPN</i> | « | 95 |
| 9.5.1.1. Procedura consigliata | « | 95 |
| 9.5.1.2. Risultati | « | 95 |
| 9.5.1.3. Osservazioni | « | 95 |
| 9.6. <i>Pectinolitici</i> | « | 95 |
| 9.6.1. Conta su piastra (Jayasankar e Graham 1970) | « | 96 |
| 9.6.1.1. Terreno colturale | « | 96 |
| 9.6.1.2. Procedura consigliata | « | 96 |
| 9.6.1.3. Risultati | « | 96 |
| 9.6.1.4. Osservazioni | « | 96 |
| 9.7. <i>Ligninolitici</i> | « | 96 |
| 9.7.1. Perdita di peso di materiali lignocellulosici (Johansson e al., 1986) | « | 97 |
| 9.7.2. Calcolo della perdita di peso del campione lignocellulosico | « | 97 |

| | | |
|---|---|-----|
| 9.8. <i>Dosaggio chimico delle lignine</i> | « | 98 |
| 9.8.1. Lignina di Klason | « | 98 |
| 9.8.2. Determinazione della lignina insolubile (Li) | « | 98 |
| 9.8.3. Determinazione delle ceneri (C) | « | 98 |
| 9.8.4. Determinazione della lignina solubile (Ls) | « | 98 |
| 9.8.5. Determinazione del contenuto totale di lignina (Lt) | « | 98 |
| 9.8.6. Determinazione spettrofotometrica della lignina | « | 99 |
| 9.8.7. Osservazioni | « | 99 |
| 9.9. <i>Determinazione dell'attività ligninolitica mediante coloranti polimerici (Glenn e Gold, 1983)</i> | « | 99 |
| 9.9.1. Terreno colturale (Haider e Trojanowski, 1975) | « | 99 |
| 9.9.2. Procedura consigliata | « | 100 |
| 9.9.3. Risultati | « | 100 |
| 9.9.4. Osservazioni | « | 100 |
| 9.10. <i>Bibliografia</i> | « | 101 |
| 10. Ciclo dello zolfo | « | 102 |
| 10.1. <i>Introduzione</i> | « | 102 |
| 10.2. <i>Solfo ossidanti</i> | « | 102 |
| 10.2.1. Stima del MPN secondo Pochon (1954) | « | 102 |
| 10.2.2. Preparazione del mezzo base | « | 102 |
| 10.2.3. Lettura dei risultati | « | 103 |
| 10.3. <i>Determinazione dei chemiolitotrofi</i> | « | 103 |
| 10.3.1. Principio del metodo | « | 103 |
| 10.3.2. Preparazione del campione | « | 103 |
| 10.3.3. Composizione del mezzo | « | 103 |
| 10.4. <i>Determinazione del MPN dei chemioeterotrofi</i> | « | 104 |
| 10.4.1. Mezzo di crescita | « | 104 |
| 10.5. <i>Determinazione del MPN dei chemiofototrofi</i> | « | 105 |
| 10.5.1. Soluzione 1 | « | 105 |
| 10.5.2. Soluzione 2 | « | 105 |
| 10.5.3. Soluzione 3 | « | 105 |
| 10.5.4. Soluzione 4 | « | 105 |
| 10.6. <i>Solfo riducenti</i> | « | 106 |
| 10.6.1. Stima dell'MPN | « | 106 |
| 10.6.2. Metodo | « | 106 |
| 10.6.3. Lettura dei risultati | « | 106 |
| 10.6.4. Composizione del mezzo | « | 107 |
| 10.7. <i>Isolamento e mantenimento delle colture</i> | « | 107 |
| 10.7.1. Composizione del mezzo | « | 107 |
| 10.8. <i>Bibliografia</i> | « | 109 |

1. Gruppi fisiologici di microrganismi

di Luigi Allievi

1.1. Introduzione

Se la valutazione delle cariche microbiche dei gruppi generici (parte II del volume) permette di ottenere una stima quantitativa della ricchezza totale della microflora presente in un suolo, la valutazione dei gruppi specifici permette di indagare la composizione di tale microflora.

È tipico della microflora ambientale, quindi anche del suolo, considerare non tanto i gruppi tassonomici (p. es. *Pseudomonas*, *Clostridium*) quanto gruppi di microrganismi, anche molto distanti tassonomicamente, accomunati dalla capacità di effettuare una determinata trasformazione chimico/enzimatica, che rappresenta un passaggio dei “cicli degli elementi” o “biogeochimici” in natura. Questo perché nella microbiologia ambientale un particolare microrganismo interessa soprattutto per l’apporto che può dare alle funzionalità generali di un ecosistema. Tali gruppi vengono definiti “fisiologici” o “funzionali” e nel caso del suolo sono evidentemente in relazione con la fertilità naturale del suolo stesso.

È da notare che una certa specie microbica può anche appartenere a più gruppi fisiologici, se in grado di svolgere le relative trasformazioni caratteristiche; la somma delle cariche dei gruppi fisiologici è quindi già per questo ben superiore a quella delle cariche totali di microrganismi.

Esistono comunque, al di là della determinazione delle cariche dei gruppi fisiologici, altri metodi per indagare le capacità fisiologiche presenti in un ambiente quale il suolo: oltre ai test fisiologico/colturali sulle forme microbiche presenti, isolate in coltura pura, è da citare, per la particolarità dell’approccio, il sistema Biolog®. Un unico dispositivo consiste di quasi cento cellette, ognuna contenente un mezzo colturale con un diverso substrato, che devono essere inoculate con una sospensione microbica. Originariamente applicato all’identificazione di microrganismi su base fisiologica (con l’inoculazione di una coltura pura), può venire inoculato con una sospensione di suolo per determinare le capacità fisiologiche dell’intera comunità microbica, considerata nel suo insieme. Si ottiene in tal modo una “impronta digitale” (*fingerprint*) metabolica, cioè una caratterizzazione fisiologico/funzionale, della comunità presente (Winding, 1994), che permette ad esempio di confrontare la biodiversità fisiologica di diversi suoli, o di suoli diversamente trattati. Il sistema Biolog® appartiene in ogni caso anch’esso ai procedimenti di tipo colturale, con tutti i limiti che ciò comporta ad esempio riguardo alla coltivabilità/non-coltivabilità dei microrganismi studiati ed alla loro possibile polifunzionalità.

Sono infine da citare le opportunità offerte dalle moderne tecniche di biologia molecolare, ormai sostanzialmente adoperate per i più vari scopi. Si tratta ad esempio dell’impiego di “sonde ad acidi nucleici” (ricerca, mediante sequenze omologhe, di particolari sequenze presenti negli acidi nucleici microbici) utilizzabili su geni che presentano sequenze nucleotidiche specifiche per le diverse specie microbiche. Tale tecnica, accoppiata eventualmente alla PCR (“reazione a catena della polimerasi”) che aumenta la quantità di DNA specifico a disposizione, può essere adottata come metodo di rilevazione della presenza di un dato gruppo microbico (secondo la sonda impiegata) in diluizioni successive del campione in esame, per ottenere la carica (MPN) del gruppo stesso. Il vantaggio di tutte queste tecniche molecolari risiede soprattutto nella possibilità di svincolarsi dalla coltivazione dei microrganismi, operazione in vari casi difficile se non impossibile. L’esposizione dettagliata di tali metodi e delle loro applicazioni richiederebbe comunque un’ampia trattazione che esula dagli scopi della presente opera; si rimanda quindi all’ormai ampia letteratura sull’argomento (p. es.: Amann et al., 1995; Chandler, 1998).

Posizione Italiana

Assente

Posizione Internazionale

Assente

1.2. Bibliografia

- Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K.H. (1995), *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. Microbiological Reviews, 59, 143-169.
- Chandler D.P. (1998), *Redefining relativity: quantitative PCR at low template concentration for industrial and environmental microbiology*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 21, 128-140.
- Winding A. (1994), *Fingerprinting bacterial soil communities using Biolog microtitre plates*. In: Beyond the Biomass. (K.Ritz, J. Dighton and K.E. Giller, Eds.), John Wiley & Sons, Chichester, U.K., pp. 85-94.

Luigi Allievi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e
Microbiologiche
Sezione Microbiologia Agraria, Alimentare, Ecologica
Università degli Studi di Milano
Via Celoria, 2,
20133 Milano

1^a ed. 2002

Coordinatori dei metodi:
Picci G., Nannipieri P.

Direttore della collana:
Paolo Sequi

2. Microrganismi del ciclo dell'azoto

Batteri azotofissatori liberi, aerobi ed anaerobi

di Luigi Allievi

2.1. Introduzione

Se si eccettuano il carbonio e l'acqua, l'azoto è il nutriente che è richiesto in maggiore quantità. È un costituente fondamentale di tutte le cellule e si trova in natura in diversi stati di ossidazione, ad esempio: R-NH₂, NH₃, NH₄⁺, N₂, NO, NO₂⁻, NO₃⁻. Le trasformazioni biologiche dell'azoto e i suoi composti rivestono importanza fondamentale, poiché alcune di queste sono condotte esclusivamente da microrganismi.

Sebbene l'atmosfera sia la principale riserva di azoto, soltanto una piccola percentuale della produzione primaria dipende dalla fissazione di N₂. La maggior parte della produzione di biomassa è basata su NH₄⁺ e NO₃⁻.

Il composto centrale del ciclo dell'azoto è NH₄⁺ che proviene dalla degradazione delle proteine e degli amminoacidi, derivanti da piante, animali e microrganismi. Nella materia vivente, l'azoto si trova quasi esclusivamente nella forma ridotta (R-NH₂) e viene rilasciato come NH₃ (NH₄⁺) dal processo di ammonificazione, l'entità della quale viene stimata equivalente a 3x10¹⁰ t/anno. Lo ione ammonico non incorporato nella biomassa è soggetto all'ossidazione a seguito del processo di nitrificazione (nitrosazione e nitrificazione), ad opera di batteri chemiolitotrofi aerobi. In carenza di ossigeno, molti microrganismi usano i nitrati per riduzione dissimilativa, compiendo un processo denominato denitrificazione, che porta a rilascio di azoto gassoso (N₂, N₂O). Tale rilascio risulta compensato dalla fissazione di azoto medesimo, processo pertanto vitale per il bilanciamento globale del ciclo. L'entità dell'N₂ fissazione è stimata di 2x10⁸ t di N₂/anno, comprendendo terre ed oceani (Picci, 1994).

La flora microbica implicata nel ciclo dell'azoto è numerosa e complessa, comprendendo specie saprofiti ed ubiquitarie ed altre dotate di elevata specificità, come ad esempio gli azotofissatori ed i chemiolitotrofi aerobi nitrosanti e nitricanti.

Alcuni gruppi di batteri, dalle diversificate caratteristiche fisiologiche generali, contengono alcune specie che sono in grado di azotofissare non in simbiosi: *Azotobacteraceae*, *Bacillus*, *Clostridium*, enterobatteriacee, micobatteri e corinebatteri, spirilli, tiobacilli, fotosintetici anaerobi (batteri rossi o verdi), cianobatteri (o alghe azzurre, fotosintetici ossigenici) ed altri gruppi minori (Dalton, 1980). Tali batteri sono accomunati dalla capacità di sintetizzare l'enzima nitrogenasi, in grado di ridurre N≡N a NH₃ che viene utilizzata per la biosintesi dell'azoto organico. Si ritiene tuttavia che nelle normali condizioni del suolo nei nostri climi abbiano importanza, in quanto agiscono effettivamente e attivamente come N-fissatori, soprattutto le *Azotobacteraceae* *Azotobacter* e *Azomonas*, aerobie, e gli anaerobi *Clostridium*.

Una tecnica specifica e sufficientemente semplice per ricercare la capacità N-fissatrice è il "test di riduzione dell'acetilene" ad etilene: la nitrogenasi è un enzima non completamente specifico per N₂, può ridurre anche altri composti ed in particolare CH≡CH a CH₂=CH₂. La determinazione della capacità di ridurre C₂H₂ (ARA=acetylene reduction assay) è quindi un metodo indiretto per verificare che si può avere azotofissazione e che ci si trova di fronte ad un potenziale N-fissatore. Si tratta di incubare la coltura, o il campione studiato, in un recipiente sigillato in cui è presente acetilene. La rilevazione dell'etilene prodotto viene effettuata per via gascromatografica (Turner & Gibson, 1980).

Tale tecnica tuttavia è più adatta a determinazioni di attività N-fissatrice (p. es. di colture pure o di campioni di suolo come tali) che alla ricerca della carica batterica, ad esempio tramite MPN. La difficoltà risiede non tanto nel doversi basare su rilevazioni gascromatografiche invece che di più semplice natura, quanto nell'elevato numero di rilevazioni necessarie per ogni singola carica, che comporta tempi eccessivamente lunghi. A ciò si aggiungono altri inconvenienti quali: difficoltà di rilevazioni separate per gli aerobi data la facilità di formazione di micronicchie anaerobiche nelle colture, limitazioni nell'effettiva N-

fissazione, fonte di azoto anche se non necessariamente obbligata per le cellule batteriche, dovute alla saturazione dei siti attivi dell'enzima già a 5-10% v/v di C₂H₂, inibizione da parte dell'acetilene di vari processi biochimici importanti anche per gli N-fissatori.

Queste considerazioni spiegano perché, nonostante siano effettivamente impiegate metodiche di conta basate sul test ARA (Rennie, 1981; Jacobs et al., 1985), vengono ancora consigliati ed applicati metodi più tipicamente microbiologici ai fini della determinazione della carica, quale l'impiego di terreni colturali selettivi. Non potendo esistere un unico accoppiamento terreno colturale/condizione d'incubazione adatto all'intero differenziatissimo gruppo degli azotofissatori (aerobi ed anaerobi, foto e chemiosintetici, eterotrofi e autotrofi), è necessario effettuare delle conte separate per i vari componenti, oppure limitarsi ai gruppi più importanti e rappresentativi. In quest'ottica viene qui proposta la ricerca degli *Azotobacter*, i più tipici tra gli aerobi nei nostri suoli, e dei *Clostridium* per gli anaerobi.

Per la ricerca di *Azotobacter* sono stati proposti terreni colturali contenenti mannitolo, ad esempio l'Agar Ashby. Alcune ricerche hanno tuttavia evidenziato che si ottengono cariche più alte con l'impiego di glucosio quale fonte di carbonio. Inconvenienti sorgono dal sottoporre al calore della sterilizzazione, congiuntamente, fosfato e glucosio, perciò è stata proposta la sterilizzazione separata (Thompson, 1989).

2.1.1. Terreno colturale di Brown (Thompson, 1989)

In g/L di H₂O distillata, D-glucosio 5 g, K₂HPO₄ 0,8 g, MgSO₄•7 H₂O 0,2 g, FeSO₄•7 H₂O 0,04 g, Na₂MoO₄•2 H₂O 0,005 g, CaCl₂ anidro 0,15 g, agar 15 g; pH = 6,8; sterilizzazione a +121°C per 15 minuti. Glucosio e fosfato vengono sciolti in una piccola parte dell'acqua, sterilizzati per filtrazione e aggiunti in piastra prima di colarvi il terreno colturale.

2.1.2. Terreno colturale secondo Augier (1957)

Per litro di acqua distillata, KH₂PO₄ 0,75 g, D-glucosio 10 g, estratto di suolo (ved. Parte II, 3.2.1.a) 10 mL, CaCO₃ 0,05 g, fenosafranina (0,2% in H₂O) 8 mL, soluzione di oligoelementi 1 mL, soluzione di Winogradsky 50 mL, NaOH 0,1 N 33 mL circa. La soda decinormale può essere aggiunta al terreno già completato, fino a raggiungimento di un pH vicino alla neutralità. Il terreno colturale va distribuito in provette di circa 16 mm di diametro, 10 mL ciascuna. Aggiungere una campanella Durham in ogni provetta e passare in autoclave a vapore fluente (+100°C) per 20 minuti. Dopo raffreddamento del liquido la campanella non deve più contenere bolle d'aria.

2.1.3. Soluzione di oligoelementi (Pochon & Tardieux, 1962)

Disciogliere in 1 litro di acqua distillata 50 mg ciascuno di K₂MoO₄•5H₂O, Na₂B₄O₇•10 H₂O, Co(NO₃)₂•6H₂O, MnSO₄, CdSO₄, CuSO₄•H₂O, ZnSO₄•7H₂O e 100 mg di FeCl₃; può essere stoccata non sterile. Far passare una corrente di CO₂ nella soluzione.

2.1.4. Soluzione di Winogradsky (Pochon & Tardieux, 1962)

Disciogliere in 1 litro di acqua distillata: K₂HPO₄ 5 g, MgSO₄•2,5 g, NaCl 2,5 g, Fe₂(SO₄)₃ 50 mg, MnSO₄ 50 mg, soluzione di oligoelementi 1 mL; sterilizzare quindi a +110°C per 20 minuti.

2.1.5. Procedura consigliata per gli N-fissatori aerobi (*Azotobacter*)

Si utilizza un terreno colturale agarizzato in cui non è presente azoto combinato, il terreno di Brown. Effettuare una semina superficiale di aliquote di 0,2 mL delle diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻⁶. Incubare a +28°C per 7 giorni. Può essere utile una rilevazione preliminare a 3 giorni.

Dato che la selettività del terreno colturale viene inficiata da tracce di N minerale o organico presenti nell'inoculo nonché nei componenti del terreno colturale, in particolare nell'agar, è necessaria una verifica dell'aspetto della colonia e della morfologia della cellula batterica per essere sicuri di rilevare *Azotobacter* e non eventuali non azotofissatori. In particolare alcuni "oligonitrofilo" possono formare colonie anche di

qualche mm sfruttando semplici tracce di N combinato; un miglioramento del risultato può essere ottenuto impiegando agar particolarmente purificati.

Aspetto della colonia di *Azotobacter*: biancastra, mucosa, lucida, da pochi fino a 10 mm di grandezza; le colonie iniziano a comparire dopo pochi giorni, spesso col tempo assumono una particolare colorazione (p. es. marrone/nerastra nel caso di *A. chroococcum*, uno dei più comuni). Aspetto della cellula batterica (microscopio a contrasto di fase): tondeggianti o ovoidali, dimensioni di qualche micron (un po' più grande della maggioranza dei batteri a cocco ma nettamente meno dei lieviti), presenza di granulazioni chiare all'interno e di un alone chiaro dovuto a polisaccaridi escreti all'esterno (Tchan & New, 1984).

2.1.6. Procedura consigliata per gli N-fissatori anaerobi (*Clostridium*)

Per i clostridi sono sconsigliabili terreni colturali agarizzati per l'invasività delle colonie e perché il gas prodotto rompe o solleva facilmente l'agar. Viene quindi impiegato un terreno colturale liquido, secondo Augier, pressoché privo d'azoto combinato, contenente un indicatore di potenziale redox ed una campanella di Durham che permette di rilevare la produzione di gas (prevalentemente H₂). Seminare aliquote di 1 mL delle diluizioni successive del campione, da 10⁻¹ a 10⁻⁹. Incubare in anaerobiosi a +28°C per 30 giorni.

Il criterio per stabilire se si è avuta crescita di clostridi azotofissatori è la presenza di una consistente bolla di gas (almeno mezzo centimetro d'altezza) nella campanella oppure il viraggio della fenosafranina, originariamente rossa. In genere queste due eventualità si verificano assieme. Un controllo microscopico del materiale sul fondo della provetta mostra normalmente la presenza delle tipiche cellule di clostridi, con spora più grande della cellula vegetativa, ma in alcuni casi la crescita non è sufficiente per permettere tale rilevazione.

Posizione Italiana

Metodo Ufficiale n° III.1
Supplemento Ordinario G.U. n. 179
Dell'1.08.2002

Posizione Internazionale

Assente

2.2. Bibliografia

- Augier J. (1957), *A propos de la fixation biologique de l'azote atmosphérique et de la numération des Clostridium fixateurs dans les sols*. Annales de l'Institut Pasteur, 92, 817-824.
- Dalton H. (1980), *The cultivation of diazotrophic microorganisms*. In: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation (F.J. Bergersen, Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, U.K., pp. 13-64.
- Jacobs M.J., Funke B.R., Merrill S.D. (1985), *Enumeration and characterization of nitrogen-fixing bacteria in a stripmine site*. Plant and Soil, 84, 3-10.
- Picci G. (1994), *Microrganismi, Ambiente e Produttività Agraria*. Edagricole, Bologna.
- Pochon J., Tardieux P. (1962), *Techniques d'Analyse en Microbiologie du Sol*. Editions De La Tourelle, St.Mandé, France.
- Rennie R.J. (1981), *A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils*. Canadian Journal of Microbiology, 27, 8-14.
- Tchan Y.T., New P.B. (1984), *Genus Azotobacter Beijerinck 1901*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (J.G. Holt and N.R. Krieg, Eds.), vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, USA, pp. 220-229.
- Thompson J.P. (1989), *Counting viable Azotobacter chroococcum in vertisols. II. Comparison of media*. Plant and Soil, 117, 17-29.
- Turner G.L., Gibson A.H. (1980), *Measurement of nitrogen fixation by indirect means*. In: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation (F.J. Bergersen, Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, U.K., pp. 111-138.

Luigi Allievi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e
Microbiologiche
Sezione Microbiologia Agraria, Alimentare, Ecologica
Università degli Studi di Milano
Via Celoria, 2
20133 Milano

1^a ed. 2002

Coordinatori dei metodi:
Picci G., Nannipieri P.

Direttore della collana:
Paolo Sequi

3. Batteri in associazioni diazotrofe (*Azospirillum*)

di Roberta Pastorelli, Alessandro Gori e Franco Favilli

3.1. Introduzione

I batteri appartenenti al genere *Azospirillum* presentano una distribuzione ecologica estremamente ampia; essi proliferano nella rizosfera di numerose graminacee di climi tropicali, subtropicali e temperati. A tale genere appartengono cinque specie distinte: *A. brasilense*, *A. lipoferum* (Tarrand et al., 1978), *A. amazonense* (Magalhaes et al., 1983), *A. halopraeferens* (Reinhold et al., 1987) ed *A. irakense* (Khammas et al., 1989). La maggior parte dei ceppi che si isolano comunemente appartengono alle specie *A. brasilense* ed *A. lipoferum*. *A. amazonense* è stato isolato esclusivamente nella regione amazzonica del Brasile, *A. halopraeferens* nella rizosfera di *Leptochloa fusca* in Pakistan mentre *A. irakense* è stato isolato in associazione con le radici di piante di riso nella regione Diwaniya (Qadisya) in Iraq. Anche le prime due specie, comunque, sono più abbondanti in habitat tropicali piuttosto che in quelli temperati. *Azospirillum* può trovarsi libero nel suolo rizosferico o in associazione con l'apparato radicale, sia esternamente che internamente ad esso, senza però portare alla formazione di strutture specializzate quali i noduli radicali indotti dai batteri appartenenti al genere *Rhizobium* sulle radici di piante leguminose. *Azospirillum* forma con la pianta una rizocenosi di tipo mutualistico; la pianta libera dalle radici sostanze organiche (essudati radicali) utili alla crescita del batterio, il quale a sua volta oltre ad incrementare l'apporto di azoto disponibile mediante azotofissazione, induce nella pianta cambiamenti sia morfologici che fisiologici.

I batteri del genere *Azospirillum* sono batteri Gram negativi con lunghezza compresa tra i 2 ed i 4 µm e 1 µm di diametro, presentano forma vibroide, ma possono assumere in certe condizioni una forma a spirale. Essi hanno un movimento vorticoso per la presenza di un singolo flagello polare; tuttavia le specie *A. brasilense*, *A. lipoferum* ed *A. irakense*, se cresciute in mezzo agarizzato, possono presentare numerosi flagelli laterali. All'interno di tali batteri sono presenti granuli di poli-β-idrossibutirrato (PBH) e le specie *A. brasilense* ed *A. lipoferum* sono capaci di produrre carotenoidi responsabili della colorazione rosa tipica delle colture vecchie. La crescita ottimale avviene ad una temperatura compresa tra i +32-35 °C e ad un pH vicino alla neutralità. Tutte le specie del genere *Azospirillum* sono capaci di fissare l'azoto in condizioni di microaerofilia, a causa della mancanza di un sistema di protezione del complesso nitrogenasico dall'ossigeno, ad un optimum di pO₂ compreso tra 0,003 e 0,008 atm. Il contenuto di G+C del genoma di tali batteri varia da specie a specie ed è compreso tra 66 e 70 mol % (Elmerich et al., 1992).

3.2. Materiali ed apparecchiature

- Cappa a flusso laminare, mortaio e pestello, bisturi con manico di metallo, pinzette metalliche, bilancia, provette di vetro, tubi in vetro da 15 mL con tappo a tenuta d'aria in gomma butilica o silicone, piastre sterili, ansa, pipette graduate sterili da 1,5 e 10 mL, siringhe, termostato, bombola di C₂H₂, gascromatografo dotato di rivelatore ad ionizzazione di fiamma;
- soluzione per sterilizzare i frammenti di radice: acqua ossigenata H₂O₂ 30%;
- soluzione di blu di bromotimolo (indicatore di pH) 0,4% in soluzione idroalcolica;
- soluzione Rosso Congo: 1 g di colorante Rosso Congo in 400 mL di acqua distillata, sterilizzare a +120°C per 20 minuti;
- soluzione di microelementi: (NaMoO₄•2H₂O) 0,235 g, (H₃BO₃) 0,28 g, (CuSO₄•5H₂O) 0,008 g, (ZnSO₄•7H₂O) 0,024 g, Acqua distillata 1000 mL;
- soluzione di vitamine: biotina (vitamina H) 0,01 g e piridossina (vitamina B6) 0,02 g Acqua distillata 1000 mL, sterilizzare per filtrazione;

- mezzo minerale Nfb (Krieg e Döbereiner, 1984): acido malico (DL) 5,0 g, (KOH) 4,0 g, (K₂HPO₄) 0,5 g, (MgSO₄•7H₂O) 0,2 g, (NaCl) 0,1 g, (CaCl₂) 0,02 g, (FeSO₄•7H₂O) 0,5 g, soluzione di microelementi 2 mL, blu di bromotimolo 4 mL, agar 1,75 g, acqua distillata 1 L, pH finale 6,8. Sterilizzare a +120°C per 20 minuti. Aggiungere sterilmente 1 mL di soluzione di vitamine;
- mezzo minerale al Rosso Congo (Caceres, 1982): acido malico (DL) 5,0 g, (KOH) 4,8 g, (K₂HPO₄) 0,5 g, (MgSO₄•7H₂O) 0,2 g, (NaCl) 0,1 g, estratto di lievito 0,5 g, (FeCl₃•6H₂O) 0,015 g, agar 12 g, acqua distillata 985 mL, pH finale 7,0. Sterilizzare a +120°C per 20 minuti, quindi aggiungere 15 mL di soluzione di Rosso Congo sterile.

3.3. Procedura consigliata

3.3.1. Isolamento

- Ripulire dal suolo l'apparato radicale della pianta campione e lavarlo 3-5 volte con H₂O distillata sterile. Tagliare le radici in frammenti di circa 1 cm di lunghezza. Sterilizzare i frammenti ottenuti mediante immersione per 5 minuti nella soluzione di H₂O₂, lavarli 3 volte con acqua distillata sterile e macerarli con un mortaio ed un pestello sterili (Döbereiner et al., 1976, Okon et al., 1977);
- seminare in tubi da 15 mL, chiusi con tappo d'ovatta e contenenti 5 mL di mezzo minerale Nfb, campioni provenienti dai suddetti trattamenti: 1 g di suolo rizosferico, 1 g (in peso fresco) di radice, 1 g (in peso fresco) di radice sterilizzata superficialmente e macerata, incubare in termostato alla temperatura di +32°C;
- i batteri appartenenti al genere *Azospirillum*, se presenti, si disporranno nel punto dove la tensione d'ossigeno sarà ottimale per l'azotofissazione e dopo 24-48 ore di incubazione si formerà una caratteristica pellicola densa, biancastra, ondulata, 2-4 mm sotto la superficie del mezzo. Inoltre il colore del mezzo minerale virerà da verde a blu;
- sottoporre i tubi, nei quali viene riscontrata la formazione della pellicola, al test della riduzione dell'acetilene (Burris, 1974). Sostituire il tappo d'ovatta del tubo con un tappo a tenuta d'aria ed iniettare acetilene (C₂H₂) pari al 12% del volume d'aria del tubo. Dopo 24 h di incubazione misurare la produzione di etilene (C₂H₄) mediante gascromatografo;
- prelevare un'ansata di batteri dai tubi che presentano riduzione dell'acetilene e seminarla su piastre Petri contenenti 20 mL di mezzo minerale Rosso Congo. Incubare a +32-35°C per 24-48 ore. Su mezzo Rosso Congo i batteri appartenenti al genere *Azospirillum* formano colonie color rosso scarlatto, secche con bordo irregolare, ondulato e superficie rugosa;
- prelevare una colonia ben isolata ed inocularla in tubi contenenti mezzo Nfb. Ripetere questi passaggi 3-5 volte fino ad ottenere una coltura pura.

3.3.2. Quantificazione

Se si desidera quantificare i batteri appartenenti al genere *Azospirillum*, o comunque i microrganismi azotofissatori, presenti in campione, si può abbinare al test della riduzione dell'acetilene la tecnica del numero più probabile (Most Probable Number, MPN).

- Diluire serialmente in soluzione fisiologica (fino alla diluizione 10⁻⁸-10⁻⁹) i campioni di suolo (1 g) e/o di radice (1 g);
- seminare 1 mL di ciascuna diluizione in tubi da 15 mL contenenti 4 mL di mezzo Nfb (per ciascuna diluizione eseguire 3-5 repliche), incubare in termostato a +32°C per 24 ore;
- sottoporre i tubi al test della riduzione dell'acetilene;
- annotare il numero dei tubi in cui si riscontra crescita e riduzione dell'acetilene. Riferendosi alle tabelle di probabilità di Mc Crady si ottiene una stima del numero di batteri azotofissatori presenti nel campione di partenza (Oberzill, 1967).

3.3.3. Osservazioni

La rizosfera è un ambiente estremamente ricco di microrganismi di ogni genere ed i mezzi minerali utilizzabili non sono strettamente selettivi per il genere *Azospirillum*. È bene quindi ripetere i passaggi dell'isolamento varie volte, accompagnandoli con osservazioni al microscopio ottico a contrasto di fase.

Il titolo batterico ottenuto mediante la tecnica MPN risulta generalmente più alto di quello reale; inoltre tale tecnica presenta un'alta probabilità di errore alla quale si può ovviare aumentando il numero delle repliche e/o diluizioni.

La caratterizzazione della specie può avvenire basandosi sia su test morfologici e fisiologici secondo i criteri tassonomici descritti da Tarrand et al., (1978) e Krieg e Döbereiner, (1984) sia mediante l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare quali le analisi di patterns di restrizione, ibridazioni DNA-DNA ed RNA-DNA, e tecniche immunologiche.

