



Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
118° (2000), Vol. XXIV, pp. 401-407

F. FORNASIER^{1,3} - P. MARTINIELLO² - C. MONDINI¹ - L. LEITA¹

Studio sui rapporti tra attività enzimatica, carbonio organico e biomassa microbica come strumento per la comprensione della qualità del suolo *

INTRODUZIONE

Il suolo è un sistema fragile, seppur in minor misura di comparti ambientali quali aria ed acqua, per i quali, considerata la minore complessità strutturale, è possibile valutare più agevolmente lo status qualitativo in base all'adozione di standard di qualità ben definiti (Bandick e Dick, 1999).

Il suolo è una matrice complessa, per la cui caratterizzazione è necessario adottare invece una serie di parametri fisici, chimici e biologici.

La biomassa microbica, che rappresenta una frazione molto limitata (1-3%) della sostanza organica, presiede al riciclo dei nutrienti ed è un valido marker dello status biologico del suolo (Brookes, 1995). I parametri più comunemente usati a tale scopo risultano essere: la misura quantitativa della biomassa microbica (C_{mic}), il rapporto C_{mic}/C organico del suolo (C_{mic}/C_{org}) (Anderson e Domsch, 1989; Carter, 1991; Powlson *et al.*, 1987), la respirazione specifica o quoziente metabolico (qCO_2) (Anderson e Domsch, 1990), l'attività enzimatica del suolo (Dick e Tabatabai, 1992). I primi due parametri sono sensibili indicatori del trend (aumento o calo) della sostanza organica del suolo mentre il terzo (qCO_2) stima l'efficienza metabolica dei microrganismi. La quantificazione dell'attività enzimatica del suolo

¹ Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante, S.O.P. di Gorizia. Via Trieste 23, 34170 Gorizia. tel. 0481-522041. fax 0481-520208.

² Istituto Sperimentale per le Colture Foraggere, S.O.P. di Foggia, Via Napoli 52, 71100 Foggia. tel. e fax 0881-741632.

³ Autore per la corrispondenza. e-mail: f.fornasier@isnp.it.

* Relazione presentata al Convegno su "Indicatori per la qualità del suolo: prospettive ed applicabilità", Roma, 29 marzo 2000.

costituisce invece una stima dell'intensità dei processi che avvengono nel suolo (Dick, 1992, 1997). È improbabile che esista una semplice relazione tra un singolo parametro microbiologico e lo status biologico del suolo, a causa delle molte reazioni metaboliche mediate dai microrganismi e delle interazioni fra questi ultimi (Nannipieri *et al.*, 1997). Pertanto l'uso simultaneo di più parametri permetterebbe di non limitarsi solamente ad un elenco di caratteristiche, seppur importanti, ma di approfondire la comprensione delle dinamiche dei cambiamenti in atto nel suolo.

Anche se la determinazione di singole attività enzimatiche nel terreno può fornire elementi validi di valutazione, potrebbe essere tuttavia interessante potersi avvalere di indici che comprendano sia le misure microbiologiche (quantità e qualità del pool microbico) che biochimiche (attività enzimatiche).

L'obiettivo del presente lavoro è quello di valutare se, ed in che misura, la proposizione di alcuni indici basati sul rapporto tra attività enzimatica carbonio organico del suolo e carbonio della biomassa microbica possa rappresentare uno strumento valido per la comprensione delle modificazioni che avvengono nel suolo a livello biologico e biochimico, quando soggetto a differente gestione irrigua e colturale.

MATERIALI E METODI

Suolo e trattamenti agronomici

Presso l'azienda sperimentale "A. Menichella" dell'Istituto Sperimentale per le Colture Foraggere di Foggia è iniziata nel 1986 una prova di rotazione agronomica avente lo scopo di valutare la produttività e l'evoluzione della fertilità del suolo in tre diverse rotazioni colturali in condizioni sia irrigue che non irrigue.

Il clima è tipicamente mediterraneo, con temperature medie massime in agosto di 24,5°C e medie minime di 3,1°C in gennaio; l'evapotraspirazione potenziale media annua (evaporimetro classe A) è pari a 1790 mm e la piovosità media annua è di 515 mm, con massimi in dicembre e in giugno. Il terreno della prova è un Chromoxerert (Soil Survey Staff, 1975), le cui principali caratteristiche fisiche e chimiche sono riportate in tabella 1.

