

Studio sull'ottimizzazione dei metodi di analisi dei fertilizzanti azotati a lento rilascio ed a rilascio controllato - <i>A. Trinchera, A. Benedetti</i>	837
Sanitizzazione di lettiere ovine con attinobatteri - <i>S. Baccella, A.L. Botta, S. Manfroni, C. Fiordigigli, M. Del Gallo, A. Lepidi</i>	851
Valutazione della capacità complessante di idrolizzati proteici ad uso fertilizzante - <i>A. Mori, L. Leita, C. Ciavatta, L. Cavani</i>	853
Effetto dei trattamenti fogliari con idrolizzati proteici di origine animale sull'attività vegetativa di piante di actinidia - <i>M. Quartieri, L. Cavani, B. Marangoni, M. Tagliavini</i>	861
La focalizzazione isoelettrica come strumento per il riconoscimento delle matrici organiche - <i>F. Alianiello, F. Baroccio, A. Benedetti</i>	869
Caratterizzazione spettroscopica (DRIFT, ¹ H-NMR) ed elettroforetica (EF) di torbe, leonarditi e ligniti - <i>O. Francioso, L. Cavani, C. Ciavatta, V. Tugnoli, C. Gessa</i>	881
Utilizzazione agricola di fanghi di depurazione: risultati di sperimentazioni a medio e breve termine - <i>A. Figliolia, G. Rossi, S. Socciarelli, B. Felici</i>	891
Dinamica e stabilità delle frazioni apolari durante il processo di compostaggio - <i>S. Grego, E. Mincione, D. Corradini, M. Mezzetti</i>	903
Relazioni sull'attività svolta nel corso del primo anno dai Gruppi di Lavoro dell'Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti	
Censimento dei concimi organici ed organo-minerali - <i>A. Benedetti, S. de Bertoldi, P. Sequi</i>	913
La distribuzione dei fertilizzanti in Italia - <i>M. Adua</i>	917
Qualità di processi e prodotti - <i>S. Silva</i>	941
Biomasse - <i>F. Tittarelli</i>	945
Sostanze ed elementi indesiderati - <i>C. Nigro</i>	949
Patogeni: posizione del problema - <i>M. de Bertoldi, F. Pinzari</i>	951
Legislazione e Normazione - <i>A. Benedetti</i>	963
Razionalizzazione dell'uso dei fertilizzanti e disciplinari di produzione - <i>F. Intrigliolo</i>	977
Agricoltura biologica: la Circolare del MiPA sui fertilizzanti - <i>S. Canali</i>	981
Pubblicazioni scientifiche - <i>C. Ciavatta, P. Nannipieri</i>	985
Metodi di analisi - <i>F. Alianiello, L. Leita</i>	989
Collegamento con altre Società Internazionali - <i>P. Sequi</i>	991
<hr/>	
Indice Generale Volume 49 (2000)	I
Indice degli Autori	VI

Delia Tura



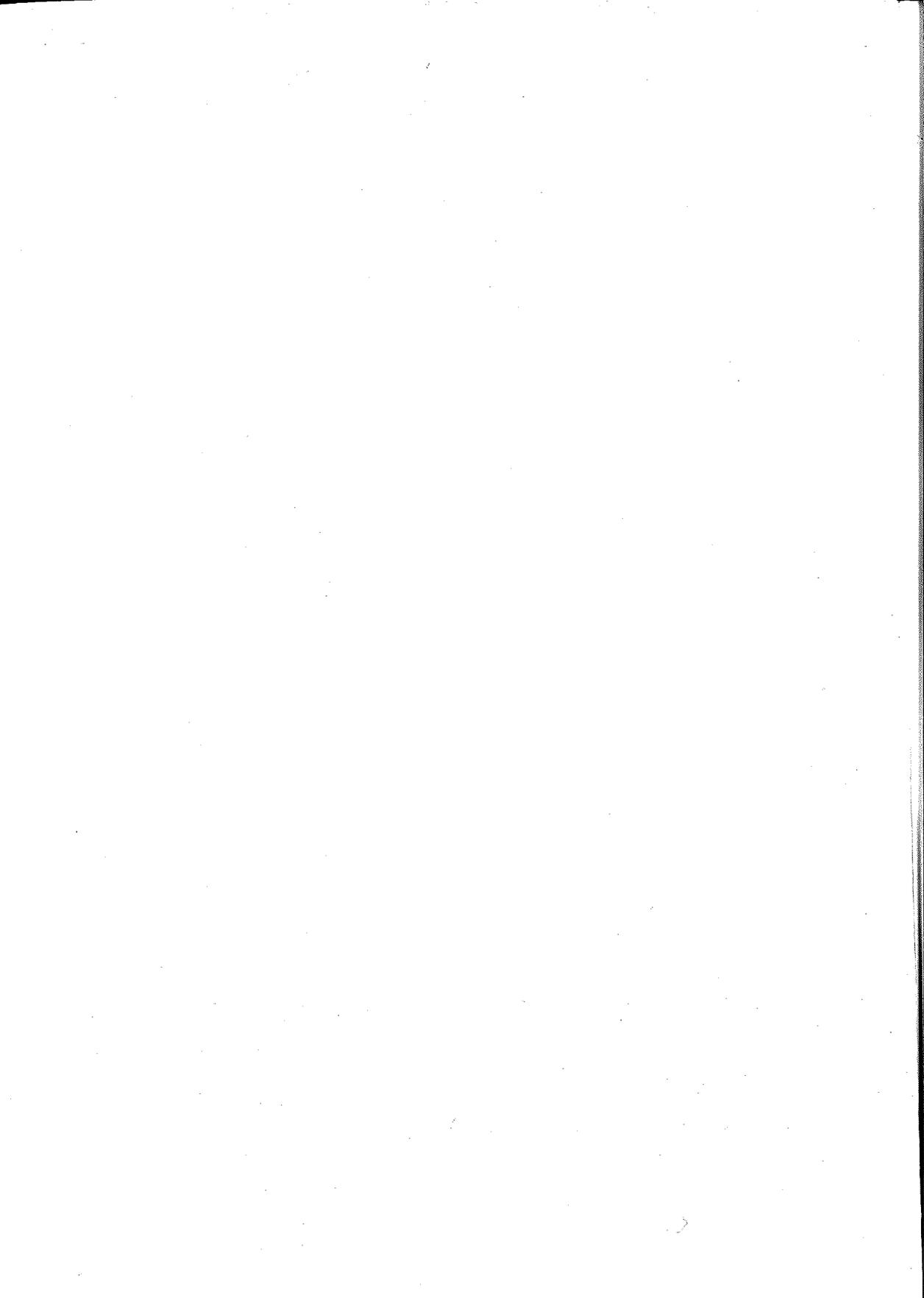
Bollettino

della Società Italiana

della Scienza del Suolo

Volume 49

No. 4 2000





**Società Italiana della Scienza
del Suolo**



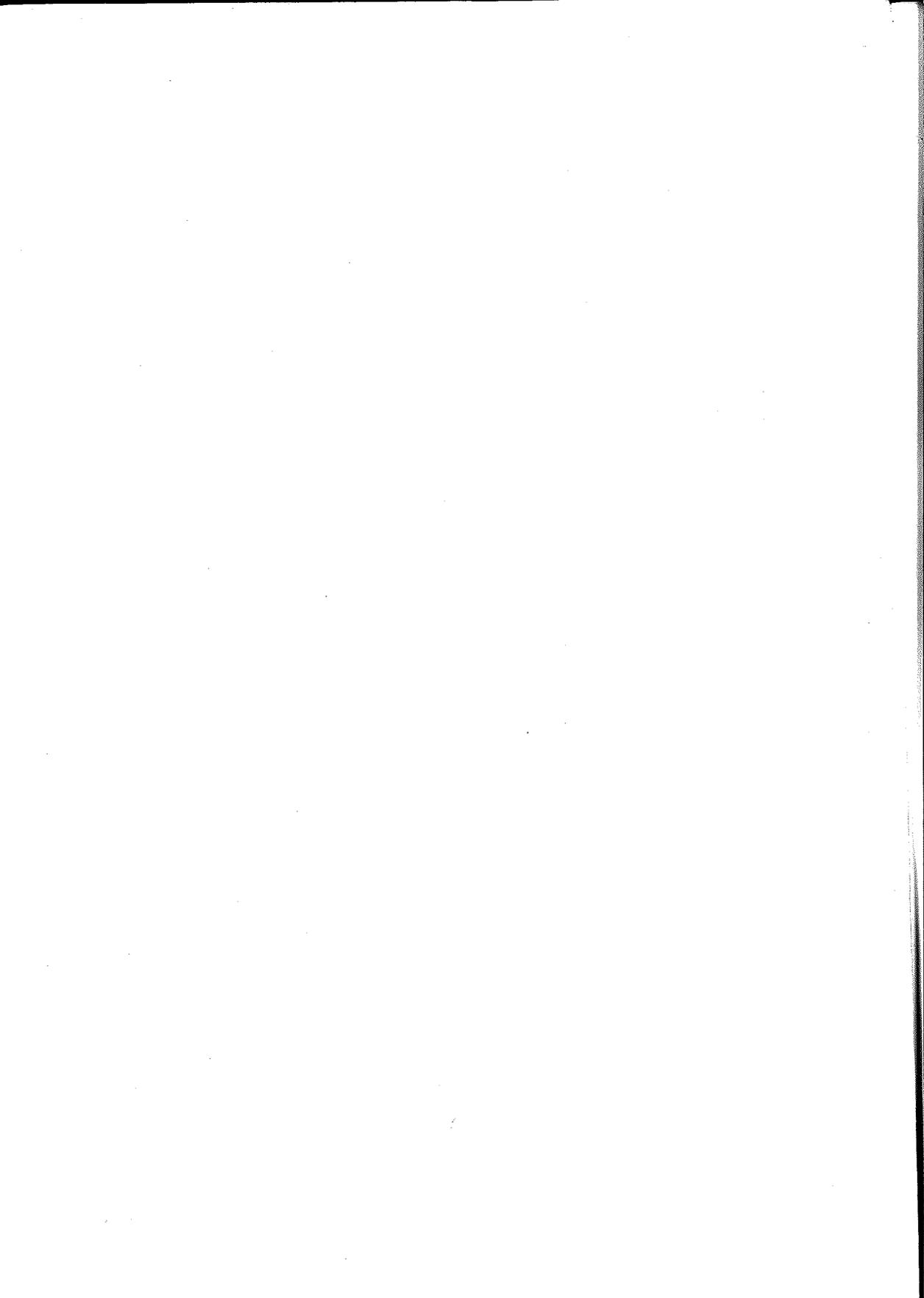
**European Cooperation in the field
of Scientific and Technical
Research**

I Giornata Nazionale

**COST Action 831:
*Biotechnologie del suolo: monitoraggio,
conservazione e ripristino della fertilità
biologica***

*Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
in collaborazione con SISS: Commissione IV*

**Via della Navicella, 2/4
Roma, 14 Dicembre 1999**



LE BIOTECNOLOGIE DEL SUOLO PER IL MONITORAGGIO, RIPRISTINO E CONSERVAZIONE DELLA FERTILITÀ BIOLOGICA

Anna Benedetti

Presidente Azione COST 831 "Biotechnology of soil: monitoring conservation and remediation"

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

L'Azione COST 831 sulle biotecnologie del suolo per il monitoraggio, la conservazione ed il ripristino della fertilità biologica è al compimento del suo secondo anno di attività.

Il progetto fu scritto, per mano mia, di Paolo Nannipieri, Fabio Tittarelli, Nerino Miclaus e Stefano Grego nel 1995 e, dopo un lungo iter burocratico, approvato dalla DG XII *General Directorate Science Research and Development* nel 1997. La prima riunione del Comitato di gestione del progetto, e quindi l'inizio ufficiale delle attività, risale ad ottobre del 1997. Attualmente hanno firmato il protocollo d'intesa sedici Paesi su i venticinque che aderiscono al COST e precisamente: Austria, Belgio, Svizzera, Francia, Gran Bretagna, Grecia, Ungheria, Italia, Olanda, Norvegia, Svezia, Slovenia e l'Università di Gerusalemme.

Gli obiettivi dell'Azione COST sono:

- ◆ Migliorare l'efficacia dei metodi di microbiologia e biologia molecolare attualmente disponibili per il monitoraggio, la conservazione ed il recupero del suolo;
- ◆ Individuare nuovi parametri microbiologici e biochimici quali indicatori di impatto ambientale;
- ◆ Identificare il declino degli ecosistemi naturali con la messa a punto di metodi di diagnosi dell'inquinamento del suolo rapidi ed efficienti.

Benefici dell'Azione COST:

- Elaborare test routinari per il monitoraggio, conservazione e recupero del suolo.
- Disporre di metodi atti alla rapida diagnosi dell'inquinamento del suolo e della perdita di fertilità.

Programma di ricerca:

- Standardizzare metodi analitici.
- Stabilire collaborazioni scientifiche fra i laboratori europei.
- Produrre un manuale di metodi microbiologici e biochimici di uso comune nei laboratori europei.

Durante la prima riunione del Comitato di Gestione è stato discusso il *Memorandum of Understanding*. In particolare sono stati individuati 4 gruppi di lavoro ed i loro rispettivi coordinatori:

Gruppo di lavoro 1: Interazione Suolo-Radice-Microrganismo - J. Lynch (U.K.), S. Grego (I).

Gruppo di lavoro 2: Gestione delle risorse microbiche per sostenere e migliorare le funzioni del suolo - F. Megusar (SI), F. C. Munch (DE).

Gruppo di lavoro 3: Biologia Molecolare applicata alle comunità microbiche del suolo - J.D. Van Elsas (NL) E. Top (BE).

Gruppo di lavoro 4: Metodi Biochimici e Microbiologici per valutare l'impatto ambientale - J. Bloem (NL), T.S. Kovacs (HU), S. Soresen (DK).

Per ciascun gruppo a livello nazionale sono stati incaricati dei referenti che seguiranno l'attività nel corso dell'intera durata del progetto, rendendosi portavoce dell'esperienza nazionale nel contesto europeo e viceversa.

- GdL 1 Luca Falchini, Stefano Grego
- GdL 2 Fabio Tittarelli, Luisa Tomasselli
- GdL 3 Nerino Miclaus, Enzo Gallori
- GdL 4 Luigi Badalucco, Antonio Gelsomino

Riunioni del Comitato di Gestione (MC)

- 6 ottobre 1997, Bruxelles
- 15 gennaio 1998 Small Meeting delle Azioni COST 821, 822, 830, 831, Bruxelles
- 24-25 maggio 1998, Bruxelles
- 12 dicembre 1998, Roma
- 17-18 luglio 1999, Granada

Riunioni dei gruppi di lavoro

- WG1: 23-24 maggio 1998 Bruxelles
- 10-11 dicembre 1998 Roma
- 10 dicembre 1999 Bruxelles

WG2:	19 marzo 1998	Bruxelles
	10-11 dicembre 1998	Roma
	6-7 maggio 1999	Monaco
WG3:	23-24 maggio 1998	Bruxelles
	10-11 dicembre 1998	Roma
	20-22 giugno 1999	Firenze
WG4:	23-24 maggio 1998	Bruxelles
	10-11 dicembre 1998	Roma
	15-16 luglio 1999	Granada

Convegni

18-19-20 settembre 1998, Edimburgo Inter-COST Meeting COST Actions 8.21, 8.22, 8.30 and 8.31: The establishment of the beneficial rhizosphere.

10-11 dicembre 1998 Roma, Joint Working Groups COST – Action 831 Meeting and Round Table “Defining Soil Quality”.

6-7 maggio 1999 Monaco, Microbial Functions and Soil Quality.

20-22 giugno 1999 Firenze, 6th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology (Bagecco).

12-15 luglio 1999 Granada, Enzymes in the Environment, Activity, Ecology and Applications.

Prossimi appuntamenti Kiel

Kiel (DE), 18 - 20 Maggio 2000 – Schleswing Holstein Saal at the house of Parliament in Kiel

Joint Working Groups Meeting of COST Action 831 “Biotechnology of Soil Monitoring, Conservation and Remediation”: Evaluating Soil Quality

Presidente del Comitato di Gestione dell’Azione COST 831

Anna BENEDETTI (I)
Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
(Direttore della Sezione di Nutrizione Azotata e Microbiologia del Terreno)
Via della Navicella 2-4
I-00184 ROMA
Tel.: +39 6 700 87 21
Fax: +39 6 700 57 11
e-mail: nutrazotata@isnp.it

Vice Presidente

Oliver DILLY (DE)
Ökologie-Zentrum Universität Kiel
Schauenburgerstrasse 112
D-24118 Kiel
Tel.: +49 431 880 4085
Fax: +49 431 880 4083
e-mail: oliver@pz-oekosys.uni-kiel.de
home page:
www.pz-oekosys.uni-kiel.de/~oliver

Segretario Scientifico

Joachim BOLLMAN (DE)
 CEC, DGXII-AP2
 200, rue de la Loi
 B-1049 BRUSSELS
 Tel.: +32 2 299 50 73
 Fax: +32 2 296 42 89
 e-mail: joachim.bollmann@cec.eu.int

Delegato nel Comitato di Gestione (sostituto)

Fabio TITTARELLI
 Istituto Sperimentale per la Nutrizione
 delle Piante
 Via della Navicella 2-4
 I-00184 ROMA
 Tel.: +39 6 700 87 21
 Fax: +39 6 700 57 11
 e-mail: nutrazotata@isnp.it

Delegati nazionali TC (Comitato Tecnico)

Paolo SEQUI
 Direttore
 Istituto Sperimentale per la Nutrizione
 delle Piante
 Via della Navicella 2-4
 I-00184 ROMA
 Tel.: +39 6 700 87 21
 Fax: +39 6 700 57 11
 e-mail: psequi@isnp.it

Carmine DAMIANO
 Istituto Sperimentale per la Frutticoltura
 Ciampino Aeroporto
 I - 00040 Roma
 Tel.: +39(0)6.793 48 104
 Fax: +39.(0)6.793 401 58
 e-mail: c.damiano@agora.stm.it
 isf.propag@mclink.it

Delegato italiano nel Comitato di Gestione

Paolo NANNIPIERI
 Dip. di Scienza del Suolo e Nutrizione
 della Pianta
 Università degli Studi di Firenze
 Piazzale delle Cascine
 I-500144 FIRENZE
 Tel: +39 55 328.83.82
 Fax: +39-55-333 273
 e-mail: nannip@iges.fi.cnr.it

Coordinatore delle Missioni Scientifiche a breve termine

Stefano GREGO (I)
 Dipartimento di Agrobiologia e
 Agrochimica
 Via S. Camillo de Lellis
 01100 Viterbo
 Tel.: +39 761 35 72 46 - Fax: +39 761 35
 72 46
 e-mail: grego@unitus.it

Rappresentanti italiani CSO (Consiglio Scientifico e Tecnico)

Gioacchino FONTI
 Ministero dell'Università e della Ricerca
 Scientifica e Tecnologica
 (MURST)
 Dipartimento Ricerca
 Piazza J.F.Kennedy 20
 Fax: +39-6-5991 2368
 telex: 614079 MUR I

Riferimento presso il MURST

Pierluigi CASCIOLI
 MURST
 Dipartimento Ricerca - Ufficio VI
 Piazza Kennedy, 20
 00144 Roma
 e-mail: pirluigi.cascioli@murst.it
 tel.: +39(0)6 59912030
 fax: +39(0)6 59912362

Rappresentanza italiana permanente

Luigi GUIDABONO CAVALCHINI

Cos'è il COST

COST = Cooperazione Tecnica e Scientifica

Il COST costituisce una rete di contatti tra istituzioni tecniche e scientifiche con il coordinamento delle attività di ricerca su scala nazionale verso un livello europeo.

Le Azioni COST costituiscono la base per cooperazioni su progetti di ricerca di tipo precompetitivo e di pubblica utilità.

La Cooperazione COST è stata fondata nel 1971 dai Ministri della Scienza e della Tecnica di 19 Paesi. Attualmente aderiscono al COST 25 Paesi, 15 dei quali sono Stati Membri dell'Unione Europea più Islanda, Norvegia, Svizzera, Repubblica Ceca, Slovacchia, Ungheria, Polonia, Turchia, Slovenia e Croazia ai quali si aggiunge la Commissione Europea.

Le Azioni COST si articolano su 17 diversi temi e precisamente:

- informatica, trasporti, materiali, meteorologia, tecnologia alimentare, medicina, chimica dinamica dei fluidi, archeologia, telecomunicazioni oceanografia, ambiente, agricoltura e biotecnologia, scienze sociali, ingegneria civile, foreste e produzione forestale, fisica.

Come funziona il COST

Tutti i Paesi aderenti al COST compresa la Commissione Europea possono proporre Azioni.

La partecipazione alle diverse Azioni è volontaria ed aggrega solo i Paesi interessati a sviluppare la tematica proposta.

Le ricerche sono coordinate e finanziate a livello nazionale. Il coordinamento e lo scambio scientifico tra Paesi viene finanziato sia dal Paese partecipante che dalla Commissione Europea.

L'obiettivo fondamentale delle Azioni COST è quello di coordinare la ricerca a livello nazionale con la ricerca a livello europeo. Amministrativamente l'Azione dipende da un Comitato di gestione (MC).

Compiti del Comitato di Gestione

Il Comitato di gestione è un organismo che pianifica nel dettaglio il lavoro da svolgere e ne controlla la buona esecuzione nelle diverse fasi. Inoltre assicura il coordinamento delle attività di ricerca tra i diversi Paesi. Esso è composto da esperti scientifici "delegati nazionali" designati ufficialmente da ciascun paese che ha firmato il protocollo d'intesa dell'Azione. Nel

maggio del 1999 si avevano 133 Azioni COST con altrettanti comitati di gestione. Attualmente non ne conosco il numero esatto, ma sono certamente aumentati.

Il COST finanzia unicamente spese di coordinamento (riunioni del MC e segreteria scientifica presso l'UE) workshops, conferenze, pubblicazioni e brevi missioni di studio (corrispondenti a borse di studio per giovani).

Ciascun delegato nazionale svolge un ruolo di coordinamento a livello nazionale della propria azione ed in particolare è responsabile della diffusione delle informazioni nel proprio Paese.

Si è pensato di organizzare una Giornata COST Italia per l'Azione COST 831 proprio per divulgare quanto stiamo portando avanti a livello europeo circa l'individuazione ed il possibile utilizzo routinario di metodologie microbiologiche, biochimiche e di biologia molecolare per il monitoraggio, la conservazione ed il ripristino della fertilità del suolo. Già con il Convegno tenutosi a Roma nel dicembre 1998 (al quale hanno partecipato più di 150 studiosi di cui circa la metà da tutta Europa) di cui a breve saranno pubblicati i proceedings si erano presentati alla collettività scientifica nazionale i contenuti dell'Azione, ma con la Giornata "COST Italia" si è voluto dare voce ai giovani ricercatori che con finanziamento COST hanno frequentato nel corso del 1998-1999 laboratori stranieri per sviluppare ricerche di collaborazione.

SE APPARTIENI AD UNO DEI PAESI ADERENTI ALL'AZIONE
COST 831 E VUOI ANCHE TU PARTECIPARE



CONTATTA IL TUO DELEGATO NAZIONALE



IL TUO DELEGATO NAZIONALE CONTATTERÀ I COORDINATORI
DEL WG A CUI VUOI ADERIRE



I COORDINATORI DEL WG INFORMERANNO IL COMITATO DI
GESTIONE

SE NON APPARTIENI AD UNO DEI PAESI ADERENTI ALL'AZIONE
COST 831 E VUOI ANCHE TU PARTECIPARE



CONTATTA IL PRESIDENTE
ED IL SEGRETARIO SCIENTIFICO

ATTIVITÀ DEL WORKING GROUP 1 (WG1) AZIONE COST 831 - "SOIL-ROOT-MICROBES INTERACTIONS"

Stefano Grego

Dipartimento di Agrobiologia ed Agrochimica, Università della Tuscia
Via S. Camillo de Lellis - 01100 Viterbo

Il WG1 del Cost 831 è coordinato dal Prof. Stefano Grego, dell'Università della Tuscia in Viterbo, e dal Prof. James M. Lynch, School of Biological Sciences, University of Surrey, Guilford, UK.

La base scientifica si basa sugli studi dell'interfaccia suolo-radice dove i microrganismi, le radici delle piante e i costituenti del suolo interagiscono fortemente. La colonizzazione microbica della superficie e/o dei tessuti più interni della radice, e il volume di suolo influenzato dalla presenza della radice hanno una influenza sostanziale sulla crescita delle piante e sulla qualità del suolo. Inoltre, la crescita dei microrganismi nella rizosfera è determinata soprattutto dalla disponibilità delle rizodeposizioni prodotte dalle piante.

Il WG1 ha essenzialmente lo scopo di rivedere le metodologie utilizzate dai diversi ricercatori in Europa per studiare l'interazione pianta-suolo-microrganismi. Durante lo sviluppo dell'azione concertata saranno valutati i diversi microcosmi che oggi sono impiegati nelle ricerche al fine di standardizzare l'approccio metodologico, se possibile. Inoltre si valuterà la possibilità di standardizzazione dei metodi per lo studio delle popolazioni microbiche presenti vicino e sulla radice utilizzando la combinazione di diverse metodiche. I gruppi scientifici che sono interessati all'attività del WG1 studiano la biomassa microbica presente nella rizosfera misurando la produzione di CO₂, sia come produzione basale che indotta da substrati, il contenuto di ATP, la produzione di enzimi, valutandone le caratteristiche fisiologiche e l'adattamento al cambiare delle condizioni trofiche od ambientali. Aspetti di biologia molecolare sono normalmente in uso per lo studio della biodiversità presente sulla rizosfera e di come le rizodeposizioni inducono cambiamenti nella composizione della microflora rizosferica. Nel gruppo di lavoro sono presenti anche aspetti di protezione delle piante da parte di rizobatteri che inibiscono patogeni delle piante influenzando direttamente sui patogeni o indirettamente producendo siderofori.

Dal momento dell'inizio dell'attività del COST 831, il WG1 si è riunito tre volte. La prima a Bruxelles 25-26 maggio 1998 dove otto esperti di sei paesi europei hanno presentato la loro attività e i loro programmi di ricerca. La seconda occasione è stata il Convegno dei quattro WGs a Roma 10-11 dicembre 1998. Al Convegno sono stati presentati 13 abstracts; da questi sono state scelte quattro presentazioni orali. Tutti gli abstracts sono stati comunque presentati e discussi nella sessione poster del WG1. In gruppo ha inoltre attivamente partecipato alla tavola rotonda "*Defining soil quality*" che si è tenuta in coda all'ultimo giorno di lavoro. Il terzo Meeting si è tenuto a Bruxelles il 10 dicembre 1999 che ha visto la partecipazione di 11 ricercatori di nove paesi. L'agenda della riunione è stata quella di verificare l'interesse alla partecipazione ad un progetto EU nell'ambito del 5FW. La discussione ha portato alla definizione di un possibile progetto da presentare ad ottobre 2000 nel quale saranno tutti coinvolti e riguarderà la biodiversità nella rizosfera. Il progetto è praticamente già ampiamente scritto e i prossimi mesi saranno utilizzati per meglio mettere a fuoco le finalità e gli aspetti più significativi. Il coordinatore sarà il Prof. Stefano Grego.

*ATTIVITÀ DEL WORKING GROUP 2 (WG2)
 AZIONE COST 831 - "MANAGEMENT OF
 MICROBIAL RESOURCES TO SUSTAIN AND IMPROVE
 SOIL FUNCTIONS"*

Fabio Tittarelli

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
 Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

Il Working Group 2 "Management of microbial resources to sustain and improve soil functions", coordinato dal Prof. C. Munch (D) e dal Prof. F. Megušar, si è riunito, nel corso degli anni di vita dell'Azione COST 831, nelle seguenti date:

- 19 Marzo 1998 - Square de Meeus 8, B-1049 Bruxelles, Belgio
- 10-11 Dicembre 1998: Joint Working Groups Meeting - COST Action 831 - Museo Civico di Zoologia, via Aldrovandi 18, Roma, Italia
- 6-7 Maggio 1999: Workshop "Microbial Functions and Soil Quality" GSF-Research Center for Environment and Health, Institute of Soil Ecology, Building 35, "Biologikum", Room 1050 - Neuherberg/Munich, Germania

Durante il primo incontro, a cui hanno partecipato ricercatori in rappresentanza di 9 Paesi COST, si sono definite le principali linee guida di ricerca. Nonostante, sia risultata evidente una notevole diversità fra i principali temi di interesse dei ricercatori coinvolti, sono state comunque individuate tre principali aree comuni:

- **microbial transformation of organic matter and soil properties;**
- **impact of management practices on processes of elemental cycling;**
- **plant-soil-microbe interactions from symbiosis to suppressiveness**

Durante il Joint Working Groups Meeting che si è tenuto a Roma nel dicembre 1998, non è stato possibile, per mancanza di tempo, dare spazio a tutti i contributi proposti dai ricercatori WG2. I coordinatori hanno pertanto individuato i lavori che, per l'argomento trattato, sono state considerate più rappresentative dei filoni di ricerca del Gruppo di Lavoro "Management of microbial resources to sustain and improve soil functions". Di seguito sono riportati gli autori ed i titoli dei lavori scelti per la presentazione orale:

- Mahne I, Princic A., Cadez P. e Megušar F. "Management of soil microbial biomass nitrogen"
- van Veen J.A. e de Boer W. "Soil-borne pathogens and their antagonists"
- De Leij F.A., Hart T. e Lynch J.M. "Compost as a means to enhance soil quality"
- Trinchera A., Pinzari F. e Benedetti A. "Assessment of soil quality in a restored Mediterranean soil".

In data 6-7 maggio 1999, presso il GSF-Research Center for Environment and Health – Institute of Soil Ecology di Neuherberg, Monaco (Germania) si è tenuto un workshop "Microbial functions and Soil Quality" a cui hanno partecipato unicamente i ricercatori del WG2.

La principale finalità del workshop è stata quella di conoscere in maniera più approfondita l'attività dei partecipanti e di correggere se necessario le linee guida del gruppo di lavoro dopo un'anno di attività ed in conseguenza del raddoppio del numero complessivo di paesi partecipanti all'Azione COST 831.

La relazione ad invito dal titolo "Contribution of mycorrhizal fungi to soil quality" è stata tenuta dal Prof. Silvio Gianinazzi che ha colto l'occasione per presentare l'attività dell'azione COST 838 da lui presieduta anche nell'intento di individuare sinergie tra le due azioni COST. Le sessioni che si sono succedute nel corso dei due giorni di lavoro del Workshop hanno rispettato l'articolazione delle linee guida del WG 2 definite precedentemente. Nell'ambito della Sessione "Impact of management practices on processes of elemental cycling" sono stati presentati i lavori dei ricercatori italiani che hanno partecipato al Workshop. Gli autori ed i titoli delle loro presentazioni sono i seguenti:

- Benedetti A., Tittarelli F., M.T. Dell'Abate "Nitrogen mineralisation of different organic fertilisers and amendments in soil";
- Quattrini P, Coletta D., Di Mattia E., Cacciari I. "Influence of tillage systems on nodulation and nitrogen fixation by soybean;
- Tomaselli L. Margheri M.C., Sparvoli E. "Influence of cyanobacterial inoculation on soil quality".

Alla fine dei lavori un comitato ristretto, costituito dal Prof. Megušar, dal Prof. Munch, dal Prof. Granhall, dal dr. Hartmann e dal dr. Tittarelli, si è riunito ed ha preparato un documento dove sono stati riassunti i punti essenziali della discussione che si è svolta alla fine della presenta-

zione dei lavori. Di seguito sono riportati gli aspetti di maggiore interesse che sono stati evidenziati:

- necessità di ulteriori approfondimenti per la standardizzazione dei metodi per determinare la struttura e le attività della microflora nel suolo;
- importanza dell'individuazione di tecniche molecolari avanzate per la determinazione di specifiche popolazioni microbiche e delle loro funzioni da utilizzare in aggiunta alle misure di biomassa microbica e della sua attività metabolica;
- necessità di stimolare delle collaborazioni fra laboratori di diversi paesi, in special modo attraverso selezionati "case studies" sulle pratiche di gestione del suolo, allo scopo di favorire un approccio multidisciplinare alle ricerche dei singoli laboratori.



*ATTIVITÀ DEL WORKING GROUP 3 (WG3)
AZIONE COST 831 - "MOLECULAR BIOLOGY
APPLIED TO SOIL MICROBIAL COMMUNITIES"*

Nerino Miclaus

Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo
Piazza D'Azeglio, 30 - 50121 Firenze

Il WG3 del COST 831 è coordinato da J.D. van Elsas (NL) ed E. Top (B). Il WG3 ha lo scopo di determinare il comportamento, in condizioni naturali, di particolari microrganismi o di geni specifici, di monitorare il trasferimento genico tra batteri e di standardizzare i metodi analitici per l'isolamento, purificazione e caratterizzazione degli acidi nucleici delle comunità batteriche telluriche.

L'estrazione degli acidi nucleici dal suolo svolta con varie metodiche e la loro successiva analisi fornisce delle informazioni di varia natura sulle comunità microbiche del suolo che possiedono intrinseche limitazioni; è quindi di cruciale importanza superare tali limitazioni metodologiche ed acquisire accurati metodi d'analisi per fornire risposte a determinate domande di ecologia microbica del suolo. Infatti, la mancata lisi di determinati tipi cellulari, ubicati in microhabitat protetti, può determinare una descrizione incompleta della comunità tellurica sia dal punto di vista della ricchezza come della frequenza delle singole specie presenti.

Per un'analisi quantitativa delle comunità microbiche del suolo, il DNA estratto deve essere quantificato e la metodica deve consentirne la determinazione del contenuto totale estraibile. Pertanto, lo sviluppo di un metodo che sia accettato dalla comunità scientifica (lisi cellulare e purificazione degli ac. nucleici estratti) è di sostanziale importanza per una applicazione a livello complessivo dei dati raccolti sia per quanto riguarda la comparazione degli ecosistemi che per le inferenze di carattere previsionale utili per una migliore utilizzazione delle risorse.

Le tecniche di ricerca utilizzate, a partire dalla cinetica della riassociazione DNA/DNA per determinare la diversità dei batteri del suolo fino ad arrivare alla tecnica dei DNA microarrays, hanno consentito notevoli avanzamenti nella conoscenza della composizione delle comunità batteriche e rappresentano un potente approccio all'identificazione dei gruppi batterici all'interno delle comunità. Inoltre, le tecniche in situ accanto allo studio fo-

calizzato sul mRNA promettono sviluppi interessanti per la definizione della funzionalità delle comunità batteriche dei diversi ecosistemi. Tuttavia esistono delle considerevoli limitazioni, che per la massima parte risiedono nella mancanza di standardizzazione di ciascuna tecnica, nella scarsa analisi statistica dei dati raccolti e nell'ancora oggettivamente modesta dimensione dei database delle sequenze appartenenti ai geni funzionali.

A questo proposito, il WG3 attraverso una serie di riunioni ha messo a fuoco le potenzialità, i limiti e i possibili sviluppi delle metodiche molecolari al fine di fornire utili contributi a specifiche problematiche di ecologia del suolo.

In particolare il WG3 si è riunito in tre occasioni:

1) La prima riunione ha avuto luogo a Bruxelles il 25 e 26 Maggio 1998; vi hanno partecipato 15 delegati di 9 paesi europei che attraverso singole comunicazioni e una discussione finale hanno affrontato le problematiche connesse

1.1 - con la definizione della frequenza relativa delle singole specie o gruppi batterici (evenness) attraverso lo studio di un pool genico,

1.2 - con la determinazione dell'attività delle popolazioni microbiche mediante tecniche "in situ" rivolte allo studio del mRNA,

1-3 - con la valutazione delle possibilità e dei limiti intrinseci delle tecniche di studio delle comunità microbiche attraverso profili elettroforetici (PCR-DGGE, T-RFLP, SSCP, ARDRA).

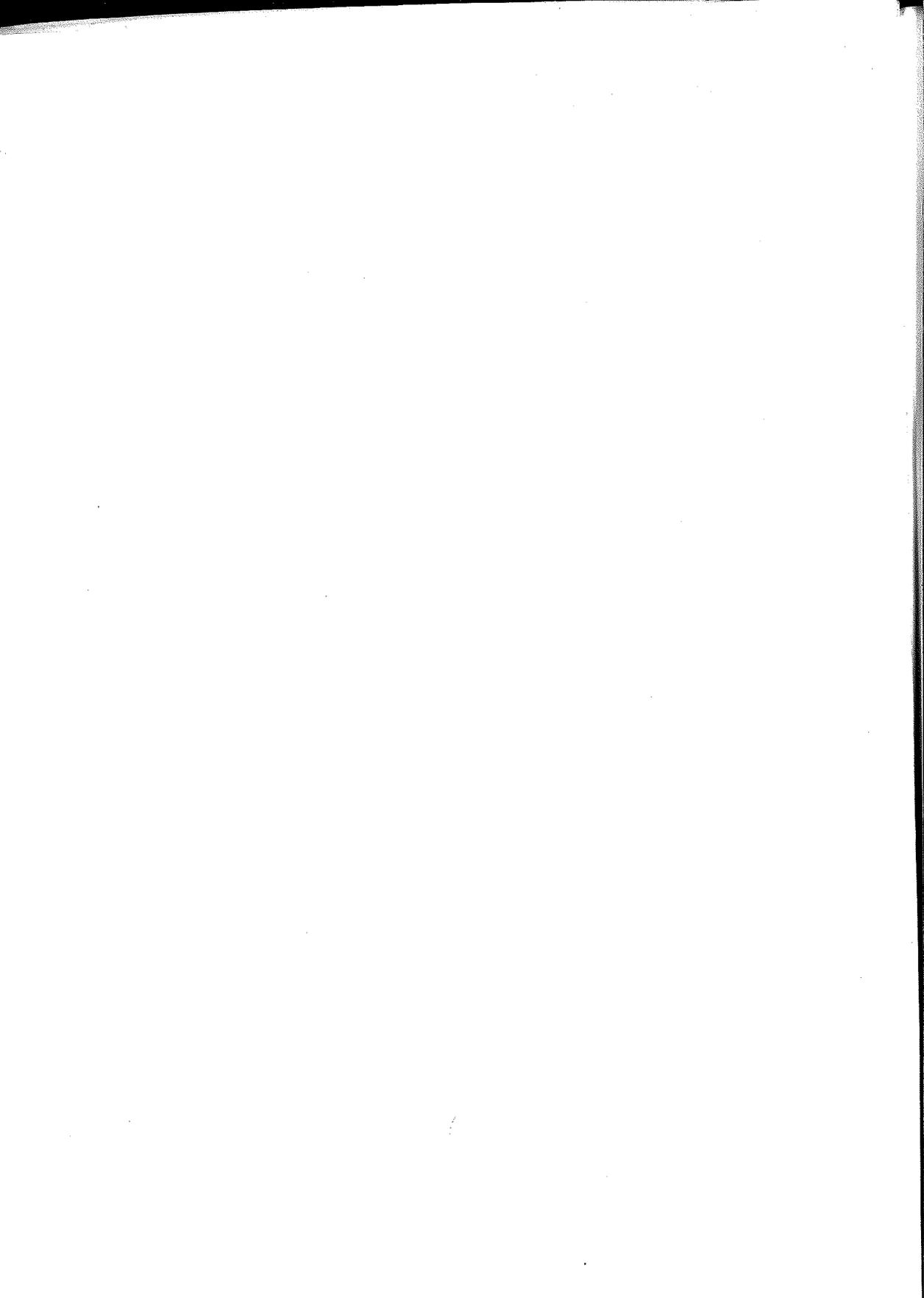
Le conclusioni finali raccomandavano un approccio polifasico allo studio delle comunità microbiche del suolo per evitare di fornire una descrizione distorta o parziale dell'ecosistema oggetto di studio.

2) Nella seconda riunione tenutasi a Roma nei giorni 10 e 11 dicembre 1998 le singole comunicazioni e la discussione finale hanno messo a fuoco le grandi potenzialità di tecniche di indagine quali l'analisi DGGE, indicando al tempo stesso la necessità di andare oltre una semplice descrizione della struttura delle comunità microbiche per indagarne anche la funzionalità. Inoltre, è stato introdotto il problema relativo alla corretta valutazione della struttura delle comunità microbiche derivante dall'interpretazione dei pattern elettroforetici dell'analisi DGGE e della scelta conseguente di operare attraverso diverse metodiche di campionamento. Infine, è stata sottolineata la mancanza di studi molecolari sulla popolazione fungina dei suoli.

3) Nel terzo incontro, svoltosi a Firenze il 22 e 23 giugno 1999, è stata ribadita l'importanza delle tecniche molecolari, soprattutto per la ca-

pacità di fornire nuove informazioni sulla composizione delle specie batteriche dei diversi ecosistemi, superando le limitazioni delle tecniche colturali, anche se permangono delle limitazioni alla capacità di elaborare nozioni biologiche di rilevante importanza a partire dai dati molecolari raccolti. E' stata inoltre affermata la necessità di analisi statistiche dei dati raccolti, per ovviare alla loro differente origine metodologica (set di primers etc.). Infine è stato sottolineato il notevole contributo che può essere fornito dall'applicazione dello studio delle funzionalità microbiche attraverso l'mRNA.

IL 14 dicembre 1999 a Roma, presso l'ISNP, si è tenuta la prima giornata nazionale dell'azione COST 831 con il tema: " Biotecnologie del suolo: monitoraggio, conservazione e ripristino della fertilità biologica". Per il WG3 il Dott. Maurizio Castaldini ha focalizzato la necessità di uno studio molecolare integrato per una più completa descrizione della comunità eubatterica del suolo.



*ATTIVITÀ DEL WORKING GROUP 4 (WG4)
AZIONE COST 831 - "MICROBIOLOGICAL AND
BIOCHEMICAL METHODS TO DETERMINE
ENVIRONMENTAL IMPACT"*

Luigi Badalucco

DITAF - Università di Palermo - Viale delle Scienze, 13 - 90128 Palermo

Il WG4 dell'Azione COST 831 è coordinato da J. Bloem, S. Kovacs e S. Sorensen. I rappresentanti italiani sono L. Badalucco (Università di Palermo) e A. Gelsomino (Università di Reggio Calabria).

Gli obiettivi del Gruppo di lavoro mirano allo sviluppo, al miglioramento ed alla valutazione di metodi microbiologici e biochimici per il monitoraggio della qualità e della salute del suolo, in vista anche dello studio degli effetti indotti da procedure e pratiche di conservazione e di bioremediation.

Il primo incontro, al quale hanno partecipato 12 ricercatori provenienti da Paesi Bassi, Italia, Spagna e Germania, si è tenuto a Bruxelles il 25 e 26 maggio 1998.

I partecipanti hanno convenuto che per stimare la biomassa, l'attività e la diversità dei microorganismi del suolo vengono utilizzati numerosi metodi diversi tra loro. I metodi più ampiamente usati nei diversi Paesi europei sono di seguito descritti:

1) Biomassa microbica

Il metodo della Fumigazione con cloroformio con successiva Estrazione con K_2SO_4 (CFEM) fornisce una stima sia del C che dell'N contenuti nella biomassa microbica ed è ampiamente usato in molti Paesi. Al contrario, il metodo della fumigazione con cloroformio con successiva incubazione (CFIM) tende ad essere usato sempre meno perchè presenta molte più limitazioni rispetto al metodo CFEM.

Il metodo fisiologico basato sulla respirazione indotta da substrato (glucosio, SIR) sembra avere una buona corrispondenza col CFEM, anche se non bisogna dimenticare che è soltanto la biomassa metabolicamente attiva che risponde immediatamente all'aggiunta di glucosio. Tale metodo tradizionalmente è seguito soprattutto in Germania.

In Olanda si sta assistendo ad un ritorno delle conte microbiche

per microscopia diretta, effettuate sia visivamente che per analisi automatica dell'immagine. Consente di stimare il numero totale ed il biovolume di batteri e funghi.

In Ungheria è ancora ben consolidata la conta delle unità microbiche in grado di formare colonie (CFU) su piastre di agar. Può essere usata per stimare gruppi specifici di microorganismi coltivabili (ammontano a non più del 10% dei microorganismi totali del suolo)

2) Attività microbica

Sostanzialmente si è convenuto che l'indicatore più ampiamente adottato è la misura della respirazione del suolo (sviluppo di CO_2 oppure consumo di O_2). Ciò non toglie tuttavia che tale misura sia piuttosto aspecifica e quindi da sola può risultare del tutto fuorviante.

La mineralizzazione dell'N, proveniente sia dalla sostanza organica nativa del suolo che da quella aggiunta, è adottata soprattutto in Italia ed Ungheria.

In Olanda e Svezia stanno proliferando con successo degli studi relativi a suoli fortemente inquinati da metalli pesanti. In tali suoli un parametro molto sensibile è risultato il tasso di crescita batterica; esso viene stimato attraverso l'incorporazione della timidina marcata nel DNA o della leucina nelle proteine.

Le attività enzimatiche, soprattutto idrolasica (fosfatasi ed esterasi) e deidrogenasica sono adottate in particolare in Italia e Ungheria, mentre in Germania si presta particolare attenzione agli enzimi fungini ligninolitici.

I processi di ammonificazione e nitrificazione hanno molto seguito in Italia ed Ungheria.

In Germania e Spagna si stanno conducendo molti studi sulla degradazione di substrati marcati complessi, come gli idrocarburi poliaromatici (PAHs) e altre sostanze xenobiotiche. Si è rilevato che oltre ad essere parzialmente mineralizzati, questi composti in piccola percentuale possono fornire frammenti organici incorporabili nelle strutture cellulari.

In Svezia, Olanda e Italia si sta affermando un approccio fisiologico denominato "Tolleranza della Comunità (microbica) alla Polluzione Indotta (PICT)". Esso consiste nel determinare l'attività microbica (attraverso incorporazione di timidina, ovvero sviluppo di colore nelle piastre BIOLOG, oppure numero di microbi in grado di formare colonie (CFU)) dopo incubazione a differenti concentrazioni di uno specifico inquinante. Le co-

munità microbiche tolleranti mostrano un picco di attività alle concentrazioni più elevate dell'inquinante.

In Germania e Italia grande interesse ha sempre suscitato la stima di vari quozienti metabolici, cioè del rapporto tra una certa attività compiuta nell'unità di tempo dall'unità di biomassa microbica. Sono stati definiti così il qCO_2 , il quoziente microbico (C microbico/C organico totale), il SIR/CFEM (rapporto tra il C della biomassa microbica stimata col metodo SIR e col metodo della Fumigazione-Estrazione), l'ATP/CFEM, il qNH_4^+ e il qN_{min} (l'ammonio e l'N minerale prodotti nell'unità di tempo dall'unità di biomassa). Sembra che tutti questi quozienti rappresentino dei buoni indicatori delle condizioni di crescita (in condizioni di stress e/o disturbo i valori dei quozienti tendono ad essere più elevati).

3) Diversità microbica

Da qualche anno notevole interesse suscita lo studio della diversità microbica, in quanto al pari degli ecosistemi naturali più vasti sembra che anche nel suolo un allontanamento da una condizione di equilibrio stazionario (omeostasi, climax) induca una riduzione della diversità microbica. In Olanda, Germania e Italia si tende a studiare soprattutto la diversità genetica (*genetic fingerprint*) per mezzo della tecnica di biologia molecolare del Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), attraverso cui è possibile ottenere un profilo delle bande di DNA appartenente a specie o gruppi microbici diversi. Un po' ovunque invece si indaga sulla diversità funzionale (*metabolic fingerprint*) attraverso il profilo dell'utilizzazione di substrati organici diversi (si usano da 30 a 95 substrati diversi). La tecnica consiste essenzialmente nell'inoculare estratti del suolo in esame in piastre BIOLOG a 96 pozzetti contenenti i diversi substrati. L'utilizzazione del substrato indurrà la formazione di colore nel pozzetto.

Soprattutto in Svezia è molto seguita l'analisi della composizione in acidi grassi dei fosfolipidi di membrana (PLFA), poichè tale biomarker è in grado di discriminare piuttosto bene tra gruppi microbici diversi.

Alla fine del primo meeting del WG4 a Bruxelles i partecipanti hanno convenuto che un metodo da applicare a tutte le situazioni attualmente ancora non esiste, né probabilmente potrà esistere in futuro. Ogni metodo presenta sia vantaggi che limitazioni. Bisogna quindi essere cauti nella scelta del metodo più sensibile per ogni condizione di stress/disturbo del suolo. I problemi metodologici, con i relativi miglioramenti, devono quindi essere sempre tenuti nella dovuta considerazione.

Il 10 e 11 dicembre 1998 a Roma si è tenuto il meeting con-

giunto di tutti i WG della COST Action 831. Nell'ambito dei lavori separati del WG4, sono stati presentati contributi riguardanti i seguenti diversi argomenti (a titolo informativo si riporta il primo autore ed il Paese di provenienza):

- 1) Influenza del cadmio sul quoziente metabolico e rapporto di respirazione L:D acido glutamico in un suolo forestale (L. Landi, Italia)
- 2) Meccanismi microbici per incrementare la biodisponibilità di inquinanti microbici nel suolo (J.J. Ortega-Calvo, Spagna)
- 3) Gli enzimi come sistema di decontaminazione (L. Gianfreda, Italia)
- 4) Risposta fisiologica della comunità microbica al sistema BIOLOG: vantaggi e limiti (H. Insam, Austria)
- 5) Uso di tecniche basate sullo studio delle comunità (PLFA e tolleranza della comunità) per monitorare gli effetti di metalli pesanti nel suolo (E. Bååth, Svezia)
- 6) Validità dei parametri microbici come indicatori dell'inquinamento da metalli pesanti del suolo (P.C. Brookes, Regno Unito)
- 7) Indagini su un processo di bio-remediation a due fasi in suoli contaminati da cloroaromatici (P. Rosenbrock, Germania)
- 8) Uso della sonicazione per la stima dell'attività fosfatase del suolo (L. Badalucco, Italy)
- 9) Indicatori microbici della qualità del suolo in suoli contaminati (J. Bloem, Paesi Bassi)
- 10) Stima dell'energia del pool della sostanza organica del suolo e sue relazioni con la dinamica microbica (M.T. Dell' Abate, Italy)
- 11) Variabilità spaziale della struttura della comunità microbica del suolo a livello di microplot (A. Gelsomino, Italia)
- 12) Impatto di agenti di controllo microbico (MCAs) sulle popolazioni batteriche native nella rizosfera di piante di orzo (J. E. Johansen, Svezia)
- 13) Effetto del cromo sulla comunità microbica del suolo (C. Viti, Italia)
- 14) Biodegradazione di rifiuti tossici selezionati (Biodegradation of selected hazardous wast) (K. Perei, Ungheria)

Il terzo meeting del WG 4 si è tenuto a Granada (Spagna) il 15 e 16 luglio 1999. La partecipazione di studiosi europei provenienti dai vari Paesi è stata veramente notevole. A titolo informativo si riportano alcuni tra i contributi più significativi, seguiti dalle relative informazioni-chiave:

Determinazioni della biomassa microbica: confronto tra alcuni metodi diretti e indiretti (U. Granhall, Svezia)

Informazioni-chiave:

La respirazione indotta da substrato (SIR) e la respirazione basale (BAS) potrebbero essere interpretate come l'attività delle popolazioni in attiva crescita e quiescenti, rispettivamente.

I comuni enzimi idrolitici negli organismi attivi (saggio dell'idrolisi della fluoresceina diacetato, FDA) sono ben correlati con la stima della biomassa microbica basata sulla Fumigazione-Estrazione e con il potenziale di denitrificazione (PDA).

Il quoziente respiratorio qCO_2 dovrebbe essere usato con grande cautela nell'interpretazione di risultati provenienti da ecosistemi a diversa maturità o gestione. Esso spesso co-varia molto bene con il rapporto C/N, indicando che l'informazione contenuta è piuttosto grezza.

Biomassa microbica: confronto dell'analisi d'immagine con i metodi basati sulla fumigazione con cloroformio (J. Bloem, Paesi Bassi)

Informazioni-chiave:

Soprattutto in Olanda per la stima della biomassa microbica del suolo comincia ad affermarsi un Metodo basato sulla Fumigazione con Cloroformio seguita da Centrifugazione (CFCM): la fumigazione induce un incremento del C e dell'N solubile nella soluzione estratta dal suolo per centrifugazione. Tale incremento si può considerare una stima della biomassa microbica.

Le conte microbiche per microscopia diretta e le stime dimensionali dei microorganismi al fine di valutare la biomassa microbica sono estremamente tediose e soggettive, perciò poco affidabili, quando effettuate visivamente dall'osservatore.

L'analisi d'immagine automatica e computerizzata è un sistema in grado di valutare con precisione il numero ed il volume delle cellule microbiche. La biomassa può essere stimata a partire dal biovolume totale.

L'azoto della biomassa microbica (Biomassa-N) misurato con i metodi della fumigazione è risultato significativamente correlato ($r = 0.60$ -

0.74) con la biomassa microbica stimata con l'analisi d'immagine. La correlazione con il Biomassa-C è stata più debole ($r = 0.24 - 0.56$), analogamente alla correlazione tra differenti metodi di fumigazione per il Biomassa-C ($r = 0.28 - 0.52$).

Il Biomassa-N stimato con i diversi metodi di fumigazione ha sempre mostrato delle forti correlazioni ($r = 0.90$). Il Biomassa-C stimato col metodo FI ha dato valori mediamente 4 volte più elevati rispetto agli altri metodi. L'analisi d'immagine, il metodo CFEM ed il metodo CFCM hanno dato stime simili della biomassa microbica.

Le attività enzimatiche come parametro per misurare l'impatto dei pesticidi nel suolo (R. G. Burns, Regno Unito)

Informazioni-chiave:

Gli effetti di xenobiotici (erbicidi, insetticidi e fungicidi) sulle attività microbiche del suolo possono costituire un importante saggio della loro accettabilità e sostenibilità ambientale.

Nel contesto del meccanismo d'azione del pesticida, queste attività possono includere processi multi-fase come la nodulazione, l'azoto-fissazione, la ligno-cellulolisi, e la respirazione. Al contrario spesso, nel tentativo di sviluppare saggi rapidi e sensibili per stimare l'impatto di pesticidi e xenobiotici, sono stati investigati quasi esclusivamente eventi enzimatici semplici.

Gli enzimi studiati sono principalmente idrolasi (per es. cellulasi, fosfatasi, amidasi, ureasi) ed ossido-reduttasi (per es. laccasi, catalasi, deidrogenasi, glucosio ossidasi). Le risposte riportate sono spesso contraddittorie e coprono tutte le possibilità (cioè stimolazione, inibizione e nessun effetto) e possono essere sia temporanee che permanenti.

In ogni caso la predizione dell'impatto e del movimento del pesticida, ed i processi di adsorbimento e di bio-disponibilità sono fondamentali per la stima del rischio e le decisioni sul potenziale di bio-remediation.

RESPIRAZIONE INDOTTA DALL'AGGIUNTA DI SUBSTRATO NEL SUOLO

Sara Marinari

Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica
Università degli Studi della Tuscia - Viterbo

Via S. Camillo de Lellis - 01100 Viterbo

La produzione di CO₂ indotta dall'aggiunta di glucosio dipende dalle caratteristiche del suolo ma generalmente segue la cinetica di Michaelis - Menten. La stima della biomassa microbica del suolo mediante la respirazione indotta dall'aggiunta di substrato (SIR) prevede una risposta fisiologica della microflora dopo poche ore dall'aggiunta del substrato e non tiene conto di quella porzione di biomassa metabolicamente inattiva (Anderson e Domsch, 1975; Hopkins e Shiel, 1996). Nel metodo SIR si assume che: i) la risposta dei diversi microrganismi è sufficientemente costante; ii) la maggioranza dei microrganismi del suolo risponde durante il periodo di misura; iii) il glucosio è un substrato ottimale che induce la massima risposta; iv) il contributo dei microrganismi che non metabolizzano il glucosio è insignificante (Sparling, 1995). Inoltre, una delle limitazioni del metodo riportate in letteratura (Martens, 1987) consiste nella sottostima della CO₂ prodotta a seguito dell'aggiunta di substrato in suoli neutri od alcalini, in particolare quando il sistema di misura è statico (West e Sparling, 1986).

Gli studi condotti fino ad oggi interessano suoli agro/forestali con caratteristiche pedologiche, chimiche e biologiche dell'area temperata (Germania, Inghilterra e Nuova Zelanda) (West e Sparling, 1986; Martens, 1987; Hopkins e Shiel, 1996). Interessante risulta l'approfondimento delle conoscenze relative al metodo SIR applicato ai suoli di ambienti estremi caratterizzati da una microflora particolare che spesso si trova in condizioni di oligotrofia.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di approfondire le conoscenze metodologiche relative al SIR al fine di avviare uno studio volto a verificare la validità delle assunzioni sopra riportate, in suoli di zone climatiche non temperate.

Esperienza maturata presso il "Department of Biological Sciences - University of Dundee" nel periodo dal 20/09/1998 al 5/10/1998 usufruendo di una Short-Term Scientific Mission (STSM) - COST ACTION 831

Materiali e Metodi

La massima risposta respiratoria indotta dall'aggiunta di glucosio è data dalla pendenza della retta che descrive il rapporto tra la concentrazione del substrato e la quantità di CO₂ prodotta per ora di incubazione - [S]/Vo, in funzione della concentrazione del substrato - [S].

Il contenuto di biomassa microbica (mg C-Bc g⁻¹ suolo - peso secco) può essere calcolato usando la relazione tra la Vmax e la Bc riportata da Anderson e Domsch (1978), Hopkins *et al.* (1996), Hopkins *et al.* (1994):

$$Bc = 0.8916 \mu \text{ mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ d.w. h}^{-1} - 0.0019$$

Sette campioni di suoli forestali prelevati in Scozia (40 g di peso fresco da utilizzare per tre repliche relativamente ad ogni concentrazione di substrato) sono stati lasciati stabilizzare per circa 24 ore a 20°C prima dell'aggiunta del substrato. 6 g di suolo sono stati mescolati con il glucosio alle concentrazioni di 0 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 4,0 - 8,0 - 16,0 mg per g di suolo (peso secco). Il substrato è stato mescolato in 0,5 g di talco per facilitarne la dispersione omogenea nel suolo. L'incubazione è avvenuta all'interno di siringhe del volume di 60 ml, chiuse ermeticamente e munite di un rubinetto a tre vie da cui è stato possibile prelevare 1 ml del campione di aria da analizzare al fine valutare la produzione di CO₂ nell'unità di tempo. La determinazione della CO₂ è avvenuta mediante l'uso di un gas cromatografo (VARIAN Model 90P con colonna Porapak 80/100 mesh della lunghezza di m 1,32 e diametro di 3 mm) e detector a temoconducibilità (TCD).

La produzione di CO₂ è stata calcolata come segue:

$$x_0 = a_0/b_0 * k * H_0 / \text{d.w.}$$

$$x_6 = a_6/b_6 * k * H_6 / \text{d.w.}$$

$$X = (x_6 - x_0) / h$$

dove:

x_0 = $\mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ d.w.}$ al momento iniziale dell'incubazione dopo l'aggiunta di substrato

x_6 = $\mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ d.w.}$ dopo 6 ore di incubazione a seguito dell'aggiunta di substrato

a_0/b_0 , a_6/b_6 = picco del campione/ picco dello standard dopo 0 e 6 ore di incubazione

k = 0.4464 $\mu\text{mol CO}_2$ in 1 ml of CO₂ 1%

H = ml spazio di testa

d.w. = peso secco del suolo

X = $\mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ d.w. h}^{-1}$ (respirazione indotta dall'aggiunta di substrato [Vo])

h = 6 ore di incubazione

La respirazione indotta dall'aggiunta di substrato durante le 6 ore di incubazione è stata calcolata come differenza tra la produzione di CO_2 nel suolo al quale non è stato aggiunto glucosio e quella di suolo al quale è stata aggiunta la dose più piccola di glucosio che ha determinato la massima risposta respiratoria.

La respirazione basale della comunità microbica del suolo è stata determinata mediante l'incubazione per un periodo di 111 ore dei campioni di suolo al quale non era stato aggiunto alcun substrato.

Risultati e discussione

Il SIR è risultato un metodo interessante per lo studio dell'attività metabolica e per la stima della biomassa microbica dei suoli dotati di buona fertilità chimico-fisica e biologica. Il contenuto di biomassa microbica è risultato di $905 \mu\text{g C-Bc g}^{-1}$ con una $V_{\text{max}} = 1,017 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La respirazione basale dei suoli ha iniziato ad essere costante dopo circa 74 ore d'incubazione a temperatura ambiente fornendo un valore medio di $0,1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Il sistema di misura adottato di tipo statico, mediante l'uso di siringhe in plastica del volume di 60 ml, costituisce un sistema di misura molto semplice, di facile realizzazione e di elevata riproducibilità. La determinazione della massima risposta respiratoria a seguito dell'aggiunta di diversi tipi di substrati rappresenta un utile parametro in grado di definire alcuni profili metabolici di un suolo da utilizzare insieme ad altre tecniche di misure metaboliche, quali il "BIOLOG eco-plates". Le scarse conoscenze riportate in letteratura relativamente all'uso del metodo SIR in suoli di ambienti estremi hanno suscitato l'interesse a voler allargare l'uso del metodo anche a suoli di zone aride o semiaride.

Bibliografia

- ANDERSON J.P.E., DOMSCH K.H. (1978). A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol Biochem* 10: 215-221.
- ANDERSON J.P.E., DOMSCH K.H. (1975). Measurements of bacterial and fungal contributions to respiration to selected agricultural and forest soils. *Can. J. Microbiol.* 21: 314-322.
- HOPKINS D.W., SHIEL R.S. (1996). Size and activity of soil microbial community in long-term experimental grassland plots treated with manure and inorganic fertilizers. *Biol Fertil Soils* 22: 66-70.
- HOPKINS D.W., FERGUSON K.E. (1994). Substrate induced respiration in soil amended with different amino acid isomers. *Appl Soil Ecol.* 1: 75-81.
- MARTENS R. (1987). Estimation of microbial biomass in soil by the respiration method: importance of soil pH and

flushing methods for the measurement of the respired CO₂. *Soil Biol Biochem.* 19: 77-81.

SPARLING G.P. (1995). The substrate-induced respiration method. In: (Nannipieri P. and Alef K. Eds) *Methods in applied soil microbiology and biochemistry.* 397-404.

WEST A.W., SPARLING G.P. (1986). Modification to the substrate-induced respiration method to permit measurement of microbial biomass in soils of differing water contents. *J. Microbiol. Meth.* 5: 117-189.

RUOLO DI COMPOSTI ORGANICI A BASSO PESO MOLECOLARE SULLE DINAMICHE DEL CARBONIO E DELL'AZOTO

Luca Falchini^{1,2}, Peter J. Kuikman¹, Paolo Nannipieri²

¹ Research Institute for Agrobiolgy and Soil Fertility (AB-DLO), Wageningen, The Netherlands

² Dipartimento di Scienza del Suolo e Nutrizione della Pianta, Università degli Studi di Firenze
Piazzale delle Cascine, 16 - 50144 Firenze

Introduzione

Tra i nutrienti l'azoto rappresenta, senza alcun dubbio, l'elemento che limita maggiormente la crescita e lo sviluppo delle piante. L'impiego di una quantità di fertilizzanti azotati in eccesso rispetto a quella realmente richiesta dalle colture è in parte legato anche alla complessità del ciclo dell'azoto nel suolo e alla difficoltà nel determinare le velocità dei processi di mineralizzazione ed immobilizzazione di questo elemento ad opera della microflora del terreno. I microrganismi del suolo sono infatti responsabili delle continue trasformazioni dell'azoto nelle sue diverse forme, organiche ed inorganiche. La complessa comunità microbica del suolo è, in ultima analisi, nutrita dall'energia solare. Infatti, la loro fonte di energia primaria è il carbonio fissato attraverso il processo fotosintetico che entra nell'ecosistema suolo attraverso i residui della biomassa vegetale e gli essudati radicali (Tate, 1995). Il rilascio di questa sostanza organica nel suolo da parte delle radici stimola l'attività microbica e porta, in prossimità dell'apparato radicale, alla formazione di un ambiente, la rizosfera, totalmente diverso, sia dal punto di vista chimico-fisico che microbiologico, dal suolo circostante. Aminoacidi, zuccheri, acidi organici sono i composti più comuni rilasciati dalle piante come essudati radicali (Krafczyk *et al.*, 1984; Bowen e Rovira, 1987; Marschner, 1995; Marstorp, 1996). Il rilascio di queste molecole facilmente degradabili ha un ruolo importante nel modificare la crescita, l'attività e la struttura delle comunità microbiche del suolo (Bottner *et al.*, 1988) e di conseguenza si ha anche una modificazione della velocità dei processi di mineralizzazione e di immobilizzazione dell'azoto (Van Veen *et al.*, 1993). Il glucosio viene spesso impiegato in letteratura come "molecola modello" per simulare gli effetti legati al rilascio nel suolo di questi composti a basso peso molecolare da parte delle radici. Minori informazioni sono disponibili

sulla mineralizzazione degli acidi organici e degli aminoacidi e sulla loro influenza sulle dinamiche dell'azoto. Scopo di questo lavoro è stato quindi quello di seguire la mineralizzazione di alcuni composti organici (uno zucchero, il glucosio; un acido organico, l'acido ossalico e un aminoacido, l'acido glutammico), ed il loro utilizzo da parte dei microrganismi del terreno, mediante l'impiego di composti marcati con ^{14}C e di osservare gli effetti che tali molecole hanno sulle dinamiche dell'azoto ammoniacale scambiabile e dell'azoto nitrico del suolo.

Materiali e metodi

Un suolo franco sabbioso (Sabbia 66%, Limo 20%, Argilla 14%, C organico 1,66%, N totale 0,17%, $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$ 8,1), è stato vagliato a 2 mm e conservato ad una temperatura $< 4^\circ\text{C}$ fino al momento dell'esperimento. Il suolo è stato pre-incubato per 7 giorni a 25°C , è stato ammendato con le seguenti soluzioni:

Controllo: $30 \mu\text{g N}-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ g}^{-1}$ suolo;

Glucosio: $^{14}\text{C}[\text{U}]\text{glucosio}$ ($1,3 \text{ KBq g}^{-1}$ suolo) e $30 \mu\text{g N}-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ g}^{-1}$ suolo;

Acido ossalico: $^{14}\text{C}[\text{U}]\text{acido ossalico}$ ($2,1 \text{ KBq g}^{-1}$ suolo) e $30 \mu\text{g N}-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ g}^{-1}$ suolo;

Acido glutammico: ^{14}C -acido glutammico ($1,4 \text{ KBq g}^{-1}$ suolo).

La quantità di carbonio aggiunta con i diversi substrati è stata pari a $300 \mu\text{g C g}^{-1}$ suolo. Il suolo (60 g), è stato posto ad incubare in vasi di vetro a chiusura ermetica (volume 1,5 l), ad un'umidità pari a circa il 50% della capacità di ritenzione idrica massima e ad una temperatura di 25°C al buio. All'interno di ogni vaso è stato posto un contenitore (125 ml) per il suolo ed uno in vetro (20 ml) con 10 ml di NaOH 0,5 M per intrappolare la CO_2 . Per mantenere costante l'umidità all'interno del barattolo sono stati aggiunti sul fondo del barattolo 3 ml di acqua deionizzata.

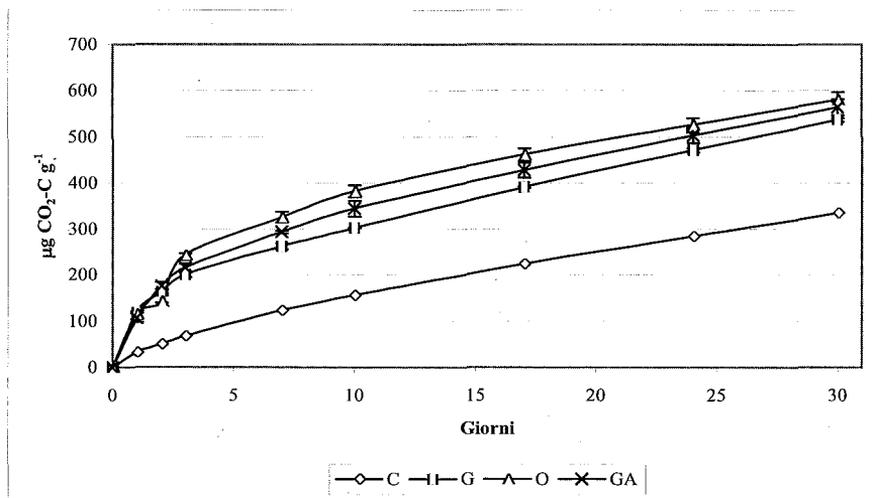
Dopo 1, 2, 3, 7, 10, 17, 24 e 30 giorni è stato determinato il C- CO_2 totale e il ^{14}C - CO_2 con le modalità descritte da Bremer e Kuikman (1994). Per determinare il ^{14}C presente all'interno della biomassa microbica, dopo 0, 3, 7 e 30 giorni è stata effettuata la fumigazione-estrazione (Vance *et al.*, 1987) utilizzando come estraente una soluzione di K_2SO_4 0,5 M contenente 5 mg l^{-1} di fenil mercurio acetato (rapporto suolo:estraente 1:5). Negli estratti di suolo non fumigati è stata determinato il contenuto di

N-NH₄⁺ e di N-NO₃⁻ impiegando un analizzatore automatico TRAACS 800 (Alfa-Laval Bran+Luebbe, Elmsford, N.Y., U.S.A.). Negli estratti dei suoli fumigati e non fumigati è stata determinata la radioattività (Bq ml⁻¹) della soluzione come descritto da Bremer e Kuikman (1994).

Risultati e discussione

Respirazione - L'aggiunta del substrato organico provoca, in tutti i trattamenti, un aumento della quantità di CO₂ emessa rispetto al suolo di controllo (Fig. 1). Questo aumento risulta minore nel suolo trattato con glucosio (200 µg C-CO₂ g⁻¹ di suolo) e maggiore in quello addizionato di acido ossalico (250 µg C-CO₂ g⁻¹ di suolo). La maggiore quantità di C emessa da quest'ultimo trattamento è tuttavia da attribuirsi, in parte, al dissolvimento dei carbonati a seguito dell'aggiunta dell'acido organico al suolo.