Posizione Italiana

Metodo Ufficiale n° III.2
Supplemento Ordinario G.U. n. 179
dell'1.08.2002

Posizione Internazionale

Assente

3.4. Bibliografia

- Burris R.H. (1974), *Biology of Nitrogen Fixation*. Quispel A. ed. North Holland Publ. Co., Amsterdam, pp. 9-33.
- Caceres E.A.R. (1982), *Improved medium for isolation of Azospirillum spp.* Applied and Environmental Microbiology, 44, 990-991.
- Döbereiner J., Marriel I.E., Nery M. (1976), *Ecological distribution of Spirillum lipoferum Beijerinck*. Canadian Journal of Microbiology, 22, 1464-1473.
- Elmerich, C., Zimmer W., Vieille C. (1992), *Associative nitrogen-fixing bacteria*. Biological Nitrogen Fixation. G Stacey, R.H. Burris and H.J. Evens eds. Chapman and Hall, pp. 212-258.
- Khammas K.M., Ageron E., Grimont P.A., Kaiser P. (1989), *Azospirillum irakense sp. nov. a nitrogen-fixing bacterium associated with rice root and rhizosphere soil*. Research in Microbiology, 140, 679-693.
- Krieg N.R., Döbereiner J. (1984), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. N.R. Krieg and J.G. Holt Eds. The Williams and Wilkins Co Baltimore, pp. 94-104.
- Magalhaes F.M., Baldani J.I., Souto S.M., Kuykendall J.R., Döbereiner J. (1983), *A new acid-tolerant Azospirillum species*. Annales Academia Brasileria Ciencia, 55, 417-430.
- Oberzill W. (1967), *Mikrobiologische Analytik*. Hans Carl, Nurnberg, pp. 122-128.
- Okon Y., Albrecht S.L., Burris R.H. (1977), *Methods for growing Spirillum lipoferum and for counting it in pure culture and in association with plants*. Applied and Environmental Microbiology, 33, 85-88.
- Reinhold B., Hurek T., Fendrik I., Pot B., Gillis M., Kersters K., Thielemans S., De Ley J. (1987), *Azospirillum halopraeferens sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (Leptochloa fusca L. Kunth)*. International Journal of Systematic Bacteriology, 37, 43-51.
- Tarrand J.J., Krieg N.R., Döbereiner J. (1978), *A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group with a description of a new genus, Azospirillum gen. nov. and two species Azospirillum lipoferum (Beijerinck) cmb. Nov. and Azospirillum brasilense sp. nov.* Canadian Journal of Microbiology, 24, 967-980.

Roberta Pastorelli

Sezione di Microbiologia
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie
Università degli Studi
Piazzale delle Cascine, 24
50144 Firenze

1^a ed. 2002

Coordinatori dei metodi:
Picci G., Nannipieri P.

Direttore della collana:
Paolo Sequi

Alessandro Gori

Neotron, Stradello Aggazzotti, 104
41010 S. Maria di Mugnano MO

Franco Favilli

Sezione di Microbiologia
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie
Università degli Studi
Piazzale delle Cascine, 24
50144 Firenze

4. Batteri in associazione simbiotica diazotrofa (Rizobi)

di Sergio Casella

4.1. Introduzione

I batteri del genere *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*, bastoncelli gram negativi, comprendono numerose specie e biovar. La loro classificazione, in rapida e continua evoluzione, si è basata per lungo tempo sulle specifiche capacità di instaurare rapporti di associazione simbiotica con specifici generi di piante leguminose, provocando la formazione di speciali strutture conosciute col nome di noduli radicali o tubercoli. In essi i batteri subiscono modificazioni fisiologiche e morfologiche e assumono la capacità di fissare l'azoto atmosferico ad ammoniaca, fertilizzando così direttamente la leguminosa ospite ed ottenendo in cambio composti del carbonio derivanti dalle attività fotosintetiche della pianta stessa. Oggi, i parametri utilizzati per classificare i rizobi non si basano più esclusivamente sulla specificità d'ospite ma anche su un certo numero di caratteristiche fisiologiche, biochimiche e genetiche proprie del microrganismo.

In base alle nuove acquisizioni la più recente classificazione può essere riferita alla Tab. 1 ed approfondita presso il sito web <http://www.ncbi.nlm.gov/Taxonomy/wgetorg>.

Tab. 1 – Classificazione corrente dei rizobi

| Genere | Specie | Biovar | Ospite | Caratteristiche |
|-----------------------|------------------------|-----------------|--|--------------------------------------|
| <i>Rhizobium</i> | <i>leguminosarum</i> | | <i>Pisum</i> , <i>Lens</i> sp, <i>Latyrus</i> sp | Rapido, specifico, noduli radicali |
| <i>Rhizobium</i> | <i>leguminosarum</i> | <i>trifolii</i> | <i>Trifolium</i> sp | Rapido, specifico, noduli radicali |
| <i>Rhizobium</i> | <i>leguminosarum</i> | <i>viceae</i> | <i>Vicia</i> sp | Rapido, specifico, noduli radicali |
| <i>Rhizobium</i> | <i>leguminosarum</i> | <i>phaseoli</i> | <i>Phaseolus</i> sp | Rapido, specifico, noduli radicali |
| <i>Rhizobium</i> | <i>loti</i> | | <i>Lotus</i> | Rapido, specifico, noduli radicali |
| <i>Rhizobium</i> | <i>galegae</i> (*) | | <i>Galega orientalis</i> | Rapido, specifico, noduli radicali |
| <i>Rhizobium</i> | <i>tropici</i> (*) | | <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> sp | Rapido, specifico, noduli radicali |
| <i>Rhizobium</i> | <i>huakuui</i> (*) | | <i>Astralagus sinicus</i> | Rapido, specifico, noduli radicali |
| <i>Rhizobium</i> | <i>hedysari</i> (*) | | <i>Hedysarum coronarium</i> | Rapido, specifico, noduli radicali |
| <i>Bradyrhizobium</i> | <i>japonicum</i> | | <i>Glycine max</i> | Lento, specifico, noduli radicali |
| <i>Bradyrhizobium</i> | <i>lupini</i> | | <i>Lupinus spp</i> | Lento, specifico, noduli radicali |
| <i>Bradyrhizobium</i> | <i>parasponium</i> (*) | | <i>Parasponia (nl)</i> | Lento, specifico, noduli radicali |
| <i>Bradyrhizobium</i> | <i>elkanii</i> (*) | | <i>Glycine max</i> | Lento, specifico, noduli radicali |
| <i>Bradyrhizobium</i> | sp | | <i>Centrosema</i> , <i>Coronilla</i> | Lento, specifico, noduli radicali |
| <i>Bradyrhizobium</i> | sp | | <i>Acacia albida</i> (gruppo cow-pea <i>sensu stricto</i>) <i>A. holosericea</i> , <i>Arachis hypogaea</i> <i>P. tetragonolobus</i> , <i>S. guyanensis</i> , <i>Vigna unguiculata</i> | Lento, poco specifico |
| <i>Azorhizobium</i> | <i>caulinodans</i> (*) | | <i>Sesbania rostrata</i> | Rapido, specifico, noduli radicali e |

| | | | |
|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|--|
| <i>Azorhizobium</i> | sp (*) | <i>Aeschynomene indica</i> | caulinari Rapido, specifico, fotosintetico |
| <i>Sinorhizobium</i> | <i>meliloti</i> | <i>Medicago</i> sp | Rapido, specifico, noduli radicali |
| <i>Sinorhizobium</i> | <i>fredii</i> (*) | <i>Glycine</i> sp (soia cinese) | Rapido, specifico, noduli radicali |
| <i>Sinorhizobium</i> | <i>xinjiangensis</i> (*) | <i>Glycine</i> sp (soia cinese) | Rapido, specifico, noduli radicali |
| <i>Photorhizobium</i> | <i>thompsonianum</i> (*) | <i>Aeschynomene scabra</i> | Noduli radicali e caulinari |

(*) nuove specie proposte od in corso di approvazione da "International Subcommittee for the Taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium*".

La pratica della batterizzazione dei semi di leguminose, ormai di largo uso anche nel nostro paese, ha richiesto maggiore attenzione nei confronti dei rizobi indigeni del suolo al fine di ottenere risultati agronomici soddisfacenti. Le sperimentazioni di pieno campo sono quindi tese a valutare la necessità di operare la batterizzazione della specie di leguminosa che si intende seminare in quel determinato suolo. In tal senso essa rappresenta il punto finale a conferma (o smentita) della rilevante mole di lavoro svolta preventivamente in laboratorio ed in ambiente controllato (es. fitotrone). Infatti, per quanto sofisticate siano le tecniche utilizzate nella sperimentazione in ambiente controllato, esse non potranno mai simulare a pieno la complessità del suolo. Basti ricordare alcuni fattori quali l'acidità del suolo e le condizioni di umidità che influiscono sulla sopravvivenza dell'inoculo, la presenza di sostanze tossiche per i rizobi, l'antagonismo microbico che ne può ostacolare la riproduzione e la persistenza in rizosfera, la concentrazione di alcuni importanti ioni che può influenzare l'efficacia di nodulazione, la presenza di ceppi indigeni che possono competere per la nodulazione con i ceppi di nuova introduzione, le temperature troppo elevate o troppo ridotte che possono ritardare la formazione dei noduli e l'inizio della fase di azotofissazione, la scarsità di alcuni elementi nutritivi minerali che possono interferire con le funzioni del nodulo.

Così come le varie specie di leguminose, i batteri simbiotici sono nel suolo largamente distribuiti. Sebbene esistano suoli privi di rizobi, la maggior parte dei terreni può contenerne popolazioni di una o più specie ed è quindi necessario conoscerne le caratteristiche al fine di valutarne la potenziale influenza sui risultati dell'operazione.

I parametri che maggiormente possono influenzare le sperimentazioni in pieno campo sono le dimensioni e le proprietà simbiotiche delle popolazioni indigene. Entrambi i fattori vanno messi in relazione con i fenomeni di competizione tra ceppi e, di conseguenza con il successo dell'inoculo nel formare noduli sulla pianta in esame. Pur non sottovalutando i fenomeni di antagonismo tra microrganismi di specie diverse, i fenomeni di competizione tra ceppi della stessa specie sono quelli che, nella pratica, si possono osservare più facilmente. A titolo di esempio, se si intendono condurre test di nodulazione in pieno campo su trifoglio (*Trifolium* spp.) soltanto ceppi di *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* saranno capaci di produrre conseguenze apprezzabili sulla nodulazione, mentre soltanto ceppi di *Bradyrhizobium japonicum* potranno interferire con i risultati di sperimentazioni condotte su soia (*Glycine max*).

In definitiva, una valutazione delle capacità competitive dei ceppi indigeni che verranno in stretto contatto con i ceppi di nuova introduzione la si può ottenere da una stima numerica delle principali popolazioni di rizobio del suolo e della loro attitudine a formare noduli efficienti sulla pianta ospite.

4.2. Prelievo dei campioni

Il suolo in esame viene idealmente suddiviso in 10-20 parti da ognuna delle quali viene prelevato un campione cilindrico del diametro di circa 3-4 cm e profondo circa 10 cm. L'operazione viene naturalmente eseguita impiegando attrezzature e contenitori pre-sterilizzati. Nel caso che altri suoli debbano essere campionati nella stessa seduta verranno utilizzate nuove attrezzature pre-sterilizzate o si procederà ogni volta a lavare le medesime con alcool etilico al 95%, flammando successivamente. L'intervallo di tempo che intercorre tra il campionamento e l'analisi dovrà essere il più breve possibile e laddove i tempi debbano essere forzatamente più prolungati i campioni dovranno essere mantenuti a +4°C.

In laboratorio i 10-20 campioni provenienti da un determinato suolo verranno mescolati a lungo, naturalmente in ambiente pulito e relativamente asettico, fino ad ottenere un campione di suolo il più omogeneo possibile. Le pietre ed i materiali solidi di una certa dimensione possono essere facilmente rimossi per mezzo di un grossolano setaccio, mentre setacci più fini sono da evitare per non eliminare particelle organiche che possono ospitare un gran numero di rizobi. Può essere opportuno determinare l'umidità del terreno per poter poi esprimere i valori in relazione al suo peso secco.

4.3. Stima del numero di rizobi nel suolo

Ad eccezione di pochissimi casi, peraltro mai totalmente confermati, non si dispone di veri e propri mezzi colturali selettivi per rizobi; ma anche qualora fosse ipotizzabile ottenerne, la possibilità di separare le varie specie di rizobi in coltura è praticamente da escludere. Ne consegue l'opportunità di utilizzare test di nodulazione, in condizioni biologicamente controllate, direttamente sulla pianta.

4.4. Test di nodulazione

Il metodo consiste essenzialmente nell'inoculare piantine cresciute asepticamente con aliquote provenienti da vari livelli di diluizione del campione di suolo da analizzare. Il numero di rizobi potrà essere calcolato in base al numero di piantine che formeranno noduli ai vari livelli di diluizione. I tests possono essere condotti in tubo, nel caso di piantine di piccole dimensioni, in caso contrario verranno indicate soluzioni alternative.

4.5. Test in tubo

L'impiego di tubi in vetro (20 x 200 mm), con tappo di cotone o metallico, risponde a varie necessità tra le quali l'ingombro ridotto e la possibilità di essere sterilizzati in autoclave. Il substrato può essere rappresentato da un mezzo agarizzato adatto alla crescita delle piante. In questo caso, tuttavia, l'inoculazione con suolo potrà promuovere la crescita di funghi ed alghe che possono interferire con il processo di nodulazione. L'uso di antimicotici, o ancor meglio di substrati alternativi quali la vermiculite, capace peraltro di sostenere la crescita di alcune specie di leguminose assai meglio del mezzo agarizzato, permetteranno di superare l'ostacolo. In quest'ultimo caso, naturalmente, le piantine dovranno essere irrorate con una soluzione nutritiva adatta e la vermiculite verrà pretrattata al fine di rimuovere eventuali impurezze e limitare l'eventuale reazione alcalina. Possono tuttavia essere utilizzati, specie in sistemi di dimensioni maggiori, altri substrati quali sabbia, agriperlite, argilla espansa etc., da soli od in varie combinazioni.

Questo sistema, adatto come accennato a specie di piccole dimensioni, può tuttavia essere sfruttato anche in alcuni casi relativi a specie di dimensioni maggiori. Esistono infatti dei casi in cui la specie di rizobio investigata è capace di produrre noduli su più di un genere di leguminose, di cui almeno una di dimensioni ridotte. Un esempio su tutti è rappresentato da *Ornithopus sativus*, leguminosa di piccole dimensioni che può essere impiegata al posto di *Lupinus* spp. nella ricerca di *Bradyrhizobium lupini*. La Tab. 2 offre alcune altre analoghe possibilità.

In tutti i casi i semi dovranno essere presterilizzati. La metodologia seguente è consigliata per semi che non presentano particolari problemi:

- immergere rapidamente i semi in alcool etilico al 95%;
- immergere i semi per 5 minuti in una soluzione di HgCl₂ allo 0,1%;
- eseguire 10 lavaggi in H₂O distillata e sterile per rimuovere le tracce di HgCl₂;
- lasciare i semi ad imbibire nell'ultimo lavaggio per alcune ore;
- deporre i semi sulla superficie di piastre Petri contenenti agar-acqua 1,5%;
- incubare le piastre a temperatura appropriata (generalmente +25°C) al buio e capovolte.

Note:

- alcune specie (p. es. soia) tendono ad imbibirsi già nella fase di immersione in cloruro mercurico; in questi casi, poiché potrebbero osservarsi malformazioni nella pianta, è consigliato solo un lavaggio in alcool etilico al 95% per 30 secondi;
- alcune specie (p. es. medica), producendo semi molto duri, tendono a non imbibirsi affatto anche dopo immersione molto prolungata; in questi casi è consigliato l'uso di H₂SO₄ per 5 minuti prima dei consueti lavaggi in acqua;
- alcune specie (p. es. trifoglio) mostrano di aumentare l'efficienza di germinazione se le piastre vengono mantenute per -48 ore a +4°C prima dell'incubazione a +25°C.

Tab. 2 - Leguminose di taglia ridotta che possono essere impiegate come ospite nei test.

| Specie di rizobio | Leguminosa ospite | Minime dimensioni dei tubi consigliate (cm) |
|--|--|---|
| <i>R. meliloti</i> | <i>Medicago sativa</i> L. <i>M.falcata</i> L. <i>M.arabica</i> (L.) Huds. <i>M.lupulina</i> L. <i>M.minima</i> (L.) Bart. <i>M.praecox</i> DC. <i>M.rigidula</i> (L.) All. <i>Melilotus alba</i> Desr. <i>Mel. indica</i> (L.) All. <i>Mel.officinalis</i> (L.) Lam. <i>Trigonella suavissima</i> Lindl | 15,0 x 1,85 |
| | <i>Medicago littoralis</i> Rhode <i>M.rugosa</i> Desr. <i>M.orbicularis</i> (L.) Bart. <i>M.polymorpha</i> L. <i>M.scutellata</i> (L.)Mill. <i>M.tornata</i> (L.) Mill. <i>Trigonella foenum-graecum</i> L. | 15,0 x 2,5 |
| <i>R. leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> | <i>Trifolium alexandrinum</i> L. <i>T.hybridum</i> L. <i>T.dubium</i> Sibth. <i>T.fragiferum</i> L. <i>T.glomeratum</i> L. <i>T.incarnatum</i> L. <i>T.pratense</i> L. <i>T.repens</i> L. <i>T.resupinatum</i> L. <i>T.subterraneum</i> L. | 15,0 x 1,85 |
| <i>R. leguminosarum</i> | <i>Vicia atropurpurea</i> Desf. <i>V.hirsuta</i> (L.) S.F.Gray <i>V.sativa</i> L. | 15,0 x 2,5 |
| <i>R. leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i> | Nessuna disponibile* | -- |
| <i>B. lupini</i> | <i>Ornithopus sativus</i> Brot. <i>O.compressus</i> L. | 15,0 x 1,85 |
| <i>B. japonicum</i> | <i>Glycine ussuriensis</i> Regel & Maack | 20,0 x 3,0 |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. (gruppo cow-peas) | <i>Macroptilium atropurpureum</i> (DC.) Urb. <i>M.lathyroides</i> (L.) Urb. <i>Teramnus uncinatus</i> (L.) Sw. | 15,0 x 2,5 |
| <i>Rhizobium loti</i> | <i>Lotus corniculatus</i> L. <i>L.hispidus</i> Desf. <i>L.pedunculatus</i> Cav. | 15,0 x 1,85 |
| <i>Rhizobium</i> sp. (per <i>Cicer arietinum</i> L.) | Nessuna disponibile* | -- |
| <i>Rhizobium</i> sp. [<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit] | <i>Desmanthus virgatus</i> (L.) Willdt | 15,0 x 2,50 |

Quando le radichette raggiungono 1-2 cm di lunghezza saranno pronte per essere trasferite asetticamente nei tubi. Questi verranno posti in ambiente adeguato a fornire le adatte condizioni di luminosità (p. es. 20.000 lux per 16 ore ed 8 ore di buio), temperatura (p. es. 18-23°C luce/buio) ed umidità (p. es. 60-80%). Ciò può essere ottenuto in serra, cella climatizzata o fitotrone.

I substrati impiegati per la crescita delle piante, come accennato sopra, potranno essere agarizzati od inerti. In quest'ultimo caso si dovrà provvedere ad irrorare con soluzioni adeguate. Naturalmente tutti i substrati ed i mezzi di coltura utilizzati non dovranno contenere azoto combinato, condizione necessaria a non inibire il processo di nodulazione prima ed eventualmente l'attività nitrogenasica poi. La Tab. 3 mostra alcuni tra i substrati più comunemente impiegati.

Tab. 3 - Soluzioni minerali prive di azoto combinato per la coltivazione di piante leguminose in test di nodulazione.

| Composto ^a (mg×L ⁻¹) | In tubo ^b | | | | Idroponica | In vaso | | |
|---|----------------------|--------|----------|---------|----------------|---------|----------------------|----------------|
| | Thorntn | Jensen | Brockwel | Fähræus | | Munns | McKnigh ^c | Gibson |
| K ₂ HPO ₄ | 500 | 200 | 500 | -- | -- | -- | 130 | -- |
| Na ₂ HPO ₄ | -- | -- | -- | 150 | -- | -- | -- | -- |
| KH ₂ HPO ₄ | -- | -- | -- | 100 | 140 | 200 | -- | 30 |
| Ca ₃ (PO ₄) ₂ | 2000 | 1000 | 2000 | -- | -- | -- | -- | -- |
| CaHPO ₄ | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| CaCO ₃ | -- | -- | 100 | -- | -- | -- | -- | -- |
| CaCl ₂ | -- | -- | -- | 100 | -- | -- | 6 | 1 |
| CaSO ₄ ·2H ₂ O | -- | -- | -- | -- | 1088 | 1500 | -- | -- |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 200 | 200 | 200 | 120 | 230 | 200 | 110 | 30 |
| NaCl | 100 | 200 | 100 | -- | -- | -- | -- | -- |
| KCl | -- | -- | -- | -- | 0.7 | 300 | 110 | 40 |
| FePO ₄ | 1000 | -- | 500 | -- | -- | -- | -- | -- |
| FeCl ₃ | 10 | 140 | 100 | -- | 3 ^d | 140 | 8 ^d | 3 ^d |
| Fe-citrato | -- | -- | -- | 5 | -- | -- | -- | -- |
| pH | 6,6 | 6,6 | 6,6 | 6,5 | 6,5 | 7,0 | 6,8 | 6,8 |

- Viene aggiunto 1 mL×L⁻¹ di soluzione di microelementi (2,86 g H₃BO₃; 2,08 g MnSO₄•H₂O; 0,22 g ZnSO₄•7H₂O; 0,08 g CuSO₄•5H₂O; 0,11 g Na₂MoO₄•7H₂O; H₂O fino a 1000 mL);
- viene aggiunto da 1 a 1,6 % di agar, in relazione al tipo di pianta;
- usato anche per colture in tubo su vermiculite;
- sequestrato con EDTA: 22,8 g EDTA, 250 mL KOH 1N, 10 g FeCl₃ (o 17,2 g FeSO₄•7H₂O) in 1000 mL H₂O; ossigenare intensamente per una notte.

4.6. Inoculazione delle piante

Il metodo di diluizione dei campioni può variare in relazione al grado di precisione richiesto ed al numero di rizobi che si presume grossolanamente di riscontrare in un determinato suolo. Diluizioni di un fattore 10 vengono impiegate più frequentemente, specie quando non è richiesto un grado di precisione estremamente elevato. Possono tuttavia essere impiegate diluizioni 1:5 e finanche 1:2 per stime più accurate. Qui di seguito verrà esaminata la procedura 1:10.

È necessario disporre di:

- 18 tubi con le piantine, derivate dai semi sterilizzati, non più vecchie di 3-5 giorni;
- contenitori sterili con quantità note di soluzione fisiologica (è da evitare l'acqua per problemi di osmosi con le cellule batteriche) e precisamente: una beuta da 300 mL contenente 90 mL di soluzione e 6 tubi contenenti 9 mL della stessa soluzione;
- pipette sterili da 1 mL.

Dieci grammi del campione di suolo vengono sospesi in 90 mL di soluzione ed agitati a 200-300 rpm per 10 minuti. Quindi 1 mL di questa sospensione viene trasferito nel primo tubo contenente 9 mL di soluzione fisiologica ed agitato ancora per qualche minuto. Da questo, usando ogni volta una nuova pipetta, tre aliquote da 1 mL ciascuna vengono prelevate ed impiegate per inoculare rispettivamente tre tubi contenenti le piantine. L'intera operazione viene ripetuta per sei volte, sino ad arrivare al livello di diluizione 10⁻⁷. Le piantine vengono quindi lasciate crescere per alcune settimane ed esaminate ad intervalli per la presenza di noduli radicali.

Il numero più probabile di batteri simbiotici presenti nel campione di suolo originale verrà calcolato in base al numero di piantine che formeranno noduli ai vari livelli di diluizione, in riferimento alla Tab. 4. Essa fornisce stime che vanno da 40 a 10.990.000 organismi per mL di sospensione di suolo originale.

Nel caso si renda necessaria una stima più accurata si potrà procedere ad un test di nodulazione utilizzando serie di diluizione per 5. La procedura di massima rimane la stessa, avendo cura di utilizzare una serie di tubi contenenti non più 9 mL ma 4 mL di soluzione fisiologica. In questo caso le tavole permettono di risalire a valori compresi tra 1 e 252.000 rizobi per mL di sospensione originale (Tab. 5). Se sono previste quantità ancora minori sarà opportuno utilizzare come primo livello di inoculo la sospensione originale stessa (10:90 peso/volume).

Tab. 4 - Numero più probabile (MPN) di batteri capaci di produrre noduli calcolato in base alla distribuzione di campioni positivi (nodulati) in un test di nodulazione basato su serie di diluizione 1:10. Il terreno viene diluito la prima volta 10:90 (peso/volume).

| Numero di piantine nodulate (su tre replicati) a seguito di inoculazione con aliquote di 1 mL | | | | | | Numero più probabile (MPN) di batteri nel campione di origine prima della diluizione per mL | |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---|------------------------------|
| Livelli di diluizione del campione | | | | | | | |
| 1:10 ⁻² | 1:10 ⁻³ | 1:10 ⁻⁴ | 1:10 ⁻⁵ | 1:10 ⁻⁶ | 1:10 ⁻⁷ | Stima | Limite di confidenza (95%) |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,4 x 10 ² | 0,1-2,5 x 10 ² |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,9 x 10 ² | 0,2-3,7 x 10 ² |
| 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,5 x 10 ² | 0,4-5,2 x 10 ² |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,3 x 10 ² | 0,7-8,0 x 10 ² |
| 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4,2 x 10 ² | 1,0-17,2 x 10 ² |
| 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9,2 x 10 ² | 2,3-36,7 x 10 ² |
| 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 14,7 x 10 ² | 4,1-52,1 x 10 ² |
| 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23,0 x 10 ² | 6,6-80,3 x 10 ² |
| 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 42,4 x 10 ² | 10,4-172,5 x 10 ² |
| 3 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 91,8 x 10 ² | 22,9-367,2 x 10 ² |
| 3 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 14,7 x 10 ³ | 4,1-52,1 x 10 ³ |
| 3 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 23,0 x 10 ³ | 6,6-80,4 x 10 ³ |
| 3 | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 42,4 x 10 ³ | 10,4-172,7 x 10 ³ |
| 3 | 3 | 3 | 2 | 0 | 0 | 91,9 x 10 ³ | 23,0-367,7 x 10 ³ |
| 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0 | 14,7 x 10 ⁴ | 4,1-52,2 x 10 ⁴ |
| 3 | 3 | 3 | 3 | 0 | 0 | 23,0 x 10 ⁴ | 6,6-80,8 x 10 ⁴ |
| 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 0 | 42,7 x 10 ⁴ | 10,4-175,2 x 10 ⁴ |
| 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 0 | 93,3 x 10 ⁴ | 23,2-375,1 x 10 ⁴ |
| 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 14,9 x 10 ⁵ | 4,2-53,6 x 10 ⁵ |
| 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 0 | 24,0 x 10 ⁵ | 6,7-85,7 x 10 ⁵ |
| 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 46,2 x 10 ⁵ | 10,4-205,0 x 10 ⁵ |
| 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 109,9 x 10 ⁵ | 25,7-470,5 x 10 ⁵ |
| 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | >240,0 x 10 ⁵ | |

Tab. 5 - Numero più probabile (MPN) di batteri capaci di produrre noduli, calcolato in base alla distribuzione di campioni positivi (nodulati) in un test di nodulazione basato su serie di diluizione 1:5. Il terreno viene diluito la prima volta 10:90 (peso/volume).

