Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
118° (2000), Vol. XXIV, pp. 363-369

C. MONDINI *, ** - R. TASSOTTI * - L. LEITA*

Influenza dello Zn nell'utilizzo di stereoisomeri dell'acido glutammico da parte della biomassa microbica del suolo ***

Introduzione

Lo Zinco è un microelemento essenziale dei cicli metabolici, che se però presente nel terreno in quantità elevate può diventare tossico per i microrganismi e per gli organismi superiori. L'apporto al suolo di ammendanti ricchi di Zn e la relativa disponibilità di questo elemento pongono la necessità di individuare validi criteri per identificare livelli di concentrazione dell'elemento che non alterino la funzionalità del sistema suolo. Esiste generale consenso sul fatto che i microrganismi del suolo possano essere utilizzati come sensibili e tempestivi indicatori di cambiamenti nell'equilibrio dell'ambiente (Brookes, 1995). Gli studi degli effetti dei metalli pesanti sui microrganismi sono generalmente basati su determinazioni della quantità, attività e composizione della biomassa microbica.. Recentemente è stato proposto di utilizzare a questo scopo il diverso comportamento fornito dai microrganismi in presenza di stereoisomeri degli aminoacidi. (Hopkins *et al.*, 1997). Gli aminoacidi maggiormente presenti nelle molecole biologiche sono nella forma L. La presenza della forma D si registra per lo più nelle pareti cellulari dei batteri (Hopkins *et al.*, 1997; Landi *et al.*, 1999) e i D aminoacidi più frequenti sono l'alanina e l'ac. glutammico. Hopkins *et al.* (1997) hanno dimostrato che il rapporto della respirazione tra le forme L e D dell'acido glutammico decresce con l'aumento del quoziente metabolico. Il quoziente metabolico, che rappresenta la quantità di

* Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante, sezione di Gorizia, Via Trieste 23, 34170 Gorizia. Tel. 0481 522041; Fax 0481 520208
** Autore per la corrispondenza: E-mail: claudio.mondini@isnp.it
*** Relazione presentata al Convegno su "Indicatori per la qualità del suolo: prospettive ed applicabilità", Roma, 29 marzo 2000.

CO_2 respirata per unità di biomassa microbica, è stato utilizzato per valutare lo stato fisiologico delle comunità microbiche del suolo: elevati valori del quoziente indicherebbero condizioni di disturbo o di stress per i microrganismi che devono spendere una maggiore quantità di energia per far fronte alle avverse condizioni ambientali (Nannipieri *et al.*, 1990). Il rapporto L/D dell'acido glutammico potrebbe essere pertanto utilizzato come un indicatore di uno stress fisiologico a livello delle comunità microbiche. È possibile che gli organismi nelle comunità più stressate siano meno discriminanti nei riguardi degli enantiomeri degli aminoacidi come risposta alla più grande domanda di substrati per la respirazione.

Scopo del presente lavoro era pertanto la verifica degli effetti di un metallo pesante sull'utilizzazione di stereoisomeri dell'ac. glutammico, anche in relazione ai cambiamenti registrati dalla biomassa microbica e dal quoziente metabolico.

Materiali e metodi

Un prato stabile (TOC 27.7 mg g^{-1}, pH 7.3) è stato campionato alla profondità di 5-20 cm, setacciato a 2 mm, portato al 40% della WHC e preincubato per 5 giorni a 25°C. I campioni condizionati sono stati quindi trattati con una soluzione di $ZnSO_4$ per dare 600 μg Zn g^{-1} suolo secco e 50% della WHC ed incubati a 25°C in contenitori ermetici contenenti 50 ml di NaOH 0.5M. Il controllo è stato addizionato della stessa quantità di acqua distillata.

Dopo 12 giorni dall'aggiunta del metallo aliquote del controllo e del campione contaminato corrispondenti a 40 gr di suolo secco sono state addizionate di ac. glutammico pari a 600 μg C g^{-1} di suolo secco nelle forme D, L e miscela D/L (1:1 p:p). L'ac. glutammico è stato disperso in forma solida con l'aggiunta di talco in rapporto 1:3. Il terreno è stato poi posto in contenitori di vetro (1 L) a chiusura ermetica contenenti 50 ml di NaOH 0.5M ed incubato a 25°C per 5 giorni. Sono state altresì incubate aliquote del controllo e del campione contenente Zn non addizionate con ac. glutammico. La CO_2 svolta è stata determinata dopo 0, 6, 24, 48 e 72 ore dal trattamento con l'ac. glutammico, mediante titolazione della NaOH con HCl 0.2 N (Jenkinson e Powlson, 1976).