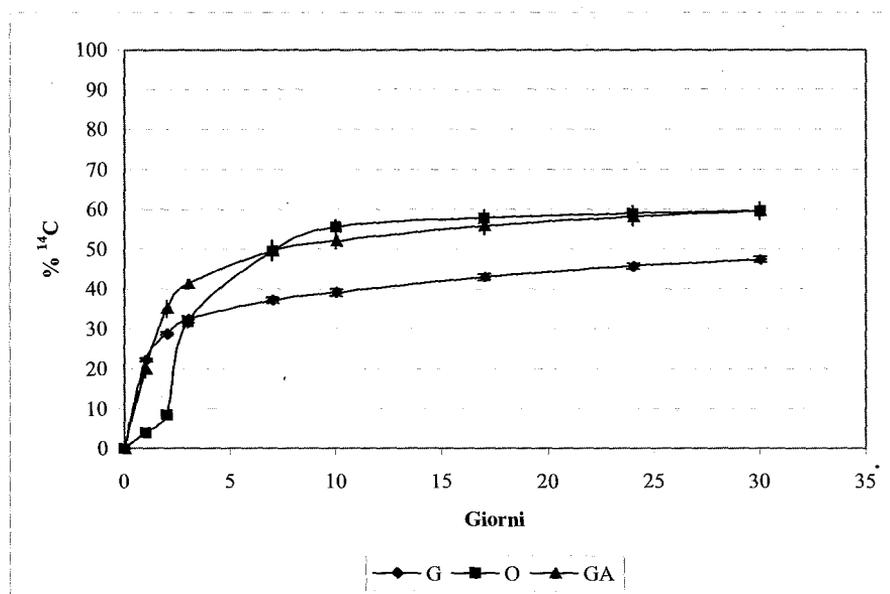
Figura 1 - Curva cumulativa del C-CO₂ emesso durante l'incubazione del suolo sottoposto a diversi trattamenti: controllo (C); glucosio (G); acido ossalico (O); acido glutammico (GA).



Infatti, la percentuale di ¹⁴C mineralizzata nei primi due giorni (Fig. 2) è minore del 10% del C aggiunto come acido ossalico. Fra il secondo ed il terzo giorno d'incubazione invece, la quantità mineralizzata supera il 20% del C aggiunto. Questa quantità è equivalente a quella rilevata dalla mineralizzazione degli altri due substrati nelle prime 24 ore d'incubazione. Questo sembra indicare che solo un numero limitato dei microrganismi pre-

senti nel suolo, per lo meno in una prima fase, è in grado di mineralizzare attivamente l'acido ossalico (Messini e Favilli, 1990). I composti organici aggiunti al suolo vengono rapidamente mineralizzati nei primi 7 giorni di incubazione. Successivamente solo una percentuale minima di substrato viene ulteriormente mineralizzata. Questo potrebbe essere dovuto ad una stabilizzazione del ^{14}C residuo (Mary et al., 1993) o ad una riduzione dell'attività della biomassa microbica. Al termine dell'incubazione, il 60% del C aggiunto come acido glutammico o acido ossalico ed il 50% di quello aggiunto come glucosio viene trasformata in C-CO_2 .

Figura 2 - Percentuale di substrato mineralizzato durante l'incubazione sottoposto a diversi trattamenti: glucosio (G); acido ossalico (O); acido glutammico (GA).



Sottraendo dal C-CO_2 totale rilasciato dal suolo il C derivante dai substrati aggiunti (^{14}C) è stato possibile calcolare la quantità di C nativo del suolo (^{12}C) emessa durante il periodo di incubazione. I risultati (Tab. 1) mostrano che l'aggiunta di questi composti organici, dopo 30 giorni, porta ad un maggiore rilascio di C nativo del suolo (15-17,5%), rispetto al terreno di controllo.

Nel caso dell'acido ossalico risulta difficile stabilire quanto incida la dissoluzione dei carbonati sulla respirazione del suolo mentre per il glucosio e l'acido glutammico si può affermare che la loro aggiunta provoca il cosiddetto *priming effect* (Dalemborg e Jager, 1989). Nei campioni di

suolo ammendati con questi due composti organici viene mineralizzata una quantità di carbonio nativo del suolo superiore a quella aggiunta.

Tabella 1 - Quantità di C nativo del suolo emessa al termine del periodo di incubazione.

Trattamento	$\mu\text{g } ^{12}\text{C-CO}_2 \text{ g}^{-1}$
Controllo	317.18 ± 10.05
Glucosio	384.37 ± 13.53
Ac. Ossalico	372.96 ± 28.51
Ac. Glutammico	374.40 ± 21.80

Azoto ammoniacale scambiabile e azoto nitrico - Relativamente al contenuto di N ammoniacale, i diversi trattamenti si differenziano tra loro solo al terzo giorno d'incubazione. L'aggiunta dell'aminoacido provoca infatti un aumento della concentrazione di N-NH_4^+ , mentre nei suoli ammendati con glucosio ed acido ossalico la quantità di N-NH_4^+ scambiabile è stata inferiore a quella del controllo. Dopo 7 e 30 giorni d'incubazione non è stata rilevata alcuna differenza significativa tra i diversi trattamenti. Al termine dell'incubazione si è osservato in tutti i trattamenti un lieve aumento della concentrazione di azoto ammoniacale scambiabile (Fig. 3). Il suolo trattato con glucosio presenta la minor quantità di N-NO_3^- , mentre quello addizionato con acido glutammico presenta la più elevata concentrazione di nitrato. Il suolo di controllo e quello addizionato con acido ossalico non mostrano alcuna differenza significativa (Fig. 3).

Il calcolo della mineralizzazione e della nitrificazione netta effettuato come riportato da Hart *et al.* (1994) permette di osservare che il glucosio dà luogo ad un'immobilizzazione netta, soprattutto nei primi tre giorni di incubazione (Fig. 4). Nei primi 3 giorni di incubazione, la quantità di N mineralizzata nel suolo trattato con acido ossalico, è simile a quella osservata nel controllo mentre, fra 3 e 7 giorni, quando l'attività metabolica è più elevata, si è osservata una certa immobilizzazione. Nei campioni di suolo ai quali è stato aggiunto acido glutammico, si osserva invece una netta prevalenza della mineralizzazione; quasi certamente in conseguenza della deaminazione dell'aminoacido, particolarmente evidente nei primi 3 giorni di incubazione (Fig. 4). Fra 7 e 30 giorni d'incubazione tutti i trattamenti hanno dato luogo ad una mineralizzazione netta.

La nitrificazione netta (Fig. 4) è particolarmente elevata durante i primi 3 giorni di incubazione mentre diminuisce bruscamente fra il terzo ed il settimo giorno ad eccezione del suolo trattato con acido glutammico. Durante i primi 7 giorni di incubazione, nei campioni di suolo trattati con

glucosio la nitrificazione netta è risultata nettamente inferiore a quella degli altri trattamenti. Questo comportamento, come quello osservato nel suolo trattato con acido glutammico, sono da porre in relazione ai rispettivi andamenti della mineralizzazione netta.

Figura 3. Dinamica del pool dell'azoto ammoniacale scambiabile e dell'azoto nitrico nei diversi trattamenti ai vari tempi di incubazione. Controllo (C); Glucosio (G); Acido Ossalico (O); Acido glutammico (GA).

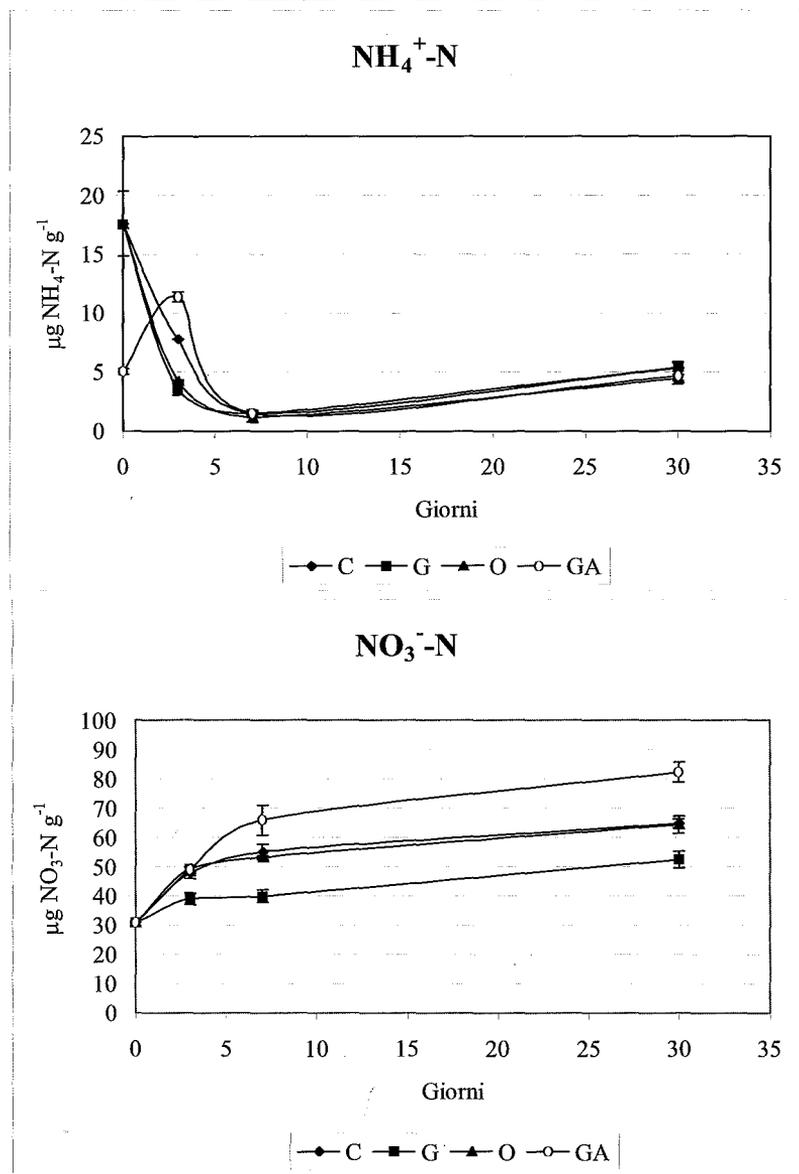
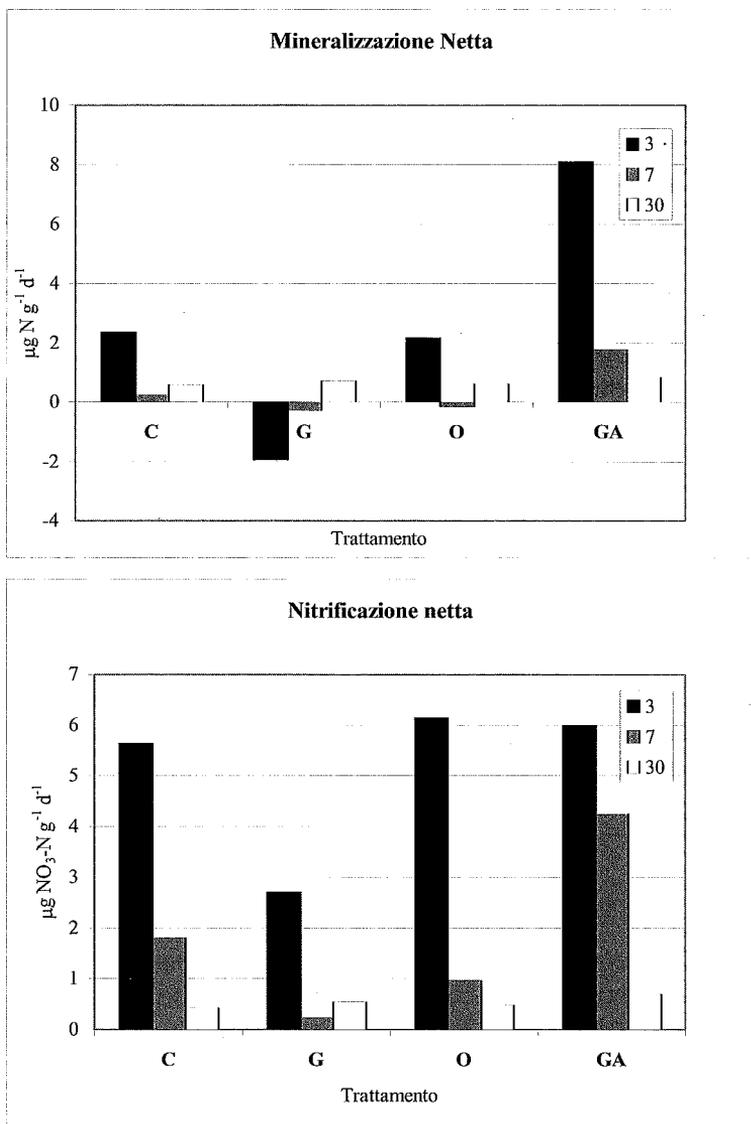


Figura 4. Andamento della mineralizzazione e della nitrificazione netta nei diversi periodi di incubazione (0-3; 3-7 e 7-30 giorni) con i vari trattamenti. Controllo (C); Glucosio (G); Acido ossalico (O); Acido glutammico (GA).



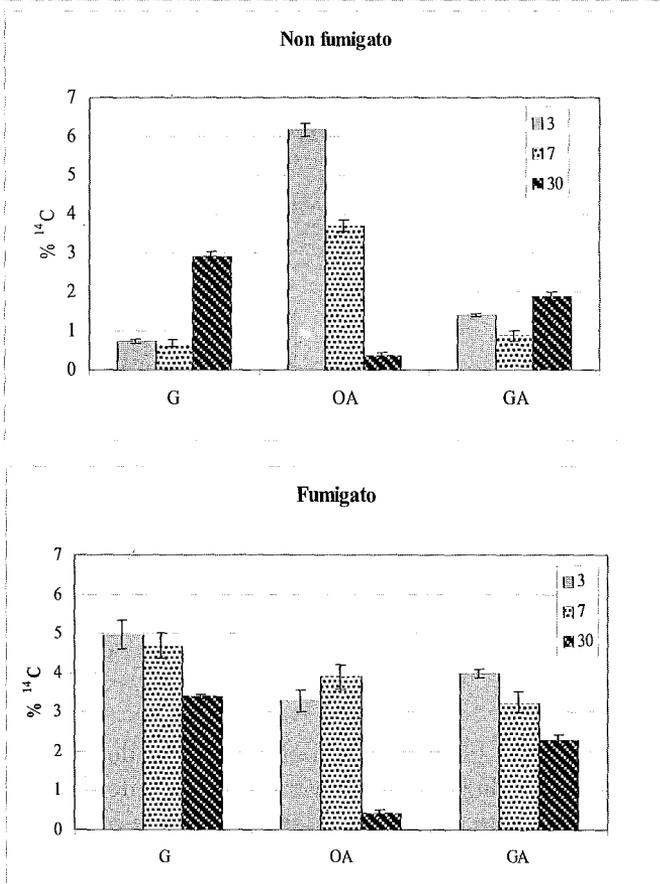
Nel caso del glucosio l'immobilizzazione dell'azoto ammoniacale ha portato ad una riduzione del substrato disponibile per i nitrificanti e quindi l'attività nitrificante è risultata inferiore a quella osservata negli altri trattamenti (Macdonald, 1986). Al contrario, la mineralizzazione dell'aminoacido ha aumentato la concentrazione di N-NH_4^+ scambiabile e quindi c'è

stato un aumento dell'attività nitrificante.

Contenuto di ^{14}C negli estratti di suolo fumigati e non fumigati - Anche in questo caso i tre composti organici danno luogo a risultati diversi indicando che non tutte le molecole organiche a basso peso molecolare sono ugualmente utilizzate dai microrganismi del suolo per costruire il loro materiale cellulare.

Nella figura 5, relativa alla percentuale di C aggiunto recuperato negli estratti dei suoli, fumigati e non fumigati, risulta prima di tutto evidente come, soprattutto nei primi 7 giorni di incubazione, la biomassa microbica mostri una certa preferenza per il C derivante dal glucosio per la biosintesi del proprio materiale cellulare.

Figura 5. Percentuale di ^{14}C recuperato negli estratti di suolo, fumigato e non fumigato, in K_2SO_4 0,5 M, nei diversi periodi di incubazione (0-3; 3-7 e 7-30 giorni) con i vari trattamenti. Glucosio (G); Acido ossalico (O); Acido glutammico (GA).



Questo concorda con i risultati di altri autori (Van Veen *et al.*, 1985; Bremer e Kuikman, 1994) che avevano osservato un'elevata efficienza di utilizzazione del glucosio in tempi brevi tanto da ipotizzare che vi fosse un assorbimento diretto di questa molecola, senza l'intervento di alcun processo enzimatico all'esterno della cellula. Il C proveniente dall'acido glutammico è meno utilizzato rispetto a quello dello zucchero mentre, per quanto riguarda l'acido ossalico, sembra che questa molecola non sia impiegata per la sintesi di materiale cellulare poiché la quantità di ^{14}C recuperata nei suoli non fumigati non differisce da quella dei suoli fumigati. Quest'ultimo risultato non è particolarmente sorprendente perché l'acido organico utilizzato è composto da soli due atomi di C e quindi questa molecola può fornire solo una limitata energia (Morris e Allen, 1994), dopo la rottura del legame C-C con la conseguente formazione di CO_2 (Jakoby e Bhat, 1958). Dopo 3 giorni di incubazione, la quantità di ^{14}C è più elevata negli estratti di suolo non fumigato trattato con acido ossalico, rispetto agli estratti dello stesso suolo fumigato. I dati ottenuti sembrano indicare che l'acido ossalico non è stato utilizzato dalla biomassa microbica del suolo. Inoltre, si avvalorava l'ipotesi, già sostenuta da altri autori (Vance *et al.*, 1987b; Tate, 1991; Hintze *et al.*, 1994; Badalucco *et al.*, 1997), che la fumigazione con CHCl_3 non sia in grado di uccidere tutti i microrganismi. E' probabile quindi che quelli sopravvissuti all'azione dell'agente fumigante, durante le 24 ore della fumigazione, abbiano continuato la loro attività metabolica riducendo quindi la quantità di acido ossalico estraibile al termine della fumigazione stessa. E' ipotizzabile quindi che la fumigazione con il CHCl_3 , per lo meno in questo suolo, non agisca in maniera efficace. Quanto osservato per l'acido ossalico non è escluso che si sia verificato anche per gli altri due trattamenti, portando ad una sottostima della quantità di ^{14}C recuperato dalla biomassa microbica.

Conclusioni

I diversi substrati, pur inducendo una maggiore attività respiratoria nella biomassa microbica, mostrano fra loro delle differenze. Il glucosio è il substrato che viene mineralizzato di meno. L'acido ossalico, dopo un'iniziale fase *lag* viene rapidamente convertito in CO_2 . L'acido glutammico viene mineralizzato più velocemente del glucosio. Il *priming effect* è osservato sia con l'aggiunta dell'aminoacido che con quella del glucide. E' stato inoltre osservato che fra le tre fonti di carbonio impiegate il glucosio sembra essere quella più utilizzata dalla biomassa microbica per la sintesi di nuovo materiale cellulare. L'azoto ammoniacale o amminico aggiunto al suolo è

stato rapidamente trasformato in altri composti azotati, mentre la nitrificazione netta varia con il substrato impiegato. E' risultata maggiore nel suolo trattato con acido glutammico e minore in quello ammendato con glucosio. Questo è dovuto alla maggiore quantità di azoto aggiunta con l'aminoacido e quindi alla maggiore disponibilità di substrato per i batteri nitrificanti. Il glucosio al contrario ha dato luogo ad una maggiore immobilizzazione netta riducendo così la quantità di azoto ammoniacale disponibile per la nitrificazione. Utilizzare il glucosio come "molecola modello" per simulare gli effetti dei composti a basso peso molecolare potrebbe quindi portare, talvolta, a delle conclusioni errate nelle dinamiche del carbonio e dell'azoto nel suolo. L'impiego del ^{14}C e di una fonte di carbonio, l'acido ossalico, poco utilizzata ai fini biosintetici, ha permesso inoltre di osservare come, nel suolo impiegato per questa ricerca, la fumigazione con CHCl_3 sembra essere solo parzialmente efficiente.

Ringraziamenti

I risultati esposti in questo lavoro sono infatti stati ottenuti durante una Short-Term Scientific Mission (STSM) nell'ambito del COST Action 831, Working Group 1: Soil-root-microbes interactions, presso l'AB-DLO di Wageningen (Olanda). Si ringrazia tutto lo staff tecnico e i ricercatori dell'AB-DLO di Wageningen per le informazioni e l'aiuto forniti durante l'impiego degli isotopi radioattivi e il Prof. Luigi Badalucco per i preziosi suggerimenti e la revisione critica dei dati ottenuti.

Bibliografia

- BADALUCCO L., DE CESARE F., GREGO S., LANDI L., NANNIPIERI P. (1997). Do physical properties of soil affect chloroform efficiency in lysing microbial biomass? *Soil Biol. Biochem.* 29, 1135-1142.
- BOTTNER P., SALLIH Z., BILLES G. (1988). Root activity and carbon metabolism in soils. *Biol. Fertil. Soils* 7, 71-78.
- BOWEN G.D., ROVIRA A.D. (1987). The rhizosphere - The hidden half of the hidden half. In: *Plant roots - The hidden half*. Waisel Y., Eshel A., and Kafkafi U. (eds.) M. Dekker New York (publ.), pp. 641-669.
- BREMER E., KUIKMAN P. (1994). Microbial utilization of ^{14}C [U]glucose in soil affected by the amount and timing of glucose additions. *Soil Biol. Biochem.* 26, 511-517.
- DALEMBERG J.W., JAGER G. (1989). Priming effect of some organic additions to ^{14}C -labelled soil. *Soil Biol. Biochem.* 21, 443-448.
- HART S.C., STARK J.M., DAVIDSON E.A., FIRESTONE M.K. (1994). Nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification. In: *Methods of soil analysis, Part 2. Microbiological and biochemical properties* - SSSA Book Series, n. 5., pp. 985-1018.
- HINTZE T., GEHLEN P., SCHRÖDER D. (1994). Are microbial biomass estimations equally valid with arable soils and forest soils? *Soil Biol. Biochem.* 26, 1207-1211.
- KRAFCZYK I., TROLLDENIER G., BERINGER H. (1984). Soluble root exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 16 (4), 315-322.

- JAKOBY W.B., BHAT J.V. (1958). Microbial metabolism of oxalic acid. *Bacteriol. Rev.* 22, 75-80.
- MACDONALD R. McL. (1986). Nitrification in soil: an introductory history. In: *Nitrification Special Publications of the Society for General Microbiology* vol. 20. Prosser J.I. (ed.), IRL Press Oxford, England (publ.), pp., 1-16.
- MARSCHNER H. (1995). The soil-root interface (rhizosphere) in relation to mineral nutrition. In: *Mineral nutrition of higher plants*. Marschner H. (ed.) Academic Press London (publ.), pp. 535-595.
- MARSTORP H. (1996). Interaction in microbial use of soluble plant components in soil. *Biol. Fertil. Soils* 22, 45-52.
- MARY B., FRESNEAU C., MOREL J.L., MARIOTTI A. (1993) C and N cycling during decomposition of root mucilage, roots and glucose in soil. *Soil Biol. Biochem.* 25, 1005-1014.
- MESSINI A., FAVILLI F. (1990). Calcium oxalate decomposing microorganisms: a microbial group of the rhizosphere of forest plants. *Ann. Microbiol.* 40, 93-101.
- MORRIS S.J., ALLEN M.F. (1994). Oxalate-metabolizing microorganisms in sagebrush steppe soil. *Biol. Fertil. Soils* 18, 255-259.
- TATE R.L. (1991). Microbial biomass measurement in acidic soil: effect of fungal:bacterial activity ratios and of soil amendment. *Soil Sci.* 152, 220-225.
- TATE R. L. (1995). The rhizosphere/mycorrhizosphere. In: *Soil Microbiology*. Tate R.L. (ed) John Wiley & sons (publ.) New York/Chichester pp. 171-200.
- VANCE E.D., BROOKES P.C., JENKINSON D.S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19, 703-707.
- VANCE E.D., BROOKES P.C., JENKINSON D.S. (1987b). Microbial biomass measurements in forest soils: determination of k_e values and tests of hypotheses to explain the failure of the chloroform fumigation-incubation method in acid soils. *Soil Biol. Biochem.* 19, 689-696.
- VAN VEEN J.A., KUIKMAN P.J., BREMER E. (1993). The regulation of carbon and nitrogen turnover in the rhizosphere. In: *Trends in microbial ecology*. Guerrero R. and Pedros-Alio C. (eds), pp. 239-242.
- VAN VEEN J.A., LADD J.N., AMATO M. (1985). Turnover of carbon and nitrogen through the microbial biomass in a sandy loam and a clay soil incubated with $[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glucose and $[^{15}\text{N}](\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ under different moisture regimes. *Soil Biol. Biochem.* 17, 747-756.



USO DELL'IMPRONTA METABOLICA NELLA SISTEMATICA E NELL'ANALISI DEL PROFILO FISILOGICO DI COMUNITÀ MICROBICHE DEL SUOLO (CLPP - COMMUNITY LEVEL PHYSIOLOGICAL PROFILES)*

Flavia Pinzari¹, Heribert Insam²

¹ Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

² Institut für Microbiologie, Innsbruck Universität, Innsbruck

Introduzione

I microrganismi colonizzano tutti gli ambienti della biosfera condizionandoli e modificandoli con la loro presenza. Sono organismi chiave in processi cruciali quali la decomposizione, il ciclo dell'azoto, la formazione di humus. Sono spesso dotati d'enzimi in grado di affrontare substrati molto complessi e possono talvolta colonizzare ambienti proibitivi per qualsiasi altro organismo. I meccanismi con cui vivono, si disperdono e competono per lo spazio e per il cibo sono vari e spesso sorprendenti. Pur rivestendo un enorme ruolo biologico, però, i microrganismi rimangono poco studiati e la loro ecologia, soprattutto in ambienti controllati da molteplici variabili come quelli naturali, è tuttora sconosciuta. Lo studio della biodiversità delle comunità microbiche ha finora sofferto di carenze metodologiche costituendo pertanto un campo intrigante ma, di fatto, ancora troppo teorico.

La difficoltà principale risiede nell'impossibilità di studiare le interazioni fra microrganismi *in situ*, nel loro ambiente naturale. Individuare chi fa cosa, dove, in che modo e con chi, è ancora molto difficile a livello microbico, mentre nell'ecologia applicata agli organismi superiori sono stati fatti grandi passi avanti.

Nello studio della microbiologia del suolo, i problemi metodologici sono amplificati dalla natura eterogenea del mezzo. Il suolo, infatti, è costituito da più fasi; gli strumenti in nostro possesso per l'isolamento e lo studio dei microrganismi talvolta sono inadeguati di fronte a tanta variabilità.

* L'approfondimento delle problematiche relative a questo lavoro è stato reso possibile grazie al Contributo COST-831, Working Group 2 - Management of Microbial Resources to Sustain and Improve Soil Function.

Gran parte del lavoro nel campo della microbiologia del suolo è stato diretto finora allo studio dei processi microbiologici più che degli stessi microrganismi. Misure della respirazione, delle attività enzimatiche, della mineralizzazione dell'azoto sono oggi condotte di *routine* allo scopo di caratterizzare la struttura e la composizione delle comunità microbiche. Si tratta di misure che restituiscono la somma delle reazioni che avvengono a seguito dell'interazione delle popolazioni microbiche fra loro, e con il substrato. La definizione di tali interazioni, sia quantitativamente, sia qualitativamente permette talvolta di fornire indicazioni sul funzionamento della comunità microbica nel suo complesso. Lo studio dell'attività microbica da sola non permette però di evidenziare la complessità e la biodiversità delle comunità, né fornisce indicazioni sulla composizione dei gruppi funzionali. Nell'ultimo decennio, lo studio delle comunità microbiche ha subito un forte impulso grazie alle acquisizioni nel campo delle tecniche di biologia molecolare e di biochimica. Approcci strutturali moderni quali l'analisi degli acidi grassi di membrana (*phospholipid fatty acid analysis* - PLFA) o l'analisi del DNA estratti direttamente dal suolo forniscono indicazioni sulla struttura delle comunità microbiche e sulla loro complessità. Di fatto comunque nessuna tecnica disponibile oggi riassume in se tutti i requisiti necessari alla definizione simultanea delle caratteristiche strutturali e funzionali delle comunità microbiche. Sia la PLFA che le diverse tecniche di biologia molecolare non permettono di associare la presenza di particolari gruppi di microrganismi alla loro attività né al loro ruolo funzionale. Paradossalmente le tecniche classiche di microbiologia e di tassonomia dei microrganismi, fatte di isolamenti e di inoculi su substrati colturali rimangono fra le più informative dal momento che permettono da un lato di isolare l'organismo e dall'altro di verificarne le attitudini metaboliche. Lavori di base di tassonomia numerica in cui le comunità microbiche del suolo sono analizzate secondo raggruppamenti tassonomici fondati a loro volta sulle caratteristiche nutrizionali sono stati condotti soprattutto fra gli anni '40 e '60 (Goodfellow, 1969). Trattandosi però di procedimenti lunghi e laboriosi, hanno finito per lasciare il passo, nella microbiologia del suolo, alle tecniche di tipo fisiologico in cui, come già accennato, più che conoscere le specie presenti è d'interesse valutarne l'attività complessiva.

La ricerca nel campo della sistematica microbica è in ogni caso proseguita nella messa a punto di metodi più rapidi ed univoci e già dagli anni '70, principalmente ad uso biomedico, esistevano in commercio *kit* per il riconoscimento di batteri patogeni basati sulle specifiche attitudini nei confronti di vari substrati selettivi.

Le specie di batteri chemoeterotrofi, infatti, differiscono nel ti-

po di substrato organico che possono utilizzare come fonte d'energia e di carbonio per la loro crescita. Le differenze sostanziali della capacità biodegradativa nei confronti di sostanze specifiche e le "richieste" metaboliche delle colture pure sono, infatti, in molti casi sufficienti per identificare le specie microbiche (e talvolta fungine) o persino i diversi ceppi di una stessa specie.

L'"impronta" metabolica

Un ulteriore passo avanti nella messa a punto di sistemi rapidi di identificazione dei microrganismi sulla base del loro profilo metabolico è stato fatto grazie all'intuizione di Bochner (1989) che per primo ha suggerito di accoppiare l'uso dei substrati da parte dei microrganismi alla presenza di un indicatore redox in grado di segnalare visivamente l'attività respiratoria. I sali di tetrazolio, in particolare, possono essere utilizzati come indicatori colorimetrici dell'attività respiratoria a livello cellulare. L'ossidazione biologica di un substrato organico da parte di un microrganismo origina NADH ridotto; se gli elettroni sono donati ad una catena di trasporto, il sale di tetrazolio può funzionare come accettore finale artificiale, riducendosi e formando un prodotto colorato, il formazano. Quest'ultimo, oltre ad essere visibile, è insolubile e pertanto precipita all'interno delle cellule formando talvolta anche cristalli nel mezzo di coltura. Esistono diverse tipologie di coloranti ai sali di tetrazolio, che differiscono nel valore medio del potenziale d'ossidoriduzione e, di conseguenza, nella maggiore o minore facilità d'uso nei saggi biochimici.

La ditta Biolog Inc. di Hayward (CA - USA) ha ulteriormente velocizzato i saggi metabolici per l'identificazione dei microrganismi mettendo a punto un sistema basato su piastre contenenti fino a 95 differenti substrati organici. Questi sono contenuti in forma liofilizzata in altrettanti pozzetti, assieme all'indicatore violetto di tetrazolio. Le piastre utilizzate sono rettangolari, in plastica trasparente e possiedono 96 pozzetti a fondo piatto organizzati in 8 file da 12 (numerazione da A ad H e quindi da 1 a 12). Il pozzetto in alto a sinistra (con coordinate A-1) per convenzione è utilizzato come bianco e contiene solo il colorante, senza substrati organici. Aggiungendo in ogni pozzetto la medesima quantità di inoculo microbico, a densità nota, il substrato si reidrata ed il pozzetto, in presenza di attività metabolica del microrganismo, si colora di viola con un'intensità teoricamente proporzionale all'utilizzo del substrato stesso. La lettura della piastra colorata può essere fatta "manualmente", indicando semplicemente la presenza/assenza di colorazione, oppure tramite un densitometro per piastre a 96 poz-

zetti in grado di leggere alla lunghezza d'onda di 590 nm (specifica per il tipo di colorazione del sale di tetrazolio utilizzato).

Il sistema della Biolog Inc. è stato inizialmente messo a punto per facilitare l'identificazione di colture pure di microrganismi Gram negativi d'importanza clinica. Pertanto le prime piastre confezionate e commercializzate sono state realizzate utilizzando 95 substrati organici, scelti fra una gamma iniziale di 500, e saggiati su circa 6000 differenti ceppi microbici (Bochner, 1989). Ad ogni specie o ceppo di microrganismo corrisponde un profilo metabolico (o profilo di utilizzo dei substrati). La somiglianza o l'equivalenza del profilo ottenuto, con i profili registrati in un *data-base* della Biolog Inc., permette di risalire al genere o, nella migliore delle ipotesi, alla specie del microrganismo isolato. Il *data-base*, che come accennato comprendeva inizialmente esclusivamente specie d'interesse biomedico o alimentare, viene di anno in anno aggiornato sulla base delle richieste del mercato e delle acquisizioni nel campo della tassonomia microbica.

Alle piastre per Gram-negativi, si sono aggiunte piastre specifiche per il riconoscimento di Gram-positivi e piastre contenenti solo il colorante, senza i substrati (piastre MT), in modo che l'utente possa sperimentare substrati in combinazioni differenti da quelle previste dalla ditta produttrice. Le piastre GN e GP differiscono in 32 substrati sui 95 contenuti, mentre i restanti 62 sono comuni ad entrambe. Nella tabella 1 sono riportati i substrati presenti nelle piastre GN e GP, suddivisi per gruppi chimici (carboidrati, acidi carbossilici, polimeri, ammine e ammidi, aminoacidi, restante miscellanea).

La Biolog Inc. assieme alle piastre fornisce una serie di raccomandazioni per il loro utilizzo ai fini diagnostici. Non seguendo la procedura indicata, l'uso del *data-base* potrebbe essere vanificato. Si tratta soprattutto d'indicazioni relative alla preparazione dell'inoculo ed alla sua densità, dalla quale chiaramente può dipendere la velocità di consumo dei substrati ed il raggiungimento della colorazione ottimale dei pozzetti.

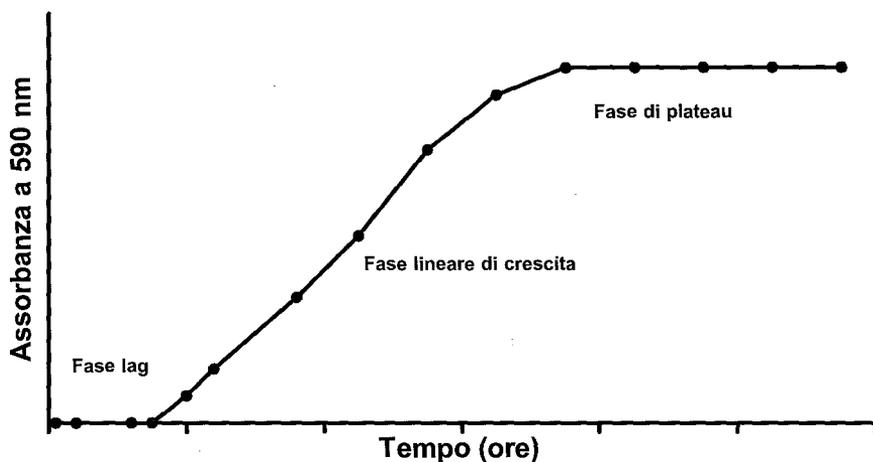
Il *data-base* è stato, infatti, costruito in funzione di "pattern" metabolici ottenuti secondo un procedimento standardizzato per il quale a) le cellule batteriche inoculate devono essere metabolicamente attive, e pertanto preventivamente coltivate su un mezzo di coltura arricchito; b) la densità dell'inoculo deve essere rigorosamente di $2-3 \times 10^8$ cellule ml^{-1} ; c) il volume di sospensione cellulare inoculato in ogni pozzetto deve essere di 150 μl ; d) la lettura della piastra, ai fini del confronto con il *data-base*, va effettuata dopo 4-24 ore d'incubazione.

Tabella 1 - Substrati inclusi nelle piastre Gram (-) e Gram (+) della Biolog, raggruppate per classi di composti in ordine alfabetico

<i>Carboidrati</i>	<i>Acidi carbossilici</i>	<i>Aminoacidi</i>
aldonitolo	acido acetico	D,L-carnitina
α -D-galattoside	acido α -idrossibutirrico	D-alanina
α -D-glucosio	acido α -chetobutirrico	D-serina
α -D-lattosio	acido α -chetoglutarico	acido γ -amminobutirrico
α -metil-D-glucoside	acido α -chetovalerico	acido glicil-L-aspartico
α -metil-D-mannoside	acido β -idrossibutirrico	acido glicil-L-glutammino
arbutina	acido cis-aconitico	Idrossi-L-prolina
β -metil-D-galattoside	acido citrico	L-alanina
β -metil-D-glucoside	acido D,L-lattico	L-alanil-glicina
cellobiosio	lattone acido D-galattunico	L-asparagina
D-arabitololo	acido D-galatturonico	acido L-aspartico
D-fruttosio	acido D-gluconico	acido L-glutammino
D-galattosio	acido D-glucosamminico	L-istidina
D-mannitolo	acido D-glucuronico	L-leucina
D-mannosio	acido D-malico	L-ornitina
D-melezitosio	acido D-saccarico	L-fenilalanina
D-meliobiosio	acido formico	L-prolina
D-raffiniosio	acido g-idrossi-butirrico	acido L-piroglutammino
D-ribosio	acido itaconico	L-serina
D-psicosio	acido L-lattico	L-treonina
D-sorbitolo	acido L-malico	
D-tagatosio	acido malonico	<i>Miscellanea</i>
D-trealosio	acido N-acetil-D-glutammino	2-deossiadenosina
D-xylosio	acido p-idrossi-fenilacetico	2,3-butanediolo
Gentobiosio	acido propionico acido piruvico	adenosina
i-eritritolo	acido chinico	adenosina-5-monofosfato
L-arabinosio	acido sebacico	amigdalina
L-fucosio	acido succinico	acido bromosuccinico
L-ramnosio		D,L- α -glicerolfosfato
lattulosio	<i>Polimeri</i>	estere metilico acido D-lattico
m-inositolo	α -ciclodestrina	fruttosio-6-fosfato
maltosio	β -ciclodestrina	glucosio-1-fosfato
maltotriosio	destrina	glucosio-6-fosfato
mannano	glicogeno	glicerolo
3-metil glucosio	inulina	inosina
metil piruvato	tween 40	salicina
mono-etil piruvato	tween 80	timidaina
mono-metil succinato		timidina-5-monofosfato
N-acetil-D-galattosammina	<i>Ammine/ammidi</i>	uridina
N-acetil-D-glucosammina	2-ammino-etanolo	uridina-5-monofosfato
N-acetil-D-manosammina	alaninammide	acido urocanico
palatinosio	glucuronammide	
sedoeptulosano	lactammide	
stachiosio	fenil-etilammina	
saccarosio	putrescina	
turanosio	acido succinammico	
xilitolo		

Il colore nei pozzetti si sviluppa sia per l'attività metabolica delle cellule inoculate, che per divisione cellulare. Se la sospensione cellulare utilizzata non possiede una densità sufficiente e l'inoculo contiene pertanto un numero di cellule minore di 10^8 per ml, il colore non si svilupperà nei tempi definiti dal protocollo, ma impiegherà più tempo in funzione della velocità di crescita della popolazione microbica e dell'accumulo di formazano nel mezzo. Per un inoculo poco denso si osserva quindi una cinetica di colorazione dei pozzetti (intensità della colorazione del pozzetto in funzione del tempo d'incubazione) con andamento sigmoidale (Figura 1). Una fase "lag" iniziale in cui le cellule si moltiplicano; una fase lineare di crescita, in cui il microrganismo utilizza i substrati organici con un'efficienza specifica per ogni substrato; un "plateau" che rappresenta il livello massimo di colorazione del pozzetto ed è funzione del substrato e del microrganismo considerati.

Figura 1. Diagramma schematico della curva di colorazione dei pozzetti in funzione del tempo



Il "plateau" è raggiunto pertanto quando il substrato è totalmente consumato dalle cellule microbiche: l'efficienza metabolica della specie microbica nei confronti del substrato determina il maggiore o minore sviluppo di colore nel pozzetto. La fase "lag" ha una durata che dipende dalla densità iniziale dell'inoculo e dalla velocità con cui le cellule si moltiplicano nel pozzetto.

Se la sostanza organica contenuta nel pozzetto invece non può essere utilizzata come fonte di carbonio dalle cellule microbiche, il pozzetto non si colora (il tetrazolio incolore non viene ridotto a formazano violetto). Il pozzetto di controllo, come accennato non contiene fonti di carbonio, ma contiene il colorante tetrazolio.

Una piastra inoculata ed incubata in modo appropriato mostra una "impronta respiratoria" dello specifico microrganismo isolato, di cui è quindi possibile individuare le attitudini metaboliche nei confronti dei 95 substrati selezionati.

Il data-base della Biolog Inc., semplificando al massimo, consiste in una "libreria" di queste "impronte respiratorie" per ceppi di microrganismi noti, ed in un algoritmo che permette di stimare la similarità dell'impronta ottenuta sperimentalmente con tutte le impronte della libreria. Il computer, cioè, restituisce la similarità metabolica del microrganismo selezionato con quella teorica di una o più specie comprese nella "libreria".

La Biolog Inc. attualmente commercializza separatamente data base per organismi Gram (-), Gram (+), anaerobi e lieviti. Inoltre il programma che permette di gestire i data base dà anche la possibilità di creare una "libreria" personale di "impronte respiratorie" ottenute da ceppi che non vengono identificati dal sistema. In questo modo è possibile affiancare ad una collezione di microrganismi in via di definizione, una libreria contenente le informazioni necessarie ad individuare, ad esempio, corrispondenze fra specie non ancora identificate o fra ecotipi d'interesse ambientale.

Dal 1989 (data di pubblicazione del lavoro di Bochner) ad oggi, l'utilizzo del sistema BiologTM per l'identificazione e lo studio di microrganismi da ambienti naturali (acque, suolo, rizosfera, fillosfera, etc.) è andato aumentando. Nel 1998 Konopka *et al.* hanno pubblicato un rendiconto esaustivo sulle ricerche realizzate nel campo ambientale e dell'ecologia microbica e basate sull'uso del SUP (*Substrate Utilization Pattern*) per la caratterizzazione dei singoli ceppi microbici. Konopka *et al.* (1998) riportano anche il tasso d'identificazione dei *data-base* BiologTM nei confronti di ceppi microbici isolati da matrici ambientali o da piante ed animali. Secondo lo studio, più del 70%, ma meno del 100% delle specie è stato riconosciuto sulla base del SUP. L'efficienza del sistema finora sembra ad ogni modo superiore nei confronti di ceppi microbici d'importanza clinica (es. Gram negativi patogeni, tasso d'identificazione del 76-98%). Gli isolati provenienti da matrici ambientali (es. acqua e suolo) presentano invece un tasso d'identificazione relativamente basso (47-70%). Come accennato, in mancanza d'identificazione è comunque possibile ottenere un valore di "affinità" con le specie ed i ceppi compresi nel *data-base*. A tale proposito, va comunque detto che si osservano talvolta delle incongruenze, come ad esempio un valore di affinità fra specie appartenenti a generi differenti maggiore che fra specie appartenenti allo stesso genere. Si tratta comunque di casi in cui la discriminante fra un genere e l'altro è costituita dall'utilizzo o meno di un numero molto esiguo di substrati. Ciò suggerisce comunque la necessità di una cer-

ta cautela nella costruzione di *cluster* e nell'uso degli indici di similarità con i dati forniti dal sistema.

L'analisi del profilo fisiologico delle comunità microbiche

Un passo avanti nell'applicazione delle piastre BiologTM in campo ecologico è stato fatto nel 1991, quando Garland e Mills (1991) hanno pubblicato un lavoro in cui le comunità microbiche del suolo sono state studiate e caratterizzate sulla base della loro "impronta metabolica" complessiva. L'intuizione è consistita nell'inoculare, nelle piastre contenenti i 95 substrati, non più un ceppo puro, preventivamente isolato e coltivato, bensì un estratto ottenuto direttamente dalla matrice ambientale (nel caso specifico, il suolo) e contenente pertanto più specie di microrganismi in forma di spore, cellule vitali, cellule resistenti, etc. Il risultato della colorazione della piastra BiologTM, in questo caso, rappresenta l'attività metabolica dell'insieme di microrganismi presenti nell'estratto ed in grado di crescere nelle condizioni stabilite dall'esperimento (substrati, temperatura, tempi d'incubazione, densità dell'inoculo, competizione nel pozzetto, etc.). In ogni pozzetto vengono cioè inoculati microrganismi che, almeno teoricamente, dovrebbero essere rappresentativi della comunità microbica presente nella matrice naturale. Pertanto, su ciascun substrato puro, si sviluppano una o più specie di microrganismi in grado di utilizzare quell'unica fonte di carbonio presente. La colorazione di ciascun pozzetto è quindi il frutto dell'attività metabolica di un "campione" della comunità presente nella matrice naturale. I pozzetti non colorati indicano l'assenza, nel campione e, presumibilmente, nella comunità, di specie in grado di utilizzare quel particolare substrato. Anche in questo caso, al pari di quanto si osserva per l'uso di sospensioni di cellule microbiche monospecifiche, la densità dell'inoculo ha un'enorme importanza nel definire la velocità e la cinetica di colorazione dei pozzetti. In ogni pozzetto, inoltre, si innescano fenomeni di competizione per il substrato fra microrganismi caratterizzati da velocità di crescita differenti. Soprattutto nei pozzetti contenenti substrati utilizzabili da un'ampia gamma di microrganismi il colore si sviluppa molto rapidamente, mentre per i substrati di difficile degradazione, i tempi di colorazione possono essere più lunghi in quanto determinati dalla crescita di microrganismi con un metabolismo specifico ma più lento. A tale proposito va sottolineato come gli studi di ecologia microbica e le osservazioni fatte sui meccanismi di competizione per lo spazio ed il substrato nelle piastre Petri, da sempre utilizzate in microbiologia, valgono in una certa misura anche per i pozzetti delle piastre BiologTM. I micror-

ganismi caratterizzati da una strategia di sviluppo di tipo "r", e pertanto aggressivi e veloci nella colonizzazione del substrato, sono quelli che determinano nella maggior parte dei casi l'impronta metabolica della comunità studiata. La presenza dei microrganismi k selezionati, spesso dotati di enzimi specifici per substrati rari ma caratterizzati da una scarsa competitività ed una crescita lenta, possono contribuire alla colorazione dei pozzetti della piastra solo in tempi lunghi ed in assenza di specie r. Come già riportato dallo stesso Garland (1997) la colorazione di ciascun pozzetto di fatto è il risultato di un'attività integrata di più microrganismi tale da poter rappresentare sia una situazione di tipo cooperativo sia di tipo competitivo. Da queste brevi considerazioni è facile comprendere come, l'utilizzo dell'impronta metabolica per lo studio delle comunità microbiche naturali, abbia dei grossi limiti che coincidono in buona parte con le osservazioni da sempre indirizzate contro i metodi classici di microbiologia del suolo. E' stato stimato (Kennedy e Gewin, 1997) che solo l'1-5% dei microrganismi esistenti al mondo siano stati finora isolati e classificati e che meno dell'1% dei microrganismi del suolo possano crescere sui substrati artificiali finora messi a punto. Da uno studio di Torsvik *et al.* (1990) in cui sono state utilizzate tecniche molecolari per lo studio della biodiversità dei suoli è emerso che la diversità complessiva delle comunità microbiche è di almeno 200 volte maggiore di quella evidenziabile attraverso le classiche tecniche di isolamento su piastra. Ciò a conferma di come le condizioni colturali rappresentino un sistema molto selettivo che discrimina, indipendentemente dalla composizione del mezzo utilizzato, la frazione di microrganismi che, per motivi probabilmente diversi, non crescono al di fuori del proprio ambiente naturale. Ogni pozzetto delle piastre BiologTM presenta inoltre un ulteriore fattore selettivo dato dalla presenza di una sola fonte di carbonio. Appare evidente, quindi, che l'impronta metabolica che emerge in una piastra BiologTM per un dato suolo rappresenti solo una piccola parte della diversità funzionale della comunità microbica presente in natura.

L'uso dell'analisi del profilo metabolico per la caratterizzazione, su base funzionale, delle comunità microbiche del suolo o d'altre matrici ambientali si basa comunque sull'assunto che le differenze riscontrabili nell'impronta lasciata dalle cellule microbiche sulle piastre BiologTM in forma di ossidazioni differenziali dei substrati, rispecchino differenze reali nel numero o nelle specie presenti nell'inoculo e nella matrice da cui esso è stato ottenuto.

Molte e complesse sono le critiche concettuali che tale assunto richiama; la comunità scientifica si è infatti variamente interrogata sui problemi che nascono nell'accettare la corrispondenza fra risposta metabolica

nelle piastre e funzionalità reale delle comunità microbiche studiate. Alcuni autori sono andati oltre il commento negativo a priori ed hanno condotto studi analitici per rispondere metodicamente alle questioni concettuali e procedurali sollevate.

Winding (1994) e Garland (1996) hanno osservato che le differenze riscontrate nella risposta metabolica fra un campione e l'altro non sono necessariamente imputabili alla struttura delle comunità microbiche. Una forte correlazione è stata rilevata, come già accennato, fra la densità cellulare dell'inoculo e la velocità di colorazione dei pozzetti. Gli stessi autori hanno inoltre fatto notare come non sia possibile verificare se tutti i membri della comunità microbica capaci di crescere su un dato substrato contribuiscono o meno equamente alla colorazione della piastra, o se la colorazione sia il risultato della crescita e dell'attività di un piccolo gruppo o di una singola specie della comunità.

Haack *et al.* (1995) hanno utilizzato singoli isolati batterici, comunità-modello composte da percentuali note di pochi ceppi noti e comunità batteriche naturali, direttamente estratte da matrici ambientali, per rispondere ad alcune domande fondamentali:

- se esista una relazione fra la crescita microbica nei pozzetti durante l'incubazione di una piastra multisubstrato, e l'ossidazione del substrato;
- quale sia l'influenza della densità dell'inoculo sulla rapidità di ossidazione dei substrati;
- se la velocità ed il grado di ossidazione di un substrato sia o meno riproducibile ad una definita densità di inoculo;
- se il profilo metabolico che si ottiene per ossidazione differenziale dei substrati nei pozzetti della piastra sia o meno riproducibile.

Gli autori hanno utilizzato a tale scopo due comunità microbiche modello di cui conoscevano la composizione tassonomica ed i profili metabolici delle singole specie componenti. Dallo studio effettuato Haack *et al.* (1995) hanno accertato che:

- il profilo metabolico di ciascuna comunità microbica è univoco e, per una definita densità di inoculo, ripetibile;
- la crescita microbica nei pozzetti non è correlata né alla velocità né all'intensità della colorazione, in compenso, per una data densità di inoculo, sia la velocità sia l'intensità della colorazione sono parametri riproducibili;
- la velocità e l'intensità della colorazione di ciascun pozzetto da parte di una comunità microbica non sono la somma delle singole risposte delle

specie microbiche che la costituiscono; la risposta infatti non è additiva per la comunità;

- il grado di ossidazione dei substrati non è funzione del numero di specie microbiche in grado di utilizzare quel substrato;
- i pozzetti che non si colorano nemmeno dopo lunghi periodi di incubazione sono molto informativi poiché stanno ad indicare l'assenza, nella comunità in esame, di ceppi microbici in grado di utilizzare i relativi substrati;
- data la costanza dei profili per un dato inoculo ed una data densità di inoculo, la mancanza di ripetibilità fra le repliche (inoculi ottenuti con estrazioni da campioni distinti della medesima matrice ambientale) indica una eterogeneità spaziale della comunità microbica.

Nonostante i limiti finora evidenziati, la tecnica dell'analisi dell'impronta metabolica di comunità, sempre più spesso indicata come CLPP (*Community Level Physiological Profile*) (Insam e Rangger, eds 1997), rimane uno strumento d'indagine in grado di fornire informazioni interessanti che, come evidenziato da Haack *et al.* (1995) permettono di fare luce su alcuni aspetti particolari delle comunità microbiche del suolo. Si tratta cioè di un metodo d'indagine rapido ed in alcuni casi efficace, soprattutto se affiancato da strumenti statistici e matematici adatti alla gestione dell'imponente mole di informazioni ottenibili. Le possibilità d'impiego e gli interrogativi ancora aperti sul significato dei risultati ottenibili fanno del CLPP una nicchia stimolante da esplorare.

Bibliografia

- BOCHNER B. (1989). "Breathprints" at the microbial level. *ASM News* 55: 536-539.
- GARLAND J.L. (1996). Analytical approaches to the characterisation of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biol Biochem.* 28: 213-221.
- GARLAND J.L. (1997). Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbial Ecology* 24: 289-300.
- GARLAND J.L., MILLS A.L. (1991). Classification and Characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 2351-2359.
- GOODFELLOW M. (1969). Numerical taxonomy of some heterotrophic bacteria isolated from a pine forest soil, pp. 83-105. In: *The soil ecosystem. Systematic aspects of the environment, organisms and communities.* Sheals J.G. (ed.) The Systematic Association Publication N° 8. British Museum (Natural History), London.
- HAACK S.K., GARCHOW H., KLUG M.J., FORNEY L.J. (1995). Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Appl.*

Environ. Microbiol. 61: 1458-1468.

- INSAM H, RANGGER A. (eds) (1997). *Microbial Communities. Functional Versus Structural Approaches*. Springer, Heidelberg, 261 pp.
- KENNEDY A.C, GEWIN V.L. (1997). Soil microbial diversity: present and future considerations. *Soil Science*, 162: 607-617.
- KONOPKA A., OLIVER L., TURCO R.F. Jr. (1998). The use of Carbon Substrate Utilization Patterns in Environmental and Ecological Microbiology. *Microbial Ecology*, 35: 103-115.
- TORSVIK V., GOKSOYR J., DAAE F.L., (1990). High diversity in DNA soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 782-787.
- WINDING A. (1994). Fingerprinting bacterial soil communities using BIOLOG microtitre plates, p. 85-94. In: Ritz K., Dighton J., Giller K.E. (eds) *Beyond the biomass: compositional and functional analysis of soil microbial communities*. John Wiley & Sons Ltd., UK.

ANALISI DELLE COMUNITÀ MICROBICHE PER LA CARATTERIZZAZIONE DEL GRADO DI MATURITÀ DEI COMPOST

Claudio Mondini

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Sezione di Gorizia, Via Trieste 23 - 34170 Gorizia

Riassunto

La metodica basata sulla capacità dei microorganismi di utilizzare differenti composti del carbonio (Biolog Community-Level Physiological Profiles – Biolog CLPP) potrebbe essere impiegata per ottenere informazioni utili per caratterizzare il processo di compostaggio e per valutare il livello di maturità dei compost, ma è stata fino ad ora poco utilizzata, probabilmente per la mancanza di una metodologia standardizzata. Il maggiore problema metodologico è legato al fatto che lo sviluppo del colore è un processo non lineare che dipende sia dal tempo che dalla densità dell'inoculo, mentre l'interpretazione dei dati si basa, in genere, su valori di densità ottica, riferiti ad uno specifico momento dell'incubazione. Scopo del presente lavoro era quello di verificare se i risultati di un nuovo approccio di interpretazione dei dati, basato sulla cinetica di sviluppo del colore, non dipendessero dalla diluizione degli estratti. Inoltre è stato indagato l'effetto del modo di conservazione dei campioni.

Campioni di compost con diverso livello di maturità, conservati sia essiccati all'aria che congelati, sono stati estratti in triplo con una procedura di estrazione sequenziale utilizzando ac. colico e tris buffer. Gli estratti sono stati diluiti in 4 differenti diluizioni (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5) ed inoculati su piastre Biolog Ecoplate che sono state incubate a 30 °C al buio. La formazione del colore è stata misurata a 592 nm ogni 8 ore per una settimana. I parametri generati da un modello che approssima la cinetica di formazione del colore sono stati sottoposti ad analisi dei componenti principali considerando i dati provenienti dalle diverse diluizioni sia separatamente che congiuntamente.

L'analisi dei dati ha mostrato che utilizzando i parametri cinetici si sono ottenute delle buone separazioni tra campioni di compost caratterizzati da

diverso livello di maturità, anche se i risultati non sono stati costanti per quanto riguarda le diverse diluizioni e i parametri considerati. In ogni caso, con tutte le diluizioni e i parametri considerati, i campioni finali dei processi sono risultati sempre ben separati dai campioni con minore età. Tra i substrati maggiormente responsabili per la separazione sono risultati fenilalanina, treonina e fenietilamina. Considerando nell'analisi tutte le diluizioni congiuntamente i campioni sono risultati chiaramente ordinati secondo il fattore di diluizione. L'applicazione dell'approccio cinetico, nelle condizioni del presente lavoro, non risolve il problema della densità dell'inoculo, ma in ogni caso ha il vantaggio di evitare i problemi di discrezionalità legati alla scelta del momento per l'analisi. I risultati mostrano inoltre l'effetto della modalità di conservazione dei campioni sulle capacità cataboliche dei microrganismi. Poiché i compost presenti sul mercato sono di solito caratterizzati da un basso tenore di umidità, lo studio delle variazioni delle capacità dei microrganismi di utilizzare diversi composti del carbonio in campioni di compost conservati e freschi appare come un campo di indagine di notevole valenza non solo scientifica ma anche applicativa.

Introduzione

Il compostaggio è un processo biossidativo controllato caratterizzato da una successione di diverse popolazioni microbiche. Lo studio della composizione e della dinamica di queste popolazioni potrebbe essere impiegato per ottenere informazioni utili per caratterizzare il processo e per valutare il livello di maturità del compost. Tra le metodologie esistenti per lo studio della composizione delle popolazioni microbiche, quella basata sulla capacità dei microrganismi di utilizzare differenti composti del carbonio (Biolog Community-Level Physiological Profiles-Biolog CLPP) è stata ampiamente e con successo applicata a diversi habitat (sedimenti, suolo). Diversi autori vedono in questa tecnica un grande potenziale per la definizione del livello di maturità dei compost, data la sua sensibilità, facilità d'utilizzo e velocità. Tuttavia le applicazioni dei CLPP ai compost non sono state fino ad ora molto numerose (Insam *et al.*, 1996; Laine *et al.*, 1997; Carpenter-Boggs *et al.*, 1998), probabilmente perché i vantaggi della metodica sono controbilanciati dalla mancanza di una metodologia standardizzata. Tra gli aspetti metodologici dei CLPP non ancora definitivi sono la scelta dei substrati più adatti, le modalità di lettura e l'interpretazione dei dati. Inoltre, vi sono altri problemi specifici legati alle matrici organiche utilizzate e al processo di compostaggio quali: i veloci cambiamenti delle caratteristiche fisi-

co-chimiche e biologiche, l'elevata eterogeneità spaziale, la colorazione degli estratti, l'alto contenuto di sostanza organica e gli aspetti legati al corretto campionamento e alla modalità di conservazione dei campioni (Insam *et al.*, 1998). Tuttavia, il maggiore problema che condiziona l'interpretazione dei risultati ottenuti mediante i CLPP è che lo sviluppo del colore è un processo non lineare che dipende sia dal tempo che dalla densità dell'inoculo. Diversi approcci sono stati proposti per superare questa difficoltà. La standardizzazione della densità iniziale dell'inoculo mediante tecniche di conta microbica è normalmente utilizzata (Garland e Mill, 1991), ma risulta lunga e laboriosa. Inoltre la validità della conta microbica ai fini delle analisi delle comunità microbiche è discutibile in quanto non vi è correlazione con il numero di cellule coltivabili *in vitro*. Altri autori hanno invece proposto dei trattamenti dei dati in modo tale che i risultati siano indipendenti dalla concentrazione dell'inoculo iniziale. Un approccio prevede di utilizzare nell'analisi i valori della densità ottica di ciascun substrato ad un dato tempo dall'inizio della incubazione (es. 72h, 96h). Questi valori sono normalizzati dividendoli per lo sviluppo di colore medio della piastra in quel determinato momento (Garland, 1996). Questa tecnica si è dimostrata valida per discriminare tra diversi campioni ambientali, ma il contributo del singolo substrato alla separazione dei diversi campioni dipende dal tempo scelto per l'analisi. Un altro approccio considera i valori di sviluppo di colore dei singoli substrati quando lo sviluppo di colore medio della piastra (Average Well Color Development - AWCD) è pari ad un determinato valore (es. AWCD 0.6, 1). Con questo approccio è stato dimostrato che il pattern di utilizzo dei substrati dipende dalla quantità di microorganismi presenti nel substrato, piuttosto che dalla loro diversità metabolica o ricchezza tassonomica (Lindstrom *et al.*, 1998). Recentemente è stato proposto un approccio che utilizza nelle analisi tre parametri generati da un modello che descrive la cinetica di formazione del colore (Lindstrom *et al.*, 1998). Gli autori hanno dimostrato che, utilizzando colture pure di microrganismi, due di questi parametri sono indipendenti dalla densità dell'inoculo iniziale.

Scopo del presente lavoro è quello di un approfondimento metodologico al fine di definire le condizioni ottimali per l'applicazione dei CLPP a campioni di compost con diverso grado di maturità. In particolare è stato studiato l'effetto della diluizione degli estratti sulla capacità di separazione di questa metodica utilizzando due diversi set di dati:

- valori di densità ottica ottenuti in uno specifico momento del periodo di incubazione;
- parametri cinetici generati da un modello che descrive la cinetica di sviluppo del colore.

Inoltre è stato anche indagato l'effetto del modo di conservazione dei campioni sulle capacità cataboliche dei microorganismi.

Materiali e metodi

Preparazione del compost, campionamento e conservazione

Nello studio sono stati utilizzati campioni provenienti dal compostaggio di due diverse miscele di residui organici. La prima miscela (compost RP) era costituita da residui della cardatura del cotone e di verde pubblico (1.1:1 v/v 1:1.5 p/p) che sono stati portati ad un contenuto di umidità del 65% e ad un rapporto C/N di circa 25 mediante una soluzione di urea. I materiali di partenza sono stati quindi sistemati in 3 contenitori forati di plastica (106 x 90 x 42 cm (profondità); 0.4 m³) posizionati all'aperto sotto una tettoia. Campioni di compost (circa 1 Kg) sono stati prelevati dopo 5, 19, 60 e 103 giorni dall'inizio del processo, corrispondenti rispettivamente alle fasi termofila, mesofila, di maturazione e finale del processo. I campioni sono stati conservati a -18°C per le successive analisi. Nel secondo processo di compostaggio (compost RV) residui della cardatura del cotone e della distillazione delle vinacce (semi, bucce e raspi) (0.83:1 v/v 0.20:1 p/p C/N 21.1) sono stati portati ad un contenuto di umidità del 65% mediante addizione di borlanda. La miscela è stata sistemata come sopra e i campioni sono stati prelevati dopo 7, 25, 45 e 88 giorni e conservati sia congelati (-18°C) che essiccati all'aria.

Durante i processi, particolare cura è stata riservata per assicurare adeguate aerazione ed umidità ai materiali, mediante rivoltamento manuale ed eventuale irrigazione.

Estrazione dei microrganismi e CLPP

I campioni prelevati sono stati estratti in triplo con una procedura di estrazione sequenziale modificata da Hopkins *et al.* (1991) utilizzando una soluzione di ac. colico (sale sodico) e Tris buffer (pH 7,4). Gli estratti sono stati diluiti in 4 differenti diluizioni (102, 103, 104, 105) ed inoculati (150µl) su piastre Biolog Ecoplate (Insam, 1997) contenenti 31 differenti composti di carbonio ed un controllo in 3 repliche, nutrienti e un indicatore redox. Le piastre sono state incubate a 30 °C al buio e la formazione del colore è stata misurata (592 nm) ogni 8 ore per una settimana con uno spettrofotometro (SLT, Groding, Austria).

Analisi statistiche

I dati grezzi di densità ottica sono stati corretti sottraendo il più piccolo valore di assorbanza della piastra. L'interpretazione del set corretto di dati è stata eseguita considerando diverse matrici di dati:

- analisi delle letture ad un certo tempo dell'incubazione (96 h). I dati corretti sono stati normalizzati dividendoli per lo sviluppo di colore medio della piastra (AWCD) in quel momento.

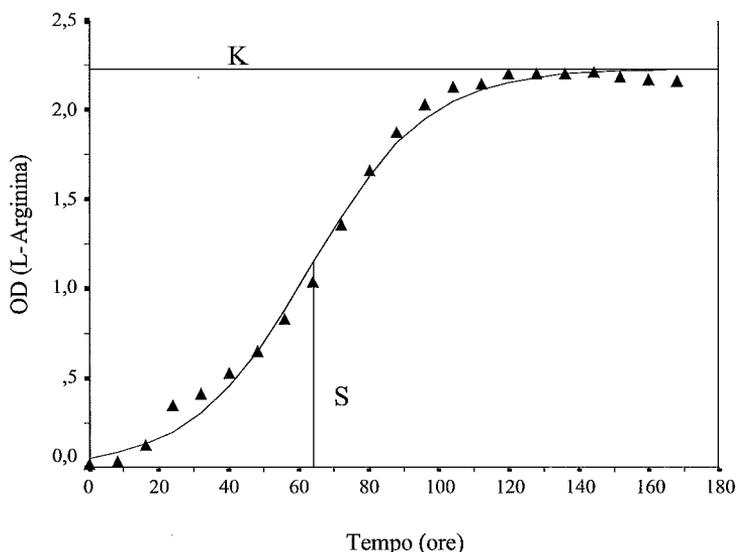
- analisi delle letture ad uno specifico AWCD (1,0).

- stima dei parametri del modello che approssima la cinetica di formazione del colore (Lindstrom *et al.*, 1998) di forma generale (Fig. 1):

Fig. 1. Modello della cinetica di formazione del colore per la L-arginina.

Il significato dei parametri è spiegato nel testo.

$$y = (2.23)/(1 + \exp(-0.06*(tempo-63.1)))$$



$$y = OD_{592} = K / (1 + e^{-r(t-s)})$$

dove:

K = asintoto che la densità ottica del pozzetto approssima

r = tasso esponenziale di cambiamento del colore

s = tempo necessario per raggiungere il punto medio del tratto esponenziale della curva (quando $y = K/2$)

t = tempo trascorso dalla inoculazione

I vari set di dati sono stati sottoposti ad analisi dei componenti principali (PCA) utilizzando SPPS (versione 9.0, SPSS Inc, Chicago, IL) considerando i dati provenienti dalle diverse diluizioni sia separatamente che congiuntamente.

Risultati e discussione

PCA delle letture ad un specifico punto dell'incubazione (96h e AWCD 1.0)

I dati ottenuti con la diluizione 10^5 non hanno portato in nessun caso a delle buone separazioni dei campioni di compost caratterizzati da diverso livello di maturità. Una eccessiva diluizione sembra portare ad una uniformazione delle capacità cataboliche dei microrganismi diminuendo od annullando il potere di separazione del metodo.

Nei campioni di compost RP diluiti 10^3 dopo 96 ore di incubazione c'è un chiaro ordinamento dei campioni caratterizzati da età crescente lungo il primo asse (varianza totale spiegata 34%), nonostante qualche sovrapposizione tra i campioni intermedi (mesofilo e maturazione). Risultati simili si ottengono con la diluizione 10^4 . La percentuale di varianza totale spiegata dal primo componente principale (PC1) è del 22%.

Per quanto riguarda il compost RV essiccato la migliore separazione lungo il primo componente principale è ottenuta con la diluizione 10^3 (varianza totale spiegata 28%) (Fig. 2). Con gli stessi campioni congelati, diluiti 10^3 e 10^4 c'è solo una chiara separazione, lungo il primo componente principale, dei campioni finali dai campioni con età minore.

Considerando le letture quando AWCD era uguale a 1 con il compost RP si ottiene una buona separazione con la diluizione 10^2 lungo il primo asse (Fig. 3) (PC1 30.7%) e con la diluizione 10^3 una chiara separazione dei campioni finali lungo il primo asse e dei campioni iniziali lungo il secondo asse (PC1 36%; PC2 19.8%)

Con gli estratti diluiti 1000 volte dei campioni del compost RV essiccati all'aria i campioni della fase termofila e finale sono chiaramente separati lungo il primo componente principale (varianza totale spiegata 35.9%), mentre nessuna separazione è stata ottenuta tra i campioni intermedi. Con gli stessi campioni conservati congelati non si è ottenuta nessuna separazione tra campioni di differente età per quanto riguarda la capacità catabolica dei microrganismi.

Fig. 2. Risultati dell'analisi dei componenti principali basata sui valori di densità ottica ottenuti dopo 96 ore dall'inoculazione di estratti del compost RV diluiti 10^3 . La percentuale di varianza spiegata da ogni asse dei componenti principali è riportata tra parentesi. I numeri (in questo e nei grafici successivi) si riferiscono alle diverse fasi del processo di compostaggio: 1 campione iniziale; 2 fase termofila; 3 fase mesofila; 4 fase di maturazione; 5 prodotto finale.

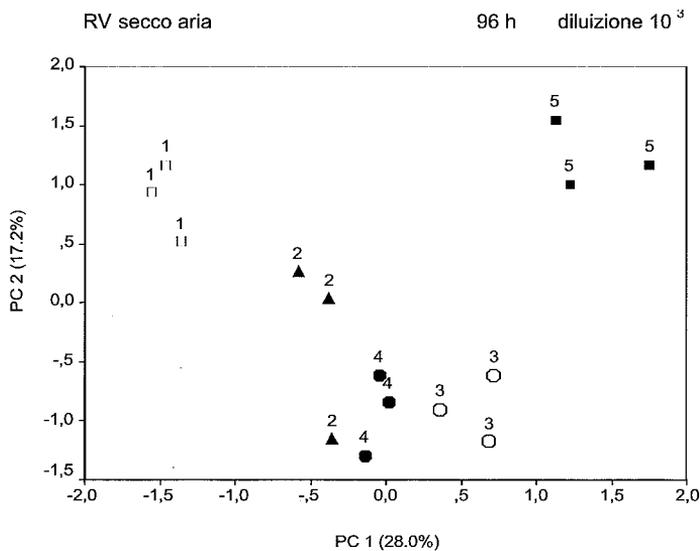
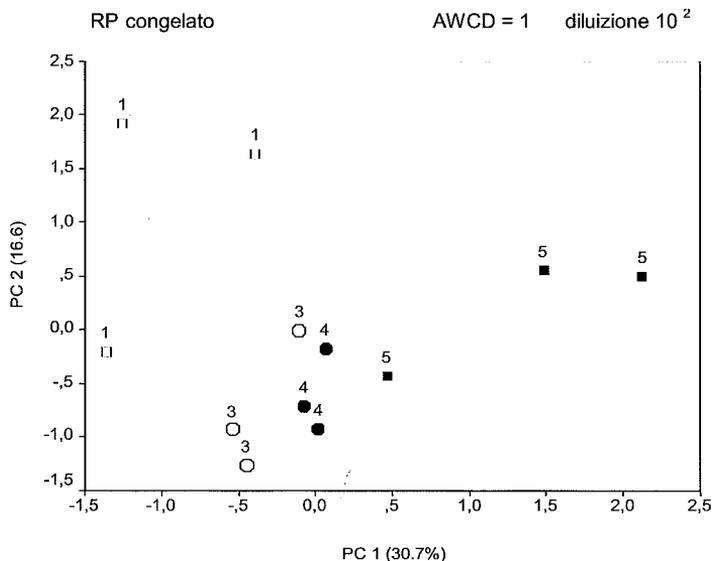
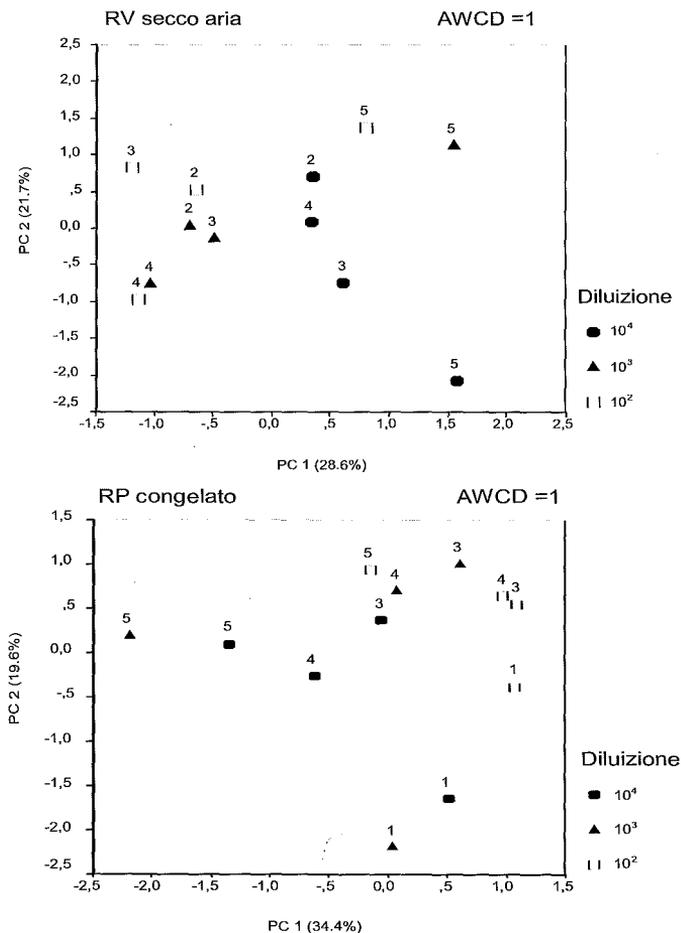


Fig. 3. Risultati dell'analisi dei componenti principali basata sui valori di densità ottica ottenuti da estratti del compost RP diluiti 10^2 quando lo sviluppo di colore medio della piastra (AWCD) era uguale a 1. La percentuale di varianza spiegata da ogni asse dei componenti principali è riportata tra parentesi.