| Numero di piantine nodulate (su 4 replicati) a seguito di inoculazione con aliquote di 1 mL | | | | | | Numero più probabile (MPN) di batteri nel campione di origine prima della diluizione | |
|---|-------|--------|--------|---------|-----------|--|----------------------------|
| Livelli di diluizione del campione | | | | | | | |
| 1:50 | 1:250 | 1:1250 | 1:6250 | 1:31250 | *1:156250 | Stima | Limite di confidenza (95%) |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,1 x 10 ¹ | 0,2-7,9 x 10 ¹ |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,6 x 10 ¹ | 0,6-10,1 x 10 ¹ |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4,6 x 10 ¹ | 1,5-14,1 x 10 ¹ |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8,0 x 10 ¹ | 3,0-21,5 x 10 ¹ |
| 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,0 x 10 ¹ | 0,1-7,7 x 10 ¹ |
| 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,3 x 10 ¹ | 0,6-9,6 x 10 ¹ |
| 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4,0 x 10 ¹ | 1,2-12,8 x 10 ¹ |
| 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6,5 x 10 ¹ | 2,3-18,0 x 10 ¹ |

| | | | | | | | |
|---|-------|--------|--------|---------|-----------|--|----------------------------|
| 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | $2,1 \times 10^1$ | $0,5-9,2 \times 10^1$ |
| 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | $3,5 \times 10^1$ | $1,1-11,9 \times 10^1$ |
| 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | $5,5 \times 10^1$ | $1,9-16,0 \times 10^1$ |
| 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | $8,7 \times 10^1$ | $3,3-23,0 \times 10^1$ |
| 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | $3,0 \times 10^1$ | $0,9-10,6 \times 10^1$ |
| 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | $4,9 \times 10^1$ | $1,6-14,6 \times 10^1$ |
| 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | $7,2 \times 10^1$ | $2,7-19,6 \times 10^1$ |
| 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | $11,3 \times 10^1$ | $4,4-29,2 \times 10^1$ |
| 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | $11,4 \times 10^1$ | $4,4-29,5 \times 10^1$ |
| 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | $16,2 \times 10^1$ | $6,2-42,4 \times 10^1$ |
| 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | $24,2 \times 10^1$ | $9,0-64,9 \times 10^1$ |
| 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | $40,4 \times 10^1$ | $15,3-106,6 \times 10^1$ |
| 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | $10,8 \times 10^1$ | $4,2-28,1 \times 10^1$ |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | $15,1 \times 10^1$ | $5,8-39,2 \times 10^1$ |
| 4 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | $21,5 \times 10^1$ | $8,1-57,4 \times 10^1$ |
| 4 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | $32,8 \times 10^1$ | $12,2-87,9 \times 10^1$ |
| 4 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | $14,1 \times 10^1$ | $5,4-36,6 \times 10^1$ |
| 4 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | $19,6 \times 10^1$ | $7,4-51,9 \times 10^1$ |
| 4 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | $28,3 \times 10^1$ | $10,5-76,1 \times 10^1$ |
| 4 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | $43,6 \times 10^1$ | $16,6-114,2 \times 10^1$ |
| 4 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | $18,1 \times 10^1$ | $6,9-47,7 \times 10^1$ |
| 4 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | $25,2 \times 10^1$ | $9,4-67,6 \times 10^1$ |
| 4 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | $36,4 \times 10^1$ | $13,7-96,8 \times 10^1$ |
| 4 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | $56,5 \times 10^1$ | $21,9-146,0 \times 10^1$ |
| 4 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | $5,7 \times 10^2$ | $2,2-14,7 \times 10^2$ |
| 4 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | $8,1 \times 10^2$ | $3,1-21,2 \times 10^2$ |
| Numero di piantine nodulate (su 4 replicati) a seguito di inoculazione con aliquote di 1 mL | | | | | | Numero più probabile (MPN) di batteri nel campione di origine prima della diluizione | |
| Livelli di diluizione del campione | | | | | | | |
| 1:50 | 1:250 | 1:1250 | 1:6250 | 1:31250 | *1:156250 | Stima | Limite di confidenza (95%) |
| | | | | | | | |
| 4 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | $12,1 \times 10^2$ | $4,5-32,4 \times 10^2$ |
| 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | $20,2 \times 10^2$ | $7,6-53,3 \times 10^2$ |
| 4 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | $5,4 \times 10^2$ | $2,1-14,0 \times 10^2$ |
| 4 | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | $7,5 \times 10^2$ | $2,9-19,6 \times 10^2$ |
| 4 | 4 | 2 | 1 | 0 | 0 | $10,8 \times 10^2$ | $4,0-28,7 \times 10^2$ |
| 4 | 4 | 3 | 1 | 0 | 0 | $16,4 \times 10^2$ | $6,1-43,9 \times 10^2$ |
| 4 | 4 | 0 | 2 | 0 | 0 | $7,1 \times 10^2$ | $2,7-18,3 \times 10^2$ |
| 4 | 4 | 1 | 2 | 0 | 0 | $9,8 \times 10^2$ | $3,7-26,0 \times 10^2$ |
| 4 | 4 | 2 | 2 | 0 | 0 | $14,1 \times 10^2$ | $5,3-38,1 \times 10^2$ |
| 4 | 4 | 3 | 2 | 0 | 0 | $21,8 \times 10^2$ | $8,3-57,1 \times 10^2$ |
| 4 | 4 | 0 | 3 | 0 | 0 | $9,1 \times 10^2$ | $3,4-23,8 \times 10^2$ |
| 4 | 4 | 1 | 3 | 0 | 0 | $12,6 \times 10^2$ | $4,7-33,8 \times 10^2$ |
| 4 | 4 | 2 | 3 | 0 | 0 | $18,2 \times 10^2$ | $6,9-48,4 \times 10^2$ |
| 4 | 4 | 3 | 3 | 0 | 0 | $28,2 \times 10^2$ | $10,9-73,0 \times 10^2$ |
| 4 | 4 | 4 | 1 | 0 | 0 | $2,9 \times 10^3$ | $1,1-7,3 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 2 | 0 | 0 | $4,1 \times 10^3$ | $1,6-10,6 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 3 | 0 | 0 | $6,0 \times 10^3$ | $2,3-16,2 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | $10,1 \times 10^3$ | $3,8-26,6 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 0 | 1 | 0 | $2,7 \times 10^3$ | $1,0-7,0 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 1 | 1 | 0 | $3,8 \times 10^3$ | $1,5-9,8 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 2 | 1 | 0 | $5,4 \times 10^3$ | $2,0-14,4 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 3 | 1 | 0 | $8,2 \times 10^3$ | $3,1-22,0 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 0 | 2 | 0 | $3,5 \times 10^3$ | $1,4-9,2 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 1 | 2 | 0 | $4,9 \times 10^3$ | $1,8-13,0 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 0 | $7,1 \times 10^3$ | $2,6-19,0 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 0 | $10,9 \times 10^3$ | $4,2-28,6 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 0 | 3 | 0 | $4,5 \times 10^3$ | $1,7-11,9 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 1 | 3 | 0 | $6,3 \times 10^3$ | $2,3-16,9 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 2 | 3 | 0 | $9,1 \times 10^3$ | $3,4-24,2 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 0 | $14,1 \times 10^3$ | $5,4-36,7 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 1 | 0 | $14,3 \times 10^3$ | $5,5-36,9 \times 10^3$ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 0 | $20,3 \times 10^3$ | $7,8-53,0 \times 10^3$ |

| | | | | | | | |
|---|-------|--------|--------|---------|-----------|--|------------------------------|
| 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 0 | 30,2 x 10 ³ | 11,2-81,3 x 10 ³ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 50,5 x 10 ³ | 19,0-133,8 x 10 ³ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 1 | 13,5 x 10 ³ | 5,2-35,3 x 10 ³ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 1 | 1 | 18,8 x 10 ³ | 7,2-49,0 x 10 ³ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 1 | 26,9 x 10 ³ | 10,1-71,8 x 10 ³ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 1 | 41,0 x 10 ³ | 15,3-110,2 x 10 ³ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 2 | 17,7 x 10 ³ | 6,8-45,9 x 10 ³ |
| Numero di piantine nodulate (su 4 replicati) a seguito di inoculazione con aliquote di 1 mL | | | | | | Numero più probabile (MPN) di batteri nel campione di origine prima della diluizione | |
| Livelli di diluizione del campione | | | | | | | |
| 1:50 | 1:250 | 1:1250 | 1:6250 | 1:31250 | *1:156250 | Stima | Limite di confidenza (95%) |
| | | | | | | | |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 1 | 2 | 24,5 x 10 ³ | 9,2-65,0 x 10 ³ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 35,3 x 10 ³ | 13,1-95,4 x 10 ³ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 54,4 x 10 ³ | 20,6-143,8 x 10 ³ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 3 | 22,6 x 10 ³ | 8,6-59,7 x 10 ³ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 1 | 3 | 31,4 x 10 ³ | 11,7-84,7 x 10 ³ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 3 | 45,5 x 10 ³ | 17,0-121,4 x 10 ³ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 70,6 x 10 ³ | 27,1-184,2 x 10 ³ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 1 | 7,1 x 10 ⁴ | 2,7-18,6 x 10 ⁴ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 10,1 x 10 ⁴ | 3,8-27,0 x 10 ⁴ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 15,1 x 10 ⁴ | 5,4-42,6 x 10 ⁴ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 25,2 x 10 ⁴ | 8,6-74,0 x 10 ⁴ |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | >35,5 x 10 ⁴ | |

*Da questo livello di diluizione vengono inoculate 5 piantine.

4.7. Considerazioni

La riproducibilità dei risultati che si possono ottenere con la procedura descritta trova ampio riscontro in letteratura.

Quando le piantine vengono fatte crescere in substrato agarizzato, la procedura può essere applicata con efficacia a colture pure del microrganismo, fornendo stime molto simili a quelle ottenibili con la conta diretta. In effetti, l'influenza della rizosfera si estende, in questo tipo di sistema, per tutta l'estensione del substrato, consentendo anche ad una singola cellula di promuovere l'infezione. L'impiego di vermiculite od altri substrati, al contrario, può condurre ad una sottovalutazione del numero di rizobi. Il fattore di correzione, tuttavia, rimane abbastanza costante per un singolo substrato.

L'intera procedura potrebbe infine mostrare limiti consistenti di precisione laddove la popolazione di rizobi del suolo fosse estremamente ridotta (< 2/g suolo). In questo caso viene suggerito l'impiego di sistemi più complessi (vasi Leonard) realizzabili con bottiglie in vetro la cui base, accuratamente rimossa, può servire da supporto e da serbatoio per la porzione superiore, capovolta. Un turacciolo di cotone o di garza servirà da collettore per la soluzione nutritiva. Il sistema, interamente sterilizzabile in autoclave, può far uso di vermiculite come substrato. Nel caso in esame, la vermiculite viene mescolata con quantità crescenti di suolo (p. es. 0.5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 g) e la mistura sarà utilizzata per riempire i contenitori. I semi pregerminati verranno mantenuti isolati dagli altri campioni mediante l'apposizione di un coperchio di piastra Petri, mentre dopo che la piantina sarà abbondantemente emersa si procederà a togliere il coperchio ed a coprire la superficie del substrato con sabbia sterile. Saranno necessarie almeno 10 settimane in cella climatizzata per permettere alla radice di esplorare la maggior parte del substrato. Considerando il rischio reale di contaminazione sarà necessario predisporre adeguati controlli.

Il sistema, sopra descritto sommariamente, viene utilizzato anche nel caso si voglia valutare il numero di rizobi simbiotici di piante leguminose di grosse dimensioni che non dispongano di ospiti alternativi di taglia più ridotta (p. es. *R. leguminosarum* bv *phaseoli*). Le procedure di diluizioni 1:5 o per 1:10 descritte per i test in tubo possono essere adattate anche a questo tipo di sistema. Tuttavia, data la maggiore complessità, il test può essere eseguito con un minor numero di livelli di diluizione e di replicati (p. es. 4 livelli di diluizione in 2 o quattro replicati) potendo comunque fornire stime comprese tra 0,6 e 690 rizobi per mL al più basso livello di diluizione. La preparazione dei semi e dei livelli di diluizione resta invariata rispetto ai test in tubo sebbene l'inoculazione venga iniziata dalla prima sospensione di suolo. Inoltre, le aliquote di 1 mL generalmente impiegate per inoculare le piantine nei test in tubo, vengono diluite fino a 10 mL con la

soluzione nutritiva e distribuite su tutta la superficie del vaso. Saranno necessarie almeno 4 settimane di crescita prima di procedere alla valutazione dei noduli radicali ed il numero di rizobi (MPN) per grammo di suolo potrà essere calcolato avvalendosi della Tab. 6.

Tab. 6 - Numero più probabile (MPN) di batteri capaci di produrre noduli, calcolato in base alla distribuzione di campioni positivi (nodulati) in un test di nodulazione in vasi Leonard, basato su serie di diluizione 1:10, in due o quattro replicati.

| Numero di piantine nodulate su 4 livelli di diluizione | | Numero più probabile (MPN) di batteri per mL al più basso livello di diluizione |
|--|-------------------|---|
| due replicati | quattro replicati | |
| 8 | 16 15 | >700 |
| 7 | 14 13 | 690 340 |
| 6 | 12 11 | 180 100 |
| 5 | 10 9 | 59 31 |
| 4 | 8 7 | 17 10 |
| 3 | 6 5 | 5,8 3,1 |
| 2 | 4 3 | 1,7 1,0 |
| 1 | 2 | 0,58 |
| 0 | 1,0 | <0,5 |

4.8. Conta diretta

La conta diretta dei rizobi nel suolo può essere eseguita quando il loro numero è simile o superiore a quello degli altri microrganismi presenti. Tale situazione può verificarsi ad esempio nel caso in cui sia stata seminata una leguminosa i cui semi siano stati adeguatamente batterizzati.

4.9. Conta in piastra

La procedura è simile a quella descritta in altro paragrafo per microrganismi di altra natura. Dai livelli di diluizione più vicini al numero di rizobi previsto vengono prelevate aliquote di 1 mL della sospensione che saranno direttamente mescolate con 14 mL di mezzo colturale agarizzato, ma ancora allo stato fluido. Il substrato generalmente usato è YMA (Yeast Mannitol Agar) che ha la seguente composizione: K_2HPO_4 0,5 $g \times L^{-1}$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 $g \times L^{-1}$, NaCl 0,1 $g \times L^{-1}$, mannitolo 10,0 $g \times L^{-1}$, estratto di lievito 0,4 $g \times L^{-1}$, pH 6,8. Si suggerisce l'aggiunta di un antimicotico (p. es. cicloesimmide 50 $\mu g \times mL^{-1}$) per limitare la crescita di miceti e Rosso-Congo (1 $mL \times L^{-1}$ di una soluzione 0,25% peso/volume) che consente di distinguere i rizobi, che non assorbono il colorante, dalla maggior parte di microrganismi comuni, capaci di assorbirlo.

Le piastre Petri così predisposte verranno incubate a +28°C per 4 giorni nel caso di rizobi a rapida crescita, e fino a 10-14 giorni nel caso di rizobi a lenta crescita.

Questa procedura può venir adottata per la valutazione di inoculanti commerciali allestiti su supporti sterili, facendo uso anche di terreni colturali che consentano la crescita, e quindi la valutazione, di microflora contaminante.

4.10. Identificazione dei ceppi

Tutte le procedure sopra descritte permettono di identificare la specie di rizobio in base alla capacità di infettare lo specifico ospite. Ma nell'ambiente suolo sono spesso presenti vari ceppi della stessa specie di rizobio ed è spesso importante poter distinguere i ceppi indigeni da quelli di nuova introduzione. Questi

ultimi, anche in relazione alle recenti normative in materia dovranno perciò possedere caratteristiche tali da renderli identificabili. Potrà così essere possibile comprendere la dinamica della popolazione nel tempo e disporre così di un adeguato sistema di monitoraggio per valutarne l'impatto ambientale. Ciò si rende particolarmente necessario per microrganismi geneticamente modificati, anche se troppo spesso si tende a considerare questi ultimi gli unici a possedere potenzialità negative rilevanti dal punto di vista ambientale.

Geneticamente modificati o meno, i ceppi di nuova introduzione dovrebbero possedere opportuni markers che ne permettano l'identificazione nel suolo in cui sono stati introdotti.

Alcuni dei markers utilizzati si riconducono alle proprietà originarie dei vari ceppi e vengono evidenziati mediante i seguenti test:

- capacità di indurre formazione di noduli sullo specifico ospite;
- attività nitrogenasica;
- attività idrogenasica;
- attività nitrato- e nitrito-riduttasica;
- altre attività enzimatiche;
- profilo proteico;
- profilo lipopolisaccaridico;
- tipizzazione fagica;
- resistenza intrinseca ad antibiotici.

Ulteriori tests prevedono l'analisi del genoma tramite:

- profilo plasmidico;
- CHEF (contour-clamped homogeneous electric field);
- ARDRA (Amplified-Ribosomal DNA Restriction Analysis);
- RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Ulteriori markers possono venire introdotti nelle cellule batteriche mediante manipolazione genetica:

- fattori di resistenza o attività enzimatiche particolari (p. es. geni lac per la β -galattosidasi, geni luc o lux per la luciferasi) tramite inserimento di: plasmidi, transposoni, cassette geniche.

Altri markers possono essere allestiti mediante l'ottenimento di anticorpi poli o monoclonali e rilevati mediante le seguenti procedure:

- immunoprecipitazione;
- immunodiffusione;
- immunofluorescenza;
- ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay).

Per ulteriori approfondimenti in materia viene suggerita la consultazione del seguente materiale bibliografico.

Posizione Italiana

Metodo Ufficiale n° III.3
Supplemento Ordinario G.U. n. 179
dell'1.08.2002

Posizione Internazionale

Assente

4.11. Bibliografia

- Bergensen F.J. (1980), *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto.
- Casella S. (1984), *Il controllo biologico della qualità degli inoculi per la batterizzazione delle leguminose*. Agric. Ital., 5-6, 65-101.
- Casella S., Rossi N., Toffanin A. (1992), *Cell surface lipopolysaccharides of different rhizobia*. FEMS Microbiol. Letters, 93, 213-220.
- Commission of the European Communities (1990), *Biotechnology Action Programme*. Sectoral Meeting on Risk Assessment. Padova 1990.
- Corich V., Giacomini A., Ollero F.J., Squartini A., Nuti M.P. (1991), *Pulsed-field electrophoresis in contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) for the fingerprinting of Rhizobium spp.* FEMS Microbiol., Lett. 83, 193-198.
- Eckhardt T. (1978), *A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria*. Plasmid, 1, 584-588.
- European Union (1996), Final sectorial meeting on Ecological Implication of Biotechnology. Norwich, U.K.
- Toffanin A., Lupi F., Casella S. (1987), *Valutazione di alcuni inoculanti commerciali su diverse varietà di soia*. Riv. Agron., 21 (3), 203-209.
- Toffanin A., Casella S., Lupi F., Frassinetti S., Rossi N. (1989), *Quality control of commercial inoculants for soybean in Italy*. Agric. Mediterr., 120, 333-338.
- Struffi P., Corich V., Giacomini A., Benguedouar A., Squartini A., Casella S., Nuti M.P. (1998), *Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating Hedysarum coronarium*. J. Appl. Microbiol., 84, 81-89.

Sergio Casella

Dipartimento di Biotecnologia Agraria
Facoltà di Agraria – Agripolis
Strada statale Romea
Legnano (PD)

1^a ed. 2002
Coordinatori dei metodi:
Picci G., Nannipieri P.

Direttore della collana:
Paolo Sequi

5. Attinomiceti azotofissatori del genere *Frankia*

di Marco Bosco ed Erica Lumini

5.1. Introduzione

Gli attinomiceti del genere *Frankia* (*Actinomycetales*) sono microrganismi del suolo poco conosciuti perché "resistenti" alla maggior parte delle tecniche microbiologiche tradizionali. Essi sono batteri Gram positivi filamentosi, capaci di indurre noduli azotofissatori sulle radici (Callaham et al., 1978) o sui tronchi (Prin et al., 1991) di 25 generi di angiosperme dicotiledoni legnose non leguminose, dette piante attinoriziche (Tjepkema e Torrey, 1979). Ceppi puri di questi attinomiceti simbiotici sono stati finora isolati soltanto dalle radici di 17 generi di piante attinoriziche ed un solo Autore ne ha riportato l'isolamento diretto dal suolo (Baker e Schwintzer, 1990). Essi sono facilmente identificabili, a livello di genere, sulla base della peculiare morfologia [microife ramificate e settate (0,5-2 μm), sporangi multiloculari (10-100 μm), diazovesicole (3-5 μm)], della crescita estremamente lenta (tempo di duplicazione fino a cinque giorni), della capacità di infettare le piante ospiti e di fissare azoto molecolare sia in coltura pura che in simbiosi (Lechevalier e Lechevalier, 1989). A causa della mancanza di caratteristiche fenotipiche correlabili con i dati di omologia DNA-DNA, le 20 specie genomiche di *Frankia* finora descritte (Akimov e Dobritsa, 1992; Fernandez et al., 1989; Lumini et al., 1996) non hanno ancora ricevuto lo status di specie (Lechevalier e Lechevalier, 1990). I ceppi di *Frankia* spp. isolati in coltura pura sono provvisoriamente divisi in tre principali gruppi subgenerici (gruppo *Alnus*, gruppo *Casuarina*, gruppo *Elaeagnus*) in base alle correlazioni esistenti tra l'infettività per le piante ospiti (Baker, 1987), la fisiologia in coltura pura (Lalonde et al., 1988) e la biologia molecolare (Lumini e Bosco, 1999; Nazaret et al., 1991).

L'interesse di *Frankia* spp. nei nostri climi è principalmente biotecnologico, legato cioè all'apporto di azoto fissato (8-300 kg ha⁻¹ anno⁻¹, Sprent e Sprent, 1990) e di sostanza organica facilmente degradabile, da parte della lettiera delle piante ospiti, negli ecosistemi forestali (*Alnus*, *Coriaria*), di alta montagna (*Alnus*, *Dryas*), in suoli di neoformazione dopo eventi catastrofici naturali, quali alluvioni ed eruzioni vulcaniche (*Alnus*, *Hippophaë*), o degradati da attività antropiche quali cave, miniere, apertura di strade, siti industriali (*Alnus*, *Elaeagnus*, *Hippophaë*). Le piante attinoriziche assumono particolare importanza anche come specie pioniere in suoli salini e dune costiere (*Casuarina*, *Elaeagnus*), (Dommergues e Bosco, 1998) come frangivento (*Casuarina*), come specie miglioratrici nella selvicoltura industriale, in consociazione con essenze arboree a legno pregiato (*Alnus*, *Elaeagnus*), (Bosco et al., 1992; Isopi et al., 1994; Lumini et al., 1994) e come specie ornamentali (*Alnus*, *Casuarina*, *Ceanothus*, *Elaeagnus*).

A differenza dei rizobi, che sono stati coltivati in vitro fin dalla fine del secolo scorso, il primo ceppo di *Frankia* è stato isolato da noduli radicali soltanto nel 1978 (Callaham et al., 1978). L'assenza di un mezzo di coltura selettivo per questi attinomiceti ne rende, a tutt'oggi, molto difficile l'isolamento diretto dal suolo. I noduli che *Frankia* induce sulle radici delle piante ospiti rappresentano l'unica forma di accertamento della presenza di questi attinomiceti in un suolo. Molto scarse sono, quindi, le conoscenze sull'ecologia di *Frankia* spp. all'esterno delle piante ospiti e sulle capacità di questi attinomiceti di colonizzare il suolo. Infatti, benché *Frankia* spp. sembrerebbero essere assenti nel suolo di molte aree prive di piante attinoriziche, "particelle" infettive di *Frankia* sono state riscontrate nella rizosfera di piante non ospiti (Van Dijk, 1984). Da questa contraddizione apparente è stato dedotto che *Frankia* possa svilupparsi saprofiticamente nel suolo. Questa ipotesi, che non è mai stata confermata sperimentalmente per mancanza di metodi affidabili, sarebbe sostenuta dal fatto che alcuni ceppi sono capaci di crescere in mezzi di coltura relativamente semplici, fissando l'azoto molecolare e differenziando gli sporangi (Baker e Schwintzer, 1990). Le capacità di sopravvivenza di questi attinomiceti sono risultate discrete nel suolo rizosferico di piante ospiti, essiccato in laboratorio e conservato per anni (Tortosa e Cusato, 1991) ma variabili, secondo il ceppo, in suolo non rizosferico (Antonelli et al., 1992). Non è stato ancora stabilito, però, se ciò sia dovuto alle spore o al micelio

sviluppatosi allo stato saprofitico.

In base alle conoscenze attuali, poiché la distribuzione dei ceppi di *Frankia* nei suoli non appare strettamente legata a quella delle piante attinoriziche, la presenza di *Frankia* spp. in un dato suolo non assumerebbe alcun particolare significato ecologico in sé. Al contrario, l'assenza di questi attinomiceti in un suolo indicherebbe che esso è molto giovane oppure che è stato disturbato da attività antropiche o da catastrofi naturali. La ricerca e la conta di *Frankia* spp. nel suolo acquistano notevole importanza, quindi, nelle applicazioni selvicolturali e nel recupero ambientale, paesaggistico e produttivo di suoli degradati.

5.2. Metodi per evidenziare *Frankia* spp. nel suolo

5.2.1. Campionamento

Vengono utilizzate metodologie standard per il prelievo asettico dei campioni, utilizzando strumenti sterili e conservando i campioni in contenitori sterili, per non più di 20 giorni, a +4°C. Per tempi maggiori si consiglia la conservazione a -80°C. Per analisi di routine si prelevano 3-10 campioni superficiali di 1 dm³, escludendo la lettiera e le piante, che vengono vagliati a 5 e 2 mm, riuniti, omogeneizzati lungamente in asepsi e frazionati.

5.3. Metodo qualitativo: DPBA (Direct Plant BioAssay)

(Rodriguez-Barrueco, 1968)

5.3.1. Premessa

A causa della mancanza di un mezzo selettivo per la coltura in vitro di *Frankia* spp. e della non rispondenza delle tecniche immunologiche, non è possibile usare le tecniche di ricerca tradizionali. Benché notevoli progressi si stiano facendo per la messa a punto di metodi diretti per la ricerca di *Frankia* nel suolo (Hilger e Myrold, 1992; Nalin et al., 1999; Simonet et al., 1994; Picard et al., 1992) l'unico metodo attualmente utilizzabile di routine è di tipo indiretto, basato cioè sulla suscettibilità delle piante ospiti ad essere infettate da *Frankia* spp. (trappole biologiche). I noduli indotti sulle radici delle piante ospiti rappresentano, infatti, l'unico sintomo diagnostico della presenza di questi microrganismi in un suolo.

5.3.2. Materiali ed apparecchiature

- Cella fitoclimatica;
- cappa a flusso laminare;
- microscopio ottico;
- semi di piante attinoriziche a germinabilità certificata;
- vasi di polietilene resistenti all'autoclave, con sottovaso;
- piastre sterili;
- beuta da 500 mL sterile;
- ancorotta magnetica;
- colino da tè in metallo;
- pinzetta metallica;
- lametta da barba.

5.3.3. Reagenti

- H₂O₂ 30%;
- agaragar;
- H₂O distillata sterile;
- alcool denaturato;
- soluzione di blu cotone 0,25% in acido lattico al 50%.

5.3.4. Procedura consigliata

- Disinfezione dei semi: porre i semi nella beuta da 500 mL, aggiungere 100 mL di H₂O₂ 30%, agitare 20 minuti, lavare 5 volte per 10 minuti con 200 mL di H₂O distillata sterile. Sgocciolare con il colino sterile in cappa a flusso laminare e conservare fino all'uso in scatola Petri a +4°C;
- germinazione in asepsi: in cappa a flusso laminare, trasferire i semi ad uno ad uno in piastre contenenti acqua agarizzata allo 0,7%, pH 7, usando la pinzetta disinfettata in alcool e flambata ad ogni passaggio, avendo cura di distanziarli di almeno 2 cm. Incubare in cella fitoclimatica per 3-30 giorni (a seconda della specie). Osservare ogni giorno le piastre al microscopio ottico ed eliminare le plantule eventualmente contaminate (in cappa a flusso laminare);
- all'emissione della prima foglia vera, trapiantare le plantule sane, in cappa a flusso laminare, nei vasi sterilizzati e riempiti di suolo vagliato e inumidito con H₂O distillata sterile;
- incubare in cella fitoclimatica per 3-6 mesi (a seconda della specie), riempiendo il sottovaso di H₂O distillata sterile ogni settimana. Intercalare i vasi con il suolo con file di vasi di controllo contenenti lo stesso suolo sterilizzato o un substrato inerte sterile;
- rilevare la presenza dei noduli estraendo delicatamente gli apparati radicali dal suolo, previa immersione dell'intero vaso in acqua saponata tiepida per 10 minuti;
- confermare la presenza di *Frankia* spp. nei noduli mediante osservazione al microscopio ottico di sezioni longitudinali a fresco, colorate con blu cotone. I lobi vengono facilmente sezionati a mano con una lametta da barba.

5.3.5. Osservazioni

I noduli indotti da *Frankia* spp. sulle radici delle piante ospiti sono generalmente di tipo "coralloide", costituiti da numerosi lobi ramificati, e sono visibili ad occhio nudo. L'uso dello stereomicroscopio può, tuttavia, aiutare a discriminare i noduli giovani dalle "ginocchiate" delle radici. Questo metodo fornisce informazioni sulla presenza di una popolazione indigena di *Frankia* capace di infettare le specie ospiti utilizzate. La sensibilità, infatti, è subordinata all'uso di materiale vegetale di specie e provenienze le più diversificate possibili, perché ciascun genotipo vegetale può selezionare, e quindi rivelare, solo il microsimbionte più adatto alle sue esigenze. È sconsigliato per la ricerca quantitativa in quanto il volume di suolo esplorato dalle radici è difficilmente standardizzabile, perché i siti di infezione possono risultare limitanti e perché le caratteristiche del suolo possono non essere ideali per la pianta usata (pH, pO₂, CaCO₃, etc.). Nel caso di suoli acidi, infatti, è necessario allestire prove parallele con lo stesso suolo portato alla neutralità mediante aggiunte opportune di CaCO₃ sterile.

5.4. Metodo Quantitativo: Metodo MPN-PBA (Most Probable Number - Plant BioAssay) (Smolander et al., 1988; Toomsan et al., 1984).

5.4.1. Premessa

I numerosi metodi descritti in letteratura possono essere ricondotti a due tipi principali, da scegliere volta per volta in base all'accuratezza necessaria, le dimensioni del campione, il tempo a disposizione e lo scopo. I due metodi qui descritti, basati sull'inoculazione di piante ospiti (Plant Bio-Assay) con sospensioni-diluizioni di suolo, seguita dal conteggio delle piante nodulate o dal numero dei noduli formati per unità di suolo, hanno in comune la caratteristica di essere indipendenti sia dai parametri chimico-fisici del suolo da esaminare, che dal numero dei "siti infettivi" presenti sulle radici delle piante trappola.

5.4.2. Materiali ed apparecchiature

- Cella fitoclimatica;
- cappa a flusso laminare;
- microscopio ottico;
- semi di piante attinoriziche a germinabilità certificata;
- piastre sterili;

- beute sterili: 1 da 5 L, 1 da 2 L, 1 da 1L per ogni diluizione;
- vagli da 1 e 2 mm;
- 5 bottiglie da 100 mL sterili per ogni diluizione;
- 5 flaconi da 500 mL sterili per ogni diluizione;
- lametta da barba.

5.4.3. Reagenti

- H₂O distillata e sterile;
- agaragar;
- soluzione Nutritiva di Hoagland e Arnon (1950) modificata, preparata sciogliendo in 1 L di H₂O distillata i seguenti sali (quantità espresse in grammi) e sterilizzata in autoclave:

| | | | |
|--------------------------------------|------|--------------------------------------|---------|
| K ₂ SO ₄ | 0,30 | MgSO ₄ •7H ₂ O | 0,50 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,02 | K ₂ HPO ₄ | 0,20 |
| CaSO ₄ •2H ₂ O | 0,08 | CaCl ₂ •2H ₂ O | 0,50 |
| CaSO ₄ •2H ₂ O | 0,01 | Oligoelementi | 1,00* |
| FeCl ₃ •6H ₂ O | | pH | 6,5-6,8 |

*Preparare la soluzione di oligoelementi disciogliendo 2 g L⁻¹ di H₃BO₃; 0,8 g L⁻¹ di ZnSO₄•7H₂O; 0,6 g L⁻¹ di MnCl₂•4H₂O; 0,2 g L⁻¹ di CuSO₄•7H₂O; 0,03 g L⁻¹ di Na₂MoO₄; 0,01 g L⁻¹ di CoCl₂•6H₂O.

- soluzione di blu cotone 0,25% in acido lattico al 50%.

5.4.4. Procedura consigliata

- Circa due mesi prima dell'analisi, far germinare 50-100 semi della/e specie ospite/i prescelta/e, come descritto nel metodo DPBA (punto 5.3.4., primi due paragrafi);
- all'emissione della prima foglia vera, trasferire le plantule sane, in cappa a flusso laminare, in bottiglie da 100 mL oscurate con alluminio e contenenti la soluzione nutritiva sterile diluita al 50% con H₂O sterile e addizionata di NaNO₃ 0,25 mM, immobilizzandole sul setto del tappo (2 per ogni bottiglia);
- incubare in cella fitoclimatica per 6 settimane, rinnovando completamente la soluzione nutritiva addizionata di ammonio ogni due settimane. 15 giorni prima dell'inoculo, utilizzare la soluzione nutritiva preparata senza azoto;
- in condizioni di asepsi, porre 200 mL di suolo vagliato e omogeneizzato in una beuta da 5L sterile, portare a 2 L con soluzione nutritiva sterile, agitare 5 volte per 1 minuto, a mano;
- prelevare 400 mL della sospensione e filtrarla successivamente con i due vagli da 2 e 1 mm, recuperando nella beuta da 2 L;
- lavare i due vagli con 400 mL della soluzione nutritiva sterile, riunendo con la precedente;
- diluire serialmente per 5 volte di un fattore 10, usando le beute sterili da 1 L;
- frazionare ogni diluizione in 5 bottiglie sterili da 100 mL, agitare bene ogni bottiglia e introdurre le radici di 2 piantine di 2 mesi, immobilizzate dal setto del tappo (5-10 piantine per diluizione);
- incubare per 6 giorni agitando lungamente ogni bottiglia ogni giorno;
- al settimo giorno trasferire i tappi dei flaconi, con le piantine immobilizzate, sui flaconi da 500 mL, contenenti soluzione nutritiva sterile senza azoto;
- incubare per 6 settimane cambiando completamente la soluzione ogni due settimane;
- rilevare i dati come Positivo (almeno 1 nodulo) o Negativo (nessun nodulo) e risalire al numero di Unità Nodulanti per cm³ di suolo, usando le tabelle del metodo MPN;
- confermare la presenza di *Frankia* nei noduli mediante osservazione al microscopio ottico di sezioni longitudinali a fresco, colorate con blu cotone.