Il contenuto di C della biomassa microbica del suolo è stata determinata prima dell'aggiunta dello Zn e nelle tesi addizionate o meno con l'isomero L dopo 0, 24 e 72 ore dal trattamento. La misura è stata effettuata mediante il metodo della fumigazione-estrazione (Vance *et al.*, 1987; Wu *et al.*, 1990). Il calcolo del quoziente metabolico (qCO_2) è stato effettuato in accordo con Anderson e Domsh (1978).

Risultati e discussione

L'aggiunta di Zn alla dose di 600 μg g^{-1} ha prodotto dopo 12 giorni di incubazione una leggera, anche se significativa, diminuzione della biomassa microbica

(6%) (Tab. 1). L'aggiunta di ac. glutammico nella forma L ha provocato un incremento nella quantità di biomassa che è risultata sempre significativamente maggiore nei terreni non trattati con Zn. Ad es. dopo 24 ore dalla somministrazione dell'aminoacido l'incremento di biomassa è stato del 8% nel terreno trattato con Zn e del 21% nel controllo non trattato. Probabilmente nel terreno contaminato la biomassa consuma parte dell'energia fornita dall'addizione del substrato facilmente degradabile per far fronte alla tossicità del metallo (Leita *et al.*, 1995, 1999), diminuendo così la efficienza di conversione dell'aminoacido in nuova biomassa. Questa ipotesi sembra trovare conferma nei risultati relativi alla respirazione. Infatti la quantità di CO_2-C svolta dopo 12 giorni dall'aggiunta del metallo è risultata del 29% superiore rispetto al controllo, indicando la maggiore spesa energetica necessaria ai microrganismi (Tab. 2). Il quoziente metabolico è risultato sempre maggiore in assenza di ac. glutammico nel terreno trattato con Zn (Tab. 3). L'aggiunta dell'ac. glutammico nella forma L, facilmente degradabile dalla biomassa microbica, ha reso più evidenti le differenze riscontrate tra terreno inquinato e controllo. Il terreno trattato con Zn dopo 24 ore ha svolto una quantità di CO_2-C superiore del 20% rispetto al controllo. Similmente è stato registrato un incremento del qCO_2 che è risultato significativamente maggiore nel terreno inquinato.

I dati relativi alla respirazione del suolo addizionato con ac. glutammico hanno messo in evidenza un comportamento analogo tra la forma L ed il racemo L/D. Probabilmente la concentrazione utilizzata dello stereoisomero L nella miscela è troppo elevata rispetto alla velocità di utilizzo di questo substrato da parte della biomassa. La dinamica di utilizzo delle forme L e D (Fig. 1) ha evidenziato che i differenti stereoisomeri degli aminoacidi aggiunti al suolo provocano una risposta differente in termini qualitativi e quantitativi. La forma L è maggiormente utilizzata fino a 24 ore dall'aggiunta dopodiché l'utilizzo dei due stereoisomeri tende ad

Tab. 1. *Carbonio della biomassa microbica (B_C) nel controllo e nel suolo contenente Zn addizionati meno con acido L-glutammico.*

Trattamento		Tempo dopo l'aggiunta dell'ac. glutammico (h) 0	24	72
		B_C ($\mu g\ g^{-1}$)		
Ctrl	–	761b	654b	793b
Ctrl	ac. L-glutammico		830d	898c
Zn	–	716a	656a	744a
Zn	ac. L-glutammico		713c	782c

I valori di una colonna che sono seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti al test di Duncan (P<0,05).

Tab. 2. *Respirazione (CO_2-C) della biomassa microbica nel controllo e nel suolo contenente Zn addizionati o meno con stereoisomeri dell'acido glutammico.*

Trattamento		Tempo trascorso dopo l'aggiunta dell'ac glutammico (h) 0	6	24	48	72
		CO_2-C ($\mu g\ g^{-1}$)				
Ctrl	–	98b	5a	19a	31a	41a
	ac. L-glutammico		48c	294d	345b	372b
	ac. D-glutammico		10a	237c	370d	402d
	raceno		47c	309d	347b	390cd
Zn	–	126a	14a	21a	35a	49a
	ac. L-glutammico		29b	356e	365cd	372b
	ac. D-glutammico		6a	213b	372d	392cd
	raceno		14a	346e	353bc	386c

I valori di una colonna che sono seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti al test di Duncan (P<0,05).

uniformarsi. Questo andamento viene riflesso nel rapporto L/D che decresce regolarmente fino a raggiungere valori prossimi all'unità (Tab. 4).