I risultati delle analisi su valori di densità ottica relativi ad un specifico momento del periodo di incubazione (96h e AWCD 1) hanno evidenziato la potenzialità di questa tecnica per quanto riguarda la classificazione di campioni di compost con differente età. I risultati però dipendevano sia dal momento scelto per l'analisi che dalla diluizione iniziale dell'estratto. Infatti considerando congiuntamente nelle analisi i dati provenienti dalle differenti diluizioni non si ottiene nessun tipo di separazione né per quanto riguarda l'età dei campioni né per quanto riguarda il fattore di diluizione. A titolo di esempio nella Fig. 4 viene riportato il grafico relativo al compost RV quando AWCD = 1. Per il motivo sopra riportato i dati ottenuti dalla diluizione 10^5 sono stati esclusi da queste analisi.

Fig. 4. Risultati dell'analisi dei componenti principali basata sui valori di densità ottica ottenuti da estratti di campioni di compost RP, conservati secchi all'aria o congelati, quando lo sviluppo di colore medio della piastra (AWCD) era uguale a 1. La percentuale di varianza spiegata da ogni asse dei componenti principali è riportata tra parentesi.



PCA dei parametri cinetici

Anche con l'utilizzo dei parametri cinetici si sono ottenute delle buone separazioni tra campioni di compost caratterizzati da diverso livello di maturità, ma i risultati non sono costanti per quanto riguarda le diverse diluizioni e i parametri considerati.

Il parametro cinetico R, rappresentante il tasso esponenziale di formazione del colore, nelle condizioni del presente lavoro, non ha portato in nessun caso a delle buone separazioni.

Con i campioni del compost RP l'analisi dei componenti principali del parametro K evidenzia una buona separazione tra campioni con diversa età, ma senza un corretto ordinamento. Il parametro S con diluizione 10^2 evidenzia una buona separazione solo dei campioni termofili e finali.

Con il compost RV essiccato all'aria i migliori risultati sono stati ottenuti con le diluizioni 10^2 e 10^3 . In genere i campioni termofili e finali sono sempre chiaramente separati tra di loro e dai campioni intermedi. Per quanto riguarda questi ultimi si verificano situazioni di inversione rispetto all'ordinamento secondo l'età o di stesso punteggio rispetto al primo componente. Il congelamento dei campioni porta decisamente ad un peggioramento della separazione dei campioni. Anche in questo caso i risultati migliori sono stati riscontrati con la diluizione di 1000 volte.

L'analisi dei dati considerando congiuntamente i valori di assorbanza delle diverse diluizioni (esclusa la diluizione 10^5) è stata in grado, per quanto riguarda i parametri K ed S di differenziare tra di loro i campioni sia per quanto riguarda l'età del campione che per quanto concerne il fattore di diluizione. In genere le diverse diluizioni sono separate lungo il primo asse, mentre campioni con diverso livello di maturità sono separati lungo il secondo asse. Il fatto che i parametri cinetici non siano indipendenti dal fattore di diluizione conferma quanto trovato da Lindstrom *et al.*, (1999). I parametri cinetici sono indipendenti dal numero di cellule presenti in soluzione nel caso di singole specie, ma in presenza di diverse popolazioni, come nel caso degli estratti del compost, la diluizione modifica i rapporti esistenti tra i diversi microrganismi portando di conseguenza anche ad una diversa funzionalità. Un corretto ordinamento dei campioni secondo l'età in tutte e 3 le diluizioni considerate si ottiene per il parametro K nel compost RV conservato a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ e per il parametro S nel caso del compost RP. L'ordinamento dei campioni in base alla loro età indica una relazione di tipo lineare tra utilizzo di determinati substrati ed età del compost. Tra i substrati maggiormente responsabili per la separazione (elevato valore del coef-

ficiente di correlazione con il secondo componente principale) vi è la fenilalanina per quanto riguarda il parametro K e fenilalanina, treonina e fenietilamina per il parametro S.

In ogni caso con tutte le diluizioni e i parametri considerati i campioni finali di entrambi i processi sono sempre chiaramente separati dai campioni con minore età. Questo potrebbe indicare che le comunità microbiche dei compost maturi possiedono delle capacità di utilizzo dei composti del carbonio molto distinte da quelle caratterizzanti le comunità microbiche di compost non maturi.

L'applicazione dell'approccio cinetico non risolve il problema della densità dell'inoculo e ulteriore lavoro è necessario per risolvere questo problema metodologico. In ogni caso rispetto ai metodi basati sull'analisi dei dati riferiti ad uno specifico momento della incubazione questo approccio, oltre ad essere più corretto da un punto di vista teorico, ha il vantaggio di evitare i problemi di discrezionalità legati alla scelta del momento per l'analisi. Inoltre l'inclusione di diverse diluizioni può portare ulteriori informazioni riguardanti la composizione delle popolazioni microbiche. Infatti i contributi delle singole popolazioni all'utilizzo dei substrati di C sono alterati dalla diluizione ed è probabile che questi cambiamenti siano maggiori nelle comunità più complesse rispetto a quelle composte da poche popolazioni dominanti (Lindstrom *et al.*, 1999).

Per quanto riguarda le modalità di conservazione dei campioni, come era logico aspettarsi, queste modificano la risposta dei microrganismi. Nel caso delle analisi su dati provenienti da uno specifico momento dell'incubazione i risultati migliori, dal punto di vista della separazione dei campioni per gruppi di età, sono stati ottenuti con i campioni essiccati all'aria. Nel caso dei parametri cinetici, i risultati appaiono più contraddittori. Lo studio delle relazioni esistenti tra campioni di compost conservati e freschi per quanto riguarda le capacità dei microrganismi di utilizzare diversi composti del carbonio appare come un importante campo di indagine non solo dal punto di vista scientifico, ma anche pratico. Questo perché i compost presenti sul mercato sono di solito caratterizzati da un basso tenore di umidità. Sarebbe pertanto interessante indagare come il modo di conservazione modifichi le capacità cataboliche dei microrganismi e verificare se le condizioni di bassa umidità possano mascherare in certi casi un insoddisfacente livello di maturità.

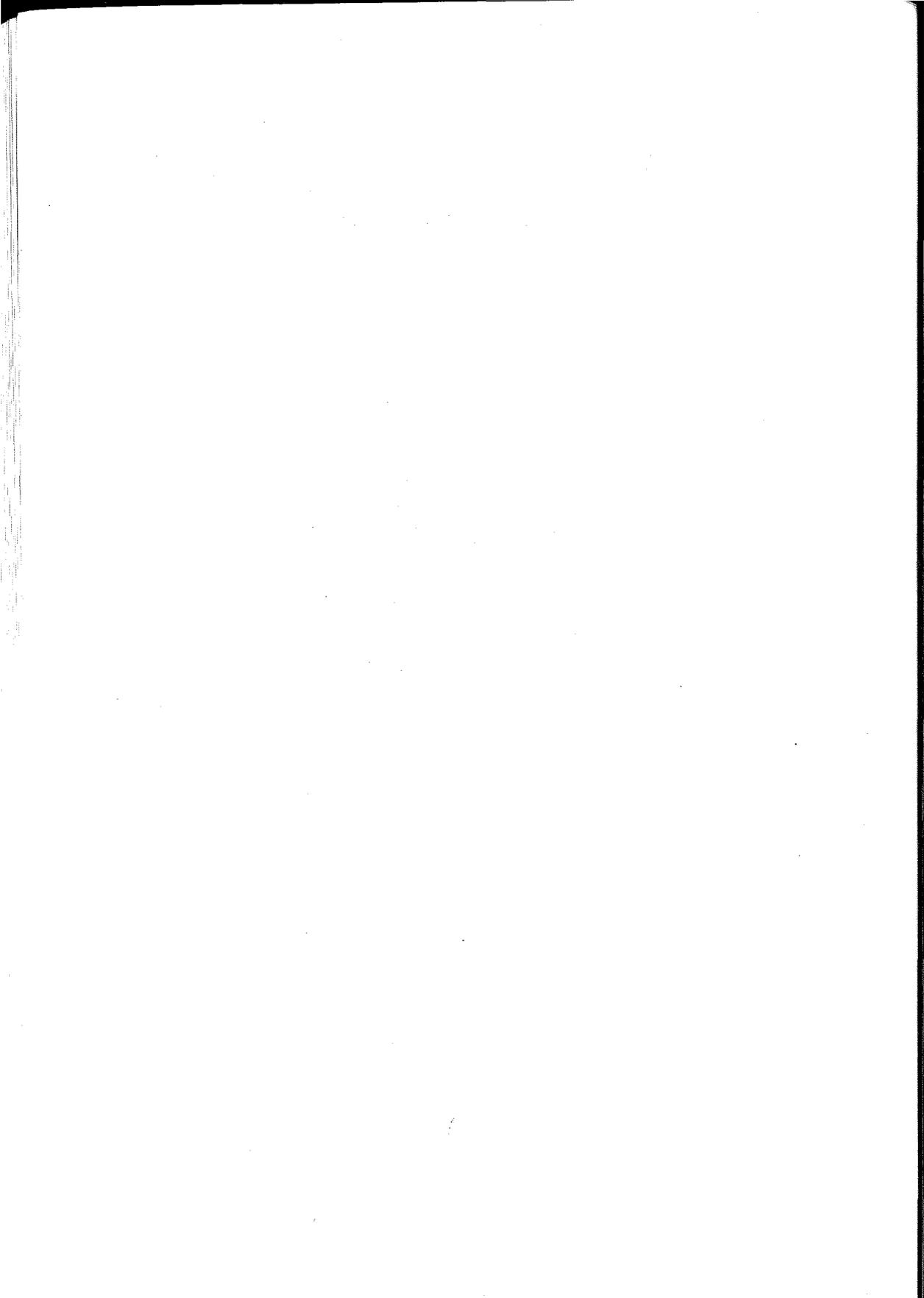
Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato possibile grazie alla concessione di una borsa di studio per missioni scientifiche di breve durata nell'ambito dell'azione COST 831 (Working Group 2: Biotechnology of Soil: monitoring, conservation and remediation).

L'autore ringrazia il Prof. Insam dell'Istituto di Microbiologia di Innsbruck, presso i cui laboratori questo lavoro è stato svolto, per la disponibilità e l'assistenza durante il lavoro sperimentale e per l'utile e critica discussione dei risultati.

Bibliografia

- CARPENTER-BOGGS L., KENNEDY A., REGANOLD J.P. (1998). Use of phospholipid fatty acids and C source utilization patterns to track microbial community succession in developing compost. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 4062-4064.
- GARLAND J.L. (1996). Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. *Soil Biol. Biochem.*, 28: 223-230.
- GARLAND J.L., MILLS A.L. (1991). Classification and characterization of heterotrophic microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2351-2359.
- HOPKINS D.W., MACNAUGHTON S.J., O'DONNELL A.G. (1991). A dispersion and differential centrifugation technique for representatively sampling microorganisms from soil. *Soil Biol. Biochem.*, 23: 217-225.
- INSAM H. (1997). A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. In: *Microbial Communities* (H. Insam, A. Rangger, eds.), Springer, Berlin, pp. 259-260.
- INSAM H. (1998). Biolog community level physiological profiling (CLPP). Virtues and pitfalls. *Cost 831 Meeting Report*. Roma, 10-11 Dicembre.
- INSAM H., AMOR K., RENNER M., CREPAZ C. (1996). Changes in functional abilities of the microbial community during composting of manure. *Microb. Ecol.*, 31: 77-87.
- LAINÉ M.M., HAARIO H., JOERGENSEN K.S. (1997). Microbial functional activity during composting of chlorophenol-contaminated sawmill soil. *Journal of Microbiological Methods*, 30: 21-32.
- LINDSTROM J.E., BARRY R.P., BRADDOCK J.F. (1998). Microbial community analysis: a kinetic approach to constructing potential C source utilization patterns. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 231-239.
- LINDSTROM J.E., BARRY R.P., BRADDOCK J.F. (1999). Long-term effects on microbial communities after a subarctic oil spill. *Soil Biol. Biochem.*, 31: 1677-1689.



LA BIOLOGIA MOLECOLARE APPLICATA ALLO STUDIO DELLE COMUNITÀ MICROBICHE DEL SUOLO*

Maria Teresa Ceccherini¹, Giacomo Pietramellara²,
Maurizio Castaldini¹

¹ Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo
Piazza D'Azeglio, 30 - 50121 Firenze

² Dipartimento di Scienza del Suolo e Nutrizione della Pianta
Università degli Studi di Firenze
Piazzale delle Cascine, 16 - 50144 Firenze

Introduzione

Quantificare la dinamica delle comunità microbiche è uno dei temi centrali di ricerca della microbiologia ambientale fin dai suoi albori (Mc Laren, 1977).

Dal momento che i microrganismi intervengono nei cicli biogeochimici degli elementi nutritivi prendendo parte attiva nel mantenimento di un ecosistema stabile e sostenibile, diventa fondamentale individuare anche la relazione tra diversità genetica e diversità funzionale della microflora (Kennedy and Smith, 1995; Griffiths *et al.*, 1997; Ohtonen *et al.*, 1997).

Fra i diversi ambienti naturali che ospitano le comunità microbiche, il suolo riveste un notevole interesse perché è il più complesso di tutti gli habitat microbici. Infatti ospita un numero eccezionale di specie appartenenti a batteri, attinomiceti, funghi, alghe, virus. Di essi, solo una percentuale molto bassa, minore dell'1% è stata isolata, coltivata e identificata (Nannipieri *et al.*, 2000; Øvreås and Torsvik, 1998; Griffiths *et al.*, 1999).

La caratteristica peculiare della microflora del suolo è la sua notevole diversità: diversi gruppi microbici sono presenti contemporaneamente (*richness*), e le loro proporzioni sono variabili (*evenness*) e dipendono dalle caratteristiche del suolo (Griffiths *et al.*, 1997). La biodiversità, quindi, intesa come varietà di specie, ma anche come variabilità genetica all'interno di ciascuna specie (Øvreås and Torsvik, 1998), è considerata una caratteristica positiva dei sistemi naturali; risulta spesso diminuita, infatti, in seguito ad interventi antropici devastanti, o comunque alterata in ecosistemi in avanzato stato di declino (Smit *et al.*, 1997; Stephen *et al.*, 1999).

* L'approfondimento delle problematiche relative a questo lavoro è stato reso possibile grazie al Contributo COST 831, Working Group 3, di una STMS svolta presso il Department of Biomolecular Sciences in Wageningen.

Strategie di analisi dei microrganismi del suolo

Fra i microrganismi del suolo, i batteri rappresentano il gruppo più importante in termini di attività metabolica e partecipano, come già detto, in maniera significativa ai cicli naturali degli elementi nutritivi. I metodi di analisi della microflora del suolo, in particolare quella batterica, si distinguono in due classi: i tradizionali e i molecolari. I primi, focalizzati sulla misura della biomassa, dei processi di respirazione, sulle attività enzimatiche, sul numero di batteri coltivabili, sono importanti e utili per esprimere le potenzialità dell'ecosistema suolo, ma non per la caratterizzazione della comunità microbica (Nannipieri *et al.*, 2000); i secondi si prestano bene alla caratterizzazione di singole specie come anche di popolazioni e gruppi funzionali microbici del suolo, perché si applicano direttamente a livello degli acidi nucleici evitando l'isolamento e la coltivazione in laboratorio (Akkermans *et al.*, 1994; Wintzingerode *et al.*, 1997; Heitzer, 1998).

Nel complesso queste metodologie comprendono l'amplificazione di sequenze geniche via PCR (Polymerase Chain Reaction), i DNA fingerprinting, l'ibridazione, il clonaggio di sequenze geniche amplificate, il sequenziamento genico; ma tutte hanno in comune l'estrazione del DNA dal campione, prima tappa dell'approccio molecolare applicato allo studio *in vivo* delle comunità microbiche negli ecosistemi (Picard *et al.*, 1992; van Elsas and Smalla, 1995; Pickup *et al.*, 1995; Dojka *et al.*, 2000).

Come già menzionato il vantaggio offerto da queste metodologie è quello di estendere l'analisi anche ai microrganismi non coltivabili che sono la maggior parte della microflora del suolo; di ottenere informazioni indipendentemente dalla coltivazione *in vitro* (independent cultivation analysis). Inoltre si può determinare il destino di batteri particolari o di sequenze geniche ricombinanti, in condizioni naturali; e si può evidenziare la diversità genotipica e le eventuali sue modificazioni (Steffan *et al.*, 1988; Picard *et al.*, 1992; Selenska-Pobell, 1995).

Altri vantaggi risiedono nella specificità e precisione delle informazioni che si ottengono, nella rapidità e nella possibilità di analizzare la microflora a più livelli. Per esempio le indagini a livello batterico possono interessare i grandi gruppi dei Proteobatteri (α , β , γ , δ), ma anche singole popolazioni all'interno di tali gruppi. E questo è possibile mediante la scelta mirata degli oligonucleotidi (corti frammenti di DNA disegnati in base a sequenze geniche specifiche e note), da usare come "primer" nelle amplificazioni o come "probe" nelle ibridazioni (Amann, 1995).

Estrazione del DNA dal suolo

Esistono, oggi, molti protocolli per l'estrazione del DNA dal suolo, che però possono essere raggruppati in due strategie principali: la **lisi diretta** delle cellule microbiche presenti nel campione e contemporanea estrazione del DNA, i cui primi esperimenti sono stati effettuati da Ogram *et al.* (1987); e la **lisi indiretta**, o frazionamento batterico, che prevede la separazione delle cellule mediante centrifugazione, prima di procedere alla lisi cellulare e al recupero del DNA, descritte in origine da Holben *et al.* (1988).

Entrambe le tecniche prevedono la purificazione del DNA estratto affinché questo possa essere sottoposto alle successive analisi molecolari. In particolare, nell'estrazione del DNA mediante lisi diretta, si usano detergenti forti, temperature abbastanza elevate e distruzione meccanica delle cellule con microsferi di vetro. Nella lisi indiretta, le cellule batteriche vengono subito separate dal resto della matrice ambientale, e dai "debris" cellulari, mediante centrifugazioni; solamente dopo le cellule vengono lisate mediante enzimi e detergenti, rilasciando il DNA in un opportuno tampone. Complessivamente l'estrazione diretta è meno laboriosa e dà rese più elevate di DNA (Duarte *et al.*, 1998); la lisi indiretta recupera DNA solo da cellule batteriche e quindi è più selettiva, ma fornisce un estratto più pulito (Selenska-Pobell, 1995; Frostegård *et al.*, 1999). Quindi non esiste un metodo di estrazione universale; la scelta dell'una o dell'altra tecnica dipende dal tipo di suolo e dal tipo di studio che si vuole affrontare (Akkermans *et al.*, 1994).

L'estrazione del DNA dal suolo comporta alcuni problemi quali la resa d'estrazione, la densità della biomassa batterica, la natura dei coloidi del suolo, la presenza di composti polifenolici, e la resistenza di alcune cellule batteriche alla lisi.

- Per campioni come il suolo, i fanghi di depurazione, i sedimenti, dove la densità batterica è alta (circa 10^8 - 10^{10} cellule/grammo di suolo), si preferisce l'estrazione diretta del DNA. Per campioni di acqua di mare o acqua dolce, in cui la densità microbica è bassa, è più indicato procedere alla concentrazione delle cellule e all'estrazione indiretta.

- La natura della matrice ambientale può avere effetti importanti sul recupero del DNA: un alto contenuto di argilla, può interferire negativamente perché il DNA estratto può essere adsorbito dalle particelle argillose; alcuni composti polifenolici, gli acidi umici, i metalli pesanti, possono rendere complessa la purificazione del DNA. Inoltre questi composti possono interferire nella determinazione del DNA e inibire l'attività polimerasica che amplifica il DNA o l'attività degli enzimi di restrizione che digeriscono il DNA (Wilson, 1997).

• La presenza di batteri più resistenti alla lisi cellulare, come i metanogeni o i Gram positivi, può essere il motivo di una resa minore di DNA.

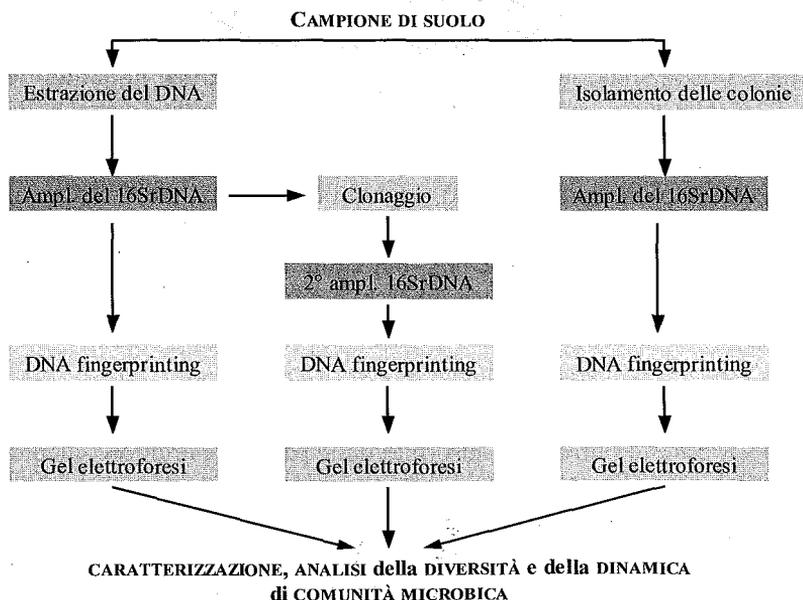
Comunque sia, il prodotto di estrazione sarà sempre costituito da una miscela complessa di molecole di DNA, appartenenti alle specie microbiche presenti nel campione.

Utilità del 16S rDNA

I geni dell'RNA ribosomiale 16S (16S rDNA) sono utili per lo studio delle comunità batteriche telluriche basato sulla caratterizzazione del DNA estratto dal suolo. Infatti, questi geni, presenti in tutti i batteri, contengono regioni conservate nell'evoluzione, e regioni (iper)variabili caratteristiche di ogni specie. Queste due caratteristiche possono essere sfruttate per individuare coppie di primer da usare nell'amplificazione, o per ottenere sonde per l'ibridazione.

Uno degli approcci sperimentali più seguiti è l'estrazione del DNA dal suolo seguita dall'amplificazione del 16S rDNA (Akkermans *et al.*, 1994). Questa strategia non dipende dallo stato fisiologico delle cellule da cui si estrae il DNA; l'unico requisito è che le cellule siano lisate e che il DNA estratto sia ugualmente disponibile per l'amplificazione. I prodotti di PCR saranno costituiti da una miscela di segmenti genici di uguale grandezza, rappresentativa della composizione batterica del campione.

La strategia descritta può essere rappresentata così:



Metodi per l'analisi della microflora del suolo:

ARDRA e DGGE/TGGE

L'amplificazione a catena della polimerasi, reazione enzimatica che permette di amplificare almeno un milione di volte il DNA stampo attraverso un processo ripetitivo, ha fornito un grosso impulso alla microbiologia ambientale molecolare. Infatti permette di evidenziare sequenze geniche appartenenti a popolazioni batteriche che rappresentano una piccola frazione della comunità totale, ma che rivestono pur sempre un ruolo fondamentale nell'ecosistema, per esempio gli ammonio ossidanti.

Una volta ottenuti gli amplificati, questi possono essere caratterizzati mediante DNA fingerprinting, come ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) o DGGE/TGGE (Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis), effettuati sugli amplificati del DNA estratto da suolo, oppure sugli amplificati clonati in opportuni vettori, o sugli amplificati da ceppi batterici isolati dal suolo.

La tecnica ARDRA produce, per ogni campione amplificato con primer per il 16S rDNA, una caratteristica impronta molecolare (molecular fingerprinting) dove le bande rappresentano i frammenti di restrizione, e il profilo di bande indica la composizione della comunità o della popolazione batterica che si vuole analizzare. Il vantaggio di questa tecnica sta nel fatto che le fluttuazioni della comunità batterica possono essere analizzate semplicemente paragonando i profili di restrizione ottenuti dopo una elettroforesi su gel d'agarosio. Se si usano primer generici, costruiti sulle regioni conservate del 16S rDNA, si otterranno informazioni riguardo alla comunità eubatterica nel suo complesso, mentre con primer disegnati sulle regioni (iper)variabili del gene, si potranno evidenziare le modificazioni a livello di singole popolazioni.

In alternativa, dopo l'amplificazione, le sequenze del 16S rDNA possono essere clonate in opportuni vettori inseriti in *E. coli*, riamplicate e analizzate mediante digestione enzimatica. Paragonando i profili ARDRA della comunità batterica complessiva e quelli del 16S rDNA clonato, con quelli ottenuti da colonie isolate dal suolo e coltivate su mezzo selettivo, si può analizzare la diversità strutturale della microflora batterica non coltivabile e coltivabile.

I cloni più interessanti possono poi essere sequenziati per attribuire loro l'appartenenza ad un genere o ad una specie.

La DGGE e la TGGE sono state di recente applicate agli studi

per la caratterizzazione del DNA estratto direttamente dal suolo, e anche queste danno luogo a DNA fingerprinting. Nella DGGE il gradiente denaturante è formato da urea e formamide, mentre nella TGGE vi è un gradiente lineare di temperatura. Frammenti di DNA amplificato, della stessa lunghezza, ma di diversa sequenza, possono essere separati in base alle loro proprietà di denaturazione. Infatti, quando la miscela di molecole amplificate viene sottoposta ad elettroforesi su gel di poliacrilammide a gradiente crescente di denaturanti, i frammenti migrano sino a quando si ha la separazione delle eliche del DNA cioè la sua denaturazione.

L'aggiunta di una sequenza ricca in GC (Guanina e Citosina) di circa quaranta nucleotidi, detta GCclamp, all'estremità 5' del primer forward, previene la completa denaturazione del prodotto di PCR, agevolando la risoluzione delle bande. Dopo la colorazione con Bromuro d'Etidio, o con SybrGreen o con nitrato d'argento, i campioni si mostrano come profili di bande che riflettono la composizione microbica del campione. Le bande più interessanti possono essere sezionate dal gel (ma non da quello colorato con nitrato d'argento), riamplicate e quindi sequenziate. Oppure tutti i profili del gel possono essere trasferiti su membrana (Southern blotting) e ibridati con sonde opportune per verificare la presenza di particolari specie.

Il DNA fingerprinting può essere applicato per mettere in evidenza geni funzionali con un forte significato filogenetico quali ad esempio *nif[°]H* che codifica per la subunità ferro-proteica della Nitrogenasi negli azotofissatori, o *amo[°]A*, gene dell'Ammonio monoossigenasi, negli ammonio ossidanti.

I mezzi molecolari di analisi come amplificazione e ibridazione applicate al DNA estratto dal suolo sia per lisi diretta che per frazionamento batterico, si rivelano particolarmente utili anche nelle analisi di valutazione del rischio ambientale associato alla coltivazione di piante transgeniche e al rilascio di microrganismi ingegnerizzati nell'ambiente (Nielsen *et al.*, 1998; Gebhard e Smalla, 1999).

Espressione genica della microflora

Si è detto in precedenza dell'importanza di correlare diversità genetica e diversità funzionale. Quando si vuole analizzare anche la componente attiva di una comunità batterica, è necessario estrarre l'RNA ribosomale o l'RNA messaggero dal suolo, perché essendo i prodotti di trascrizione del DNA, sono gli strumenti attraverso cui si manifesta l'attività fisiologica di un organismo.

Dopo aver estratto l'RNA dal campione in esame, con tutti gli accorgimenti che richiede l'esperimento, la strategia prevede di applicare una RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) per avere cDNA (DNA complementare) e poi DNA amplificato. La successiva ibridazione con sonde per geni particolari, metterà in evidenza l'espressione o meno, di tali geni. Dal momento che la quantità di RNA ribosomale aumenta proporzionalmente all'attività delle cellule, l'analisi degli amplificati potrà essere correlata all'attività metabolica complessiva di una comunità batterica, ma anche alla diversità delle frazioni attive della comunità.

Con una RT-PCR dell'RNA messaggero, è possibile valutare l'espressione di un particolare gene funzionale e quindi l'attività della popolazione batterica a cui il gene appartiene. L'unica difficoltà in questo caso è di evitare la degradazione dell'RNA messaggero, la cui semivita è molto breve, solo qualche minuto.

Diversità genetica e diversità funzionale

L'applicazione delle tecniche molecolari alla microbiologia ambientale offre la possibilità di caratterizzare i microrganismi in modo sempre più preciso, e di perfezionare gli studi sulle complesse relazioni fra diversità genetica e diversità funzionale. E' probabile che esista un livello critico della diversità, intesa come ricchezza di specie, al di sotto del quale la funzionalità del sistema è compromessa; però non è stato ancora possibile chiarire quale sia questo livello; e si intuisce, che, entro la soglia limite, la comunità microbica del suolo può conservare l'abilità di recuperare una funzionalità persa in seguito ad una perturbazione; questa capacità di recupero o di resistenza agli stress, viene definita "*resilienza*". Se, per esempio, un fattore di disturbo riduce la biodiversità, ma il sistema nel suo complesso mantiene le proprie capacità funzionali, allora tale sistema si considera *resiliente*. Se una gamma di funzioni è danneggiata solo per un certo periodo, allora il tempo che occorre per recuperare le funzioni iniziali viene preso come misura della resilienza. Se invece, in concomitanza di una riduzione della biodiversità, un sistema perde completamente certe attività, e non è più capace di recuperare la funzionalità, allora non è resiliente.

Associando i DNA fingerprinting di certe specie microbiche alla particolare attività funzionale evidenziata attraverso l'estrazione dell'RNA messaggero, del suolo, è possibile appurare se la composizione e la dinamica delle specie all'interno di una comunità, sono tali da mantenere stabile la funzionalità di un ecosistema. Una microflora capace di ciò, caratterizza un suolo ad alta qualità biologica.

Conclusioni

L'analisi dell'RNA messaggero può completare le indicazioni che derivano dallo studio del DNA da suolo poiché in questo modo si può avere un quadro complessivo sulla composizione e sulla dinamica di una popolazione microbica che è anche coinvolta in una particolare attività metabolica.

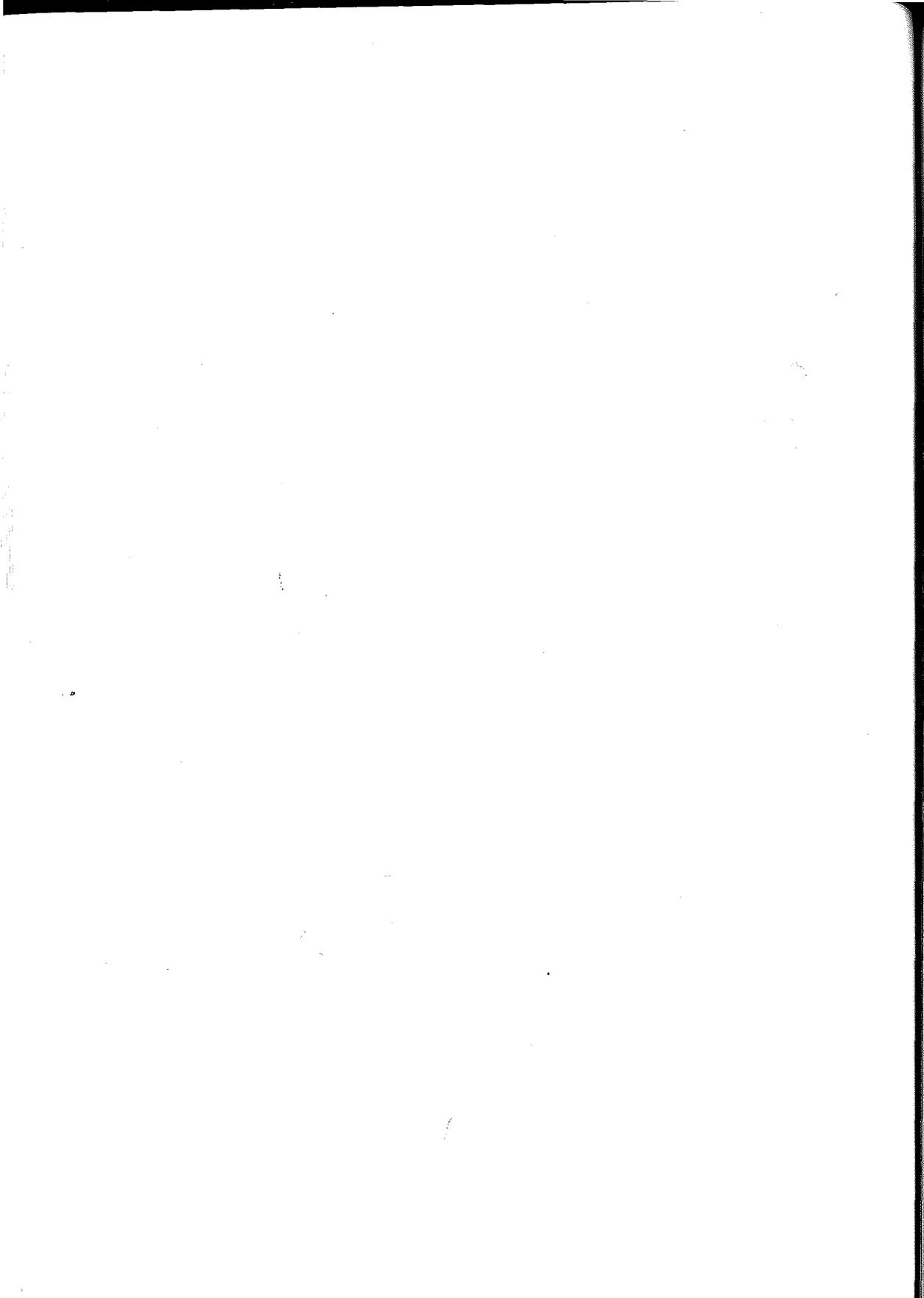
In questa panoramica generale riguardo la caratterizzazione del DNA estratto dal suolo, si è ritenuto opportuno sorvolare sulle problematiche relative a certe "imperfezioni" delle tecniche molecolari, come differenze nell'efficienza delle estrazioni, differenze nel numero di copie del 16S rDNA, "annealing" preferenziale durante le reazioni di amplificazione. Pur essendo consapevoli di questi limiti, resta la convinzione che le tecniche molecolari possono permettere di fare grandi progressi nello studio dell'ecologia microbica, e la certezza che, in campo ambientale, tali tecniche saranno molte utilizzate nelle ricerche future.

Bibliografia

- AKKERMANS A.D.L., MIRZA M.S., HARMSSEN H.J.M., BLOK H.J., HERRON P.R., SESSITSCH A., AKKERMANS W. (1994). Molecular ecology of microbes: a review of promises, pitfalls and true progress. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 185-194.
- AMANN R.L., LUDWIG W., SCHLEIFER K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- DOJKA M.A., HARRIS J.K., PACE N.R. (2000). Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1617-1621.
- FROSTEGÅRD Å., COURTOIS S., RAMISSE V., CLERC S., BERNILLON D.L., LE GALL F., JEANNIN P., NESME X., SIMONET P. (1999). Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5409-5420.
- GEBHARD F., SMALLA K. (1999). Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28, 261-272.
- GRIFFITHS B.S., RITZ K., EBBLEWHITE N., DOBSON G. (1999). Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biol. Biochem.* 31, 145-153.
- HEITZEER A. (1998). Microbiological, molecular and biochemical methods for environmental risk analysis and bioprocess evaluation. *J. Microbiol. Meth.* 32, 89-91.
- HOLBEN W.E., JANSSON J.K., CHELM B.K., TIEDJE J.M. (1988). DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 703-711.
- JACOBSEN A.S., RASMUSSEN O.F. (1992). Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin. *Applied and environmental microbiology* 58, 2458-2462.
- KENNEDY A.C., SMITH K.L. (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil* 170: 75-86.

- Mc LAREN (1977). The seven questions of Selman A. Waksman. *Soil Biol. Biochem.* 9, 375-376.
- NANNIPIERI P., FALCHINI L., LANDI L., PIETRAMELLARA G. (2000). Management of soil microflora. In: Acta of OECD Conference on "Biological resource management: connecting science and policy" (in press).
- NANNIPIERI P., PIETRAMELLARA G., FALCHINI L., BRADFORD M., PAREKH N., PINZARI F., SCHMIDT N. (2000). Microbial diversity and activity in soil: meaning, limits and advantages of the present methods. In: NATO-ASI "Soil and global change: carbon cycle, trace gas exchange and hydrology" (in press).
- NIELSEN KAARE M., BONES A.M., SMALLA K., VAN ELSAS J.D. (1998). Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria - a rare event? *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 79-103.
- OGRAM A., SAYLER G.S., BARKAY T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of microbiological methods* 7, 57-66.
- OHTONEN R., AIKIO S., VÄRE H. (1997). Ecological theories in soil biology. *Soil Biol. Biochem.* 29, 1613-1619.
- ØVREÅS L., TORSVIK V. (1998). Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb. Ecol.* 36,303-315.
- 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.
- PICKUP R.W., RHODES G., SAUNDERS J.R. (1995). Extraction of microbial DNA from aquatic sources: freshwater. In: A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn (Eds.) *Molecular Microbial Ecology Manual*, Dordrecht, sect. 1.3.2.
- SELENSKA S., KLINGMÜLLER W. (1991). DNA recovery and direct detection of Tn5 sequences from soil. *Letters in applied microbiology* 13, 21-24.
- SELENSKA-POBELL S. (1995). Direct and simultaneous extraction of DNA and RNA from soil. *Molecular microbial ecology manual* 1.5.1, 1-17.
- SMIT E., LEEFLANG P., WERNARS K. (1997). Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 249-261.
- STEFFAN R.J., GOKSØYR J., BEJ A.K., ATLAS R.M. (1988). Recovery of DNA from soils and sediments. *Applied and environmental microbiology* 54, 2908-2915.
- STEPHEN J.R., CHANG Y-J., MACNAUGHTON S.J., KOWALCHUK G.A., LEUNG K.T., FLEMMING C.A., WHITE D.C. (1999). Effect of toxic metals on indigenous soil (-subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 95-101.
- TORSVIK V. (1995). Cell extraction method. In: A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn (Eds.) *Molecular Microbial Ecology Manual*, Dordrecht, sect. 1.3.1.
- VAN ELSAS J.D., SMALLA K. (1995). Extraction of microbial community DNA from soils. In: A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn (Eds.) *Molecular Microbial Ecology Manual*, Dordrecht, sect. 1.3.3.
- WILSON I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741-3751.
- WINTZINGERODE F. V., GÖBEL U.B., STACKEBRANDT E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 213-229.
- ZHOU J., BRUNS M.A., TIEDJE J.M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and environmental microbiology*, 62, 316-322.

- Mc LAREN (1977). The seven questions of Selman A. Waksman. *Soil Biol. Biochem.* 9, 375-376.
- NANNIPIERI P., FALCHINI L., LANDI L., PIETRAMELLARA G. (2000). Management of soil microflora. In: Acta of OECD Conference on "Biological resource management: connecting science and policy" (in press).
- NANNIPIERI P., PIETRAMELLARA G., FALCHINI L., BRADFORD M., PAREKH N., PINZARI F., SCHMIDT N. (2000). Microbial diversity and activity in soil: meaning, limits and advantages of the present methods. In: NATO-ASI "Soil and global change: carbon cycle, trace gas exchange and hydrology" (in press).
- NIELSEN KAARE M., BONAS A.M., SMALLA K., VAN ELSAS J.D. (1998). Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria - a rare event? *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 79-103.
- OGRAM A., SAYLER G.S., BARKAY T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of microbiological methods* 7, 57-66.
- OHTONEN R., AIKIO S., VÄRE H. (1997). Ecological theories in soil biology. *Soil Biol. Biochem.* 29, 1613-1619.
- ØVREÅS L., TORSVIK V. (1998). Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb. Ecol.* 36,303-315.
- 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.
- PICKUP R.W., RHODES G., SAUNDERS J.R. (1995). Extraction of microbial DNA from aquatic sources: freshwater. In: A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn (Eds.) *Molecular Microbial Ecology Manual*, Dordrecht, sect. 1.3.2.
- SELENSKA S., KLINGMÜLLER W. (1991). DNA recovery and direct detection of Tn5 sequences from soil. *Letters in applied microbiology* 13, 21-24.
- SELENSKA-POBELL S. (1995). Direct and simultaneous extraction of DNA and RNA from soil. *Molecular microbial ecology manual* 1.5.1, 1-17.
- SMIT E., LEEFLANG P., WERNARS K. (1997). Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 249-261.
- STEFFAN R.J., GOKSØYR J., BEJ A.K., ATLAS R.M. (1988). Recovery of DNA from soils and sediments. *Applied and environmental microbiology* 54, 2908-2915.
- STEPHEN J.R., CHANG Y.-J., MACNAUGHTON S.J., KOWALCHUK G.A., LEUNG K.T., FLEMMING C.A., WHITE D.C. (1999). Effect of toxic metals on indigenous soil (-subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 95-101.
- TORSVIK V. (1995). Cell extraction method. In: A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn (Eds.) *Molecular Microbial Ecology Manual*, Dordrecht, sect. 1.3.1.
- VAN ELSAS J.D., SMALLA K. (1995). Extraction of microbial community DNA from soils. In: A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn (Eds.) *Molecular Microbial Ecology Manual*, Dordrecht, sect. 1.3.3.
- WILSON I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741-3751.
- WINTZINGERODE F. V., GÖBEL U.B., STACKEBRANDT E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 213-229.
- ZHOU J., BRUNS M.A., TIEDJE J.M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and environmental microbiology*, 62, 316-322.



STUDIO DELLA STRUTTURA DELLA COMUNITÀ BATTERICA DI UN SUOLO OLANDESE MEDIANTE METODI MOLECOLARI

Antonio Gelsomino

Dipartimento di Agrochimica ed Agrobiologia, Università di Reggio Calabria
Piazza San Francesco, 4 - 89061 Gallina (RC)

Riassunto

La struttura della comunità batterica residente in un suolo olandese di natura franco-limosa proveniente da una parcella sperimentale è stata investigata mediante tecniche di biologia molecolare. L'indagine ha riguardato campioni da prelievo superficiale e lungo il profilo, e aggregati strutturali di suolo di dimensione decrescente (da 4 a < 0.063 mm) frazionati mediante setacciamento umido e centrifugazione. Il DNA totale della popolazione batterica è stato estratto utilizzando la tecnica dell'estrazione diretta (lisi *in situ* con rilascio di DNA) e, successivamente, è stato purificato mediante precipitazione con CICs e filtrazione attraverso colonnine cromatografiche Wizard® DNA Clean-up System. Dopo amplificazione del materiale genetico per mezzo della reazione a catena della polimerasi (PCR), i frammenti sono stati separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide con gradiente di denaturante (DGGE). I profili elettroforetici ottenuti, il cui bandeggio riflette la struttura molecolare della popolazione batterica del suolo indagato, hanno evidenziato una presenza ubiquitaria e costante di un numero limitato di specie batteriche dominanti, indipendentemente dalla loro localizzazione nel suolo.

Introduzione

Le conoscenze e le tecniche maturate nel corso degli ultimi due decenni nel settore della biologia molecolare hanno promosso con crescente decisione e diffusione, interessanti applicazioni anche nella negli studi inerenti alla scienza del suolo ed, in particolare, alla microbiologia del terreno (van Elsas *et al.*, 1997a).

Infatti gli acidi nucleici, sia l'RNA, ma soprattutto il DNA, possono realizzare, nella forma denaturata, accoppiamenti altamente specifici tra regioni nucleotidiche complementari ed essere quindi utilizzati sia come sonde molecolari (*molecular probe*) per riconoscere determinate regioni geniche, sia come molecole bersaglio (*molecular target*) di sequenze specie-specifiche, per identificare specie e popolazioni microbiche residenti nel suolo. Le nuove tecniche d'indagine bio-molecolare, basate quindi sull'analisi e la caratterizzazione degli acidi nucleici estratti dalla popolazione microbica del terreno, appaiono tanto più interessanti se si considera che più del 95% delle specie batteriche residenti nel suolo non è coltivabile su piastra e, dunque, sfugge ad analisi microbiologiche condotte con le tecniche tradizionali (Holben, 1994).

D'altro canto il suolo è un sistema estremamente complesso ed eterogeneo, costituito da una fase solida, liquida e gassosa le cui proporzioni relative possono cambiare nel tempo e nello spazio. La componente biologicamente attiva, rappresentata dalla biomassa microbica, costituita principalmente da batteri e da funghi, risulta localizzata in micro-nicchie tra e all'interno degli aggregati del suolo (Hattori, 1973), della dimensione di poche decine di micron, caratterizzate ciascuna da precise proprietà chimico-fisiche (pH, umidità, potenziale redox, etc.) e biologiche (disponibilità di nutrienti, sostanze antagoniste, etc.) (Stotzky, 1997). Il suolo quindi rappresenta uno dei sistemi biologici più complessi, caratterizzato da una notevole discontinuità spaziale, in cui si sviluppano e si localizzano i microrganismi, ed in cui il variare delle condizioni ambientali, sia per cause naturali che per intervento antropico, determina precisi cambiamenti nella presenza e nella distribuzione spaziale dei microrganismi. La caratterizzazione mediante tecniche proprie della biologia molecolare degli acidi nucleici di origine batterica estratti da suolo, rappresenta dunque una strategia d'avanguardia per indagare a livello molecolare l'ecologia microbica (Akkermans *et al.*, 1998) e la struttura delle comunità batteriche del terreno (Griffiths *et al.*, 1997).

Scopo della presente ricerca, condotta sotto la supervisione scientifica del Dr. J.D. van Elsas presso il Soil Biotechnology Laboratory del Research Institute of Plant Protection (IPO-DLO) con sede a Wageningen (Olanda), è stato lo studio della struttura della comunità batterica presente in un suolo olandese con diverse localizzazioni (a livello superficiale, lungo il profilo, in aggregati di diversa dimensione), mediante l'ausilio di tecniche di indagine di biologia molecolare.

Materiali e metodi

I prelievi di suolo sono stati effettuati in una parcella sperimentale localizzata presso l'IPO-DLO. Le proprietà chimico-fisiche del suolo erano: sabbia, 14.3%; limo, 59.7%; argilla, 26.0%; tessitura, franco-limoso; pH in acqua, 7.2; sostanza organica, 2.7 g 100 g⁻¹. Per valutare la variabilità spaziale a livello della superficie del suolo (0-10 cm) sono stati prelevati quattro campioni composti, ciascuno risultante dalla miscelazione di tre distinti sub-campioni semplici, e quattro campioni semplici. La variabilità spaziale lungo il profilo è stata indagata in campioni composti (da tre sub-campioni semplici ognuno) prelevati alle profondità di 0-2 cm, 3-7 cm, 8-12 cm, 13-17 cm, 23-27 cm, 33-37 cm, 38-42 cm e 43-47 cm. Infine, per valutare la variabilità all'interno degli aggregati, un campione di suolo composto prelevato superficialmente (0-10 cm) è stato frazionato mediante la procedura del setacciamento umido descritta da Kemper e Rosenau (1986). La frazione granulometrica <0.063 mm è stata raccolta dopo centrifugazione a 13.000 g per 30 min.

Il DNA totale della popolazione batterica è stato estratto secondo il metodo della estrazione diretta e successivamente purificato mediante precipitazione con CICs e filtrazione attraverso colonnine cromatografiche Wizard[®] DNA Clean-up System (Promega, USA), secondo le procedure descritte da van Elsas *et al.* (1997b). L'amplificazione mediante PCR è stata condotta utilizzando un termoreattore a cicli programmabili PTC-200 della MJ Research (Watertown, USA), secondo il metodo riportato da van Elsas e Wolters (1995). Il sistema di primers usato è quello descritto da Smalla *et al.* (1998) che permette l'amplificazione delle regioni V6-V8, comprese fra il nucleotide 968 e 1401, della sequenza genica codificante per la sintesi della sub-unità 16S dell'rRNA ribosomale (16S rDNA). Più precisamente, all'interno del 16S rDNA si distinguono alcune regioni a minor variabilità, tra le quali le regioni V6-V8, le cui differenze, dovute a variazioni puntiformi di basi azotate, aumentano solo con la distanza filogenetica degli individui.

L'analisi DGGE è stata condotta per mezzo di un apparecchio Ingeny (Vlissingen, Olanda) con gel di acrilammide al 6% (p/v) contenente un gradiente di denaturante chimico dal 45 al 65 % di urea e formammide. La soluzione di denaturante al 45% conteneva urea 3.15 M e formammide al 18% (v/v), mentre la soluzione di denaturante al 65% conteneva 4.55 M urea e formammide al 26% (v/v). La corsa elettroforetica è stata condotta in tampone TAE 0.5x (0.02 M Tris, 0.01 M acetato di sodio e 0.5 mM EDTA; pH 7.8), a 60°C, ad un voltaggio costante di 100 V per 16 h. Dopo la corsa il gel è stato colorato con SYBR[®] Green I (Molecular Probes, USA) colorante per acidi nucleici e fotografato sotto luce ultravioletta. I profili elettroforetici sono stati acquisiti mediante elaborazione computerizzata di immagine.

Risultati e discussione

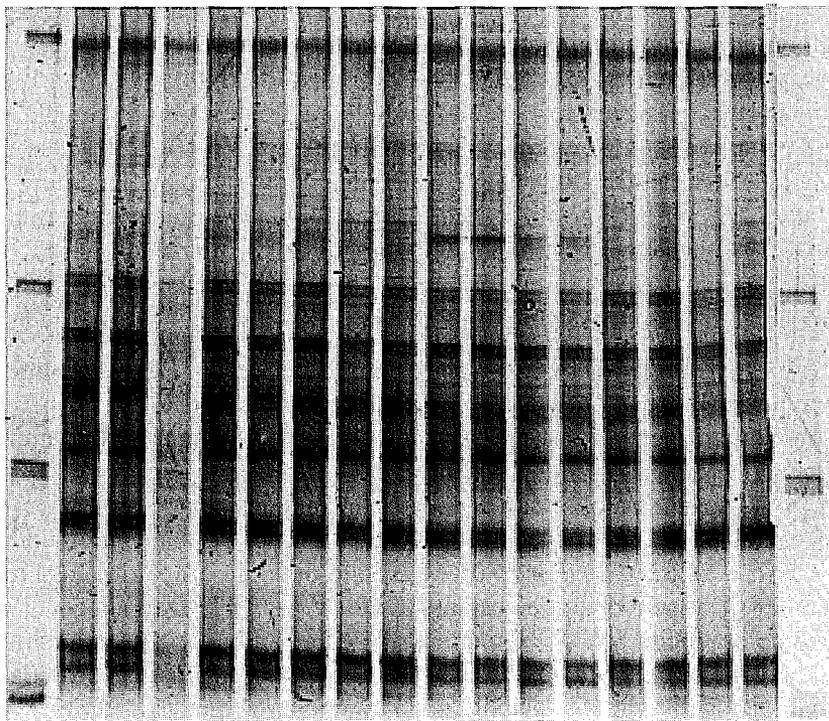
La tecnica di separazione per elettroforesi su gel con gradiente di agente denaturante (DGGE) risolve frammenti di DNA della stessa dimensione ma con differente composizione in basi azotate (Muyzer *et al.*, 1993). Il profilo elettroforetico ottenuto offre una distribuzione di bande, ciascuna associabile ad una specie batterica, che nel complesso descrive la struttura molecolare della popolazione microbica (Heuer e Smalla, 1997).

I risultati sperimentali ottenuti possono così essere riassunti.

Variabilità spaziale della struttura della comunità batterica in campioni di suolo superficiali semplici e composti. La figura 1 mostra i profili elettroforetici ottenuti dopo analisi DGGE di estratti di DNA da campioni di suolo superficiali.

Figura 1. Variabilità spaziale della struttura della comunità batterica in campioni di suolo di superficie (0-10 cm) semplici e composti, analizzati in doppio. M=marcatori (dall'alto in basso): (1) *Enterobacter cloacae* BE1, (2) *Listeria innocua* ALM105, (3) *Arthrobacter* sp., and (4) *Burkholderia cepacia* P2. Corsie 1-8: quattro campioni composti, ciascuno risultante dalla miscelazione di tre distinti sub-campioni semplici. Corsie 9-16: quattro campioni semplici.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M

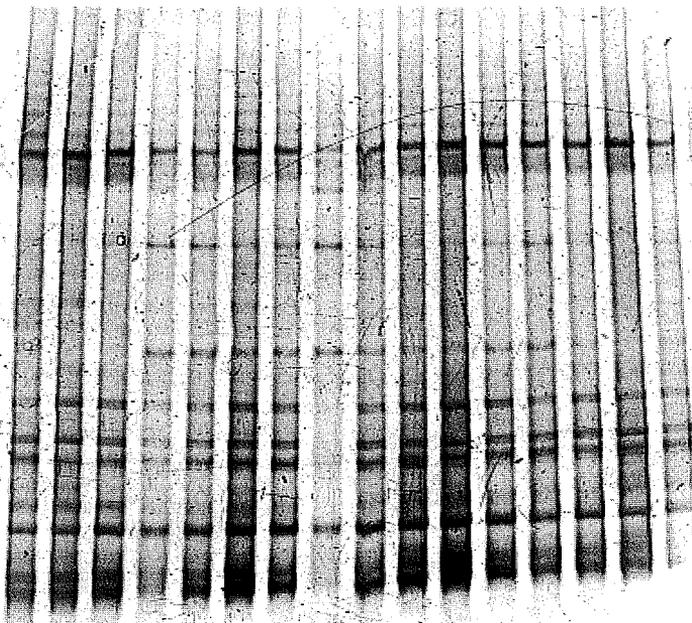


Ciascun profilo risulta costituito da 7-10 bande di maggiore intensità, oltre ad altre bande minori di più debole intensità. La presenza costante delle bande a più forte intensità in tutti i profili sembrerebbe suggerire una uniforme distribuzione di poche specie batteriche dominanti, presenti in tutti i campioni analizzati. Le differenze, invece, dovute ai segnali più deboli, potrebbero ricondursi alle specie batteriche numericamente meno rappresentate. Si può infine notare che la popolazione batterica sia del campione singolo che del campione composto sembra avere la stessa struttura molecolare.

Variabilità spaziale della struttura della comunità batterica lungo il profilo. I profili molecolari ottenuti mediante DGGE da campioni di suolo prelevati a profondità crescenti da 0 a 45 cm dalla superficie, sono mostrati in figura 2. Anche in questo caso viene confermata, almeno a livello delle bande più intense, la presenza di una popolazione batterica stabile costituita prevalentemente da poche ed ubiquitarie specie.

Figura 2. Variabilità spaziale della struttura della comunità batterica in campioni di suolo prelevati lungo il profilo da 0 a 45 cm ed analizzati in doppio. M=marcatori (dall'alto in basso): (1) *Enterobacter cloacae* BE1, (2) *Listeria innocua* ALM105, (3) *Arthrobacter* sp., and (4) *Burkholderia cepacia* P2. Corsie 1, 2: prelievo a 0-2 cm; 3, 4: prelievo a 3-7 cm; 5, 6: prelievo a 8-12 cm; 7, 8: prelievo a 13-17 cm; 9, 10: prelievo a 23-27 cm; 11, 12: prelievo a 33-37 cm; 13, 14: prelievo a 38-42 cm; 15, 16: prelievo a 43-47 cm.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M



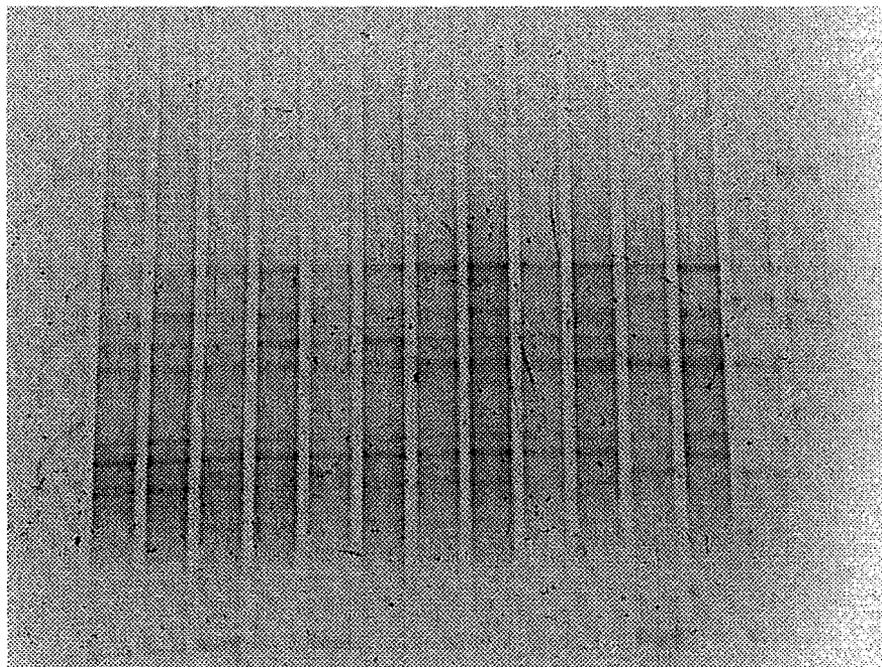
Inoltre, le rese di DNA batterico estratto, che possono essere considerate un attendibile indicatore del volume della comunità microbica di origine (Curci *et al.*, 1997), sono variate con la profondità di campionamento, e precisamente: da 25 $\mu\text{g g}^{-1}$ suolo secco in campioni di superficie, a 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. alla profondità di 10-25 cm, per poi decrescere a 12 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s. alla profondità di 45 cm. Si può pertanto dedurre che lungo il profilo del suolo la comunità microbica, pur variando nelle dimensioni, ovvero nel numero degli individui di ciascuna specie, presentava tuttavia lo stesso "fingerprint" molecolare, cioè la stessa struttura della popolazione residente.

Variabilità spaziale della struttura della comunità batterica in aggregati di suolo dopo frazionamento dimensionale. L'analisi mediante tecnica DGGE del DNA batterico estratto da classi granulometriche differenti, ottenute dopo frazionamento del campione di suolo, come illustrato in figura 3, ha rivelato, ancora una volta, una distribuzione pressoché omogenea delle specie batteriche dominanti, indipendentemente dalla loro localizzazione spaziale nel suolo.

Figura 3. Variabilità spaziale della struttura della comunità batterica in aggregati di suolo dopo frazionamento dimensionale di un campione di suolo composto prelevato in superficie (0-10 cm).

I campioni sono stati analizzati in doppio. M=marcatori (dall'alto in basso): (1) *Enterobacter cloacae* BE1, (2) *Listeria innocua* ALM105, (3) *Arthrobacter* sp., and (4) *Burkholderia cepacia* P2. Corsie 1-2: suolo tal quale; 3-4: aggregati da 4 a 2 mm; 5-6: aggregati da 2 a 0.5 mm; 7-8: aggregati da 0.5 a 0.25 mm; 9-10: aggregati da 0.25 a 0.063 mm; 11-12: aggregati <0.063 mm.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M



In conclusione, l'indagine condotta sui campioni del suolo olandese ha rivelato una struttura molecolare della comunità batterica residente particolarmente stabile. Tuttavia, pur non sottovalutando la moltitudine di fattori che possono inficiare la riproducibilità delle tecniche impiegate, in particolare la fase di amplificazione mediante PCR del materiale estratto (Wang e Wang, 1997), si può ritenere che la tecnica PCR-DGGE possa realisticamente descrivere la presenza di comunità stabili (Sheffield *et al.*, 1990; Heuer e Smalla, 1997; El Fantroussi *et al.*, 1999). Infatti i risultati ottenuti concordano con le evidenze sperimentali recentemente riportate da Felske e Akkermans (1998) in seguito a indagini condotte utilizzando ribosomi batterici estratti da suolo. Rimane comunque aperta la questione se, ed eventualmente in che misura, le proprietà chimiche e fisiche del suolo possano selezionare una popolazione batterica dominante per ogni differente contesto pedologico. Ulteriori indagini potrebbero arricchire lo stato delle conoscenze riguardanti l'interazione tra la componente microbica e l'ambiente fisico-chimico del suolo. Infine, un aumento del livello di sensibilità analitica della tecnica DGGE (risoluzione delle bande "minori") e l'accoppiamento con tecniche complementari (uso di sonde molecolari) potrebbero rivelare la variabilità nascosta nelle bande a più debole intensità.

Ringraziamenti

Esprimo la mia gratitudine al Dr. J.D. van Elsas per l'ospitalità ed il valido supporto scientifico offerto durante la mia permanenza presso il Soil Biotechnology Laboratory dell'Institute of Plant Protection (IPO-DLO) di Wageningen (Olanda), presso cui la presente ricerca è stata condotta. Desidero inoltre ringraziare il Management Committee del progetto COST, azione 831, per aver finanziato il mio soggiorno in Olanda con un contributo per Short-Term Scientific Mission.

Bibliografia

- AKKERMANS A.D.L., van ELSAS J.D., de BRUIJN F.J. (1998). *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- CURCI M., PIZZIGALLO M.D.R., CRECCHIO C., MININNI R., RUGGIERO P. (1997). Effects of conventional tillage on biochemical properties of soils. *Biology and Fertility of Soils*, 25: 1-6.
- EL FANTROUSSI S., VERSCHUERE L., VERSTRAETE W., TOP E.M. (1999). Effect of phelylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Applied & Environmental Microbiology*, 65: 982-988.
- FELSKE A., AKKERMANS A.D.L. (1998). Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in grassland soil. *Microbial Ecology*, 36: 31-36.
- GRIFFITHS B.S., RITZ K., WHEATLEY R.E. (1997). Relationship between functional diversity and genetic diversity

- in complex microbial communities. In: *Microbial communities: functional versus structural approaches* (H. Insam, A. Rangger eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-9.
- HATTORI T. (1973). *Microbial life in the soil: An introduction*, Marcel Dekker, New York, cap. 6, pp 263-312.
- HEUER H., SMALLA K. (1997). Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: *Modern Soil Microbiology* (J.D. van Elsas, J.T. Trevors, E.M.H. Wellington eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 353-373.
- HOLBEN W.E. (1994). Isolation and purification of bacterial DNA from soil. In: *Methods of Soil Analysis Part 2*. (S.H. Mickelson ed.), Soil Science Society of America, Madison, pp. 727-751.
- KEMPER W.D., ROSENAU R.C. (1986). Aggregate stability and size distribution. In: *Methods of Soil Analysis. Part 1*. 2nd ed. (A. Klute ed.), American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, pp. 425-442.
- MUYZER G., de WAAL E.C., UITTERLINDEN A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied & Environmental Microbiology*, 59: 695-700.
- SHEFFIELD V.C., COX D.R., MYERS R.M. (1990). Identifying DNA polymorphisms by denaturing gradient gel electrophoresis. In: *PCR Protocols* (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White eds.), Academic Press, San Diego, pp. 206-218.
- SMALLA K., WACHTENDORF U., HEUER H., LIU W.-T., FORNEY L. (1998). Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Applied & Environmental Microbiology*, 64, 1220-1225.
- STOTZKY G. (1997). Soil as an environment for microbial life. In: *Modern Soil Microbiology* (J.D. van Elsas, J.T. Trevors, E.M.H. Wellington eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1-20.
- van ELSAS J.D., MÄNTYNEN V., WOLTERS A.C. (1997b). Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenolicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. *Biology and Fertility of Soils*, 24: 188-195.
- van ELSAS J.D., TREVORS J.T., WELLINGTON E.M.H. (1997a). *Modern Soil Microbiology*, Marcel Dekker Inc., New York, 683 pp.
- van ELSAS J.D., WOLTERS A.C. (1995). Polymerase chain reaction (PCR) of soil microbial DNA. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*. (A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn eds.), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, sec. 2.7.2: 1-10.
- WANG G.C.-Y., WANG Y. (1997). Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Applied & Environmental Microbiology*, 63, 4645-4650.



Giornata di Studio
Osservatorio Nazionale Permanente
per i Fertilizzanti

NUOVI INDIRIZZI PER LA PRODUZIONE



Scuola Superiore di Studi Universitari e di Perfezionamento
S. Anna

Via Carducci, 40
Pisa, 24 Marzo 2000



L'Osservatorio Permanente per i Fertilizzanti propone una seconda Giornata di Studio quale appuntamento annuale di incontro. Il Tema di quest'anno riguarda i nuovi indirizzi della produzione che l'industria dei fertilizzanti è andata sviluppando in questi ultimi anni. Molti, ad esempio, non solo tra gli utenti, si trovano spesso a porsi delle domande sull'efficacia agronomica dei biostimolanti o sul meccanismo d'azione di alcuni inibitori della nitrificazione o dei chelanti naturali. Altri ancora si chiedono cosa ci sia dietro la parola biofertilizzanti o come ottimizzare il loro impiego.

L'Osservatorio ha promosso questa giornata di approfondimento coinvolgendo ricercatori che quotidianamente con il loro lavoro cercano di dare una risposta a questi interrogativi nella speranza che il dibattito che ne potrà scaturire possa essere di comune utilità a ricercatori, produttori e conservatori.

CONTROLLED-RELEASE FERTILIZERS AND FERTILIZERS WITH NITRIFICATION INHIBITOR

Wolfram Zerulla

BASF Agricultural Center Limburgerhof, Germany

Frequently, controlled-release fertilizers (CRF's) and fertilizers with nitrification inhibitor are erroneously both treated together as slow-release fertilizers. Erroneously, because these two types of fertilizer have a totally different mode of action. Therefore it has to be defined what in this paper will be meant by 'CRF' and what by 'fertilizer with nitrification inhibitor'.

Definitions:

Slow and controlled-release fertilizers (SRF; CRF) are fertilizers containing a plant nutrient in a form which either delays its availability for plant uptake and use after application, or which is available to the plant significantly longer than ammonium nitrate or urea, ammonium phosphate or potassium chloride.

There is no official differentiation between slow-release and controlled-release fertilizers. However, the microbially decomposed N products, such as Isodur, Crotodur or Ureaform, are commonly referred to in the trade as slow-release fertilizers and coated or encapsulated products as controlled-release fertilizers.

Nitrification inhibitors are compounds that delay bacterial oxidation of the ammonium-ion (NH_4^+) by depressing over a certain period of time the activities of *Nitrosomonas* bacteria in the soil. They are responsible for the transformation of ammonium into nitrite (NO_2^-) which is further changed into nitrate (NO_3^-) by *Nitrobacter* and *Nitrosolobus* bacteria.

For the plants this means, that:

- in a SRF, nitrogen is present in a form which is not available for plant uptake, and first has to be transformed by microbes into ammonium and nitrate. Thus, SRFs are fertilizers with a long-term effect due to a chemical-synthetic compound.
- With a CRF, the fertilizer nitrogen is applied in the plant available

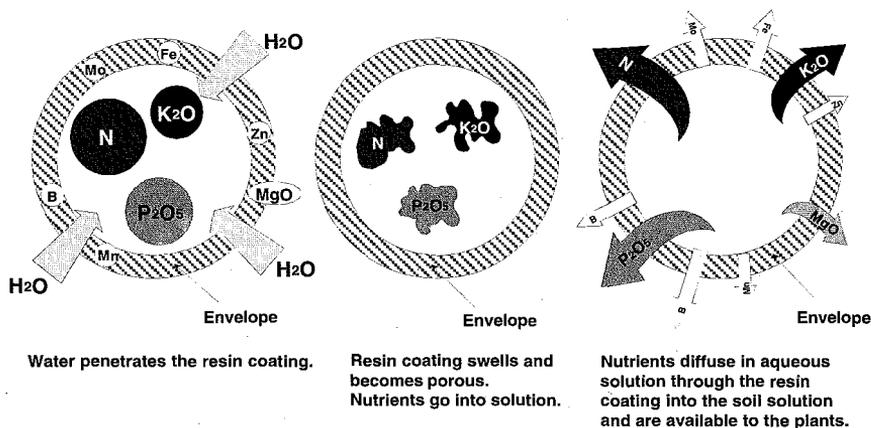
forms ammonium and nitrate, but a more or less permeable coating prevents the unwanted uptake by the plants of excessive amounts of nutrients from the fertilizer granules. This means that the long-term effect is obtained by a physical barrier.

- Fertilizers with nitrification inhibitor do generally contain ammonium which is plant available and protected by the nitrification inhibitor against transformation into nitrate. I.e. plants can absorb this ammonium immediately, and it is actually wanted that they do so. Therefore, and opposed to the two other fertilizer types, a fertilizer with nitrification inhibitor is not a slow-release fertilizer.

Nutrient release from coated fertilizers

Nutrients are released from coated fertilizers, as water diffuses into the coating which then becomes "porous" so that step by step nutrients can enter the soil solution.