5.4.5. Osservazioni

La coltura delle piante in mezzo liquido permette una rapida identificazione dei noduli senza disturbare le piante, ma non è adatta a tutte le specie. Per le piante xerofile, che non tollerano tali condizioni (es. *Elaeagnus* spp.), modificare il 2° e 3° punto trasferendo le plantule in vasetti sterilizzati contenenti sabbia

grossolana o argilla espansa, imbibite di soluzione nutritiva. Irrigare ogni settimana con soluzione nutritiva diluita al 50% in H₂O sterile; 15 giorni prima dell'inoculo sostituire la soluzione nutritiva con H₂O sterile. L'inoculazione delle piantine di 2 mesi viene fatta, immediatamente dopo la diluizione del campione, vicino al colletto, con 5 mL di sospensione per piantina. Il tempo di incubazione è, in questo caso, di almeno 3 mesi.

Entrambi i metodi MPN-PBA e NC-PBA presentano le seguenti limitazioni:

- esprimono i dati in "Unità Nodulanti" (Nodulating Units, NU), definite come unità che inducono la formazione di un singolo nodulo, delle quali, però, non è noto il corrispondente numero di cellule. Inoltre, poiché *Frankia* è un batterio filamentoso, molta cura va posta nell'interpretazione dei risultati: il numero di UN può essere infatti falsato dalla frammentazione del micelio durante le diluizioni seriali. Per stabilire se *Frankia* è presente nel campione maggiormente sotto forma di ife vegetative o di spore, può essere eseguito il saggio di Pochon (1954), che prevede due prove parallele su campioni agitati per 5 minuti e 30 minuti rispettivamente;
- quantificano soltanto i ceppi compatibili con il genotipo delle piante trappola impiegate, che devono, quindi, essere scelte adeguatamente;
- possono essere largamente "influenzati" dalle caratteristiche simbiotiche dei microsimbionti: si è visto, infatti, che il numero dei noduli è inversamente correlato alla loro efficienza azotofissatrice;
- la sensibilità e la riproducibilità sono subordinate all'allestimento di un gran numero di ripetizioni.

5.5. Metodo Quantitativo NC-PBA (Nodule Counting - Plant BioAssay) (Smolander e Sundman, 1987; Van Dijk, 1979; Van Dijk, 1984)

5.5.1. Materiali ed apparecchiature

- Cella fitoclimatica;
- cappa a flusso laminare;
- microscopio ottico;
- semi di piante attinorizziche a germinabilità certificata; piastre sterili; beute sterili: 1 da 5 L, 1 da 2 L, 1 da 1 L per ogni diluizione; vagli da 1 e 2 mm; 30-40 vasetti da 500 mL in polietilene autoclavabile, per ogni diluizione;
- lametta da barba.

5.5.2. Reagenti

Come nel metodo MPN-PBA.

5.5.3. Procedura consigliata

- Circa due mesi prima dell'analisi, far germinare 200 semi della/e specie ospite/i prescelta/e, come descritto nel metodo DPBA (primo e secondo paragrafo);
- all'emissione della prima foglia vera, trasferire le plantule sane, in cappa a flusso laminare, in vasetti sterilizzati contenenti sabbia grossolana o argilla espansa imbibite di soluzione nutritiva;
- incubare in cella fitoclimatica per 6 settimane, irrigando ogni settimana con soluzione nutritiva diluita al 50% in H₂O sterile; 15 giorni prima dell'inoculo, sostituire la soluzione nutritiva con H₂O sterile;
- preparare le sospensioni-diluizioni di suolo come descritto dal quarto al settimo paragrafo del metodo MPN-PBA;
- per ogni diluizione inoculare 30-40 piantine di 2 mesi, ciascuna con 5 mL di sospensione, vicino al colletto;
- incubare per 3-6 mesi, irrigando ogni settimana con soluzione nutritiva priva di azoto;
- contare i noduli indotti sulle radici di ogni piantina e risalire al numero di NU per cm³ di suolo sulla base dei dati che mostrano una relazione più o meno lineare tra la quantità di inoculo e il livello di nodulazione (Van Dijk, 1984);

- confermare la presenza di *Frankia* nei noduli mediante osservazione al microscopio ottico di sezioni longitudinali a fresco, colorate con blu cotone.

5.5.4. Osservazioni

Comuni al metodo MPN-PBA. Le diluizioni seriali possono anche essere eseguite in mezzo solido, usando sabbia grossolana sterile in proporzioni crescenti e omogeneizzando a lungo la miscela in condizioni asettiche. In questo caso le plantule di cui al punto 2 sono trapiantate direttamente in vasi sterili riempiti con le diluizioni "solide" e irrigate con soluzione nutritiva sterile diluita.

5.6. Isolamento di *Frankia* spp. dal suolo

Poiché non è stato ancora formulato alcun mezzo selettivo per l'isolamento di questi attinomiceti direttamente dal suolo, gli unici metodi utilizzabili di routine sono di tipo indiretto e consistono in una fase di arricchimento mediante piante ospiti usate come "trappole biologiche", seguita da una fase di isolamento vera e propria, a partire dai noduli radicali ottenuti su tali piante. L'unico metodo diretto, descritto da Baker e O'Keefe nel 1984, non è mai entrato nella routine dei laboratori interessati, che hanno generalmente adottato i metodi indiretti. Qui di seguito vengono riportati entrambi i tipi di metodi. Comunque, in base ad un accordo tra i ricercatori del settore e in attesa di definire criteri affidabili per la definizione delle specie, tutti i ceppi di *Frankia* isolati in coltura pura vengono indicati come *Frankia* spp., dando a ciascuno un numero di riconoscimento formato da tre lettere (che indicano il laboratorio ed il Paese) seguito da un massimo di 10 cifre, le prime quattro delle quali codificano il genere e la specie della pianta ospite dalla quale il ceppo è stato isolato o indicano l'isolamento diretto da suolo (per maggiori dettagli consultare Lechevalier, 1983).

5.7. Metodo Diretto (Baker e O'Keefe, 1984)

Si basa sulla differenza di densità tra le cellule di *Frankia*, le particelle di suolo, i tessuti vegetali e gli altri microrganismi, che possono quindi venire separate e concentrate per mezzo di un gradiente discontinuo di saccarosio.

5.7.1. Materiali ed apparecchiature

- Ultracentrifuga con rotore basculante;
- tubi da ultracentrifuga (100 mL) trasparenti e di materiale perforabile (tipo Beckman Ultra-clear, Quick Seal);
- rifrattometro;
- piastre sterili.

5.7.2. Reagenti

- Soluzione di fenolo allo 0,7% sterile, 30 mL;
- soluzioni di saccarosio 2,5 M; 1,6 M; 1,0 M; 50 mL.

L'accuratezza delle concentrazioni è importante e deve essere verificata misurandone l'indice di rifrazione a +20°C (rispettivamente 1,442; 1,410; 1,381).

5.7.3. Terreno di coltura minimale BAP di Murry et al., (1984) in g L⁻¹

| | | | |
|--------------------------------------|-------|---------------|--------|
| MgSO ₄ •7H ₂ O | 0,02 | Na Propionato | 0,81 |
| CaCl ₂ •2H ₂ O | 0,01 | Fe Citrato | 1,00** |
| Oligoelementi | 1,00* | pH | 6,8 |

(*) mL della seguente soluzione (g L⁻¹):

H₃BO₃ 1,5; ZnSO₄•7H₂O 0,6; CuSO₄•7H₂O 0,1; MnCl₂•4H₂O 0,57; Na₂MoO₄ 0,0333; CoCl₂•6H₂O 0,083.

(**) mL della seguente soluzione (g L⁻¹):

FeNH₄ Citrato 10; Acido Citrico 10.

5.7.4. Procedura consigliata

- Allestire il gradiente discontinuo versando, in successione, lungo la parete di un tubo da ultracentrifuga da 100 mL trasparente e perforabile: 30 mL di soluzione di saccarosio 2,5 M, 30 mL di soluzione 1,6 M e 20 mL di soluzione 1 M;
- deporre 5 g di suolo in una beuta da 50 mL, aggiungere 25 mL di soluzione di fenolo e incubare in agitazione per 30 minuti;
- trasferire la sospensione di suolo sulla superficie del gradiente e centrifugare fino all'equilibrio (100.000 g per 3 ore). Gli autori fanno presente che l'equilibrio può essere raggiunto anche con una centrifuga da banco in un'ora a 600 giri;
- recuperare in una provetta sterile le cellule di *Frankia* (concentrate all'interfaccia tra le fasi 2,5 M e 1,6 M) forando il fondo del tubo con un ago sterile e lasciando uscire per gravità;
- diluire serialmente per 5 volte con fattore 10 e seminare le sospensioni in profondità, in 10 piastre per diluizione, su terreno minimale agarizzato;
- incubare a +28°C per 3-6 settimane, eliminando giornalmente le piastre visibilmente contaminate da funghi e batteri; le colonie di *Frankia* si possono distinguere microscopicamente da quelle degli altri attinomiceti in quanto si sviluppano molto lentamente a partire dai mazzetti di ife e diazovesicole presenti originariamente nei tessuti del nodulo;
- quando le colonie di *Frankia* sono visibili ad occhio nudo (20-30 giorni), trasferirle individualmente in terreno liquido, confermando l'isolamento con osservazione microscopica.

5.7.5. Osservazioni

Il metodo originale risulta eccessivamente complicato e, richiedendo un'ultracentrifuga refrigerata, non è utilizzabile da tutti i laboratori. Successive ricerche nel laboratorio del Dr. Baker hanno stabilito che l'equilibrio di separazione delle cellule di *Frankia* si può raggiungere in meno di un'ora anche con una centrifuga da banco con rotore basculante; la separazione delle fasi può, inoltre, essere evidenziata mediante colorazione delle tre soluzioni di saccarosio con coloranti da pasticceria (1 goccia; Baker, 1988 comunicazione personale).

L'aggiunta di fenolo alla sospensione di suolo riduce la popolazione batterica contaminante senza inibire *Frankia* spp., per incubazioni brevi. Nonostante l'impiego di terreni di coltura minimali privi di azoto combinato, la microflora contaminante risulta spesso preponderante, per cui il metodo necessita molte ripetizioni ed una delicata messa a punto.

5.8. Metodi indiretti

Negli ultimi 20 anni sono state sperimentate con successo numerose tecniche per l'isolamento di *Frankia* spp., nessuna delle quali garantisce, però, il 100% di riuscita. I quattro metodi qui descritti sono risultati adatti all'uso routinario: microdissezione (Lalonde e Calvert, 1979), filtrazione differenziale (Benson, 1982), diluizioni seriali (Diem et al., 1982) e frazionamento in gradiente di saccarosio (Baker e O'Keefe, 1984). La scelta dell'uno o dell'altro è a discrezione del ricercatore o sull'equipaggiamento del laboratorio. In tutti i casi i noduli radicali indotti sulle piante trappola devono essere prelevati e manipolati in condizioni di asetticità, separando i singoli lobi e asportando completamente le particelle di suolo aderite alla superficie esterna, per mezzo di ripetuti lavaggi in soluzioni detergenti. La conservazione dei campioni prima dell'isolamento, può avvenire a +4°C per pochi giorni, o a -20°C. Poiché le piante vengono inoculate con sospensioni di suolo, esse sono verosimilmente venute a contatto con l'intera microflora: di fondamentale importanza risultano, quindi, le pratiche di disinfezione superficiale dei noduli.

5.9. Microdissezione (Lalonde e Calvert, 1979)

È probabilmente il metodo più usato: si basa sull'incubazione dei tessuti infettati del nodulo in un terreno ricco, che favorisce la crescita delle microife di *Frankia* fuori dai tessuti vegetali.

5.9.1. Materiali ed apparecchiature

- Cappa aspirante;
- cappa a flusso laminare;
- piastre sterili;
- provette con tappo di cotone;
- bisturi con manico metallico;
- pinzetta metallica;
- termostato.

5.9.2. Reagenti

Soluzione di OsO₄ all'1% in H₂O: in cappa aspirante, porre una fiala da 250 mg in una bottiglia da 100 mL, rompere il vetro della fiala con una bacchetta di vetro, aggiungere 25 mL di H₂O distillata, tappare e agitare fino a completa dissoluzione. Attenzione, l'OsO₄ è estremamente tossico, manipolare sempre con i guanti e sotto cappa aspirante.

5.9.3. Terreno di isolamento Qmod in g L⁻¹

| | | | |
|--------------------------------------|-------|----------------------------------|--------|
| K ₂ HPO ₄ | 0,30 | NaH ₂ PO ₄ | 0,20 |
| MgSO ₄ •7H ₂ O | 0,20 | KCl | 0,20 |
| Estratto di Lievito | 0,50 | Peptone | 5,00 |
| Glucosio | 10,00 | Fe Citrato | 1,00** |
| Oligoelementi | 1,00* | CaCO ₃ | 0,10 |
| Lecitina di soia | 0,05 | Tween 80 | 2,00 |
| pH 6,8 | | | |

(*) mL della seguente soluzione (g L⁻¹):

H₃BO₃ 1,5; ZnSO₄•7H₂O 0,6; CuSO₄•7H₂O 0,1; MnCl₂•4H₂O 0,57; Na₂MoO₄ 0,0333; CoCl₂•6H₂O 0,083.

(**) mL della seguente soluzione (g L⁻¹):

FeNH₄ Citrato 10; Acido Citrico 10.

5.9.4. Procedura consigliata

- In cappa aspirante, sterilizzare la superficie esterna e gli strati superficiali del lobo mediante immersione per 30-60 secondi nella soluzione di acido osmico; recuperare la soluzione usata e lavare abbondantemente con acqua sterile;
- in cappa a flusso laminare, tagliare il lobo in pezzettini o fettine con bisturi sterile, sul fondo di una piastra sterile;
- trasferire ciascun frammento in una provetta di terreno liquido (o includere nella massa di terreno solido, in piastra). Allestire 30-50 ripetizioni in quanto un'elevata percentuale di tubi risulta normalmente contaminata da microrganismi estranei non uccisi;
- incubare per 3-6 settimane a +28°C, eliminando tempestivamente i tubi contaminati (un'estesa crescita dopo qualche giorno di incubazione è sintomo di contaminazione);
- *Frankia* sp. forma colonie fiocose chiare sul fondo della provetta; confermare sempre l'isolamento, mediante esame microscopico a fresco, in contrasto di fase: la presenza di sporangi multiloculari è

l'unico carattere morfologico diagnostico per questo genere di attinomiceti.

Note:

L'impiego di OsO_4 è estremamente pericoloso, ma l'effetto sterilizzante risulta abbastanza riproducibile. Il fatto che le cellule di *Frankia* restino lungamente in contatto con i composti fenolici (batteriostatici) presenti nella maggior parte dei noduli, sembra alla base di molti insuccessi. Risulta piuttosto difficile discriminare *Frankia* dagli altri attinomiceti, nelle prime fasi di sviluppo delle colonie in provetta: sono quindi indispensabili molti controlli di purezza nella fase di moltiplicazione delle colture.

5.10. Filtrazione Differenziale (Benson, 1982)

Si basa sulla separazione precoce delle cellule di *Frankia* dai tessuti nodulari, mediante filtrazione differenziale e sulla loro incubazione in terreno complesso.

5.10.1. Materiali ed apparecchiature

- Mortaio e pestello (oppure Potter) sterili;
- piastre sterili;
- provette sterili contenenti 9 mL di terreno FM;
- pipette Pasteur sterili; termostato;
- cappa a flusso laminare.
- Dispositivo di filtrazione differenziale descritto dall'Autore (Benson, 1982) sostituibile da due apparati di filtrazione dotati di membrane con pori di 50 μm e 20 μm , rispettivamente, sterilizzabili in autoclave.

5.10.2. Reagenti

- H_2O distillata sterile;
- NaClO 1%;
- terreno di isolamento FM in g L^{-1} .

| | | | |
|--------------------------|---------|---|--------|
| K_2HPO_4 | 3,00 | KH_2PO_4 | 2,00 |
| NaCl | 0,30 | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,20 |
| Na Piruvato | 3,00 | Casaminoacidi | 3,00 |
| Oligoelementi | 1,00* | Fe EDTA | 0,20** |
| Vitamine | 1,00*** | pH 6,9 | |

(*) mL della seguente soluzione (g L^{-1}):

H_3BO_3 1,5; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6; $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,57; Na_2MoO_4 0,0333; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,083.

(**) mL della seguente soluzione (g L^{-1}):

Na_2EDTA 29,8; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 24,9.

(***) mL della seguente soluzione (g L^{-1}):

Tiamina Cloridrato 0,1; Piridossina Solfato 0,5; Acido nicotinico 0,5.

5.10.3. Procedura consigliata

- In cappa a flusso laminare: disinfettare 4-15 lobi per ogni nodulo con la soluzione di ipoclorito per 5 minuti agitando;
- lavare 5 volte con abbondante H_2O distillata sterile e trasferire in mortaio;
- omogeneizzare in 5 mL di terreno FM liquido;
- trasferire la sospensione nell'apparato di filtrazione da 50 μm , lasciando filtrare per gravità;
- lavare con 30 mL di terreno FM e trasferire il filtrato nell'apparato di filtrazione da 20 μm , lasciando filtrare per gravità;
- lavare i mazzetti di vescicole per 2 volte con 30 mL di terreno FM;
- trasferire i mazzetti di ife in una provetta sterile mediante una pipetta Pasteur sterile;

- diluire serialmente e seminare in piastra (in profondità) in terreno FM agarizzato;
- incubare a +28°C per 2-4 settimane, controllando microscopicamente lo sviluppo di micelio a partire dai mazzetti di ife;
- quando le colonie sono visibili ad occhio nudo (20-30 giorni), trasferirle individualmente in terreno liquido, confermando l'isolamento con osservazione microscopica.

5.10.4. Osservazioni

Escludendo la maggior parte dei microrganismi contaminanti e dei composti inibitori, questo metodo è risultato efficace nel 91% dei casi. L'asportazione di tutti i composti di origine vegetale, però, sfavorisce l'isolamento dei ceppi di *Frankia* che richiedono fattori di crescita sconosciuti.

5.11. Diluizioni Seriali (Diem et al., 1982; Margheri et al., 1984)

È il metodo classico della batteriologia, adattato all'isolamento di *Frankia* spp. dopo arricchimento nei tessuti nodulari. Si basa sulla separazione fisica di *Frankia* sp. dai frammenti vegetali e da eventuali contaminanti mediante diluizione e semina in terreno solido. Il contatto con i composti inibenti (polifenoli) viene ridotto per diluizione, senza escludere totalmente dal terreno eventuali fattori di crescita presenti nei tessuti vegetali.

5.11.1. Materiali ed apparecchiature

- Omogeneizzatori di tessuti (Potter o mortaio) di vetro sterilizzati;
- piastre sterili;
- provette sterili contenenti 9 mL di terreno liquido;
- pipette di vetro da 1 mL, a bocca larga (diametro 3-4 mm) sterili;
- termostato;
- cappa a flusso laminare.

5.11.2. Reagenti

- H₂O distillata sterile;
- H₂O₂ 30%.

5.11.3. Terreno di isolamento Tween 80/NH₄⁺ (Blom et al., 1980) in g L⁻¹

| | | | |
|--------------------------------------|---------|----------------------------------|--------|
| KH ₂ PO ₄ | 0,30 | Na ₂ HPO ₄ | 0,20 |
| MgSO ₄ •7H ₂ O | 0,20 | NH ₄ Cl | 0,02 |
| CaCl ₂ •2H ₂ O | 0,02 | Tween 80 | 2,00 |
| Oligoelementi | 1,00* | Fe EDTA | 1,00** |
| Vitamine | 1,00*** | pH | 7,0 |

(*) mL della seguente soluzione (g L⁻¹):

H₃BO₃ 1,5; ZnSO₄•7H₂O 0,6; CuSO₄•7H₂O 0,1; MnCl₂•4H₂O 0,57; Na₂MoO₄ 0,0333; CoCl₂•6H₂O 0,083.

(**) mL della seguente soluzione (g L⁻¹):

Na₂ EDTA 29,8; FeSO₄•7H₂O 24,9.

(***) mL della seguente soluzione (g L⁻¹):

Tiamina Cloridrato 0,1; Piridossina Solfato 0,5; Acido nicotinico 0,5.

5.11.4. Procedura consigliata

- Disinfettare i lobi per 15 minuti in H₂O₂ al 30%;
- lavare 10 volte in acqua distillata sterile, e trasferire singolarmente in Potter;
- omogeneizzare delicatamente in 3 mL di terreno liquido;
- utilizzando le pipette a punta rotta, diluire serialmente la sospensione per tre volte di un fattore 10, con il terreno liquido;
- seminare 5 piastre per ogni diluizione, in profondità, nello stesso terreno addizionato di Agaragar all'1%;
- incubare per 15-30 giorni a +27°C; esaminare le piastre, prima ad occhio nudo in luce incidente su un fondo scuro e poi al microscopio, ogni giorno a partire dalla seconda settimana;
- prelevare le colonie di *Frankia*, riconoscibili al microscopio per la presenza dei tipici sporangi, eseguendo una "carota" con un'ansa sterile e isolarle in provette contenenti terreno liquido.

5.11.5. Osservazioni

È molto importante disinfettare accuratamente i noduli. In caso di elevate concentrazioni di polifenoli, può essere inoltre opportuno asportare gli strati superficiali del nodulo, in condizioni asettiche, prima della frantumazione. Questo metodo, come quello di Benson, permette l'identificazione precoce delle colonie di *Frankia* al microscopio, prima che l'incremento di densità impedisca l'individuazione di eventuali attinomiceti contaminanti. Con questo metodo sono stati isolati più di 50 ceppi puri di *Frankia* spp. della nostra collezione.

5.12. Frazionamento in Gradiente di Saccarosio (Baker e O'Keefe, 1984)

È l'estensione del Metodo Diretto all'isolamento di *Frankia* da noduli radicali indotti.

5.12.1. Materiali ed apparecchiature

Come nel Metodo Diretto, più un Potter da 50 mL sterile.

5.12.2. Reagenti

Come per il Metodo Diretto.

5.12.3. Procedura consigliata

- Allestire il gradiente discontinuo di saccarosio come descritto per il metodo diretto (primo paragrafo);
- in cappa a flusso laminare: disinfettare numerosi lobi per ogni nodulo con la soluzione di ipoclorito, agitando per 5 minuti;
- lavare 5 volte con abbondante H₂O distillata sterile;
- omogeneizzare in 25 mL della soluzione di fenolo sterile per mezzo di Potter o mortaio (sterilizzati);
- trasferire la sospensione sulla superficie del gradiente e centrifugare fino all'equilibrio (come al punto 3 del metodo diretto);
- recuperare le cellule di *Frankia* come indicato nel Metodo Diretto, diluire serialmente e seminare in un terreno di coltura agarizzato, per esempio il Qmod (Lalonde e Calvert, 1979) o l'FM (Benson, 1982);
- Incubare e isolare le colonie come descritto negli altri metodi.

5.12.4. Osservazioni

Come per il Metodo Diretto. In questo caso, però, la percentuale di successo è molto maggiore.

Posizione Italiana

Metodo Ufficiale n° III.4
Supplemento Ordinario G.U. n. 179
dell'1.08.2002

Posizione Internazionale

Assente

5.13. Bibliografia

- Akimov V.N., Dobritsa S.V. (1992), *Grouping Frankia strains on the basis of DNA relatedness*. Systematic and Applied Microbiology, 15, 372-379.
- Antonelli F., Bosco M., Lumini E., Favilli F. (1992), *Survival of Frankia spp. Strains introduced in a disturbed soil*. In "Abstracts" of Sixth International Symposium on Microbial Ecology (ISME-6). Barcellona, 4-11 September, p. 160.
- Baker D.D. (1987), *Relationships among pure cultured strains of Frankia based on host-specificity*. Physiologia. Plantarum, 70, 245-248.
- Baker D. and O'Keefe D. (1984), *A modified sucrose fractionation procedure for the isolation of Frankiae from actinorhizal root nodules and soil samples*. Plant and Soil, 78, 23-28.
- Baker D.D., Schwintzer C.R. (1990), *Introduction*. In: "The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants". C. R. Schwintzer and J. D. Tjepkema (eds.). Academic Press, Inc., San Diego. pp. 1-13.
- Benson D.R. (1982), *Isolation of Frankia strains from alder actinorhizal root nodules*. Applied and Environmental Microbiology, 44, 461-465.
- Blom J., Roelofsen W., Akkermans A.D.L. (1980), *Growth of Frankia AvcII in media containing Tween 80 as C-source*. FEMS Microbiology Letters, 9, 131-135.
- Bosco M., Buresti E., Moiroud A., Materassi R. (1992), *Biomass production improvement and soil reclamation by nitrogen fixing actinorhizal plants in two disturbed sites*. In: "Biomass for Energy, Industry and Environment" (G. Grassi, A. Collina, E. Zibetta eds.) Elsevier Applied Science, London, pp. 128-132.
- Callahan D., Del Tredici P., Torrey J.G. (1978), *Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in Comptonia*. Science, 199, 899-902.
- Diem H.G., Gauthier D., Dommergues Y.R. (1982), *Isolation of Frankia from nodules of Casuarina equisetifolia*. Canadian Journal of Microbiology, 28, 526-530.
- Dommergues Y. R., Bosco M. (1998), *The contribution of N₂-fixing trees to soil productivity and rehabilitation in tropical, subtropical and Mediterranean regions*. pp. 65-96. In: N.S. Subba Rao and Y.R. Dommergues (ed.), Microbial interactions in agriculture and forestry. Oxford and IBH Publishing Co, New Delhi.
- Fernandez M.P., Meugnier H., Grimont P.A.D., Bardin R. (1989), *Deoxyribonucleic acid relatedness among members of the genus Frankia*. International Journal of Systematic Bacteriology, 39, 424-429.
- Hilger A.B., Myrold D.D. (1992), *Quantitation of soil Frankia by bioassay and gene probe methods: response to host and non-host rhizospheres and liming*. Acta Oecologica, 13, 505-506.
- Hoagland D.R., Arnon D.I. (1950), *The water-culture method for growing plants without soil*. Circular of California Agricultural Experimental Station No. 347. Berkeley, CA.
- Isopi R., Lumini E., Frattegiani M., Puppi G., Bosco M., Favilli F., Buresti E. (1994), *Inoculation of Alnus cordata with selected microsymbionts: effects of Frankia and Glomus spp. on seedling growth and development*. Symbiosis, 17, 237-245.
- Lalonde M., Calvert H.E. (1979), *Production of Frankia hyphae and spores as an infective inoculant for Alnus species*. In: Gordon JC, Wheeler CT, Perry DA (eds) "Symbiotic nitrogen fixation for use in temperate forestry". Oregon State University, Corvallis, OR, pp. 96-110.
- Lalonde M., Simon L., Bousquet J., Séguin A. (1988), *Advances in the taxonomy of Frankia: recognition of species alni and elaeagni and novel subspecies pommerii and vandijkii*. In: H. Bothe, F. J., de Bruijn, and W. E. Newton (eds.), "Nitrogen fixation: hundred years after". Gustav Fischer, Stuttgart, New York, pp. 671-680.
- Lechevalier M.P. (1983), *Cataloging Frankia strains*. Canadian Journal of Botany, 61, 2964-2967.
- Lechevalier M.P., Lechevalier H.A. (1989), *Genus Frankia Brunchorst* In S.T. Williams, M. E. Sharpe and J. G. Holt (eds.), "Bergey's manual of systematic bacteriology", Vol. 4, William & Wilkins, Baltimore. 1886, 174 AL, pp. 2410-2417.
- Lechevalier, M.P., Lechevalier H.A. (1990), *Systematics, Isolation, and Culture of Frankia*. In C.R. Schwintzer and J.D. Tjepkema (eds.), "The Biology of Frankia and actinorhizal plants". Academic Press, Inc., San Diego, pp. 35-60.
- Lumini E., Bosco M., Puppi G., Isopi R., Frattegiani M., Buresti E., Favilli F. (1994), *Field performance of Alnus cordata Loisel. (Italian alder) inoculated with Frankia and VA-mycorrhizal strains in mine-spoil afforestation plots*. Soil Biology and Biochemistry, 26, 659-661.
- Lumini E., Bosco M. (1999), *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphisms for assessing and increasing biodiversity of Frankia culture collections*. Canadian Journal of Botany, 77, 1261-1269.
- Lumini E., Bosco M., Fernandez M.P. (1996), *PCR-RFLP and total DNA homology revealed three related genomic species among broad-host-range Frankia strains*. FEMS Microbiology Ecology, 21, 303-311.
- Margheri M.C., Tredici M.R., Florenzano G. (1984), *Gli attinomiceti del genere Frankia: metodi d'isolamento e d'inoculazione*. In: "Atti del Colloquio SISS Biotecnologia del suolo" a cura di W. Balloni. Firenze, 1984.
- Murry M.A., Fontaine M.S., Torrey J.G. (1984), *Growth kinetics and nitrogenase induction in Frankia sp. HFPArI3 grown in batch culture*. Plant and Soil, 78, 61-78.
- Nalin R., Normand P., Simonet, Domenach A.M. (1999), *Polymerase Chain Reaction and hybridization on DNA extracted from soil as a tool for Frankia spp. Population distribution studies in soil*. Canadian Journal of Botany, 77, 1239-1247.
- Nazaret S., Cournoyer B., Normand P., Simonet P. (1991), *Phylogenetic relationships among Frankia genomic species determined by use of amplified 16S rDNA sequences*. Journal of Bacteriology, 173, 4072-4078.
- Picard C., Ponsonnet C., Paget E., Nesme X., Simonet P. (1992), *Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction*. Applied and Environmental Microbiology, 58, 2717-2722.
- Prin Y., Duhoux E., Diem H.G., Roederer Y., Dommergues Y.R. (1991), *Aerial nodules in Casuarina cunninghamiana*. Applied and Environmental Microbiology, 57, 871-874.
- Rodriguez-Barrueco C. (1968), *The occurrence of the root nodule endophyte of Alnus glutinosa and Myrica gale in soils*. Journal of General Microbiology, 52, 189-194.
- Simonet P., Bosco M., Chapelon C., Moiroud A., Normand P. (1994), *Molecular characterization of Frankia microsymbionts from spore positive and spore negative nodules in a natural alder stand*. Applied and Environmental Microbiology, 60, 1335-1341.
- Smolander A., Sundman V. (1987), *Frankia in acid soils of forests devoid of actinorhizal plants*. Physiologia Plantarum, 70, 297-23.