La prova agronomica prevedeva tre rotazioni: monosuccessione di frumento duro (*Triticum durum* Desf.) e due successioni sessennali che prevedevano tre anni di frumento duro seguito da tre anni di coltura prativa: in una di queste è previsto l'impiego di medica (*Medicago sativa* L.), nell'altra l'erbaio di orzo (*Hordeum vulgare* L.) consociato con trifoglio alessandrino (*Trifolium alexandrinum* L.). Lo schema sperimentale era a parcella suddivisa, con il fattore irrigazione in parcella principale e i trattamenti nelle parcelle secondarie. Ogni trattamento era replicato tre volte. Nella parte irrigua della prova l'acqua veniva somministrata al raggiungimento di 50 mm di deficit idrico, previa correzione per le piogge utili. La prova prevede inoltre la rimozione della paglia prodotta dal frumento, per cui gli apporti di materiale organico, in tutte le rotazioni, erano costituiti dalle sole radici e dalle stoppie, la cui altezza si riduce a pochissimi centimetri.

Tabella 1. *Principali caratteristiche chimiche e fisiche del terreno all'inizio della sperimentazione agronomica.*

SCHELETRO	ASSENTE
Sabbia (2-0.02 mm)	21%
Limo (0.02-0.002 mm)	43%
Argilla (<0.002 mm)	36%
pH (acqua)	8.2
Capacità scambio cationico	45.6 cmol kg ⁻¹
Carbonato totale (CaCO ₃)	8.9%
Sostanza organica	2.3%
Azoto totale	1.3‰
Fosforo assimilabile (Olsen)	17 mg kg ⁻¹
Potassio scambiabile	920 mg kg ⁻¹

Campionamento e analisi effettuate

I campioni di suolo per le analisi sono stati prelevati nel Febbraio 1997 a 10 anni dall'inizio della prova (5 subcampioni di suolo per ogni parcella, alla profondità di 0-25 cm) sia nella sezione in irriguo che in quella non irrigata. Nelle due rotazioni sessennali, il campionamento è stato effettuato nelle parcelle di frumento del primo anno e sulla coltura prativa del primo anno di entrambe al fine di valutare anche eventuali effetti della fase della rotazione. In totale sono state quindi campionate 30 parcelle. Il terreno è stato conservato a 4°C sino all'analisi, completata in 40 giorni dal prelievo.

Il carbonio organico (C_{org}) è stato quantificato mediante combustione con analizzatore elementare Carlo Erba NA 1500, previa eliminazione dei carbonati mediante trattamento del terreno con HCl in capsula d'argento.

Le analisi biologiche hanno riguardato la quantificazione della biomassa microbica, della sua respirazione e di quattro attività enzimatiche. Per la loro determinazione, il terreno, conservato in frigorifero, è stato setacciato e portato ad un contenuto di acqua pari al 50% della capacità di campo, preincubato a 21°C per un totale di 12 giorni in contenitore chiuso assieme ad un bicchiere di acqua ed uno di NaOH. Dopo i primi 5 giorni, necessari per la stabilizzazione dell'attività respiratoria conseguente alla manipolazione del terreno, la soda è stata sostituita e il contenitore lasciato per i successivi 7 giorni nelle stesse condizioni; la respira-

zione è stata determinata mediante titolazione potenziometrica della CO_2 catturata dalla soda. Il carbonio contenuto nella biomassa microbica (C_{mic}) è stata determinato con il metodo della fumigazione-estrazione (Vance *et al.*, 1987) e successiva misura dell'azoto reattivo alla ninidrina (Joergensen e Brookes, 1990).

Le attività enzimatiche sono state determinate seguendo metodologie standardizzate. L'idrolisi del diacetato di fluorescina a fluorescina è stata determinata in tampone fosfato secondo il metodo di Schnürer e Rosswall (1982). Tale attività (esterasica) viene considerata essere un indice di "attività" globale della biomassa microbica del suolo, in quanto sono diversi gli enzimi che vi concorrono (Nannipieri *et al.*, 1997). L'attività fosfomonoesterasica neutra (pH 6.5) e alcalina (pH 11) sono state determinate in "tampone universale modificato" misurando l'idrolisi del paranitrofenilfosfato a paranitrofenolo secondo la metodologia riportata da Alef *et al.* (1995). L'attività arilsulfatasica è stata determinata misurando la formazione di paranitrofenolo dal paranitrofenilfosfato in tampone acetato 0.5M a pH 5.8, secondo la metodologia riportata da Alef e Nannipieri (1995).