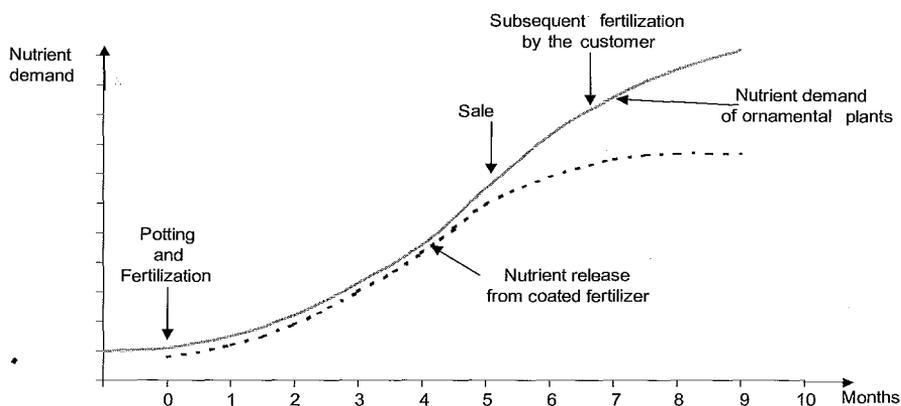
Figure 1: Mode of action of a coated fertilizer



Generally, the time period over which nutrients are released from coated fertilizers with conventional coating substances is 3 to 12 months, depending on the thickness of the coating and on environmental conditions.

This is ideal for ornamental plants in pots or containers (see figure 2), as thus there is no need for time consuming and cost intensive fertilizer top-dressing during the nursery period. In addition, the salt stress for the plants thus fertilized is reduced to a minimum which facilitates depot fertilization or mechanical localized fertilizer application.

Figure 2: Cumulated nutrient release from a coated fertilizer compared to the cumulated nutrient demand of ornamental plant (6-month type, idealized)



When coated fertilizers are used in the production of ornamental plants, this is hardly a matter of environmental consciousness but is clearly done for economic reasons.

However, the environmental problems connected with fertilizer application to field crops, are clearly reduced by fertilizer coating.

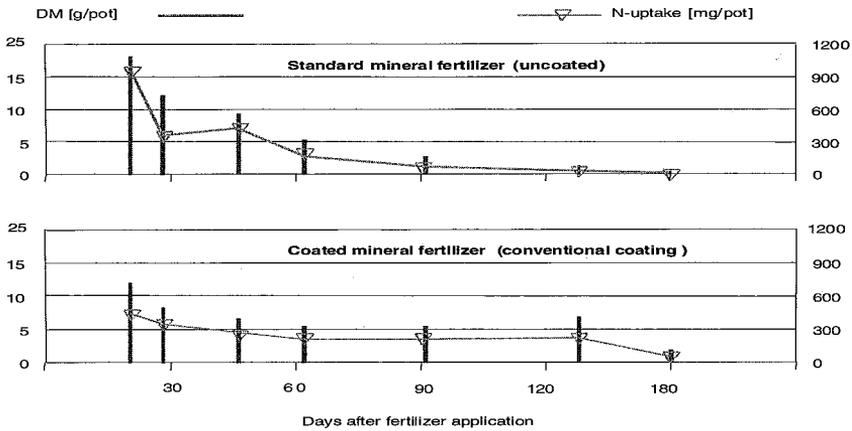
For as long as the coated nutrients, namely N, have not diffused into the soil solution, they are protected against translocation, leaching, fixation or volatilization.

Since the use of coated fertilizers results in additional slow-release fertilizer effects, as they are known from Isodur-containing fertilizers, it is and was also an option for field crops, the more so as coated fertilizers constitute a cost-effective alternative to customary slow-release fertilizers.

However, with all coating materials registered so far, the release characteristics of 100 % coated fertilizers for field crops are not optimal so that the grower has to make compromises.

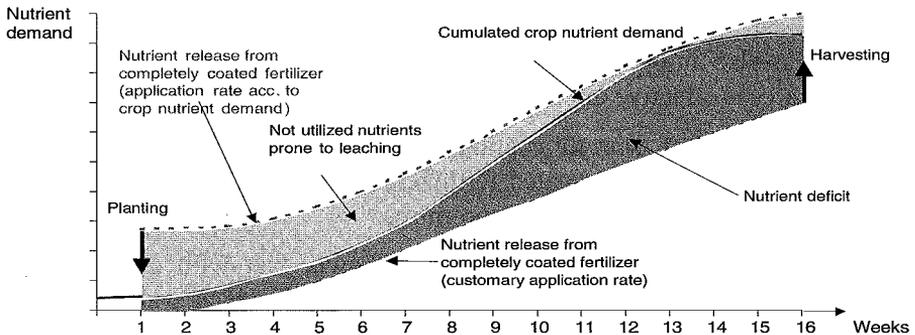
Pot trials with ryegrass have shown, that with all presently known coated fertilizers, after a 'lag period' during which water diffuses through the coating, there is a more or less continuous nutrient release over the vegetation period until the nutrient concentration in the fertilizer granules drops significantly (see figure 3). Although its cumulative representation results in a S-shaped curve similar to that for the cumulated nutrient requirement of a field crop, both curves differ significantly in regard to their aspect.

Figure 3: Model trial on the nutrient release from coated fertilizers - Ryegrass, Mitscherlich pots, 2.4 g N/pot -



When a fertilizer which consists of 100% coated granules only is applied to a vegetable crop at the customary nutrient rate, this will result within short- due to its specific nutrient release profile - in a nutrient deficit for the crop; to ensure an adequate supply the application rate would have to be raised substantially (see figure 4).

Figure 4: Cumulated nutrient release from a coated fertilizer compared to the cumulated nutrient demand of a vegetable crop (4-month cultivation period, idealized, 100 % coated fertilizer granules)



A nutrient deficit would cause yield reduction, unsatisfactory crop quality or might even result in the production of not-marketable produce. In the case of a sufficient nutrient supply, the production costs would be strongly increased and postponed environmental problems would be created.

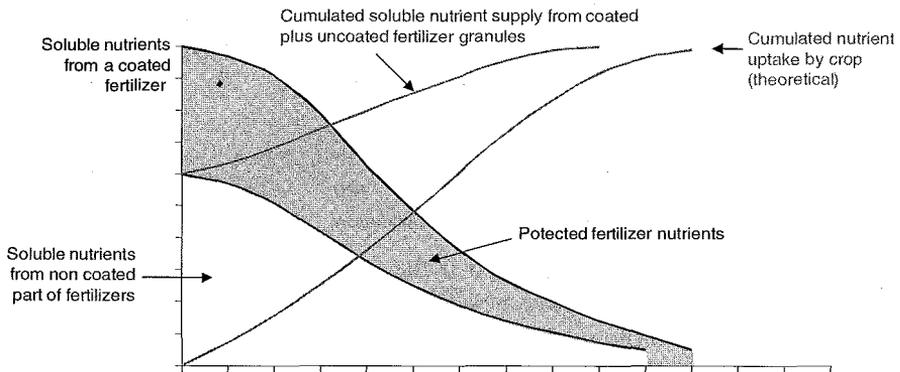
As it is not practicable to try to achieve environmental gains at

the cost of economic losses for the grower, compromises have to be made in this case.

In the present example, to make compromises means that for the application to field crops the coated fertilizer has to be mixed with conventional non-coated fertilizer granules, so that the positive properties of the coated material as regards environment and crop quality are exploited as far as possible, while at the same time enough nutrients for immediate uptake are supplied.

For such a blend, the comparison between fertilizer nutrient supply and crop nutrient requirement looks as follows (see figure 5):

Figure 5: Cumulated nutrient release from a partly coated fertilizer in comparison to the cumulated nutrient requirement of a vegetable crop (4-month cultivation period, idealized)

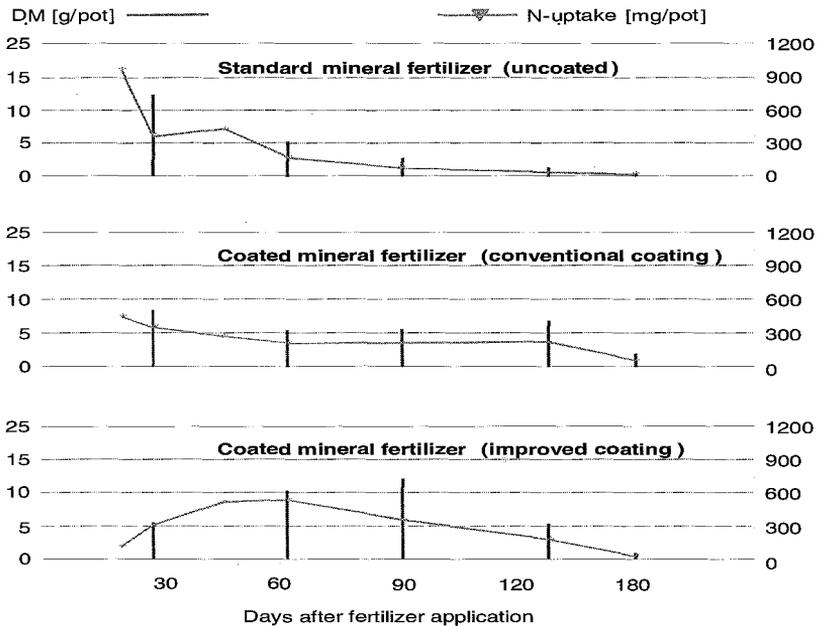


While the application of an easily soluble fertilizer leads to a substantial nutrient surplus in the soil during the first stages of crop growth, this surplus is significantly reduced by applying part of the fertilizer in coated form (thus preventing nutrients from translocation, leaching, fixation, etc.). Additional nutrients then become available as they are released from the coated portion of the fertilizer.

A look at the graph for the total supply of immediately plant available nutrients from coated and uncoated fertilizer granules shows, that the supply is now better adapted to the crop's nutrient demand, however, a nutrient surplus over a certain part of the cultivation period can not be avoided (see figure 6).

Therefore, it would be beneficial both for the environment and for the grower (and would lead to even better slow-release fertilizers), to have a fertilizer coating material with release characteristics which more closely match the nutrient demand of field crops.

Figure 6: Model trial on the nutrient release from coated fertilizers



This could be achieved if the permeability of the coating substance were not primarily governed by physical factors, but were increasingly dependent on biological factors.

Research at BASF Aktiengesellschaft has been following this approach for several years and first results show that we are on the right track.

Results from pot trials with ryegrass show that at the onset of vegetation these new coating materials release noticeably less nutrients than any coating material currently on the market, but that later-on nutrient release increases significantly and is thus better adapted to the nutrient demand of field crops.

This new generation of coated fertilizers will make it possible to significantly increase the percentage of coated granules in fertilizers for application to field crops, so that the environmental advantages of coated fertilizers can be better exploited, and their slow-release effect can be enhanced.

Fertilizers with nitrification inhibitor

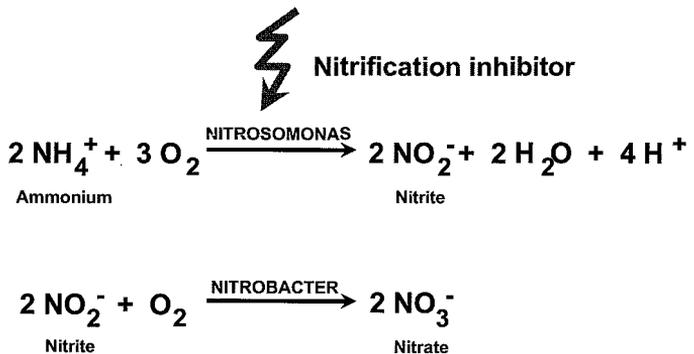
Even in intensively managed cash crop production, utilization rate of mineral fertilizer nitrogen is only 50 to 70 %, so that, for economic

and ecological reasons, the increase of fertilizer nitrogen efficiency continues to be the main objective of nitrogen related research. Results in this direction are expected from site-specific crop management, from the use of sensors for nitrogen application monitoring, and from the introduction of so-called nitrogen efficient varieties.

A further possibility to increase fertilizer nitrogen utilization rate is the improvement of the fertilizer itself, e.g. by addition of a nitrification inhibitor.

Nitrification inhibitors are substances by which the oxidation of ammonium to nitrite in the soil (first step of nitrification) can be retarded for a certain period of time.

Figure 7: Schematic representation of nitrification



The amount of nitrate present in the soil during the inhibition period is then also significantly reduced. Since nitrate is considered to be the source of major processes of N loss (leaching, denitrification), nitrification inhibitors can help to reduce the environmental problems which stem from nitrogen application, while increasing fertilizer nitrogen efficiency.

Practical advantages for agriculture and horticulture, as well as for the environment, are, that:

- the risk of nitrate leaching-losses is significantly reduced for fertilizers with nitrification inhibitor, compared to conventional fertilizers;
- the emission of nitrous greenhouse gases, especially of nitrous oxide, is drastically decreased by the addition of a nitrification inhibitor to fertilizers;
- smaller N losses and the temporary ammonium nutrition of crops to which fertilizers with nitrification inhibitor have been applied, often lead to yield increases and lead to a better N utilization by plants;

- the work-load of growers is reduced due to a more flexible fertilizer application timing, and by the possibility to combine or to save application rounds.

Worldwide, hundreds of nitrification inhibitors are known, with more or less specific action. On a global scale, only two nitrification inhibitors have so far gained importance for practical use; these are: DCD in Europe and, to a limited extent, in the US (Didin^{®(1)}, Ensan^{®(2)}) and – exclusively in the US - Nitrapyrin (Nserve^{®(3)}).

Besides the advantages specified above, both compounds also have significant disadvantages.

Figure 8: Disadvantages of presently used nitrification inhibitors

Dicyandiamide	Nitrapyrin
<ul style="list-style-type: none"> → too expensive → high application rate to achieve effective inhibition → prone to translocation in soil → phytotoxic problems possible 	<ul style="list-style-type: none"> → high vapor pressure → organo-chlorine-compound → toxicologic problems → corrosive → explosive

DCD is just too expensive for large-scale use in agriculture and horticulture. Also, its efficiency is comparatively low, so that high application rates are needed for a sufficient nitrification inhibition (e.g. 15-30 kg/ha DCD together with a slurry application).

As DCD is easily water soluble, intensive precipitation may lead to its translocation within the soil profile, resulting in the spatial separation of the nitrification inhibitor from the NH_4 to be stabilized. In addition, under certain agro-climatological conditions, DCD use may cause phytotoxicity which, though not leading to reduced yields, affect the marketability, e.g. of leaf vegetables.

Nitrapyrin has an extremely high vapor pressure which excludes its addition to solid fertilizers. Therefore, Nserve is almost exclusively used as an additive to anhydrous ammonia for pre-winter application, as practiced in large areas of the USA.

(1) Didin, registered trade mark of SKW Trostberg

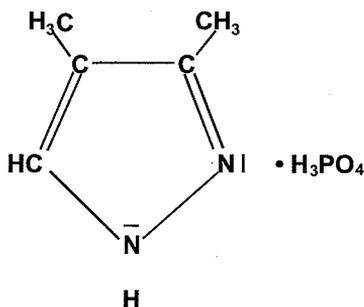
(2) Ensan, registered trade mark of BASF AG

(3) Nserve, registered trade mark of DOW Agroscience

Moreover, this substance belongs to the group of organic chlorine compounds, the release of which into the environment faces increasing opposition; finally, it is corrosive and explosive and it poses certain toxicology problems.

In the frame of a research project by the German Federal Ministry for Research and Technology, BASF in cooperation with universities and research institutes developed a new nitrification inhibitor which does not feature the problems of the above mentioned compounds. This new nitrification inhibitor is 3,4-dimethylpyrazol-phosphate (DMPP; ENTEC^{®(4)}, see Figure 9).

Figure 9: Structural formula of 3,4-dimethylpyrazol-phosphate (DMPP)



Trade mark: **ENTEC**

According to European legislation, DMPP is a new substance, and as such has been submitted to extensive toxicology and ecotoxicology tests.

None of these assays indicates any problematic characteristics of DMPP. DMPP has both been declared under the Chemicals Act and been internationally registered according to fertilizer laws.

DMPP is effective at very low rates. Already an application of 0.5 – 1.5 kg/ha DMPP, depending

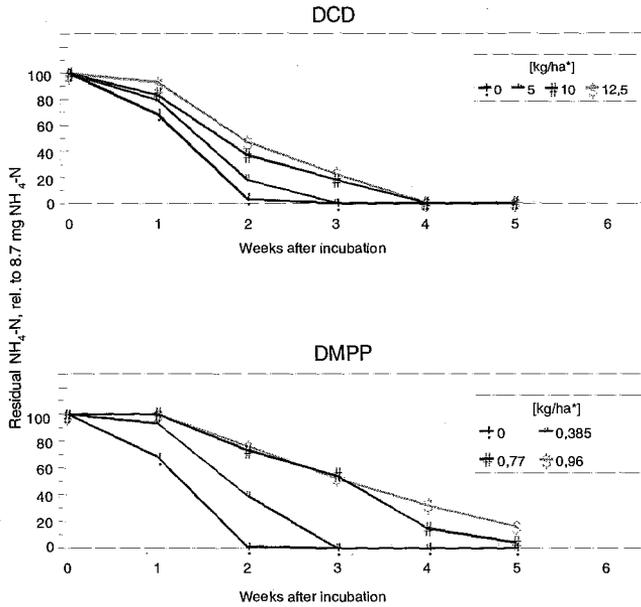
on climatic conditions, site, and kind of crop, is sufficient to securely inhibit nitrification over a period of 4 – 10 weeks. Thus, compared to DCD, a comparable if not better inhibition effect is achieved with less than one-tenth of the application rate (see Figure 10). Therefore, mineral fertilizers with DMPP contain only 1% active ingredient, based on their ammonium-N or carbamide-N content.

As could be expected, the intensity of nitrification inhibition depends on environmental conditions. The period of time over which a nitrification inhibitor is effective strongly depends on soil temperature. This also applies to DMPP (see figure 11).

Other than temperature, soil type and precipitation at the respective site influence the inhibitory effect of DMPP. You can show, that the yield-increasing effect of DMPP was the stronger, the lighter the soil and the higher the amount of precipitation in the period January to July see figure 13).

(4) ENTEC, registered trade mark of COMPO GmbH & Co. KG

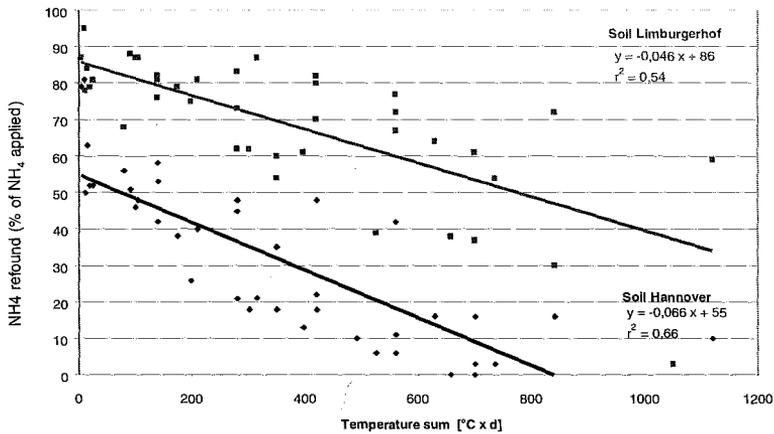
Figure 10: Inhibition effect of DMPP and DCD



*) application rate of mg/100 g soil projected to kg/ha applied N amount

Figure 11: Effect of DMPP on the amount of NH₄ recovered at different temperatures

Relation between temperature sum and ammonium recovered in two soils



This relation gives an indication for the risk of potential nitrate leaching at the respective site. The higher this risk, the greater the chance that the addition of a nitrification inhibitor will result in improved N efficiency and thus in a yield increase.

Figure 12: Effect of ENTEC 26 on the grain yield of winter wheat, depending on soil rating – 1997 - 1999

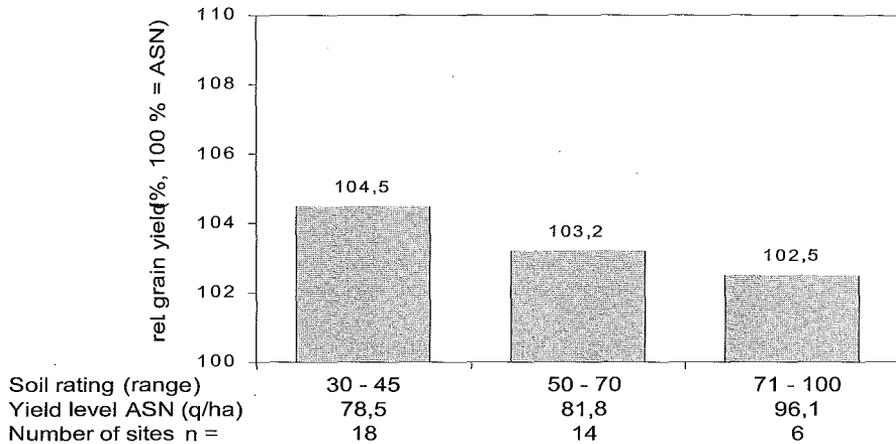
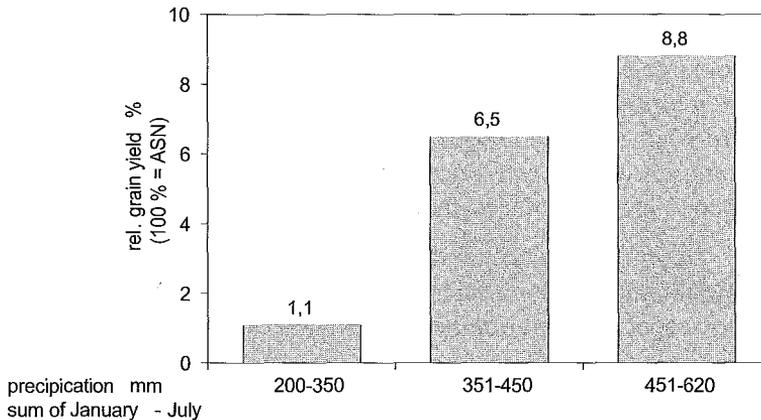
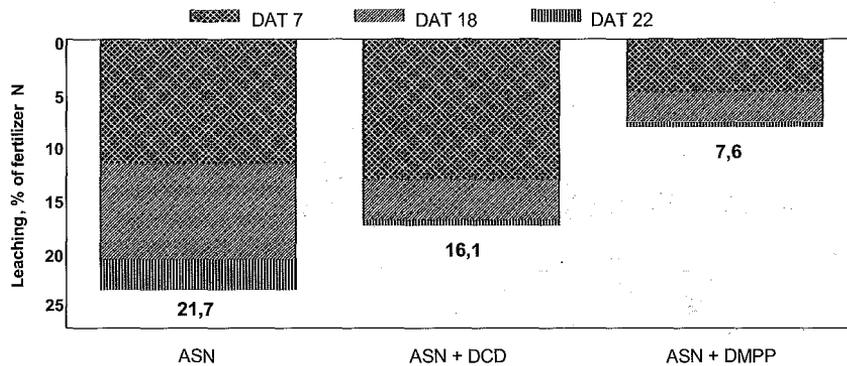


Figure 13: Effect of ENTEC 26 on the grain yield of winter wheat, depending on precipitation (sum of January – July)



It could be shown, both in model experiments in Mitscherlich pots (see Figure 14) and in lysimeter experiments conducted under adverse environmental conditions in Spain, that DMPP offers a better protection against the risk of nitrate leaching than does DCD.

Figure 14: Nitrate leaching under spinach after application of different nitrification inhibitors



(Mitscherlich pot; soil Ruchheim; fertilizer application after emergence; 20 mm add. irrigation per leaching)

DMPP is not translocated within the soil profile; only mechanical incorporation into the ploughed soil layer by soil tillage has been observed. Thus, there is no spatial separation of the nitrification inhibitor from the fertilizer ammonium. The risk of DMPP being leached into the groundwater can thus also be excluded. In lysimeter studies acc. to BBA specifications, no DMPP concentrations above the detection limit of 0.5 µg/L could be found in the leachate.

An additional important environmental advantage of nitrification inhibitors can be seen in the repeatedly documented reduction of N₂O losses after a nitrogen application. It seems that DMPP is especially effective in this respect. At a site in Germany, this new nitrification inhibitor reduced the emission of nitrous oxide more effectively than DCD, without having a negative effect on the methane sorption capacity of the soil.

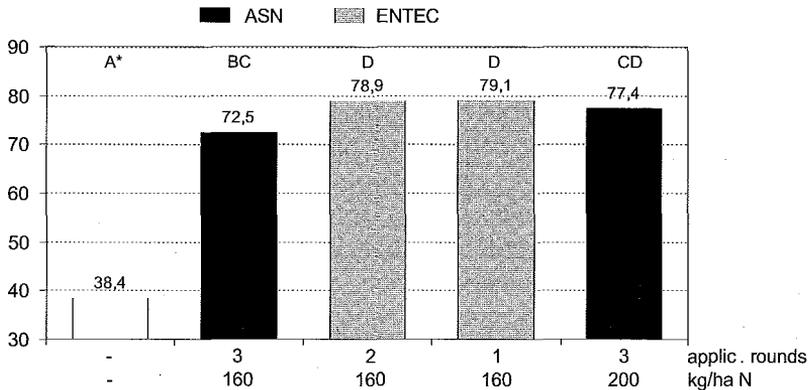
As the choice of a fertilizer is primarily a question of economy, a nitrification inhibitor has to offer practical advantages for the grower besides the above specified environmental advantages.

Frequently claimed advantages for the use of a fertilizer with nitrification inhibitor are increased yields, the possibility to save fertilizer nitrogen and to reduce the number of fertilizer applications.

These advantages have also been obtained with the use of DMPP-containing fertilizers in numerous experiments under West and South European conditions.

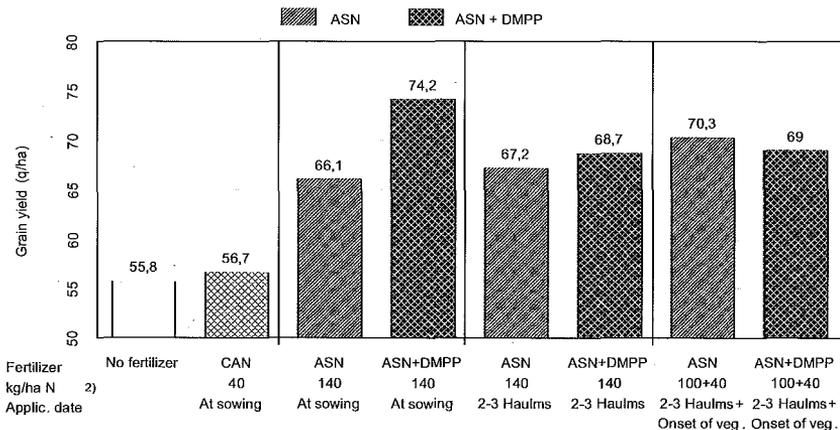
For most crops, significant yield increases compared to the control fertilizer without nitrification inhibitor were obtained when averaging the results of application-technology experiments; the number of application rounds could always be reduced see figure 15 and 16).

Figure 15: Saving of fertilizer nitrogen or of application rounds with ENTEC containing fertilizers, Example: winter wheat 1997 – 1998, n = 4 Results by TU München-Weihenstephan



*Same letter: no significant difference (Duncan-Test, $\alpha = 5\%$)

Figure 16: Effect of DMPP on the yield of winter wheat in Italy (1998 n = 1)



1) ASN+DMPP = LAB 843 = 1,56 % rel. NH 4-N

2) at sowing = October 1997, 2-3 haulms = 2-3 haulms, onset of vegetation = spring 1998

In many experiments with vegetables, DMPP use resulted in reduced nitrate concentration in the fresh matter; plants frequently had a more intensive green color (see figure 18). The positive effects of a DMPP application could be found even in permanent crops such as citrus, apples and grapevines.

Figure 17: Effect of ENTEC fertilizers on the yield of vegetable crops (1998, 1999)

Kultur	n =	Marktertrag, rel.			
		N-suboptimal, N ₁		N-optimal, N ₂	
		ohne	mit	ohne	mit
		ENTE C		ENTE C	
Salate	13	100	104	100	99
Blumenkohl	6	100	115 ¹⁾	100	110 ¹⁾
Kopfkohl	2	100	106 ¹⁾	100	102 ¹⁾
Chinakohl	2	100	105 ¹⁾	100	106 ¹⁾
Porree	7	100	102	100	109
Sellerie	5	100	103 ¹⁾	100	109 ¹⁾
Zwiebeln	4	100	102 ¹⁾	100	101 ¹⁾
Feldsalat	5	100	150	100	155
Radies	3	100	118	100	106
Mittel	n = 46	100	110	100	109

¹⁾Düngung in 1 Gabe weniger

Figure 18: Effect of ENTEC fertilizers on the nitrate content of harvested vegetables (1999; Mean of 2 N levels)

Crop	n =	ppm NO ₃ in FM		
		No fertilizer	without	with
			ENTE C	
Lettuce	7	295	720	348
Cauliflower	6	23	152	110
Leek	7	48	73	61
Celeriac	5	238	449	393
Lambs 'lettuce	3	66	2447	1699
Radish	3	693	1480	1353
Carrot ¹⁾	2	38	102	51
Spinach	4	38	1706	1168

¹⁾only 1 N level

²⁾Mean of spring and autumn cultivation

DMPP proved to be excellently plant compatible. So far, there have been no experiments in soil in which the application of ENTEC-fertilizers caused a phytotoxic reaction. Even an 8-fold overdose of the DMPP application rate did not lead to any symptoms in the plants, whereas DCD caused pronounced symptoms. This is not astonishing, as in the residue analysis experiments - with extremely rare exceptions - practically no traces of DMPP could be detected in plants, while DCD is liable to plant uptake in considerable amounts.

I FUNGHI SIMBIONTI COME BIOFERTILIZZATORI: BASI TEORICHE E PROSPETTIVE DI APPLICAZIONE

Paola Bonfante

Centro di Studio sulla Micologia del Terreno del CNR e Dipartimento di Biologia vegetale
dell'Università di Torino

Viale Mattioli 25 - 10125 Torino

I funghi micorrizici - insieme con altri microorganismi del suolo - vengono attualmente considerati degli efficaci "biofertilizzanti". Molte ricerche degli ultimi anni hanno dimostrato che i funghi simbionti svolgono non solo un ruolo ecologico fondamentale, in quanto controllano la qualità delle comunità vegetali e ne aumentano la biodiversità (van der Heijden *et al.*, 1998), ma anche assumono un notevole interesse nello sviluppo di una *agricoltura sostenibile*, basata fundamentalmente sulla limitazione dei fertilizzanti, sul rispetto degli equilibri microbiologici e sulla conservazione della struttura del suolo (Gianinazzi e Schuepp, 1994).

I funghi micorrizici appartengono a circa 6000 specie fungine, variamente distribuite tra le classi degli Zigomiceti, Ascomiceti, Basidiomiceti; si associano con le radici del 90% delle piante terrestri, circa 240000 specie, tra cui le più importanti piante di interesse agricolo e forestale. Si realizzano in questo modo delle simbiosi che sono le più diffuse sulla terra e che, a seconda della posizione sistematica dei partners e delle loro interazioni cellulari, si distinguono nei due tipi principali delle ectomicorrize ed endomicorrize, a seconda se il fungo attraversa o no la parete cellulare della pianta ospite (Bonfante e Perotto, 1995). Il primo gruppo mostra notevole variabilità, per cui si riconoscono ulteriormente: micorrize arbuscolari, micorrize delle *Ericales*, micorrize delle Orchidee (Smith e Read, 1997). Grazie alla simbiosi micorrizica, basata sullo scambio di nutrienti, la pianta migliora il suo sviluppo vegetativo, mentre il fungo completa con successo il suo ciclo vitale.

Lo scopo di questo breve lavoro è quello di offrire una sintetica panoramica delle nostre attuali conoscenze sul ruolo dei funghi micorrizici nel riciclo dei nutrienti all'interfaccia suolo-radici. Attraverso i più recenti risultati ottenuti usando approcci molecolari si è ora in grado di dare una spiegazione razionale al cosiddetto "effetto crescita" (Smith e Read, 1997), vale a dire la diffusa nozione che le piante micorriziche crescono meglio, proprio grazie alla migliorata nutrizione minerale.

Tali approcci sono riduzionistici rispetto ad una visione globale

delle micorrize negli ecosistemi, ma hanno permesso di concentrare l'attenzione sui meccanismi di assorbimento del fosforo e dell'azoto, e di identificare le ife extraradicali come le strutture fungine attive in tali processi. Sono proprio queste ife ad essere in grado di assorbire i nutrienti dal suolo, di trasportare gli ioni e i metaboliti assimilati all'ospite anche attraverso cordoni ifali che possono raggiungere nel caso di alcuni funghi ectomicorrizici notevoli livelli di specializzazione (Bianciotto e Bonfante, 1998; Perez-Moreno e Read, 2000).

Il meccanismo di assorbimento effettuato dai funghi simbiotici è particolarmente importante per gli ioni che sono poco mobili, per esempio il fosfato inorganico, o per quei nutrienti che sono legati alle particelle di suolo, come il ione ammonio. E' ben noto che tali ioni sono limitanti per la crescita delle piante, in quanto in seguito all'assorbimento da parte dei peli radicali, essi diventano carenti nella rizosfera, dove si forma una zona di deplezione (Maschner, 1995). Le ife dei funghi simbiotici sono in grado di controbilanciare in modo efficiente tale area di deplezione, in quanto i nutrienti attraverso le ife fungine passano alle cellule radicali che agiscono da sink più velocemente di quanto essi diffondano nel suolo (Smith and Read, 1997). L'aumento di velocità di assorbimento delle radici micorrizzate è proprio spiegato da questa più veloce attività di traslocazione. Dal canto suo, il fungo riceve composti carboidratici, stabilendo pertanto uno scambio a doppia via che avviene solo tra cellule metabolicamente vive dei due partners (Harrison, 1999): la caratterizzazione delle zone di interfaccia tra i due simbiotici è la base strutturale per comprendere gli scambi nutritivi tra pianta e fungo (Bonfante, 2000).

L'acquisizione di fosforo da parte dei funghi micorrizici

Il miglior sviluppo vegetativo delle piante micorrizzate è in primo luogo dovuto alla migliorata disponibilità di fosforo. Questo dato era emerso fin dalle prime esperienze citate da Jack Harley negli anni 60 (Harley e Smith, 1983) ed ha rappresentato il punto di partenza per spiegare il grande interesse suscitato dai funghi simbiotici come biofertilizzatori. Essi infatti sono in grado di assumere il fosforo libero nella soluzione del suolo al di là della zona di deplezione, e trasferirlo alla pianta (Maschner, 1995). L'assunzione è probabilmente regolata dalle riserve intracellulari di P che può anche essere presente nel citoplasma fungino sotto forma di granuli di polifosfati. Sono questi delle catene di circa 10 residui di fosfato, che vengono immagazzinati all'interno dei vacuoli fungini, dove rappresentano una riserva di polianioni, giocando pure un ruolo importante nell'osmoregolazione (Martin *et al.*, 2000 per una revisione dei dati). Nel caso dei funghi ectomicorrizici è noto che essi possono solubilizzare forme di fosforo non solubili-

zabili dalla pianta, come fosfati di calcio ed alluminio o esofosfati di inositolo, grazie alla secrezione controllata di fosfatasi extracellulari.

La scoperta di Harrison e van Buuren (1995) ha rappresentato la chiave di svolta per comprendere numerosi processi: esse scoprirono che un gene che codifica per un trasportatore ad alta affinità per il fosfato è presente in *Glomus versiforme*, un fungo micorrizico arbuscolare (AM) e che il trasportatore è attivo solo nelle ife esterne. Questo dato suggerisce che esso rappresenti il primo anello nella tappa di assorbimento del P dal suolo alle radici. Una volta all'interno, il P deve essere spostato lungo le ife tramite l'accumulo vacuolare anche attraverso la condensazione in granuli di polisfato e poi ceduto alla pianta probabilmente nelle cellule dove ci sono gli arbuscoli. In realtà, colorazioni citochimiche per le fosfatasi avevano già suggerito questa localizzazione negli anni passati (Smith e Read, 1997). Tuttavia, solo recentemente il gruppo di Sally Smith (Rosewarne *et al.*, 1999) è stato in grado di fornire prove più convincenti. Essi hanno trovato che in *Lycopersicon* è espresso un trasportatore del fosfato inorganico, tipico della pianta e che risulta essere attivo particolarmente quando la pianta è in carenza di fosforo. Esso è espresso soprattutto nelle cellule che contengono gli arbuscoli. Sulla base di queste osservazioni, gli autori propongono un interessante modello integrato di assunzione e trasporto del P dal suolo alle radici tramite le ife extraradicali.

L'acquisizione dell'azoto da parte dei funghi micorrizici

I funghi micorrizici hanno capacità differenziate di esplorare nicchie diverse anche nello stesso ecosistema e di utilizzare variamente le sorgenti di elementi minerali (Read, 1991; Sen, 2000). Questo è particolarmente vero per l'azoto: cospicue modificazioni dipendono dalla sua concentrazione ambientale, dalle sue forme, dalla disponibilità differenziale per le piante che è correlata con il ciclo di degradazione da parte dei microrganismi del suolo. Ad esempio, a basse temperature e a pH acidi, la mineralizzazione dell'azoto è così lenta che la disponibilità e l'uso di fonti organiche diventano essenziali. I funghi ectomicorrizici ed ericoidi, che sono in grado già in coltura pura di crescere su fonti di azoto organico come proteine a basso peso molecolare, danno un contributo cruciale in questa direzione (per una review vedere Martin *et al.* 2000). Essi infatti sono in grado di assimilare aminoacidi come glutamina, glutamato ed alanina, che predominano nelle soluzioni circolanti del suolo, oltre che peptidi che provengono dalla degradazione di proteine. Al contrario, la capacità dei funghi ectomicorrizici di assorbire nitrati è ancora sotto discussione. Molto recentemente un clone di

cDNA che codifica per un trasportatore fungino di aminoacidi è stato identificato nelle ectomicorrize di *Amanita muscaria* (Nehls *et al.*, 1999). L'espressione di questo gene viene amplificata di 10 volte in assenza di una sorgente di azoto che il fungo possa utilizzare e - dato molto interessante - viene confermato che il nitrato non è una sorgente assimilabile. L'analisi molto accurata della funzionalità genica dimostra che questo trasportatore svolge due funzioni chiave: permettere l'assorbimento di aminoacidi dal suolo essenziali per la nutrizione fungina ed impedire che ci sia una perdita di aminoacidi in assenza di una opportuna fonte di azoto. Il processo di trasferimento alla pianta non è ancora stato tuttavia chiarito.

Al contrario, i funghi AMs sono molto attivi nell'assorbire ioni nitrato: una volta assorbito il nitrato è assimilato in glutamato e glutamina che sono poi usati per la sintesi degli altri amminoacidi. Le vie di assimilazione variano notevolmente a seconda dell'associazione con la pianta ospite. Anche in questo caso l'approccio molecolare ha portato ad interessanti contributi: Kaldorf *et al.* (1998) hanno dimostrato che geni della nitrato reductasi sono espressi nelle radici micorrizzate di mais e che è possibile distinguere l'espressione di geni che appartengono sia al fungo simbionte (*Glomus*) sia alla pianta ospite.

I funghi micorrizici non sono soli nella loro opera di biofertilizzatori

Le associazioni tra funghi simbiotici e microorganismi del suolo sono state recentemente oggetto di numerose analisi (Barea, 1997; Perotto e Bonfante 1997): grazie alla benefica sinergia tra le diverse popolazioni microbiche della rizosfera ci possono essere rilevanti effetti sulla salute delle piante. Molti meccanismi sono già stati suggeriti per spiegare queste interazioni: produzione di fitoormoni, rilascio di enzimi, di vitamine, di stimolatori di crescita (Sen, 2000). Nonostante la copiosa produzione, spiegazioni del tutto soddisfacenti di come avvenga il sinergismo tra funghi AMs e batteri che appartengono alla categoria dei Plant Growth Promoting Rhizobacteria non sono disponibili. Partendo da un'ipotesi meccanicistica abbiamo suggerito che l'adesione tra PGPRs e funghi AMs sia uno strumento importante, in quanto la capacità di alcuni ceppi di formare biofilm sulla superficie delle ife potrebbe evitare il loro percolamento e quindi la perdita dell'inoculo. In questo modo, un numero superiore di batteri potrebbe raggiungere la superficie radicale, dove può esplicare i suoi benefici effetti (Bianciotto *et al.*, 1996a). Dati più recenti mostrano come alcuni ceppi di *Pseudomonas*,

selezionati in base alle loro capacità di biocontrollo, aderiscano alle ife fungine in base alla presenza o no di molecole specifiche come mucopolisaccardi (Bianciotto *et al.*, in preparazione).

Tuttavia, i funghi AMs non stabiliscono interazioni solo con i batteri della rizosfera: abbiamo dimostrato che un ceppo di *Gigaspora margarita* (BEG 34) possiede all'interno del suo citoplasma una massiccia popolazione di batteri riportabili al genere *Burkholderia* in base alla sequenza del 16 S dei geni ribosomali (Bianciotto *et al.*, 1996b). Inoltre, analisi dettagliate condotte su numerosi isolati di funghi appartenenti alle *Gigasporaceae* hanno dimostrato che la presenza di tali colonie batteriche è assai frequente. Batteri simili a *Burkholderia* sono stati identificati in almeno tre altri isolati (Bianciotto *et al.*, in preparazione). La disponibilità di una libreria genomica costruita per il fungo ospite, *G. margarita* BEG 34, ci ha dato l'inattesa opportunità di analizzare il genoma del batterio (van Buuren *et al.*, 1999), batterio che non è coltivabile almeno finora *in vitro*. Accanto ad alcune sequenze geniche di interesse per la nutrizione minerale, quale un trasportatore del fosfato (Ruiz-Losano e Bonfante, 1999) abbiamo identificato l'intero operone nifHDKD (Minerdi, R. Fani e P. Bonfante, in preparazione). Tale operone codifica per le componenti I e II della nitrogenasi (Minerdi 2000).

La presenza di batteri con capacità potenziale di fissare l'azoto atmosferico all'interno di funghi simbiotici apre nuove e stimolanti prospettive nel settore dei biofertilizzatori. E' infatti possibile prevedere, ammesso che l'enzima nitrogenasi venga espresso in modo attivo, la costruzione di *super inoculi* in cui un fungo in grado di migliorare l'assorbimento del fosforo, fissa anche l'azoto attraverso il tramite di una popolazione endobatterica specializzata.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti i ricercatori che hanno partecipato a questo progetto di ricerca, in particolare modo: Silvia Perotto, Valeria Bianciotto, Daniela Minerdi del CSMT-CNR e Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università di Torino, e Renato Fani dell'Università di Firenze.

Bibliografia

- BAREA J.M. (1997). Mycorrhiza/bacteria interactions on plant growth promotion. In: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: present status and future prospects*. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino, eds. OECD Tokyo, 150-158.
- BIANCIOOTTO V., BONFANTE P. (1998). Saprotrophic versus symbiotic phase in endomycorrhizal fungi: morphology and cytology. In: *Mycorrhizas: Molecular Biology and Biotechnology*, Hoch and Varma eds, Springer Verlag, 229-251, II edition.

- BIANCIOOTTO V., BANDI C., MINERDI D., SIRONI M., TICHY H.V., BONFANTE P. (1996b). An obligately endosymbiotic fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 162: 3005-3010.
- BIANCIOOTTO V., MINERDI D., PEROTTO S., BONFANTE P. (1996a). Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasts* 193: 123-131.
- BONFANTE P. (2000). At the interface between mycorrhizal fungi and plants: The structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. In: *Mycota, IX Fungal associations*, ed B.Hock, Springer Verlag, in press.
- BONFANTE P., PEROTTO S. (1995). Tansley Review No. 82. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist* 130: 3-21.
- GIANINAZZI S., SCHUEPP H. (1994). *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*, Birkhauser Verlag, Basel.
- HARLEY J., SMITH S.E. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*, Academic Press, London.
- HARRISON M. J., M. L. van BUUREN (1995). A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378: 626-629.
- HARRISON M.J. (1999). Biotrophic interfaces and nutrient transport in plant/fungal symbioses. *Journal Experimental Botany* 50, Special Issue: 1013-1022.
- KALDORF M., SCHNEMELZER E., BOTHE H. (1998). Expression of maize and fungal nitrate reductase genes in arbuscular mycorrhiza. *MPMI* 11: 439-448.
- MARSCHNER H. (1995). *Mineral nutrition of Higher Plants*, 2d Edition Academic Press, London.
- MARTIN F., PEROTTO S., BONFANTE P. (2000). Mycorrhizal fungi: a fungal community at the interface between soil and roots. In: *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. Editors: R. Pinton, Z.Varanini, P. Nannipieri, In press.
- MINERDI D. (2000). Individuazione e caratterizzazione di sequenze genomiche in un batterio endosimbionte del fungo micorrizico arbuscolare *Gigaspora margarita*. Dottorato di Ricerca in Scienze Ambientali (Acque interne ed ecosistemi). Tesi di Dottorato.
- NEHLS U., KLEBER R., WIESE J., HAMPP R. (1999). Isolation and characterization of a general amino acid permease from the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *New Phytologist* 144: 343-349.
- PEREZ-MORENO J., READ D.J. (2000). Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytologist*, 145: 301-309.
- PEROTTO S., BONFANTE P. (1997). Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. *Trends Microbiology* 5: 496-501.
- READ D.J. (1991). Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* 47: 376-381.
- ROSEWARNE G.M., BARKER S.J., SMITH S.E., SMITH F.A., D. SCHATCHTMAN (1999). A *Lycopersicon esculentum* phosphate transporter involved in phosphorus uptake from a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 144: 507-516.
- RUIZ-LOZANO J.M., BONFANTE P. (1999). A P-transporter operon is present in the genome of a *Burkholderia* strain living inside the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Journal of Bacteriology*, 181, 4106-4109.
- SEN R. (2000). Budgeting for the wood-wide web. *New Phytologist*, 145, 161-165.
- SMITH S.E., READ D.J. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London
- van BUUREN M., LANFRANCO L., LONGATO S., MINERDI D., HARRISON M., BONFANTE P. (1999). Construction and characterization of genomic libraries of two endomycorrhizal fungi: *Glomus versiforme* and *Gigaspora margarita*. *Mycological Research*, 103 (8) 955-960.
- van der HEIJDEN M.G., KLIRONOMOS J.N., URSIC M., MOUTOGLIS P., STREITWOLF-ENGEL R., BOLLER T., WIEMKEN A., SANDERS I.R. (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-71.

STABILITÀ DEI CHELATI E LORO EQUILIBRIO IN MISCELA

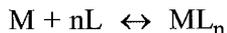
Monica Saladini

Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Dipartimento di Chimica
Via Campi, 183 - 41100 Modena

I complessi chelati

Un importante settore della chimica, correlato al metabolismo dei minerali nelle piante, è quella dei composti di coordinazione noti anche come complessi. Questi composti contengono atomi metallici circondati da gruppi di atomi o molecole chiamati leganti [1]. Il meccanismo con cui avviene la coordinazione di un legante ad un metallo coinvolge la codivisione di elettroni metallo-legante per cui i leganti migliori risultano essere quelle specie chimiche che possiedono doppietti elettronici disponibili per colmare le lacune elettroniche del metalli. Un chelato è un particolare tipo di composto di coordinazione che ha una struttura ad anello in cui la molecola del legante coordina lo stesso ione metallico attraverso due atomi donatori. Sebbene i metalli rappresentino una frazione molto piccola del materiale biologico, giocano un ruolo fondamentale nei processi metabolici, e i complessi chelati con amino acidi e proteine rappresentano la via più comune per l'utilizzazione dei metalli nelle funzioni biologiche.

La maggior parte delle reazioni che coinvolgono i complessi avvengono in soluzione. Perciò è importante considerare l'equilibrio che coinvolge il metallo e i leganti in soluzione che può essere così schematizzato:

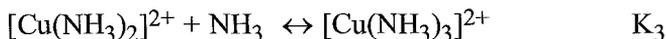
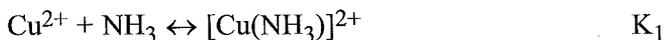


e la stabilità del complesso formato è espressa dal valore della costante K

$$K = \frac{[ML_n]}{[M][L]^n}$$

I complessi metallici in soluzione vengono formati con reazioni successive, ciascuna delle quali è regolata da una costante di equilibrio;

prendiamo come esempio la formazione del complesso del rame con l'ammoniaca:



dove K_1 , K_2 , K_3 , K_4 rappresentano le costanti di step, mentre la reazione globale è definita dall'equilibrio



la cui costante complessiva β è il prodotto delle costanti di step ed è espressa da [2]:

$$\beta = K_1 K_2 K_3 K_4 = \frac{[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}}{[\text{Cu}^{2+}][\text{NH}_3]^4}$$

di conseguenza è più significativo considerare il valore della β piuttosto che delle K dato che ciò che interesse è conoscere la frazione di metallo coordinato rispetto al metallo libero.

Determinazione delle costanti di stabilità o di formazione dei complessi

Esistono diversi modi sperimentali per valutare le costanti di formazione dei complessi [3], tra i principali ricordiamo:

Metodi potenziometrici: si tratta di effettuare delle titolazioni potenziometriche (acido-base) dei sistemi metallo-leganti in diversi rapporti molari, in ambiente rigorosamente termostato e a forza ionica costante. L'elaborazione dei dati tramite appropriati programmi di calcolo [4] permette di ottenere il valore delle $\log\beta$ dei complessi. Il vantaggio di questa tecnica è che permette di lavorare in concentrazioni piuttosto basse 10^{-3} - 10^{-5} M.

Metodi spettrofotometrici: un altro metodo interessante per determinare le costanti di formazione dei complessi è attraverso l'utilizzo di tecniche spettrofotometriche nel campo dell'uv-visibile. Ciò naturalmente è possibile nel caso in cui il complesso dia origine a delle bande di assorbimento in questa zona spettrale. Si può seguire la formazione del complesso nel caso di un metallo che dia origine ad un cromoforo attivo nella zona del visibile (400-

1000) nm, è questo il caso di alcuni metalli di transizione come Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} . E' possibile in questo modo calcolare sia le costanti di formazione che ottenere delle informazioni sulla geometria e sul numero di coordinazione del complesso stesso. L'inconveniente di questa tecnica è che per ottenere dei valori di assorbanza sufficienti è necessario che la concentrazione del cromoforo, ovvero del metallo sia almeno dell'ordine di 10^{-2} M. Se la molecola del legante è essa stessa un cromoforo, darà origine ad assorbimento nel campo dell'uv; la complessazione del metallo può portare a delle modificazioni nella struttura elettronica del legante di conseguenza si osservano variazioni nella posizione e nell'intensità dei massimi di assorbimento della molecola, in funzione del pH e in relazione alla quantità di complesso formato.

Valutazione delle costanti di stabilità

Il valore della costante di formazione del complesso, pur essendo un dato importante, non è comunque sufficiente a definire compiutamente un sistema metallo-legante, infatti la stabilità dei complessi è fortemente dipendente dal pH e quindi è necessario poter valutare il comportamento del complesso al variare del pH. A questo scopo si utilizzano delle curve dette di distribuzione o di speciazione che permettono di verificare la % di complesso formato in funzione del pH e di verificare la % di metallo complessato sotto le varie specie in funzione del pH.

Ci sono molti fattori legati alla natura sia del metallo che dei leganti che influenzano la stabilità dei complessi [2]. Come regola generale si hanno complessi tanto più stabili quanto più elevato è il potere elettron-donatore del legante. I complessi chelati sono in generale più stabili di quelli non chelati a causa di fattori termodinamici legati all'aumento di disordine del sistema a seguito della chelazione. In particolare i complessi più stabili si hanno con anelli chelati 5 o al massimo 6 membri. Generalmente, la presenza di sostituenti molto ingombranti sul legante porta ad una diminuzione della stabilità del complesso. Se invece sono presenti dei sostituenti aromatici, si possono avere effetti stabilizzanti: sia a causa di retrodonazione π che coinvolge i sistemi aromatici, sia a causa di interazioni di stacking tra gli anelli aromatici dei leganti.

Chelati in agricoltura

Gli oligoelementi (Fe, Mn, Zn, Cu, Mo) svolgono un ruolo importante nel metabolismo delle piante e nella loro nutrizione, ma, a causa

delle sfavorevoli condizioni del suolo, come pH, contenuto di materia organica, areazione, la disponibilità di questi elementi è piuttosto scarsa. La loro somministrazione nel suolo, per aumentarne la fertilità, non è così semplice. I cationi come Fe, Zn, Cu e Mn sono poco disponibili nel terreno come sali inorganici a causa della loro scarsa solubilità a pH >5 per la formazione di idrossidi molto stabili:



Questa reazione riduce la quantità di ferro disponibile per le piante poichè le specie $\text{Fe}(\text{OH})_3$ e Fe_2O_3 non sono assimilabili dalle piante. Per questo motivo i complessi chelati, che consentono di mantenere il ferro e gli altri metalli in soluzione anche a pH basico, hanno assunto notevole importanza per la somministrazione degli oligoelementi.

Le caratteristiche che deve avere un complesso chelato per poter essere utilizzato in agricoltura sono le seguenti [5]:

- 1) non deve dare sostituzione con altri cationi presenti nel terreno
- 2) deve essere stabile all'idrolisi del metallo
- 3) deve avere resistenza microbiologica
- 4) deve essere solubile in acqua
- 5) non deve dar luogo a precipitazione in presenza di altri ioni nel terreno
- 6) non deve danneggiare le piante alle concentrazioni richieste.

Gli agenti complessanti possono essere suddivisi in tre categorie sulla base della loro forza [6]:

FORTI	INTERMEDI	DEBOLI
EDTA	poliflavonoidi	amino acidi, peptidi
HEEDTA	acidi umici e fulvici	acido citrico
DTPA	amino acidi, peptidi	acido ascorbico
EDDHA	polifosfati	acido tartarico
NTA		acido adipico
acidi umici		

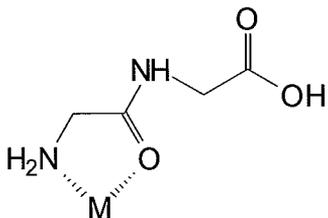
I composti sintetici sono tra i più stabili e trovano larga applicazione per la fertilizzazione in particolare del suolo. Tuttavia non dobbiamo dimenticare alcuni aspetti riguardo all'utilizzo di questi composti. Queste molecole presentano una elevata fitotossicità, la loro grande capacità complessante, in particolare la loro bassa selettività nei confronti degli ioni me-

tallici fa sì che possano dar luogo alla complessazione di tutti i cationi metallici presenti nel suolo. La presenza di elevate quantità di ione Ca^{2+} , se confrontate a quelle di Fe^{3+} , può portare facilmente alla sostituzione dei due metalli per effetto massa. La estrema solubilità di questi composti fa sì che essi subiscano facilmente il processo di dilavamento che può portare, come conseguenza, un eccessivo accumulo di queste molecole nelle falde acquifere. Da non sottovalutare è anche l'effetto di tossicità nei confronti dell'organismo umano che può portare a squilibri, anche gravi, a livello di elementi metallici essenziali come calcio e zinco.

I composti chelanti di natura intermedia sono più spesso utilizzati per l'applicazione in foglia perché sono facilmente decomponibili e quindi rilasciano facilmente il metallo e inoltre non sono fitotossici. I complessi con peptidi o aminoacidi sono in grado di interagire direttamente con le membrane cellulari per poter trasferirne lo ione metallico al suo interno.

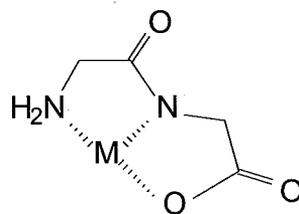
Nei complessi con aminoacidi si ha la coordinazione da parte dell'ossigeno carbossilico e l'azoto aminico terminale con la formazione di un anello chelato a 5 membri piuttosto stabile.

Per quanto riguarda i peptidi si ha una prima fase di complessazione a pH acido che coinvolge l'azoto aminico terminale e l'ossigeno del gruppo peptidico sempre con la formazione di un anello chelato a 5 membri come riportato in figura [7].



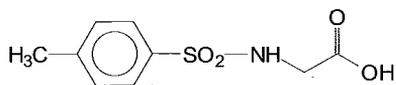
Tuttavia l'ossigeno peptidico è un legante piuttosto debole, mentre l'azoto peptidico può coordinare lo ione metallico solo se deprotonato. I peptidi hanno un pK di deprotonazione dell'azoto molto elevato >15 ma, in presenza di metalli come Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , si può osservare la deprotonazione dell'azoto peptidico e la sua conse-

guente coordinazione ad un valore di pH nettamente inferiore rispetto a quello di precipitazione dell'idrossido del metallo. Si formano così complessi particolarmente stabili, la cui struttura è riportata in figura, più stabili di quelli con aminoacidi, poiché il potere donatore dell'azoto peptidico deprotonato è nettamente superiore di quello dell'azoto aminico degli aminoacidi.



Altri agenti chelanti

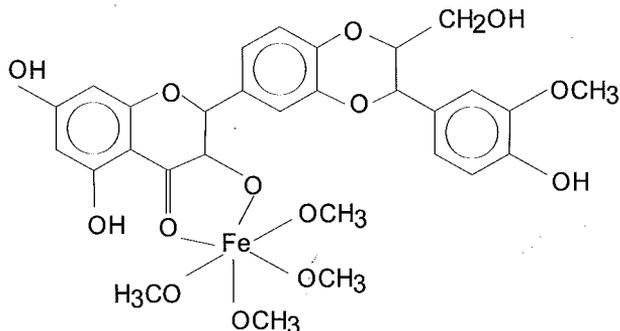
Nel nostro laboratorio ci siamo occupati per diversi anni delle proprietà coordinative di aminoacidi sostituiti che mimassero il comportamento dei peptidi [8]. Interessanti risultati si sono ottenuti con aminoacidi N sostituiti da un gruppo elettron attrattore come ArSO_2 esempio la tosilglicina:



In presenza di metalli come Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e altri [9], questo aminoacido dà luogo ad un notevole anticipo della deprotonazione dell'azoto solfonamidico rispetto al legante libero formando complessi chelati particolarmente stabili. Il valore del pH a cui si forma il complesso chelato e la sua stabilità sono strettamente dipendenti dalla natura del metallo e dalla sua affinità per l'atomo di azoto come atomo donatore. L'aggiunta poi di un legante addizionale come il 2,2'-dipiridile favorisce ulteriormente la reazione di deprotonazione sia per effetto di retrodonazione π che della formazione di interazioni di stacking, rendendola possibile per metalli come Zn^{2+} che non sono attivi nel sistema binario [10].

Un'altra classe di chelanti interessanti sono i flavonoidi; essi sono composti fenolici largamente diffusi in natura che oltre ad avere capacità chelanti nei confronti di diversi ioni come il Fe, presentano proprietà antiossidanti cioè sono in grado di inibire la formazione di radicali liberi, ossidrili o perossidrili che sono iniziatori dei processi di perossidazione lipidica.

Nel nostro laboratorio abbiamo studiato le proprietà chelanti, nei confronti dello ione Fe^{3+} di una molecola di natura flavonoica: la Silibina [11]. Misure di spettroscopia NMR, uv-visibile, Massa, potenziometria e polarografia hanno permesso di stabilire quali sono i siti di coordinazione del legante, come riportato in figura, e di calcolare le costanti di stabilità dei complessi formati



L'aspetto legato alla definizione strutturale del sistema, ovvero alla definizione dei siti leganti, nonché della geometria di coordinazione intorno al metallo, non è sicuramente secondaria rispetto alla valutazione della stabilità del complesso. Infatti per poter migliorare le proprietà leganti di una molecola, ad esempio attraverso processi di funzionalizzazione della molecola stessa, è necessario conoscere nei dettagli il meccanismo legato al processo di coordinazione, nonché la struttura, quanto più possibile precisa del complesso formato. La determinazione della struttura cristallina ai raggi x rappresenta sicuramente un aiuto importante in questo senso. Infatti, anche se è vero che la struttura allo stato solido non coincide necessariamente con quella in soluzione, è pur vero che quando un complesso, riconosciuto in soluzione, viene isolato e caratterizzato allo stato solido, con buona probabilità presenta la medesima struttura nelle due fasi.

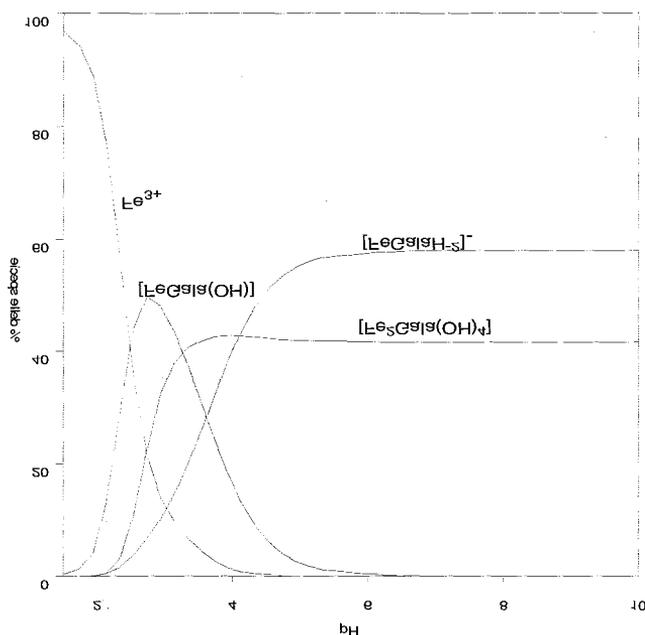
Un ruolo importante nella chimica dei complessi chelati è giocato dagli zuccheri acidi.

La capacità degli zuccheri acidi di formare complessi solubili e stabili in un ampio spettro di pH è dovuta alla presenza nella loro struttura, sia della funzione acida sia delle funzioni ossidriliche che coordinano il metallo già a pH acido, con la formazione di complessi chelati, e generalmente, a più alto pH, si osserva la deprotonazione del gruppo ossidrilico legato al metallo con formazione di complessi ancora più stabili.

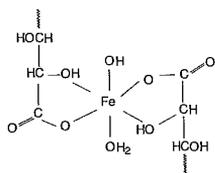
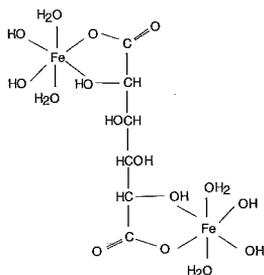
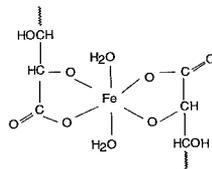
Nel nostro laboratorio ci siamo occupati delle proprietà chelanti di un particolare zucchero acido: l'acido galattarico. Questa molecola presenta due funzioni acide e quattro funzioni alcoliche che possono essere coinvolte nella coordinazione. Come si è potuto osservare dall'analisi cristallografica dei complessi, con lo ione Cu^{2+} si ha la formazione di un complesso neutro già a partire da $\text{pH} < 4$ [12].

Tale complesso si ottiene dalla coordinazione di un ossigeno carbossilico e di un gruppo ossidrilico in posizione α rispetto al carbossile. All'aumentare del pH si osserva la deprotonazione dei gruppi idrossilici con la formazione di un complesso $[\text{CuLH}_2]^{2-}$ che è la specie prevalente già a $\text{pH} > 6$. La stabilità di questi complessi è di gran lunga superiore rispetto a quelli con acidi aldonici come il gluconico, che possiede un solo gruppo carbossilico.

E' stato inoltre studiato il comportamento di questo zucchero con lo ione Fe^{3+} . Nella figura seguente vengono riportate le curve di distribuzione delle specie complesse trovate nel rapporto Fe/Gala 1:1, $[\text{Fe}^{3+}] = 10^{-3}$ M.



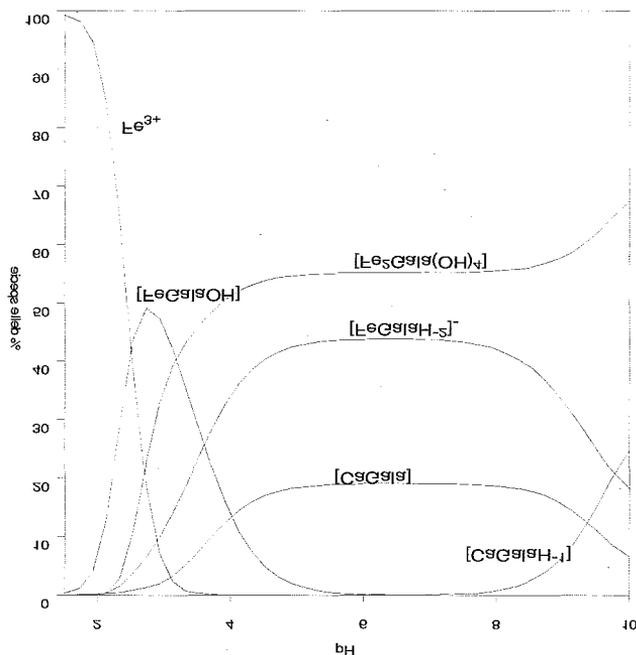
La probabile struttura dei complessi, desunta da dati spettroscopici e di analisi elementare è di seguito riportata.


 $[FeGala(OH)]$

 $[Fe_2Gala(OH)_4]$

 $[FeGalaH_2]^-$

Lo stesso zucchero forma complessi con lo ione Ca^{2+} e nella tabella seguente vengono riportati i logaritmi delle costanti di stabilità sia dei complessi del Fe^{3+} che di quelli del Ca^{2+} .

$[FeGala(OH)]$	2.99(6)	$[CaGala]$	3.45
$[Fe_2Gala(OH)_4]$	-2.12(4)	$[CaGalaH_1]^-$	-5.93
$[FeGalaH_2]^-$	-0.62(7)		

Dall'analisi dei dati non risulta possibile confrontare i valori di $\log\beta$ trattandosi di specie complesse diverse; è più utile un confronto delle curve di stabilità delle specie come riportate nella figura seguente in rapporto Fe/Ca/Gala 1:1:1, $[\text{Fe}^{3+}] = 10^{-3}$ M.



Come si può vedere il calcio è complessato in quantità inferiore al 20% e tale quantità diventa intorno al 2% se si lavora in rapporto Fe/Ca/Gala 2:2:1. Per cui possiamo affermare che l'acido galattarico rappresenta un buon agente chelante per lo ione Fe^{3+} soprattutto in considerazione della sua biocompatibilità e della sua selettività nei confronti di questo metallo.

Riferimenti bibliografici

- 1) F.A. COTTON, G. WILKINSON (1980). *Advanced Inorganic Chemistry*. J.Wiley and Sons, New York.
- 2) N.N. GREENWOOD, A.EARNshaw (1984). *Chemistry of the Elements*. Pergamon Press Ltd.
- 3) A. ALBERT, E.P. SERJEANT (1984). *The Determination of Ionization Constants*. Chapman and Hall, London.
- 4) P. GANS, A. SABATINI, A. VACCA (1965). *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 244; 1185.
- 5) F.P. DWYER, D.P. MILLER (1964). *Chelating Agents and Metal Chelates*. Academic Press, New York.
- 6) F.L. FISHER (1984). *Solutions*, 52 January.
- 7) H. SIGEL, R.B. MARTIN (1982). *Chem. Rev.*, 82; 385.
- 8) A. BONAMRTINI CORRADI (1992). *Coord. Chem. Rev.*, 117; 45.

- 9) G. BATTISTUZZI, M. BORSARI, L. MENABUE, M. SALADINI, M. SOLA (1996). *Inorg. Chem.*, 35; 4239.
- 10) G. GAVIOLI, M. BORSARI, L. MENABUE, M. SALADINI, M. SOLA (1991). *Inorg. Chem.*, 30; 498.
- 11) F. BORELLA, M. BORSARI, C. GABBI, R. GRANDI, M. SALADINI, S. SEVERI. *Inorg. Biochem.*, in stampa.
- 12) M. SALADINI, M. CANDINI, D. IACOPINO, L. MENABUE (1999). *Inorg. Chim. Acta* 292; 189.

BIOSTIMOLANTI: PROBLEMATICHE E PROSPETTIVE DI IMPIEGO

Elvira Rea

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2-4 - 00184 Roma

E' pratica sempre più comune abbinare alla normale fertilizzazione, applicazioni di formulati esogeni mirati alla stimolazione di alcuni stadi di sviluppo della pianta. Tra queste sostanze esogene applicate, un gruppo è costituito dai biostimolanti.

I biostimolanti sono prodotti ottenuti dal trattamento industriale di materiale di origine animale o vegetale, e in conseguenza della loro origine contengono sostanze come amminoacidi, proteine, enzimi, zuccheri, vitamine, e altri composti biologicamente attivi, si tratta quindi di una categoria molto eterogenea di prodotti che possono esplicare, con meccanismi di azione diversi, effetto stimolante sulla crescita vegetale.

L'argomento necessita comunque di molti chiarimenti dal punto di vista scientifico e legislativo, dal punto di vista scientifico perché si tratta di una categoria di prodotti molto eterogenea, dal punto di vista legislativo perché la legislazione italiana non prevede una categoria ad hoc per questi prodotti, come vedremo si tratta di una categoria di prodotti che può avere un campo molto vasto di applicazione. I biostimolanti infatti, contengono composti organici normalmente presenti nei tessuti e necessari allo sviluppo vegetale, la loro somministrazione per via esogena rappresenta un risparmio energetico per le piante.

Processi di assorbimento

L'assorbimento avviene fondamentalmente attraverso la membrana plasmatica, costituita da due strati di fosfolipidi e da proteine con funzione enzimatiche, di trasporto e funzioni di canali.

A livello della radice, organo più propriamente votato alla funzione di assorbimento, questo non viene assolutamente ostacolato, al massimo ha dei costi energetici, avviene per trasporto attivo, per diffusione o per trasporto passivo.

A livello fogliare le cose cambiano, l'assorbimento degli elementi nutritivi risulta ostacolato da impedimenti di natura fisica, chimica e biochimica.

Le cellule dell'epidermide della pagina superiore della foglia sono rivestite dalla cuticola composta in prevalenza da una miscela eterogenea di componenti detta nel complesso cutina, mentre la parte restante è costituita da strati sovrapposti di cere e da polisaccaridi pectici legati alla parete cellulare. Al di sotto di questo strato si trova il mesofillo dove si sono localizzate le cellule fotosintetizzanti.

La pagina inferiore, che costituisce l'ultimo strato, è caratterizzato dalla presenza degli stomi. In alcune specie gli stomi si trovano anche nella pagina superiore delle foglie, ma quasi sempre in numero più limitato.

Va ricordato inoltre che:

- L'assorbimento dei soluti è specifico e selettivo. La selettività nel trasporto è presente per gli ioni ma anche per i composti organici come gli aminoacidi e gli zuccheri e si verifica in tutte le parti della pianta.
- La velocità varia con la loro concentrazione.
- I soluti assorbiti di solito fuoriescono solo lentamente, si accumulano all'interno delle cellule.

L'assorbimento dei sali minerali è inoltre, in parte controllato dall'attività del germoglio.

Due ipotesi sono state formulate per spiegare questo controllo:

Nel senso della domanda: il germoglio potrebbe far aumentare l'assorbimento dei sali minerali nella radice utilizzandoli rapidamente in prodotti di accrescimento proteine, acidi nucleici, clorofilla.