- Smolander A., Van Dijk C., Sundman V. (1988), Survival of Frankia strains introduced into soil. *Plant and Soil*, 106, 65-72.
- Sprent J.I., Sprent P. (1990), *Nitrogen Fixing Organisms: Pure and Applied Aspects*. Chapman & Hall, London.
- Tjepkema J.D., Torrey J.G. (1979), *Symbiotic nitrogen fixation in actinomycete-nodulated plants*. Preface. *Botanical Gazette* (Chicago), Suppl., 140, i-ii.
- Toomsan B., Rupela O.P., Mittal S., Dart P.J., Clark K.W. (1984), *Counting Cicer-Rhizobium using a plant infection technique*. *Soil Biology and Biochemistry*, 16, 503-507.
- Tortosa R.D., Cusato M. (1991), *Effective nodulation of rhamnaceous actinorhizal plants induced by air dry soils*. *Plant and Soil*, 131, 229-233.
- Van Dijk C. (1979), *Endophyte distribution in soil*. In: "Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests" (J.C. Gordon, C.T. Wheeler and D.A. Perry, Eds.), Forest Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis, pp. 84-94.
- Van Dijk C. (1984), *Ecological Aspects of Spore Formation in the Frankia-Alnus Symbiosis*. Ph. D. Thesis. University of Leiden, The Netherlands.

Marco Bosco

Sezione di Microbiologia Applicata del Dipartimento
di Biotecnologie Agrarie
Università degli Studi
Piazzale delle Cascine, 24
50144 Firenze

1^a ed. 2002

Coordinatori dei metodi:
Picci G., Nannipieri P.

Direttore della collana:
Paolo Sequi

Erica Lumini

Sezione di Microbiologia Applicata del Dipartimento
di Biotecnologie Agrarie
Università degli Studi
Piazzale delle Cascine, 24
50144 Firenze

6. Batteri proteolitici e ammonificanti

di Luigi Allievi

6.1. Introduzione

L'azoto organico di varia origine presente nel suolo è prevalentemente sotto forma di proteine. La capacità di degradare le proteine è ampiamente diffusa nella microflora, così come è presente in organismi vegetali e animali. I primi due passaggi del processo sono un'idrolisi ad opera di vari tipi di enzimi, che porta dalla molecola proteica a peptoni, peptidi ed infine a singoli aminoacidi, e la successiva deaminazione che libera il gruppo aminico NH_2 come NH_3 , prima forma di azoto inorganico a comparire.

A questi due successivi processi possono essere fatti corrispondere due distinti gruppi fisiologici di microorganismi, i proteolitici, idrolizzanti, e gli ammonizzanti o ammonificanti, mineralizzatori ad ammonio. Moltissimi batteri, aerobi ed anaerobi e compresi gli attinomiceti, nonché funghi, sono in grado di mineralizzare l'azoto organico proteico.

La capacità proteolitica può essere evidenziata dalla crescita in terreni colturali a base di proteine o, più specificamente, dalla capacità di fluidificare la gelatina, idrolizzando questo materiale proteico ed impedendogli così di gelificare. Si può effettuare una conta in piastra con terreni colturali gelificati con la sola gelatina, contando le colonie in corrispondenza delle quali si ha appunto fluidificazione, ma ciò impedisce l'incubazione oltre i $+20^\circ\text{C}$. D'altra parte impiegando agar come gelificante accanto alla gelatina, l'idrolisi di quest'ultima deve venire evidenziata con appositi reattivi. Tutto sommato si ritiene più semplice ed affidabile ricorrere alla metodica del MPN utilizzando un terreno colturale a base di gelatina in provetta ed incubando anche per la ricerca di questo gruppo microbico a $+28^\circ\text{C}$. La perdita della gelificabilità viene evidenziata a fine incubazione abbassando la temperatura a pochi gradi.

Il saggio più specifico per l'avvenuta ammonificazione è invece l'accumulo, in condizioni non limitanti per l'azoto, di $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, rilevabile con reattivi quali quello di Nessler. Si può perciò ricorrere a terreni colturali liquidi per il calcolo del MPN, nei quali viene appunto ricercato qualitativamente l'ammonio come criterio per assegnare la positività di crescita.

6.2. Soluzioni, terreni colturali e reattivi

6.2.1. Soluzione di oligoelementi (Pochon & Tardieux, 1962)

- In 1 litro di acqua distillata, 50 mg ciascuno di $\text{K}_2\text{MoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; MnSO_4 , CdSO_4 ; $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 100 mg di FeCl_3 ; può essere stoccata non sterile. Far passare una corrente di CO_2 nella soluzione.
- Soluzione di Winogradsky (Pochon & Tardieux, 1962): per litro di acqua distillata: K_2HPO_4 5 g; MgSO_4 2,5 g; NaCl 2,5 g; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 50 mg, MnSO_4 50 mg, soluzione di oligoelementi 1 mL; sterilizzare.
- Reattivo di Nessler: Soluzione A: HgI_2 50 g; KI 36,5 g; H_2O distillata 1000 mL; tritare in mortaio; Soluzione B: KOH 150 g; H_2O distillata 1000 mL. Al momento dell'uso mescolare le due soluzioni in parti uguali.
- Terreno colturale per proteolitici (Pochon & Tardieux, 1962): soluzione di oligoelementi 1 mL; soluzione di Winogradsky 50 mL; gelatina 30 g; portare a 1000 mL con acqua distillata; la gelatina va sciolta a caldo; fino alla distribuzione nelle provette il terreno colturale va mantenuto nettamente sopra i $+20^\circ\text{C}$; regolare il pH a 7,2; distribuire in provette da circa 20 mm di diametro, 4 mL ciascuna, e sterilizzare a $+110^\circ\text{C}$ per 20 minuti.
- Terreno colturale per ammonificanti (Pochon & Tardieux, 1962): in 950 mL di acqua distillata, soluzione di Winogradsky 50 mL; soluzione di oligoelementi 1 mL; asparagina 0,2 g; regolare il pH a 6,8;

distribuire in provette da circa 20 mm di diametro, 10 mL ciascuna, e sterilizzare a +110°C per 20 minuti.

6.3. Procedura consigliata per i proteolitici

Si effettua una conta mediante MPN in un terreno colturale che si presenta liquido a temperature superiori a circa +20°C. Seminare aliquote di 1 mL delle sospensioni-diluizioni del campione, indicativamente da 10^{-3} a 10^{-9} . Incubare a +28°C per 15 giorni. Porre per 1 ora in bagnomaria a pochi °C. Le provette in cui il terreno colturale si è mantenuto liquido vengono considerate positive per la crescita dei proteolitici.

6.4. Procedura consigliata per gli ammonificanti

Si effettua un conteggio mediante MPN in terreno colturale liquido. Seminare aliquote di 1 mL delle sospensioni-diluizioni del campione, indicativamente da 10^{-3} a 10^{-9} . Incubare a +28°C per 15 giorni. Su 1 mL di coltura posto in provetta pulita (conservare il resto per eventuali verifiche) far cadere 2 gocce di reattivo di Nessler. La presenza di ammonio denotante crescita di ammonificanti è rivelata da una colorazione arancio più o meno spiccata.

Posizione Italiana

Metodo Ufficiale n° III.5
Supplemento Ordinario G.U. n. 179
dell'1.08.2002

Posizione Internazionale

Assente

6.5. Bibliografia

Pochon J., Tardieux P. (1962), *Techniques d'Analyse en Microbiologie du Sol*. Editions De La Tourelle, St.Mandé, France.

Luigi Allievi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e
Microbiologiche
Sezione Microbiologia Agraria, Alimentare, Ecologica
Università degli Studi di Milano
Via Celoria, 2
20133 Milano

1^a ed. 2002

Coordinatori dei metodi:
Picci G., Nannipieri P.

Direttore della collana:
Paolo Sequi

7. Batteri nitrificanti

di Luigi Allievi

7.1. Introduzione

Anche se è ormai assodata l'esistenza di una nitrificazione eterotrofa ad opera di alcuni batteri e muffe, importante tuttavia solo in ambienti e situazioni particolari, la massima parte dell'ossidazione dell'ammonio a nitrito ed infine a nitrato nel terreno è condotta da batteri chemio-autotrofi aerobi obbligati estremamente specializzati e appartenenti esclusivamente al Sottogruppo 3, Batteri Nitrificanti.

La coltivazione e la determinazione della carica dei due gruppi di nitrificanti, i nitrosanti (ammonio-ossidanti) e i nitrificanti (nitrito-ossidanti), possono essere condotte su terreni colturali agarizzati o supportati da gel di silice (Soriano & Walker, 1973; Mahasneh et al., 1984), ma presentano alcuni gravi problemi che la rendono poco vantaggiosa: in particolare, è pressoché impossibile raggiungere la completa selettività per gli autotrofi, evitando la crescita di eterotrofi su tracce di sostanza organica; inoltre, le colonie di nitrificanti sono a malapena visibili ad occhio nudo. Sono stati anche proposti metodi in cui la presenza di colonie nitrificanti viene indirettamente evidenziata con l'uso di reattivi chimici, ma la procedura appare delicata e di uso specialistico (Finstein, 1968).

I sistemi di conteggio tuttora più semplici ed affidabili prevedono in effetti terreni colturali minerali liquidi, in cui non si evita la crescita di eterotrofi ma è la rilevazione del risultato ad essere estremamente selettiva dato l'uso di reattivi specifici per nitriti e nitrati. I risultati ottenuti appaiono in buon accordo con quelli di metodi di ricerca più sofisticati quali l'impiego di anticorpi fluorescenti. Unico inconveniente è la lentezza di crescita dei nitrificanti autotrofi: si può a volte arrivare a 55 giorni per avere la massima conta dei nitrosanti e addirittura a 100 per i nitrificanti. Questo risulta dipendere anche dalle specie batteriche coinvolte. Il pH considerato ottimale per le varie specie è 7,5-8; terreni colturali con pH oltre 8 hanno a volte fornito risultati poco attendibili (Belser, 1979; Watson et al., 1989). Può facilitare la rilevazione del risultato la presenza nel terreno colturale di un indicatore di pH, il cui viraggio costituisce un buon indizio della crescita di nitrificanti, da confermare con i reattivi specifici (Schmidt & Belser, 1982).

7.2. Soluzioni, terreni colturali e reattivi

7.2.1. Soluzione di Winogradsky (Pochon & Tardieux, 1962)

Per litro di acqua distillata: K_2HPO_4 5 g; $MgSO_4$ 2,5 g; NaCl 2,5 g; $Fe_2(SO_4)_3$ 50 mg; $MnSO_4$ 50 mg, soluzione di oligoelementi 1 mL; sterilizzare a +110°C per 20 minuti.

7.2.2. Soluzione di oligoelementi (Pochon & Tardieux, 1962)

Disciogliere in 1 litro di acqua distillata 50 mg ciascuno di $K_2MoO_4 \cdot 5H_2O$, $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, $MnSO_4$, $CdSO_4$, $CuSO_4 \cdot H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ e 100 mg di $FeCl_3$; può essere stoccata non sterile. Far passare una corrente di CO_2 nella soluzione.

7.2.3. Terreno colturale per nitrosanti (Pochon & Tardieux, 1962)

Aggiungere a 950 mL di acqua distillata: soluzione di Winogradsky 50 mL; $(NH_4)_2SO_4$ 0,5 g, $CaCO_3$ 1 g; portare il pH a 7,5; distribuire in provette da circa 16 mm di diametro, 2 mL ciascuna, e sterilizzare a +110°C per 20 minuti; con la sterilizzazione il pH può aumentare lievemente.

7.2.4. Terreno colturale per nitrificanti (Pochon & Tardieux, 1962)

In 950 mL di acqua distillata: soluzione di Winogradsky 50 mL; NaNO_2 1 g; CaCO_3 1 g; portare il pH a 8; distribuire in provette da circa 16 mm di diametro, 2 mL ciascuna, e sterilizzare a $+110^\circ\text{C}$ per 20 minuti; con la sterilizzazione il pH può diminuire lievemente.

Reattivo alla difenilamina: sciogliere 1 g di difenilamina in 100 mL di H_2SO_4 95-97%; versare in 20 mL di acqua distillata (non versare l'acqua nell'acido, per evitare pericolosi spruzzi).

7.3. Procedura consigliata

Si effettua una conta mediante MPN in terreni colturali liquidi con pH vicini a 8. Seminare aliquote di 1 mL delle sospensioni-diluizioni del campione da 10^{-1} a 10^{-7} . Incubare a $+28^\circ\text{C}$ per almeno 40 giorni per i nitrosanti e 60 per i nitrificanti. Per una rilevazione più accurata, effettuare rilevazioni settimanali su una goccia di coltura, prelevata senza agitazione per non sollevare la terra nelle prime diluizioni, fino ad avere costanza di MPN per almeno due settimane.

Per la rilevazione dei risultati relativi ai nitrosanti si valuta la comparsa di nitriti e/o nitrati mediante reattivo alla difenilamina, sensibile indifferentemente ai due anioni. Nelle provette in cui sono cresciuti i nitrosanti, ma solo in esse, il nitrito può essere stato ulteriormente ossidato a nitrato ad opera di nitrificanti contemporaneamente presenti. Sarebbe perciò rischioso e fonte di false negatività impiegare un reattivo sensibile ai soli nitriti. In ogni caso se sono presenti solo nitrificanti non si può avere alcuna ossidazione dell'ammonio, perciò il conteggio è riferibile ai soli nitrosanti. Per la rilevazione, su una goccia o pochi decimi di mL di coltura posti in provetta pulita pipettare 0,5 mL di H_2SO_4 95-97% e successivamente 1,5 mL di reattivo. Un colore blu cupo entro pochi secondi indica risultato positivo (presenza di nitrato e/o nitrito).

Per l'evidenziazione della crescita dei nitrificanti, si rileva la presenza di nitrati dopo eliminazione per via chimica degli eventuali nitriti rimasti nel terreno colturale. Si procede perciò dapprima all'aggiunta, a una goccia o pochi decimi di mL di coltura posti in provetta pulita, di circa 50 mg di urea e 0,5 mL di H_2SO_4 20% in acqua. Agitare e bagnare bene tutta la parete interna della provetta. Versare l'eccesso di liquido e lasciare solo un fondo di provetta. Aggiungendo 1,5 mL di reattivo alla difenilamina, la comparsa di blu cupo non può essere dovuta ad altro che a nitrati e costituisce risultato positivo per il test, da utilizzare per il calcolo del MPN.

Posizione Italiana

Metodo Ufficiale n° III.6
Supplemento Ordinario G.U. n. 179
dell'1.08.2002

Posizione Internazionale

Assente

7.4. Bibliografia

- Belser L.W. (1979), *Population ecology of nitrifying bacteria*. Annual Review of Microbiology, 33, 309-333.
- Finstein M.S. (1968), *Enumeration of autotrophic ammonium-oxidizing bacteria in marine waters by a direct method*. Applied Microbiology, 16, 1646-1649.
- Mahasneh A., Budour S., Doddema H. (1984), *Nitrification and seasonal changes in bacterial populations in the rhizosphere of Suaeda and Arthrocnemum species growing in saline soils*. Plant and Soil, 82, 149-154.
- Pochon J., Tardieux P. (1962), *Techniques d'Analyse en Microbiologie du Sol*. Editions De La Tourelle, St.Mandé, France.
- Schmidt E.L., Belser L.W. (1982) *Nitrifying bacteria*. In: Methods of Soil Analysis (A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney, Eds.), Part 2, pp. 1027-1042.
- Soriano S., Walker N. (1973), *The nitrifying bacteria in soils from Rothamsted classical fields and elsewhere*. Journal of Applied Bacteriology, 36, 523-529.
- Watson S.W., Bock E., Harms H., Koops H.P., Hooper A.B. (1989), *Family Nitrobacteraceae Buchanan 1917*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig and J.G. Holt, Eds.). Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 3, pp. 1808-1834.

Luigi Allievi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e
Microbiologiche
Sezione Microbiologia Agraria, Alimentare, Ecologica
Università degli Studi di Milano
Via Celoria, 2,
20133 Milano

1^a ed. 2002

Coordinatori dei metodi:
Picci G., Nannipieri P.

Direttore della collana:
Paolo Sequi

8. Batteri denitrificanti

di Pier Giacomo Arcara

8.1. Introduzione

Le giuste preoccupazioni per i problemi ambientali collegate all'interesse per la questione dei nitrati nelle acque e nel suolo hanno determinato, negli ultimi due decenni, una considerevole attenzione per la denitrificazione. Questo processo consiste nell'eliminazione biologica dei nitrati tramite la loro riduzione ad N_2O e/o N_2 , pertanto la sua intensità può essere valutata o con la determinazione dei prodotti terminali o tramite la verifica della scomparsa del substrato. Mentre la prima via, che richiede attrezzature complesse, è ampiamente seguita per lo studio dell'attività denitrificante nel suo complesso su campioni di suolo o sul suolo indisturbato, la seconda è quella largamente preferita nell'enumerazione dei microrganismi denitrificanti.

Sebbene la riduzione anaerobica dei nitrati ad azoto molecolare sia un processo quasi esclusivamente batterico, i vari metodi di coltura in mezzo liquido proposti nel corso del tempo non sono mai risultati pienamente soddisfacenti, mentre quelli su piastra sono stati scartati per la loro inadeguatezza ad un uso di routine.

Fondamentalmente un buon test per il conteggio dei batteri denitrificanti deve basarsi su due elementi: l'accertamento della scomparsa dell'accettore di elettroni (nitrato o nitrito) aggiunto al mezzo di coltura e la rilevazione della formazione di azoto gassoso che confermi l'avvenuta denitrificazione. La seconda verifica è resa necessaria dal fatto che in condizioni di anaerobiosi (Tiedje, 1982) NO_3^- e NO_2^- possono essere utilizzati da alcuni microrganismi che ne operano la riduzione disassimilativa a NH_4^+ senza giungere al prodotto finale N_2 : ciò permette di evitare la perdita di azoto da parte del sistema.

Scorrendo rapidamente i principali metodi proposti dalla bibliografia possiamo osservare che il limite principale del metodo proposto da Pochon e Tardieux (1962) è dovuto proprio alla possibilità che la maggior parte del gas svolto (e reso visibile con l'intrappolamento sotto una campana di Durham) sia costituita da H_2 e CO_2 piuttosto che da N_2 , in ragione del tipo di substrato carbonico presente nel mezzo di coltura. La tecnica adottata da Alexander (1965), basata su un substrato sostanzialmente simile al precedente ma arricchito di blu di bromotimolo quale indicatore di alcalinizzazione operata dalla denitrificazione, si è rivelata insoddisfacente poiché non ha risolto i problemi relativi ai gas sviluppati e l'attribuzione dell'aumento di pH alla sola denitrificazione è risultato equivoco dal momento che i composti azotati presenti nel mezzo possono liberare ammoniacca.

Sebbene non privo di inconvenienti legati soprattutto alla nocività per l'analista dei reattivi impiegati, il metodo di Focht e Joseph (1973) modificato da Tiedje (1982), continua ad essere il più affidabile e di semplice esecuzione. Esso è basato sull'impiego di un mezzo liquido esente da carboidrati (Nutrient Broth Difco) arricchito con NO_3^- e sull'osservazione della scomparsa del nitrato e della formazione di bolle di N_2 . L'elevata probabilità che le bolle di gas siano costituite, impiegando Nutrient Broth, solo da azoto molecolare è stata accertata da Gamble et al. (1977).

L'uso di NO_2^- al posto di NO_3^- , raccomandato da Volz (1977) per evitare la valutazione di falsi risultati positivi dovuti ai microrganismi che ottengono energia dalla riduzione anaerobica di NO_3^- a NO_2^- , non sembra costituire un reale vantaggio sia per la potenziale tossicità di NO_2^- sia perché microrganismi che operano la riduzione disassimilativa possono trasformare l' NO_2^- in NH_4^+ .

8.2. Vetrerie, terreni colturali e reattivi

Provette per batteriologia 16 x 160, campane di Durham, contenitori a tenuta ermetica (Gaspak anaerobic Jar, BBL).

8.2.1. Terreno colturale per denitrificanti (Focht e Joseph, 1973)

Reidrattare 9 g di Nitrate Broth Difco (Nutrient Broth + nitrato) in 1000 mL di acqua distillata; distribuire in provette da 16 mm di diametro corredate con la campana di Durham (Tiedje, 1982) in ragione di 10 mL per provetta e sterilizzare in autoclave a +120 °C per 15 minuti.

8.2.2. Reattivo di Bray per nitrati e nitriti (Bray, 1945)

Mescolare, dopo triturazione fine in un mortaio, 10 g di $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 g di polvere di zinco, 4 g di acido sulfanilico e 2 g di alfa-naftilamina; aggiungere poi con cura 100 g di BaSO_4 e 75 g di acido citrico. La polvere va conservata in un recipiente scuro, al riparo dalla luce perché la naftilamina è fotosensibile, con viraggio dal grigio al rosa.

8.2.3. Reattivi per l'eliminazione dell'ossigeno nei contenitori ermetici

Gaspak Anaerobic System, BBL.

8.3. Procedura consigliata

Come già indicato sopra si procede ad una conta mediante MPN in mezzo liquido a pH neutro. I tubi con il mezzo di coltura (preferibilmente cinque tubi per diluizione) vengono inoculati con 1 mL delle sospensioni diluizioni del campione di suolo preparate a parte, da 10^{-2} a 10^{-7} , e incubati a +28°C nei contenitori ermetici nei quali si instaurano condizioni di anaerobiosi tramite il sistema Gaspak indicato al paragrafo precedente. Dopo 14 giorni di incubazione si esaminano i tubi per la produzione di gas scartando quelli che non presentano bolle dentro la campana di Durham. Sui rimanenti si procede alla ricerca dell'effettiva scomparsa di nitrati e nitriti nel modo seguente: si svuotano parzialmente i tubi lasciando circa 1 mL di mezzo in ciascun tubo, si aggiungono alcune gocce di acido acetico glaciale e si versa nei singoli tubi della polvere di Bray in quantità pari ad una punta di spatola. L'assenza di colorazione rossa indica che tutto il nitrato è stato denitrificato.

Il numero dei batteri denitrificanti potrà essere determinato annotando i tubi positivi per ciascuna diluizione e facendo riferimento alle tavole statistiche di McCrady o di Cochran.

Posizione Italiana

Metodo Ufficiale n° III.7
Supplemento Ordinario G.U. n. 179
dell'1.08.2002

Posizione Internazionale

Assente

8.4. Bibliografia

- Alexander M. (1965), *Denitrifying bacteria*. In : Methods of soil analysis (Black et al. eds.). Am. Soc. of Agron., Inc., Madison, Wis. Part 2. Agronomy, 9, pp.1484-1486.
- Bray R.H. (1945), *Nitrates tests for soil and plant tissues*, Soil Sci., 60, 219-221.
- Focht D.D., Joseph H. (1973), *An improved method for the enumeration of denitrifying bacteria* Soil Sci. Soc. Am. Proc., 37-5, 698-699.
- Gamble T.N., Betlach M.R., Tiedje J.M. (1977), *Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils*. Appl. Environ. Microbiol., 33, 926-939.
- Pochon J., Tardieux P. (1962), *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*. Editions de la Tourelle, St. Mandé, France.
- Tiedje J.M. (1982), *Denitrification* In: Methods of Soil analysis (Page et al. eds.) Am Soc. of Agron., Inc., Madison, Wis. Part 2, Agronomy, 9, pp.1011-1025.
- Volz M.G. (1977), *Denitrifying bacteria can be enumerated in nitrite broth* Soil Sci. Soc. Am. J., 41, 549-551.

Pier Giacomo Arcara

Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo
Sezione di Biologia del Suolo
Piazza D'Azeglio 30
50121 Firenze.

1^a ed. 2002

Coordinatori dei metodi:
Picci G., Nannipieri P.

Direttore della collana:
Paolo Sequi

9. Gruppi fisiologici del ciclo del carbonio

di Isabella Cacciari e Paola Quatrini

9.1. Introduzione

Una parte considerevole del ciclo del carbonio consiste nella degradazione dei polimeri vegetali e questo processo è particolarmente importante nell'ambiente terrestre. Le piante rappresentano la fonte principale di carbonio organico nel suolo e i microrganismi del suolo sono i maggiori responsabili della trasformazione dei loro polimeri. Come conseguenza dell'attività microbica, l'anidride carbonica viene reintrodotta nell'atmosfera, viene formato materiale umico e composti più semplici vengono resi disponibili alle altre popolazioni microbiche.

La cellulosa, l'amido, la pectina e la lignina sono i principali polimeri di origine vegetale presenti nel suolo.

9.2. Cellulosolitici

La cellulosa costituisce circa 1/3 della biomassa delle piante annuali e circa metà di quelle perenni. Essa è la principale componente delle pareti cellulari delle piante vascolari e delle alghe. Ha una struttura semicristallina ed è composta da lunghe catene di unità di glucosio unite da legami β (1,4) glucosidici. Le catene individuali a loro volta sono unite saldamente da legami idrogeno. La struttura della cellulosa è molto complessa e la sua decomposizione è generalmente lenta. Responsabili della degradazione della cellulosa possono essere funghi, attinomiceti e batteri sia aerobi che anaerobi. La degradazione della cellulosa può avvenire in un ampio spettro di condizioni chimico-fisiche. Esistono due gruppi di microrganismi che svolgono cellulolisi in anaerobiosi: i mesofili (+28-35°C) ed i termofili (+55-70°C). Funghi e attinomiceti sono rari in ambienti anaerobi ed il processo di cellulolisi a carico dei batteri è molto lento. La cellulolisi anaerobia è trascurabile in suoli ben drenati.

La biodegradazione avviene ad opera dell'attività combinata e sinergica di almeno tre differenti gruppi di enzimi esocellulari: le endoglucanasi, le esoglucanasi e le cellobiasi (β -glucosidasi).

9.2.1. Cellulosolitici aerobi: Conta su piastra a doppio strato (Kluepfel, 1988)

L'attività cellulosolitica è dimostrata dall'idrolisi del substrato (cellulosa) aggiunto come unica fonte di carbonio ad un terreno agarizzato distribuito in piastre Petri. Il principio per la determinazione numerica dei microrganismi cellulosolitici è quello della conta per diluizione su piastra, distinguendo le colonie che mostrano l'alone di idrolisi dalle altre. In alternativa al metodo tradizionale si propone un metodo a doppio strato che rende più evidenti gli aloni.

9.2.1.1. Terreno colturale (Tansey, 1971)

- Cellulosa Avicell 5 g (oppure cellulosa trattata con acidi*, 5 g)
- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 2 g
- KH_2PO_4 0,6 g
- K_2HPO_4 0,4 g

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,8 g
- Tiamina 0,1 mg
- Adenina 4 mg
- Adenosina 8 mg
- Estratto di lievito 0,5 g
- Agar 17 g
- H_2O deionizzata 1 L

*(Demain and Solomon, 1986).

(Operare in camera fredda o in bagno di ghiaccio).

Porre 30 gr di cellulosa Whatman® in polvere essiccata all'aria in un beaker da 5 litri. Aggiungere lentamente 800 mL di acido orto-fosforico concentrato (85%) agitando vigorosamente con agitatore magnetico per 2 ore. Aggiungere 2 L di acqua fredda continuando ad agitare. Recuperare il materiale in sospensione centrifugando a 4000 rpm e sospendere il pellet in 5 L di acqua distillata fredda; centrifugare nuovamente. Sospendere il pellet in 1 L di NaCO_3 al 2% e omogeneizzare per 5 minuti alla massima velocità in un omogeneizzatore, lasciando poi per 12 ore a $+4^\circ\text{C}$ (non congelare). Lavare il prodotto in 5 L di acqua distillata fredda su filtro e risospendere in 15 L di acqua distillata fredda. Recuperare centrifugando a 10000 rpm per 5 minuti e successivamente omogeneizzare per 5 minuti. La sospensione ottenuta dovrebbe avere un pH pari a $6,5 \pm 0,1$. Essiccare a $+80^\circ\text{C}$ o utilizzare direttamente calcolando il contenuto di cellulosa della sospensione come media del peso secco di tre campioni da 1 mL ciascuno.

9.2.1.2. Procedura consigliata

Preparare una seconda aliquota di terreno colturale identico al primo ma privo di cellulosa. Sterilizzare entrambe in autoclave a $+121^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Versare nelle piastre Petri un primo strato (15 mL) del terreno colturale privo di cellulosa, lasciar raffreddare e versare un secondo strato (5 mL) del terreno contenente cellulosa. Dopo adeguata asciugatura inoculare le piastre in superficie con le sospensioni-diluizioni di suolo opportune, incubare a $+28^\circ\text{C}$ per 7-14 giorni.

9.2.1.3. Risultati

Contare le colonie totali e successivamente quelle circondate da un alone più trasparente. Esprimere i risultati come numero di organismi cellulolitici per grammo di suolo o come percentuale sugli organismi totali che crescono su questo terreno.

9.2.1.4. Osservazioni

Nonostante sia il metodo più descritto in letteratura esso presenta molte difficoltà di applicazione. Non è sempre facile distinguere l'alone intorno alle colonie soprattutto nei funghi nei quali l'area idrolizzata non si estende intorno al bordo della colonia ma resta nascosta al di sotto di essa. Si suggerisce l'uso di sorbosio (1% p/v) per ridurre la dimensione delle colonie fungine. Una più bassa concentrazione del substrato rende il metodo più sensibile, ma diminuisce il contrasto tra substrato e alone.

Il trattamento della cellulosa con acido solforico dà risultati più apprezzabili.

9.2.2. Conta su piastra con CMC (Kluepfel, 1988)

La carbossimetilcellulosa (CMC) è un derivato solubile della cellulosa che viene facilmente degradato dai microrganismi. Alla fine del periodo di incubazione le piastre vengono trattate con soluzione acquosa di Rosso Congo che evidenzia un alone di idrolisi arancione chiaro intorno alle colonie attive.

9.2.2.1. *Terreno colturale (Hankin et Anagnostakis, 1977)*

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g
- KH_2PO_4 2 g
- Na_2HPO_4 3 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g
- CaCl_2 0,5 mg
- Elementi in tracce* 1 mL
- Estratto di lievito 1 g
- CMC 5 g
- Agar 10 g
- Acqua deionizzata 1 L

*Elementi in tracce: H_3BO_3 10 mg; MnSO_4 10 mg; ZnSO_4 70 mg; CuSO_4 50 mg; MoO_3 10 mg; acqua deionizzata 1 L.

Il pH del terreno colturale raccomandato dagli autori è 7, dato che sia i batteri che la maggior parte dei funghi crescono bene a questo pH. Lo stesso terreno può essere usato a pH 5 per mettere in evidenza quelle specie fungine che non possono svilupparsi a pH superiori.

9.2.2.2. *Procedura consigliata*

Aggiungere lentamente alla soluzione la CMC agitando continuamente. Per ridurre le dimensioni delle colonie fungine aggiungere al terreno prima di autoclavare sorbosio all'1%. Sterilizzare a $+121^\circ\text{C}$ per 20 minuti e versare in piastre Petri. Inoculare le piastre con le sospensioni-diluizioni di suolo ed incubare a $+28^\circ\text{C}$ per 4-9 giorni.

9.2.2.3. *Risultati*

Ricoprire le piastre di una soluzione acquosa (0,1%) di Rosso Congo (20 minuti), rimuovere il colorante, fissare con NaCl 5 M (20 minuti) e rilevare il numero di colonie che presentano un alone più trasparente arancio chiaro.