Il comportamento osservato conferma i risultati di precedenti studi che hanno evidenziato come la SIR (respirazione indotta da substrato) dei D-aminoacidi sia risultata significativamente inferiore a quella dei corrispondenti L-aminoacidi (Hopkins e O'Dowd, 1997). Questo fatto è stato spiegato come un utilizzo della

Tab. 3. *Quoziente metabolico (qCO_2) nel controllo e nel suolo contenente Zn addizionati o meno con acido L-glutammico.*

Trattamento		Tempo dopo l'aggiunta dell'ac. glutammico (h) 0	24	72
		qCO_2 (μg C-CO_2 $\mu g\ B_c^{-1}\ h^{-1} \times 10^4$)		
Ctrl	–	4,5 *(0,1)*	11,9 *(0,2)*	7,2 *(0,1)*
Ctrl	ac. L-glutammico		148 *(2)*	58 *(1)*
Zn	–	6,1 *(0,1)*	13,4 *(0,4)*	9,1 *(0,3)*
Zn	ac. L-glutammico		208 *(3)*	66 *(2)*

I valori tra parentesi rappresentano la deviazione standard.

Tab. 4. *Rapporto della respirazione acido L-glutammico/acido D-glutammico nel controllo e nel suolo contenente Zn.*

Trattamento	Tempo dopo l'aggiunta dell'ac glutammico (h) 6	24	48	72
	Respirazione L/D			
Controllo	5,30b	1,20a	0,93a	0,93a
Zn	4,70a	1,70b	0,98b	0,95a

I valori di una colonna che sono seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti al test *t* (P<0.1).

forma D da parte di una frazione della biomassa microbica oppure da un utilizzo da parte dell'intera biomassa microbica, ma ad un minore tasso rispetto alla forma L (Hopkins e Ferguson, 1994). Il ritardo della respirazione indotta dalla forma D può essere spiegata sulla base del metabolismo di utilizzazione dei D aminoacidi. Il primo passaggio nella utilizzazione degli stereoisomeri D da parte dei microrganismi è stato ipotizzato essere la loro racemizzazione ad opera di uno specifico enzima inducibile. Questa via metabolica non è stata ancora dimostrata, ma a sostegno di questa tesi vi è il fatto che la preincubazione del suolo con la forma D dell'aminoacido ha portato ad un significativo incremento della SIR di questo aminoa-

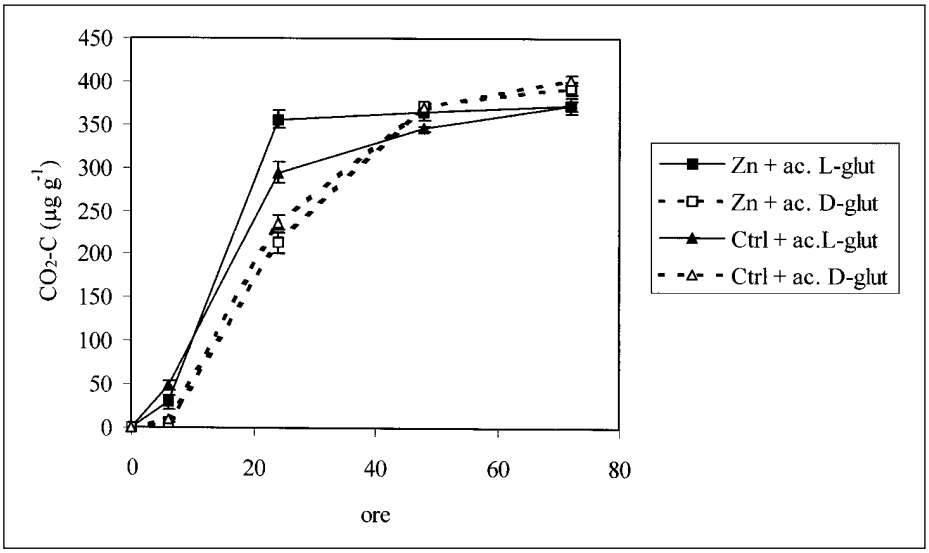

Fig. 1. Dinamica della respirazione (CO_2-C) del controllo e del suolo contenente lo Zn addizionati con acido L-glutammico e D-glutammico.

cido (Hopkins e O'Dowd, 1997). Il tempo necessario per l'induzione della racemasi potrebbe spiegare il ritardo con cui si manifesta la crescita indotta dalla forma D (Hopkins e Ferguson, 1994).