Nel senso dell'offerta: il germoglio fornisce, via floema, i carboidrati che la radice deve respirare per produrre l'ATP che controlla l'assorbimento dei sali minerali (Salisbury e Ross, 1994).

A livello delle foglie, una funzione importante, perché da essa dipendono molte manifestazioni della pianta, è comunque la fotosintesi.

A proposito della fotosintesi va detto che la notevole differenza tra la produttività in condizioni ottimali e la produttività media realizzata nella pratica agricola suggerisce che le piante comunque subiscono una serie di stress che limitano il potenziale produttivo.

Situazione del mercato

Come già accennato, l'uso dei biostimolanti si va diffondendo sempre di più, ma cosa esiste attualmente in commercio?

Da un esame dei prodotti attualmente reperibili sul mercato, su 50 formulati dichiarati come biostimolanti è emerso che il 58% di questi prodotti contiene amminoacidi, il 28% vitamine, il 16% enzimi, il 14% alghe, il 10% acidi umici, in percentuale minore altri composti.

I biostimolanti rappresentano quindi una classe molto eterogenea di prodotti, le modalità d'uso riportate indicano la somministrazione a concentrazioni molto diluite, spesso con più trattamenti ripetuti nel tempo, per fertirrigazione o per via fogliare.

Gli effetti indicati riguardano l'azione positiva su fotosintesi, respirazione, traspirazione, sintesi proteica, traslocazione e accumulo degli assimilati, con effetti positivi su germinazione, crescita, allegagione, maturazione, resistenza agli stress, assorbimento di acqua ed elementi nutritivi (Rea *et al.*, 1998).

Da una ricerca bibliografica fatta di recente è emerso che gli amminoacidi sono i più studiati. Vengono riportate ricerche effettuate su colture di cellule (King e Hirji, 1975; Beherend e Mateles, 1975; Padget e Leonard, 1993), o su plantule (Jones e Darrah, 1993). La somministrazione di una miscela di amminoacidi o di idrolizzati proteici provoca in molti casi una stimolazione della crescita (Gamborg *et al.*, 1968, Nickell e Marezki, 1969), mentre alcuni amminoacidi somministrati singolarmente in alcuni casi la inibiscono (Street, 1966; Gamborg, 1970). Questi lavori riguardano per lo più ricerche di tipo specialistico e non agronomico, ma costituiscono la base per la realizzazione di miscele adeguate all'impiego degli amminoacidi in agricoltura. Disponiamo anche di numerosi riferimenti bibliografici su l'utilizzo di prodotti a base di amminoacidi utilizzati su colture in campo (Siviero, 1989; 1993; Maini, 1990, Giurdanella, 1993, Schippa e Davi, 1994). Discorso a parte costituiscono gli amminoacidi chelati con metalli. Risultati ottenuti da sperimentazione in campo, su numerose colture hanno fatto registrare incrementi produttivi in media del 20% (Hsu *et al.*, 1982; 1986; Wallace e Wallace, 1983). I tempi di assorbimento sono inferiori a quelli riportati per altri chelati metallici di sintesi es. EDTA. Per quanto riguarda gli altri composti, è da tempo noto che gli estratti cellulari costituiscono fonte di materiale biologicamente attivo (Albersheim e Darvill, 1986), la letteratura esistente riporta ad esempio che frammenti di cellule, che contengono tra l'altro polisaccaridi, glicoproteine, stimolano l'organogenesi e il differenzia-

mento (Bois, 1992). Anche studi condotti nel nostro Istituto hanno prodotto risultati confortanti sulla reale efficacia di amminoacidi, zuccheri, estratti vegetali sulla della crescita vegetale e sui microrganismi del suolo.

Va comunque detto che il termine biostimolante, viene spesso utilizzato in maniera impropria e talvolta nasconde delle vere e proprie frodi commerciali, su alcuni prodotti si parla ad esempio genericamente di agenti biostimolanti senza indicazione di un principio attivo.

La legislazione

Abbiamo cominciato col dire che la legislazione italiana non prevede attualmente una categoria specifica per questi prodotti, si sta lavorando per sanare il vuoto legislativo, tra l'altro nell'ambito della Commissione Tecnico Consultiva per le modifiche agli allegati alla 748/84. è stato costituito un Gruppo di Lavoro denominato "biostimolanti e chelati".

Il primo passo per l'immissione in legge di questi prodotti è quello di definirli, una possibile definizione potrebbe essere la seguente:

"per biostimolante si intende qualsiasi prodotto naturale o sintetico, caratterizzato da diverse azioni e modalità d'uso in grado di contribuire positivamente al miglioramento della nutrizione e allo sviluppo delle specie vegetali con l'esclusione dei fitoregolatori e dei prodotti con dichiarata e specifica funzione fitosanitaria."

I prodotti fitosanitari, vengono definiti infatti dal DL n. 194 del 17/03/95 che costituisce l'attuazione della Direttiva CEE 91/414, che recita:

"I prodotti fitosanitari sono quei preparati formulati destinati alla protezione delle piante in funzione della loro proprietà di:

- protezione
- conservazione
- eliminazione di piante indesiderate
- regolazione dei processi vitali senza fungere da fertilizzanti (ad es. regolatori della crescita).

Il DL n.194 del 17/03/95 potrebbe, se male interpretato, essere applicato anche ai biostimolanti, questi ultimi rientrano, a pieno nella legge sui fertilizzanti.

La legge 748/84 "Nuove norme per la disciplina dei fertilizzan-

ti" definisce infatti un fertilizzante come "qualsiasi sostanza che, per il suo contenuto in elementi nutritivi oppure per le sue peculiari caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche contribuisce al miglioramento della fertilità del terreno agrario oppure al nutrimento delle specie vegetali coltivate o, comunque ad un loro migliore sviluppo".

Un aspetto importante da sottolineare è che gli ormoni sono attivi a concentrazioni interne intorno a $1\mu\text{M}$, mentre zuccheri, amminoacidi, acidi organici ed altri metaboliti necessari per l'accrescimento e lo sviluppo sono di solito presenti a concentrazioni comprese tra 1 e 50 mM.

La legge 748/84 ha recepito inoltre, il DL 161 attuazione della direttiva CEE 89/530 che recita: "che sono opportuni il continuo sviluppo e l'aggiornamento delle direttive relative ai concimi per quanto riguarda l'adeguamento al progresso scientifico e tecnico dei prodotti che figurano negli allegati delle suddette direttive".

Diverse problematiche devono essere risolte perché si possa giungere ad un regolamentazione adeguata dell'uso di questi prodotti allo scopo di salvaguardare quelli di sicuro interesse agronomico attualmente penalizzati dalla estrema confusione esistente sulla reale efficacia di azione.

Prima di tutto la giusta collocazione in legge, che potrebbe prevedere una doppia collocazione a seconda se si tratta di un concime o di un ammendante:

- nell'All. 1.B "**Concime con proprietà di biostimolazione**";
- nell'All. 1.C "**Ammendante e correttivo con proprietà di biostimolazione**",

questo tipo di inserimento comporta la formulazione di nuove regole e pone comunque il problema della repressione frodi. Non è pensabile infatti, che il controllo possa essere effettuato mediante prove in campo, occorre individuare prove di laboratorio, è necessaria cioè l'individuazione e la taratura di metodi di analisi atti a rivelare le proprietà biostimolanti. Attualmente non disponiamo di simili metodologie, anche se a livello di ricerca qualcosa si sta facendo.

I metodi utilizzati per caratterizzare questi prodotti sono di due tipi: diretti e indiretti.

Al primo gruppo appartengono tutti i metodi volti ad accertare la composizione del prodotto e le sue proprietà. Essi sono utili e forniscono e forniscono risultati di interesse fondamentale, specifici per ogni singolo prodotto, ma non danno indicazioni di alcun tipo sulla sua efficacia.

Al secondo gruppo appartengono invece tutti i metodi volti ad evidenziare un'accelerazione del metabolismo degli organismi viventi, finalizzata al miglioramento della nutrizione vegetale. Gli organismi indicatori possono essere a titolo di esempio vegetali (plantule opportunamente scelte) o i microrganismi del suolo più attivi nei rapporti con le radici. I metodi di questo secondo gruppo si potrebbero adattare a biostimolanti sia di origine vegetale che animale, una volta provata la relazione positiva fra risposta positiva del metodo e crescita delle piante. Tuttavia, questo tipo di determinazioni non è ancora né ufficiale né successivamente collaudato.

In conclusione possiamo quindi auspicare un corretto inserimento in legge di questi prodotti, non a caso sono stati inseriti nell'ambito di una giornata di studio che tratta dei NUOVI INDIRIZZI PER LA PRODUZIONE.

Ma i biostimolanti rispondono ai requisiti dei nuovi indirizzi per la produzione?

Io direi che possiamo dire di sì.

Infatti è importante sottolineare che questi prodotti rispondono alle esigenze di una agricoltura moderna basata sull'uso di prodotti naturali a basso impatto ambientale. Non è da sottovalutare che alcuni di essi possono rappresentare un valido mezzo per il recupero dei sottoprodotti agroindustriali. Sarebbe molto utile, ed anche economicamente molto vantaggioso per il nostro paese, ricco di industrie agroalimentari, produrre biostimolanti partendo dai sottoprodotti di queste industrie.

Un corretto inserimento in legge potrebbe tra l'altro ampliare il campo di applicazione di questi prodotti.

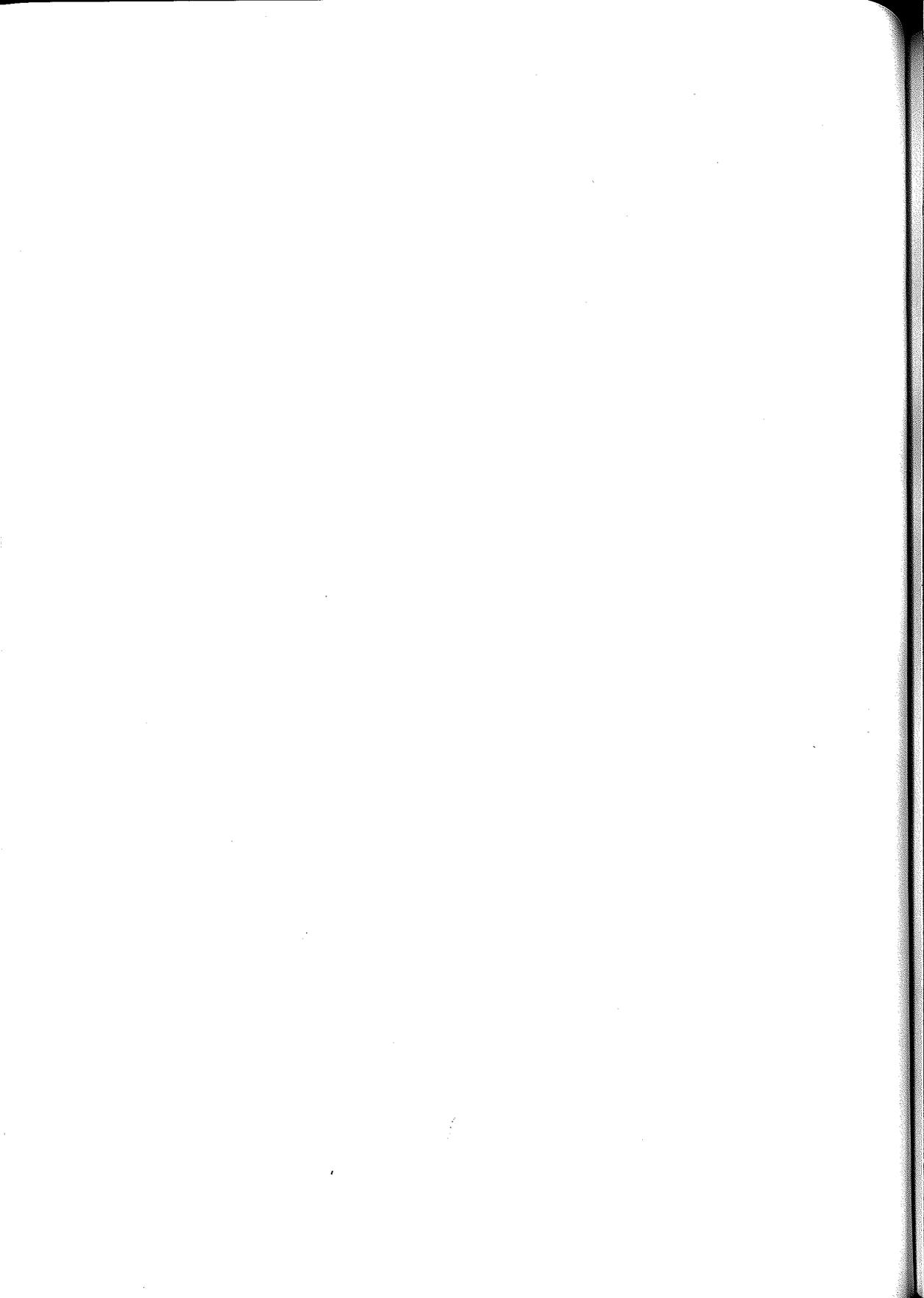
Ad esempio:

- applicazione in campo vivaistico. Quest'ultimo aspetto riveste particolare importanza. Un'emergenza rapida e contemporanea ad esempio porta alla produzione di piante di taglia molto simile tra loro, questo accelera i tempi del vivaio.
- applicazioni in agricoltura biologica che si pone come obiettivo proprio la produzione di alimenti senza l'impiego di prodotti chimici di sintesi, ma solo con l'utilizzo di sostanze le più naturali possibili;
- perché non pensare all'effetto di questi prodotti sull'attività microbica del terreno.
- al loro possibile utilizzo nell'ottica anche di una riduzione della fertilizzazione in quelle realtà dove i terreni risultano già ricchi di elementi nutritivi.

E' auspicabile che il problema legislativo venga risolto in breve affinché questi prodotti possano essere immessi sul mercato in modo chiaro e si possano così evitare frodi che vanno a scapito del consumatore e dei prodotti di consolidata efficacia e serietà di produzione.

Bibliografia

- ALBERSHEIM P., A.G. DARVILL (1986). Oligosaccharins. *Scientific American*, 253: 44-50.
- BEHEREND J., R.I. MATELES (1975). Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. *Plant Physiol.*, 56: 584-589.
- BOIS F. (1992). The influence of some natural cell-wall derived precursors on organogenesis and differentiation of wild strawberry. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 28: 91-96.
- GAMBORG O.L. (1970). The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cell in suspension culture. *Plant Physiol.*, 45: 372-375.
- GAMBORG O.L., R. A. MILLER, K. OGIMA (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, 50: 151-158.
- GIURDANELLA G. (1993). Biostimolanti, prove in serra. *Terra e Vita*, 15: 74-76.
- HSU H.H., H.D. ASHMEAD, D.J. GRAFF (1982). Absorption and distribution of foliar applied iron by plants. *J. Plant Nutrition* 5(4-7): 969-974.
- HSU H.H. (1986). Chelates in plant nutrition. In: *Foliar feeding of plants with aminoacids chelates* (Park Ridge ed.) pp. 208-316.
- JONES D.L., P.R. DARRAH (1993). Influx and efflux of amino acid from *Zea mays* L. roots and their implication for N nutrition and the rhizosphere. In: *Plant nutrition - from genetic engineering to field practice* (N. J. Barrow ed.), pp. 91-94. Kluwer Academic Publishers.
- KING J., R. HIRJI (1975). Amino acid transport systems of cultured soybean root cells. *Can. J. Bot.* 53: 2088-2091.
- MAINI P. (1990). Nutrire e stimolare le piante con aminoacidi e peptidi. *Terra e Vita* 72-73.
- NICKELL L.G., A. MARETZKI (1969). Growth suspension culture of sugar cane cells in chemically defined media. *Physiol. Plant.*, 9: 177-189.
- PADGET P.A., R.T. LEONARD (1993). Regulation of nitrate uptake by amino acids cell suspension culture and intact roots. *Plant and Soil* 155/156: 159-161.
- REA E., G. DI MONTE, A. BENEDETTI (1998). Biostimolanti. In: *I fertilizzanti organici* (A. Benedetti e P. Sequi eds.) pp. 201-206. PANDA/L'Informatore Agrario, Verona.
- SALISBURY F.B., C.L. ROSS (1994). *Fisiologia Vegetale*. pp. 151-178. Zanichelli Bologna.
- SCHIPPA M., R. DAVÌ (1994). Metabolismo senza stress grazie ai biostimolanti. *Terra e Vita* 16. 55-58.
- SIVIERO P. (1989). Applicazione dei biostimolanti su peperone a duplice attitudine. *L'Informatore Agrario* 12: 95-97.
- SIVIERO P., 1993. Effetti di applicazioni di biostimolanti su pomodoro e melone. *L'Informatore Agrario* 45: 55-60.
- STREET H.E. (1966). In: *Cells and Tissues in Culture* (E.N. Willmer ed.) p. 542. Academic Press, London.
- WALLACE A., G.A. WALLACE (1983). Foliar fertilization with Metalosates. *J. Plant nutrition* 6 (6): 551-554.



L'IMPIEGO DELL'INIBITORE DELLA NITRIFICAZIONE 3,4 DMPP SU FRUMENTO DURO: EFFETTI SULLA PRODUTTIVITÀ E SULLA DINAMICA DEI NITRATI NEL SUOLO

Antonio Coli, Elisabetta Moscheni, Rosalba Risaliti

Centro Interdipartimentale di Ricerche Agro-Ambientali "Enrico Avanzi"

Università degli Studi di Pisa

Via S. Michele degli Scalzi, 2 - 56124 Pisa

Introduzione

La Direttiva Comunitaria 91/676, relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento da nitrati di origine agricola, prevede l'ottimizzazione della gestione dell'azoto nel sistema suolo-pianta al fine di contenere le possibili perdite con le acque di ruscellamento e di drenaggio. Tra le pratiche agricole finalizzate al contenimento delle perdite di nitrati, il ricorso a fertilizzanti stabilizzati sembra offrire vantaggi di tipo agronomico ed ambientale.

I fertilizzanti stabilizzati contengono sostanze in grado di influenzare selettivamente l'attività della microflora del terreno, rallentando la nitrificazione dell'azoto (Zacherl e Amberger, 1990; Bronson e Mosier, 1994; Watson *et al.*, 1994). Ne risulta una maggiore stabilità dell'azoto sotto forma ammoniacale ($N-NH_4$), difficilmente dilavabile e di conseguenza disponibile per periodi più lunghi per le colture. Il rallentamento del processo di mineralizzazione permette di contenere efficacemente i rilasci ambientali di azoto, limitando le perdite per dilavamento e l'emissione di ossidi nell'atmosfera (Schweiger, 1991; Delgado e Mosier, 1996). Al tempo stesso, la più regolare cessione dell'azoto dovrebbe sincronizzare la disponibilità dell'anione nitrato con le necessità della coltura, migliorando l'efficienza della fertilizzazione (Benedetti, 1998).

Materiali e metodi

La ricerca ha valutato l'effetto agronomico-ambientale di un concime stabilizzato su frumento duro. La verifica di pieno campo è stata effettuata nel 1998-1999 presso il Centro Interdipartimentale di Ricerche

Agro-Ambientali "Enrico Avanzi" dell'Università degli Studi di Pisa, in collaborazione con Basf-Italia S.p.A.. L'area di prova, in località S. Piero a Grado, ricade all'interno del Parco Regionale di Migliarino-San Rossore-Massaciuccoli, in cui il rischio di dilavamento e di conseguente inquinamento delle acque superficiali e di falda assume un interesse particolare (Bonari *et al.*, 1996; Kauppi, 1990). Le caratteristiche del terreno che ha ospitato la prova sono riportate in tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche fisico-chimiche del terreno che ha ospitato la prova sperimentale

Scheletro	%	assente
Sabbia (1)	%	22.1
Limo	%	46.0
Argilla	%	31.9
pH		8.0
Conducibilità	$\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$	129.6
Sostanza organica (2)	%	1.62
Azoto totale (3)	%	1.10
Fosforo assimilabile (4)	ppm	8.4

(1) analisi granulometrica, metodo USDA;

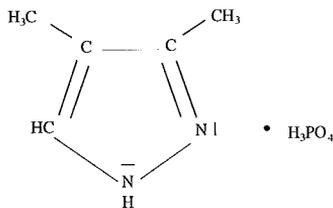
(2) metodo Lotti;

(3) metodo Kjeldhal;

(4) metodo Olsen.

E' stato impiegato l'inibitore della nitrificazione 3,4DMPP (3,4 Dimetilpirazolo fosfato) (Fig. 1), molecola che agisce inibendo temporaneamente l'attività dei batteri del genere *Nitrosomonas* (Tesi e Zerulla, 1999). Per valutare correttamente l'effetto agronomico ed ambientale del fertilizzante stabilizzato sono state determinate le rese della coltura ed è stata monitorata la concentrazione dell'anione nitrato nel terreno durante il ciclo colturale del cereale.

Figura 1
3,4 Dimetilpirazolo fosfato DMPP



La semina del frumento (cv. Cirillo) è avvenuta il 09.11.98 distribuendo 200 kg ha⁻¹ di seme. La coltura è stata fertilizzata con 140 unità di azoto ha⁻¹, ricorrendo a due diversi formulati di solfo-nitrato ammonico con titolo 26% e seguendo tre diverse modalità di distribuzione. La sigla SNAI corrisponde al fertilizzante addizionato dell'inibitore della nitrificazione 3,4 DMPP, la sigla SNA allo stesso fertilizzante non stabilizzato. Le modalità di distribuzione sono state:

applicazione unica alla semina, applicazione unica in fase di accestimento ed applicazione frazionata in due interventi (70% all'accestimento e 30% alla levata). Lo schema sperimentale è stato quello a blocco randomizzato con quattro replicazioni, con parcelle elementari di 12 m² (3mx4m).

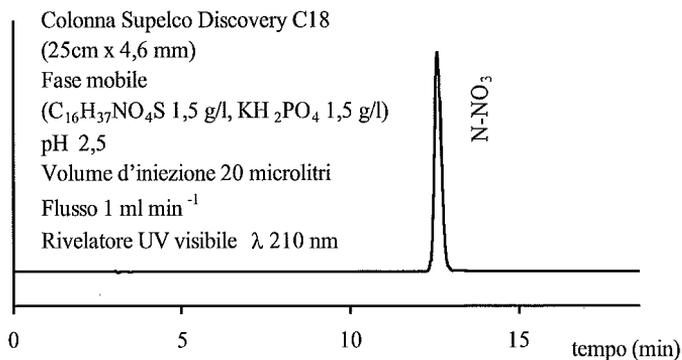
I prelievi di terreno per la determinazione del contenuto di nitrati hanno riguardato il profilo fino a 90 cm di profondità, ad intervalli di 30 cm; le date di campionamento hanno seguito il calendario degli interventi di fertilizzazione azotata (Tab. 2).

Tabella 2 - Calendario dei campionamenti di terreno per la determinazione dei nitrati

Data del campionamento	
09.11.98	Prima della concimazione in pre-semina
22.01.99	Prima della concimazione all'accestimento
31.03.99	Prima della concimazione alla levata
01.06.99	60 giorni dopo la concimazione alla levata (fase di maturazione latteo-cerosa del frumento)

L'estrazione dei nitrati dal terreno è stata effettuata utilizzando un rapporto terreno/acqua di 1:2,5; la concentrazione è stata misurata sugli estratti acquosi via HPLC, secondo le condizioni cromatografiche riportate in figura 2.

Figura 2 - Analisi di N-NO₃, condizioni cromatografiche



Al momento della raccolta per ciascuna delle tesi a confronto è stato determinato il peso secco della granella, della paglia ed il relativo contenuto in azoto (metodo Kjeldhal).

Dai valori rilevati è stato possibile calcolare l'efficienza apparente della concimazione e l'efficacia produttiva (Giardini, 1989):

Efficienza apparente della concimazione (Efa):

$$Efa = \frac{Dc - Dcn}{Dn} = \frac{\Delta Dc}{Dn}$$

dove Dc è la frazione di elemento assorbito dalla coltura concimata, Dcn è la frazione di elemento assorbito dalla coltura non concimata e Dn è la dose somministrata con la concimazione; il parametro "efficienza apparente" è stato riferito all'azoto, esprimendo quindi il rapporto percentuale tra quantità di azoto assorbito dalla coltura ed azoto distribuito con il fertilizzante, al netto degli apporti naturali.

Efficacia produttiva (Er):

$$Er = \frac{Rn - R_0}{Dn}$$

dove Rn-R₀ è l'incremento di resa conseguente all'impiego della dose Dn di elemento nutritivo; il parametro "efficacia produttiva", espresso come quantità di granella prodotta per unità di azoto distribuito.

I risultati sono stati sottoposti ad analisi della varianza secondo uno schema fattoriale con due fonti di variazione: tipo di concime (SNA e SNAI) ed epoca di distribuzione (alla semina, all'accestimento, frazionata). Per l'analisi dei dati relativi alla concentrazione dei nitrati nel suolo, ciascuna profondità e ciascuna epoca di campionamento sono state trattate separatamente.

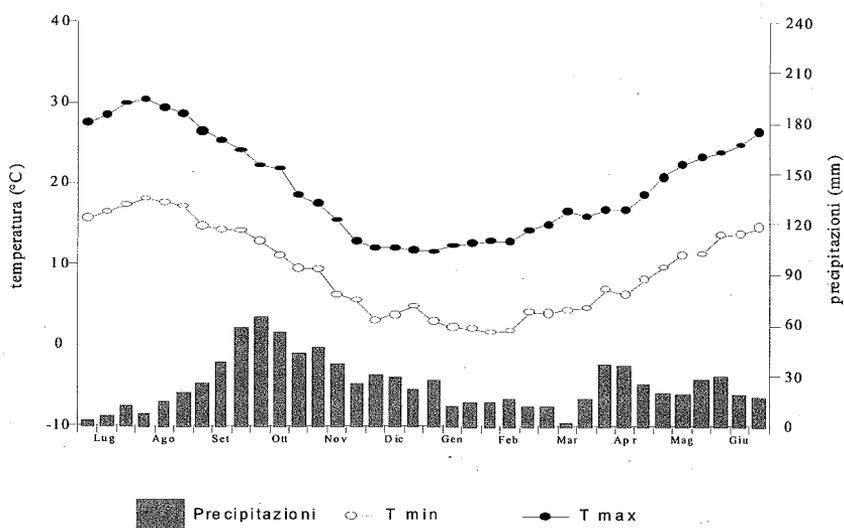
Nell'annata 1997-1998 è stata effettuata una prova sperimentale analoga, di tipo preliminare; nella presente nota si riportano i risultati produttivi a titolo comparativo.

Risultati e discussione

Andamento climatico

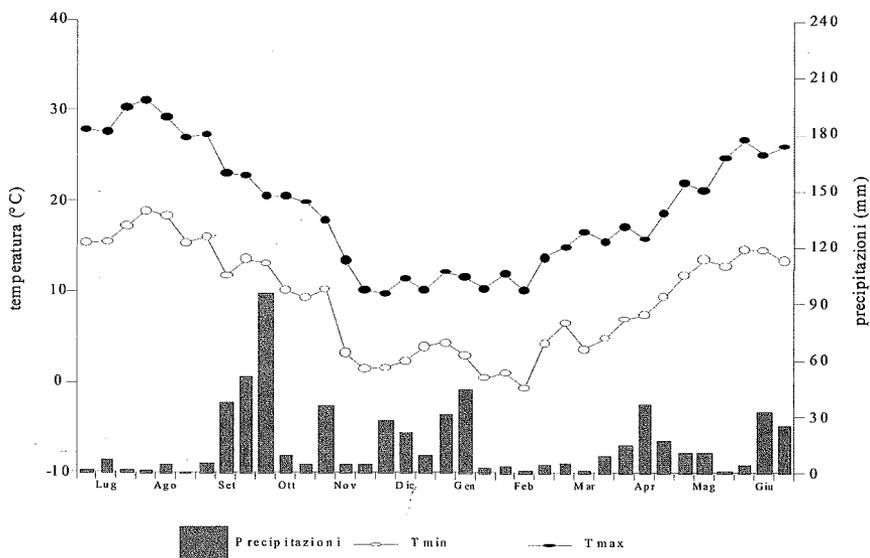
L'area che ha ospitato la prova è caratterizzata da un clima tipicamente mediterraneo con piovosità pari a circa 900 mm annui, concentrata nei mesi autunnali e primaverili. La temperatura media annua è pari a 15 °C; le minime medie che si registrano in gennaio e febbraio raramente scendono al di sotto dello zero, le massime medie si verificano in luglio e agosto (28-30 °C) (Fig. 3).

Figura 3 - Andamento decadico delle precipitazioni e delle temperature nel decennio 1989-1998



Nell'anno di prova, la piovosità registrata durante il ciclo colturale del frumento duro (270 mm circa) è risultata decisamente inferiore rispetto alla media poliennale (480 mm circa) (Fig. 4).

Figura 4 - Andamento decadico delle precipitazioni e delle temperature nell'anno di prova



In nessun caso le piogge hanno assunto carattere di rovescio né si sono verificate condizioni di ristagno idrico. In particolare, tra la terza decade di gennaio e la terza decade di marzo, periodo in cui il cereale è passato dalla fase di accestimento alla fase di levata, le precipitazioni totali sono state di soli 23 mm, rispetto ad una media decennale pari a 86 mm.

Aspetti produttivi

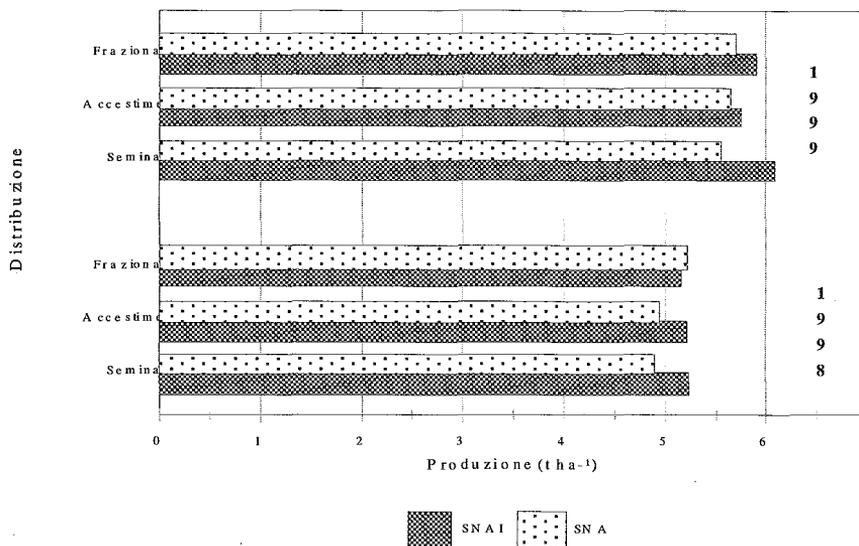
Nell'anno di prova i due fertilizzanti testati non hanno dato luogo a risultati produttivi significativamente diversi, anche se l'efficienza e l'efficacia produttiva sono risultate tendenzialmente maggiori nelle tesi trattate con SNAI. Anche l'epoca di distribuzione sembra aver influenzato in maniera contenuta la produttività della coltura; non sono state osservate rese granellari significativamente diverse tra distribuzione alla semina, all'accestimento e frazionata (Tab. 3). In termini di efficienza produttiva, indipendentemente dal tipo di prodotto utilizzato, i valori più alti sono stati riscontrati in corrispondenza delle tesi sottoposte a distribuzione frazionata. La distribuzione del fertilizzante stabilizzato in un'unica soluzione, alla semina o all'accestimento, ha fatto raggiungere gli stessi livelli produttivi ottenuti con il fertilizzante tradizionale distribuito in due epoche distinte. Anche l'interazione "tipo di fertilizzante x epoca" non ha evidenziato differenze statisticamente significative.

Tabella 3 - Effetto medio ed interazione dei fattori di variazione (tipo di concime ed epoca di distribuzione) su alcuni parametri legati alla produttività della coltura

Anno	EFFETTI MEDI						TIPO x EPOCA					
	Tipo di concime		Epoca di distribuzione				SNAI			SNA		
	SNAI	SNA	sem.	acc.	fraz.	sem.	acc.	fraz.	sem.	acc.	fraz.	
1998-1999												
Produzione utile (t ha ⁻¹)	5,89	5,62	5,79	5,67	5,79	6,06	5,73	5,88	5,53	5,62	5,7	
Efficienza apparente (%)	44	41	36	39	53	34	37	61	37	41	46	
Efficacia produttiva (kg di granella/kg di N)	6,9	6,2	6,8	6,3	6,5	7,3	6,6	6,7	6,3	5,9	6,4	

Le rese granellari del frumento confermano quanto osservato nell'annata precedente, caratterizzata da un andamento climatico sostanzialmente simile, all'inizio della campagna di sperimentazione sugli inibitori della nitrificazione. I risultati produttivi delle due annate (Fig. 5) sembrano influenzati dalla scarsa piovosità verificatasi a cavallo delle due concimazioni di copertura nei due anni di prova che potrebbe aver ridotto l'efficacia della prima fertilizzazione di copertura.

Figura 5 - Effetto "tipo di concime" x "epoca di distribuzione" sulla resa utile della coltura



In particolare nel 1998-1999, l'assenza di precipitazioni significative nel periodo successivo alla concimazione all'accestimento, ha influenzato negativamente sia le parcelle fertilizzate solo all'accestimento sia quelle che in questa fase hanno ricevuto il 70% del fertilizzante.

Concentrazione dei nitrati nel terreno

Indipendentemente dall'epoca di distribuzione del fertilizzante, il contenuto in azoto nitrico è risultato complessivamente minore nel terreno trattato con fertilizzante stabilizzato, nell'arco di tempo compreso tra la fase di accestimento e la fase di maturazione latteo-cerosa del frumento (Tab. 4).

Fase di accestimento

La concentrazione dell'anione nitrato nell'orizzonte 0-30 nelle parcelle fertilizzate con SNAI, è risultato minore del 40% rispetto alle tesi trattate con SNA (Tab. 4b). La localizzazione di questo fenomeno allo strato più superficiale del terreno può essere attribuita alle piogge di scarsa intensità verificatesi nel periodo compreso tra la data di concimazione e quella di campionamento, che potrebbero aver limitato la migrazione dell'azoto nitrico lungo il profilo.

Tabella 4 - Effetto medio ed interazione "tipo di concime" x "epoca di distribuzione" sul contenuto in azoto nitrico (kg ha⁻¹) in diversi orizzonti del terreno

Tab. 4 a 30.11.98		EFFETTI MEDI						TIPO x EPOCA							
(1)		Tipo di concime		Epoca di distribuzione			SNAI		TIPO x EPOCA			SNA			
Profondità	Test.	SNAI	SNA	sem.	acc.	fraz.	sem.	acc.	fraz.	sem.	acc.	fraz.	sem.	acc.	fraz.
0-30 cm	12,1	12,4	11,0	11,7	11,3	12,2	11,2	12,3	13,7	12,2	10,2	10,6			
30-60 cm	10,7	10,0	10,5	9,9	9,9	10,9	8,7	10,0	11,3	11,3	9,7	10,5			
0-60 cm	22,8	22,4	21,5	21,7	21,1	23,1	19,9	23,3	25,0	23,5	19,9	21,1			
Tab. 4 b 22.01.99		EFFETTI MEDI						TIPO x EPOCA							
(2)		Tipo di concime		Epoca di distribuzione			SNAI		TIPO x EPOCA			SNA			
Profondità	Test.	SNAI	SNA	sem.	acc.	fraz.	sem.	acc.	fraz.	sem.	acc.	fraz.	sem.	acc.	fraz.
0-30 cm	7,2	5,7b	9,5a	12,6a	5,5b	4,6b	7,6b	4,5b	4,9b	17,6a	6,5b	4,3			
30-60 cm	8,1	9,6	9,9	10,7	8,5	10,2	9,7	8,2	11,1	11,8	8,8	9,3			
60-90 cm	9,0	9,1	7,4	8,8	6,7	9,2	9,3	7,2	10,7	8,4	6,1	7,7			
0-90 cm	24,3	24,4	26,8	32,1a	20,6b	24,0b	26,6b	19,9b	26,7b	37,8a	21,4b	21,3			
Tab. 4 c 31.03.99		EFFETTI MEDI						TIPO x EPOCA							
(3)		Tipo di concime		Epoca di distribuzione			SNAI		TIPO x EPOCA			SNA			
Profondità	Test.	SNAI	SNA	sem.	acc.	fraz.	sem.	acc.fraz.	sem.	acc.	fraz.	sem.	acc.	fraz.	
0-30 cm	7,5	20,1	22,4	15,9b	26,6a	21,3ab	11,2	28,8	20,3	20,6	24,4	22,3			
30-60 cm	9,1	16,4	16,2	14,6b	15,4ab	19,1a	13,5	16,7	19,1	15,6	14,0	19,1			
60-90 cm	12,2	19,2b	25,0a	20,1	20,9	25,3	15,0	19,0	23,5	25,2	22,8	25,0			
0-90 cm	28,8	55,7b	63,7a	50,6b	62,9a	65,6a	39,7	64,5	62,9	61,4	61,2	68,4			
Tab. 4 d 01.06.99		EFFETTI MEDI						TIPO x EPOCA							
(4)		Tipo di concime		Epoca di distribuzione			SNAI		TIPO x EPOCA			SNA			
Profondità	Test.	SNAI	SNA	sem.	acc.	fraz.	sem.	acc.	fraz.	sem.	acc.	fraz.	sem.	acc.	fraz.
0-30 cm	5,3	9,2b	13,0a	5,4c	9,6b	18,2a	5,7c	9,5bc	12,3b	5,1c	9,7bc	24,1			
30-60 cm	2,9	8,9	9,1	7,7	8,0	11,2	7,2	8,0	11,4	8,2	7,9	11,1			
60-90 cm	3,7	8,3b	13,2a	9,0	10,9	12,4	6,7	8,4	9,8	11,3	13,3	15,0			
0-90 cm	11,9	26,4b	35,2a	22,1b	28,4b	41,9a	19,6	25,9	33,5	24,6	30,9	50,2			

(1) prima della concimazione alla semina;

(2) prima della concimazione all'accestimento e 53 gg dalla concimazione alla semina;

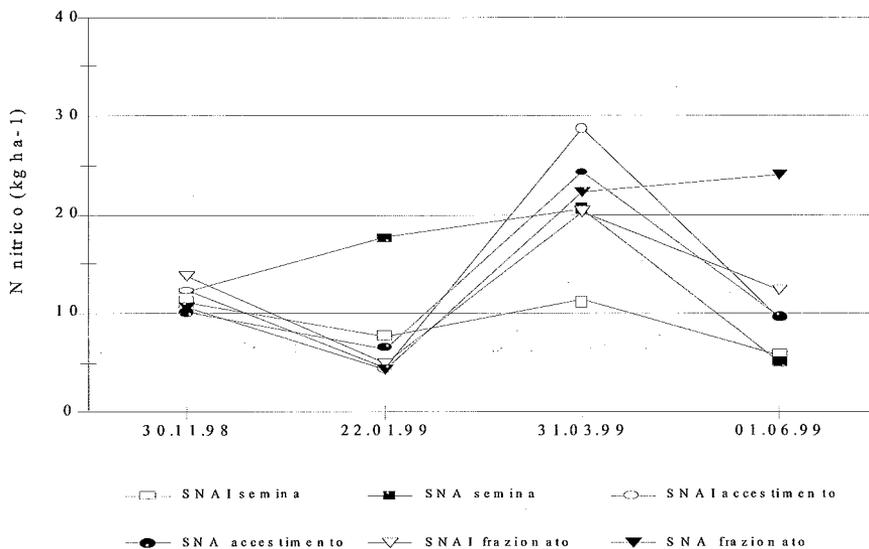
(3) prima della concimazione alla levata, 120 gg dalla concimazione alla semina e 67 gg dalla prima copertura all'accestimento;

(4) 182 gg dalla concimazione alla semina; 67 gg dalla prima copertura all'accestimento; 61 gg dalla seconda copertura alla levata.

Valori seguiti da lettere diverse sono significativamente diversi per $P \leq 0,05$ (Duncan's multiple range test)

L'analisi dell'interazione ha messo in evidenza una significativa riduzione (-57%) del contenuto in azoto nitrico nelle parcelle fertilizzate totalmente alla semina con SNAI rispetto a quelle sulle quali è stato impiegato SNA nelle stessa epoca (Fig. 6); la presenza di azoto nitrico nelle parcelle concimate in un'unica soluzione alla semina con SNAI è risultata della stessa entità di quelle utilizzate come controllo.

Figura 6 - Andamento del contenuto in N-NO₃ nei primi 30 cm di profondità del terreno



Fase di levata

A 120 giorni dalla semina, l'impiego dell'inibitore della nitrificazione ha determinato, in media, una significativa riduzione del contenuto in azoto nitrico sia nello strato di terreno più profondo del profilo (-23%), sia complessivamente nello strato 0-90 (-13 %) (Tab. 4c).

Fase di maturazione latteo-cerosa

In corrispondenza dell'ultimo campionamento (Tab. 4d), l'impiego del fertilizzante stabilizzato ha indotto significative riduzioni del contenuto in azoto nitrico nello strato più superficiale (-29%), nello strato più profondo (-37%) e complessivamente nell'intero profilo analizzato (-25%). I risultati ottenuti non sono stati influenzati dall'epoca di distribuzione del fertilizzante. È interessante osservare che rispetto alla distribuzione frazionata di SNA, che può essere considerata la tecnica ordinaria di concimazione, l'impiego di SNAI distribuito con le stesse modalità, ha indotto una riduzione del 49% della concentrazione dell'azoto nitrico nel profilo 0-30 cm.

Nello strato più profondo del terreno, le parcelle fertilizzate con SNAI, comunque distribuito, hanno fatto registrare valori confrontabili con quelli delle parcelle non concimate utilizzate come controllo.

Conclusioni

Le condizioni ambientali del periodo di prova, caratterizzate da precipitazioni di scarsa entità e frequenza, hanno sensibilmente ridotto il rischio potenziale di lisciviazione dell'azoto durante il ciclo colturale del frumento duro, non hanno permesso quindi di valorizzare appieno i vantaggi connessi all'impiego dell'inibitore della nitrificazione. Ciò nonostante il fertilizzante stabilizzato ha determinato significative riduzioni delle concentrazioni di N-NO₃ lungo il profilo del terreno, anche nel caso della distribuzione in un'unica soluzione alla semina o all'accestimento. Con questo tipo di distribuzione si sono inoltre ottenuti i medesimi risultati produttivi della tecnica convenzionale (distribuzione frazionata del fertilizzante senza inibitore).

Bibliografia

- BENEDETTI A. (1998). Fertilizzanti e ambiente un equilibrio possibile. *Terra e Vita* n12 supplemento: 4-8.
- BONARI E., SILVESTRI N., PAMPANA S. (1996). Alcune riflessioni agronomiche sull'agricoltura all'interno delle aree protette. Il caso del Parco Naturale di Migliarino, San Rossore e Massaciuccoli. La valorizzazione dell'agricoltura ecocompatibile nei parchi naturali. Litografia Felici ed., 13-25.
- BRO A.R. (1994). Suppression of methane oxidation in aerobic soil by nitrogen fertilizers, nitrification inhibitors, and urease inhibitors. *Biol. Fertil. Soils*, 17(4): 263-268. Springer-Verlag, Berlin.
- DELGADO J.A., MOSIER A.R. (1996). Mitigation alternatives to decrease nitrous oxides emissions and urea-nitrogen loss and their effect on methane flux. *J. Environ. Qual.* 25(5). CodeN. JEVQAA; ISSN: 0047-2425.
- GIARDINI L. (1989). Aspetti agronomici e fisiologici della concimazione azotata in relazione con l'ambiente. *Rivista di Agronomia*, 1: 3-22.
- KAUPPI L. (1990). Hydrology: water quality changes. In: *Toward ecological sustainability in Europe climate, water resources, soils, and biota*. International Institute for Applied System Analysis, Luxemburg, Austria, 43-63.
- SCHWEIGER P. (1991). Wege zur Minimierung des Nitrateintrages (Ways to minimize nitrate losses). German. Proceedings: Stabilisierte Stickstoffduenger-ein Beitrag zur Verminderung des Nitratproblems. Fachtagung: 15./16. Oktober 1991, Wurzburg. Publisher: BASF Aktiengesellschaft, Limburgerhof, SKW Trostberg AG, Germany.
- TESI D., ZERULLA W. (1999). 3,4 DMPP, fertilizzanti stabilizzati per un'agricoltura sostenibile. *Bollettino della Società Italiana di Scienza del Suolo*, volume 48 (4), 867-872.
- WATSON C.J., MILLER H., POLAND P., KILPATRICK D.J., ALLEN M.D.B., GARRET M.K., CHRISTIANSON C.B. (1994). Soil properties and the ability of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (nBTPT) to reduce ammonia volatilization from surface-applied urea. *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 26, No. 9, pp. 1165-1171.
- ZACHERL B., AMBERGER A. (1990). Effect of the nitrification inhibitors dicyandiamide, nitrapyrin and thiourea on *Nitrosomonas europaea*. *Fertilizer Research*, 22: 37-44.

*IMPIEGO DI UREA STABILIZZATA CON 3,4-DIMETIL-
PIRAZOLO FOSFATO IN UN TERRENO DI RISAIA:
I. INFLUENZA SULLA PRODUZIONE E SULLE
PERDITE PER LISCIVIAZIONE DI N NITRICO*

Marina Gatti, Beatrice Taina, Sandro Silva

Istituto di Chimica Agraria e Ambientale, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza
Via Emilia Parmense, 84 - 29100 Piacenza

Introduzione

Il principale concime azotato usato in risaia, sia sommersa che non sommersa è l'urea. Una volta applicata al terreno l'urea viene idrolizzata formando ioni NH_4^+ . L'N ammoniacale entra nel ciclo dell'N del terreno diventando soggetto ad ossidazione ad N nitrico, a volatilizzazione come ammoniaca, a fissazione sulle argille e a immobilizzazione nelle forme di N organico (Keeney e Sahrawat, 1986).

Tutti questi passaggi competono con l'assorbimento di N ammoniacale da parte del riso.

L'ossidazione ad N nitrico, operata dai microorganismi nitrificanti, rende questa forma suscettibile a perdite per lisciviazione e nell'ambiente anaerobico della coltivazione in sommersione a perdite per denitrificazione sotto forma di N_2O e N_2 (De Datta, 1979; Craswell e Vlek, 1979).

Durante la coltivazione del riso in sommersione, più diffusamente praticata in Italia in terreni a tessitura franco-sabbiosa, sia le precipitazioni che le irrigazioni frequenti contribuiscono ad un potenziale aumento dell'inquinamento delle acque sotterranee da N nitrico proveniente dal fertilizzante. Tuttavia, anche la coltivazione senza sommersione ha dimostrato in prove precedenti di comportare sensibili perdite di nitrati per lisciviazione (Gatti *et al.*, 1998).

Dato che l'N ammoniacale è meno soggetto a perdite per dilavamento, ritardando la trasformazione dell'N ammoniacale ad N nitrico con una inibizione selettiva dell'attività dei batteri nitrificanti, si possono ridurre le perdite di N per lisciviazione e per denitrificazione (Bremner e Yeomans, 1987; Prasad e Power, 1995).

Pertanto l'inibitore di nitrificazione stabilizzando l'N aggiunto con il fertilizzante consente all'N ammoniacale di permanere sotto questa forma nel suolo per alcune settimane (McCarty, 1999).

Il 3,4-dimetilpirazolo fosfato (3,4-DMPP) è da qualche anno sotto studio per valutarne gli effetti come inibitore di nitrificazione, avendo mostrato di interferire sulla respirazione del batterio *Nitrosomonas* già alla dose di applicazione pari all'1% dell'N nitrificabile del fertilizzante, stabilizzando l'N ammoniacale per un periodo di 4-8 settimane (Tesi e Zerulla, 1999; Zerulla *et al.*, 1999).

Scopo di questo studio biennale è stato quello di testare la performance del 3,4-DMPP aggiunto all'urea quale inibitore di nitrificazione in un suolo di risaia sottoposto a due diversi regimi irrigui attraverso la valutazione (a) dell'effetto stabilizzante del prodotto sull'N ammoniacale derivato dal fertilizzante, (b) delle eventuali perdite di N nitrico per lisciviazione.

Materiali e Metodi

La prova sperimentale in lisimetri è stata condotta nel biennio 1997-98 a Vercelli presso la Stazione Sperimentale per la Cerealicoltura, sezione Specializzata in Riscoltura (MIRAF). Il terreno di classe tessiturale franco-sabbiosa conteneva 1,2 g kg⁻¹ di N totale, 12,7 g kg⁻¹ di C organico totale, 17,5 meq 100g⁻¹ di C.S.C., 5,3 meq 100g⁻¹ di K scambiabile, 390 mg kg⁻¹ di P totale e aveva un pH di 6,9.

I trattamenti irrigui prevedevano un regime in sommersione continua, con uno strato acquoso di ~5 cm, e un regime non sommerso, mantenendo il terreno ad una umidità pari al 20% della capacità di campo mediante periodiche irrigazioni per scorrimento superficiale.

La concimazione azotata è stata eseguita con urea alle dosi di 200 e 150 kg N ha⁻¹, rispettivamente nel 1997 e 1998, con e senza 3,4-DMPP. In entrambi gli anni, la dose di applicazione dell'inibitore di nitrificazione è stata pari all'1% della quantità di N ureico. Nella sperimentazione del secondo anno è stata aggiunta una tesi senza concimazione azotata, con funzione di controllo. Il disegno sperimentale era a blocchi randomizzati completi con 4 replicati per ciascun sistema irriguo e trattamento fertilizzante.

L'N ureico è stato distribuito nelle diverse tesi in tre frazioni uguali - all'impianto e agli stadi fenologici di 3^a-4^a foglia e di fine accestimento - questi ultimi corrispondenti alle fasi di maggior fabbisogno azotato

per la pianta che sono quelle dell'accestimento e dello sviluppo della pannocchia. Le frazioni azotate in copertura sopra indicate sono state applicate a 56, 87 gg e a 52, 72 gg rispettivamente dalla concimazione all'impianto nel biennio in oggetto.

I cassoni lisimetrici, con un'area di 1,4 m² ciascuno ed un'altezza emergente dal piano di campagna di 1,4 m, erano dotati di tubi in polietilene pescanti sul fondo per la raccolta delle acque di percolazione. I campioni di terreno e di acque sono stati prelevati durante il ciclo di sviluppo del riso fino alla maturazione, coprendo un periodo di circa 150 gg in entrambe le prove sperimentali.

L'N nitrico è stato analizzato per cromatografia ionica (Dionex, 2000i/SP) dopo filtrazione dei campioni di acqua e degli estratti acquosi di suolo (Gatti *et al.*, 1998), attraverso un filtro a membrana in acetato di cellulosa (< 0,45 µm) e una cartuccia C₁₈ per la rimozione di eventuali contaminanti organici. La determinazione dell'N ammoniacale nei campioni di terreno è stata eseguita utilizzando la metodica con elettrodo specifico (Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo, 1999).

Le medie dei dati relative a ciascuna epoca di prelievo sono state sottoposte ad analisi della varianza e confrontate con il test della minima differenza significativa (LSD).

Risultati e discussione

Durante il 1° anno di sperimentazione, l'applicazione di urea stabilizzata con 3,4-DMPP ha mantenuto nel suolo non sommerso livelli significativamente più elevati di N-NH₄ rispetto al trattamento con solo urea (tabella 1), con incrementi percentuali tra il 60 e il 200% circa, secondo l'epoca di prelievo. Viceversa, la trasformazione di N-NH₄ in N-NO₃ è stata molto più rapida in assenza di 3,4-DMPP, indicata dai rapporti N-NH₄ / N-NO₃ nel terreno per ogni epoca di prelievo. Nel corso della prova questi indici diminuiscono, suggerendo un aumento della velocità di nitrificazione per entrambi i trattamenti (urea e urea + 3,4-DMPP). Nel terreno ammendato con 3,4-DMPP una più elevata concentrazione di N-NO₃ alla fine del ciclo colturale rispetto al trattamento con solo urea suggerisce un rischio di dilavamento nella fase successiva alla raccolta.

Anche in sommersione il trattamento con 3,4-DMPP ha determinato una crescita dei livelli di N-NH₄ che hanno raggiunto differenze significative rispetto al trattamento con urea non stabilizzata nel 3° e 5° prelievo, entrambi effettuati dopo l'ultima applicazione di N fertilizzante.

Tabella 1. Effetto del 3,4-DMPP sulle concentrazioni di N-NH₄ e N-NO₃ nel terreno al variare del regime idrico non sommerso e sommerso e delle epoche di prelievo durante il 1° anno di sperimentazione.

Regime idrico	Epoche di prelievo	N-NH ₄		N-NO ₃	
		Urea	Urea + DMPP	Urea	Urea + DMPP
<--- gg* --->		<----- mg kg ⁻¹ § ----->			
Non Sommerso	39 dalla 1 ^a	4,42 a	11,1 b	6,12 b	2,90 a
	12 dalla 2 ^a	8,71 a	13,9 b	12,6 b	5,41 a
	2 dalla 3 ^a	17,0 a	34,4 b	29,4 b	8,13 a
	36 dalla 3 ^a	3,30 a	15,4 b	26,4 b	13,4 a
	66 dalla 3 ^a	1,08 a	3,18 b	13,9 a	26,2 b
Sommerso	39 dalla 1 ^a	4,55 a	4,77 a	7,07 b	3,00 a
	12 dalla 2 ^a	11,0 a	11,9 a	4,97 a	3,63 a
	2 dalla 3 ^a	15,6 a	22,3 b	2,52 a	1,39 a
	36 dalla 3 ^a	4,80 a	5,73 a	2,57 a	1,96 a
	66 dalla 3 ^a	3,32 a	4,94 b	5,89 b	2,89 a

* giorni dall'ultima applicazione della frazione di N ureico;

§ in ciascuna riga a concentrazioni di N-NH₄ e N-NO₃ seguite da lettere diverse corrispondono differenze significative per P_e ≤ 0.05.

Dalla tabella 1 si può inoltre osservare che in sommersione si sono registrati aumenti significativi delle concentrazioni di N-NO₃ nel suolo soltanto all'inizio e al termine del periodo sotto osservazione con il trattamento con urea non stabilizzata. Rispetto al trattamento non sommerso, i rapporti N-NH₄ / N-NO₃ nel suolo in sommersione evidenziano, come ci si può attendere in condizioni riducenti, un minor grado di nitrificazione, ad eccezione dell'applicazione della 1a frazione di N fertilizzante per entrambi i trattamenti con urea e urea + 3,4-DMPP.

Nella tabella 2 sono riportati i risultati analitici del 2° anno, relativi agli stessi trattamenti fertilizzanti eseguiti alla dose di 150 kg ha⁻¹ di N-ureico. Sia nel suolo non sommerso che in quello sommerso l'aggiunta di 3,4-DMPP ha determinato analoghi andamenti di concentrazione ammoniacale e nitrica osservati durante la sperimentazione dell'anno precedente, con la differenza che l'applicazione di una dose complessivamente inferiore di N-ureico ha comportato concentrazioni di N-NO₃ non diverse dal controllo per entrambi i trattamenti fertilizzanti al termine del ciclo colturale. Nel corso della prova il trattamento con urea non stabilizzata ha comunque determinato nel suolo non sommerso intensità di trasformazione di N-NH₄ in N-NO₃ superiori anche alla tesi controllo.

Tabella 2. Effetto del 3,4-DMPP sulle concentrazioni di N-NH₄ e N-NO₃ nel terreno al variare del regime idrico non sommerso e sommerso e delle epoche di prelievo durante il 2° anno di sperimentazione.

Regime idrico	Epoche di prelievo	N-NH ₄			N-NO ₃		
		Urea	Urea + DMPP	Controllo	Urea	Urea + DMPP	Controllo
		<--- gg* ---> <----- mg kg ⁻¹ § ----->					
Non Sommerso	46 dalla 1 ^a	2,33 a	4,29 b	2,54 a	8,27 c	5,89 b	3,21 a
	9 dalla 3 ^a	12,5 b	24,3 c	2,65 a	24,1 c	18,8 b	3,33 a
	58 dalla 3 ^a	3,38 b	2,98 ab	2,29 a	6,62 a	7,70 a	6,09 a
Sommerso	46 dalla 1 ^a	2,90 a	2,98 a	3,20 a	4,39 b	2,25 a	3,26 ab
	9 dalla 3 ^a	6,16 b	8,47 c	3,95 a	4,12 a	3,30 a	3,25 a
	58 dalla 3 ^a	3,44 a	2,74 a	3,09 a	4,21 a	3,98 a	3,70 a

* giorni dall'ultima applicazione della frazione di N ureico;

§ in ciascuna riga a concentrazioni di N-NH₄ e N-NO₃ seguite da lettere diverse corrispondono differenze significative per P ≤ 0.05.

Nel corso del 2° anno la quantità di N inorganico (N-NH₄ + N-NO₃) recuperata nel suolo con l'impiego di 3,4-DMPP è risultata significativamente maggiore rispetto al trattamento con urea senza 3,4-DMPP per entrambi i regimi irrigui. Le concentrazioni di N inorganico sono state calcolate dalla differenza tra le concentrazioni di ciascuna forma azotata, ammoniacale o nitrica, nel terreno concimato e il controllo, scartando dalla successiva elaborazione le differenze di segno negativo. La somma delle differenze viene attribuita alla quota di N inorganico nel suolo derivata dal fertilizzante.

Tradotti in percentuali, gli incrementi di N inorganico ottenuti con l'impiego dell'ammendante 3,4-DMPP sono risultati del 21 e 76% nel suolo non sommerso e del 94 e 128% nel suolo in sommersione, rispettivamente nel 2° e 3° prelievo. Tali risultati suggeriscono l'efficacia del prodotto 3,4-DMPP nel mantenere più a lungo nel tempo l'N fertilizzante in forma ammoniacale e nel graduare la sua trasformazione in forma nitrica.

Le concentrazioni di N-NO₃ nelle acque di lisciviazione hanno mostrato, ad entrambe le dosi di 150 e 200 kg N ha⁻¹, un marcato trend in diminuzione dopo il picco di massima concentrazione a circa 40-50 giorni dall'applicazione della prima frazione di N fertilizzante, indipendentemente dal regime irriguo imposto al terreno (tabella 3). Le perdite di N-NO₃ per lisciviazione sono state relativamente più elevate dal suolo non sommerso con concentrazioni significativamente inferiori con l'impiego di urea + 3,4-DMPP rispetto al trattamento con solo urea.

Tabella 3. Effetto del 3,4-DMPP sulla concentrazione di N-NO₃ nelle acque di lisciviazione al variare del regime idrico imposto al terreno e delle epoche di prelievo.

Anno di prova	Epoche di prelievo	Non Sommerso			Sommerso		
		Urea	Urea + DMPP	Controllo	Urea	Urea + DMPP	Controllo
		mg N-NO ₃ L ⁻¹ §					
		<--- gg* --->		<----->			
1997	39 dalla 1 ^a	12,4 b	10,0 a		12,8 a	12,6 a	
	12 dalla 2 ^a	5,39 b	2,87 a		2,11 a	1,89 a	
	2 dalla 3 ^a	2,60 a	1,55 a		0,31 a	0,39 a	
	36 dalla 3 ^a	1,72 b	0,86 a		0,10 b	0,04 a	
	66 dalla 3 ^a	0,32 a	1,17 b		0,03 a	0,02 a	
1998	46 dalla 1 ^a	14,0 c	11,5 b	8,41 a	9,30 b	8,35 ab	7,93 a
	9 dalla 3 ^a	3,50 b	2,28 a	2,48 a	1,11 b	0,87 ab	0,77 a
	58 dalla 3 ^a	0,77 a	1,23 a	1,22 a	0,03 a	0,03 a	0,02 a

* giorni dall'ultima applicazione della frazione di N ureico;

§ in ciascuna riga per ogni regime idrico a concentrazioni di N-NO₃ seguite da lettere diverse corrispondono differenze significative per $P \leq 0.05$.

Mentre alla dose di 200 kg N ha⁻¹ al termine del ciclo colturale si osserva un aumento della concentrazione di N-NO₃ per il trattamento con 3,4-DMPP rispetto al trattamento con solo urea, alla dose di 150 kg N ha⁻¹ non sono state riscontrate differenze significative tra i livelli di nitrati nelle acque del controllo non concimato e il trattamento fertilizzante con l'impiego di 3,4-DMPP.

Per il regime irriguo in sommersione non si osservano differenze significative tra le concentrazioni di N-NO₃ dei trattamenti fertilizzanti, tuttavia nel 2° anno di prova si è potuto riscontrare che il trattamento con solo urea determina concentrazioni di N-NO₃ nelle acque di percolazione significativamente maggiori alla tesi non concimata.

Nonostante la risaia in sommersione comporti un minor rischio di inquinamento delle acque sotterranee da N-NO₃ derivato dal fertilizzante rispetto alla coltivazione non sommersa presenta tuttavia un potenziale aumento di emissione di composti azotati nell'atmosfera. Va infatti sottolineato che la sommersione ha mantenuto costantemente nel tempo livelli significativamente inferiori di N inorganico rispetto al suolo non sommerso in entrambi gli anni. Nonostante tali diminuzioni siano risultate generalmente meno accentuate con l'impiego di 3,4-DMPP, e perciò attribuibili a perdite inferiori di N per denitrificazione, si può ragionevolmente supporre che la sommersione abbia comportato nel corso del ciclo colturale consistenti perdite di N per volatilizzazione di NH₃ e per denitrificazione.

Conclusioni

Il biennio di prove con l'impiego di 3,4-DMPP formulato con urea ha dimostrato sia l'efficacia del prodotto quale inibitore di nitrificazione, graduando la trasformazione dell'N ammoniacale in forma nitrica, sia di mantenere nel suolo una quota maggiore di N inorganico, specialmente durante il 2° anno di prova. Questi risultati hanno avuto riscontro in una riduzione delle perdite di N-NO₃ per lisciviazione, soprattutto dal suolo mantenuto non sommerso. Per entrambi i regimi irrigui il rischio di dilavamento di N nitrico è comunque associato all'applicazione della prima frazione azotata all'impianto, indipendentemente dall'uso o meno di urea stabilizzata. Nella sperimentazione condotta con una dose complessivamente maggiore di N-ureico, il 3,4-DMPP ha tuttavia aumentato la concentrazione di N-NO₃ nel suolo alla fine del ciclo colturale in un periodo di minore utilizzo da parte della pianta, rendendolo così soggetto a perdite per lisciviazione.

I risultati ottenuti suggeriscono di approfondire gli aspetti che legano l'uso di questo ammendante ad azione inibitrice, dose di N fertilizzante ed epoche di applicazione di quest'ultima, non soltanto nei confronti della quota di nutriente in forma inorganica a disposizione della coltura ma anche nei confronti della frazione di N fertilizzante accumulata nella sostanza organica del suolo, che dalla letteratura specifica risulta aumentare in presenza di inibitori di nitrificazione (Norman e Wells, 1989; Wilson *et al.*, 1990).

Bibliografia

- BREMNER J.M., YEOMANS J.C. (1987). Effects of nitrification inhibitors on denitrification of nitrate in soil. *Biology and Fertility of Soils* 2: 173-179.
- CRASWELL E.T., VLEK P.L.G. (1979). Fate of fertilizer nitrogen applied to wetland rice. In: *Nitrogen and Rice*, (W.G. Rockwood ed.), International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, pp. 175-192.
- DE DATTA S.K. (1979). Fertilizer management for efficient use in wetland rice soils. In: *Nitrogen and Rice*, (W.G. Rockwood ed.), International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, pp. 671-701.
- GATTI M., SASSI D., SILVA S. (1998). Nitrogen fate and use as influenced by flooded and dry rice and nitrogen fertilization. In *Atti XV Convegno Nazionale S.I.C.A.*, Pàtron Editore, Bologna, pp. 305-312.
- KEENEY D.R., SAHRAWAT K.L. (1986). Nitrogen transformations in flooded rice soils. In: *Nitrogen Economy of Flooded Rice Soils*, (S.K. De Datta e W.H. Patrick jr. eds.), Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, pp. 15-38.
- McCARTY G.W. (1999). Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils* 29: 1-9.
- Metodi Ufficiali di Analisi del Suolo (1999). Determinazione degli ioni ammonio con l'impiego di elettrodo specifico. Suppl. ord. *Gazz. Uff.* n. 248 del 21 Ottobre, pp. 170-171.
- NORMAN R.J., WELLS B.R. (1989). Effect of dicyandiamide on the form and recovery of ¹⁵N-labelled flood soil system. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 20: 2079-2089.

- PRASAD R., POWER J.F. (1995). Nitrification inhibitors for agriculture, health and the environment. *Advances in Agronomy* 54: 233-281.
- TESI D., ZERULLA W. (1999). 3,4-DMPP, fertilizzanti stabilizzati per un'agricoltura sostenibile. In *Ambiente-Alimentazione- Salute: Agricoltura e Zootecnia*, Forum Distretto 2050 R.I. e U.C.S.C., Piacenza, pp. 53-61.
- WILSON Jr.C.E., NORMAN R.J., WELLS B.R. (1990). Dicyandiamide influence on uptake of preplant-applied fertilizer nitrogen by rice. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 54: 1157-1161.
- ZERULLA W., ERHARDT K., DRESSEL J., HORCHLER von LOCQUENQHIE K., LEIBOLD E., BARTH T. (1999). DMPP – ein neuer Nitrifikationshemmstoff für Landwirtschaft und Gartenbau. *VdLUFA - Kongre'band 50*, VDLUFA-Verlag, Darmstadt, pp. 525-528.

METILENUREA LIQUIDA: RISULTATI DI UN PROGETTO DI RICERCA ITALIANO

Sergio Miele

Dipartimento di Agronomia e Gestione dell'Agroecosistema, Università di Pisa
Via San Michele degli Scalzi, 2 - 56124 Pisa

Riassunto

La crescente attenzione verso produzioni agricole di qualità e la riduzione dell'impatto ambientale dell'agricoltura hanno favorito la ricerca di nuovi fertilizzanti ad alta efficienza, tra cui i concimi azotati a lenta cessione. Tra questi, è stato sviluppato un nuovo fertilizzante in soluzione a base di metilenurea, un breve polimero lineare di urea-formaldeide. Il formulato presenta 20 unità di azoto metilenureico ed 8 ureico. Il fertilizzante rilascia progressivamente il suo azoto in 120-130 giorni, per effetto della naturale mineralizzazione operata dai microrganismi del suolo. L'attività sperimentale svolta in Italia ed altri Paesi europei ha evidenziato che il prodotto è in grado di ridurre significativamente le perdite di azoto per lisciviazione e di consentire l'ottenimento di buoni risultati produttivi con dosi di azoto inferiori del 20-25% rispetto ai concimi tradizionali. La qualità delle produzioni, in particolare di grano e barbabietola da zucchero, viene migliorata. La forma liquida favorisce inoltre i trattamenti combinati, con vantaggi in termini di riduzione dei passaggi sugli appezzamenti ed economicità d'intervento.

Parole chiave: Concimi azotati a lenta cessione, Slow-release, Metilenurea, urea-formaldeide, concimi liquidi

Summary

Increasing attention to high quality crop productions and reducing the environmental impact of agriculture have favoured the research of new Nitrogen fertilizers, with high nutrient efficiency, such as Slow-release Nitrogen fertilizers. Among these products, a new Methylenurea-based solution fertilizer was developed. Methylenurea is a short polymer of urea-formaldehyde. This fertilizer, with 20 units as Methylenurea-N and 8 units as Urea-N, releases progressively, in 120-130 days, its Nitrogen, due to the natural mineralization of soil microorganisms. The experimental activity carried

out in Italy and other European Countries showed that this product permitted to significantly reduce $N-NO_3^-$ loss for leaching and obtain good crop yields with Nitrogen rates 20-25% lower than the traditional Nitrogen fertilizers. Crop production quality, e.g. of wheat and sugar beet, was also improved. The liquid form of the fertilizer favours combined treatments, reducing trips across the fields and operation costs.

Key words: Slow-release Nitrogen Fertilizers, Methylenurea, Liquid Fertilizers, Nitrogen Use Efficiency

L'azoto è il principale elemento nutritivo in grado di stimolare lo sviluppo vegetale. Tuttavia, presenta anche una bassa efficienza: non più del 50% nella maggior parte delle condizioni colturali (1) (2). In forma nitrica può infatti perdersi per denitrificazione e nelle acque per lisciviazione. Qui, se arriva ad interessare le falde ed i corpi idrici superficiali, può influenzare negativamente la potabilità delle acque. E' quindi del massimo interesse, per la salute pubblica e la stessa economicità del processo agricolo, operare nell'intento di aumentare l'efficienza d'uso dell'azoto (*Nitrogen Use Efficiency*), vale a dire per incrementare la quota dell'azoto applicato che viene effettivamente assorbita dalle piante (*recovery* apparente) per produrre biomasse di elevato valore biologico. La ricerca agronomica ha dimostrato che quanto sopra è possibile ottimizzando il dosaggio e la tempistica applicativa dell'azoto o usando concimi meno soggetti a rilascio incontrollato di azoto nell'ambiente, in confronto ai formulati tradizionali (3), come ad esempio i fertilizzanti con azoto a lenta cessione. La Task Force Slow-release Fertilizers dello European Committee for Normalization (4) ha proposto che un concime possa essere definito "a lento rilascio" solo se l'elemento nutritivo dichiarato come tale, in condizioni definite, tra cui una temperatura di 25°C, soddisfa i seguenti tre criteri:

- Non più del 15% rilasciato in 24 ore.
- Non più del 75% rilasciato in 28 giorni.
- Almeno il 75% rilasciato nel previsto tempo di cessione.

I vantaggi legati all'impiego di concimi con azoto a lento rilascio sono, in breve:

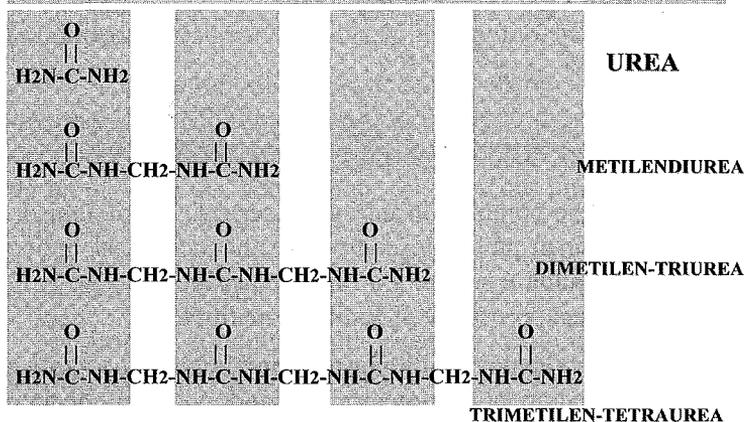
- Diminuzione dei dosaggi, a pari o superiore livello di resa quali-quantitativa, perché l'azoto è più efficiente.
- Ridotta fitotossicità, quando il fertilizzante viene a diretto contatto delle piante.