Analisi statistica

Con i dati ottenuti dalle analisi sopra riportate si sono calcolati i seguenti rapporti: 1) rapporto tra C_{mic} e carbonio organico totale ($C_{\text{mic}}/C_{\text{org}}$); 2) quoziente metabolico ($q\text{CO}_2$), ovvero il rapporto tra la quantità di carbonio respirato dalla biomassa microbica nell'unità di tempo (1 ora) e la quantità di carbonio organico contenuto nella biomassa microbica; 3) rapporto tra attività enzimatica e il carbonio organico totale del suolo; 4) rapporto tra attività enzimatica e C_{mic} .

I dati, separati a seconda del regime irriguo, sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante il test Student-Newman-Keuls (SNK) al fine di evidenziare differenze significative tra le varie rotazioni.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati ottenuti hanno mostrato, in prima istanza, una differente risposta dei parametri biologici nei due regimi idrici (tabella 2). L'elaborazione statistica dei dati ha posto infatti in evidenza come i parametri legati alla quantificazione ed alla attività respiratoria della biomassa microbica rappresentino un approccio valutativo interessante per la caratterizzazione del suolo in esame in condizioni non irrigue. Infatti l'efficienza metabolica, espressa come $q\text{CO}_2$, ha messo in rilievo, significative differenze nello status biologico del suolo in rapporto alla differente gestione colturale. I valori di $q\text{CO}_2$ ottenuti sono paragonabili come valori assoluti a quelli più alti ottenuti da Anderson e Domsch (1990) e tendenzialmente inferiori nella media a quelli ottenuti da Giardini *et al.* (1999) in una prova di rotazione in Italia indicando che, nella sperimentazione condotta, la monosuccessione di frumento ha

Tabella 2. Quoziente metabolico, rapporto C_{mic}/C_{org} e rapporti tra attività enzimatica, C_{org} e C_{mic} nei diversi trattamenti.

TRATTAMENTI	$q_{CO_2}(x10^4)$ ugC-CO ₂ ug ⁻¹ C _{mic} h ⁻¹	C_{mic}/C_{org}	attività enzimatica/ C_{org}				attività enzimatica/ C_{mic}						
			FDAH μM g ⁻¹ C _{org}	neF μM g ⁻¹ C _{org}	alF	ariS	FDAH	neF pM μg ⁻¹ B _c h ⁻¹	alF	ariS			
NON IRRIGUO													
Monosuccessione di frumento	12,03a	2.47ab	20.1a	124a	548a	126a	82a	503a	2228a	515a			
Rotazione A <i>frumento (dopo medica)</i> <i>medica (dopo frumento)</i>	10,2bc 9,6c	2.61a 2.47ab	21.8a 20.1a	120a 109a	562a 551a	127a 119a	84a 82a	460a 444a	2156a 2236a	487a 484a			
Rotazione B <i>frumento (dopo trif.-orzo)</i> <i>trifoglio-orzo (dopo frum.)</i>	11,3ab 11,3ab	2.21b 2.43ab	20.7a 24.4a	101a 124a	496b 557a	105a 126a	93a 100a	457a 507a	2254a 2236a	478a 525a			
IRRIGUO													
Monosuccessione di frumento	11,4a	2.43a	20.5b	137b	510b	104c	84bc	573b	2112a	434b			
Rotazione A <i>frumento (dopo medica)</i> <i>medica (dopo frumento)</i>	11,3a 10,0a	2.47a 2.61a	17.3b 20.1b	180a 172a	590a 560ab	130a 126a	70c 77bc	729a 657ab	2375a 2120a	526a 483ab			
Rotazione B <i>frumento (dopo trif.-orzo)</i> <i>trifoglio-orzo (dopo frum.)</i>	11,2a 11,4a	2.47a 2.47a	23.2ab 28.1a	164a 172a	523b 553ab	116b 116b	94b 115a	664ab 704ab	2125a 2271a	471ab 474ab			