Per quanto riguarda gli effetti della presenza del metallo pesante sul rapporto L/D è stato visto che dopo 6 ore dal trattamento il rapporto è più basso nel terreno in presenza di Zn rispetto al controllo (Tab. 4). Questi risultati sono in accordo con l'ipotesi, formulata da Hopkins *et al.* (1997), di una minore selettività dei microrganismi del suolo riguardo alle forme stereoisomere in condizioni di stress. Dopo 24 ore si ha il massimo della respirazione in seguito all'aggiunta del substrato, in particolare nel trattamento con la forma L. Il rapporto L/D risulta in questo caso maggiore nei terreni trattati con Zn. L'andamento contradditorio del rapporto potrebbe trovare una spiegazione nelle diverse frazioni della biomassa coinvolte. Secondo Sparling (1995) l'iniziale risposta respiratoria (entro 6 ore) è dovuta alla biomassa nativa, mentre quella misurata dopo 24 ore può indicare la partenza della fase di crescita microbica. L'andamento registrato potrebbe indicare un cambiamento di funzionalità tra biomassa nativa e biomassa di nuova sintesi. Inoltre Hattori (1985) ha dimostrato che la prima mineralizzazione dei substrati aggiunti al suolo è più sensibile alla presenza dei metalli rispetto alle mineralizzazioni successive. Dopo 48 il rapporto L/D è ancora superiore nel terreno contenente Zn, mentre dopo 72 ore non si sono registrate differenze significative.

I risultati del presente lavoro sembrano confermare la validità di utilizzo delle differenze nel metabolismo dei D- e L- aminoacidi per ottenere utili informazioni sullo stato fisiologico generale della biomassa microbica.

BIBLIOGRAFIA

Anderson J.P.E., Domsch K.H. (1978): "A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil". *Soil Biol. Biochem.*, *10*, 215-221.

Brookes P.C. (1995): "The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals". *Biol. Fert. Soils*, *19*, 269-279.

Hattori H. (1992): "Influence of heavy metals on soil microbial activities". *Soil Sci. Plant. Nutr.*, *38*, 93-100.

Hopkins D.W, Ferguson K. (1994): "Substrate-induced respiration in soil amended with D- and L- isomers of aminoacids". *Applied Soil Ecology*, *1*, 75-81.

Hopkins D.W., O'Dowd R.W. (1997): "Chirality is a factor in substrate utilization assays". In: H. Insam, A. Rangger Eds., *Microbial communities: functional versus structural approaches*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 215-228.

Hopkins D.W., O'Dowd R.W., Shiel R.S. (1997): "Comparison of D- and L-amino acid metabolism in soils with differing microbial biomass and activity". *Soil Biol. Biochem.*, *29*, 23-29.

Jenkinson D.S., Powlson D.S. (1976): "The effect of biocidal teatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass". *Soil Boil. Biochem.*, *8*, 209-213.

Landi L., Renella G., Moreno J.L., Falchini L., Nannipieri P. (1999): "Metabolic quotient, enzyme activities, L/D amino acid respiration ratio as affected by cadmium in a forest soil". Proc. 5th Intern. Conf. On The Biogeochem. *Of Trace Elements*. Vienna, pp. 758-759.

Leita L., De Nobili M., Muhlbachova G., Mondini C., Marchiol L., Zerbi G. (1995): "Biovailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation". *Biol. Fertil. Soils*, *19*, 103-108.

Leita L., De Nobili M., Mondini C., Muhlbachova G., Marchiol L., Bragato G., Contin M. (1999): "Influence of inorganic and organic fertilization on soil microbial biomass, metabolic quotient and heavy metal bioavailability". *Biol. Fertil. Soils*, *28*, 371-376.

Nannipieri P., Grego S., Ceccanti B. (1990): "Ecological significance of the biological activity in soil". In: J-M. Bollag, G. Stotzky (eds.), *Soil Biochemistry*, vol. 6, Marcel Dekker, New York, pp. 293-355.

Vance E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S. (1987): "An extraction method for measuring microbial biomass C.". *Soil Boil. Biochem.*, *19*, 703-707.

Wu J., Joergensen R.G., Pommering B., Chaussod R., Brookes P.C. (1990): "Measurement of soil microbial biomass C – an automated procedure". *Soil Boil. Biochem.*, *22*, 1167-1169.