- Minori passaggi, con contenimento dei costi di applicazione e del calpestamento del suolo.
- Inferiore impatto ambientale, con possibilità di rientrare nei programmi di finanziamento all'agricoltura per la riduzione degli input.

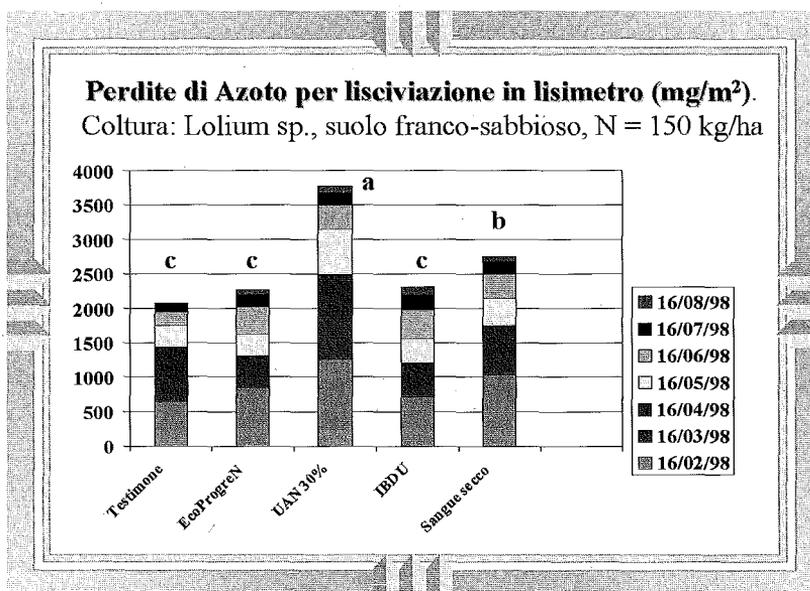
Nell'ambito dei prodotti a lento rilascio, quello che finora è stato oggetto di massima attenzione da parte della ricerca tecnologica è la metileneurea. Con questo termine si identificano i prodotti di condensazione dell'urea-formaldeide (UF), uno dei primi concimi a lenta cessione al mondo. Il primo brevetto della tedesca BASF è infatti del 1924, ma è solo dal 1955 che alcuni polimeri di UF sono stati commercializzati negli USA a scopo fertilizzante (5). Negli anni, sono stati realizzati numerosi nuovi brevetti, nell'intento di produrre concimi sempre più efficienti e con caratteristiche chimiche e di rilascio specifiche per i diversi impieghi. Attualmente, il termine metileneurea identifica quindi il maggior gruppo di concimi azotati a lenta cessione usati al mondo; "gruppo" e non singolo prodotto, perché i polimeri di UF possono presentare caratteristiche fertilizzanti molto diverse, a seconda del processo di produzione.

Nell'ambito di una ricerca commissionata da SADEPAN CHIMICA al Consorzio per la Chimica e Tecnologia dei Materiali di Firenze, e svolta a livello operativo dai Dipartimenti di Agronomia e Gestione dell'Agroecosistema e di Chimica e Chimica Industriale dell'Università di Pisa, è stato sviluppato un nuovo fertilizzante in soluzione a base di metileneurea, denominato Sazolene 28 L, specificamente formulato con prevalenza di trimeri e tetrametri lineari di urea-formaldeide (Fig. 1) e praticamente esente da residui di formaldeide libera.

Forme di Azoto nell'EcoProgen 28 L



Il prodotto presenta 20 unità di azoto metilureico ed 8 ureico. Il nome con il quale si è diffuso a livello operativo, EcoProgreN® 28 L (acronimo di Ecologically Progressively Relaxed Nitrogen), si riferisce al fatto che il fertilizzante rilascia progressivamente il suo azoto, in 120-130 giorni, per effetto della naturale mineralizzazione operata dai microrganismi del suolo, con temperature superiori a 5°C. Siccome il meccanismo di rilascio è lo stesso che favorisce la crescita delle piante, si verifica che il rilascio di azoto e l'assorbimento operato dalla pianta procedono di pari passo, con chiari vantaggi di ordine ambientale. In ciò il prodotto evidenzia una marcata differenza di comportamento rispetto ad altri fertilizzanti a lenta cessione che agiscono come tali esclusivamente (prodotti ricoperti) o prevalentemente (IBDU) per effetto della loro bassa solubilità in acqua. La forma liquida non altera minimamente l'andamento del rilascio di azoto da questa metilurea, come evidenziato nel corso di prove in ambiente controllato e lisimetro. Sotto azione dell'acqua gravitazionale, il prodotto viene fisicamente trattenuto dal suolo fintanto che non ha luogo la nitrificazione (Fig. 2).



Le ricerche condotte in un'ampia serie di condizioni di suolo, umidità e temperatura, in ambiente controllato, hanno altresì indicato che questa metilurea liquida è soggetta a minime perdite di azoto per volatilizzazione di ammoniaca, prossime ai limiti di analitici.

Un preciso vantaggio di questa forma liquida di azoto è che determina bassi o nulli fenomeni di fitotossicità quando viene applicata in post-

emergenza dei cereali a paglia, a differenza delle tradizionali soluzioni di urea-nitrato ammonico (Fig.3). Ciò significa un parziale assorbimento fogliare di azoto più efficiente e prolungato, soprattutto delle frazioni ureica e metileneureiche a più basso peso molecolare, in aggiunta all'effetto fertilizzante mediato dal terreno.

**METILENUREA LIQUIDA 28%
FITOTOSSICITA' SUI CEREALI A PAGLIA**

- **CONFRONTO CON SOL. UAN 30%**
- **DOSI: 200-550 l/ha, TEE-JET 8008/8015**
- **EPOCA: INIZIO ACCESTIMENTO**
- **FITOTOSSICITA': SCALA 1 (MIN) - 9(MAX)**

	MU-28	UAN-30
A 7 gg.	3	7
A 14 gg.	2	5
A 21 gg.	1	3

Attraverso la ricerca agronomica si è tentato di dare una risposta ai seguenti quesiti:

- Andamento del rilascio di azoto: il prodotto è in grado di soddisfare le esigenze di colture diverse? Qual è il momento migliore per effettuarne l'applicazione sulle varie specie agrarie?
- Effetto fertilizzante: è possibile migliorare la qualità delle colture?
- Dosi di applicazione: è conveniente sotto il profilo economico passare dai concimi azotati tradizionali a questa forma di azoto.

A causa del suo meccanismo d'azione progressivo, il fertilizzante deve essere distribuito con un anticipo di 30-60 giorni in confronto agli azotati convenzionali. Ad esempio per il grano la sperimentazione sin qui condotta ha indicato che il momento migliore per intervenire in post-emergenza è la fase di inizio accestimento e non il pieno-fine accestimento o l'inizio levata, come accade invece con la soluzione di urea-nitrato ammonico o il nitrato ammonico granulare.

In base ai risultati delle ricerche svolte in ambiente controllato e pieno campo, gli impieghi dove questo fertilizzante ha fornito i migliori risultati si sono avuti nella concimazione:

- di post-emergenza dei cereali a paglia; i vantaggi registrati sono stati: riduzione delle dosi del 20-25% rispetto alle forme di azoto tradizionali e del numero degli interventi; assenza o ridotta fitotossicità con interventi a inizio accestimento, possibilità di trattamenti combinati con erbicidi, fungicidi ed insetticidi. Nella maggior parte dei casi è infatti sufficiente un solo intervento a due-tre foglie. Tuttavia, con varietà di grano ad alto tenore proteico, ed in condizioni di elevata potenzialità produttiva, può rendersi necessario un secondo intervento a basso dosaggio, allo stadio di foglia a bandiera, per ottenere la massima resa di proteine (30-40 l/ha diluiti in 400 l/ha di acqua, applicati con ugelli a fessura tipo TEE JET 8008).
- di pre-impianto o pre-emergenza di barbabietola da zucchero, mais, girasole, patata, cipolla, carota e cavoli. I vantaggi sono nella riduzione dei livelli fertilizzanti e dei trattamenti, per effetto della maggiore efficienza del prodotto e della possibilità di interventi combinati con gli erbicidi. Su alcune colture ortive, come cipolla, in prove sperimentali condotte su terreno sabbioso, è stato possibile passare da 5-6 applicazioni frazionate in post-emergenza ad una sola.
- annuale di vigneti e frutteti, dove se ne può combinare la distribuzione con quella del diserbo primaverile localizzato sulla fila (ad es. con il glifosate) o con il chelato di ferro ad applicazione suolo (ad es. su pero), operando a dosaggi inferiori a quelli dei concimi tradizionali.
- di pre e post-emergenza dei tappeti erbosi.
- di tutte le colture in condizioni soggette a lisciviazione dell'azoto e a contaminazione delle falde e dei corpi idrici.

La forma liquida permette una distribuzione molto precisa ed uniforme, rispetto a quella granulare, con vantaggi a carico dell'accrescimento della coltura, perché in tal caso la competizione intraspecifica si riduce al minimo.

Sotto il profilo della logistica, questa metilenurea ha tutti i pro e contro di un concime liquido. Richiede infatti cisterne per lo stoccaggio aziendale o l'uso di moduli trasportabili da 1000 litri, ma evita la manipolazione di sacchi e lo smaltimento di plastica.

Il prodotto ha una densità apparente di 1,265 (1000 litri pesano 1265 kg), risultando così anche efficiente in termini di spazio occupato da una data quantità d'azoto: 1 metro cubo di questo fertilizzante contiene infatti 354 kg di azoto, vale a dire il 25% di unità in più dello stesso volume di nitrato ammonico 26/27 e praticamente le stesse di 1 metro cubo di urea.

L'applicazione in campo è possibile con tutti i tipi di irroratrici

per concimi liquidi. Il prodotto viene distribuito tal quale o diluito in acqua soprattutto quando si effettuano trattamenti combinati con gli erbicidi, per raggiungere un sufficiente grado di ripartizione sul suolo. E' in fase di studio la possibilità del suo impiego in fertirrigazione, soprattutto su colture caratterizzate da un fabbisogno d'azoto progressivo (es. piante arboree da frutto, ed in particolare drupacee).

Il fertilizzante non deve essere miscelato con prodotti acidi, soluzioni di urea-nitrato ammonico e altri concimi liquidi NP od NPK. Può comunque essere applicato in modo estemporaneo con borlande, umati liquidi e numerose formulazioni di microelementi.

Attività di ricerca svolta dal D.A.G.A. e dal D.C.C.I. dell'Università di Pisa sul prodotto

D.A.G.A.

- studio della fitotossicità del prodotto per assorbimento radicale e fogliare
- attività a carico della flora microbica del suolo (amb. controllato e serra)
- perdite per volatilizzazione e lisciviazione (amb. controllato e lisimetri)
- pattern di rilascio dell'azoto di diverse formulazioni al variare delle condizioni di suolo, temperatura, disponibilità idrica, compattamento del suolo, compresa la risaia
- effetto quanti-qualitativo sulla resa di: cereali, barbabietola, patata, cipolla e altre ortive, tappeti erbosi, vite, alberi da frutto e ottimizzazione delle modalità applicative nelle diverse condizioni d'impiego
- miscibilità con agrochimici e fertilizzanti

D.C.C.I.

- analisi conoscitive sul prodotto (assorbimento infrarosso, risonanza magnetica nucleare, termogravimetrica, cromatografia a permeazione su gelo, liquida ad alte prestazioni, anche accoppiata a massa, ecc.)
- studi strutturali
- stabilità strutturale
- rapporti tra struttura o mix di strutture e tempistica di rilascio agronomico dell'azoto
- assorbimento-desorbimento su vari supporti
- stabilità all'invecchiamento

Bibliografia

- (1) CEA, IFA, IPI (1983). *Handbook on Environmental Aspects of Fertilizer Use*. Martinus Nijhoff/Dr. Junk Pub., The Hague, 66.
- (2) FINCK A. (1992). "Fertilizers and their efficient use". In: Halliday D.J. *et al.*, eds., *World Fertilizer Use Manual*, IFA, Paris.
- (3) MIELE S. (1991). Innovazioni in tema di fertilizzanti e loro tecniche applicative volte a migliorare il rapporto agricoltura ambiente. *Atti Soc. Agraria di Lombardia CXXIX, Bollettino dell'Agricoltura* 1/1991, 21-53.
- (4) TRENKEL M.E. (1997). *Controlled-Release and Stabilized Fertilizers in Agriculture*. IFA, Paris, 11.
- (5) GOERTZ H.M. (1993). Controlled Release Technology. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, vol. 7, 251-274.

STUDIO SULL'OTTIMIZZAZIONE DEI METODI DI ANALISI DEI FERTILIZZANTI AZOTATI A LENTO RILASCIO ED A RILASCIO CONTROLLATO

Alessandra Trinchera, Anna Benedetti

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

Introduzione

Negli ultimi anni, sotto la spinta dell'emanazione di norme a tutela dell'ambiente, le nuove tecnologie, in particolare nel campo della sintesi chimica, hanno permesso di produrre fertilizzanti in grado di soddisfare le esigenze della nutrizione vegetale, senza dimenticare la salute umana, animale e vegetale, oltre che il rispetto per l'ambiente (Benedetti, 1998).

In questo contesto, si sono affermati sul mercato i concimi a lento rilascio ed a rilascio controllato. Il concetto base del principio d'essere di questi concimi è legato alla necessità di fornire i principali elementi nutritivi (N, P, K, ecc.) alle colture nei tempi e nei modi più vantaggiosi, da un lato evitandone la perdita nell'ambiente, dall'altro consentendone la disponibilità nel lungo periodo, migliorando il coefficiente di utilizzazione di tali elementi da parte delle specifiche colture (Nannipieri, 1996).

Di seguito, si propone una breve rassegna delle differenti tipologie di tali fertilizzanti:

Concimi organici: in tali concimi, la cessione dei nutrienti risulta modulata nel tempo, in quanto la mineralizzazione della sostanza organica che li costituisce avviene in tempi differenti, in funzione della diversa velocità di degradazione delle loro componenti (Sequi e Benedetti, 1999). Essi contengono azoto di origine principalmente proteica. Dal momento che in natura esistono proteine con diverse caratteristiche strutturali (fibre, globulari, ecc.), conseguentemente la loro mineralizzazione da parte dei microrganismi tellurici comporta tempi diversi, anche in funzione della fertilità biologica del suolo.

Concimi organo-minerali: in tali concimi, come più volte dimostrato (Benedetti e Canali, 1996) la componente organica non svolge funzioni di fertilizzazione organica vera e propria, bensì esalta le cosiddette "proprietà fisiologiche" dell'humus. Le sostanze umificate od umo-simili, infatti,

contengono azoto, spesso in forma eterociclica, o derivante dalla reazione di radicali amminici con radicali fenolici o idrossilici, e risultano altamente resistenti alla biodegradazione. A differenza della componente fosfatica dell'organo-minerale, che viene protetta dall'insolubilizzazione nel suolo da parte della sostanza organica mediante un vero e proprio legame chimico con il fosforo (Canali *et al.*, 1992), non sono ancora completamente note le modalità di cessione dell'azoto dell'organo minerale. Molto probabilmente viene stimolata la componente microbica del suolo, che aumentando ponderalmente, immobilizza azoto minerale per cederlo successivamente attraverso la mineralizzazione della biomassa in esubero (Benedetti *et al.*, 1998). Tali considerazioni, dedotte in maniera indiretta da studi condotti sulla fertilità biologica residua a seguito di una concimazione organo-minerale, necessiterebbero di essere comprovati con l'ausilio delle tecniche di discriminazione isotopica.

Fertilizzanti polimerici di sintesi: molti concimi di sintesi possono essere considerati a lento rilascio, in quanto costituiti da polimeri a base azotata, in grado di degradarsi gradualmente nel terreno e quindi di cedere gli elementi nutritivi nel tempo.

Tra essi, si annoverano tutti i prodotti a base di urea condensata come urea-formaldeide od i polimeri quali la crotonilidendiurea, la isobutilidendiurea, ecc, ottenuti per condensazione di aldeidi crotonica o isobutirica con il fertilizzante ureico (Alexander A., Helm M.V. 1990). Anche in questo caso, i microrganismi del suolo devono necessariamente degradare i polimeri organici per utilizzare l'azoto, determinando di fatto un effetto di lento rilascio azotato.

Fertilizzanti a cessione controllata: consistono in concimi di tipo ureico, NPK o elementi nutritivi + micro elementi, diversamente ricoperti mediante processo chimico. Possono essere suddivisi in due gruppi:

- ricopertura costituita da uno strato di zolfo. In tal caso, la percentuale di granuli ricoperti costituisce un importante parametro in relazione alla velocità di rilascio dei nutrienti e può variare dal 10 % al 100 % del totale dei granuli. Inoltre, il materiale di ricopertura può presentare diverso spessore: ciò determina un rallentamento del processo di cessione dei nutrienti, che può essere efficacemente sfruttato. I granuli possono infine presentare in superficie un ulteriore strato di ricopertura, costituito da sali inorganici (N, P, e K).

- ricopertura di tipo polimerico. Di questo gruppo fanno parte fertilizzanti dell'ultima generazione, nei quali il granulo di concime è ricoperto da una pellicola costituita da un polimero organico ceroso (es. Isodur, PVC, Poligen®) il quale, per le sue caratteristiche di semipermeabilità, permette l'ingresso di acqua all'interno del granulo ricoperto, causando la solu-

bilizzazione delle sostanze nutritive. Ciò determina un gradiente di pressione osmotica tra l'interno e l'esterno della membrana, che provoca il rilascio dei nutrienti dall'interno all'esterno del granulo. Tale rilascio può essere efficacemente modulato agendo sia sullo spessore del film polimerico che sul diametro dei pori del polimero stesso.

In entrambi i casi il meccanismo di rilascio è esclusivamente di tipo chimico-fisico.

Inibitori della nitrificazione e della ammonificazione: sono sostanze in grado di agire direttamente sulla attività enzimatica ammonificante, nitrificante od ureasica dei microrganismi del suolo. Tra tutte, si ricordano la nitropirina e la diciandiamide, quest'ultima assai utilizzata quale efficace inibitore della nitrificazione (Benedetti, Dell'Abate, 1992).

Metodi di analisi dei fertilizzanti a lento rilascio ed a cessione controllata

La determinazione dei tempi di rilascio degli elementi nutritivi nei concimi a lenta cessione od a cessione controllata costituisce un elemento fondamentale al fine della valutazione della loro efficacia agronomica. Anche in relazione alle esigenze di standardizzazione dei metodi di analisi dei fertilizzanti in sede nazionale ed internazionale, è necessario individuare e proporre, a fini preparativi ed applicativi, metodi chimici rapidi, sensibili ed efficaci, in grado di valutare le caratteristiche di lenta cessione dei fertilizzanti oggetto di studio.

Occorre ricordare che in sede italiana, in base a quanto deciso dalla Commissione Fertilizzanti, l'immissione di un nuovo prodotto negli allegati della Legge 748 (19/10/94) quale fertilizzante ricoperto richiede l'esecuzione di tre tipi di prove:

a) *Determinazione della percentuale di ricopertura* - La determinazione si basa sulla idrosolubilità dei granuli non ricoperti contenuti in una miscela di concime, rispetto a quelli ricoperti. I granuli che in 5 minuti si solubilizzano in acqua vengono definiti non ricoperti, i granuli che non si solubilizzano vengono definiti ricoperti. Il metodo è applicabile a tutti i concimi granulari di diametro > di 0,8 mm. La determinazione dei granuli ricoperti e non ricoperti è di tipo gravimetrico. L'espressione del risultato è la seguente:

$$\begin{aligned} \text{Quota granuli ricoperti (\%)} &= P_R \\ \text{Quota granuli non ricoperti (\%)} &= P_A - P_B \end{aligned}$$

ove: P_B = concime determinato per pesata dopo il trattamento con H_2O ;

P_A = concime determinato per pesata prima del trattamento con H_2O ;

b) Determinazione in laboratorio della curva di cessione degli elementi nutritivi - Il concime, mescolato omogeneamente con sabbia di quarzo e posto in opportuno cilindro, viene dilavato giornalmente con una quota fissa di acqua per un determinato periodo di tempo, interrompendo la prova quando l'azoto ed il potassio dilavati si avvicinano al 100 %, ed il fosforo ed il magnesio a circa il 60 % del totale. Tali prove consentono di misurare la capacità di cessione degli elementi nutritivi, fornendo utili informazioni sul meccanismo di azione della ricopertura.

c) Prove agronomiche in vaso o in campo - Si effettuano generalmente applicando il fertilizzante su colture di graminacee allevate in vaso, in quanto esse assorbono velocemente gli elementi nutritivi disponibili nella soluzione circolante nel terreno. Grazie alla elevata efficienza nutritiva delle graminacee, è possibile determinare la produzione della massa vegetale e quindi la sostanza secca con il taglio, senza distruggere le piante.

I metodi *a)* e *b)* sembrerebbero soddisfare l'esigenza di quantificare l'effetto di lento rilascio od il rilascio controllato, in quanto supportati da test in vaso in grado di simulare la situazione in campo. Occorre tuttavia ricordare che, oltre a quelli menzionati, disponiamo in sede europea di alcuni metodi di analisi per i concimi definiti a lento rilascio od a cessione controllata, di seguito elencati in Tabella 1, alcuni dei quali ufficializzati.

Tabella 1: Principali metodi di analisi dell'effetto di lento rilascio o rilascio controllato nei fertilizzanti.

Metodi chimici	
<ul style="list-style-type: none"> - Determinazione dell'indice di attività e dell'N isolubile in acqua fredda (BNL-N-12) - Determinazione della percentuale di ricopertura (prEN 13266)* - Estrazione in acqua fredda - Procedura cumulativa (prEN 13266) - Estrazione in acqua fredda - Procedura sequenziale (prEN 13266) - Estrazione in acqua calda - Procedura cumulativa (prEN 13266) - Estrazione in acqua calda - Procedura sequenziale (prEN 13266) - Determinazione degli elementi nutritivi negli estratti acquosi (prEN 13266) - Conduttività elettrica dell'estratto acquoso cumulativo (CEN TC 260/WG4) 	<ul style="list-style-type: none"> - Conduttività elettrica in estratti acquosi sequenziali (CEN TC 260/WG4) - Determinazione dell'N estratto in acqua dopo 1 e 10 giorni (BNL-N-14) - Prove di dilavamento con acqua fino a 60 giorni*
Metodi enzimatici	
	<ul style="list-style-type: none"> - Determinazione dell'N ureico da isobutilidendiurea mediante idrolisi acida ed ureasi (BNL-N-13)
Metodi biochimici	
	<ul style="list-style-type: none"> - Metodo per applicazione al terreno e dilavamenti sequenziali (Benedetti, 1983)
	<ul style="list-style-type: none"> Prove agronomiche - Prove in vaso* - Prove in campo

*: i metodi contrassegnati con asterisco sono quelli richiesti dalla normativa Italiana per l'inserimento del fertilizzante ricoperto negli allegati della Legge 748.

Sei metodi tra quelli elencati costituiscono la normativa prEN 13266, relativa alla "Determinazione della velocità di rilascio dei nutrienti per i fertilizzanti slow-release". Essi prevedono il trattamento del fertilizzante (del tipo ricoperto, in quanto nella normativa si fa specifico riferimento ai "coated fertilisers") con acqua fredda ed acqua calda in condizioni cumulative (ossia con un volume fisso di acqua e rilevamenti successivi a tempi prestabiliti) oppure sequenziali (ossia con ripetute estrazioni con acqua nel tempo e rilevazioni corrispondenti), al fine di determinare la concentrazione dei principi nutritivi estratti nelle differenti condizioni (Bernhard K., 1997).

Da una prima valutazione dei metodi riportati si rileva che essi sono principalmente di tipo chimico, e per di più applicabili efficacemente solo in relazione ai fertilizzanti ricoperti. Per tali concimi, le prove di dilavamento in acqua per 60 giorni sembrano in effetti le più efficaci, dal momento che permettono di definire le velocità di rilascio dei nutrienti nel tempo. Tuttavia, poiché richiedono tempi piuttosto lunghi, nasce l'esigenza di renderle il più possibile rapide ed applicabili su vasta scala, mediante opportune modifiche metodologiche.

Metodi biochimici

Nel caso dei fertilizzanti organici naturali o di sintesi, poiché la loro efficacia agronomica risulta strettamente correlata alla attività dei microrganismi del suolo (che intervengono direttamente nella biodegradazione delle strutture chimiche complesse), è chiaro che l'analisi di tipo chimico non è in grado da sola di fornire risposte esaurienti sul reale effetto di lento rilascio degli elementi nutritivi dopo l'applicazione al terreno.

I metodi biochimici, in grado di simulare l'azione dilavante dell'acqua nel terreno e le asportazioni da parte della coltura risultano certamente validi, in quanto in grado di ricreare in laboratorio condizioni simili a quelle di campo. Tuttavia, tali procedure analitiche sono laboriose e soprattutto di lunga durata, raggiungendo in media le 8 settimane.

Sono disponibili numerosi dati relativi alle sperimentazioni condotte dall'Istituto sulle tipologie di fertilizzanti descritte precedentemente. In particolare, sono state effettuate prove di dilavamento seguendo la metodica di Stanford e Smith (1972) modificata da Benedetti (1983), che permette di determinare l'azoto mineralizzabile dal sistema suolo + concime in condizioni potenziali. Dal punto di vista esecutivo, la prova consiste nella addizione del fertilizzante (in misura corrispondente a 250 mg/kg di azoto) a 50 g di terreno miscelato con sabbia di quarzo (in rapporto 1:1), dilavando il si-

stema terreno + concime con una soluzione di CaSO_4 10 M e reintegrando successivamente i nutrienti con una soluzione "N-minus" (CaSO_4 0,002 M, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 0,005 M, K_2SO_4 0,0025 M, MgSO_4 0,002 M). Il sistema viene incubato durante tutto l'esperienza in condizioni ottimali di umidità e temperatura, e l'azoto minerale formatosi nel corso dell'incubazione, nelle forme nitrica, nitrosa ed ammoniacale, eluito mediante i successivi dilavamenti (dopo 2, 4, 8, 12, 16, 20, e 24 settimane) viene determinato colorimetricamente mediante analizzatore automatico a flusso continuo [Wall *et al.* (1975); Kamshak *et al.* (1967); Keeney, Nelson (1982)].

In Tabella 2 si riportano le percentuali di azoto totale (nitrico, nitroso ed ammoniacale) mineralizzato nel tempo, determinato attraverso il metodo precedentemente descritto, in relazione a tre formuree caratterizzate da differenti indici di attività ed a tre fertilizzanti organici a base cuoio a differente granulometria; si riportano inoltre i dati relativi all'azoto nitrico percentuale prodotto a seguito di aggiunta ad un liquame suino di diciandamide a due differenti dosi. In tutte le prove, l'aggiunta di concime o di inibitore è stata effettuata su un terreno ad alta fertilità biologica, a tessitura franca, e su un terreno a bassa fertilità biologica, a tessitura sabbiosa, in modo da evidenziare l'influenza del substrato tellurico sull'effetto di lento rilascio.

Tabella 2. Azoto mineralizzato (%) nel tempo in relazione alla aggiunta al terreno di differenti concimi a lento rilascio. Legenda (+) = terreno ad alta fertilità biologica; (-) = terreno a bassa fertilità biologica; DCD (1) = dose 7,5 mg/kg; DCD (2) = 18,8 mg/kg.

Concime	Terreno	N min. % 2 sett.	N min. % 4 sett.	N min. % 6 sett.	N min. % 12 sett.	N min. % 24 sett.	Rif.
Formurea 56	+	87	95	98	100		Benedetti, 1983
	-	26	38	45	45		
Formurea 45	+	72	87	93	98		
	-	19	27	36	40		
Formurea 29	+	56	72	74	83		
	-	12	19	22	23		
Cuoio polvere	+	11	17	19	52	77	Benedetti <i>et al.</i> , 1999
	-	7	18	19	43	63	
Cuoio 2-4 mm	+	12	21	23	51	76	
	-	7	21	22	43	62	
Cuoio 4-6 mm	+	14	24	27	53	75	
	-	9	25	27	45	61	
	Terreno	N- NO_3 mg kg^{-1} 2 sett.	N- NO_3 mg kg^{-1} 4 sett.	N- NO_3 mg kg^{-1} 6 sett.	N- NO_3 mg kg^{-1} 8 sett.		Tittarelli <i>et al.</i> , 1997
Liquame	+	122	122	124	124		
	-	112	130	138	143		
Liquame +	+	110	110	112	114		
DCD (1)	-	64	100	110	120		
Liquame +	+	96	96	98	99		
DCD (2)	-	25	50	60	68		

Sia per i fertilizzanti di sintesi che per quelli organici, l'effetto della fertilità biologica del terreno è determinante nella individuazione delle proprietà di lento rilascio. Ad esempio, nel caso della formurea 56, dopo 12 settimane la quota di azoto mineralizzato nel terreno (+) è del 100 %, mentre è del solo 45 % nel terreno (-). L'effetto è ancora più evidente nel caso della formurea 29, con indice di attività inferiore: in tal caso dopo 12 settimane si passa da una percentuale di azoto mineralizzato dell'83 % nel terreno ad alta fertilità ad una quota del solo 23 % nel terreno a bassa fertilità (circa il 50 % in meno di azoto mineralizzato rispetto al totale). Analogamente, anche nel caso dei fertilizzanti organici a base cuoio, sebbene i tempi di rilascio azotato risultino globalmente più lunghi, raggiungendo le 24 settimane, è possibile evidenziare come la fertilità biologica influenzi notevolmente il corso della mineralizzazione. Nel terreno ad alta fertilità biologica (+) infatti, l'attività mineralizzante risulta più intensa nella seconda settimana, diminuendo poi nelle settimane successive; nel terreno a bassa fertilità biologica (-), invece, la massima attività mineralizzante si realizza durante la quarta settimana (Benedetti *et al.*, 1999). Inoltre, malgrado siano stati applicati ai due terreni le medesime quantità di concimi a base cuoio, il totale di azoto mineralizzato durante le prove è risultato significativamente diverso, con circa il 15 % di azoto mineralizzato in più nel terreno ad elevata fertilità rispetto a quello a bassa fertilità.

Tali risultati dimostrano come la fertilità del terreno giochi un ruolo chiave nell'effetto di lento rilascio azotato per i concimi considerati, confermando peraltro quanto la tessitura del terreno influisca sulla rapidità di degradazione delle strutture complesse, probabilmente a causa di una ridotta capacità di protezione sterica da parte delle sostanze umiche, che nei terreni sabbiosi risultano presenti in limitate quantità.

Le stesse informazioni vengono ancora una volta supportate dal lavoro di Tittarelli *et al.* (1997), che pone in evidenza il ruolo del terreno anche nell'effetto di inibizione sulla nitrificazione da parte della diciandiamide (DCD) (Tabella 2). Anche in tal caso, l'aggiunta di DCD ad un liquame suino in dosi basse (1) od elevate (2) comporta risposte differenti in relazione alla fertilità del terreno. Il dato diviene significativo nel caso (2), dove a fronte di un valore di azoto nitrico dilavato dopo 8 settimane di 99 mg/kg_{suolo} nel terreno ad alta fertilità (+) corrisponde un valore di 68 mg/kg_{suolo} nel terreno a bassa fertilità (-).

Da quanto sopra esposto, si evince che le prove biochimiche possono fornire informazioni agronomicamente utili in relazione ai fertilizzanti slow-release, anche se va tenuto presente che le metodologie descritte comportano tempi molto lunghi, non sempre compatibili con le esigenze del

Errata corrige:

Figura pagina 800

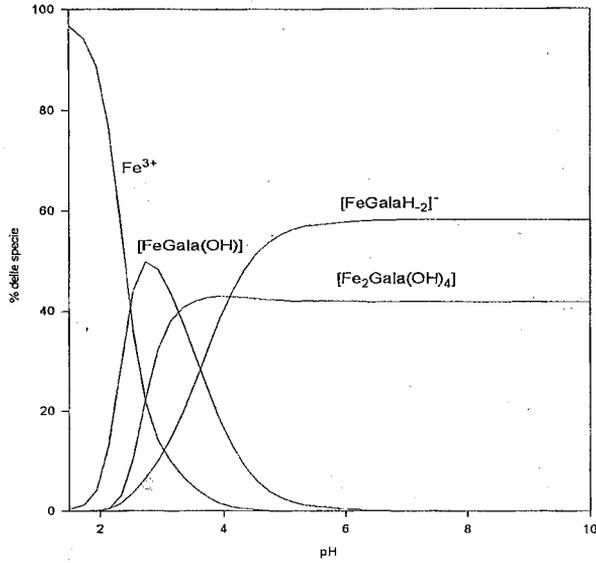


Figura pagina 801

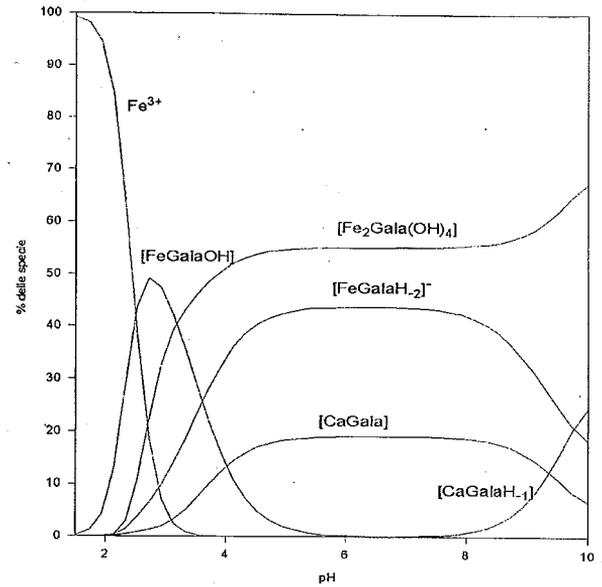
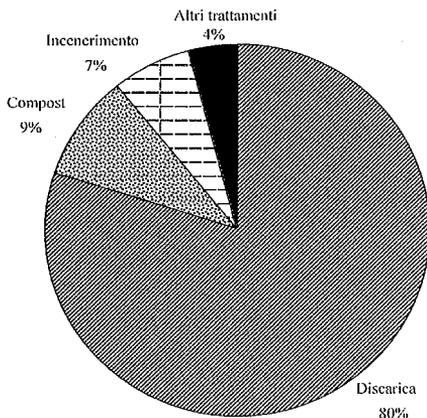


Figura 1 pagina 904



controllo-qualità del prodotto. Nasce conseguentemente l'esigenza di identificare parametri di tipo chimico, correlabili alle risposte biochimiche, di più rapida esecuzione.

Nel caso dei concimi organici a lento rilascio, le metodologie di tipo chimico, in grado di determinare le differenti frazioni dell'azoto mediante specifici criteri estrattivi (Keeney D.R. e Nelson D.W., 1982) possono in effetti costituire, se correlabili ai pools azotati ottenuti mediante i metodi biochimici, una possibile risposta alla esigenza di quantificare le caratteristiche di lento rilascio. Sono stati proposti indici alternativi rispetto alle semplici quote di azoto solubile in acqua fredda e calda, già da tempo utilizzate e spesso rivelatesi non sufficientemente esaustive ai fini della definizione del reale effetto di slow-release nemmeno per i concimi di sintesi. Tale tipo di approccio (Galluzzo *et al.*, 1998), ha permesso di definire nuovi indici di seguito riportati:

$$N_{\text{vel. sol.}} = [(N_{\text{tot.}} - N_{\text{ins H}_2\text{O fredda}}) / N_{\text{tot.}}] \times 100$$

$$N_{\text{lent. sol.}} = \{[(N_{\text{tot.}} - N_{\text{ins H}_2\text{O calda}}) / N_{\text{tot.}}] \times 100\} - N_{\text{vel. sol.}}$$

$$N_{\text{lento rilascio}} = (N_{\text{ins H}_2\text{O calda}} / N_{\text{tot.}}) \times 100$$

dove vengono definiti tre pools azotati: l'azoto prontamente solubile ($N_{\text{vel. sol.}}$), l'azoto lentamente solubile ($N_{\text{lent. sol.}}$) e l'azoto definibile a lento rilascio ($N_{\text{lento rilascio}}$).

Il calcolo di tali indici in relazione a prove effettuate su fertilizzanti organici a base cuoio a differente classe granulometrica ha dimostrato come, mediante una opportuna rielaborazione dei dati di estraibilità, sia possibile ottenere una stima della quota di azoto definito "a lento rilascio", seppure inteso in termini esclusivamente chimici. Nel caso specifico, tale quota di Nlento rilascio è risultata proporzionale alla granulometria del cuoio. Inoltre, i risultati ottenuti da tali prove di solubilità in acqua fredda e calda sono stati confrontati con i dati biochimici già riportati in Tabella 1, rivelando una correlazione significativa tra l'entità del pool definito Nlento rilascio e la percentuale di azoto mineralizzato nelle prove biochimiche a partire dalla 8 settimana di dilavamento (Galluzzo *et al.*, 1998).

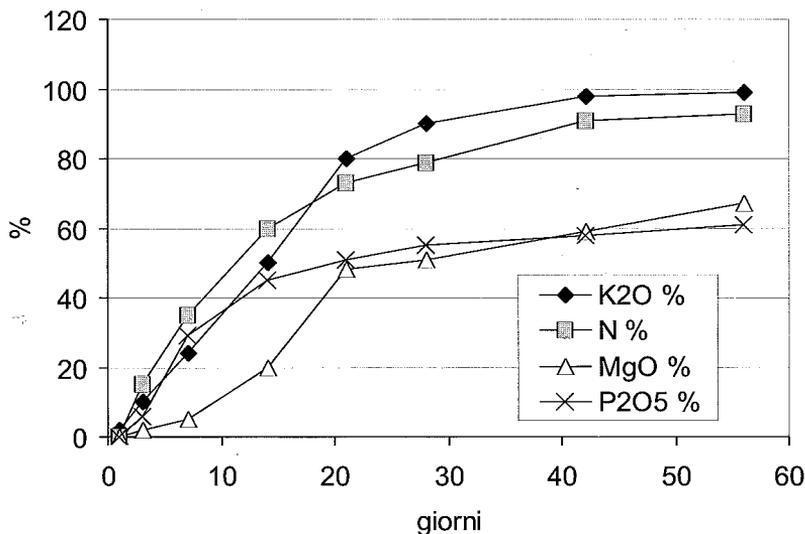
Parte sperimentale

Il metodo per dilavamento giornaliero con acqua *b*), attualmente in uso quale metodo di riferimento per la valutazione della cessione controllata, è applicabile a tutti i fertilizzanti ricoperti.

Prove effettuate per 60 giorni su concimi ricoperti mediante

Poligen® hanno dimostrato una buona rispondenza tra i risultati ottenuti mediante dilavamento e le prove agronomiche (Lutz, 1998; Tesi, 1998), Grafico 1.

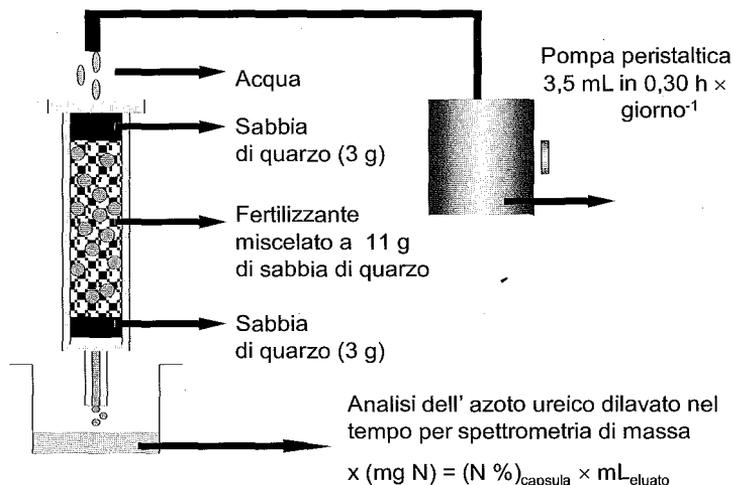
Grafico 1. Rilascio delle sostanze nutritive (%) da un concime ricoperto con Poligen® a seguito di lisciviazione con acqua.



Al fine di ottimizzare l'applicazione del metodo anche ai concimi con diversa ricopertura (es. zolfo), presso l'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante sono in corso prove in relazione alle quali si riportano alcuni risultati preliminari.

Prova 1: E' stata effettuata una prova su due fertilizzanti del tipo Urea S ricoperta + strato di NPK (1 e 2), entrambi con percentuale di ricopertura di circa 25 %, e su urea non ricoperta come controllo. Un quantitativo di concime contenente 600 mg di N, mescolato omogeneamente con sabbia di quarzo in un rapporto 3:1, posto in una colonna cromatografica di diametro 1.5 cm, chiusa all'estremità con lana di vetro, è stato dilavato giornalmente con 5 mL di acqua bidistillata, fatta percolare per 30 minuti applicando una pressione costante mediante pompa peristaltica, interrompendo la prova quando l'azoto dilavato è risultato circa il 100 % dell'azoto totale (Figura A). Le eluizioni sono state effettuate per 7 giorni. Ogni frazione eluita è stata analizzata per il contenuto in azoto mediante spettrometro di massa ANCA MS 20/20. Sono stati caricati (in capsule di stagno) circa 0.5 mg di supporto inerte, e quindi 10 µL di soluzione eluita.

Figura A: Sistema di eluizione con pompa peristaltica.



Analisi mediante ANCA MS 20/20 (Mulvaney, 1993)

Lo spettrometro di massa è uno strumento in grado di fornire la percentuale di azoto presente in un campione analizzato, solido o liquido (su supporto inerte). Conseguentemente i valori percentuali, calcolati sul peso del campione caricato nella capsula, sono stati successivamente rapportati al quantitativo in mg di N eluito nelle singole frazioni secondo la seguente formula:

$$x \text{ (mg N)} = (N \%)_{\text{capsula}} \times \text{mL}_{\text{eluato}}$$

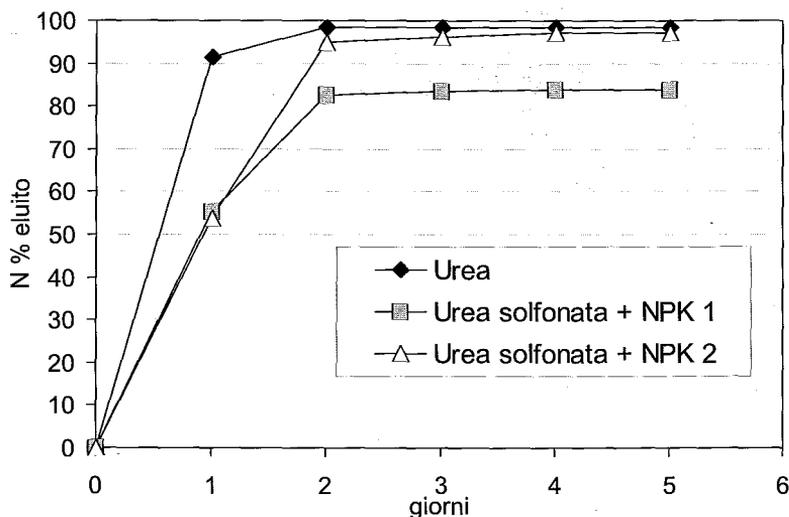
E' stata quindi calcolata la percentuale di azoto totale eluito a seguito del dilavamento, in modo da quantificare la frazione di azoto prontamente disponibile, secondo la seguente formula:

$$N_{\text{pront. disp.}} (\%) = \sum_{(i=1-7)} \text{mg } N_{\text{eluiti}} \times 100 / \text{mg } N_{\text{tot}} \quad \text{dove } N_{\text{tot}} \approx 600 \text{ mg}$$

Nel Grafico 2 sono riportati i risultati ottenuti a seguito del dilavamento dei tre fertilizzanti.

Anche se la prova è stata interrotta dopo sette giorni, le curve riportate permettono di evidenziare una differente modalità di rilascio nei concimi analizzati. A parte il caso dell'urea non ricoperta, che rilascia dopo i primi due dilavamenti un quantitativo di azoto pari all'98 % del totale, si nota che, mentre nel dilavamento dopo 24 ore il quantitativo di azoto rilasciato dai due campioni è intorno al 53-55 %, nel secondo giorno l'azoto eluito si differenzia (27.1 % per il campione 1 e 41.1 % per il campione 2).

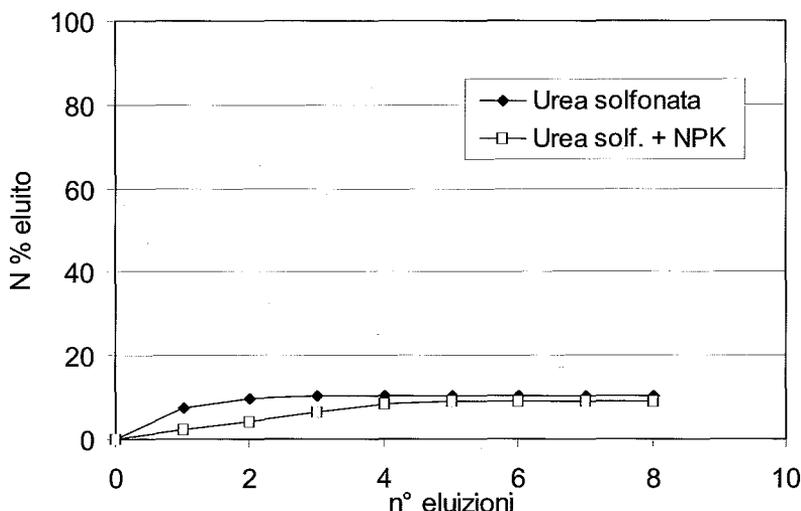
Grafico 2. Rilascio di azoto (%) rispetto all'N totale per i fertilizzanti



Al terzo dilavamento, il quantitativo di azoto eluito risulta per entrambi piuttosto basso (intorno all'1 %), per poi scendere a valori assai vicini al limite della sensibilità dello strumento al quarto dilavamento (0.04 %). Il valore totale di azoto rilasciato in cinque giorni è rispettivamente di 83.6 % per il campione 1 e del 96.4 % per il campione 2. Sembra quindi che nel caso del concime 1, un quantitativo di azoto, corrispondente a circa il 16 % del totale, non venga eluito nei primi 7 giorni di dilavamento: esso potrebbe costituire un pool di azoto a rilascio più lento. Dal momento che la principale differenza tra i campioni 1 e 2 risiede esclusivamente nella modalità preparativa dei concimi, le modalità del processo di ricopertura dell'urea solfonata + NPK sembrano avere un ruolo significativo nella definizione della qualità di tali concimi ricoperti, ed il metodo analitico utilizzato appare in grado di rilevare tali differenze anche in tempi molto brevi.

Prova 2: Una prova analoga alla precedente nelle medesime condizioni operative è stata condotta su altri due fertilizzanti, il primo Urea-S ricoperta (1), il secondo Urea-S ricoperta + NPK (2). In tal caso, l'acqua è stata fatta percolare in continuo, senza l'applicazione di alcuna pressione esterna, raccogliendo l'eluato in frazioni successive (8 frazioni, per circa 80 mL di acqua eluita in 1 ora). Per ogni frazione raccolta è stato determinato l'azoto eluito (in mg per ogni frazione) e la percentuale di azoto rilasciato rispetto al totale (600 mg). I dati di eluizione sono riportati nel Grafico 3.

Grafico 3. Rilascio di azoto (%) rispetto all'N totale per i fertilizzanti ricoperti considerati.



L'analisi dell'azoto eluito, effettuata mediante spettrometria di massa, ha rivelato che in tale prova la percentuale totale di azoto prontamente rilasciato dai due campioni ammonta al 10.3 % per il campione 1 ed a 9.2 % per il campione 2. Tali valori piuttosto bassi potrebbero dipendere da differenti fattori:

- il metodo di percolamento in continuo potrebbe essere un metodo eccessivamente dinamico, che non permette alla soluzione acquosa percolante di solubilizzare efficacemente l'azoto in tempi brevi;

- la bassa percentuale ritrovata potrebbe dipendere essenzialmente dalla presenza di una percentuale di granuli non ricoperti, che quindi determinerebbe la immediata solubilizzazione di questa frazione di azoto. In tal caso, il metodo potrebbe costituire un valido elemento di giudizio per la determinazione della percentuale di granuli ricoperti e non ricoperti.

Va comunque considerato che in questa prova non è stata utilizzata la pompa peristaltica, e conseguentemente non è stata applicata alcuna pressione aggiuntiva al sistema dilavato. E' ipotizzabile che, nella prima prova, tale pressione aggiuntiva abbia determinato l'aumento della percentuale di azoto rilasciato, costituendo di fatto un elemento perturbante del sistema analizzato (la ricopertura di zolfo verrebbe ad essere solubilizzata troppo velocemente). Il metodo di eluizione in continuo potrebbe invece in una prima fase i) permettere la determinazione dell'azoto prontamente solu-

bile, che corrisponderebbe alla percentuale di granuli non ricoperti, ed in una seconda fase ii) definire la curva di solubilizzazione di tutto l'azoto presente, prolungando i tempi di percolamento/raccolta (ad esempio fino a 24 ore) e correlando opportunamente tali dati a quelli ottenuti dalle prove di dilavamento giornaliero per 60 giorni.

Infine, sembra opportuno evidenziare che una valida alternativa ai metodi di tipo chimico per la determinazione dell'azoto ureico nelle soluzioni ottenute a seguito del dilavamento può essere costituita dal metodo per mineralizzazione secca secondo Dumas e successiva misura dell'azoto (ridotto ad N_2) mediante spettrometria di massa. Poiché infatti in tali soluzioni l'azoto ureico può assumere concentrazioni anche molto basse, vi è la necessità dell'utilizzo di una strumentazione altamente sensibile, in grado di rilevare quantitativi limitati di azoto in soluzione (fino a $0.02 \text{ mg N x mL}^{-1}$), come lo spettrometro di massa ANCA MS 20/20.

Conclusioni

La eterogeneità delle caratteristiche dei concimi considerati comporta l'esigenza di ottimizzare i metodi di analisi in funzione dei diversi meccanismi di azione dei fertilizzanti. Appare infatti alquanto inefficace tentare di definire l'entità del lento rilascio di un concime organico mediante semplici prove di solubilità in acqua, dal momento che il meccanismo di "slow-release" in tal caso risiede nel fenomeno della mineralizzazione, mediata dai microrganismi. Viceversa, l'approccio di tipo chimico può essere ritenuto valido nei concimi ricoperti, ove l'acqua, sia per fenomeni di solubilizzazione che di permeabilità delle membrane di copertura, gioca un ruolo chiave.

E' in ogni caso opportuno sottolineare che la reale efficacia agronomica di un fertilizzante a lento rilascio può essere definita solo in relazione alla sua utilizzazione in campo. Nel sistema suolo, infatti, la biomassa microbica, la presenza di sostanza umica, il valore di pH, ecc., oltre che le esigenze nutrizionali della specifica coltura, costituiscono un set di variabili estremamente vasto, in grado di giocare un ruolo chiave nei processi di biodegradazione di matrici organiche di varia origine. Conseguentemente, le informazioni derivanti da parametri analitici di tipo esclusivamente chimico debbono essere sempre convalidate mediante prove di tipo biochimico, che tengano conto dell'elevata complessità del processo di mineralizzazione/solubilizzazione dei nutrienti forniti con il fertilizzante.

Bibliografia

- ALEXANDER A., HELM M.V. (1990). Ureaform as a Slow Release Fertilizers - A. review 2. *Pflanzenern Bodenk* 153: 249-255.
- BENEDETTI A. (1983). Fertilità biologica del terreno e concimi ad azoto lento. *Annali dell'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante*, Vol. XII, 3.
- BENEDETTI A. (1998). Fertilizzanti e ambiente: un equilibrio possibile. *Terra e Vita*, 12: 4-8.
- BENEDETTI A., ALIANIELLO F., DELL'ABATE M.T. (1994). A modified Stanford and Smith method for the study of the mineralization of nitrogen from organic material. In: *Nitrogen mineralization in agricultural soils*. J.J. Neetson e J. Hassink Eds, pp. 127-132.
- BENEDETTI A., CANALI S. (1996). Tecnologie di produzione ed aspetti agronomici. In: *La concimazione organo-minerale: i perché di una scelta*. Suppl. a *Terra e Vita*. 10, 4-10.
- BENEDETTI A., CANALI S., ALIANIELLO F. (1998). La fertilizzazione organica dei suoli. In: *I fertilizzanti organici*. Ed. L'Informatore Agrario. Vol. I, 3-12.
- BENEDETTI A., DELL'ABATE M.T. (1992). Studi preliminari sulle proprietà antinitrificanti della diciandiamide. In: *Atti del X Convegno Nazionale della Società Italiana di Chimica Agraria*, ISNP Editore, pp.293-298.
- BENEDETTI A., DELL'ABATE M.T., TRINCHERA A., GALLUZZO D. (1999). Evaluation of the agronomic quality of leather meal as nitrogen slow-release fertilisers". In: *Book of Abstract of 10th Nitrogen Workshop*. Copenhagen (DK), 23 - 26 August.
- BERNHARD K. (1997). Slow release fertilizers - Determination of the rate of release of nutrients. 1: coated fertilizers. *Test report. CEN TC 260/ WG 4 / Task Force "Slow release fertilizers"*.
- BNL-N-12 (1997). Determinazione dell'indice di attività e dell'azoto insolubile in acqua fredda.
- CANALI S., INDIATI R., FIGLIOLIA A. (1992). Influenza degli acidi umici sulla disponibilità del fosforo aggiunto al terreno. In: *Atti del X Convegno della Società Italiana di Chimica Agraria*. Settembre, Roma. pp. 259-261.
- prEN 13266 (1998). Slow release fertilizers - Determination of the rate of release of nutrients - Method for coated fertilizers. European Committee for Standardization. CEN TC 260 Bruxelles.
- GALLUZZO D., DELL'ABATE M.T., BENEDETTI A. (1998). Valutazione delle caratteristiche agronomiche del cuoio idrolizzato a diversa granulometria. In: *Atti XVI Convegno Nazionale della Società Italiana di Chimica Agraria*. Ravello (SA), 30 settembre-2 ottobre, SBR Ed.
- KAMSHAKE L.J., HANNAH S.A., COMEN J.M. (1967). Automated analysis for nitrate by hidrazine reduction. *Water Resour.* 1, 205-216.
- KEENEY D.R., NELSON D.W. (1982). Nitrogen inorganic forms, In: *Methods of soil analysis* Part. 2 (Black C.A., Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., Clark F.E., Eds.). Agronomy 9, Am. Soc. Agron., Madison W.I., USA, pp. 682-687.
- Legge 748 del 19/10/1984 - Nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti. M.A.F. - Ministero della Agricoltura e delle Foreste. *Supplemento Ordinario Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* 305 del 6/11/84.
- LUTZ H.J. (1998). Caratteristiche dei nuovi concimi a cessione controllata della Basf. *Terra e Vita*, 12: 20-23.
- Metodi ufficiali di analisi per i fertilizzanti (1989). - Supplemento n. 1, Decreto Ministeriale. *Gazzetta Ufficiale* n. 29.
- MULVANEY R.L. (1993). Mass spectrometry. In: *Nitrogen isotope techniques*. Ed. Knowles R. e Black T.H. - Academic Press, Inc. San Diego, USA.
- NANNIPIERI P. (1996). Bilancio del fertilizzante azotato. *Agricoltura e Ricerca*, 163, 112-118.
- SEQUI P., BENEDETTI A. (1998). *I fertilizzanti organici*. Ed. L'Informatore Agrario. Vol.I.
- STANFORD G., SMITH S.J. (1972). Nitrogen mineralization potential of soils. *Soil Sci. Am. Proc.* 36, 465-472.
- TESI D. (1998). Esperienze pratiche di concimazione con i Nitrophoska® Top a cessione controllata. *Terra e Vita*, 12: 24-30.
- TITTARELLI F., CANALI S., BERTI C., BENEDETTI A. (1997). Effects of dicyandiamide on nitrification in soil amended with animal slurries. *Agricoltura Mediterranea*. 127: 44-48.
- WALL L., GEHRKE C.W., NEUNER J.E., LATHEY R.D., REXNORD P.R. (1975). Cereal protein nitrogen: evolution and comparison of four different methods. *Assoc. off. Anal. Chem.* 58, 811-817.

SANITIZZAZIONE DI LETTIERE OVINE CON ATTINOBATTERI

Silvia Baccella¹, Anna Lisa Botta², Simona Manfroni²,
Carla Fiordigigli¹, Maddalena Del Gallo², Aldo Lepidi²

¹ Consorzio Parco Scientifico e Tecnologico d'Abruzzo,
Via Antica Arischia 1 - 67100 L'Aquila (AQ)

² Dipartimento di Biologia di Base ed Applicata, Università degli Studi di L'Aquila
Via Vetoio, Località Coppito - 67010 Coppito (AQ)

Riassunto

I clostridi risultano tra i più importanti agenti patogeni degli animali da allevamento. Essi producono notevoli quantità di esotossine, dalle quali dipendono lesioni ai diversi organi e tessuti (parete intestinale, reni, fegato, muscolo, ecc.). I clostridi patogeni sono normalmente presenti nel terreno ricco di humus, ma vengono anche reperiti nel contenuto intestinale di animali sani, provocando la malattia solo a seguito dell'intervento di fattori scatenanti. Le esigenze della zootecnia moderna hanno causato indirettamente un aumento del rischio di contagio, dovuto allo stazionamento del bestiame in aree circoscritte per lunghi periodi dell'anno. In Abruzzo, in particolare, a seguito della diminuzione della pratica della transumanza orizzontale, gli allevamenti ovisi richiedono la permanenza delle greggi nelle stalle durante la stagione invernale; di conseguenza si accumulano grandi quantità di deiezioni sulle lettiere, esponendo i capi ad una potenziale fonte di microrganismi patogeni per periodi relativamente lunghi. Il trattamento delle lettiere ovine con agenti sanitizzanti atti ad abbattere il numero delle spore di clostridi ed altri batteri patogeni, può diminuire notevolmente la mortalità e la morbilità del bestiame e, qualora la sanitizzazione sia accoppiata ad un processo di compostaggio controllato, riduce l'impatto ambientale delle deiezioni zootecniche in stalla e sui campi.

Nel presente lavoro vengono riportati i risultati preliminari di una ricerca volta alla messa a punto di un processo biotecnologico atto a migliorare le caratteristiche igienico-sanitarie e fertilizzanti delle deiezioni ovisi e ad accelerarne i tempi di compostaggio tramite l'impiego di Attinobatteri come starter umificanti e sanitizzanti.

Per valutare la fattibilità del processo è stata eseguita una pro-

va preliminarmente incubando la lettiera ovina in compostiere su scala laboratoriale con un inoculo di 14 ceppi di Attinobatteri. I risultati hanno evidenziato nel prodotto finale una carica di spore di clostridi trascurabile rispetto a quella rilevata nel materiale grezzo, inoltre l'andamento della concentrazione dei clostridi, misurato durante il processo, ha evidenziato che l'abbattimento è avvenuto entro le prime tre settimane di trattamento.

Successivamente è stata studiata in vitro l'attività antibiotica dei ceppi microbici usati come starter. L'effetto antagonista è stato saggiato prima verso *E. coli* e, successivamente, verso ceppi di clostridi isolati dalla lettiera ovina e sottoposti ad identificazione. Nel primo caso si è osservato che, nella maggior parte degli Attinobatteri, la capacità antibiotica raggiunge un picco massimo dopo 10 giorni di incubazione con *E. coli*. Per ciò che riguarda l'inibizione della crescita dei clostridi autoctoni della lettiera, 10 dei 14 ceppi di Attinobatteri saggiati hanno mostrato attività antagonista.

Bibliografia

- BACCELLA S. *et al.* (1997). Composting and sanitation of sheep manure by means of Actinomycetes strains. *Atti del Congresso I.S.E.B. Monopoli 1997*.
- QUARONI S. *et al.* (1987). *Natura e Ricerca* No 75/76: 49-54.

VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ COMPLESSANTE DI IDROLIZZATI PROTEICI AD USO FERTILIZZANTE

Antonella Mori¹, Liviana Leita¹, Claudio Ciavatta², Luciano Cavani²

¹ Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via Trieste, 23 - 34170 Gorizia

² UCI-Scienze e Tecnologie Agroindustriali ed Agroambientali
Istituto di Chimica Agraria, Università degli Studi di Bologna
Via Berti Pichat, 10 - 40127 Bologna

Riassunto

Nel presente lavoro viene data una prima valutazione chimico-analitica sulla capacità Fe-complessante di idrolizzati proteici allo scopo di poter trasporre le acquisizioni a prodotti ottenuti industrialmente mediante un processo innovativo che prevede l'idrolisi enzimatica di biomasse di recupero di origine animale.

L'obiettivo del lavoro è stato quello di verificare la capacità di idrolizzati proteici di mantenere il Fe(II) in soluzione a diversi valori di pH (3,5; 6,3; 7,5), impedendone l'ossidazione e la conseguente precipitazione. A questo scopo è stato utilizzato un peptone da gelatina e i suoi prodotti ottenuti per idrolisi enzimatica e successivo frazionamento in frazioni a diversa massa molecolare nominale (NMW). I risultati ottenuti hanno evidenziato che, rispetto al peptone originale, il prodotto idrolizzato presentava una maggiore capacità di trattenere in soluzione il Fe (II) in forma complessata e di prevenirne l'ossidazione, e questo a tutti i valori di pH presi in considerazione. Confrontando le frazioni a diversa NMW è stato riscontrato che sono state quelle a più elevata NMW che hanno trattenuto maggiormente il Fe in soluzione, mentre quelle a minor NMW hanno mostrato una maggiore capacità di prevenire l'ossidazione del Fe (II) a Fe (III). L'efficacia dell'idrolizzato "in toto" nel mantenere come tale il Fe(II) complessato in soluzione sembra dunque dovuta ad un'azione sinergica delle diverse frazioni contemporaneamente presenti.

Introduzione

Gli idrolizzati proteici sono prodotti di idrolisi di matrici organiche a base proteica caratterizzate da diversa complessità strutturale. Il processo idrolitico porta alla frammentazione della struttura proteica in peptidi, oligopeptidi e amminoacidi liberi che possono fungere da *carrier* di microelementi per la nutrizione delle piante. Tuttavia, la valenza nutrizionale degli idrolizzati è strettamente vincolata alla loro qualità, soprattutto all'entità della racemizzazione amminoacidica che si verifica a seguito del processo idrolitico. È noto infatti che l'efficienza nutrizionale di amminoacidi, di oligo- e polipeptidi è connessa alla presenza della forma levogira, biologicamente attiva. Dal punto di vista tecnologico, appare quindi importante controllare i processi di idrolisi al fine di minimizzare i rischi di racemizzazione. L'idrolisi enzimatica, maggiormente selettiva, potrebbe rappresentare una promettente ed efficace alternativa alle classiche idrolisi chimiche.

I prodotti di idrolisi chimica od enzimatica sono caratterizzati da domini di legame che potrebbero essere coinvolti nei processi di metallo-complettazione e favorire così l'equilibrio in soluzione di elementi che, per peculiarità chimico-fisiche, darebbero luogo a precipitati. In genere, per ovviare a questo inconveniente si usano molecole chelanti di sintesi che agevolano da un lato la solubilità degli elementi in uno spettro di pH ampio, ma che dall'altro non promuovono la mobilità dell'elemento nei tessuti vegetali.

Il ferro rappresenta senza dubbio un microelemento che mostra spesso problemi di disponibilità ed assimilabilità, specie in suoli calcarei nei quali la clorosi ferrica si manifesta frequentemente. Nei suoli non acidi il Fe è essenzialmente presente in forma ossidata - Fe(III) - non solubile e la quantità di Fe presente in soluzione è di norma inferiore al fabbisogno nutrizionale della pianta. La chelazione del Fe(III) permette di agevolare la solubilità del metallo e quindi di facilitare l'*uptake* radicale. Va da sé, tuttavia, che il trasporto dell'elemento nei comparti vegetali è vincolato alla capacità Fe-riduttasica nell'apoplasto che governa i primi *steps* metabolici del Fe(II) che rappresenta la forma chimica biologicamente attiva a livello nutrizionale. Appare quindi importante poter disporre di prodotti chelanti in grado non solo di favorire la solubilità del Fe(III) nel suolo, ma anche di mantenere ed incentivare la complessazione del Fe(II) agevolando quindi il trasporto nella pianta a seguito della somministrazione del prodotto al suolo o per aspersione fogliare.

Nel presente lavoro viene data una prima valutazione chimico-analitica sulla capacità Fe-complettante di idrolizzati proteici allo scopo di poter trasportare le acquisizioni a prodotti ottenuti industrialmente mediante un

processo innovativo che prevede l'idrolisi enzimatica di biomasse di recupero di origine animale.

Materiali e metodi

L'idrolisi enzimatica è stata effettuata su di un campione di peptone da gelatina (*peptone from gelatine, pancreatic digest*, Fluka). L'idrolizzato così ottenuto è stato quindi separato in frazioni a diversa massa molecolare nominale (NMW <1000 Da, 1000-3000 Da e 3000-10.000 Da, rispettivamente) mediante ultrafiltrazione tangenziale (Molecular/Por MP3 Spiral Wound UF, Spectrum). Con i campioni liofilizzati di peptone, di idrolizzato e delle sue frazioni sono state preparate delle soluzioni acquose in rapporto 1:10 (p/v) a tre diversi valori di pH: non modificato (pH 6,3), tamponato a pH 3,5 per aggiunta di H₂SO₄ diluito, e tamponato a pH 7,5 per aggiunta di NaOH diluita. Alle soluzioni così preparate è stato quindi aggiunto del FeSO₄ in ragione del 4% in Fe sul peso secco del campione. Sono stati determinati periodicamente, con cadenza settimanale, per due mesi, il pH, il tenore in Fe totale e in Fe (II), in modo da valutare nel tempo la quantità di Fe mantenuta in soluzione ed il suo stato di ossidazione. La determinazione del Fe totale in soluzione è stata condotta mediante spettroscopia atomica di emissione (ICP-AES), mentre la speciazione del Fe in soluzione è stata effettuata mediante il metodo alla fenantrolina.

Risultati e discussione

In una prima fase del lavoro è stata confrontata la capacità del prodotto idrolizzato di trattenere il Fe in soluzione con quella del peptone di partenza, allo scopo di verificare se il processo di idrolisi aveva favorito l'azione complessante e antiossidante sul Fe bivalente da parte della matrice organica. In Tab. 1 sono riportati i risultati ottenuti dalla determinazione analitica di Fe totale e del Fe(II), in percentuale, rispettivamente, sulla quantità di Fe aggiunto inizialmente al campione e sul Fe totale presente in soluzione, relativamente ai tre valori di pH considerati (pH originale - 6,3; tamponato a pH 3,5 e 7,5). Dai dati ottenuti si osserva come la quantità di Fe totale trattenuto in soluzione sia in tutti i casi piuttosto elevata: infatti i valori percentuali hanno spesso superato il 90% e comunque non sono mai scesi al di sotto del 75%. Del Fe totale in soluzione, la maggior parte è rimasta sotto forma di Fe bivalente, con l'unica eccezione nel caso del peptone originale, dove la percentuale di Fe(II) è scesa fino al 60%.

Tab. 1 Valori percentuali di Fe totale e di Fe(II) registrati periodicamente nel tempo relativi all'idrolizzato proteico (I) e al peptone commerciale (M): soluzioni a pH 3,5; 6,3 e 7,5.

pH 3.5	idrolizzato		peptone Fluka	
	% Fe tot.	% Fe (II)	% Fe tot.	% Fe (II)
0 gg	100.0	100.0	100.0	100.0
4 gg	84.6	99.9	99.9	88.9
8 gg	96.8	95.0	86.9	99.9
15 gg	99.9	99.9	95.2	94.9
22 gg	98.2	99.9	94.4	95.9
29 gg	99.9	99.9	99.9	90.7
57 gg	94.1	89.8	99.9	90.4
pH 6.3	idrolizzato		peptone Fluka	
	% Fe tot.	% Fe (II)	% Fe tot.	% Fe (II)
0 gg	100.0	100.0	100.0	100.0
4 gg	82.4	84.4	96.3	82.3
8 gg	92.1	85.5	79.8	77.1
15 gg	95.9	86.8	88.2	81.6
22 gg	97.7	94.3	87.0	77.5
29 gg	95.5	90.5	88.6	73.4
57 gg	87.0	84.1	76.2	73.0
pH 7.5	idrolizzato		peptone Fluka	
	% Fe tot.	% Fe (II)	% Fe tot.	% Fe (II)
0 gg	100.0	100.0	100.0	100.0
4 gg	71.9	69.9	93.6	77.9
8 gg	82.7	81.2	78.3	77.4
15 gg	83.8	76.3	76.9	63.7
22 gg	82.1	79.1	75.8	60.7
29 gg	81.8	77.9	73.3	57.8
57 gg	74.4	75.7	68.4	62.8

Dal confronto tra peptone e prodotto idrolizzato è emerso che una maggiore capacità di quest'ultimo sia nel mantenere in soluzione il Fe in forma complessata sia nell'impedire l'ossidazione da Fe(II) a Fe(III), e questo a tutti i valori di pH considerati. È importante notare come la differenza di comportamento tra peptone e idrolizzato cambi all'aumentare del pH. Infatti a pH 3,5 i valori percentuali del Fe totale e del Fe(II) in soluzione sono molto elevati e simili per i due campioni, mentre a pH 6,3 e 7,5 è stata riscontrata una minor quantità di Fe in soluzione, nonché una sua progressiva diminuzione nel tempo, e contemporaneamente una più marcata diversa capacità complessante e antiossidante dei due campioni. L'idrolizzato ha mantenuto in soluzione una maggior quantità di Fe totale e soprattutto una maggior percentuale di Fe (II) (fino al 20% in più a pH 7,5) rispetto al peptone di partenza. Questo risultato può essere spiegato considerando che il Fe bivalente a pH acidi è piuttosto stabile in soluzione, anche in assenza di complessanti, ed ha una tendenza mino-

re ad ossidarsi, mentre a pH maggiori di 5 il Fe(II) libero non è stabile in soluzione e si ossida rapidamente precipitando come idrato ferrico. Pertanto l'azione complessante e antiossidante degli idrolizzati proteici è messa particolarmente in evidenza a valori di pH prossimi alla neutralità.

Fig. 1 Andamento nel tempo della percentuale di Fe totale in soluzione rispetto a quello aggiunto inizialmente su campioni di idrolizzato proteico (I) e di peptone commerciale (M): soluzione 1:10 in acqua a pH 6,3.

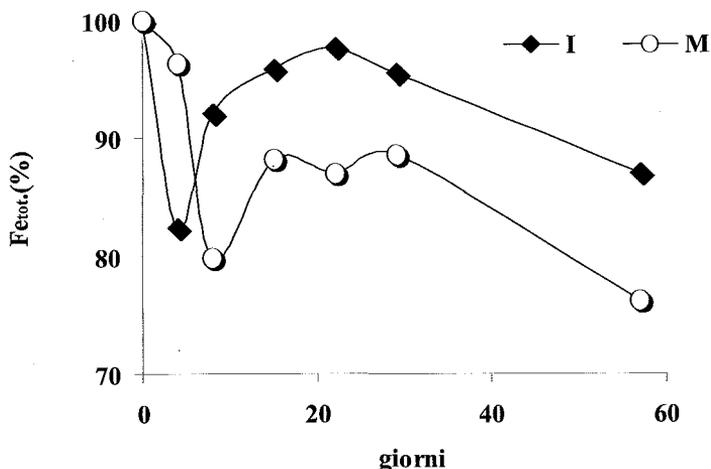


Fig. 2 Andamento nel tempo della percentuale di Fe(II) rispetto al Fe totale in soluzione su campioni di idrolizzato proteico (I) e di peptone commerciale (M): soluzione 1:10 in acqua a pH 6,3.