9.2.2.4. *Osservazioni*

La combinazione ideale agar (1%) e CMC (0,5%) garantisce i risultati migliori in termini di dimensione dell'alone. Un effetto negativo viene esercitato da un elevato grado di sostituzione della CMC.

9.2.3. *Saggio colorimetrico con Remazol Brilliant Blue per MPN (Moore et. al., 1979; Poincelot e Day, 1972)*

Il colorante Remazol Brilliant Blue (RBB) si lega covalentemente alla cellulosa e viene rilasciato nel mezzo per l'azione idrolizzante delle cellulasi microbiche, in proporzione alla frazione di polimero degradata. Il rilascio del colorante nel mezzo offre un metodo sensibile per determinare i tubi positivi nella stima del Most Probable Number (MPN).

9.2.3.1. *Terreno colturale*

Si utilizza lo stesso terreno descritto per il metodo 9.2.2., privo di agar.

9.2.3.2. Preparazione delle strisce di cellulosa

Può essere utilizzato un film trasparente di cellulosa (Cellophane) tagliato in strisce (2x5 cm). Far bollire 100 strisce (3 g) in 500 mL di acqua distillata per due volte per eliminare i plastificanti. Dopo il secondo cambio di acqua sospendere le strisce in ulteriori 500 mL di acqua distillata e riscaldare, sotto agitazione, fino alla temperatura di +80°C. Aggiungere 1,5 g di RBB e successivamente 5 aliquote da 20 mL di soluzione acquosa di Na₂SO₄ (30%) ogni 2 minuti. Aggiungere 2,5 g di Na₃PO₄•12H₂O disciolto in 15 mL di acqua e mantenere alla temperatura di +80°C per 20 minuti. Risciacquare le strisce in acqua calda fino a scomparsa di colorazione e autoclavare a +121°C per 15 minuti in 1 L di acqua distillata per rimuovere ogni traccia di colorante e lasciare asciugare all'aria. Disporre una striscia di cellophane in tubi sterili contenenti il terreno colturale e inoculare con le opportune sospensioni-diluizioni di suolo. Incubare 7-14 giorni a +28°C.

9.2.3.3. Risultati

Sono considerati positivi i tubi che mostrano presenza di colorante nel mezzo colturale. Calcolare il MPN utilizzando le apposite tabelle.

9.2.3.4. Osservazioni

Il film di cellophane trattato con RBB può essere utilizzato anche in alternativa alla cellulosa incorporata nel mezzo colturale per la conta su piastra sovrapponendo un disco del film all'agar.

E' reperibile in commercio una cellulosa in polvere già colorata ("Cellulose azure") da utilizzare in doppio strato in tubi contenenti un terreno minerale agarizzato (Smith, 1977). L'attività cellulosolitica viene evidenziata dal diffondersi del colorante dallo strato superiore a quello inferiore della provetta. In realtà da alcune prove effettuate risulta che una certa diffusione del colorante può avvenire anche nei tubi non inoculati (M. Fenice, comunicazione personale).

9.3. Cellulosolitici anaerobi

9.3.1. Stima del MPN in tubo (Pochon, 1954)

Il metodo si basa sulla stima del MPN di microrganismi cellulosolitici anaerobi rivelati attraverso la degradazione di strisce di carta incubate in anaerobiosi in presenza di sospensioni-diluizioni di suolo.

9.3.1.1. Terreno colturale

| | |
|-----------------------------------|-------|
| Soluzione salina standard* | 50 mL |
| (NH ₄)NO ₃ | 2 g |
| Peptone | 1 g |
| CaCO ₃ | 10 g |
| Acqua deionizzata | 1 L |

*Soluzione salina standard:

K₂HPO₄ 5 g; K₂HPO₄ 2,5 g; NaCl 2,5 g; Fe₂(SO₄)₃ 0,05 g; MnSO₄ 0,05 g; acqua deionizzata 1L.

9.3.1.2. Procedura consigliata

Portare a pH 7,2 con soda, ripartire in tubi agitando spesso per riportare il carbonato in sospensione. Aggiungere in ogni tubo una striscia di carta (1x6 cm) di cellulosa pura (per esempio, carta Whatman® n° 1) chiudere e sterilizzare a +121°C per 15 minuti. Inoculare almeno tre tubi per diluizione con 1 mL delle sospensioni-diluizioni di suolo opportune. Incubare in cappa o giara anaerobia a +28°C per 15 giorni agitando occasionalmente per riportare in sospensione il carbonato.

9.3.1.3. Risultati

Calcolare il MPN considerando positivi i tubi nei quali si verifica il rammollimento della carta e/o la comparsa di macchie gialle e brune sulla sua superficie cui corrispondano zone visibilmente intaccate (p. es. maggiore trasparenza della cellulosa).

9.3.1.4. Osservazioni

Si tratta di un metodo piuttosto antiquato che richiede notevole tempo di preparazione e i cui risultati sono piuttosto imprecisi. Permette di ottenere comunque un indice comparabile in caso di suoli di diversa origine. La stessa tecnica può essere utilizzata per determinare i cellulolitici aerobi incubando i tubi in ambiente aerobio.

9.4. Amilolitici

L'amido è, dopo la cellulosa, il polimero più diffuso nel mondo vegetale e rappresenta la principale riserva di carboidrati della pianta. Contiene due polimeri del glucosio, l'amilosio costituito da lunghe e semplici catene di unità glucosidiche riunite da legami (1,4) glucosidici e l'amilopectina, la cui molecola ramificata è formata da catene analoghe a quelle dell'amilosio legate alla catena principale da legami (1,6). Sono numerosissimi i batteri e i funghi del suolo capaci di idrolizzare l'amido producendo enzimi extracellulari.

9.4.1. Conta su piastra (Wollum, 1982)

Il numero dei microrganismi amilolitici presenti in un campione di suolo viene stimato inoculando le sospensioni-diluizioni su un terreno colturale contenente amido come unica fonte di carbonio. L'attività amilolitica delle colonie viene rivelata con la soluzione iodata di Gram che forma con l'amido un complesso blu scuro. Le colonie che mostrano un alone giallo chiaro sono da considerarsi positive per l'attività amilolitica.

9.4.1.1. Terreno colturale

- Amido solubile 10 g
- Estratto di lievito 1 g
- NaNO₃ 1 g
- KCl 0,5 g
- MgSO₄•7H₂O 0,5 g
- Agar 17 g
- H₂O deionizzata 1L

In alternativa a questo terreno colturale viene proposto Agar Nutriente addizionato con 0,2% di amido solubile (Hankin et Anagnostakis, 1975).

9.4.1.2. Procedura consigliata

Sterilizzare a +121°C per 15 minuti e versare in piastre Petri. Inoculare le piastre con le appropriate sospensioni-diluizioni di suolo e incubare 7 giorni a +28°C.

9.4.1.3. Risultati

Ricoprire la superficie della piastra con la soluzione di Gram* e contare le colonie che presentano un alone chiaro intorno alla superficie di crescita. L'assenza dell'alone indica che l'amido non è stato utilizzato dal microrganismo. È possibile esprimere i risultati come numero di microrganismi amilolitici per grammo di

suolo oppure come percentuale di amilolitici rispetto al numero totale di colonie cresciute sulla piastra.

*Soluzione iodata di Gram : I₂ 1 g; KI 2 g; acqua distillata 200 mL.

9.4.1.4. Osservazioni

La colorazione con iodio rappresenta ancora il metodo più rapido e semplice di visualizzazione degli amilolitici. Nel caso sia necessario un isolamento occorre trasferire immediatamente la colonia su un terreno adatto perché lo iodio ha proprietà antimicrobiche.

Altri metodi di rilevamento dell'attività amilolitica prevedono l'uso di amido complessato con coloranti (Mc Cleary, 1980) e particolari metodi di preparazione dell'amido che rendono gli aloni più evidenti senza l'aggiunta di coloranti (Dhawale et al., 1982). Tutti i metodi su piastra sono in grado di indicare anche l'intensità dell'attività enzimatica che può essere misurata come diametro dell'alone di idrolisi intorno alla colonia (Federici, 1983).

9.5. Microtecnica per MPN

Lo stesso terreno colturale descritto nel primo metodo, privo di agar, viene utilizzato per operare contemporaneamente sia la diluizione (1:2) della sospensione di suolo sia la crescita dei microrganismi. L'operazione viene effettuata utilizzando piastre sterili per microtitolazioni a 96 pozzetti (8x12). Il campione viene diluito 12 volte con otto repliche.

9.5.1.1. Procedura consigliata

Si utilizza lo stesso terreno della tecnica su piastra (Wollum, 1982), privo di agar. Ripartire il terreno liquido nelle piastre per microtitolazioni in ragione di 0,05 mL per pozzetto. Partendo dalla sospensione-diluizione di suolo opportuna trasferire 0,05 mL di campione in tutti i pozzetti della prima colonna. Procedere con la diluizione su ogni fila trasferendo 0,05 mL di sospensione dal primo pozzetto al successivo per 12 volte. Incubare 7 giorni a +28°C chiudendo le piastre con parafilm per evitare l'evaporazione.

9.5.1.2. Risultati

Evitando di agitare le piastre, far cadere una goccia di soluzione di Gram in ogni pozzetto e registrare come positivi quelli che rimangono incolori. Utilizzare una tabella MPN basata su diluizioni 1:2 invece che 1:10 (Rowe et al., 1977).

9.5.1.3. Osservazioni

La tecnica MPN in piastre per microtitolazioni, messa a punto nel nostro laboratorio, deriva dalla vecchia metodica in tubo (Pochon, 1954) ed è stata applicata per la prima volta allo studio dei nitrificanti (Rowe et al., 1977). Essa offre molti vantaggi sia in termini di precisione, dovuta al maggior numero di repliche (8 invece di 5), sia perché permette un notevole risparmio di spazio e materiali utilizzati.

9.6. Pectinolitici

Le pectine sono componenti della lamella mediana che si trova tra le pareti cellulari di cellule adiacenti. Consistono di catene non ramificate di acido D-galatturonico riunite mediante legami β -(1,4) glucosidici. I gruppi carbossilici sono esterificati parzialmente o totalmente con metanolo. La degradazione microbica delle pectine avviene ad opera degli enzimi pectinolitici (esterasi, glucosidasi e liasi). Molti batteri e funghi hanno la capacità di metabolizzare le pectine. Nel suolo, il numero dei microrganismi pectinolitici è abbastanza elevato (circa 10^5 cellule/g di suolo).

9.6.1. Conta su piastra (Jayasankar e Graham, 1970)

Il metodo si basa su una semina di sospensioni-diluizioni di suolo su agar contenente pectina. L'alone di idrolisi viene messo in evidenza da una sostanza che, precipitando la pectina integra, opacizza lo strato di agar circostante rendendo visibile una zona trasparente intorno alle colonie che hanno idrolizzato la pectina.

9.6.1.1. Terreno colturale

9.6.1.2. Procedura consigliata

Sterilizzare il terreno a $+121^\circ C$ per 15 minuti e versarlo nelle piastre. Inoculare le appropriate diluizioni-sospensioni di suolo sulle piastre e incubare a $+28^\circ C$ per 72 ore.

9.6.1.3. Risultati

Versare sulle piastre una soluzione acquosa all'1% di bromuro di cetiltrimetilammonio lasciando agire 20-30 minuti per evidenziare l'alone chiaro intorno alle colonie. È possibile esprimere i risultati come numero di microrganismi pectinolitici per grammo di suolo oppure come percentuale di pectinolitici rispetto al numero totale di colonie cresciute sulla piastra.

9.6.1.4. Osservazioni

Il diametro della zona chiara è correlabile al potenziale decompositivo del microrganismo. È possibile isolare i pectinolitici replicando la colonia non appena si evidenzia l'alone. Un terreno colturale capace di distinguere l'attività pectatoliasica da quella poligalatturonasica viene descritto da Hankin et al. (1971) e si basa su una differenziazione del pH dello stesso mezzo colturale.

9.7. Ligninolitici

Le lignine sono polimeri fenolici condensati che presentano legami irregolari carbonio-carbonio molto stabili e legami eterici tra le unità fenilpropanoidi. Nel legno svolgono una azione cementante legandosi sia fisicamente che chimicamente ai polisaccaridi della parete cellulare. Le lignine si formano dalla polimerizzazione deidrogenativa degli alcoli p-idrossi-cinnamilici. Il processo della decomposizione della lignina è ossidativo ma la sua natura e il ruolo svolto dalle fenolossidasi implicate nel processo, non sono stati ancora completamente spiegati. Numerosi studi sembrano dimostrare che l'attività ligninolitica non è indotta dalla presenza della lignina, ma piuttosto si verifica in concomitanza con uno shift fisiologico verso il metabolismo secondario provocato dalla limitazione o dall'esaurimento della fonte di azoto (Kirk e Farrell, 1987). La ligninolisi avviene particolarmente per azione dei funghi del marciume bianco e dei funghi del marciume molle che possono determinare una profonda degradazione della lignina. I funghi del marciume bruno, invece, degradano soltanto i carboidrati senza determinare una apprezzabile diminuzione del contenuto di lignina del legno. Anche alcuni batteri sono stati descritti avere un ruolo nella decomposizione della lignina. I microrganismi che degradano le lignine, data la complessità e diversità delle molecole di questi polimeri e, di conseguenza, le difficoltà metodologiche di dosaggio, non possono essere determinati utilizzando i metodi microbiologici tradizionali. Il solo metodo che consente di misurare quantitativamente

l'attività ligninolitica di campioni provenienti da ambienti naturali è quello che si basa sulla produzione di $^{14}\text{CO}_2$ da lignine marcate. Queste lignine possono essere sintetizzate chimicamente da fenilpropano marcato al ^{14}C oppure ottenute nutrendo la pianta con precursori contenenti ^{14}C . Questa ultima tecnica è da preferirsi perché il materiale lignocellulosico che si ottiene meglio riproduce quello dell'ambiente naturale. La produzione di $^{14}\text{CO}_2$ da lignine marcate, incubate con diluizioni seriali di campioni di suolo consente, applicando la tecnica del MPN, di risalire al numero dei microrganismi ligninolitici (Crawford et al., 1977). L'uso delle lignine radioattive però, richiede metodologie sofisticate e personale altamente specializzato, attrezzature raramente disponibili nei laboratori di microbiologia del suolo, e locali appositamente destinati alla manipolazione dei materiali radioattivi. Inoltre questo tipo di approccio implica alti costi. Tuttavia, per chi volesse adottare questa metodica, si consiglia di consultare i trattati specifici (Crawford, 1981; Crawford e Crawford, 1988; Kirk e Brunow, 1988).

In questo capitolo verranno descritti tre metodi che, nonostante i molti limiti, possono consentire di ottenere una stima dell'attività ligninolitica di un ambiente naturale senza ricorrere all'uso di sostanze marcate.

Il primo metodo valuta l'attività ligninolitica di un suolo misurando la perdita di peso di campioni di materiale lignocellulosico naturale incubati direttamente nell'ambiente naturale e prelevati a diversi intervalli di tempo.

È possibile applicare questo metodo accoppiandolo al secondo qui descritto che si basa sull'estrazione e dosaggio della lignina, mediante trattamenti chimici, dai materiali lignocellulosici.

Il terzo metodo si basa sulla determinazione dell'attività ligninolitica mediante coloranti polimerici utilizzati come molecole modello della lignina.

9.7.1. Perdita di peso di materiali lignocellulosici (Johansson et al., 1986)

Preparazione del campione: 1,5 g del materiale lignocellulosico naturale (p. es. aghi di pino) in esame viene posto in sacchetti di garza in poliammide (10 x 10 cm) con pori di 0,5 mm. I sacchetti vengono chiusi e posti nel suolo in esame che è stato diviso in parcelle distribuite a blocchi randomizzati secondo gli scopi dello sperimentatore. I sacchetti vengono prelevati a tempi diversi e portati in laboratorio, puliti, seccati per 48 ore a $+85^\circ\text{C}$ e pesati individualmente. Infine i campioni di ogni blocco vengono mescolati, macinati e passati su un setaccio da 40 mesh.

9.7.2. Calcolo della perdita di peso del campione lignocellulosico

Le perdite di peso nel tempo vengono calcolate sia sui campioni individuali che su quello mediato di ogni singolo blocco. Assumendo che la degradazione del materiale lignocellulosico segua una cinetica di 1° ordine la velocità di decomposizione verrà calcolata:

$$v_{dec} = -dA/dt = -kA$$

dove v_{dec} rappresenta la velocità di decomposizione ($\text{g} \times \text{giorni}^{-1}$), A la quantità della materia organica presente (g) e k la costante di velocità di decomposizione ($\text{g} \times \text{giorni}^{-1}$). Integrando si otterrà:

$$\ln A/A_0 = -kt$$

dove A_0 è la quantità di A al tempo 0. Se si riporta il $\ln (A/A_0)$ in ordinata e il tempo in ascissa, si otterrà una retta con una pendenza uguale a -k. La costante di velocità di decomposizione è indipendente dalla concentrazione del substrato dato che la pendenza è costante nel tempo. Il tempo richiesto per trasformare metà del substrato iniziale sarà calcolato:

$$\ln|(A_0/2)/A_0| = -kt_{1/2}$$

dove A_0 è la quantità di materiale al tempo 0, k la costante di velocità di degradazione e $t_{1/2}$ il tempo di dimezzamento. Per cui si avrà:

$$t_{1/2} = 0,693/k$$

9.8. Dosaggio chimico delle lignine

L'isolamento della lignina che generalmente si trova strettamente associata ai polisaccaridi è molto difficile. Esistono vari metodi di estrazione e determinazione della lignina, ma nessuno di essi consente di isolare la molecola naturale senza modificarne la struttura e le proprietà (Kirk e Obst, 1988). Vengono proposti due diversi metodi.

9.8.1. Lignina di Klason

Il procedimento di Klason è il metodo standard con cui vengono analizzati i materiali vegetali per determinare il contenuto di lignina. Per la determinazione della frazione insolubile sono stati utilizzati i metodi descritti da Effland (1977) e da Johansson e al. (1986) e per la frazione solubile della lignina il metodo descritto da Musha e Goring (1974).

Ad 1 g del materiale macinato, accuratamente pesato e posto in un beaker da 50 mL, vengono aggiunti 10 mL di H₂SO₄ al 72%. Si agita la sospensione con una bacchetta di vetro e si lascia in un bagno termostatico per 2 ore a +18-20°C, agitando occasionalmente. Aggiungere quindi acqua fino a raggiungere il volume di 400 mL e far bollire a riflusso per 4 ore. A tale scopo il campione viene posto in un pallone munito di collo a smeriglio in cui si inserisce un refrigeratore a serpentina collegato ad una presa d'acqua. Quando il campione giunge alla temperatura di ebollizione, il vapore, salendo nel refrigeratore, si condensa e viene a rifluire nel pallone. Il materiale insolubile viene filtrato su carta da filtro precedentemente pesata.

Spesso può essere necessario per alcuni campioni vegetali rimuovere le proteine prima di procedere alla determinazione della lignina. Questo può essere ottenuto trattando 100 mg di materiale lignocellulosico con 4 mL di soluzione di pepsina (1% in HCl 0,1 N) a +40° C per 20 ore (Benner et al., 1984).

9.8.2. Determinazione della lignina insolubile (Li)

Il materiale insolubile viene lavato ripetutamente con acqua bollente per rimuovere ogni traccia di acido. Il filtro con la lignina di Klason viene essiccato in stufa a +105°C sino a peso costante.

La lignina acido-insolubile viene calcolata:

$$Li(\%) = | P_{(2)} (1-C(\%)/P_{(1)}) | \times 100$$

dove Li(%) rappresenta la percentuale in peso della lignina insolubile, P₍₁₎ il peso secco del materiale in esame (g), C(%) il peso in percentuale delle ceneri e P₍₂₎ il peso del residuo insolubile in H₂SO₄ (in grammi).

9.8.3. Determinazione delle ceneri (C)

Su una aliquota conosciuta (100-200 mg) del residuo secco ottenuto dopo idrolisi con H₂SO₄ vengono determinate le ceneri per combustione a +750°C in una atmosfera di ossigeno. Una volta accertato che si è ottenuta una completa ossidazione del materiale organico si determina il peso del residuo inorganico (C).

9.8.4. Determinazione della lignina solubile (Ls)

Il filtrato ottenuto dopo idrolisi viene portato a volume in un matraccio da 50 mL con acqua distillata, quindi diluito 1:6 e analizzato spettrofotometricamente in cuvette di quarzo da 1 cm a 205 nm, usando come bianco H₂SO₄ al 72% diluito come un normale campione. La lignina acido solubile (%), noto il valore medio del coefficiente di estinzione corrispondente (110 l/g cm a 205 nm), viene calcolata:

$$Ls (\%) = A_{205/110} \times 6 \times 50/1000 \times 100/P_{(1)}$$

dove Ls rappresenta il contenuto percentuale di lignina solubile, A₂₀₅ l'assorbanza a 205 nm, 110 il coefficiente di estinzione corrispondente, P₍₁₎ il peso in grammi del materiale in esame.

9.8.5. Determinazione del contenuto totale di lignina (Lt)

Il contenuto totale in percento del peso del materiale in esame sarà dato da:

$$Lt (\%) = Li + Ls$$

dove Lt rappresenta il contenuto totale di lignina, Li il contenuto di lignina insolubile e Ls il contenuto di lignina solubile.

9.8.6. Determinazione spettrofotometrica della lignina

La determinazione spettrofotometrica della lignina negli estratti in diossano, acqua e acido cloridrico è basata sull'assorbimento delle unità aromatiche nell'ultravioletto (Janshekar et al., 1981; Johansson et al., 1986). Il diossano è un solvente che non contiene gruppi chimicamente reattivi e il massimo di assorbimento delle soluzioni di lignine di differenti materiali vegetali si ha a 280 nm. I carboidrati e le proteine non mostrano assorbimento nello spettro di assorbimento della lignina e quindi la loro presenza non interferisce nelle letture spettrofotometriche.

I campioni (100 mg) vengono estratti a temperatura ambiente per 48 ore con 10 mL di solvente (HCl 0,2 N in una soluzione 9:1 di diossano e acqua) che deve essere preparato fresco prima dell'uso. Si filtra ed il filtrato viene diluito 1:50 con il solvente. L'assorbimento della soluzione viene letto a 280 nm in una cuvetta di quarzo usando il solvente come bianco. Una curva di taratura può essere preparata usando diverse quantità di materiale, estraendole e misurando l'assorbimento a 280 nm.

9.8.7. Osservazioni

Entrambi i metodi forniscono stime quantitative e riproducibili della lignina ma presentano alcuni inconvenienti che non debbono essere sottovalutati, specialmente negli studi di degradazione di materiali lignocellulosici naturali. La determinazione della lignina di Klason fornisce spesso valori più alti di quelli reali perché le sostanze umiche prodotte durante la decomposizione vengono incluse nelle frazioni della lignina. Inoltre la quantità di lignina solubile aumenta durante la degradazione.

Il metodo spettrofotometrico, d'altro canto, fornisce solo stime relative e non assolute dato che non si possono usare molecole standard di riferimento e che differenti lignine danno differenti reazioni colorate. I vantaggi del secondo metodo rispetto alla determinazione della lignina di Klason consistono nel fatto che sono necessari solo piccoli quantitativi del campione e che il contenuto totale di lignina può essere determinato con una unica analisi.

9.9. Determinazione dell'attività ligninolitica mediante coloranti polimerici (Glenn e Gold, 1983)

I metodi usati per determinare la degradazione della lignina, siano essi basati sui metodi chimici che sull'uso di lignine marcate, sono generalmente complessi e richiedono tempi lunghi. Spesso però è necessario effettuare screenings veloci specialmente se si vuole valutare l'attività ligninolitica di campioni di suolo o di colture fungine. Un metodo basato sulla decolorazione di coloranti polimerici è stato proposto da Glenn e Gold (1983) per valutare la degradazione della lignina da parte del fungo *Phanerochaete*.

Questo metodo è stato applicato finora a colture pure di funghi ma può anche essere adottato negli studi di campioni naturali. La tecnica descritta utilizza il colorante poly B-411 per una stima del MPN di organismi ligninolitici di un campione di suolo.

9.9.1. Terreno colturale (Haider e Trojanowski, 1975)

- Glucosio 5,0 g
- Estratto di lievito 0,5 g
- NaNO₃ 3,0 g
- KH₂PO₄ 1,0 g
- MgSO₄•7H₂O 0,5 g
- KCl 0,5 g
- FeSO₄•7H₂O 0,01 g
- Mn(CH₃COO)₂•4H₂O 0,008 g
- Zn(NO₃)₂ 0,002 g
- Ca(NO₃)₂•4H₂O 0,005 g

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,003 g
- Acqua deionizzata 1 L

9.9.2. Procedura consigliata

Al terreno di coltura sterilizzato in autoclave a +120°C per 20 minuti viene aggiunto lo 0,02% di Poly B-411 (polivinilammina sulfonato antrachinone) dopo averlo sterilizzato per filtrazione. Inoculare le sospensioni-diluizioni di suolo opportune in beute da 100 mL contenenti 20 mL del terreno di coltura, 5 beute per diluizione, e incubare in un agitatore orbitale a +30°C per 2-3 settimane. Ogni 3 giorni pesare le beute e aggiungere la quantità di acqua sterile necessaria per compensare le perdite dovute all'evaporazione.

9.9.3. Risultati

Dopo 7, 15, 21 giorni prelevare da ogni beuta 1 mL del brodo colturale e centrifugare in una microcentrifuga per 5 minuti. Prelevare 0,1 mL del supernatante e diluire 1:10 con acqua. Determinare l'assorbanza a 593 e 483 nm e calcolare il rapporto tra le due assorbanze. Le diluizioni che mostreranno una diminuzione del rapporto A_{593}/A_{483} rispetto ai controlli non inoculati saranno considerate positive. Utilizzare le tabelle MPN per calcolare il numero dei microrganismi e riferirlo al peso secco dei campioni di suolo.

9.9.4. Osservazioni

È considerato un valido metodo indiretto per una valutazione veloce dell'attività ligninolitica. I coloranti polimerici non sono costosi, sono stabili e facilmente solubili, rimangono fuori della cellula e non sono tossici. I risultati di numerosi esperimenti hanno dimostrato che solo i funghi ligninolitici sono in grado di decolorare i coloranti polimerici e che l'efficienza di decolorazione è strettamente correlata all'abilità di degradare molti modelli di lignina (Chet et al., 1985; Platt et al., 1985; Gold et al., 1988). Infine, sembra evidente che i coloranti fungano da substrato per l'intero sistema degradativo fungino e che la loro degradazione sia influenzata dagli stessi fattori che influenzano la degradazione della lignina (Gold et al., 1988).

Posizione Italiana

Metodo Ufficiale n° III.8
Supplemento Ordinario G.U. n. 179
dell'1.08.2002

Posizione Internazionale

Assente

9.10. Bibliografia

- Benner R., MacCubbin A.E., Hodson R.E. (1984), *Preparation, characterization, and microbial degradation of specifically radiolabelled (¹⁴C) lignocelluloses from marine and freshwater macrophytes*. Appl. Environ. Microbiol., 47, 381-389.
- Chet I., Trojanowski J., Hutterman A. (1985), *Decolorization of the dye Poly B- 411 and its correlation with lignin degradation by fungi*. Microbios. Lett., 29, 37-43.
- Crawford R.L. (1981), *Lignin biodegradation and trasformation*. New York Wiley, p 154.
- Crawford R.L., Crawford D.L. (1988), *¹⁴Clignin-labeled lignocelluloses and ¹⁴C-labeled milled wood lignins: preparation, characterization and uses*. Methods Enzymol., 161, 18-31.
- Crawford R.L., Crawford D. L., Olofsson C., Wikstrom L., Wood J. M. (1977), *Biodegradation of natural and man-made recalcitrant compounds with particular reference to lignin*. J. Agric. Food Chem., 25, 704-708.
- Demain A.L., Solomon N.A. (1986), *Manual of industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society Microbiology.
- Dhawale M.R., Wilson J.J., Khachatourians G.G., Mike W. (1982), *Improved method for detection of starch hydrolysis*. Appl. Environ. Microbiol., 44, 747-750.
- Effland M.J. (1977), *Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp*. Tappi, 60, 143-144.
- Federici F. (1983), *Extracellular enzymes productions in yeasts*. Ann. Microbiol., 33, 93-98.
- Glenn J.K., Gold M.H. (1983), *Decolorization of several polimeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol., 45, 1741-1747.
- Gold M.H., Glenn J.K., Alic M. (1988), *Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays*. Methods Enzymol., 161, 74-79.
- Haider K., Trojanowski J. (1975), *Decomposition of specifically ¹⁴C-labelled phenols and dehydropolymers of coniferyl alcohol as models for lignin degradation by soft and white rot fungi*. Arch. microbiol., 105, 33-41.
- Hankin L., Anagnostakis S.L. (1977), *Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of microorganisms*. J. Gen. Microbiol., 98, 109-115.
- Hankin L., Anagnostakis S.L. (1975), *The use of solid media for detection of enzyme production by fungi*. Mycologia, 47, 597-607.
- Hankin L., Zucker M., Sands D.C. (1971), *Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria*. Appl. Microbiol., 22, 205- 209.
- Janshekar H., Brown C., Fiechter A. (1981), *Determination of biodegraded lignin by ultraviolet spectrometry*. Analytica Chimica Acta., 130, 81-91.
- Jayasankar N.P., Graham P.H. (1970), *An agar plate method for screening and enumerating pectinolytic microrganisms*. Can. J. Microbiol., 16, 1023.
- Johansson M.B., Kogel I., Zech W. (1986), *Changes in the lignin fraction of spruce and pine needle litter during decomposition as studied by some chemical methods*. Soil Biol. Biochem., 18, 611-619.
- Kirk T.K., Brunow G. (1988), *Synthetic ¹⁴C-labeled lignins*. Methods Enzymol., 161, 65-74.
- Kirk T.K., Farrell R.L. (1987), *Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin*. Ann. Rev. Microbiol., 41, 465-505.
- Kirk T.K., Obst J.R. (1988), *Lignin determination*. Methods Enzymol., 161, 87-101.
- Kluepfel D. (1988), *Screening of procaryotes for cellulose-and hemicellulose degrading enzymes*. Methods Enzymol., 160, 180-186.
- McCleary B.V. (1980), *A new chromogenic substrate for the assay of amylase and (1-4) β D-glucanase*. Carbohydr. Res., 86, 97-104.
- Moore R.L., Basset B.B. and Swift M.J. (1979), *Developments in the Remazol Brilliant Blue dye-assay for studying the ecology of cellulose decomposition*. Soil Biol. Biochem., 11, 311-312.
- Musha Y. e Goring D.A.I. (1974), *Klason and acid-soluble lignin content of hardwoods*. Wood Sci., 7, 133-134.
- Platt M.W., Hadar Y and Chet I. (1985), *The decolorization of the polimeric dye Poly-blue (polyvinilamine sulfonate-anthroquinone) by lignin degrading fungi e.g Pleurotus ostreatus; use for screening lignin degradation activity*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 21, 394-396.
- Pochon J. (1954), *Manuel technique d'analyse microbiologique du sol*. Masson e C. ed. Paris.
- Poincelot R. P. e Day P.R. (1972), *Simple dye release assay for determining cellulolytic activity of fungi* Appl. Microbiol., 23, 875-879.
- Rowe R., Todd R. and Waide J. (1977), *Microtechnique for most probable number analysis*. Appl. Environm. Microbiol., 33, 675-680.
- Smith R.E. (1977), *Rapid tube test for detecting fungal cellulase production*. Appl. Env. Microbiol., 33, 980-981.
- Tansey M.R. (1971), *Agar diffusion assay of cellulolytic ability of termophilic fungi*. Arch. fur Mikrobiologie, 77, 1-11.
- Wollum A.G. (1982), in: *Methods in soil analysis Part 2. Chemical and microbiological properties*. Agronomy Monograph n. 9. ASA-SSSA, U.S.A.