Rotazione A: frumento-medica; Rotazione B: frumento-erbaio di orzo e trifoglio alessandrino.
 FDAH: idrolisi del diacetato di fluorescina; neF: attività fosfomonoesterasica a pH 6.5; alF: attività fosfomonoesterasica a pH 11;
 ariS: attività arilsulfatase.

portato ad una minore efficienza metabolica rispetto alle rotazioni che includono una fase a coltura prativa. Sono state riscontrate minori, seppur significative variazioni del rapporto C_{mic}/C_{org} , mentre i valori dei rapporti tra attività enzimatiche $C_{org}-C_{mic}$ risultavano praticamente costanti tra i diversi trattamenti.

Al contrario, in condizioni irrigue le differenze sono risultate statisticamente significative nella valutazione di rapporti che comprendono le attività enzimatiche. Il sistema irriguo non ha permesso infatti di evidenziare differenze per quanto riguarda la quantità e l'attività respiratoria del pool microbico del suolo soggetto a differente gestione colturale, mentre ha consentito di rilevare una maggior implicazione delle attività enzimatiche nella caratterizzazione delle diverse gestioni colturali.

BIBLIOGRAFIA

- Alef K., Nannipieri P. (1995): "Arylsulphatase activity". In: *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. K. Alef, P. Nannipieri Eds. Academic press, London, UK.
- Alef K., Nannipieri P., Trasar-Cepeda C. (1995): "Phosphatase activity". In: *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. K. Alef, P. Nannipieri Eds. Academic press, London, UK.
- Anderson T.H., Domsch K.H. (1989): "Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils". *Soil Biol. Biochem.*, 21, 471-479.
- Anderson T.H., Domsch K.H. (1990): "Application of ecophysiological quotients (qCO₂ e qD) on microbial biomass from soils of different cropping histories". *Soil Biol. Biochem.*, 22, 251-255.
- Bandick A.K., Dick R.P. (1999): "Field management effects on soil enzyme activities". *Soil Biol. Biochem.*, 31, 1471-1479.
- Brookes P.C. (1995): "The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals". *Biol. Fertil. Soils*, 19, 269-279.
- Carter M.R. (1991): "The influence of tillage on the proportion of organic carbon and nitrogen in the microbial biomass of medium-textured soils in a humid climate". *Biol. Fertil. Soils*, 11, 135-139.
- Dick R.P. (1992): "A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters". *Agric. Ecosys. Environ.*, 40, 25-36.
- Dick R.P. (1997): "Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health". In: Pankhurst C.E., Doube B.M., Gupta V.V.S.R. (coordinatori), *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International, Wallingford, Regno Unito.
- Dick W.A., Tabatabai M.A. (1992): "Potential use of soil enzymes". In: Metting F.B. Jr. (coordinatore), *Soil Microbial Ecology: Applications in agricultural and environmental management*. pp. 95-127. Marcel Dekker, New York.
- Giardini L., Borin M., De Nobili M., Fornasier F. (1999): "Effetti della fertilizzazione organica e dell'avvicendamento delle colture sul contenuto di carbonio organico e sull'attività microbica del terreno". *Rivista di Agronomia*, 33, 141-146.
- Joergensen R.G., Brookes P.C. (1990): "Ninhydrin reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0.5M K₂SO₄ extracts". *Soil Biol. Biochem.*, 22, 1023-1027.
- Nannipieri P., Badalucco L., Landi L., Pietramellara G. (1997): "Measurement in assessing the risk of chemicals to the soil ecosystem". In: J.T. Zelikoff (coordinatore), *Ecotoxicology: responses, biomarkers and risk assessment*, workshop della OECD. SOS Publications, Fair Haven, NJ, Stati Uniti d'America.

- Powlson D., Brookes P.C., Christensen B.T. (1987): "Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation". *Soil Biol. Biochem.*, 19, 154-164.
- Schnürer J., Rosswall T. (1982): "Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter". *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1256-1261.
- Soil Survey Staff (1975): *Soil taxonomy: a basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys*. USDA Handbook No. 436. US Government Printing Office, Washington, DC.
- Vance, Brookes P.C., Jenkinson D.S. (1987): "An extraction method for measuring microbial biomass C.". *Soil Biol. Biochem.*, 19, 703-707.