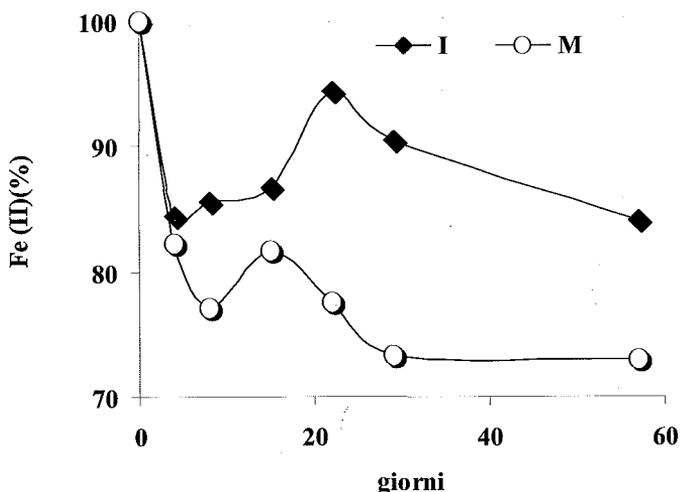


Fig. 3 Andamento nel tempo della percentuale di Fe totale in soluzione rispetto a quello aggiunto inizialmente su frazioni a diversa NMW dell'idrolizzato proteico: soluzione 1:10 in acqua a pH 6,3.

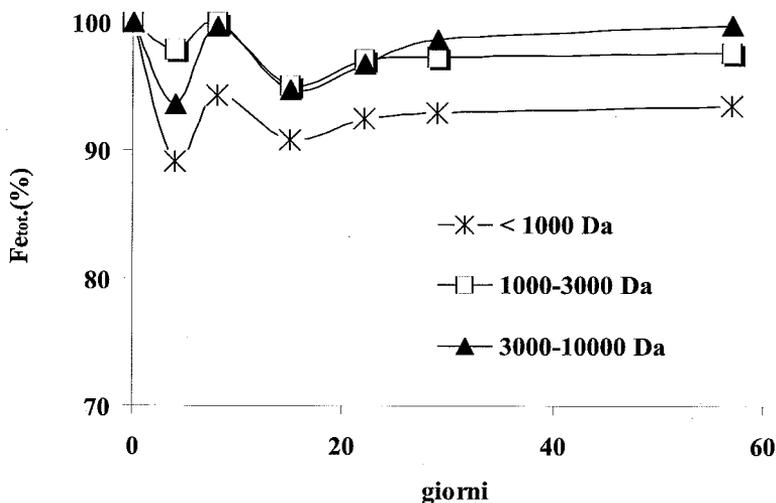
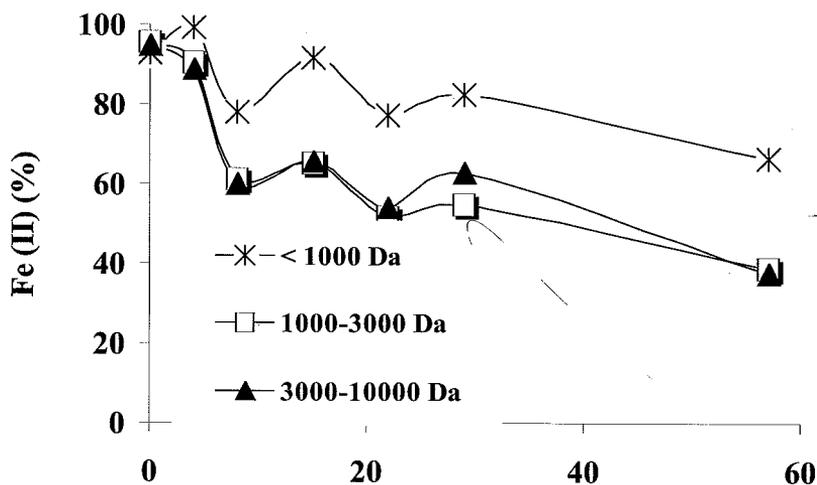


Fig. 4 Andamento nel tempo della percentuale di Fe (II) rispetto al Fe totale in soluzione su frazioni a diversa NMW dell'idrolizzato proteico: soluzione 1:10 in acqua a pH 6,3.



Per capire quale ruolo abbiano le componenti a diversa massa molecolare nel processo di complessazione del Fe, sono state condotte a pH 6,3 alcune prove analoghe a quelle descritte in precedenza su frazioni dell'idrolizzato con NMW, rispettivamente, inferiore a 1000 Da, 1000-3000

Da e 3000-10.000 Da. Dai grafici riportati nelle Figg. 3 e 4 si riscontra come le frazioni a più elevata NMW presentino una maggiore prevalenza a trattenere il Fe totale in soluzione. È però interessante sottolineare come la frazione con NMW < 1000 Da abbia mostrato una maggiore capacità non solo di prevenire l'ossidazione del Fe(II) a Fe(III), ma anche di incrementarne la quantità (+30%) a distanza di due mesi dall'inizio dell'indagine analitica. Si può quindi pensare che l'efficacia dell'idrolizzato "in toto" nel complessare il Fe(II) e di mantenerlo come tale in soluzione sia dovuta a un'azione sinergica delle componenti a diversa massa molecolare contemporaneamente presenti in soluzione.

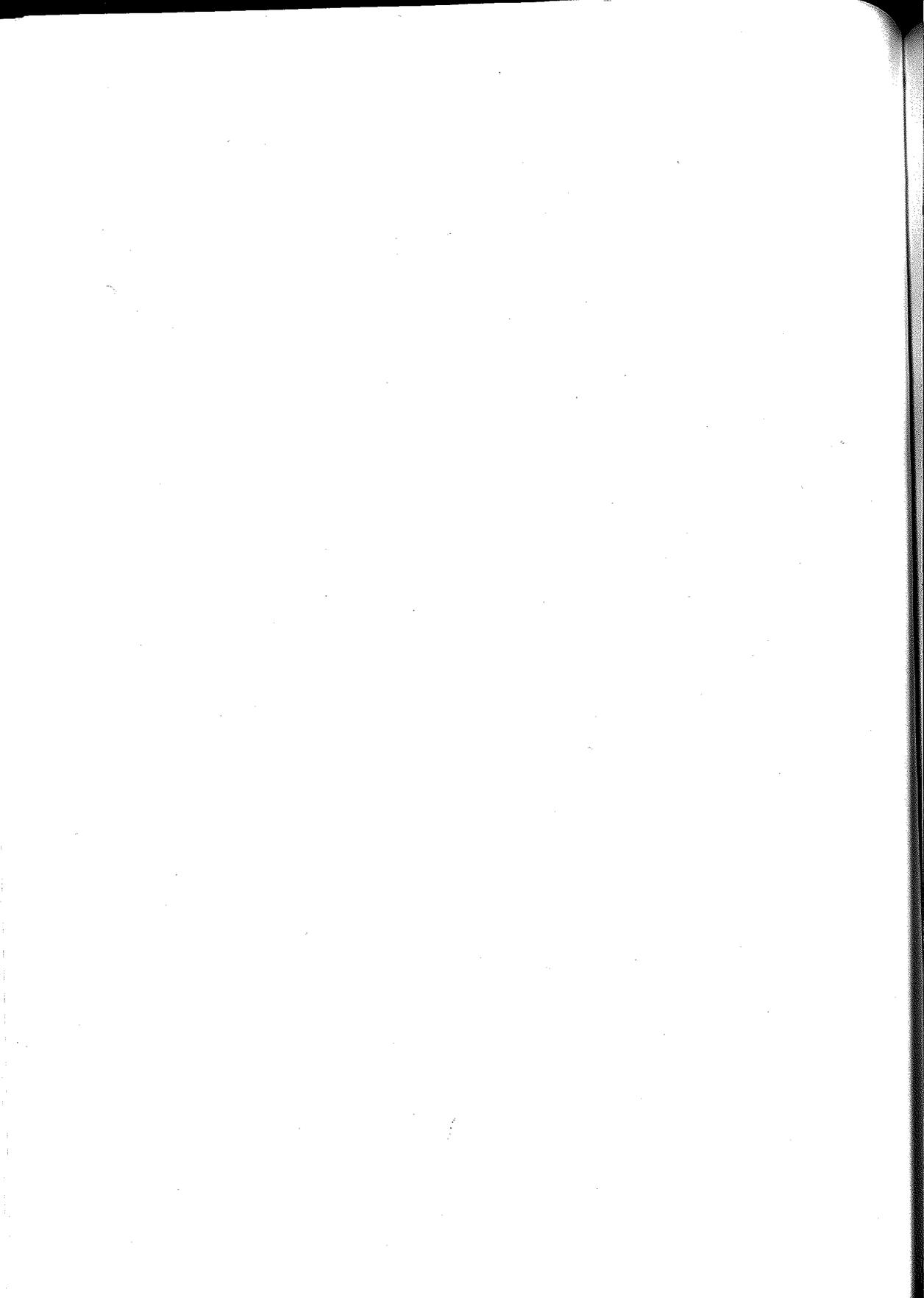
Ringraziamenti

Il lavoro è stato svolto nell'ambito del progetto finalizzato MURST (Fondo Speciale per la Ricerca Applicata, L. 46/82), in collaborazione con l'ILSA S.p.A. - Arzignano che ha finanziato il contratto di ricerca della dr.ssa Mori.

Gli autori ringraziano, inoltre, il Dr. Marco Govi per la preziosa e fattiva collaborazione nell'ambito della ricerca in atto.

Bibliografia

- MARSCHNER H. (1995). *Mineral Nutrition of higher plants*, 2th edition. Academic Press, London, 889 pp.
- MINOIA C., M. BETTINELLI, E. SABBIONI (1993). *Applicazioni dell'ICP-AES nel laboratorio chimico e tossicologico. Vol.2 Ambiente e salute*. Morgan Edizione Tecniche, Milano 860 pp
- TARAS A.J., GREENBERG A.E., HOAK R.D., RAND M.C. (1971). Iron. In: *Methods for the examination of water and wastewater*, 13th edition. American Public Health Association Washington pp189-192.



EFFETTO DEI TRATTAMENTI FOGLIARI CON IDROLIZZATI PROTEICI DI ORIGINE ANIMALE SULL'ATTIVITÀ VEGETATIVA DI PIANTE DI ACTINIDIA (°)

Maurizio Quartieri^{1*}, Luciano Cavani², Bruno Marangoni¹,
Massimo Tagliavini¹

¹ Dipartimento di Colture Arboree, Università di Bologna
Via Filippo Re, 6 - 40126 Bologna

² U.C.I. - Scienza e Tecnologie Agroindustriali ed Agroalimentari
Istituto di Chimica Agraria, Università di Bologna
Via S. Giacomo, 7 - 40126 Bologna

* Borsista dell'I.L.S.A. S.p.A., Arzignano (VI)

Introduzione

La fertilizzazione delle piante è basata prevalentemente sull'apporto di concimi minerali; negli ultimi anni tuttavia si è assistito all'uso sempre più frequente, soprattutto nella nutrizione fogliare, di prodotti contenenti amminoacidi, peptidi, zuccheri e acidi organici. L'efficacia agronomica di questi prodotti è data dalla loro azione nutrizionale (es. apporto di N) e dalla capacità di trasportare altri elementi (es. il ferro). In aggiunta agli aspetti nutrizionali, questi prodotti suscitano interesse anche per la loro capacità di agire sul metabolismo (Mladenova, 1978) e sul bilancio energetico della pianta. L'aspetto energetico diventa assai importante per le piante che si trovano in condizioni sub-ottimali (piante affette da stress biotici e/o abiotici). Alcuni studi condotti su cereali, per esempio, suggeriscono un ruolo chiave di alcuni amminoacidi, tra cui la L-prolina, nel superamento di stress idrici (Bogges *et al.*, 1976; Rajagopal *et al.*, 1977) e termici (Chu *et al.*, 1978). La capacità della pianta di assorbire, sia per via radicale sia attraverso le foglie, molecole come gli amminoacidi ed i peptidi è stata riportata in letteratura per diverse specie (es. asparago, avena e pisello) (Housley *et al.*, 1977; Jones e Darrah, 1993; Kinraide e Etherton, 1980; Shobert *et al.*, 1988; Servaites *et al.*, 1979; Pate *et al.*, 1973); tuttavia esistono poche informazioni sull'effetto di tale molecole sulla pianta.

Di seguito si riportano i risultati di uno studio condotto su actinidia, con l'obiettivo di valutare l'azione di idrolizzati proteici caratterizzati da un diverso peso molecolare sull'attività vegetativa.

(°) Lavoro finanziato da I.L.S.A. S.p.A. (Arzignano - VI) nell'ambito del Progetto MURST (legge 46/82) "Biotecnologie per la cura e la nutrizione dei vegetali".

Materiali e Metodi

La prova è stata condotta nel 1999 in una serra climatizzata presso il Centro Didattico-Sperimentale dell'Università di Bologna, utilizzando piantine di actinidia (*Actinidia deliciosa*) micropropagate. Le piante sono state allevate in vasi della capacità di 1,2 L, riempiti con un substrato misto (60% di terra e 40% di sabbia). Il disegno sperimentale prevedeva, accanto ad un testimone non trattato, il confronto tra sette prodotti (sei idrolizzati proteici e l'urea), applicati ciascuno secondo tre diverse concentrazioni di azoto (240, 400 e 800 mg N L⁻¹ di soluzione). Gli idrolizzati proteici utilizzati nell'esperimento sono stati ottenuti mediante idrolisi enzimatica del peptone da gelatina (prodotto standard Fluka, codice 70176), realizzata presso il laboratorio dell'Istituto di Chimica Agraria dell'Università di Bologna. Il frazionamento è avvenuto mediante ultrafiltrazione tangenziale, utilizzando membrane di cellulosa rigenerata del tipo Prep/Scale-TFF Cartridges (Millipore Corp., U.S.A.) da 1, 3 e 10 kD NMW. I prodotti così ottenuti differivano tra loro per il peso molecolare e, quindi, per il contenuto in amminoacidi e peptidi.

Di seguito si riportano le tesi e le caratteristiche principali dei prodotti posti a confronto:

- 1) testimone, non trattato;
- 2) peptone da gelatina, denominato PG (N=16%);
- 3) idrolizzato da peptone da gelatina, non frazionato, denominato IEPG (N=15,2%);
- 4) frazione del PG con peso molecolare superiore a 10000 Dalton, denominato IEPG > 10 kD (N=14,0%);
- 5) frazione del PG con peso molecolare compreso tra 3000 e 10000 Dalton, denominato IEPG 3-10 kD (N=14,7%);
- 6) frazione del PG con peso molecolare compreso tra 1000 e 3000 Dalton, denominato IEPG 1-3 kD (N=15,5%);
- 7) frazione del PG con peso molecolare inferiore a 1000 Dalton, denominato IEPG <1 kD (N=14,2%);
- 8) urea (N=46%).

Dalla fine di maggio alla prima decade di luglio sono stati eseguiti cinque trattamenti fogliari, intervallati l'uno dall'altro di 10 giorni. Dopo circa un mese dall'inizio della prova si è provveduto a concimare al suolo tutte le piante, apportando i macroelementi ed il ferro. Durante l'esperimento sono state eseguite periodicamente misure dell'altezza delle piante e dell'intensità di colorazione verde delle foglie (mediante SPAD, Minolta). Al

termine della prova ogni pianta è stata distrutta e separata in radici, fusto e foglie, e sono stati misurati alcuni parametri come la superficie fogliare dell'intera pianta, il peso specifico fogliare ed il peso secco degli organi campionati, dopo essiccazione in stufa a 65 °C per 72 ore.

I dati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi statistica mediante analisi della varianza. Le variazioni dei diversi parametri misurati, in funzione delle concentrazioni crescenti di prodotto, sono state apprezzate mediante l'applicazione dei polinomi ortogonali, mentre, a parità di concentrazione, le differenze fra i prodotti applicati sono state valutate procedendo alla separazione delle medie con il test di Student-Newman-Keuls ($P=0,05$). I risultati riportati nelle figure sono la media di nove repliche.

Risultati

L'applicazione del peptone da gelatina (PG) ha prodotto nel breve periodo effetti positivi sull'accrescimento dei germogli alla concentrazione massima (800 N), mentre al termine dell'esperimento le concentrazioni 240 N e 400 N hanno assai ridotto tale parametro (Tab. 1). Questa azione inibente è stata confermata anche dalla minore biomassa dell'intera pianta e della chioma, nonché dalla minore superficie fogliare al termine della prova (dati non riportati).

Tab. 1. Effetto della concentrazione azotata sulla crescita delle piante di actinidia trattate con PG.

Concentrazione N della soluzione (mg L ⁻¹)	Giorni dall'inizio dell'esperimento				
	+11 gg Altezza (cm/pianta)	+21 gg Altezza (cm/pianta)	+32 gg Altezza (cm/pianta)	+46 gg Altezza (cm/pianta)	+60 gg Altezza (cm/pianta)
0	15,8	20,7	29,4	55,9	91,8
240	15,2	18,6	21,4	28,6	43,3
400	18,4	27,3	35,9	50,9	67,3
800	23,8	40,9	56,8	75,3	88,4
Significatività	L* ¹	L**	L**	Q*	Q*

¹ L e Q: effetto lineare e quadratico della dose di applicazione.

* e **: significativo al 5% ed allo 0,1%, rispettivamente.

I trattamenti con l'idrolizzato proteico non frazionato (IEPG) hanno fortemente inibito la crescita finale delle piante, indipendentemente dalla concentrazione (dati non riportati). L'azione negativa è aumentata progressivamente con la concentrazione di azoto ed ha determinato anche una minore massa secca totale e delle parti aeree (Tab. 2).

Tab. 2. Effetto della concentrazione azotata sulla ripartizione della sostanza secca nelle piante di actinidia trattate con IEPG.

Concentrazione N della soluzione (mg L ⁻¹)	Ripartizione della sostanza secca nella pianta			
	TOTALE (g/pianta)	Radici (g/pianta)	Fusto (g/pianta)	Foglie (g/pianta)
0	11,02	2,43	2,93	5,65
240	9,24	2,20	2,28	4,77
400	9,99	2,42	2,41	5,16
800	10,25	2,12	3,34	4,79
Significatività	Q**1	N.S.	Q***	L*

¹ L e Q: effetto lineare e quadratico della dose di applicazione.

N.S., ** e ***: non significativo e significativo al 1% ed allo 0,1%, rispettivamente.

Il formulato IEPG >10 ha prodotto alle concentrazioni maggiori (400 e 800 N) un effetto costante e positivo sulla crescita dei germogli durante tutto l'esperimento (Tab. 3) e, al termine della prova, ha determinato una maggiore massa totale e dei singoli organi campionati (radici, fusto e foglie) (Tab. 4).

Tab. 3. Effetto della concentrazione azotata sulla crescita delle piante di actinidia trattate con IEPG >10 kD.

Concentrazione N della soluzione (mg L ⁻¹)	Giorni dall'inizio dell'esperimento				
	+11 gg Altezza (cm/pianta)	+21 gg Altezza (cm/pianta)	+32 gg Altezza (cm/pianta)	+46 gg Altezza (cm/pianta)	+60 gg Altezza (cm/pianta)
0	15,8	20,7	29,4	55,9	91,8
240	14,4	18,3	26,0	44,8	69,1
400	18,6	30,8	44,7	74,2	115,7
800	16,4	21,9	33,8	81,8	125,3
Significatività	C**1	C**	N.S.	Q*	Q**

¹ C e Q: effetto cubico e quadratico della dose di applicazione.

N.S., * e **: non significativo e significativo al 5% ed all'1%, rispettivamente.

Tab. 4. Effetto della concentrazione azotata sulla ripartizione della sostanza secca nelle piante di actinidia trattate con IEPG >10.

Concentrazione N della soluzione (mg L ⁻¹)	Ripartizione della sostanza secca nella pianta			
	TOTALE (g/pianta)	Radici (g/pianta)	Fusto (g/pianta)	Foglie (g/pianta)
0	11,02	2,43	2,93	5,65
240	10,36	2,37	2,46	5,53
400	12,50	2,81	3,56	6,12
800	13,10	2,79	3,91	6,40
Significatività	L***1	L**	L***	L**

¹ L: effetto lineare della dose di applicazione.

** e ***: significativo al 1% ed allo 0,1%, rispettivamente.

L'idrolizzato con peso molecolare compreso tra 3000 e 10000 Dalton ha prodotto i risultati più interessanti nel lungo periodo e solo quando applicato alla concentrazione massima (800 N), inducendo una maggiore crescita delle piante (dati non riportati).

Gli idrolizzati con peso molecolare più basso (IEPG 1-3 e IEPG <1) hanno stimolato la crescita soprattutto nella prima parte della prova e la concentrazione 240 N è risultata la più efficace (Tab. 5). I trattamenti con IEPG 1-3 hanno incrementato la massa totale indipendentemente dalla concentrazione. L'accumulo di sostanza secca nelle radici è aumentato linearmente con la concentrazione azotata della soluzione IEPG 1-3 (Tab. 6), unico prodotto che si è distinto significativamente dal testimone per questo parametro.

Tab. 5. Effetto della concentrazione azotata sulla crescita delle piante di actinidia trattate con IEPG 1-3 kD.

Concentrazione N della soluzione (mg L ⁻¹)	Giorni dall'inizio dell'esperimento				
	+11 gg Altezza (cm/pianta)	+21 gg Altezza (cm/pianta)	+32 gg Altezza (cm/pianta)	+46 gg Altezza (cm/pianta)	+60 gg Altezza (cm/pianta)
0	15,8	20,7	29,4	55,9	91,8
240	22,5	42,8	62,7	86,3	102,7
400	20,0	33,1	48,8	69,9	95,2
800	18,6	25,7	37,0	64,3	98,2
Significatività	Q**1	Q**	Q*	N.S.	N.S.

¹ Q: effetto quadratico della dose di applicazione.

N.S., * e **: non significativo e significativo al 5% ed all'1%, rispettivamente.

Tab. 6. Effetto della concentrazione azotata sulla ripartizione della sostanza secca nelle piante di actinidia trattate con IEPG 1-3 kD.

Concentrazione N della soluzione (mg L ⁻¹)	Ripartizione della sostanza secca nella pianta			
	TOTALE (g/pianta)	Radici (g/pianta)	Fusto (g/pianta)	Foglie (g/pianta)
0	11,02	2,43	2,93	5,65
240	12,38	2,71	3,55	6,12
400	12,42	2,94	3,47	6,00
800	12,46	3,05	3,45	5,96
Significatività	L*1	L**	N.S.	N.S.

¹ L: effetto lineare della dose di applicazione.

** e ***: significativo al 1% ed allo 0,1%, rispettivamente.

Considerazioni conclusive

Lo studio condotto ha permesso di evidenziare una diversa risposta delle piante di actinidia ai trattamenti applicati, risposta che si è diversificata in funzione del peso molecolare del prodotto, della concentrazione azotata della soluzione irrorata, nonché del numero di trattamenti. I risultati ottenuti sulla crescita suggeriscono inoltre di distinguere l'azione di alcuni idrolizzati nel breve periodo (dopo l'applicazione di tre trattamenti) da quella nel lungo periodo (valutata al termine della prova, dopo cinque trattamenti). Nel breve periodo, infatti, è evidente l'azione promotrice sull'accrescimento dei germogli di quasi tutti gli idrolizzati (ad eccezione di IEPG e IEPG 3-10), mentre al termine della prova solo IEPG >10 e IEPG 3-10 hanno stimolato l'attività vegetativa.

L'azione degli idrolizzati proteici è risultata spesso simile a quella promossa dai trattamenti con urea. In alcuni casi tuttavia l'effetto dell'idrolizzato è risultato superiore a quello del fertilizzante minerale ed è da attribuire non all'apporto azotato (che era simile) ma ad un probabile effetto degli amminoacidi e dei peptidi sull'attività metabolica della pianta. In un precedente studio condotto su mais è stata riscontrata una maggiore attività dell'enzima glutammato deidrogenasi (GDH), con produzione di potere riducente (NADH), su piante trattate con acido L-glutammico o con una miscela commerciale di amminoacidi liberi (Mladenova, 1978).

Non devono essere sottovalutati, inoltre, i risultati forniti da alcuni prodotti (es. PG, IEPG e IEPG 3-10) che hanno inibito fortemente la crescita della pianta se applicati a determinate concentrazioni. E' evidente, quindi, la necessità di individuare per ciascun prodotto la concentrazione ottimale di applicazione ed il numero degli interventi, in funzione dell'obiettivo da raggiungere.

Bibliografia citata

- BOGGESS S.F., STEWART C.R., ASPINALL D., PALEG L.G. (1976). Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. *Plant Physiol.* 58: 398-401.
- CHU T.M., JUSAITIS M., ASPINALL D., PALEG G. (1978). Accumulation of free proline at low temperatures. *Physiol. Plant.* 43: 254-260.
- HOUSLEY T.L., PETERSON D.M., SCHRADER L.E. (1977). Long distance translocation of sucrose, serine, leucine, lysine and CO₂ assimilates. I. Soybean. *Plant Physiol.* 59: 217-220.
- JONES D.L., DARRAH P.R. (1993). Influx and efflux of aminoacid from *Zea mays* L. roots and their implications for N nutrition and the rhizosphere. *Plant and Soil*, 155/156: 87-90.
- KINRAIDE T.B., ETHERTON B. (1980). Electrical evidence for different mechanism of uptake for basic, neutral and

acidic amino acids in oat coleoptiles. *Plant Physiol.* 85: 1085-1089.

- MLADENOVA Y.I. (1978). Effect of L-glutamic acid and Siapton leaf organic fertilizer on oxidized nicotinamide adenine dinucleotide dependent glutamate dehydrogenase of different maize genotypes. *J. Agric. Food Chem.*, 26 (6): 1274-1276.
- PATE J.S. (1973). Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Biochem.* 5: 109.
- RAJAGOPAL V., BALASUBRAMANIAN V., SINHA S.K. (1977). Diurnal fluctuation in relative water content, nitrate reductase and proline content in water-stressed and non-stressed wheat. *Physiol. Plant.* 40: 69-71.
- SCHOBERT C., KÖCKENGERGER W., KOMOR E. (1988). Uptake of aminoacids by plants from the soil: a comparative study with castor bean seedlings grown under natural and axenic soil conditions. *Plant and Soil*, 109: 181-188.
- SERVAITES J.C., SCHRADER L.E., JUNG D.M. (1979). Energy-dependent loading of amino acids and sucrose into the phloem of soybean. *Plant Physiol.* 64: 546-550.



LA FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA COME STRUMENTO PER IL RICONOSCIMENTO DELLE MATRICI ORGANICHE

Francesco Alianiello, Francesca Baroccio, Anna Benedetti

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

Introduzione

I fertilizzanti organici sono ormai da tempo oggetto di interesse, soprattutto per la loro rispondenza agli schemi propri dell'agricoltura sostenibile, che impone particolare attenzione alla salvaguardia delle risorse. Derivando i fertilizzanti organici in gran parte dal recupero di biomasse organiche di rifiuto e di scarto, si rende necessario approntare delle tecniche analitiche che ne consentano il riconoscimento, anche al fine di rivelare probabili frodi commerciali.

Poche sono le tecniche strumentali che si stanno individuando come adatte al riconoscimento delle matrici organiche; nel campo dei mangimi è prevista ad esempio la microscopia (MIRAAF, 1994), mentre su altre tecniche sono in corso indagini anche nel campo dei fertilizzanti. La focalizzazione isoelettrica (IEF), già prevista dalla legge 748 come tecnica analitica per il riconoscimento delle matrici organiche nei concimi organo-minerali, ha ottenuto solo recentemente risultati soddisfacenti, anche per i fertilizzanti organici. Al fine di raccogliere i profili delle più diverse matrici, sono state caratterizzate varie biomasse di origine diversa, principalmente di derivazione agro-alimentare, quali acque di vegetazione da frantoio, sanse, pastazzi dell'industria degli agrumi, vinacce, borlande, fanghi e compost, ma anche carboni fossili quali torbe, ligniti e leonarditi.

Nel presente lavoro vengono sintetizzati i risultati ottenuti fino ad oggi dalla comunità scientifica. Una trattazione più approfondita viene dedicata ad alcuni di essi, raggiunti nei laboratori dell'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante. Vengono infine riportati i profili di alcune tipologie di biomasse ed organo-minerali da loro derivati ancora inediti.

Materiali e metodi

Vengono qui descritti i materiali e i metodi degli esperimenti condotti nei laboratori dell'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante, premettendo che comunque, negli ultimi anni, si è raggiunta una stretta collaborazione fra i vari gruppi italiani impegnati in questa tecnica, che ha permesso una certa omogeneità fra le metodiche impiegate.

2 g di campione sono stati estratti con 100 ml di soluzione $\text{NaOH} + \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0.1N. La soluzione ottenuta è stata poi dializzata contro acqua su membrane con porosità di 6-8000 Dalton e quindi liofilizzata. Il liofilizzato è stato poi ripreso con acqua nel rapporto di 10 mg/400 μl di H_2O per tutti i campioni, esclusi i pastazzi per i quali si è adottata la concentrazione di 10 mg/200 μl di H_2O . Le soluzioni sono state poi centrifugate in provette Eppendorf a 2500 rpm per 15', ed il surnatante è stato utilizzato per l'analisi. Una precorsa IEF, necessaria per la formazione del gradiente di pH, è stata effettuata a 1200 V per 2 ore e 30 minuti sulla piastra di gel di poliacrilammide di 0.5 mm di spessore priva di campioni contenente anfoliti carrier (Ampholine) dell'intervallo di pH 3.5-8.0. Il gel utilizzato per quasi tutti gli esperimenti era basato su una miscela acrilammide/bisacrilammide in rapporto pari a 37:1, mentre nell'esperimento di confronto fra una torba e una lignite e i loro organo-minerali il rapporto era di 29:1. Il frazionamento IEF della sostanza organica è stato effettuato caricando 30 μl di campione su piastra per 2 ore a una differenza di potenziale di 1200 V. A fine corsa, la piastra è stata colorata con Blu Coomassie 250 e i profili sono stati scansionati al densitometro laser. Nel caso dei concimi organo-minerali è stata effettuata l'integrazione dei picchi.

Stato dell'arte

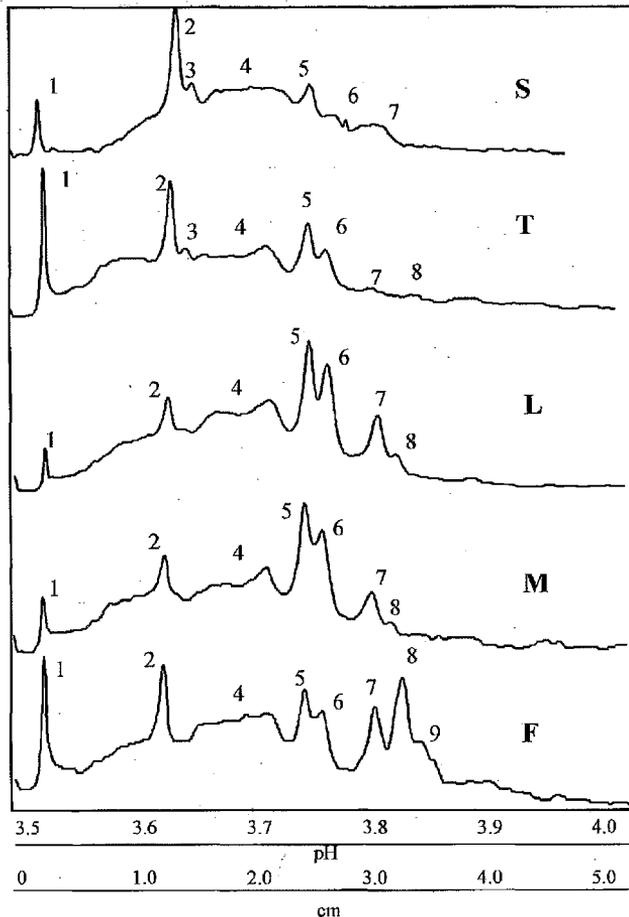
In scienza del suolo il primo materiale analizzato alla focalizzazione isoelettrica è stata la sostanza organica del terreno (Cacco *et al.*, 1974). Alcuni studi avevano individuato una relazione fra posizione delle bande di focalizzazione isoelettrica e peso molecolare (Ceccanti *et al.*, 1986). Altre applicazioni sono state effettuate su fertilizzanti organici e su compost nei loro diversi stadi di stabilizzazione: Govi ed altri (1989) hanno analizzato un liquame suino, seguendo l'evoluzione dei profili IEF durante un'incubazione di 120 giorni in periodo estivo e in periodo invernale. Si è seguita con IEF, in due diversi esperimenti condotti da due diversi gruppi, l'evoluzione della stabilizzazione della sostanza organica nei fanghi da acque reflue

(De Nobili *et al.*, 1986; Govi *et al.*, 1995). Gli studi, anche se i profili IEF sono difficilmente confrontabili tra loro, hanno dato risultati convergenti, nel senso che hanno evidenziato con la maturazione un aumento delle bande IEF più vicine al catodo.

Altri materiali sono stati caratterizzati con IEF, come sangue secco, pollina, polvere di ossa, pelli e crini, farina di pesce, panelli (Govi *et al.*, 1991a; Govi *et al.*, 1991b).

Gran parte di questi risultati, all'interno di un discorso più complessivo sulla focalizzazione isoelettrica in scienza del suolo, è stata sintetizzata da Ciavatta e Govi (1993).

Fig. 1: Profili IEF di pastazzi da agrumi diversi - S: Arancio Sanguinello; T: Arancio Tarocco; L: Limone; M: Mandarino; F: Fanghi.



In realtà fino a pochi anni fa non è stato facile confrontare risultati ottenuti in esperimenti diversi. Molto è cambiato da quando si è ottenuta una certa omogeneizzazione nei metodi e soprattutto quando si è cominciato ad usare un densitometro laser per tracciare i picchi di frazionamento IEF (Alianiello e Fiorelli, 1998).

Si è dimostrato poi che è possibile distinguere mediante focalizzazione isoelettrica due materiali di non facile riconoscimento, e cioè torba e leonardite (Ciavatta *et al.*, 1996).

Inoltre sono stati analizzati altri tipi di biomasse da scarti di lavorazione industriale, e cioè pastazzi da lavorazione di agrumi diversi e sanse ottenute con diverse tecniche di estrazione dell'olio (Alianiello *et al.*, 2000).

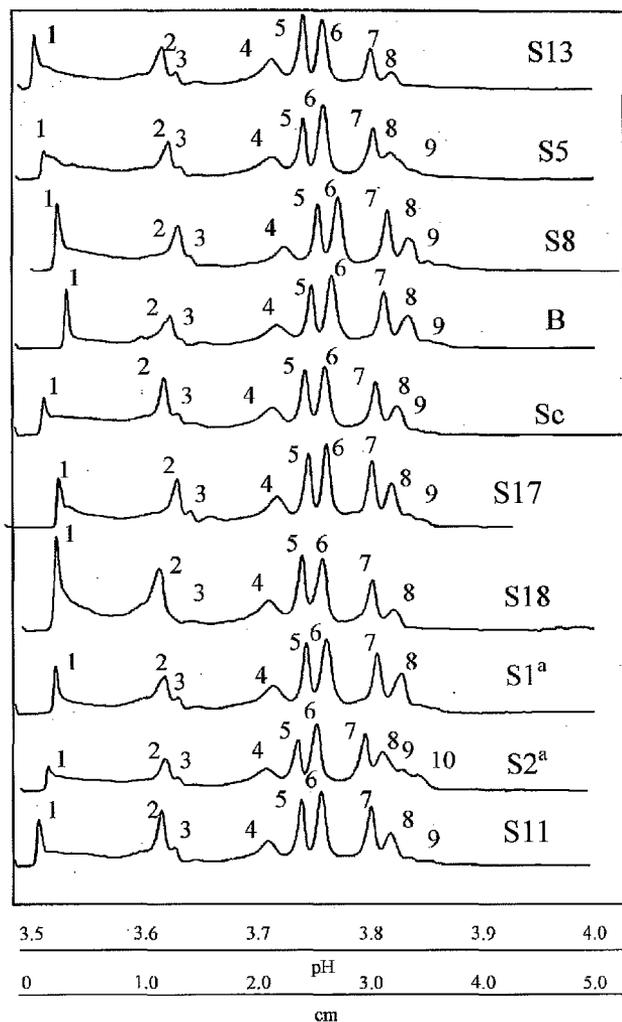
In fig. 1 sono illustrati i profili di focalizzazione isoelettrica dei pastazzi e di un fango proveniente dagli stessi processi di lavorazione degli agrumi. Le tracce rilevate dal densitometro risultano molto poco pronunciate, a causa del basso contenuto proteico della sostanza organica che le costituisce. Ciò provoca un innalzamento del rumore di fondo, più evidenziato al centro del profilo. Ciononostante i picchi sono ancora distinguibili, ed evidenziano le differenze esistenti tra i profili.

In fig. 2 compaiono i profili di focalizzazione isoelettrica delle sanse: fra di loro si nota un forte somiglianza. Le sole differenze di qualche rilievo consistono nei picchi 9 e 10, che compaiono per lo più come spalle solo in alcuni campioni. Il picco numero 1, nei diversi profili, presenta ampiezze fortemente variabili.

Oltre alle biomasse da sole si è indagata la possibilità di riconoscere le matrici organici nelle miscele di concimi organo-minerali (Dell'Orco *et al.*, 1993); un affinamento della tecnica ha permesso un miglioramento dell'efficacia nella separazione in bande (Alianiello *et al.*, 1999).

Profili di focalizzazione isoelettrica sono stati ottenuti su quattro torbe, quattro cuoi, due polline e due liquami suini e, per ogni matrice, su un concime organo-minerale composto da un campione di questi e da un concime minerale NPK (Fig. 4-5). I profili di torba e dell'organo-minerale relativo sono molto simili, anche se uno dei campioni di torba mostra due picchi, assenti negli altri campioni. L'integrazione dei picchi permette di differenziare la torba da altre matrici il cui profilo sembra simile: nella torba infatti la somma dei picchi 9 e 10 è superiore al 28% del totale, mentre in tutte le altre matrici, quando tali picchi siano presenti, non supera il 17%. Il cuoio si differenzia da tutte le altre matrici in quanto non presenta picchi a pH superiori a quello indicato con il numero 8.

Fig. 2: Profili IEF di sanse diverse



S13: Olive Cipressino decanter a 2 ½ fasi

S5: Olive Dritta decanter a 3 fasi

S8: Olive Leccino decanter a 2 ½ fasi

B1: Olive Moraiolo decanter a 2½ fasi (Bevagna)

Sc: Olive Moraiolo decanter a 2½ fasi (Foligno)

S17: Olive miste decanter a 3 fasi

S18: Olive miste decanter a 2 fasi

S1^a: Sgura 1^a prova: olive Coratina decanter a 2 fasi integrale

S2^a: Sgura 2^a prova: olive Coratina decanter a 2 fasi integrale

S11: Olive Coratina decanter a 2½ fasi

Fig. 3. Profili IEF di 4 campioni di torba e di un concime organo-minerale a base torba.

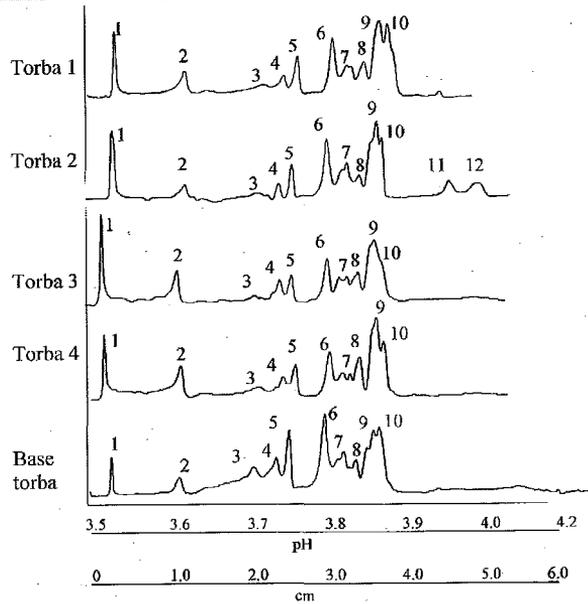


Fig. 4. Profili IEF di 4 campioni di cuoio e di un concime organo-minerale a base cuoio.

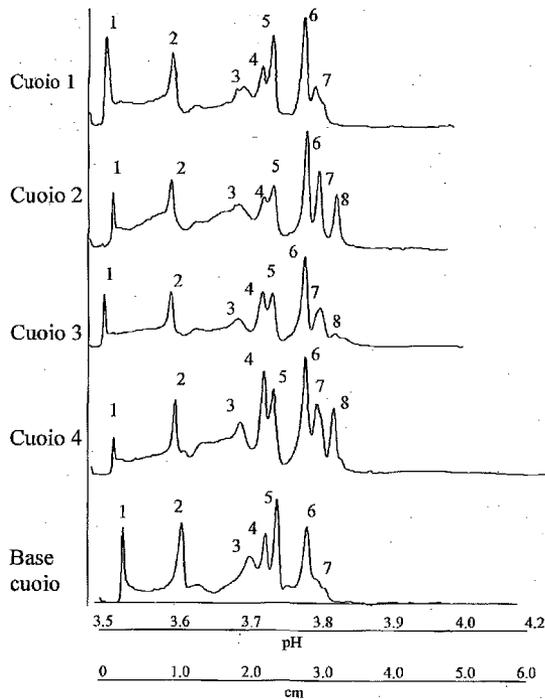
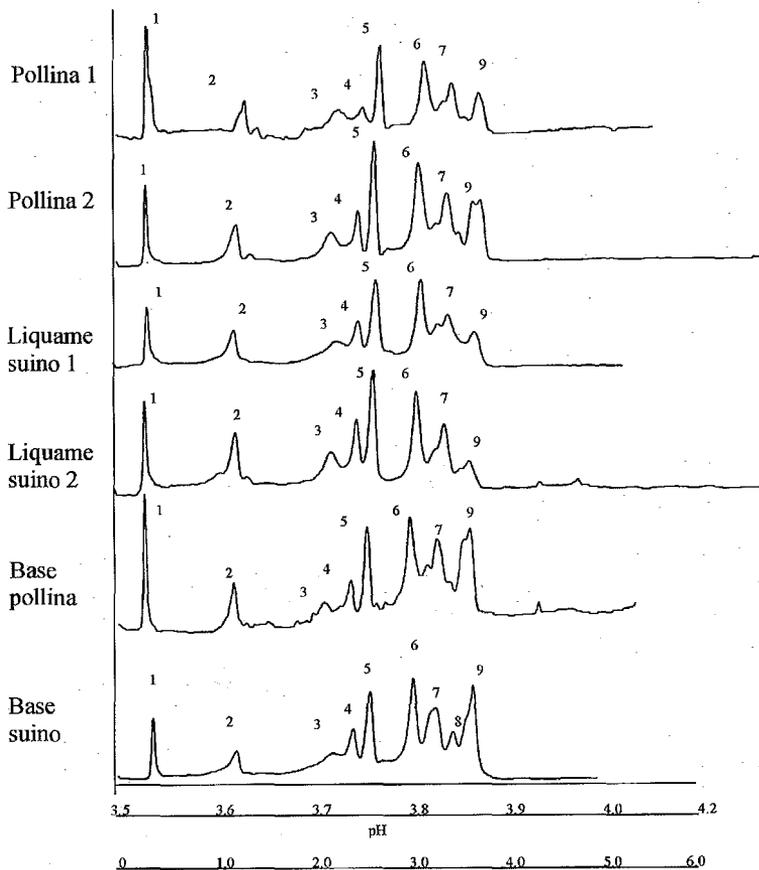


Fig. 5: Profili IEF di due campioni di pollina, di due campioni di liquame suino, di un concime organo-minerale a base pollina e uno a base suino.



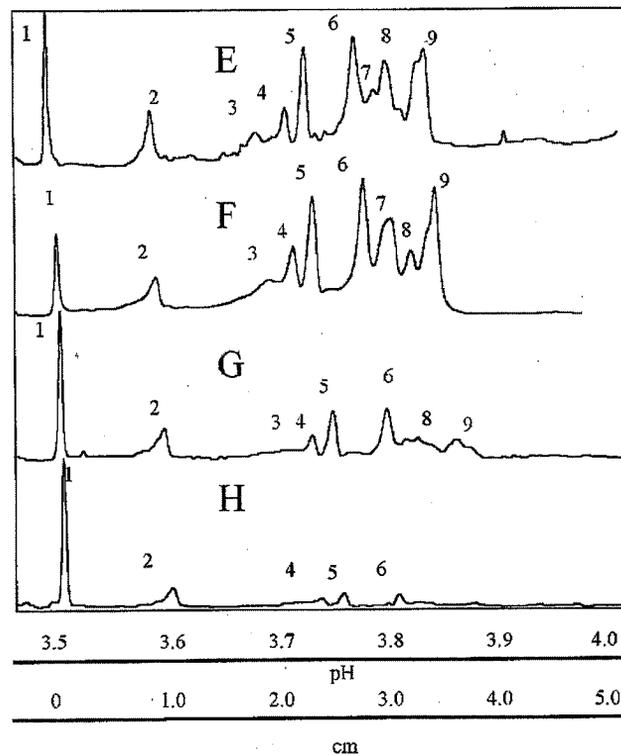
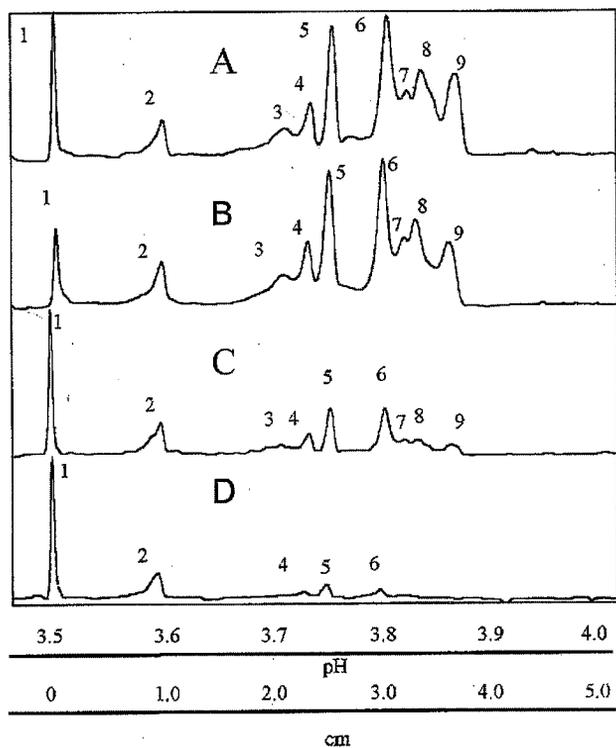
La distinzione fra liquame suino, pollina e organo-minerali relativi risulta più difficile: i profili delle matrici e degli organo-minerali derivati sono veramente molto simili, e sui profili ottenuti in questo modo non è possibile trovare un criterio per la differenziazione delle matrici.

Altri risultati

Se si osservano i tracciati lasciati dalla pollina e dal liquame sulla piastra di poliacrilammide dopo la corsa e il trattamento con blu Coomassie, si nota una differenza fra matrice e matrice nella colorazione delle ban-

Fig. 6: Profili IEF di:

A: Pollina colorato con blu Coomassie; B: Suino colorato con blu Coomassie; C: Pollina non colorato; D: Suino non colorato; E: organo-minerale base pollina colorato con blu Coomassie; F: organo-minerale base suino colorato con blu Coomassie; G: organo-minerale base pollina non colorato; H: organo-minerale base suino non colorato.



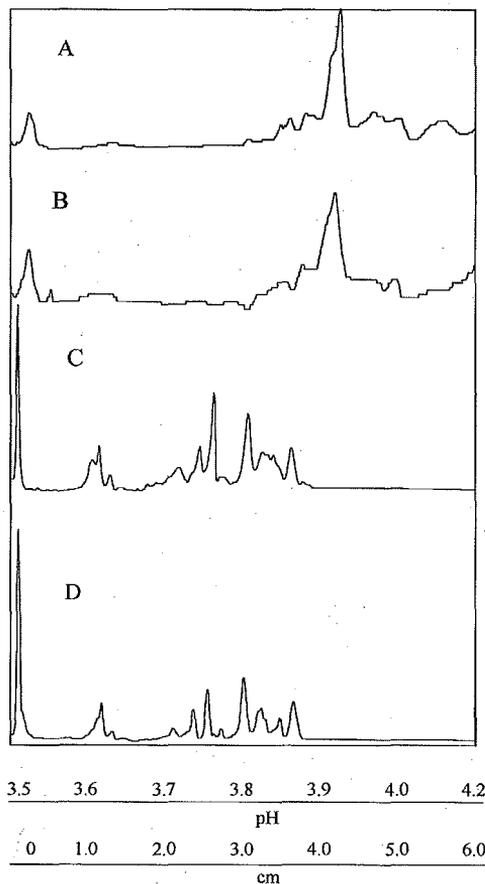
de: quelle della pollina mostrano un colore che tende al marrone, mentre quelle del liquame suino tendono più al blu. Il colore brunastro della pollina è quello tipico di questa tipologia di materiali, che risulta però molto meno intensa nel liquame suino, per il quale la visibilità delle bande è quasi completamente dovuta alla colorazione. Questo potrebbe di per sé rappresentare un criterio di distinzione fra pollina e suino, ma comporta delle difficoltà ulteriori, visto che il riconoscimento di sfumature di colore necessiterebbe di altre tecniche per ottenere una valutazione quantitativa.

Per superare queste difficoltà, dopo una corsa IEF si è eseguita una scansione al densitometro laser prima e dopo colorazione con blu Coomassie. I profili risultanti appaiono in fig. 6: in quello del liquame suino e del suo organo-minerale solamente il picco 1 e il picco 2 sono di ampiezza paragonabile a quelli corrispondenti della pollina, mentre i picchi 4, 5 e 6 appaiono molto deboli. Gli altri picchi, ben visibili nella piastra colorata, quasi scompaiono se in assenza di colorazione. I profili privi di colorazione della pollina e del suo derivato risultano anch'essi molto meno marcati di quelli colorati, ma in essi quasi tutti i picchi sono ancora distinguibili.

In figura 7 vengono riportati i profili IEF di una lignite e di una pollina accompagnati da quelli di organo-minerale da loro derivati. La differenziazione fra organo-minerali in funzione delle matrici organiche è in questo caso particolarmente evidente. I profili della torba hanno caratteristiche diverse da quelli mostrati in Fig. 3: ciò è dovuto alle diverse condizioni sperimentali, come indicato nei materiali e metodi.

Fig. 7: Profili IEF di una lignite e di una pollina e dei relativi organo-minerali:

A: lignite; B: organo-minerale base lignite; C: torba; D: organo-minerale base torba.



Conclusioni

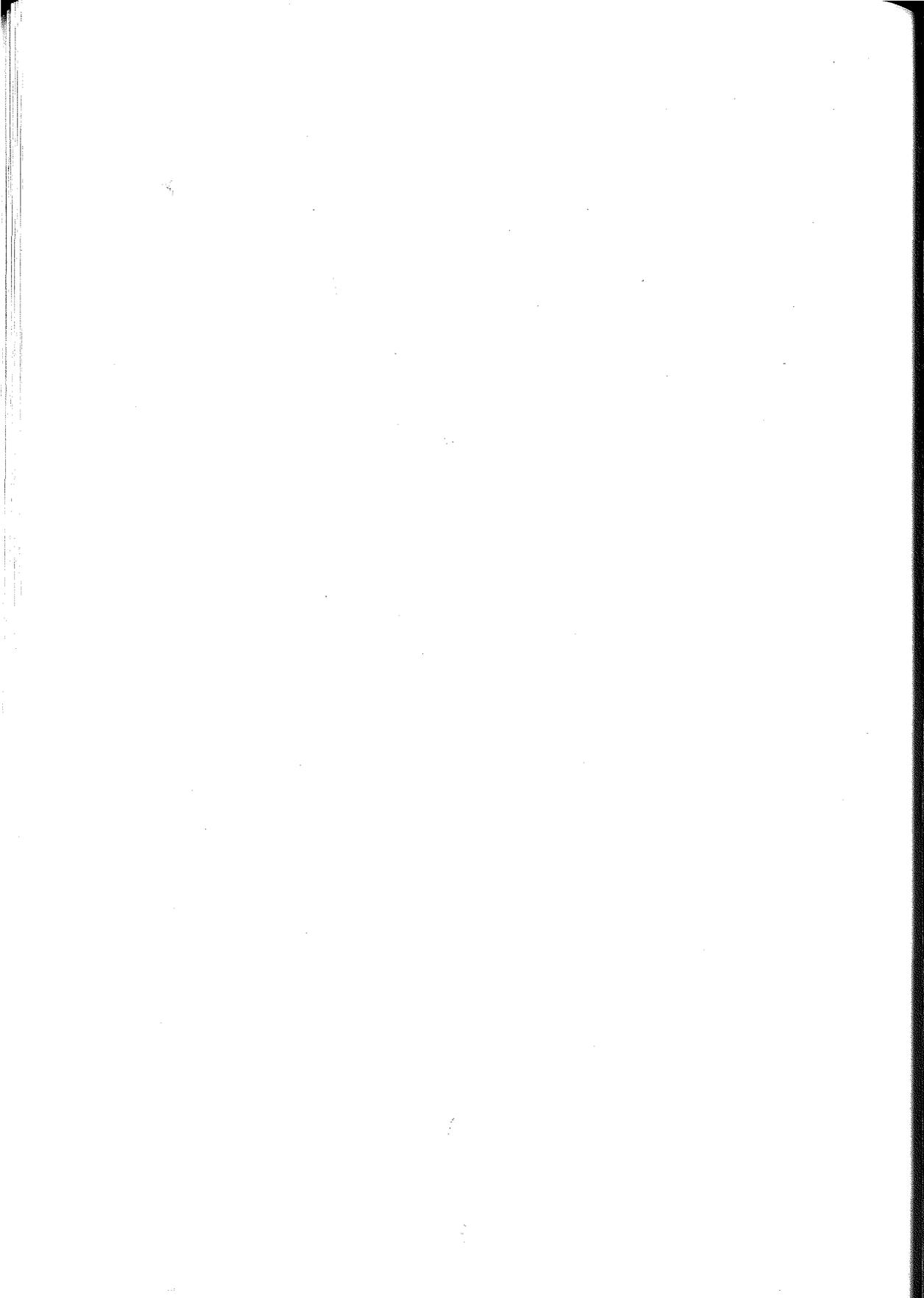
I risultati ottenuti confermano che mediante la focalizzazione isoelettrica oggi è possibile riconoscere matrici tra loro molto simili, quali una torba da una leonardite, mentre nei concimi organo-minerali è possibile riconoscere le biomasse di provenienza della frazione organica, purché queste siano state preventivamente analizzate da sole e quindi il loro profilo sia già noto.

In sostanza la focalizzazione isoelettrica è una tecnica che risponde alle necessità analitiche richieste sia sulle matrici tal quali che sui concimi organo-minerali e che, per essere considerato uno strumento completo di analisi, necessita ancora di una individuazione dei profili tipici ancora per molte tipologie di biomasse, mediante la caratterizzazione sistematica di un elevato numero di campioni per ogni matrice, impresa che è stata realizzata solo in pochi casi.

Bibliografia

- ALIANIELLO F., F. FIORELLI (1998). Iso-electric focusing in soil science: A tool to develop for the knowledge of humic substances. *Fresenius Envir. Bull.*, 7: 523-530.
- ALIANIELLO F., S. DELL'ORCO, A. BENEDETTI, P. SEQUI (1999). Identification of Primary substrates in Organo-Mineral Fertilizers by means of Isoelectric focusing. *Communications in Soil Science and Plant analysis*. 30, 15-16.
- ALIANIELLO F., M. MARCHIONNI, A. BENEDETTI (2000). Biomasse di rifiuto da frantoio oleario e da lavorazione degli agrumi: caratterizzazione di sanse e pastazzi mediante focalizzazione isoelettrica. In: *Atti XVII SICA*. In corso di stampa.
- CACCO G., MAGGIONI A., FERRARI G. (1974). Electrofocusing: A new method for characterization of soil humic matter. *Soil Biol. Biochem.* 6, 145-148.
- CECCANTI B., BERTOLUCCI M.T., RUSTIGHI G., CALCINAI M. (1986). Isoelectric focusing of soil humic substances in the presence of 8 M urea. *Biol Fert. of Soils* 2: 71-75.
- CIAVATTA C., GOVI M. (1993). Use of insoluble polyvinylpyrrolidone and isoelectric focusing in the study of humic substances in soils and organic wastes. *J. Chromatogr.*, 643, 261-270.
- CIAVATTA C., GOVI M., BONORETTI C., GESSA C. (1996). Identification of peat and Leonardite using humification parameters and isoelectric focusing (IEF): a first approach. *Fertilizer Research*. 44, 225-230
- DELL'ORCO S., ALIANIELLO F., BENEDETTI A., TITTARELLI F., SEQUI P. (1995). L'elettrofocalizzazione dei concimi organo-minerali. In: *Atti XII SICA*, 373-378.
- DE NOBILI M., CERCIGNANI G., LEITA L., P. SEQUI (1986). Evaluation of organic matter stabilization in sewage sludge. *Commun. In Soil Sci. Plant Anal.*, 17 (10), 1109-1119.
- GOVI M., CIAVATTA C., VITTORI ANTISARI L., P. SEQUI (1989). Characterisation of organic materials by means of electrofocusing. In: *Lecture notes in earth sciences*. S. Bhattacharji et al. eds. 143-149.
- GOVI M., CIAVATTA C., VITTORI ANTISARI L., P. SEQUI (1991a). Characterization of humified substances in organic fertilizers by means of analytical electrofocusing (EF): a first approach. *Fertilizer research*. 28: 333-339.

- GOVI M., MONTECCHIO D., C. CIAVATTA (1991b). Characterization of humic and humic-like substances in organic fertilizers and amendments. *Finnish Humus News* 3, 3.
- GOVI M., CIAVATTA C., MONTECCHIO D., P. SEQUI (1995). Evaluation of organic matter during stabilization of sewage sludge. *Agr. Med.*, 125, 107-114.
- Ministero per le Risorse Agricole, Alimentari e Forestali, 1994. Decreto Ministeriale 13 aprile 1994. "Approvazione dei metodi di analisi per il controllo ufficiale degli alimenti per gli animali". *Gazzetta Ufficiale*. Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale del 28.5.1994.



CARATTERIZZAZIONE SPETTROSCOPICA (DRIFT, $^1\text{H-NMR}$) ED ELETTROFORETICA (EF) DI TORBE, LEONARDITI E LIGNITI

Orietta Francioso, Luciano Cavani, Claudio Ciavatta,
Vincenzo Tugnoli*, Carlo Gessa

U.C.I. - Scienza e Tecnologie Agroindustriali ed Agroalimentari
Istituto di Chimica Agraria, Università degli Studi di Bologna
Via S. Giacomo, 7 - 40126 Bologna

* Dipartimento di Biochimica, Università degli Studi di Bologna,
Via Belmeloro 8/2 - 40126 - Bologna.

Riassunto

E' stato condotto uno studio sulla caratterizzazione strutturale di acidi umici (HA) estratti da campioni di riferimento di torbe, ligniti e leonarditi con tecniche spettroscopiche (DRIFT, $^1\text{H NMR}$) e per elettrofocalizzazione (EF). Le tecniche DRIFT e $^1\text{H NMR}$ hanno messo in evidenza significative differenze tra i principali gruppi funzionali che permettono di distinguere fra loro queste complesse matrici. Gli HA estratti da torbe hanno mostrato un maggiore contenuto di gruppi ossigenati ed alifatici rispetto a quelli da ligniti e leonarditi, i quali a loro volta hanno evidenziato un contenuto di composti aromatici e polifenolici più elevato. In particolare nelle ligniti è risultato maggiore il contenuto di sostanze polifenoliche rispetto alle leonarditi.

L'EF ha messo in evidenza un profilo elettroforetico tipico per ciascuna tipologia di ammendante analizzato (torbe, ligniti e leonarditi).

L'impiego di tecniche spettroscopiche (DRIFT, $^1\text{H NMR}$) e cromatografiche (EF), pertanto, consentono di caratterizzare torbe, ligniti e leonarditi e di giungere alla loro identificazione merceologica.

Introduzione

Le torbe e le leonarditi sono "ammendanti organici naturali" ai sensi della Legge 19 ottobre 1984, n. 748, caratterizzati da elevati contenuti in carbonio (C) organico e di C umico (Nigro *et al.*, 1998). Le torbe, in par-

ticolare, costituiscono matrici importanti anche per la produzione di concimi organo-minerali (Benedetti e Ciavatta, 1995; 1998). In altri Paesi della U.E. trovano impiego nel settore fertilizzante anche le ligniti (giacimenti di materiali vegetali fossili di cui le leonarditi costituiscono la parte più superficiale) che tuttavia la Legge 748 non ne consente l'impiego (Nigro *et al.*, 1998). Tale divieto potrebbe cadere qualora entrasse in vigore la normativa comunitaria in fase avanzata di preparazione.

Gli ammendanti organici naturali in commercio a base di torbe e di leonarditi devono dichiarare i titoli in C e N organico, nonché l'ubicazione del giacimento di provenienza. Ligniti e leonarditi risultano caratterizzate da percentuali di C organico umificato superiori rispetto alle torbe (Ciavatta *et al.*, 1996; Govi e Ciavatta, 1997; Nigro *et al.*, 1998). Alcuni lavori hanno dimostrato che è possibile differenziare i campioni di torba da quelli di leonardite impiegando alcuni parametri di umificazione, mentre non è possibile distinguere le ligniti dalle leonarditi (Ciavatta *et al.*, 1996; 1997, Govi e Ciavatta, 1997). Per caratterizzare a fondo queste complesse ed eterogenee matrici organiche è indubbiamente necessario procedere con un approccio che preveda l'impiego di differenti metodiche analitiche.

La spettroscopia vibrazionale infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) e la risonanza magnetica nucleare (NMR) sono tecniche di indagine molecolare che sono state applicate per studiare macromolecole complesse come le sostanze umiche (SU) estratte da differenti matrici organiche (Gessa *et al.*, 1983; Wilson 1987; Bloom e Leenheer 1989; Francioso *et al.*, 1996; 2000; Sánchez-Cortés *et al.*, 1998). Tra le tecniche NMR lo spostamento chimico protonico (^1H NMR) ha fornito significative informazioni nei riguardi di alcuni gruppi funzionali e di composti a bassa massa molecolare presenti nelle SU (Wilson *et al.*, 1988; Francioso *et al.*, 1999).

Ulteriori lavori applicando l'isoelettrofocalizzazione (Govì *et al.*, 1992; Govì *et al.*, 1996; Govì e Ciavatta, 1997) e l'elettroforesi capillare (Ciavatta *et al.*, 1995) hanno fornito ulteriori informazioni sulla struttura chimica di queste complesse matrici.

Scopo del lavoro è stato quello di ottenere informazioni sulla struttura chimica delle sostanze umiche estratte e purificate da campioni di riferimento di torbe, leonarditi e ligniti utilizzando la spettroscopia vibrazionale infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR), la risonanza magnetica nucleare (^1H -NMR) e l'elettrofocalizzazione (EF). E' stata inoltre valutata la possibilità di utilizzare queste metodologie per distinguere analiticamente le diverse tipologie di matrici organiche, tenuto conto della elevata possibilità di frodi commerciali.

Materiali e metodi

Nella tabella 1 sono riportate alcuni parametri analitici (pH, carbonio organico totale, azoto totale e ceneri) dei campioni di riferimento di ammendanti organici analizzati.

Le SU sono state estratte con una soluzione di NaOH 0,5 M (10 g di campione: 100 mL di estraente). La sospensione è stata agitata a 25 °C per 24 h in atmosfera di N_2 , poi centrifugata a 6000 x g, quindi filtrata a 0,45 μm . La soluzione ottenuta è stata acidificata con HCl al 15% fino a $\text{pH} < 2$, lasciata riposare per circa 30 minuti e quindi centrifugata a 6000 x g per 20 minuti. Gli HA così separati sono stati trattati per due volte con una soluzione di HCl 0,05 M, dializzati contro H_2O distillata e quindi liofilizzati.

Tabella 1. pH, carbonio organico totale (TOC), azoto e ceneri degli ammendanti analizzati (dati medi su tre ripetizioni).

AMMENDANTE	pH (in acqua 1:10 p/v)	Carbonio organico (TOC %)	Azoto totale (N %)	Ceneri (%)
Torba				
Acida (Novobalt, Russia)	3,0	41,8	0,98	8,4
Neutra (Trento, Italia)	6,5	21,5	1,12	57,4
Acida (Connemara, Irlanda)	4,8	52,3	1,10	4,5
Lignite				
(Figline Valdarno, Italia)	5,0	44,3	0,44	16,4
(Standard Ward's, USA)	6,5	53,6	0,78	8,7
Leonardite				
i (Nord Dakota-USA)	4,0	41,8	0,74	21,8
ii (Nord Dakota-USA)	3,7	39,1	0,77	19,8
iii (Nord Dakota-USA)	3,8	43,8	0,73	20,2

Spettroscopia FT-IR - Gli spettri sono stati ottenuti utilizzando uno spettrofotometro (Nicolet Impact 400) munito di apparato per la riflettanza diffusa (DRIFT) (Francioso *et al.*, 1996).

Spettroscopia NMR - Gli spettri ^1H NMR sono stati ottenuti su una soluzione di HA (40 mg) in un volume di 0,5 mL di NaOD 0,5 M, con uno spettrometro (Bruker ACF 250) munito di probe multinucleare di 5 mm (Francioso *et al.*, 1996).

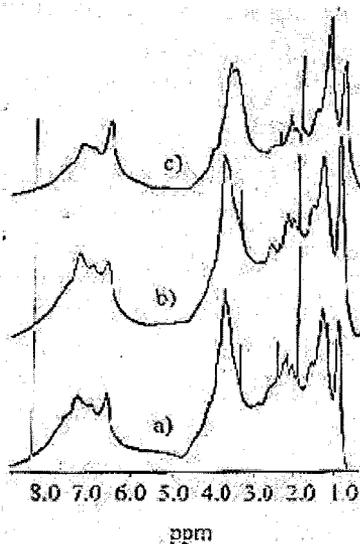
Elettrofocalizzazione - L'analisi per elettrofocalizzazione è stata condotta utilizzando la metodica riportata da Govi *et al.* (1996). I parametri analitici principali erano i seguenti: a) gel di poliacrilammide (PAA) 37,5:1 (2,6 % C; 30,0 % T); b) anfoline Ampholine® (Pharmacia) in miscela (60 % con pH 3,5÷5,0; 20 % con pH 4,0÷6,0; 20 % con pH 6,0÷8,0); c)

condizioni di precorsa: 3 ore ($0,6 \text{ mA cm}^{-1}$; $0,9 \text{ W cm}^{-1}$; 1200 V); d) di corsa: 2 ore ($0,6 \text{ mA cm}^{-1}$; $0,9 \text{ W cm}^{-1}$; 1200 V).

Risultati e discussione

Gli spettri $^1\text{H NMR}$ degli HA di torbe, ligniti e leonarditi sono riportati nelle figure 1, 2 e 3 e presentano il tipico andamento riportato in letteratura per le sostanze umiche (Gessa *et al.*, 1983; Wilson, 1983; 1987).

Figura 1. Spettri $^1\text{H NMR}$ di acidi umici estratti da torbe: a) acida irlandese (Connemara, IRL); b) neutra (Trento, I); c) acida (Novobalt, Russia).

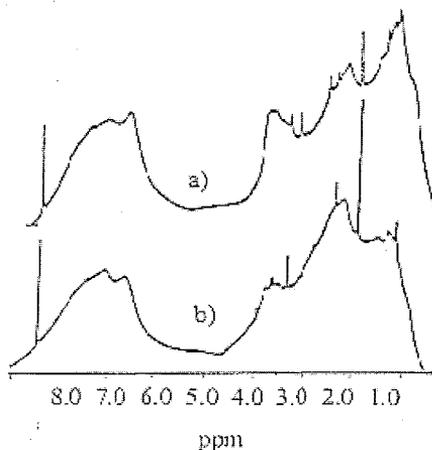


1988). La presenza dell'acetato e del formiato sono state attribuite a fenomeni di ossidazione delle sostanze umiche quando sono estratte con soluzioni alcaline (Wilson, 1987).

Differenze significative sono state riscontrate tra gli spettri degli HA estratti da torbe, ligniti e leonarditi. In particolare, negli HA estratti da torbe (Fig. 1) i protoni legati a C adiacenti ai centri saturi ($0,9 \text{ ppm}$ $-\text{CH}_3$ terminali di catena) presentavano un'intensità relativa maggiore rispetto a quella registrata per gli HA estratti da ligniti e da leonarditi; infatti in essi appare come

Ciascun spettro si può suddividere nelle seguenti regioni: i) $0 - 1,8 \text{ ppm}$ attribuita a protoni legati ad un carbonio vicino a centri saturi; ii) $1,8 - 3,0 \text{ ppm}$ attribuita a protoni che si trovano in posizione α rispetto a gruppi elettronegativi quali quelli aromatici, le insaturazioni, i carbossili e i carbonili; iii) $3,0 - 4,5 \text{ ppm}$ attribuita a protoni su C direttamente legati ad atomi di O che derivano principalmente da zuccheri, polieteri e gruppi metossili, con il contributo anche di strutture amminoacidiche (Wilson 1983; 1987). E' presente inoltre una componente aromatica ed eteroaromatica evidenziata dalla larga banda compresa iv) tra $6,0 - 8,0 \text{ ppm}$ (Wilson 1983; 1987). In tutti gli spettri si possono osservare picchi ben risolti a $1,92$, $2,41$, $3,34$ e $8,49 \text{ ppm}$ attribuiti rispettivamente ai seguenti composti: acetato, succinato, metanolo e formiato (Wilson *et al.*,

Figura 2. Spettri $^1\text{H NMR}$ di acidi umici estratti da ligniti: a) Figline Valdarno (I) e b) Standard Ward's (USA).

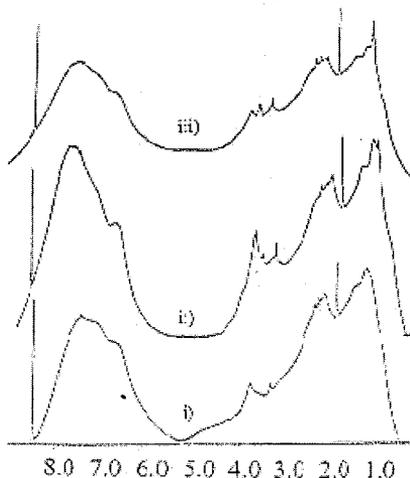


quali i carbossili ($-\text{COOH}$), metossili (O-CH_3) ed i carbonili ($-\text{C=O}$), nelle sostanze umiche estratte da differenti ligniti. La presenza di un basso contenuto di questi composti può rappresentare un utile *marker* per discriminare proprio le ligniti e le leonarditi dalle torbe.