Isabella Cacciari

Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica
Università della Tuscia
Via S. C. de Lellis
01100 Viterbo

1^a ed. 2002

Coordinatori dei metodi:
Picci G., Nannipieri P.

Direttore della collana:
Paolo Sequi

Paola Quatrini

Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica
Università della Tuscia
Via S. C. de Lellis
01100 Viterbo

10. Ciclo dello zolfo

di Carlo Filippi e Giovanna Bagnoli

10.1. Introduzione

Lo zolfo è un elemento essenziale per la vita sulla terra. Esso viene costantemente convertito e trasformato tra i vari pools organici dell'ambiente.

L'elemento esiste in natura in diverse forme, di queste, le seguenti sono quelle più importanti: la forma più ossidata SO_4^{2-} , la più ridotta S^{2-} (di cui le forme idrogeno solforato o solfuro di ferro sono quelle principalmente rappresentate) e la forma intermedia come S^0 .

La conversione dello zolfo da uno stato all'altro è condotta principalmente dai microrganismi, la cui classificazione si basa sul tipo di reazione effettuata.

10.2. Solfo ossidanti

I microrganismi solfo ossidanti usano H_2S , zolfo elementare o altri composti parzialmente ridotti, convertendoli tutti a solfato SO_4^{2-} . Un membro del gruppo, il *Thiobacillus ferrooxidans*, può utilizzare anche il Fe^{2+} come fonte di energia.

10.2.1. Stima del MPN secondo Pochon (1954)

Si semina utilizzando sospensioni di suolo in un mezzo liquido minerale arricchito, dove lo zolfo è aggiunto come solfuro o come atmosfera arricchita di H_2S .

È un metodo piuttosto superato ed impreciso (non rileva il gruppo degli eterotrofi); permette comunque un primo dato orientativo.

10.2.2. Preparazione del mezzo base

- K_2HPO_4 0,25 g
- MgCl_2 0,10 g
- NaCl 0,1 g
- NH_4NO_3 2,0 g
- CaCO_3 5,0 g
- H_2O distillata 1 L

Ripartire il terreno liquido in tubi da saggio da 22 mL, in ragione di 5 mL per tubo, tappare con cotone, sterilizzare in autoclave per 20 minuti a $+110^\circ\text{C}$.

Per la semina, utilizzare sospensioni diluite del campione secondo la tecnica standard della diluizione decimale, distribuire 1 mL per tubo (3 o 5 tubi per diluizione), utilizzare fino alla diluizione 10^{-5} come massimo.

a) Ossidazione dei solfuri: porre i tubi sotto campana contenente una capsula in cui è stato versato qualche mL di una soluzione fresca al 10% di monosolfuro di sodio (Na_2S) e quindi si incuba a $+28^\circ\text{C}$.

b) Ossidazione dello zolfo: aggiungere asepticamente in ogni tubo 50 mg di fiori di zolfo (FS^0) previamente lavato e sterilizzato a $+121^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Incubare a $+28^\circ\text{C}$.

10.2.3. Lettura dei risultati

Dopo tre settimane, prelevare da ogni tubo, senza agitare, 1-2 mL di liquido e trasferirli in un tubo da saggio, aggiungere 2 gocce di HCl più 5 gocce di una soluzione acquosa di BaCl₂ al 5%.

La presenza di solfato si traduce in un precipitato lucido biancastro; confrontare con un testimone non inoculato.

10.3. Determinazione dei chemiolitotrofi

Conta del MPN di solfo ossidanti chemiolitotrofi obbligati secondo il metodo di Germida (1985), modificato da Chapman (1990).

10.3.1. Principio del metodo

Il MPN viene determinato in vaschette per analisi sierologiche (24-Well microtrite dishes) dove al mezzo vengono addizionati fiori di zolfo (FS⁰) ed un indicatore che metta in evidenza la variazione del pH in seguito alla ossidazione dello zolfo.

10.3.2. Preparazione del campione

Dieci grammi di campione vengono trattati con 100 mL di H₂O sterile e sferette di vetro e quindi si agita per 10 minuti prima delle opportune diluizioni.

10.3.3. Composizione del mezzo

| | | |
|---|-------|---|
| • (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,20 | g |
| • MgSO ₄ •H ₂ O | 0,50 | g |
| • CaCl ₂ | 0,25 | g |
| • KH ₂ PO ₄ | 3,0 | g |
| • FeSO ₄ | 0,005 | g |
| • H ₂ O di rubinetto | 1 | L |

Per la determinazione degli acidofili aggiungere al mezzo del blu di bromofenolo come indicatore allo 0,005% (pH 4,6 - 3,0), oppure verde bromocresolo allo 0,005% (pH 5,8 - 3,4), mentre per i neutrofilo si deve aggiungere blu bromotimolo allo 0,003% (pH 7,0 - 6,0).

Si sterilizza in corrente di vapore per 30 minuti per tre giorni consecutivi.

Il mezzo può essere usato anche agarizzato al 2%.

I fiori di zolfo, vengono lavati tre volte in H₂O distillata, risospesi sempre in H₂O distillata (approssimativamente 50-60% p/v), e sterilizzati in autoclave per 15 minuti a +121°C. Dopo la sterilizzazione si hanno alcune aggregazioni di zolfo intorno alle pareti che devono essere rimosse; quindi si procede alla determinazione del peso secco dello zolfo.

Lo zolfo viene aggiunto al mezzo fino a raggiungere la concentrazione finale compresa tra 0,1 e 1%.

Ogni serie di pozzetti (3 o 5) viene riempita con 2,5 mL di mezzo. Si inocula con aliquote di 0,1 mL di appropriate diluizioni di campione; si incuba a +27°C. Una tesi senza zolfo viene usata come controllo per la valutazione dei microrganismi produttori di acido non solfo-ossidanti.

Il risultato viene preso come positivo quando il pH scende a valori compresi tra 5,0 e 2,8 e persino minori per gli acidofili, tra i quali possiamo includere *T. thiooxidans* e *T. ferrooxidans*. Mentre per i tiobacilli neutrofilo, (p. es. *T. thioparus*, *T. neapolitanus* e *T. denitrificans*), si prende come positivo il risultato quando il pH oscilla tra valori 7,5 e 6,0.

10.4. Determinazione del MPN dei chemioeterotrofi

Il principio del metodo e la preparazione del campione è quella riportata per la determinazione dei chemiolitotrofi.

10.4.1. Mezzo di crescita

| | | |
|---|------|----|
| • NH ₄ Cl | 1,0 | g |
| • MgCl ₂ | 0,5 | g |
| • MgSO ₄ | 0,30 | g |
| • KH ₂ PO ₄ | 0,40 | g |
| • K ₂ HPO ₄ | 0,60 | g |
| • FeCl ₃ | 0,02 | g |
| • Na ₂ S ₂ O ₃ | 10,0 | g |
| • Blu bromotimolo | 0,03 | g |
| • Soluzione di metalli pesanti* | 30 | mL |
| • Estratto di lievito | 5,0 | g |
| • H ₂ O distillata | 1 | L |
| • pH 6,8 | | |

*Soluzione metalli pesanti:

| | | |
|--|------|----|
| • EDTA | 1,5 | G |
| • Soluzione di Hoagland modificata** | 6,0 | mL |
| • FeSO ₄ •7H ₂ O | 0,20 | g |
| • ZnSO ₄ •7H ₂ O | 0,10 | g |
| • MnCl ₂ •4H ₂ O | 0,02 | g |
| • H ₂ O distillata | 1 | L |

**Soluzione di Hoagland modificata:

| | | |
|---|------|---|
| • AlCl ₃ | 1,0 | g |
| • KI | 0,50 | g |
| • KBr | 0,50 | g |
| • LiCl | 0,50 | g |
| • MnCl ₂ •4H ₂ O | 7,0 | g |
| • H ₃ BO ₃ | 11,0 | g |
| • ZnCl ₂ | 1,0 | g |
| • CuCl ₂ | 1,0 | g |
| • NiCl ₂ | 1,0 | g |
| • CoCl ₂ | 1,0 | g |
| • SnCl ₂ •2H ₂ O | 0,5 | g |
| • BaCl ₂ | 0,5 | g |
| • Na ₂ MoO ₄ | 0,5 | g |
| • Na ₂ VO ₄ •H ₂ O | 0,1 | g |
| • H ₂ O distillata | 1 | L |

Ogni sale viene disciolto separatamente in H₂O distillata prima della miscelazione; ogni soluzione viene aggiustata a pH 7,0 mentre il pH della soluzione finale viene portato a pH 3-4. Prima dell'uso si deve agitare vigorosamente la soluzione.

I contenitori con i pozzetti vengono posti in camere umide ed incubati a +25°C per 60 giorni. Dopo 30 giorni si possono leggere i risultati che vanno poi confrontati con quelli determinati dopo 60 giorni.

La conta del MPN può essere calcolata usando anche un basic program (Hurley and Roscoe, 1983).

10.5. Determinazione del MPN dei chemiofototrofi

Si usa un mezzo che permette la crescita di tutti i solfobatteri fotosintetici, e che è stato descritto da Pfenning (1966) e modificato da Van Niel (1971).

Preparazione del mezzo in una quantità necessaria a riempire 30 bottiglie della capacità di 100 mL.

10.5.1. Soluzione 1

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,83 g
- H_2O 2,50 mL

Per organismi alofili usare acqua di mare.

10.5.2. Soluzione 2

- KH_2PO_4 1,0 g
- NH_4Cl 1,0 g
- $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,0 g
- KCl 1,0 g
- Soluz. Vit. B_{12} * 3,0 mL
- Soluz. metalli pesanti** 30,0 mL
- H_2O distillata 67,0 mL

*2 mg di Vitamina B_{12} (cianocobalamina) sciolti in 10 mL di H_2O . La soluzione stock deve essere mantenuta al buio per prevenire la fotodecomposizione della vitamina.

***Soluzione metalli pesanti:

- EDTA sale sodico 500,0 mg
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200,0 mg
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10,0 mg
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3,0 mg
- H_3BO_3 30,0 mg
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20,0 mg
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,0 mg
- $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,0 mg
- $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,0 mg
- H_2O distillata 1 L

Si solubilizza l'EDTA in acqua distillata a parte, quindi si aggiungono i sali alla soluzione che viene portata a 1 L; il pH finale viene aggiustato a circa 3,0.

10.5.3. Soluzione 3

- Na_2CO_3 3,0 g
- H_2O 900 mL

La soluzione viene sterilizzata in autoclave in un contenitore tappato con cotone in cui viene inserito un tubicino per una successiva gasificazione con CO_2 per 30 minuti.

10.5.4. Soluzione 4

- Na_2S 3,0 g
- H_2O distillata 200 mL

Questa soluzione viene sterilizzata in una bottiglia contenente una ancorretta magnetica.

La Soluzione 1 (2 L) viene distribuita in ragione di 67 mL in bottiglie con tappo a vite della capacità di 100 mL. Quindi si sterilizza in autoclave come tutte le altre soluzioni.

Tutte le soluzioni una volta tolte dall'autoclave devono essere raffreddate velocemente a bagnomaria per diminuire gli scambi con l'aria.

La Soluzione 3, dopo averla saturata con CO₂, viene addizionata alla Soluzione 2 e 33 mL di questa nuova soluzione vengono aggiunti asetticamente nelle bottiglie contenenti la Soluzione 1.

La bottiglia con la Soluzione 4 è posta su di un agitatore magnetico e il suo contenuto viene neutralizzato con circa 1,5 mL di H₂SO₄ 2M sterile; 5 mL di questa soluzione vengono addizionati ad ognuna delle bottiglie contenenti il mezzo base.

Le bottiglie vengono quasi riempite con il rimanente della Soluzione 1 (500 mL), fino a lasciare una bolla di aria tra la superficie del liquido ed il tappo ed immediatamente chiuse. Il pH finale è compreso tra 6,7 e 7,2.

Il mezzo fresco subisce un intorbidamento in seguito all'ossidazione di alcuni solfuri a zolfo dovuto all'ossigeno disciolto; dopo alcuni giorni il mezzo si chiarifica per sedimentazione. Il mezzo fresco non deve essere utilizzato prima di 24 ore e si può conservare per alcuni mesi.

Le colture vengono incubate a +20-25°C vicino ad una lampada da 40 Watt (la distanza dalla sorgente luminosa è compresa tra 30 e 40 cm). Sono favorevoli fotoperiodi di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

Se in seguito alla crescita dei microrganismi è stato utilizzato l'H₂S e lo zolfo (scomparsa del sedimento) si deve aggiungere una soluzione fresca neutralizzata di Na₂S con le stesse modalità riportate in precedenza.

Il grado di crescita di un batterio fotosintetico è una funzione della sua attività (fotosintetica), e quindi entro certi limiti da l'ammontare dell'energia radiante assorbita dai suoi cloroplasti. Esponendo perciò la coltura a radiazioni di una lunghezza d'onda corrispondente all'assorbimento massimo di una particolare clorofilla (che è tipica per ogni genere di batterio fotosintetico) questa può agire come un potente agente selettivo e porta ad una predominanza di un singolo organismo in colture che in origine erano state inoculate con una popolazione mista.

Questo, associato a differenti temperature di crescita e tolleranza all'H₂S, permette una sufficiente selettività relativa alle Chlorobacteriaceae (*Chlorobiaceae*) e alle Thiorhodaceae (*Chromatiaceae*) rispettivamente.

Per i dettagli relativi alle lunghezze d'onda ed alla modulazione di alcuni componenti del substrato base si consiglia la consultazione del vol. XXIII di *Methods in Enzymology*.

10.6. Solfo riducenti

Il metabolismo dei solfo-riducenti si basa sulla riduzione dell'SO₄²⁻ o di altri composti inorganici dello zolfo come: solfiti, tiosolfati, tetrati e S colloidale.

10.6.1. Stima dell'MPN

Il mezzo di Skerrman (1967) e una modificazione del mezzo di Starkey costituiscono un buon substrato per colture di arricchimento e per la conta del MPN da campioni provenienti da ambienti naturali.

10.6.2. Metodo

Il campione, una volta raccolto, viene posto in piastre Petri di vetro ed incubato per 2 giorni a +30°C in camere per anaerobiosi; dopo tale periodo un sub-campione viene inoculato direttamente nel mezzo, il quale sarà contenuto in bottiglie di vetro con tappo a vite a tenuta. Questo pretrattamento si può trascurare nel caso di campioni che si presumono ricchi di solfobatteri. In tal caso si passa direttamente all'inoculo del mezzo o nel caso di stima del MPN alle diluizioni decimali.

10.6.3. Lettura dei risultati

La colorazione nera del mezzo, dopo 7 giorni di incubazione a +30°C è indice di una attiva riduzione dei solfati.

10.6.4. Composizione del mezzo

| | | |
|-----------------------------------|-----|----|
| • K ₂ HPO ₄ | 0,5 | g |
| • NH ₄ Cl | 1,0 | g |
| • CaSO ₄ | 1,0 | g |
| • Sodio lattato (70%) | 2,0 | mL |
| • H ₂ O rubinetto | 1 | L |

Sciogliere i sali, aggiustare il pH a 7,0 – 7,5 e sterilizzare a +121°C per 20 minuti.

Preparare separatamente una soluzione di FeSO₄(NH₄)₂SO₄•6H₂O all'1% e sterilizzare al vapore per 1 ora per tre giorni consecutivi. Aggiungere 5 mL del supernatante per 100 mL di mezzo sopra descritto immediatamente prima dell'uso.

Nota: questo mezzo ha un pesante precipitato ma è ben appropriato per colture grezze.

In alternativa un substrato di più rapida preparazione è quello di seguito descritto:

| | | |
|--|-----|----|
| • K ₂ HPO ₄ | 0,5 | g |
| • NH ₄ Cl | 1,0 | g |
| • Na ₂ SO ₄ | 1,0 | g |
| • CaCl ₂ •2H ₂ O | 0,1 | g |
| • MgSO ₄ •7H ₂ O | 2,0 | g |
| • Sodio lattato (70%) | 5,0 | mL |
| • H ₂ O distillata | 1 | L |

Far sciogliere gli ingredienti ed aggiustare il pH a 7,0-7,5. Sterilizzare a +121°C per 20 minuti.

Nota: questo mezzo ha un debole precipitato, che può essere rimosso per filtrazione, e successivamente deve essere risterilizzato.

Preparare una soluzione di FeSO₄(NH₄)₂SO₄•6H₂O all'1% come per il mezzo di Skerrman, e aggiungere 5 mL per ogni 100 mL di mezzo immediatamente prima dell'uso.

Per i ceppi alofili, aggiungere 1-3% di NaCl ad ogni mezzo prima della sterilizzazione o alternativamente rimpiazzare l'acqua distillata con acqua di mare.

10.7. Isolamento e mantenimento delle colture

I mezzi descritti sopra non sono ideali per studi in coltura pura. Skerrman raccomanda il seguente mezzo, descritto da Butlin e Coll. (1949) e modificato da Postgate (1963). Il mezzo è simile per molti aspetti a quello pubblicato indipendentemente da Miller (1950).

10.7.1. Composizione del mezzo

| | | |
|--|------|----|
| • K ₂ HPO ₄ | 0,5 | g |
| • NH ₄ Cl | 1,0 | g |
| • Na ₂ SO ₄ | 1,0 | g |
| • CaCl ₂ •6H ₂ O | 0,1 | g |
| • MgSO ₄ •7H ₂ O | 2,0 | g |
| • Na-lattato (70%) steriliz. a parte | 3,5 | mL |
| • Estratto di lievito | 1,0 | g |
| • FeSO ₄ •7H ₂ O | 0,02 | g |
| • H ₂ O distillata | 1 | L |

Sciogliere gli ingredienti, aggiustare il pH a 7,5 e autoclavare per 20 minuti a +121°C. Filtrare via il sedimento, distribuire come richiesto per la determinazione del MPN e risterilizzare.

Preparare separatamente una soluzione di cisteina cloridrato allo 0,6% in acqua distillata e sterilizzare a +121°C per 20 minuti. Questa soluzione ha un pH di 1,8 ed è relativamente stabile all'ossidazione, per cui

non è necessario neutralizzare; 9 mL di mezzo vengono addizionati di 1 mL di detta soluzione immediatamente prima dell'uso. Quindi si incuba in condizioni aerobiche.

Ad un esame microscopico le colonie nel mezzo liquido, appaiono nere ed appuntite.

Se si desidera, le colture possono essere piastrate sullo stesso mezzo contenente 2% di agar ed incubate anaerobicamente in atmosfera di idrogeno e 5% di anidride carbonica.

In alternativa al mezzo sopra descritto, se non si dispone di una camera di anaerobiosi, può essere usato il seguente substrato sempre suggerito da Postgate (1963):

| | | |
|---|------|---|
| • KH_2PO_4 | 0,6 | g |
| • NH_4Cl | 1,0 | g |
| • Na_2SO_4 | 1,0 | g |
| • $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 1,0 | g |
| • $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1,0 | g |
| • Na-lattato | 3,5 | g |
| • Estratto di lievito | 1,0 | g |
| • Ac. ascorbico | 0,1 | g |
| • Ac. tioglicolico | 0,1 | g |
| • $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,5 | g |
| • Agar | 15,0 | g |
| • H_2O distillata | 1 | L |

Nel caso di ricerca di microrganismi alofili aggiungere 10 g/L di NaCl.

Portare a pH 7,6 con NaOH, autoclavare per 15 minuti ad una pressione di 1 atm e ad una temperatura di +40-44°C, versare asetticamente 10 mL di mezzo nei tubi di semina ed aggiungere 1 mL del campione da saggiare. Mescolare, lasciar solidificare e quindi sigillare con un tappo di agar (circa 1,5 cm) per prevenire il contatto con l'aria della porzione inoculata. Si incuba a +28°C fino a che il numero delle colonie nere (batteri solfo-riduttori) rimane costante (da 3 a 16 giorni).

Posizione Italiana

Metodo Ufficiale n° III.9
Supplemento Ordinario G.U. n. 179
dell'1.08.2002

Posizione Internazionale

Assente

10.8. Bibliografia

- Butlin K.R., Adams M.E, Thomas M. (1949), *J. Gen. Mycobiol.*, 3, 46.
Chapman S.J. (1990), *Soil. Biol. Biochem.*, 22, n° 4, 479.
Germida J.J. (1985), In: *Planetary Ecology* (D.E. Caldwell, J.A. Brierly & C.L. Brierly, Eds), p. 333.
Hurley M.A., Roscoe M.E. (1983), *J. Appl. Bacteriol.*, 55, 159.
Miller L.P. (1950), *Contr. Boyce Thompson Inst. Pl. Res.*, 6, n° 3, 83.
Pochon J. (1954), In: *Manual technique d'analyse microbiologique du sol.* (Nasson e C. Eds.) Paris.
Postgate J.R. (1963), - *Appl. Microbiol.*, 11, 265.
Pfenning N., Lippert K.D. (1966), *Arkiv fur Mikrobiol.*, 55, 245.
Skerrman V.B.D. (1967), In: *A guide to the identification of the genera of bacterial* (Williams & Wilkins Eds) Baltimore.
Van Niel C.B. (1971), In: *Methods in Enzymology XXIII*, 3. Accademic Press.

Carlo Filippi

Dipartimento di Chimica e Biotecnologie Agrarie
Via del Borghetto, 80
Pisa

Giovanna Bagnoli

Centro di Studio per la Microbiologia del Suolo C.N.R.
Via del Borghetto, 80
Pisa

1^a ed. 2002

Coordinatori dei metodi:
Picci G., Nannipieri P.

Direttore della collana:
Paolo Sequi

IV Microflora fotosintetica ossigenica

| | | |
|--|---|-----|
| 1. Microflora fotosintetica ossigenica | « | 112 |
| 1.1. <i>Introduzione</i> | « | 112 |
| 1.2. <i>Metodi di valutazione quantitativa</i> | « | 112 |
| 1.2.1. Conta totale al microscopio ottico | « | 113 |
| 1.2.1.1. Materiali ed apparecchiature | « | 113 |
| 1.2.1.2. Procedura consigliata | « | 113 |
| 1.2.1.3. Osservazioni | « | 113 |
| 1.2.2. <i>Conta vitale mediante semina in piastra</i> | « | 113 |
| 1.2.2.1. Materiali ed apparecchiature | « | 113 |
| 1.2.2.2. Mezzo di coltura BG-11 (Rippka, 1988) | « | 113 |
| 1.2.2.3. Soluzione di microelementi (g L ⁻¹) | « | 113 |
| 1.2.2.4. Procedura consigliata | « | 114 |
| 1.2.2.5. Osservazioni | « | 114 |
| 1.2.3. <i>Conta vitale su mezzo liquido mediante determinazione del numero più probabile (MPN)</i> | « | 114 |
| 1.2.3.1. Materiali ed apparecchiature | « | 114 |
| 1.2.3.2. Procedura consigliata | « | 114 |
| 1.2.3.3. Commenti | « | 115 |
| 1.2.4. <i>Determinazione della clorofilla (Metodo di Hoyt, 1966, modificato)</i> | « | 115 |
| 1.2.4.1. Materiali ed apparecchiature | « | 115 |
| 1.2.4.2. Procedura consigliata | « | 115 |
| 1.2.4.3. Commenti | « | 115 |
| 1.3. <i>Tecniche di isolamento</i> | « | 115 |
| 1.3.1. Isolamento mediante micromanipolazione | « | 116 |
| 1.3.1.1. Materiali ed apparecchiature | « | 116 |
| 1.3.1.2. Procedura consigliata | « | 116 |
| 1.4. <i>Tecniche di arricchimento e isolamento delle colonie sviluppate in piastra</i> | « | 116 |
| 1.4.1. Materiali ed apparecchiature | « | 116 |
| 1.4.2. Procedura consigliata | « | 116 |
| 1.5. <i>Bibliografia</i> | « | 117 |
| 2. Metanobatteri | « | 118 |
| 2.1. <i>Introduzione</i> | « | 118 |
| 2.1.1. Tecniche di coltivazione | « | 118 |
| 2.1.2. Camera di anaerobiosi | « | 118 |

| | | |
|--|---|-----|
| 2.2. <i>Conta in liquido dei metanobatteri</i> | « | 119 |
| 2.2.1. Preparazione del terreno colturale | « | 119 |
| 2.2.2. Prelievo dei campioni | « | 119 |
| 2.2.3. Semine ed incubazione | « | 119 |
| 2.2.4. Letture | « | 119 |
| 2.3. <i>Bibliografia</i> | « | 121 |
| 3. Metodi di studio delle micorrize arbuscolari nel suolo | « | 122 |
| 3.1. <i>Introduzione</i> | « | 122 |
| 3.2. <i>Principio</i> | « | 122 |
| 3.3. <i>Reagenti</i> | « | 122 |
| 3.4. <i>Materiali ed apparecchiature</i> | « | 122 |
| 3.5. <i>Procedura consigliata</i> | « | 123 |
| 3.5.1. Colorazione differenziale delle radici e determinazione della percentuale di lunghezza radicale infetta | « | 123 |
| 3.5.2. Valutazione del numero di spore presenti nel suolo | « | 123 |
| 3.5.3. Valutazione del numero di propaguli fungini | « | 123 |
| 3.6. <i>Espressione dei risultati</i> | « | 124 |
| 3.6.1. Calcolo della percentuale di lunghezza radicale infetta | « | 124 |
| 3.6.2. Calcolo del numero totale di spore | « | 124 |
| 3.6.3. Calcolo del numero totale di propaguli fungini | « | 124 |
| 3.7. <i>Bibliografia</i> | « | 125 |

1. Microflora fotosintetica ossigenica

di Luisa Tomaselli e Maria Cristina Margheri

1.1. Introduzione

I cianobatteri e le microalghe eucariote, microrganismi autotrofi provvisti di clorofilla e in grado di svolgere la fotosintesi ossigenica, sono componenti ubiquitari delle comunità microbiche che si sviluppano sulla superficie del suolo in ecosistemi aridi ed umidi a tutte le latitudini. In quanto microrganismi fotoautotrofi, essi necessitano per la loro crescita solo di acqua, luce, CO₂ e nutrienti inorganici essenziali. Così, in presenza di luce ed umidità adeguate, tali organismi possono diventare dominanti sulla superficie del suolo, rendendosi macroscopicamente visibili per la loro pigmentazione. La microflora fotosintetica ossigenica del suolo comprende più frequentemente cianobatteri (alghе verdi-azzurre), Cloroficee (alghе verdi), Xantoficee (alghе gialle) e Bacillarioficee (diatomee), ma possono essere presenti anche Euglenoficee (euglenoidi) e Rodoficee (alghе rosse).

Il ruolo ecologico delle microalghe e dei cianobatteri del suolo non è ancora completamente definito, tuttavia è noto come questi organismi, oltre a contribuire alla produttività primaria mediante la fotosintesi, siano coinvolti nell'azotofissazione (cianobatteri), esplichino un'azione di colonizzazione delle aree nude e degradate e, grazie al rilascio di polisaccaridi esocellulari, favoriscano l'aggregazione delle particelle del suolo (Metting, 1990). Come componente organica del suolo, le microalghe prendono parte al ciclo dei nutrienti per le piante. Come componente biotica, possono esercitare un'azione antagonista o di stimolo verso altri microrganismi del suolo, o dare luogo ad associazioni simbiotiche con funghi e piante. E' stata inoltre ipotizzata la produzione da parte delle microalghe di sostanze ad azione fitormonale (Metting et al., 1988).

La capacità azotofissatrice riscontrata in molti cianobatteri è stato l'aspetto più studiato della biologia della microflora fotosintetica del suolo. In molti habitat terrestri i cianobatteri, grazie alla loro nutrizione autotrofa, costituiscono il gruppo più importante fra tutti gli organismi azotofissatori (Sprent e Sprent, 1990). Per questa loro indipendenza nutrizionale, l'impiego di cianobatteri azotofissatori come biofertilizzanti risulta essere particolarmente promettente.

Le microalghe ed i cianobatteri del suolo, in quanto componenti normali della microflora tellurica, possono rappresentare dei validi monitori microbiologici dell'inquinamento del suolo da fitofarmaci, e in particolar modo da diserbanti. Come le piante infestanti, microalghe e cianobatteri per la loro localizzazione superficiale sono infatti particolarmente esposti all'azione di tali composti, i quali possono determinare profonde modificazioni nella composizione della popolazione.

1.2. Metodi di valutazione quantitativa

Vengono riportati i metodi diretti, rappresentati dalla conta totale (1.2.1.) e dalla conta vitale (1.2.2. e 1.2.3.), ed il metodo indiretto basato sulla determinazione del contenuto in clorofilla *a* del suolo (1.2.4.).

Per distinguere i differenti componenti della microflora fotosintetica ossigenica occorre effettuare delle osservazioni al microscopio. Microalghe e cianobatteri sono facilmente distinguibili fra di loro: nelle prime, che sono microrganismi eucarioti, i pigmenti sono contenuti in plastidi mentre nei cianobatteri, organismi procarioti, i pigmenti appaiono uniformemente diffusi nella cellula. Le più comuni microalghe del suolo sono le alghе verdi con pigmentazione dal verde al verde giallastro e le diatomee aventi parete cellulare rigida silicizzata e pigmentazione dal bruno al verde chiaro. I cianobatteri, caratterizzati da pigmentazione verde azzurra o verde bruna, sono presenti nel suolo sia con generi unicellulari che filamentosi, questi ultimi comprendenti molti organismi azotofissatori. Per un eventuale riconoscimento a livello di genere nell'ambito

dei diversi raggruppamenti, si consiglia la consultazione di opere specifiche (Bold e Wynne, 1985).

1.2.1. Conta totale al microscopio ottico

1.2.1.1. Materiali ed apparecchiature

- Pipette graduate;
- beuta Sovirel da 250 mL;
- palline di vetro del diametro di 2-5 mm;
- H₂O sterile;
- camera contaglobuli di Thoma (Superficie complessiva del reticolo 1 mm², profondità 0,1 mm. Reticolo composto da 16 gruppi di quadrati; ogni gruppo è a sua volta suddiviso in 16 quadratini di 0,05 mm di lato);
- microscopio ottico.

1.2.1.2. Procedura consigliata

Mettere 10 g del campione di suolo nella beuta contenente alcune palline di vetro (una ventina circa), aggiungere 90 mL di H₂O sterile e agitare fino ad ottenimento di una sospensione omogenea. Introdurre una goccia della sospensione nella camera contaglobuli coperta dal relativo vetrino coprioggetto; contare le unità algali e/o cianobatteriche (cellule o corti filamenti) presenti in 5 gruppi di quadrati, corrispondenti cioè a 80 quadratini (volume complessivo pari a 0,02 mm³). Moltiplicando il valore ottenuto per 5.10⁴ e per il fattore di diluizione, si ottiene il numero di microrganismi presenti in 1 g del campione di suolo.

1.2.1.3. Osservazioni

Il metodo, adatto per campioni di acqua, è di più difficile applicazione per il suolo a causa dei detriti presenti. Può essere vantaggioso l'uso del microscopio a fluorescenza, mediante il quale si evidenziano le cellule pigmentate che sono naturalmente fluorescenti.

1.2.2. Conta vitale mediante semina in piastra

1.2.2.1. Materiali ed apparecchiature

- Pipette graduate;
- piastre Petri del diametro di 90-100 mm;
- tubi contenenti 9 mL di H₂O;
- tubi contenenti 20 mL del mezzo di coltura sotto riportato.

1.2.2.2. Mezzo di coltura BG-11 (Rippka, 1988)

(composizione in mg L⁻¹)

NaNO₃, 1500; MgSO₄ 7H₂O, 75; K₂HPO₄ 3H₂O, 40; CaCl₂ 2H₂O, 36; Na₂CO₃, 20; acido citrico, 6; ferro (III)-ammonio citrato, 6; Na₂-EDTA, 1; soluzione di microelementi 1 mL; pH=7,4; agar 10 g.

Per i cianobatteri azotofissatori viene omessa la fonte di azoto (mezzo BG-11o).

1.2.2.3. Soluzione di microelementi (g L⁻¹)

H₃BO₃, 2,86; MnCl₂ 4H₂O, 1,81; ZnSO₄ 7H₂O, 0,22; CuSO₄.5H₂O, 0,08; Na₂MoO₄ 2H₂O, 0,39; Co(NO₃)₂ 6H₂O, 0,049.

Per la conta delle microalghe eucariote aggiungere in piastra bacitracina (concentrazione finale, 15-30 mg L⁻¹); per la conta dei cianobatteri aggiungere cicloesimide (concentrazione finale, 20-100 mg L⁻¹) (Reynaud e Roger, 1977).

1.2.2.4. Procedura consigliata

Usare materiali sterili e lavorare in condizioni di asepsi. Sospendere il campione in acqua sterile come in 1.2.1.2 e preparare diluizioni decimali seriali fino a 10⁻⁶.

Semina in profondità: inoculare 1 mL di campione in sospensione opportunamente diluita sul fondo della piastra (in triplo per ogni diluizione decimale seriale effettuata), aggiungere 40 mL di mezzo di coltura fuso e raffreddato a +45°C e mescolare accuratamente. Dopo solidificazione, capovolgere la piastra e porre ad incubare in opportune condizioni di luce e temperatura (20-30 μmoli di fotoni m⁻² s⁻¹ e +24°-30°C). Contare il numero di colonie sviluppate nelle piastre e scegliere le diluizioni in corrispondenza delle quali si ha un numero di colonie per piastra compreso fra 30 e 300. Moltiplicando il numero medio delle colonie per piastra per il fattore di diluizione corrispondente si ottiene il numero di organismi vivi per grammo di campione originario.

Semina in superficie: versare 40 mL di mezzo agarizzato fuso in piastra. Dopo solidificazione, prosciugare le piastre per 2 h a +37°C. Inoculare sulla superficie del mezzo agarizzato 0,1 mL di campione in sospensione opportunamente diluita. Distribuire omogeneamente l'inoculo utilizzando delle palline di vetro sterili, che vengono fatte ruotare sulla superficie inocolata. Capovolgere le piastre e rimuovere le palline di vetro. Dopo incubazione in opportune condizioni si procede a contare le colonie sviluppate, calcolando il numero di microrganismi nel campione di suolo come precedentemente riportato.

1.2.2.5. Osservazioni

Il metodo, basandosi sull'abilità dei microrganismi presenti nel campione di crescere su mezzi colturali solidi, penalizza alcuni tipi strettamente legati ad ambienti idromorfi. Pertanto, non vi è la certezza che la microflora che si sviluppa nelle piastre abbia una composizione del tutto corrispondente a quella del campione in esame. Inoltre è difficile fare una stima degli organismi mobili che non formano colonie (tipo *Oscillatoria* spp.) e si deve anche tenere presente che, nel caso di organismi filamentosi, il numero delle colonie che si sviluppano è funzione del grado di frammentazione che si verifica durante la diluizione. Tuttavia questo metodo è il più seguito in quanto permette l'isolamento e la successiva identificazione delle specie presenti.

1.2.3. Conta vitale su mezzo liquido mediante determinazione del numero più probabile (MPN)

1.2.3.1. Materiali ed apparecchiature

- Pipette graduate;
- provette con 9 mL di H₂O;
- provette contenenti 5 mL di mezzo colturale liquido BG-11 o BG⁻11° (Vedi 1.2.2.2.);
- microscopio ottico.

1.2.3.2. Procedura consigliata

Sospendere il campione di suolo come al punto 1.2.1. Preparare delle diluizioni decimali seriali fino a 10⁻⁶. Seminare 1 mL per ogni diluizione in triplo o in quintuplo nei tubi contenenti 5 mL di mezzo colturale selettivo. Incubare come riportato nel punto 1.2.2. per la semina in piastra mantenendo le provette inclinate per facilitare gli scambi gassosi. Dopo 21 giorni annotare per ciascuna diluizione il numero dei tubi positivi, presentanti cioè sviluppo microalgale o cianobatterico riconoscibile per la pigmentazione dal verde al bruno. Calcolare l'MPN, in base al grado di diluizione del campione di suolo, utilizzando le tavole di Mc Crady. Per determinare la quantità dei differenti componenti della microflora fotosintetica ossigenica mediante l'MPN occorre verificarne la presenza alle diverse diluizioni mediante osservazioni al microscopio.

1.2.3.3. *Commenti*

Il metodo è rapido ed idoneo per campioni contenenti un basso numero di organismi, per i quali il metodo della semina in piastra è meno indicato. Infatti, alle basse diluizioni, lo sviluppo di microalghe e cianobatteri su mezzo agarizzato facilmente viene ostacolato da quello della microflora eterotrofa a più rapida crescita.

1.2.4. *Determinazione della clorofilla (Metodo di Hoyt, 1966, modificato)*

1.2.4.1. *Materiali ed apparecchiature*

- Beuta Sovirel da 100 mL;
- acetone;
- palloncini tarati;
- HCl 4N;
- MgCO₃.

1.2.4.2. *Procedura consigliata*

Pesare 10-20 g di suolo, metterlo nella beuta e aggiungere 30 mL di acetone al 90% neutralizzato con MgCO₃. Tappare ermeticamente ed agitare per 5 h al buio, a +4°C. Centrifugare a 15000 x g per 15 minuti, decantare l'estratto acetone e portarlo a volume in palloncino tarato. Misurare allo spettrofotometro l'assorbimento (A) a 663 nm e a 750 nm. Ripetere la lettura dopo acidificazione con poche gocce di HCl 4N. Calcolare la quantità di clorofilla *a* (clo *a*) secondo la seguente formula:

$$\text{mg (clo } a \text{) per mL (estratto)} = A \text{ corretto} / 89^*$$

A corretto = 2,43 [(A°663 - A°750) - (A°°663 - A°°750)]; A°, prima dell'acidificazione; A°°, dopo acidificazione;*, coefficiente di estinzione della clo *a*.

Riferire la quantità di clorofilla *a* grammo di suolo, moltiplicando il valore precedentemente trovato per il volume di estratto e dividendo il valore ottenuto per la quantità di suolo.

1.2.4.3. *Commenti*

Il metodo è poco indicato per suoli contenenti abbondanti residui vegetali, in quanto in essi sono presenti miscugli di vari pigmenti e prodotti della loro degradazione che possono interferire con la misura della clorofilla proveniente dalla microflora fotosintetica presente nel campione. Inoltre si deve tenere presente che il contenuto di clorofilla in un microrganismo fotoautotrofo può variare in relazione al suo stato fisiologico.

1.3. **Tecniche di isolamento**

L'isolamento delle specie cianobatteriche e microalgali presenti nel suolo viene effettuato direttamente mediante micromanipolatore o isolando le singole colonie sviluppatesi dalla semina in piastra, secondo quanto riportato al punto 1.2.2. Per suoli a bassa densità microalgale o per la ricerca di gruppi particolari (ad es. cianobatteri azotofissatori) può essere opportuno arricchire preliminarmente il campione sugli idonei mezzi colturali (1.2.2.2.).

1.3.1. Isolamento mediante micromanipolazione

1.3.1.1. Materiali ed apparecchiature

- Pipette Pasteur capillari;
- vetrini portaoggetto;
- tubi con mezzo colturale;
- micromanipolatore.

1.3.1.2. Procedura consigliata

Usare materiali sterili e lavorare in condizioni di asepsi. Osservare al microscopio sospensioni diluite di suolo e prelevare con micropipette Pasteur le singole cellule o i brevi filamenti, trasferendoli in tubi contenenti il mezzo colturale.

1.4. Tecniche di arricchimento e isolamento delle colonie sviluppate in piastra

1.4.1. Materiali ed apparecchiature

- Beute con 50-100 mL di mezzo colturale;
- tubi con mezzo colturale liquido;
- strisci di mezzo colturale;
- piastre Petri;
- spatola ed ansa.

1.4.2. Procedura consigliata

Arricchimento del campione di suolo su mezzo liquido: distribuire 0,5-1,0 g di suolo in beute contenenti il mezzo colturale ed incubare come riportato al punto 1.2.2.2. fino all'ottenimento dello sviluppo microalgale.

Arricchimento diretto del campione di suolo: allestire delle piastre con 20 - 40 g di suolo, inumidirlo con 10-20 mL di H₂O sterile e molarlo in superficie con una spatola. Incubare come sopra riportato.

Isolamento: dalle colture di arricchimento su mezzo liquido, al fine di isolare le specie presenti, si procede alla semina in piastra sugli idonei mezzi colturali (1.2.2.2.). Le colonie sviluppatesi sulla superficie della terra molata vengono strisciate su mezzi agarizzati in piastra. Nel caso che le colture ottenute non siano monoalgali, ripetere l'operazione fino ad ottenere l'isolamento delle singole specie. I ceppi isolati vengono mantenuti su mezzo BG-11 liquido o agarizzato (strisci), omettendo la fonte di azoto combinato per i cianobatteri azotofissatori (mezzo BG-11o).

Posizione Italiana

Metodo Ufficiale n° IV.1
Supplemento Ordinario G.U. n. 179
dell'1.08.2002

Posizione Internazionale

ISO/dis 10381 – 1-2

1.5. Bibliografia

- Bold H.C., Wynne M.J. (1985), *Introduction to the Algae. Structure and Reproduction*. Prentice-Hall, New Jersey, p. 720.
- Hoyt P.B. (1966), *Chlorophyll-type compounds in soil and their origin*. Plant and Soil, 25, 167-171.
- Metting B. (1990), *Microalgae applications in agriculture*. In Developments in Industrial Microbiology, Vol. 31, (G.E. Pierce, Ed), pp. 265-270.
- Metting B., Rayburn W.R., Reynaud P.A. (1988), *Algae and agriculture*. In Algae and Human Affairs (C.A. Lembi and R.A. Waaland, Eds), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 335-370.
- Rippka R. (1988), *Isolation and purification of cyanobacteria*. In Methods in Enzymology, Vol. 167 (L. Packer and A.N. Glazer, Eds), Academic Press, San Diego, pp. 3-27.
- Reynaud P.A., Roger P.A. (1977), *Milieux selectifs pour la numeration des algues eucaryotes, procaryotes et fixatrices d'azote*. Revue d'Ecologie et Biologie du Sol, 14, 421-428.
- Sprent J.I., Sprent P. (1990), *Nitrogen Fixing Organisms. Pure and Applied Aspects*, Chapman and Hall, London, pp. 123-127.

Tomaselli Luisa

Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi del CNR
c/o Dip.to di Scienze e Tecnologie Alimentari e
Microbiologiche
Università di Firenze
P.le delle Cascine, 27
50144 Firenze

1^a ed. 2002

Coordinatori dei metodi:
Picci G., Nannipieri P.

Direttore della collana:
Paolo Sequi

Margheri Maria Cristina

Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi del CNR
c/o Dip.to di Scienze e Tecnologie Alimentari e
Microbiologiche
Università di Firenze
P.le delle Cascine, 27
50144 Firenze

2. *Metanobatteri*

di Annamaria Ferrari

2.1. Introduzione

I microrganismi strettamente anaerobi, quali i batteri metanogeni, richiedono assenza di ossigeno molecolare (O_2) ed un basso potenziale redox (E_h) nei mezzi di coltura. Il semplice ricorso a giare per l'incubazione in ambiente anossico, associato ai normali metodi microbiologici di preparazione dei substrati, trasferimento e allestimento di subculture, può ancora risultare sufficiente per i clostridi formanti endospore ed altre specie microbiche ossigeno-tolleranti, ma è di sicuro inadeguato per i batteri produttori di metano. Per questi ultimi tutte le precauzioni devono essere prese al fine di escludere l'ossigeno in ogni fase delle procedure di manipolazione, compresi il prelievo dei campioni dagli ambienti ovvero dalle matrici oggetto di indagine, il trasferimento in laboratorio, la preparazione dei mezzi colturali. Ciò significa che, al fine di riuscire con successo nella identificazione, isolamento e coltivazione dei batteri metanogeni, dovranno essere approntati specifici apparati e attuati rigorosi protocolli metodologici di solito non immediatamente disponibili nella maggior parte dei laboratori di microbiologia.

Di seguito viene proposta la metodica orientata alla valutazione quantitativa dei metanobatteri che è in particolare adottabile qualora non necessiti l'isolamento delle singole forme microbiche.

2.1.1. *Tecniche di coltivazione*

In questa sede si riportano le procedure per la manipolazione dei batteri metanogeni secondo le più recenti acquisizioni che hanno preso le mosse dalle pionieristiche indicazioni di Hungate (1950; 1969), relative alla coltivazione di microrganismi anaerobi stretti. La versatilità di queste procedure è stata estesamente documentata in letteratura (Bryant et al., 1968; Bryant, 1972; Holdeman and Moore, 1972; Macy et al., 1972; Miller and Wolin, 1974; Edwards and McBride, 1975). Il metodo proposto si basa in particolare sui protocolli descritti da Balch e Wolfe (1976) e presuppone l'uso di tre componenti fondamentali: a) bottiglie o tubi con bocca adatta ad ospitare uno spesso tappo di butile nero fissato con una ghiera di alluminio; b) una camera di anaerobiosi; c) una centralina per dispensare gas o miscele di gas completamente prive di ossigeno.

2.1.2. *Camera di anaerobiosi*

Per la preparazione dei mezzi colturali e delle soluzioni anaerobiche, nonché per gli strisci su mezzi agarizzati in piastre Petri è indispensabile l'uso di una camera di anaerobiosi che, storicamente, in letteratura viene definita di tipo Freter (Aranki and Freter, 1972). Oggi, tuttavia, sono disponibili in commercio vari modelli di camera di anaerobiosi, proposti da diversi costruttori. In ogni caso, l'atmosfera interna è costituita da una miscela $N_2:CO_2:H_2$ nel rapporto 85:15:10. All'interno della camera l'idrogeno consente il funzionamento di un catalizzatore al palladio per la rimozione di eventuali tracce di ossigeno. $CaCl_2$ finemente macinato ovvero granuli di gel di silice rigenerabile vengono invece collocati in camera d'anaerobiosi per eliminare il vapor d'acqua che si libera specialmente durante le operazioni di distribuzione dei substrati agarizzati nelle piastre.

2.2. Conta in liquido dei metanobatteri

Il metodo si basa sulla valutazione indiretta dell'MPN impiegando terreni colturali di comune reperibilità quale ad esempio il Todd Hewitt Broth ed operando in condizioni di rigorosa anossia all'interno di una cabina anaerobica.

2.2.1. Preparazione del terreno colturale

Il terreno sopra indicato va addizionato di acetato e formiato di sodio entrambi allo 0.25% e deve essere portato a pH 7. La preparazione va effettuata in una cabina anaerobica impiegando acqua che sia stata preridotta per 24-48 h all'interno della stessa. Tutti gli altri componenti del terreno andranno introdotti in cabina almeno due ore prima dell'utilizzo. Il terreno verrà quindi distribuito in vial da 50 mL, ognuno riempito con 20 mL, chiusi poi con tappi di gomma butilica e ghiere di serraggio in alluminio.

I vial verranno poi estratti dalla cabina anaerobica per essere sottoposti a sterilizzazione a +115°C per 20 minuti.

2.2.2. Prelievo dei campioni

I suoli da campionare devono essere decorticati prima del prelievo che verrà eseguito per mezzo di un carotatore. Durante tale operazione si deve limitare per quanto possibile il contatto con l'aria, operando nel più breve tempo e riponendo immediatamente i campioni in sacchetti di plastica successivamente sottoposti a lavaggio con atmosfera inerte, ad esempio mediante bombola di N₂, per eliminare l'ossigeno atmosferico.

Qualora il campione da prelevare si trovasse in suoli allagati (ad esempio risaie, o sedimenti di corpi idrici), il prelievo si effettuerà per mezzo di un contenitore che possa essere riempito completamente e chiuso in sommersione.

I campioni andranno poi riposti in un contenitore possibilmente refrigerato e trasportati nel più breve tempo possibile al laboratorio per essere messi in condizioni di anaerobiosi rigorosa come quella offerta dalle cabine anaerobiche. I campioni andranno utilizzati entro 24 h dal prelievo.

2.2.3. Semine ed incubazione

Operando all'interno di una cabina anaerobica, per ogni campione verrà allestita una serie di diluizioni-sospensioni in base 10 impiegando come medium diluente una soluzione salina preridotta quale la Dilution-blank indicata dal Virginia Polytechnic Institute (Holdeman and Moore, 1973).

Con ogni diluizione verranno inoculati, mediante siringa, tre vial (tecnica dell'MPN in triplo) poi estratti dalla cabina stessa. Lo spazio di testa di ciascun vial verrà lavato con una miscela di H₂-CO₂ (80/20 v/v) per mezzo di una siringa collegata direttamente ad una bombola di tale miscela; gli stessi vials verranno poi mandati in sovrappressione a circa 1-2 atm con tale miscela gassosa. Le temperature di incubazione saranno di +37°C nel caso si ricerchino metanobatteri mesofili, di +50/55°C nel caso si valutino metanobatteri termofili.

2.2.4. Letture

Dopo 10 giorni dalla semina si potrà effettuare la prima valutazione per verificare la presenza di metanobatteri. Sarà considerato positivo ogni vial nel quale sia rilevabile gascromatograficamente la presenza di metano e/o nel quale si possa constatare la presenza di microrganismi fluorescenti mediante l'osservazione di preparati a fresco al microscopio a fluorescenza (Ferrari et al., 1994). In caso di risultato negativo le letture andranno ripetute a 20 giorni.

Tale caratteristica fluorescenza del coenzima F₄₂₀ andrà osservata con un microscopio ad epifluorescenza equipaggiato ad esempio con un set di filtri H 436 della Zeiss, con un filtro di eccitazione 436/8, partitore dicromatico FT 460 e filtro di sbarramento LP 470.

La valutazione gascromatografica del metano può essere effettuata impiegando un gascromatografo con detector a termoconducibilità e dotato di colonna a setacci molecolari (1m x 4 mm). Le condizioni operative saranno: iniettore +100°C, forno +40°C, carrier elio, flusso 20 mL/minuto (Ferrari et al., 1994).

Posizione Italiana

Metodo Ufficiale n°IV.2

Supplemento Ordinario G.U. n. 179
dell'1.08.2002**Posizione Internazionale**

Assente

2.3. Bibliografia

- Aranki A., Freter R. (1972), Use of anaerobic glove boxes for the cultivation of strictly anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 1329-1334.
- Balch W.E., Wolfe R.S. (1976), New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethansulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, 781-791.
- Bryant M.P. (1972), Commentary on Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 1324-1328.
- Bryant M.P., McBridge B.C., Wolfe R.S. (1968), Hydrogen-oxidizing methane bacteria. I. Cultivation and methanogenesis. *J. Bacteriol.*, 95, 1118-1123.
- Edwards T., McBridge B.C. (1975). New method for the isolation and identification of methanogenic bacteria. *Appl. Microbiol.*, 29:540-545.
- Ferrari A., Brusa T., Rutili A., Canzi E., Biavati B. (1994), Isolation and characterization of *Methanobrevibacter oralis* sp. nov. *Current Microbiology*, 29, 2-12.
- Holdeman L.V., Moore W.E.C. (1972), Roll-tube techniques for anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 1314-1317.
- Holdeman L.V., Moore W.E.C. (1973), *Anaerobic Laboratory Manual*, 2nd edn. Virginia Polytechnic Institute and State University Anaerobe Manual, Blacksburg, Virginia, USA.
- Hungate R.E. (1950), The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 14, 1-49.
- Hungate R.E. (1969), A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In J.R. Norris and D.W. Ribbons (eds), *Methods in Microbiology*, vol. 3B. Academic Press Inc., New York. pp. 117-132.
- Macy J.M., Snellen J.E., Hungate R.E. (1972), Use of syringe methods for anaerobiosis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 1318-1323.
- Miller T.L., Wolin M.J. (1974), A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 27, 985-987.

Annamaria Ferrari

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche.

Sezione Microbiologia Agraria, Alimentare, Ecologica

Università degli Studi di Milano

Via Celoria 2

20133 Milano

1^a ed. 2002

Coordinatori dei metodi:

Picci G., Nannipieri P.

Direttore della collana:

Paolo Sequi

3. Metodi di studio delle micorrize arbuscolari nel suolo

di Manuela Giovannetti

3.1. Introduzione

Le micorrize arbuscolari sono associazioni simbiotiche che si instaurano tra le radici della maggior parte delle piante (80%) e molte specie di funghi del suolo. L'importanza delle simbiosi micorriziche risiede nel fatto che esse svolgono un ruolo fondamentale nella nutrizione minerale delle piante: le ife fungine infatti rappresentano un valido apparato radicale ausiliario, che esplora il suolo in maniera efficace, assorbendo le sostanze nutritive e traslocandole alle ife interne alle radici ed alle cellule radicali.

La maggior parte delle piante agrarie possiede micorrize arbuscolari, ed i funghi interessati appartengono ad un ristretto gruppo di Zygomycetes, l'ordine Glomales. I metodi per la valutazione di tale simbiosi non sono assimilabili a quelli di conta generale microbica, poichè i funghi interessati sono biotrofi obbligati e non sono in grado di vivere separatamente dalla pianta ospite.

3.2. Principio

- I metodi per la valutazione della infezione micorrizica si basano sulla colorazione differenziale delle radici (Clearing and staining technique, Phillips e Hayman, 1970), e sulla misura della percentuale di lunghezza radicale infetta (Gridline intersect method, Giovannetti e Mosse, 1980).
- I metodi per la valutazione del numero di spore presenti nel suolo si basano sulla conta diretta dopo lavaggio e setacciamento del suolo (Wet-sieving and decanting technique, Gerdemann e Nicolson, 1963).
- I metodi per la valutazione della infettività di un suolo si basano sulla determinazione del numero di propaguli infettivi presenti in un dato suolo (Most probable number technique, Porter, 1979).

3.3. Reagenti

Nel corso dell'analisi, le operazioni che prevedono l'uso di Trypan blu devono essere eseguite sotto una cappa aspirante. In ogni caso, il lattofenolo può essere sostituito con acido lattico.

- Idrossido di potassio, KOH, soluzione 10% in acqua distillata;
- acido cloridrico, HCl, soluzione 2% in acqua;
- trypan blu, soluzione 0.05% in lattofenolo;
- acido lattico puro.

3.4. Materiali ed apparecchiature

Corrente attrezzatura da laboratorio ed in particolare:

- Bagno ad acqua con termostato;
- microscopio stereoscopico;
- provette di vetro;
- piastre Petri sulla cui base esterna sia stampata una griglia di linee perpendicolari tra loro;

- contatore manuale;
- serie di setacci metallici a maglie di diametro 700, 400, 250, 100, 50 μm ;
- autoclave per la sterilizzazione del suolo;
- provette di plastica del volume di 50-100 mL, sulla cui base siano stati praticati alcuni piccoli fori;
- camera di crescita in condizioni controllate o serra;
- semi di specie di piante micotrofiche come trifoglio, medica, porro.

3.5. Procedura consigliata

3.5.1 Colorazione differenziale delle radici e determinazione della percentuale di lunghezza radicale infetta

- Immergere un campione rappresentativo di radici o di segmenti radicali (2-5 g) in una provetta di vetro contenente KOH.
- Porre la provetta contenente le radici in un bagnomaria, a $+90^{\circ}\text{C}$, per un tempo variabile da 30 minuti ad 1 h, a seconda del diametro radicale.
- Risciacquare il campione in acqua corrente e acidificarlo in HCl (3.2).
- Aggiungere al campione radicale Trypan blu al lattofenolo, e porre la provetta in un bagnomaria a $+90^{\circ}\text{C}$ per 5 minuti.
- Rimuovere l'eccesso di colorante, risciacquando il campione in acido lattico puro. Il campione può essere mantenuto per alcuni giorni in acido lattico e successivamente esaminato al microscopio stereoscopico per la stima quantitativa della infezione radicale.
- Versare il campione in una piastra Petri su cui è disegnata una griglia di linee rette intersecantesi perpendicolarmente, distribuire le radici uniformemente sopra la griglia, e porre la piastra Petri sotto al microscopio stereoscopico (20-50 ingrandimenti).
- Procedere al conteggio di tutti i punti in cui una linea retta della griglia interseca una radice, registrando mediante un contatore manuale la presenza o meno dell'infezione micorrizica nel punto individuato.

3.5.2. Valutazione del numero di spore presenti nel suolo

- Sospendere un campione rappresentativo di un dato suolo, fresco e asciutto, di circa 100 g, in 1 l di acqua di rubinetto, in un beaker, agitando con un bastoncino di vetro, e lasciando quindi sedimentare per circa 20 secondi: in tal modo le particelle più pesanti sedimentano rapidamente.
- Filtrare rapidamente attraverso i setacci a maglie di diametro decrescente a partire dall'alto, posti uno sull'altro.
- Ripetere le operazioni a e b per tre volte.
- Risospendere in poca acqua le frazioni organiche depositatesi su ciascun setaccio e versarle separatamente in piastre Petri per il successivo conteggio.
- Contare il numero di spore presenti in ciascuna piastra. Allo scopo di facilitare il conteggio viene spesso utilizzata una piastra avente alla base cerchi in rilievo concentrici, adatta alla conta dei nematodi. Le spore sono facilmente riconoscibili dal loro notevole diametro (50-500 μm), dalla forma globosa e dal colore, che varia nelle diverse specie da bianco a giallo, rosa, rosso, marrone, nero.

3.5.3. Valutazione del numero di propaguli fungini

- Preparare una serie di diluizioni decimali del suolo da saggiare utilizzando come diluente lo stesso tipo di suolo previamente sterilizzato in autoclave a 121°C per 20 minuti. Le diluizioni di suolo su cui eseguire le prove sono: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .
- Riempire con le varie diluizioni di suolo le provette di plastica, effettuando 5 repliche.
- Seminare ogni provetta con i semi delle specie di piante micotrofiche.
- Far crescere le piantine per 6 settimane in camera di crescita o in serra.
- Raccogliere le radici da ogni replica e diluizione, lavarle, chiarificarle e colorarle come precedentemente descritto, e determinare la presenza o assenza di infezione micorrizica in ogni apparato radicale.

3.6. Espressione dei risultati

3.6.1. Calcolo della percentuale di lunghezza radicale infetta

Il numero dei punti radicali in cui è presente l'infezione, diviso per il numero totale delle intersezioni tra radici e linee rette, moltiplicato per 100, darà la percentuale di lunghezza radicale infetta.

Se si avrà l'avvertenza di utilizzare una griglia con distanze tra le linee rette di 1.27 cm, il numero totale di intersezioni darà direttamente la lunghezza in cm del campione radicale studiato ed il numero di intersezioni in cui le radici sono positive all'infezione darà i cm di lunghezza radicale infetta del campione in esame (Newman, 1966; Marsh, 1971; Giovannetti e Mosse, 1980). Questo metodo di calcolo è basato sulla formula matematica di Newman (1966), che mette in relazione la lunghezza di linee curve disposte in una data area con il numero di volte che esse intersecano delle linee rette poste a caso nell'area occupata da esse:

$$R = \frac{\pi \times A \times n}{2H}$$

R=lunghezza totale delle radici;

A=area nella quale sono distribuite le radici;

n=numero di intersezioni tra le radici e le linee rette;

H=numero totale di linee rette.

Marsh (1971) considerò una serie regolare di linee tale da formare una griglia quadrata. Quando la distanza tra le linee era 14/11 della unità di misura richiesta, allora $\pi A = 2H$, cioè la lunghezza radicale in cm era uguale al numero di intersezioni contate tra le radici stesse e le linee rette.

3.6.2. Calcolo del numero totale di spore

Il numero totale di spore contenute nel campione di 100 g di suolo si ottiene sommando i numeri relativi alle spore presenti nelle diverse piastre Petri su cui era stato versato il materiale organico depositato sui setacci metallici.

3.6.3. Calcolo del numero totale di propaguli fungini

Il numero dei propaguli fungini presenti nel campione di suolo si ottiene utilizzando le stesse tavole usate per la determinazione dei microrganismi del suolo secondo il metodo classico delle sospensioni/diluizioni (Cap. 2 del presente testo).

Posizione Italiana

Metodo Ufficiale n° IV.3
Supplemento Ordinario G.U. n. 179
dell'1.08.2002

Posizione Internazionale

ISO/dis 10381 – 1-2

3.7. Bibliografia

- Gerdemann J.W., Nicolson T.H. (1963), *Spores of endomycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting*. Transactions of the British Mycological Society, 46, 235-244.
- Giovannetti M., Mosse B. (1980), *An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots*. New Phytologist, 84, 489-500.
- Marsh B.A.B. (1971), *Measurement of length in random arrangements of lines*. Journal of Applied Ecology, 8, 265.
- Newman E.Y. (1966), *A method of estimating the total length of root in a sample*. Journal of Applied Ecology, 3, 139.
- Phillips J.M., Hayman D.S. (1970), *Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection* Transactions of the British Mycological Society, 55, 158.
- Porter W.M. (1979), *The "most probable number" method for enumerating infective propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil*. Australian Journal of Soil Research, 17, 515-519.

Manuela Giovannetti

Dipartimento di Chimica e Biotecnologie Agrarie
Università di Pisa
Via del Borghetto, 80
56124 Pisa

1^a ed. 2002

Coordinatori dei metodi:
Picci G., Nannipieri P.

Direttore della collana:
Paolo Sequi