Un ulteriore modificazione strutturale è stata osservata nella regione attribuita ai protoni legati ad anelli aromatici ed eterociclici. In particolare, l'intensità relativa della risonanza a 6,59 ppm è risultata maggiore negli HA estratti sia da torbe che da ligniti (Figg. 1 e 2) rispetto a quelli da leonarditi (Fig. 3). La regione tra 8,0 e 7,0 ppm, attribuita a protoni di anelli aromatici, è caratterizzata nelle torbe da due ampie risonanze a 7,0 e 7,5 ppm che nelle ligniti e nelle leonarditi appaiono come una unica ed ampia risonanza a 7,51 ppm. Il rapporto di intensità relativa tra le risonanze a 7,51 e 6,69 ppm varia in maniera significativa nelle leonarditi e ligniti.

un debole flesso (Figg. 2 e 3). La regione attribuita a protoni legati a C adiacenti a insaturazioni, carbonili e carbossili risulta meno intensa negli HA estratti da ligniti e leonarditi (Figg. 2 e 3) rispetto a quelli da torbe (Fig. 1) dove questa regione risulta finemente risolta. La regione attribuita ai protoni legati a C adiacenti ad atomi elettronegativi (O, N) appare particolarmente intensa negli HA estratti da torbe (Fig. 1) rispetto a quelli estratti da ligniti e leonarditi (Figg. 2 e 3). Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti da Stephanova *et al.* (1993) i quali avevano osservato una forte diminuzione dei principali gruppi ossigenati,

Figura 3. Spettri $^1\text{H NMR}$ di acidi umici estratti da tre diversi campioni standard di leonarditi i); ii) e iii), provenienti da giacimenti del Nord Dakota (USA).



Gli spettri DRIFT degli HA estratti da torbe, ligniti e leonarditi sono riportati nelle figure 4, 5 e 6. Tutti gli spettri sono caratterizzati da un profilo spettroscopico simile a quello delle sostanze umiche riportate in letteratura (Gessa *et al.*, 1983; Stephanova *et al.*, 1993; Johnston *et al.*, 1994). Le principali bande che appaiono in tutti gli spettri sono le seguenti: la banda a 3300 cm^{-1} è attribuita alle vibrazioni stretching di (OH) di gruppi diversi; le bande a 2950 e 2850 cm^{-1} , rispettivamente, alla vibrazione vas e vs di gruppi alifatici (CH_3 , CH_2 , CH) (Rao, 1963); l'intensa banda a 1600 cm^{-1} è attribuita alle vibrazioni $\nu(\text{C}=\text{C})$ di aromatici e vas (COO^-); le bande a 1450 e 1400 cm^{-1} sono attribuite a $\delta(\text{CH})$ di gruppi alifatici (Bellamy, 1975) e alle vibrazioni $\delta(\text{CH}_2)$ e $\nu(\text{COO}^-)$ (Francioso *et al.*, 1996). La presenza di una debole banda a 1280 cm^{-1} può essere assegnata a $\delta(\text{CH})$ di gruppi alcolici e $\nu(\text{C}-\text{O})$ di fenoli. La regione dello spettro tra 1100 e 1000 cm^{-1} è attribuita generalmente alle vibrazioni stretching di C-O di carboidrati (Rao, 1963; Bellamy, 1975).

Figura 4. Spettri DRIFT di acidi umici estratti da torbe: a) acida (Connemara, IRL); b) acida (Novobalt, Russia); c) neutra (Trento, I)

Figura 5. Spettri DRIFT di acidi umici estratti da ligniti: a) Figline Valdarno (I); b) Standard Ward's (USA).

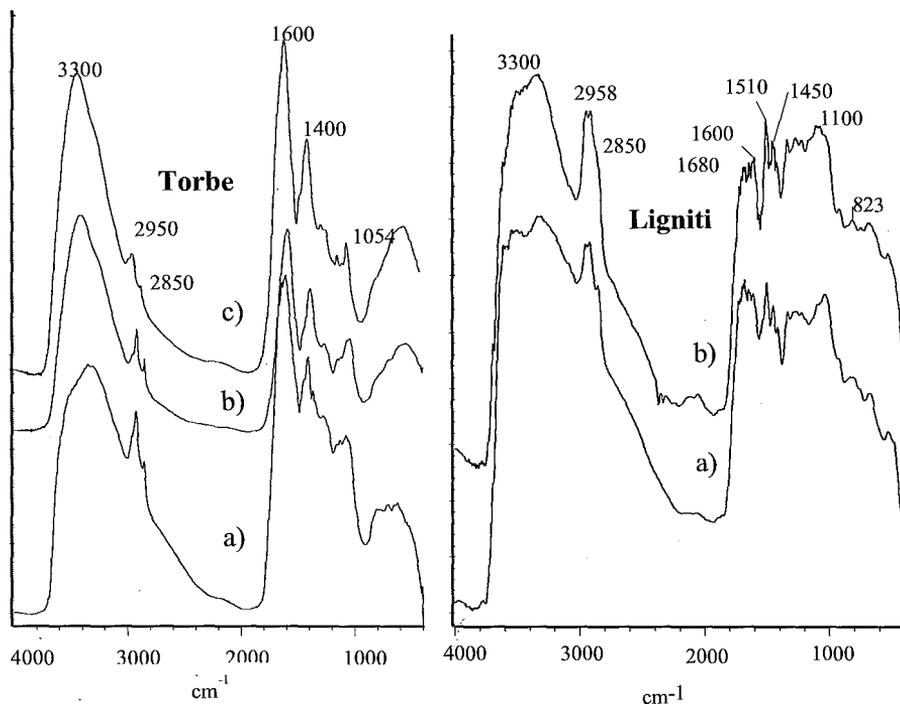
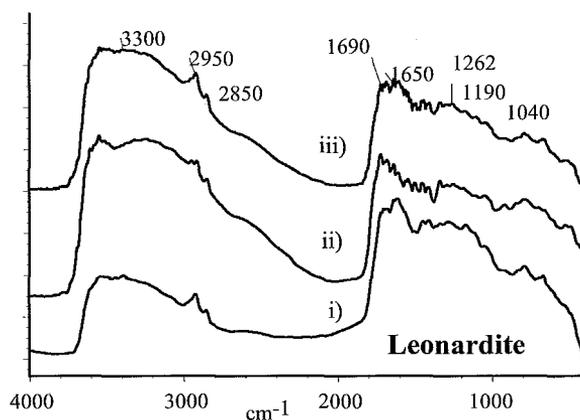


Figura 6. Spettri DRIFT di acidi umici estratti da tre differenti campioni standards: i); ii) e iii) di leonarditi del Nord Dakota (USA).



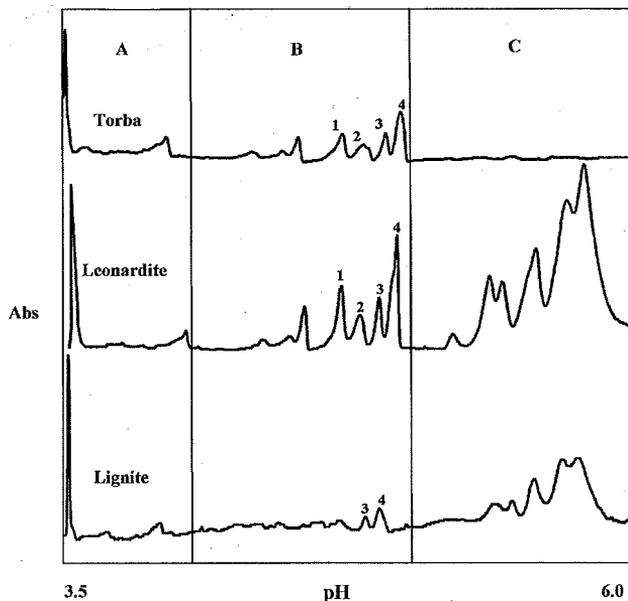
In particolare, negli spettri di HA estratti da torbe l'intensità relativa della banda a 1054 cm^{-1} risulta maggiore rispetto a quella degli HA da ligniti e leonarditi. La presenza di questa banda potrebbe essere attribuita alle vibrazioni $\nu(\text{C-O})$ di acidi, di gruppi eteri ramificati e alle vibrazioni $\nu(\text{C-O})$ di alcoli terziari. Gli spettri $^1\text{H NMR}$ degli HA estratti da torbe confermano la presenza di questi componenti (Figura 1). Negli spettri degli HA estratti da ligniti e leonarditi sono presenti bande nella regione delle vibrazioni del carbonile tra $1680 - 1635\text{ cm}^{-1}$ che possono essere attribuite, rispettivamente, a $\nu(\text{C=O})$ di chinoni in strutture di anelli policiclici aromatici (Rao, 1963). In particolare, la comparsa di intense bande nella regione intorno a 1500 cm^{-1} suggerisce la presenza di strutture polifenoliche non lineari e di polifenilalcani (Rao, 1963).

In figura 7 sono riportati i profili tipo di elettrofocalizzazione (EF) di campioni di torba, leonardite e lignite presi come di ciascuna tipologia di ammendanti. I tre profili risultano ben differenziati tra loro per la presenza di bande diversamente distribuite nelle tre regioni (A, B, C) del profilo.

In particolare tutte e tre le tipologie di ammendanti organici presentano una banda nella regione A del profilo ($\text{pH} < 4$), riconducibile alle molecole più acide e mobili e con elevato rapporto carica/massa. Le regioni B e C del profilo sono invece quelle in grado di differenziare fra loro i campioni di torbe, leonarditi e ligniti.

Le sostanze umiche estratte da campioni di torba mostrano un gruppo di bande molto intense nella regione B del profilo, caratterizzate da valori di pH intorno a 4,4.

Figura 7. Profili di elettrofocalizzazione di acidi umici estratti da: i) torba acida (Connemara, IRL); ii) leonardite Nord Dakota (USA) e iii) lignite Standard Ward's (USA).



Le sostanze umiche estratte da campioni di leonarditi evidenziano la presenza di bande focalizzate sia nella regione B (pH intorno a 4,4) sia in quella C a pH più elevato (pH 4,4-6,0).

Le ligniti, invece, mostrano un *pattern* elettroforetico con bande poco intense nella regione B (pH intorno a 4,4) ed una loro intensificazione nella regione C, con pH compreso fra 4,4 e 6,0.

Conclusioni

Le tecniche spettroscopiche (^1H NMR e DRIFT) utilizzate in questa ricerca hanno consentito di ottenere dettagliate informazioni sulla struttura di campioni standard di torbe, ligniti e leonarditi. In particolare: i) gli HA estratti da torbe sono risultati caratterizzati da un maggior contenuto di gruppi alifatici e composti ossigenati rispetto a quelli ottenuti da ligniti e leonarditi; ii) gli HA da ligniti hanno mostrato un maggior contenuto di composti polifenolici non lineari rispetto alle torbe e leonarditi; iii) gli HA da leonarditi hanno mostrato un maggior contenuto di composti aromatici sostituiti, rispetto a torbe e ligniti.

L'EF ha messo in evidenza profili elettroforetici differenti per ciascuna tipologia di ammendante analizzato. La suddivisione del profilo EF in 3 aree distinte consente di identificare ciascuna tipologia di ammendante.

Ringraziamenti

Il lavoro è stato svolto con il contributo del Mi.P.A.F. - Ispettorato Centrale Repressioni Frodi.

Bibliografia

- BELLAMY J. (1975). *The Infrared Spectra of Complex Molecules*. Chapman and Hall, London, 3rd ed., Vol. 1.
- BENEDETTI A., CIAVATTA C. (1995). I concimi organo-minerali prodotti in Italia: aspetti legislativi, tecnologia e qualità agronomiche. *L'Informatore Agrario* 48: 33-37.
- BENEDETTI A., CIAVATTA C. (1998). Cuoio idrolizzato e/o torrefatto. In: *I Fertilizzanti Organici - Quaderni PAN-DA* (a cura di A. Benedetti e P. Sequi). Cap. V, pp. 49-66. Edizioni L'Informatore Agrario, Verona.
- BLOOM P.R., LEENHEER J.A. (1989). Vibrational, electronic, and high-energy spectroscopic methods for characterizing humic substances. In: *Humic Substances II* (M.H.B. Hayes., P. MacCarthy, R.L. Malcolm, R. Swift Eds.) John Wiley & Sons Chichester, England, pp. 409-446.
- CIAVATTA C., GOVI M., SITTI L., GESSA C. (1995). Capillary electrophoresis of humic acid fractions. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 26: 3305-3313.
- CIAVATTA C., GOVI M., BONORETTI G., GESSA C. (1996). Identification of peat and leonardite using humification parameters and isoelectric focusing (IEF): A first approach. *Fert. Res.*, 44: 225-230.
- CIAVATTA C., GOVI M., SITTI L., CAVANI L., GESSA C. (1997). Riconoscimento e caratterizzazione di matrici organiche nei fertilizzanti. In: *Atti del XIV Convegno Nazionale della Società Italiana di Chimica Agraria* (a cura di C. Gessa e C. Ciavatta). Patron Editore Bologna, pp. 105-112.
- FRANCIOSO O., SÁNCHEZ-CORTÉS S., TUGNOLI V., CIAVATTA C., SITTI L., GESSA C. (1996). Infrared, Raman, and Nuclear Magnetic Resonance (¹H, ¹³C, ³¹P) Spectroscopy in the Study of fractions of Peat Humic Acids. *Appl. Spectr.*, 50: 1165-1174.
- FRANCIOSO O., SÁNCHEZ-CORTÉS S., CIAVATTA C., MARZADORI C., GARCIA-RAMOS J.V., GESSA C. (1999). Spectroscopic analysis (IR, Raman and ¹H NMR) of low molecular weight organic fraction extracted from soil. In: *Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions* (J. Greve, G. J. Pupples, C. Otto Eds.). Kluwer Acad. Publ. London, pp. 587-588.
- FRANCIOSO O., SÁNCHEZ-CORTÉS S., CIAVATTA C., MARZADORI C., GESSA C. (2000). DRIFT and SERS analysis of peat humic and fulvic acid fractions. *Res. Adv. Appl. Spectr.*, 1: 1-11.
- GESSA C., CABRAS M.A., MICERA A., POLEMIO M., TESTINI C. (1983). Spectroscopic characterization of extracts from humic and fulvic fractions: IR and ¹H NMR spectra. *Plant Soil*, 75: 169-177.
- GOVI M., FRANCIOSO O., CIAVATTA C., SEQUI P. (1992). Influence of long-term fertilization on soil humic substances: a study by electrofocusing. *Soil Sci.*, 154: 8-13.
- GOVI M., CIAVATTA C. (1997). Livello di umificazione della sostanza organica nelle torbe. *L'Informatore Agrario*, 19: 37-38.
- JOHNSTON C.T., DAVIS W. M., ERICKSON C., DELFINO J.J., COOPER W.T. (1994). Characterization of humic substances using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health* (N. Senesi, T.M. Miano Eds.). Elsevier Amsterdam, pp. 145.
- NIGRO C., PINZARI F., SATANASSI A. (1998). Torbe, leonarditi e ligniti. In: *I Fertilizzanti Organici - Quaderni PAN-DA* (a cura di A. Benedetti e P. Sequi). Cap. V, pp. 167-180. Edizioni L'Informatore Agrario, Verona.

- RAO C.N.R. (1963). *Chemical applications of Infrared Spectroscopy*. Acad. Press, New York.
- SÀNCHEZ-CORTÉS S., FRANCIOSO O., CIAVATTA C., GARCÍA-RAMOS J.V., GESSA C. (1998). pH-Dependent adsorption of fractionated peat humic substances on different silver colloids studied by Surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Coll. Interf. Sci.*, 198: 308-318.
- STEPHANOVA M., VELINOVA D.M., MARINOV S.P., NIKOLOVA R. (1993). The composition of lignite humic acids. *Fuel*, 72: 681-684.
- WILSON M.A. (1987). *NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry*. Pergamon Press, Headington Hill Hall, Oxford, England.
- WILSON M.A., COLLIN P.J., TATE K. R. (1983). ¹H NMR nuclear magnetic resonance study of a humic acid. *J. Soil Sci.*, 34: 297-304.
- WILSON M.A., COLLIN P.J., MALCOLM R. (1988). Low molecular weight species in humic and fulvic fractions. *Org. Geochem.*, 12: 7-12.

UTILIZZAZIONE AGRICOLA DI FANGHI DI DEPURAZIONE: RISULTATI DI SPERIMENTAZIONI A MEDIO E BREVE TERMINE

Adele Figliolia, Gabriella Rossi, Silvia Socciarelli, Barbara Felici

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

Riassunto

Nel presente lavoro vengono riportati i principali risultati ottenuti in sperimentazioni di medio e breve termine, sulla possibilità di utilizzare in agricoltura fanghi di depurazione civile con particolare riguardo all'accumulo di metalli pesanti nel suolo, all'asportazione da parte delle colture ed agli effetti sulle produzioni vegetali. Le indagini sono state realizzate in due siti sperimentali, utilizzando differenti tipologie di fanghi e colture di interesse agrario. Nel caso della sperimentazione a medio termine, è stato inoltre valutato l'effetto di tale pratica agricola sulla sostanza organica del suolo in termini sia quantitativi e che qualitativi. I risultati ottenuti hanno mostrato un positivo effetto della somministrazione di fanghi depurazione sia sul contenuto in sostanza organica del suolo sia sulla produttività delle colture. Inoltre, a fronte di un moderato incremento del contenuto in metalli pesanti nel suolo, soprattutto a carico della frazione biodisponibile, non si è rilevata una maggiore concentrazione di tali elementi nelle piante analizzate. In alcuni casi l'effetto della sostanza organica apportata nel limitare l'assorbimento e la traslocazione dei metalli nei diversi organi vegetali è stato evidente.

Introduzione

La regolare somministrazione al suolo di sostanza organica, nel passato costituiva una usuale pratica agronomica atta a garantire e conservare un buon livello di fertilità, indipendentemente dall'apporto di concimi minerali. In tempi più recenti, la crisi del settore zootecnico, la pratica della monocoltura, il notevole incremento della produzione ottenibile con la conc-

mazione minerale, ha determinato un progressivo e preoccupante impoverimento del suolo, relativamente al contenuto in sostanza organica, con conseguente perdita di tutti i benefici derivanti dalla reiterata somministrazione ai suoli agrari di materiale organico.

L'utilizzo agricolo di fanghi di depurazione può costituire una valida pratica per la conservazione della fertilità del suolo stesso, proprio per il loro contenuto in sostanza organica e in elementi nutritivi, quest'ultimo influenzando direttamente la produttività delle colture. Considerando ad esempio che un fango urbano ha un valore minimo dell'1,5% in N totale riferito alla sostanza secca, con tutti i depuratori a regime, si ha in Italia una risorsa in N di circa 260.000 quintali all'anno (Figliolia *et al.*, 1997). Il rischio legato alla utilizzazione di questi biosolidi è quello di un eventuale accumulo nel suolo di metalli pesanti ed il conseguente trasferimento di questi alle colture (de Fraja Frangipane *et al.*, 1988). Detti elementi tendono di fatto ad accumularsi nel suolo e, anche dopo lungo tempo, vengono assimilati dalle colture in piccolissime quantità (Mc Grath, 1987). E' inoltre da considerare che la sostanza organica, sia essa nativa o apportata con fertilizzazioni organiche, può influenzare la formazione dei complessi organo-metallici nel suolo e, più in generale, la mobilità e biodisponibilità di detti metalli per le colture (Ciavatta *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 1999). La stabilità di tali complessi nel suolo è funzione sia della frazione organica coinvolta sia di alcune caratteristiche del metallo. Ad esempio, la mobilità di Zn, Ni, Cd e Mn viene favorita dalla presenza di chelati organici solubili (Bergkvist *et al.*, 1989, Berggren, 1992). Al contrario, il rame tende a formare legami con la frazione più stabile della sostanza organica (sostanze umiche), legami che con il tempo diventano progressivamente più forti (Stevenson, 1976).

Per ottimizzare l'utilizzazione dei fanghi di depurazione in agricoltura risulta quindi necessario affiancare alla valutazione dell'accumulo dei metalli pesanti nel suolo e nella pianta, lo studio sia degli effetti sulla produttività delle colture che dell'influenza di tali pratiche agricole sui parametri quanti/qualitativi della sostanza organica del suolo.

Gli obiettivi di questo lavoro sono stati:

- indagare sulla dinamica di alcuni metalli pesanti nel sistema suolo-pianta, attraverso la determinazione nel terreno del contenuto totale e della frazione assimilabile di detti metalli, nonché la concentrazione degli stessi nei vegetali;
- valutare l'influenza della somministrazione pluriennale di fanghi sul carbonio organico totale ed umificato del suolo;

- confrontare gli effetti sulla produttività delle colture di una concimazione organica naturale con lo spandimento di fanghi di depurazione.

Materiali e metodi

Le indagini sono state condotte in due differenti siti sperimentali (tab. n. 1): (sito 1) azienda Marani di Ravenna, gestita dal Centro Ricerche Produzioni Animali di Reggio Emilia e dall'Istituto di Agronomia dell'Università di Bologna, dove è in atto una prova sperimentale a lungo termine di utilizzo agricolo di fanghi di depurazione urbana e parzialmente industriale; (sito 2) azienda sperimentale Tor Mancina (Roma-Monterotondo) di proprietà dell'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante di Roma, dove è in corso una sperimentazione che prevede lo spandimento di fanghi di depurazione urbana forniti dall'ACEA S.p.A..

Tabella n. 1. Confronto tra i due siti di studio.

	Ravenna (sito 1)	Tor Mancina (sito 2)
Durata esperienza	8 anni	2 anni
Tipo coltura	Rotazione triennale: mais, frumento e barbabietola	Rotazione triennale: girasole, frumento e mais
Tipo di biomasse utilizzate e forma di somministrazione	Fanghi di depurazione urbana e parzialmente industriale liquidi, disidratati e compostati	Fanghi di depurazione urbana disidratati Letame ovino
C.S.C.	13,8 meq/100 g-1	25,1 meq/100 g-1
pH	Subalcalino (7,8)	Neutro (6,8)
Contenuto in sostanza organica	Basso (1,48%)	Basso (1,30%)

La prova condotta nel sito 1, è impostata secondo uno schema a blocchi randomizzati completi. Il suolo è un franco-limoso, classificato come Calcic Cambisol (FAO).

I fanghi provenienti dall'impianto di depurazione della città di Faenza vengono distribuiti una volta l'anno, alla lavorazione preparatoria nel periodo autunnale, in tre diverse tipologie: liquido (L); disidratato attraverso nastropressatura (D); compostato con paglia di frumento nel rapporto di 9:1 (C). Le somministrazioni sono state effettuate in due dosi: dal 1988 al 1993 in ragione di 7,5 (L1, D1 e C1) e 15 (L2, D2 e C2) t s.s. ha⁻¹ anno⁻¹; dal 1994 le dosi sono state ridotte a 5 e 10 t s.s. ha⁻¹ anno⁻¹. Oltre alle parcelle trattate è presente un testimone (T) che non ha ricevuto alcun tipo di fertilizzazione organica.

L'esperienza condotta nel sito 2 è iniziata nel 1996 e prevede una sperimentazione parcellare randomizzata (Biondi *et al.*, 1998). Sono state allestite, oltre al controllo (T), quattro tesi con dosi crescenti di fango: 5 (F 5), 10 (F 10), 15 (F 15), 20 (F 20) t s.s. ha⁻¹ anno⁻¹ e una tesi trattata con 10 (L 10) t s.s. ha⁻¹ anno⁻¹ di concime organico (letame ovino), nell'intento di confrontare gli apporti dei metalli pesanti delle due biomasse, nonché il loro effetto sulla produzione vegetale.

I fanghi utilizzati sono forniti dall'ACEA S.p.A. di Roma e provengono da uno dei depuratori della Capitale. Il suolo, a tessi tura franco-limoso, è classificato come "Typic xerochrept" (Soil Taxonomy U.S.D.A. 1975).

Nel sito 1, dopo otto anni di sperimentazione e dopo la coltura del mais, sono stati prelevati campioni di suolo nello strato 0-30 cm e di vegetali; questi ultimi sono stati suddivisi in granella, stocchi e tutoli. Nel sito 2, campioni di suolo e di materiale vegetale sono stati prelevati alla fine di ogni annata agraria.

Determinazioni analitiche:

- per il suolo, mediante spettrometria al plasma (ICP), sono state determinate le concentrazioni totali di Cu, Ni, Zn e Pb, quest'ultimo limitatamente al sito 1, estratti con digestione nitro-perclorica (2,5:1) a 140 °C per circa 20 ore e quelle assimilabili dopo estrazione in DTPA, secondo il metodo di Lindsay e Norvell (1978);

- per le diverse parti della pianta, suddivisa in diverse sezioni vegetali, le concentrazioni dei metalli sono state analizzate con spettrometro al plasma, in seguito a digestione in acido nitrico a 140 °C per circa 2 ore.

Inoltre sui campioni di suolo del sito 1 e solo per le tesi doppie è stato determinato il contenuto in carbonio organico totale (Mi.R.A.A.F., 1994) ed è stato effettuato il frazionamento del carbonio organico mediante la tecnica del polivinilpirrolidone (Sequi *et al.*, 1986; Ciavatta *et al.*, 1990).

I dati relativi ai contenuti totali e assimilabili dei metalli nel suolo e le loro concentrazioni nei tessuti vegetali sono stati sottoposti al confronto tra medie con il test di Duncan per individuare la significatività tra le tesi.

Risultati e discussione

Sito 1: Ravenna - Azienda Marani

Le concentrazioni totali di Cu e Pb nel suolo, dopo otto anni di

somministrazione di fanghi, non sono state interessate da un aumento significativo rispetto al controllo (tab. 2); al contrario, per il Ni, si osserva un incremento nelle tesi trattate, indipendentemente dal tipo di fango impiegato, e per lo Zn, si rilevano differenze significative soltanto per le tesi trattate con il fango disidratato e compostato, con una discreta variazione tra dosi singole e doppie.

Tabella n. 2. Valori di Cu, Zn, Ni e Pb totali nel suolo (mg/kg) - sito 1.

Tesi	Cu	Zn	Ni	Pb
T	79,0a	95,25ab	38,42a	18,50a
D1	90,0a	103,5bc	40,63ab	21,87a
D2	89,19a	120,63e	41,21b	20,89a
L1	87,63a	93,69a	40,28ab	19,93a
L2	89,63a	98,0ab	42,00b	18,37a
C1	92,25a	107,31cd	41,76b	20,95a
C2	87,13a	113,0de	41,28b	19,84a

$P \leq 0.05$; $n=8$

Per Cu e Pb assimilabili (tab. 3.), come nel caso dei totali, non si hanno differenze tra le tesi, ad eccezione del Cu nel trattamento D2; il Ni presenta aumenti significativi, rispetto al testimone, in C1 ed in tutti i trattamenti a dose doppia, con una concentrazione massima nel disidratato (D2); lo Zn mostra un andamento analogo.

Tabella n. 3. Valori di Cu, Zn, Ni e Pb estraibili in DTPA nel suolo (mg/kg) - sito 1.

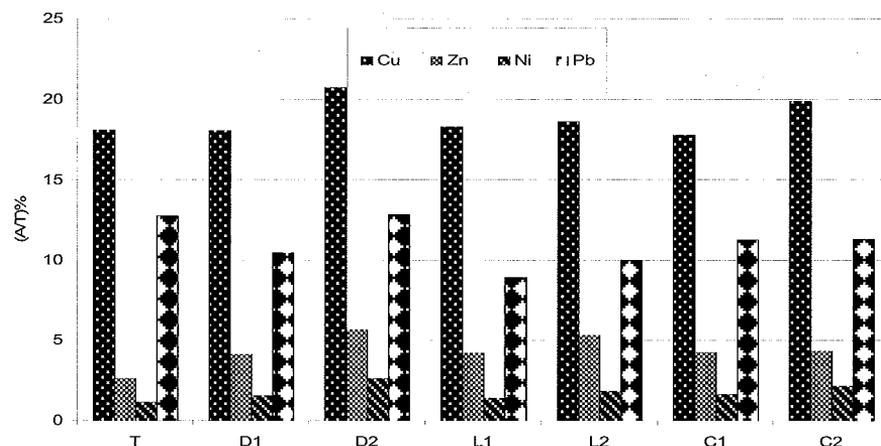
Tesi	Cu	Zn	Ni	Pb
T	14,29a	2,52a	0,44a	2,36a
D1	16,26ab	4,28abc	0,64abc	2,29a
D2	18,49b	6,82d	1,08e	2,68a
L1	16,04ab	3,94abc	0,57ab	1,78a
L2	16,71ab	5,22cd	0,79cd	1,84a
C1	16,42ab	4,60bc	0,70bcd	2,36a
C2	17,33ab	4,87bc	0,90de	2,24a

$P \leq 0.05$; $n=8$

I valori riscontrati per i metalli totali e assimilabili, confrontati con i limiti proposti dal gruppo di lavoro che opera nell'ambito della Commissione per la L. 748/84 sui fertilizzanti, sono da considerarsi normali per suoli non inquinati, ad esclusione delle quote di Cu assimilabile che raggiungono il cosiddetto "livello di attenzione". E' da notare come l'apporto di fanghi abbia comportato per tutti i metalli considerati un aumento percentuale della frazione assimilabile rispetto a quella totale (fig. 1). Questo fenomeno è particolarmente evidente nelle dosi doppie ed appare influenzato

non solo dalla quantità aggiunta ma anche dalla forma fisica del fango (disidratata, liquida o compostata).

Figura n. 1. Rapporto percentuale tra la forma assimilabile e totale di Cu, Zn, Ni e Pb nel suolo - sito 1.



Nelle piante di mais analizzate è stata rilevata la presenza solo di rame e zinco (tab. 4). In particolare dall'analisi dei risultati ottenuti, si evidenzia nelle piante coltivate sul testimone (T), un accumulo maggiore dei due metalli considerati negli stocchi rispetto alla granella ad ai tutoli. Tale tendenza è risultata meno evidente nelle piante allevate sulle parcelle su cui erano stati somministrati fanghi di depurazione. Analogamente a quanto riscontrato nel suolo, le concentrazioni rilevate nei vegetali non superano i valori considerati normali, secondo i limiti proposti dal suddetto gruppo di lavoro afferente alla Commissione per la L. 748/84 sui fertilizzanti.

Tabella n. 4. Concentrazioni di Zn e Cu nei tessuti vegetali di mais (mg/kg s.s.) - sito 1.

Tesi	Zn			Cu		
	granella	tutoli	stocchi	granella	tutoli	stocchi
T	23,83 a	23,82 a	40,8 b	5,36 a	6,54 a	9,64 bc
D1	24,25 a	26,9 a	39,45 b	6,47 ab	6,53 a	10,19 c
D2	23,12 a	22,7 a	28,48 a	6,30 ab	6,08a	8,71 ab
L1	39,63 a	25,97 a	27,86 a	7,44 ab	6,39 a	8,49 ab
L2	24,22 a	26,7 a	30,91 a	8,09 b	6,70 a	8,86 ab
C1	22,42 a	24,05 a	31,28 a	5,57 a	6,18 a	8,7 ab
C2	23,23 a	21,47 a	28,06 a	5,43 a	6,08a	8,43 a

P<0.05; n=8

Considerando le concentrazioni di rame e zinco nella coltura del mais, ottenute come somma delle diverse sezioni vegetali analizzate (fig. 2), appare evidente come, nonostante la maggiore concentrazione di detti metalli in forma assimilabile nelle tesi ammendate, per il rame non si è evidenziata nessuna differenza tra queste tesi ed il controllo mentre nel caso dello zinco, ed in particolare nelle parcelle trattate con dose doppia di fanghi, le quantità di metallo riscontrate nelle piante sono inferiori rispetto al testimone. Si può quindi ipotizzare che, dopo otto anni di somministrazioni, la componente organica apportata con i fanghi di depurazione, abbia influenzato l'assorbimento di detti elementi da parte della coltura del mais. Infatti, in tutte le parcelle trattate con dosi doppie è stato rilevato, rispetto al testimone, un aumento medio del contenuto in carbonio organico totale pari al 26% (tab. 5). Anche la concentrazione di carbonio umico [C-(HA+FA)] è aumentata in tutte le tesi trattate (27% in D2; 24% in L2; 54% in C2).

Figura n. 2. Concentrazioni di rame e zinco come somma delle diverse sezioni vegetali- sito 1.

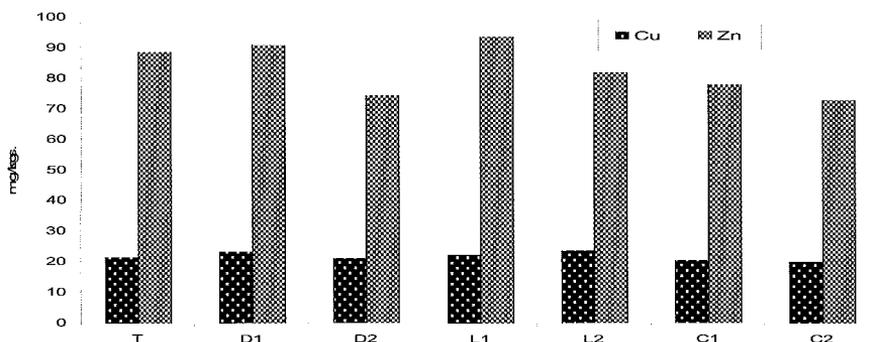


Tabella n. 5. Valori di carbonio organico totale, estraibile ed umico (g/kg) - sito 1.

Tesi	TOC	TEC	C-(HA+FA)
T	8,6	5,1	3,3
D2	11	7,1	4,2
L2	10,8	6	4,1
C2	10,8	8	5,1

Questi risultati, oltre ad evidenziare un'azione positiva dei fanghi sul miglioramento della fertilità organica del suolo, possono spiegare l'effetto della somministrazione dei fanghi sulla dinamica dei metalli nel sistema suolo-pianta. Alcuni autori (Lagerweff *et al.*, 1977; Jones and Jarvis, 1981) hanno infatti determinato il seguente ordine di affinità relativa tra metalli pesanti e sostanze umiche: $\text{Cu}^{2+} >> \text{Pb}^{2+} > \text{Ni}^{2+} >> \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$.

Sito 2: Roma - Azienda Tor Mancina

In questo sito dopo due anni di sperimentazione si è rilevata, solo per lo zinco in forma totale un aumento della concentrazione, rispetto al testimone, nelle tesi F10, F15 ed F20. Anche nella forma estraibile in DTPA si manifesta tale tendenza, pur non essendoci differenze statisticamente significative tra le tesi (tabb. n. 6 e n.7). Le concentrazioni degli altri metalli considerati non presentano incrementi significativi in nessuna tesi sempre in confronto con il testimone.

Tabella n.6. Concentrazioni di Cu, Zn e Ni in forma totale nel suolo (mg/kg) - sito 2.

Tesi	Cu	Zn	Ni
	Totale	Totale	Totale
T	39,58 a	69,02 a	25,28 a
F 5	40,85 a	73,65 ab	25,27 a
F 10	40,22 a	77,16 bc	27,66 a
F 15	41,12 a	85,71 cd	30,33 a
F 20	41,22 a	87,88 d	25,66 a
L 10	41,62 a	70,06 a	26,03 a

$P < 0.05$; $n=6$

Tabella n.7. Concentrazioni di Cu, Zn e Ni estraibili in DTPA nel suolo (mg/kg) - sito 2.

Tesi	Cu	Zn	Ni
	DTPA	DTPA	DTPA
T	2,50 a	0,94 a	0,24 a
F 5	2,84 a	1,55 b	0,19 a
F 10	2,78 a	2,72 c	0,20 a
F 15	3,15 a	3,43 d	0,26 a
F 20	3,03 a	3,97 de	0,31 a
L 10	2,72 a	1,03 a	0,22 a

$P < 0.05$; $n=6$

Considerando il rapporto percentuale tra la forma assimilabile e quella totale di rame, zinco e nichel (figura n. 3) si evidenzia che la somministrazione di fanghi ha comportato un aumento della frazione biodisponibile la cui entità varia in funzione sia della quantità di biomassa apportata che del tipo di metallo.

Dall'esame della figura 4, in cui è rappresentata la concentrazione di metalli rilevata nel frumento come somma di paglia e granella, si può notare come per ogni singolo metallo esista un andamento simile tra la percentuale di biodisponibilità nel suolo (fig. 3) e l'assorbimento dello stesso da parte delle colture, a differenza di quanto riscontrato nell'esperienza a medio termine.

Figura n. 3. Rapporto percentuale tra la forma assimilabile e totale di Cu, Zn, e Ni dopo la coltura del frumento - sito 2.

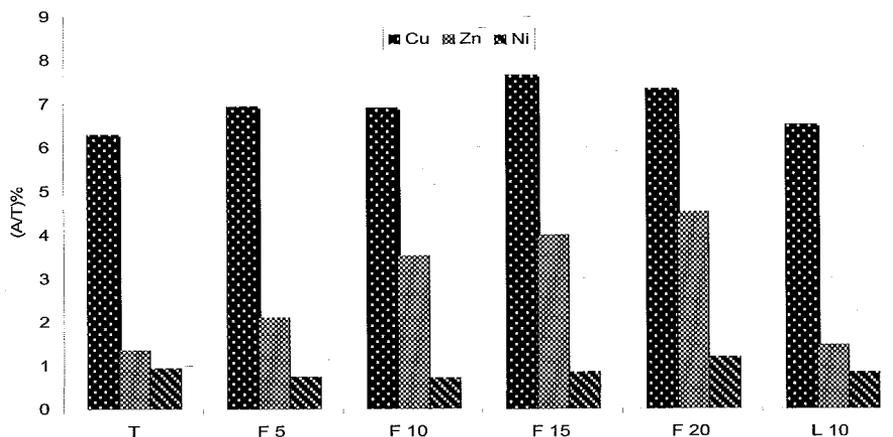
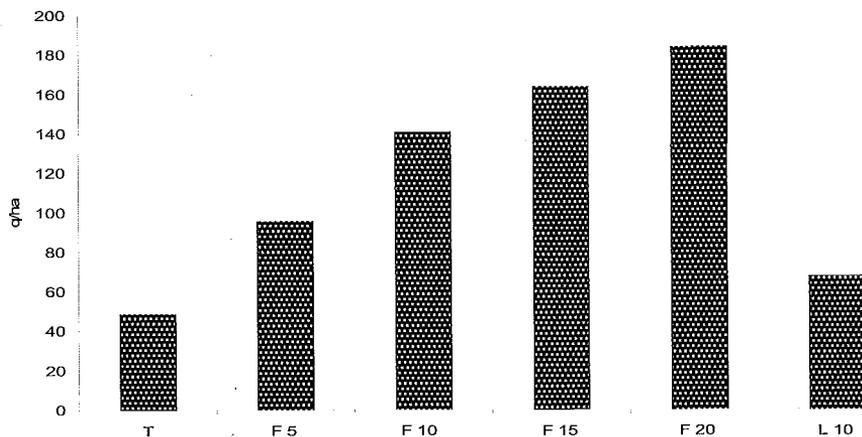


Figura n.4. Concentrazioni di rame, zinco e nichel come somma delle diverse sezioni vegetali - sito 2.



In questo caso si può presupporre che, data la brevità del periodo di esperienza, gli equilibri che si instaurano nel suolo tra metalli, componenti organiche ed inorganiche non abbiano influenzato in modo apparente l'asportazione dei metalli da parte della coltura.

Relativamente alla biomassa vegetale (figura n. 5), le produzioni nelle tesi trattate con i fanghi sono state sempre maggiori rispetto a quelle del testimone con un incremento fino al 280% nella tesi trattata con la massima dose di fango (F20). La risposta produttiva della coltura è stata

quindi positiva per i fanghi e superiore a quella delle tesi trattate con letame, confermando risultati ottenuti in altre sperimentazioni (Pardini G. 1981).

Conclusioni

Sulla base di quanto esposto è emerso che:

- la utilizzazione agricola pluriennale dei fanghi di depurazione ha avuto effetti positivi sui parametri quali/quantitativi della sostanza organica del suolo incrementando il contenuto in carbonio organico totale ed umico;
- a fronte di un moderato accumulo nel terreno, di metalli apportati con i fanghi, la asportazione da parte della coltura è stata limitata e presumibilmente influenzata dalle interazioni metallo – sostanza organica di questi, che giocano un ruolo chiave nel modulare gli equilibri di detti elementi tra forme mobili o biodisponibili e forme maggiormente fissate;
- l'effetto fertilizzante delle suddette biomasse appare già nella esperienza a breve termine, in cui le produzioni vegetali hanno risentito positivamente dell'apporto di elementi nutritivi, risultando superiori anche a quelle ottenute con la somministrazione di letame ovino;
- la valorizzazione agronomica dei fanghi depurazione consente quindi di trasformare questi prodotti da rifiuto a risorsa.

Bibliografia

- BERGGREN D. (1992). Speciation and mobilization of aluminium and cadmium in podsols and cambisols of S, Sweden. *Water, Air and Soil Pollution*, 62: 125-156.
- BERGKVIST B., FOLKESON L., BERGGREN D. (1989). Fluxes of Cu, Zn, Pb, Cd, Cr and Ni in temperate forest ecosystems. A literature review. *Water, Air and Soil Pollution*, 47, 217-286.
- BIONDI F.A., FIGLIOLIA A., SOCCIARELLI S., DI DIO C., DI CARLO V. (1998). Heavy metals dynamics on the soil/plant system of a sludge amended soil. *XVI Congrès Mondial de Sciece du Sol*. Montpellier France.
- CIAVATTA C., FIGLIOLIA A., LEITA L., PETRUZZELLI G. (1997). Evaluation of heavy metals during stabilization of organic matter in compost produced with municipal solid wastes (MSW): chemical, agronomical and environmental aspects. In: *Advances in environmental Control Tecnology Series. Ecological Issues and Environmental Impact Assesment*. Paul N. Cheremy sinoff Editor, pp.613-631.
- Decreto Legislativo n. 99/92 del 27 gennaio 1992. Applicazione della direttiva 86/278/CEE concernente la protezione dell'ambiente, in particolare del suolo, nell'utilizzazione dei fanghi di depurazione in agricoltura. *Gazzetta Ufficiale* n° 38 del 15/02/1992.
- de FRAJA FRANGIPANE E., COSSU R. (1988). Recupero di energia e materiali dai rifiuti. *Rifiuti Solidi* vol. 2 n. 5.
- JONES L.H.P., JARVIS S.C. (1981). The fate of heavy metals. In: *The chemistry of soil process* (Greenland D.J. and

- Hayes M.H.B. Wiley ed. Chichester, GB) pp. 593-620.
- LAGERWERFF J.V., BIERSDORF G. T., MILBERG R. P., BROWER D. L. (1997). Effects of incubation and liming on yield and heavy metal uptake by rye from swadage-sludged soil. *J. Environ. Qual.* vol. 6, 427-431.
- LINDSAY W.L., NORWELL W.A. (1969). Equilibrium relationship of Zn, Fe, Ca and H with EDTA and DTPA in soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 33: 62-68.
- MANFREDINI M. (1970). Foglio geologico n. 144 Palombara Sabina. *Carta Geol. d'Italia.*
- OTTAVI C., OTTAVIANI M., FIGLIOLIA A. (1995). Aspetti tecnici-economici, agronomici, pedologici, igienico-sanitari e normativi dei fanghi di depurazione civile. *Ist. Sup. San.*, Roma.
- PARDINI G. (1981). Aspetti agronomici. Utilizzazione dei fanghi e compost in agricoltura. *Collana del P.F. Promozione della qualità e dell'ambiente, AR/2/20-27, 9-42.*
- PARIS P., LUCIANER A. (1986). Piante e metalli pesanti: gli equilibri possibili nella molteplicità delle variabili. *Genio Rurale* n°6.
- ROSSI G., BELLICIONI S., FELICI B., FIGLIOLIA A. (1999). The effect of sewage sludge fertilisation on the heavy metals behaviour in soil-plant system: a long term experience. *5th International Conference on the biogeochemistry of Trace Elements (ICOBTE)*. 730-731
- Soil taxonomy U.S.D.A., 1975. *Soil Survey Staff, Soil taxonomy: a basic system of soil classification for marching and interpreting soil surveys.*
- STANLEY A. BARBER (1995). *Soil Nutrient Bioavailability. A mechanistic Approach.* John B. Wiley & Sons, pp 318-329; 353-371.
- STEVENSON F. J. (1976). Stability constants of Cu²⁺, Pb²⁺, and Cd²⁺ complexes with humic acids. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 40: 665-672.



DINAMICA E STABILITÀ DELLE FRAZIONI APOLARI DURANTE IL PROCESSO DI COMPOSTAGGIO

Stefano Grego, Enrico Mincione, Danilo Corradini*,
Maurizio Mezzetti

Dipartimento di Agrobiologia ed Agrochimica, Università della Tuscia
Via S. Camillo de Lellis - 01100 Viterbo

* Istituto di Cromatografia, Area della Ricerca del CNR, Monterotondo Scalo, Roma

La frazione organica solubile in differenti solventi organici con polarità crescente è stata studiata durante il processo di compostaggio, seguendo la loro dinamica dal materiale di partenza fino al prodotto finale stabilizzato, con lo scopo di individuare nuovi indici di maturità del compost. Tutte le frazioni apolari durante il processo di compostaggio hanno una riduzione maggiore del 50%. Una parte di questi composti è stata utilizzata dalla microflora come materiale energetico e per svolgere le bio-trasformazioni, e parte è stata trasformata in molecole a reazione unica. Nelle nostre condizioni, comunque, una parte rilevante di materiale apolare (36%) è recuperato alla fine del processo di compostaggio. L'analisi spettroscopica indica un aumento nel prodotto finale di prodotti lipidici, come esteri o acidi e anche di idrocarburi a catena alifatica lunga. Inoltre, esami analitici hanno indicato che alcuni composti presenti nella frazione estratta con diclorometano potrebbero essere utilizzati come indici di processo, in quanto la loro abbondanza e presenza varia durante il processo di biotrasformazione. Conseguentemente, il processo può essere seguito mediante mappatura cromatografica (finger-prints) degli estratti in diclorometano dei campioni raccolti a tempi diversi durante il compostaggio. La presenza di composti stabili, la cui abbondanza non varia con il processo di compostaggio, potrebbe invece, costituire la base per l'analisi quantitativa delle altre molecole organiche biodegradabili, e quindi un fattore di valutazione del grado di umificazione ed in ultima analisi della qualità del compost. Alcune di queste sostanze, quali l'acido ursolico e il β -sitosterolo, sono state individuate mediante analisi HPLC-MS in compost di diversa natura.

Introduzione

Sono definite biomasse tutti i materiali organici, vegetali ed animali, nonché i residui e/o i sottoprodotti organici derivanti dalla loro trasformazione ed utilizzazione. Si possono anche considerare biomasse i resi-

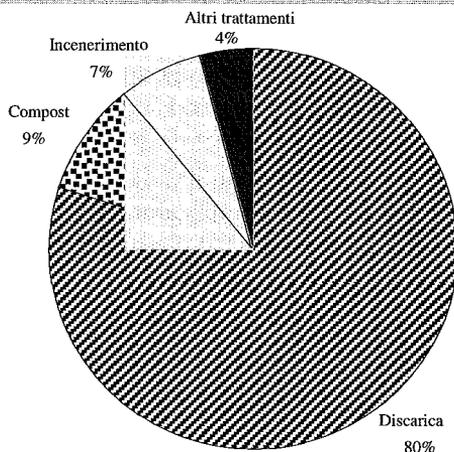
dui prevalentemente organici solidi, semisolidi e liquidi, sia urbani che derivanti da attività industriali. Le biomasse, quando non sono utilizzabili vantaggiosamente, rappresentano un rifiuto; quando, invece, consentono una qualsiasi forma di utilizzazione economica, costituiscono una risorsa di cui l'uomo cerca di recuperare ed accrescere il valore residuo. Con l'urbanizzazione e l'industrializzazione la problematica dei residui investe, oltre che il recupero del loro valore potenziale, anche il loro smaltimento, cioè la loro eliminazione senza però provocare fenomeni d'inquinamento ambientale. Recenti dati indicano come la produzione di rifiuti solidi urbani (RSU) nel nostro Paese ammonta a poco meno di 26 milioni di tonnellate per anno diversamente ripartita al nord, centro e sud (Tabella 1; Viviano, 1998).

Tabella 1: Produzione annua e giornaliera di RSU ripartita nelle diverse zone geografiche d'Italia.

Produzione Totale 10 ⁶ T/anno	Media procapite kg/anno Nord	Media procapite kg/anno Centro	Media procapite kg/anno Sud	Media procapite kg/anno Italia
26	452,6 kg/anno	488,4 kg/anno	431,4 kg/anno	451,7 kg/anno
	1,24 kg/giorno	1,34 kg/giorno	1,18 kg/giorno	1,24 kg/giorno

L'80% dei RSU finiscono in discarica, mentre il restante quantitativo è avviato ad impianti di recupero di materia per la produzione di compost e di combustibile derivato dai rifiuti (CDR) o in impianti di incenerimento o in altri trattamenti (Piccinini, 1999) (Figura 1).

Figura 1: Smaltimento e trattamento dei rifiuti solidi urbani in Italia



In termine di offerta di smaltimento la realtà nazionale risulta essere molto al di sotto della media dei Paesi dell'Unione Europea, attestata intorno al 30%.

Esistono diverse possibilità di utilizzazione dei residui organici; in parte possono essere utilizzati per la produzione di energia termica, sia per combustione diretta che per pirolisi o gassificazione (legno, segatura, paglia); possono essere fermentati per la produzione di etanolo (amido, legno, colture da zucchero); possono essere utilizzati per l'alimentazione del bestiame, spesso dopo pretrattamento (Levi-Minzi e Riffaldi, 1989). Dal punto di vista agronomico è indubbio che i residui organici costituiscono un'importante risorsa in grado di mantenere e reintegrare la fertilità del suolo.

In questi anni, il processo di compostaggio, processo biologico di trasformazione delle matrici organiche di differente origine in un materiale con caratteristiche simili ad un terriccio, si è progressivamente guadagnato un'attenta considerazione dei settori della ricerca e della società civile come metodo per il recupero di sostanza organica da utilizzare in agricoltura. Questo processo porta, attraverso la bioossidazione termofila aerobica della sostanza organica ad opera di microrganismi, alla formazione di un prodotto stabile, il compost, libero da patogeni e che può essere utilizzato come ammendante per il terreno (Haug, 1993). Il compost può essere utilizzato in diversi settori in campo agricolo e forestale ed è in grado di esplicare numerose funzioni positive nel suolo. La conoscenza della dinamica delle biotrasformazioni che la matrice organica subisce durante il processo di compostaggio è di primaria importanza per valutare l'efficacia agronomica, l'impatto ambientale ed il valore economico del compost da utilizzare. Infatti, il materiale prodotto da processi di biotrasformazione incompleti (*compost non maturi*) pongono problemi di emanazione di cattivi odori, annidamento di insetti durante lo stoccaggio, fitotossicità ed inquinamento biologico durante l'uso (Senesi e Brunetti, 1996; Mahur *et al.*, 1993). Il completamento del processo di biotrasformazione che conduce alla produzione di compost maturi può essere valutato mediante lo studio di parametri di diversa natura, come il rapporto C/N (Mathur, 1991), la temperatura e l'odore (Brodie *et al.*, 1994), le variazioni di densità ottica (rapporto E4/E6) (Senesi e Brunetti, 1996), la capacità di scambio cationico (Mathur *et al.*, 1993), l'analisi di composti solubili in acqua e in solventi organici (Saviozzi *et al.*, 1988; Dinel *et al.*, 1996), saggi enzimatici, contenuto di ATP e respirazione (Garcia *et al.*, 1992; Nannipieri *et al.*, 1990), contenuto di sostanze umiche (Sequi e Benedetti, 1995) ed altri. Allo stato attuale delle conoscenze nessuno di questi metodi consente di definire con precisione degli indici di qualità a carattere universale in quanto i processi a cui sono sottoposti i materiali durante il compostaggio sono molto complessi ed influenzati dalla variabilità delle caratteristiche chimico-fisiche delle matrici di partenza.

La nostra ricerca è finalizzata allo studio della trasformazione

dei residui organici che conduce alla sintesi di sostanze non umiche, solubili in solventi apolari. Ciò al fine di individuare composti organici prodotti o trasformati durante il compostaggio da utilizzare come indici di processo e di qualità del prodotto finale. La ricerca è condotta eseguendo campionamenti di materiale organico sottoposto al processo di compostaggio, l'estrazione dei residui organici con diversi solventi a polarità crescente e la valutazione della composizione dei diversi estratti con adeguate tecniche analitiche.

Materiali e metodi

Lo studio è stato svolto su due compost di origine vegetale. Il primo (*compost 1, C1*) è stato ottenuto presso l'Azienda Didattico-Sperimentale della Facoltà di Agraria dell'Università della Tuscia in Viterbo utilizzando sfalci di pratino sottoposti a compostaggio della durata di 100 giorni, con rivoltamento manuale del cumulo e il controllo della temperatura e dell'umidità. Il secondo (*compost 2, C2*) è stato prodotto in un'azienda di compostaggio utilizzando residui vegetali di giardinaggio miscelati con materiale legnoso nel rapporto 8:2, impiegando una procedura di rivoltamento dei cumuli simile a quella da noi eseguita e protratta per 10 mesi (per le procedure e le modalità di compostaggio vedere Mezzetti, 1999).

I *parametri di umificazione* sono stati calcolati come suggerito da Sequi e Benedetti (1995).

Estrazione: Tutti i campioni prelevati a differenti tempi di compostaggio sono stati successivamente sottoposti ad estrazione in continuo a caldo in un apparecchio Soxhlet. Quantitativi diversi di ogni campione umido, pari a 13 g di peso secco, sono stati posti in filtro di cellulosa Whatman ed estratti con 5 solventi a polarità crescente: esano, diclorometano, acetato di etile, metanolo, acqua. Le estrazioni hanno avuto la durata di 7 ore ciascuna utilizzando 220 ml di solvente. Dopo aver allontanato il solvente (rotovapor o liofilizzazione) i prodotti sono stati pesati e conservati a -18°C.

Il *riconoscimento* e la *caratterizzazione* di molecole complesse sono stati eseguiti utilizzando la cromatografia a fasi inverse impiegando un cromatografo liquido per micro-HPLC della Gynkotek munito di rivelatore spettrofotometrico a lunghezza d'onda variabile il cui valore è stato da noi selezionato a 205 nm. Le condizioni sperimentali sono state ottimizzate allo scopo di ottenere la massima risoluzione, ottenuta mediante un gradiente lineare composto da due segmenti di diversa pendenza. Il primo, costituito da un gradiente lineare di acetonitrile in acqua da 20% al 60% (v/v) in 30 mi-

nuti; il secondo da un gradiente lineare da 60% a 100% (v/v) acetonitrile in 40 minuti. La velocità del II flusso di fase mobile di 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ con il quale è stata alimentata la colonna ha consentito l'accoppiamento diretto della colonna allo spettrometro di massa, senza dover utilizzare alcun dispositivo di parzializzazione del flusso. La determinazione della massa molecolare dei composti risolti mediante micro-HPLC è stata eseguita mediante uno spettrometro di massa con sorgente a ionizzazione chimica a pressione ambiente (FINNIGAN TSQ 7000).

Risultati e discussione

I campioni prelevati a tempi diversi di compostaggio sono stati studiati valutando i parametri chimico-fisici riportati in Tabella 2 per essere poi sottoposti ad estrazione in Soxhlet con i diversi solventi.

Tabella 2: Valori di umidità relativa (RH), del rapporto carbonio/azoto, indice di umificazione (IH), tasso di umificazione (HR) e grado di umificazione (DH) dei due compost oggetto dello studio.

TEMPO	RH%	C/N	HI	HR %	DH %
COMPOST 1 (giorni)					
0	84,5	10,4			
16	73,7	12,8			
30	59,6	8,8			
100	39,3	8,5	1,4	37,1	40,3
COMPOST 2 (mesi)					
0	53,1	39,3			
6	47,7	28,7			
10	45,6	19,9	0,29	74,6	77,1

I dati indicano che per entrambi i materiali sottoposti a compostaggio è avvenuto un processo di biotrasformazione che ha comportato la diminuzione del carbonio organico, la perdita di umidità e la sintesi di sostanze umiche. Parallelamente si deduce che il C2 ha raggiunto una maggiore maturazione rispetto al C1.

Al termine del processo di compostaggio il materiale organico estratto totale nel C1 e nel C2 con solventi organici è risultato essere rispettivamente il 42% e il 45% del materiale organico iniziale. Il materiale estratto con acqua è risultato aumentare di 3,5 volte nel C1, mentre è diminuito del 37% nel C2 (Figura 2 e 3).

Questi opposti andamenti dei valori del materiale estratto con acqua sono probabilmente dovuti al diverso grado di maturazione dei due compost che risulta maggiore per il C2 rispetto al C1.

Figura 2: Materiale organico estratto dal *Compost 1* a differenti tempi di compostaggio utilizzando cinque solventi a polarità crescente. I valori riportati sono espressi in mg e sono riferiti a 13 g di peso secco per ogni campione.

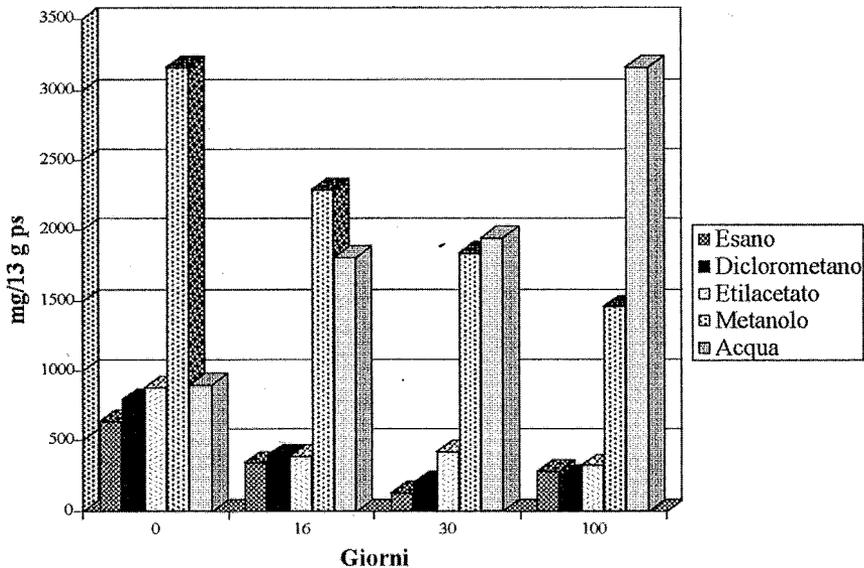
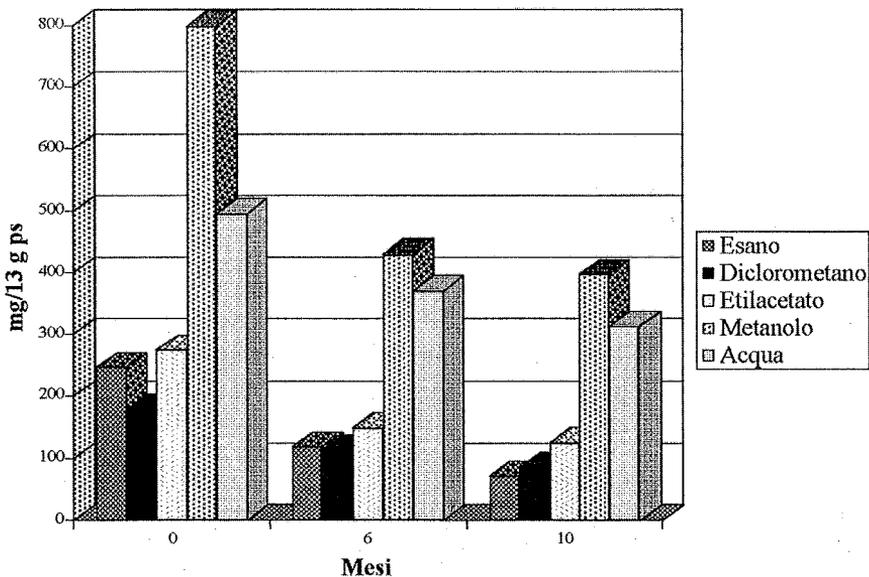


Figura 3: Materiale organico estratto dal *Compost 2* a differenti tempi di compostaggio utilizzando cinque solventi a polarità crescente. I valori riportati sono espressi in mg e sono riferiti a 13 g di peso secco per ogni campione.



Il materiale estratto con i diversi solventi organici è stato successivamente studiato mediante diverse tecniche analitiche quali la spettrometria a risonanza magnetica nucleare (NMR), la gas cromatografia (GC), la cromatografia liquida ad elevate prestazioni a fasi inverse (RP-HPLC) e la spettrometria di massa (MS). I risultati di queste indagini hanno evidenziato che il processo di biotrasformazione determina significative variazioni della composizione della frazione estratta con diclorometano. L'esame dei cromatogrammi rivelati mediante spettrometria UV evidenziano in entrambi i compost una generalizzata diminuzione dei composti meno trattenuti dalla colonna a fasi inverse (composti più polari) con il procedere del processo di compostaggio (Figure 4 e 5 per C1; figura 6 e 7 per C2).

Figura 4: HPLC-MS dell'estratto in diclorometano del C1 all'inizio del processo di compostaggio.

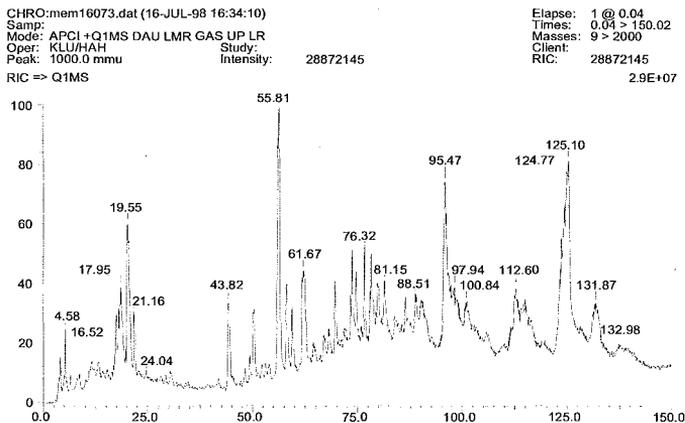


Figura 5: HPLC-MS dell'estratto in diclorometano del C1 dopo 100 giorni di compostaggio.

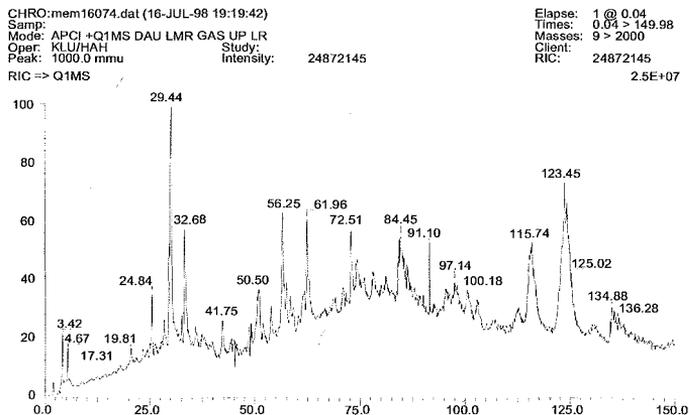


Figura 6: HPLC-MS dell'estratto in diclorometano del C2 all'inizio del processo di compostaggio.

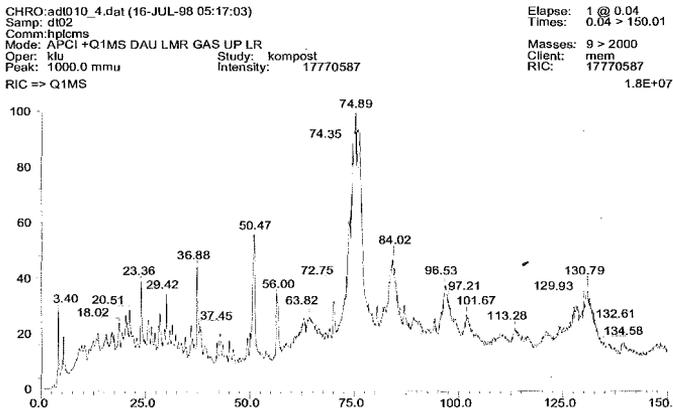
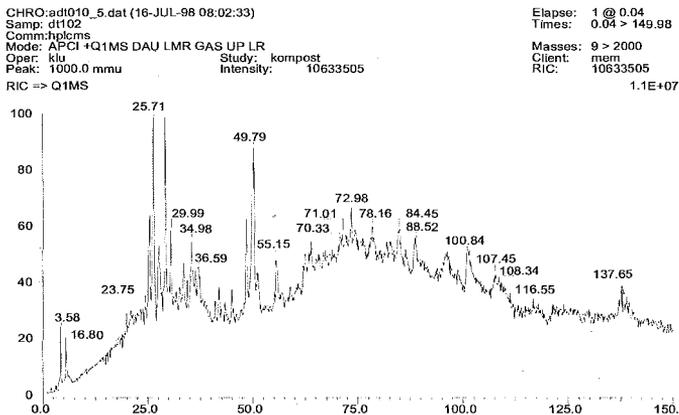


Figura 7: HPLC-MS dell'estratto in diclorometano del C2 al termine del processo di compostaggio.

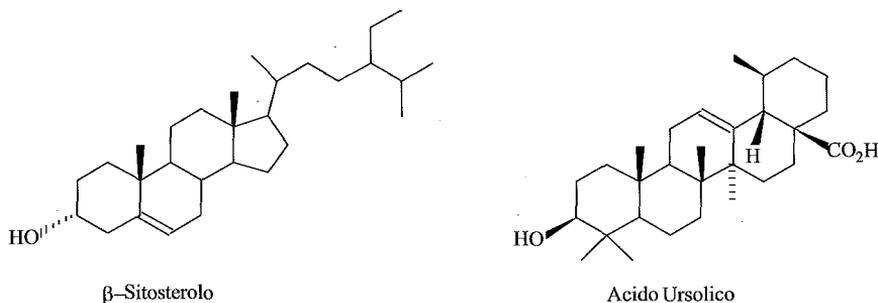


Alcuni di questi composti risultano essere assenti nel prodotto finale. Questo andamento del profilo comatografico è in accordo con l'osservazione che i composti più polari sono soggetti al processo di umificazione che di fatto li sottrae dal prodotto finale estratto dal diclorometano. Per contro, nel prodotto finale si nota la presenza di picchi non rilevati nell'estratto al tempo iniziale. Questi composti eluiscono con tempi di ritenzione circoscritti in un relativamente breve intervallo di tempo. Nel C1 questo intervallo è compreso tra 24 e 32 minuti, mentre nel C2 l'intervallo è tra 25 e

27 minuti. Nell'intervallo 24-32 minuti la concentrazione di acetonitrile è tra 60 e 72%, mentre nell'intervallo tra 25-27 la concentrazione dell'acetonitrile è tra 60 e 64%. Ciò farebbe supporre che i composti neoformati nel C2 siano più apolari di quelli formati nel C1. Per contro, la posizione di questi picchi nel cromatogramma farebbe supporre trattarsi di composti di media polarità. L'analisi degli spettri di massa di questi picchi rivela che in entrambi i composti i composti neoformati hanno masse molecolari comparabili tra 445 e 715. L'accoppiamento in linea della HPLC con la spettrometria di massa (HPLC-MS) ha consentito di individuare alcuni composti che non sembrano subire degradazione durante il processo di compostaggio.

Due composti sembrano essere particolarmente interessanti, il β -sitosterolo e acido ursolico (Figura 8). Queste molecole sono state trovate sia nel materiale iniziale che nel prodotto finale.

Figura 8: Strutture β -Sitosterolo, Acido Ursolico.



I risultati di questa indagine indicano che alcuni composti presenti nella frazione estratta con diclorometano possono essere utilizzati come indici di processo, in quanto la loro abbondanza e presenza varia con il procedere del processo di biotrasformazione. Conseguentemente, il processo può essere seguito mediante mappatura cromatografica (*finger print*) degli estratti in diclorometano dei campioni raccolti ai diversi tempi di compostaggio.

Ringraziamenti

La presente ricerca è co-finanziata con un contributo MURST 40% n° 9807352092

Bibliografia

- DINEL H., SCHNITZER M., DUMONTET S. (1996). Compost maturity: extractable lipids as indicators of organic matter stability. *Compost Science and Utilization*, 4: 6-12.
- GARCIA C., HERNANDEZ T., COSTA F., CECCANTI B., CIARDI C. (1992). Changes in ATP content, enzyme activity and inorganic nitrogen species during composting of organic wastes *Can. J. Soil Sci.* 72: 243-253.
- HAUG R.T. (1993). *The practical handbook of compost engineering*. Lewis Publishers, Boca Raton FL, pp. 1-19.
- LEVI-MINZI R., RIFFALDI R. (1989). Uso e riciclo delle biomasse. In: Sequi P., *Chimica del Suolo*. Patron, pp. 548-566.
- MEZZETTI M. (1999). Riciclaggio e valorizzazione dei residui agroindustriali attraverso metodiche sia biologiche che chimico-fisiche. Tesi di dottorato di Ricerca. Università di Roma "La Sapienza".
- NANNIPIERI P., GREGO S., CECCANTI B. (1990). *Ecological significance of the biological activity in the soil*. Soil Biochem. J.M. Bollag and G. Stotzky (Eds.) 6: 293-355.
- PICCININI S. (1999). La situazione del compostaggio in Italia: panoramica sugli impianti. *Atti dei Seminari di RICICLS 99*. Rimini Fiera, 21-24 Ottobre
- SAVIOZZI A., LEVI-MINZI, RIFFALDI R. (1988). Maturity evolution of organic waste. *BioCycle* 29: 54-56.
- SENESI N., BRUNETTI G. (1996). Chemical and physico-chemical parameters for quality evolution of humic substances produced during composting. In de Bertoldi M., Sequi P., Lemmes B., Papi T. (Eds.) *The Science of Composting*, pp. 195-212.
- SEQUI P., BENEDETTI A. (1995). Management techniques of organic materials in sustainable agriculture. In: Integrated plant nutrition systems. *FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin*, 12: 139-154.
- VIVIANO G. (1998). Aspetti di controllo ambientale nell'incenerimento dei rifiuti. *Atti della "Scuola Nazionale sui Rifiuti"* Assisi, la Cittadella (PG) 27/9-3/10

CENSIMENTO DEI CONCIMI ORGANICI ED ORGANO-MINERALI

Anna Benedetti, Silvia de Bertoldi, Paolo Sequi (*)

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2-4 - 00184 Roma

Come promesso nella giornata di studio tenutasi a Pietrasanta (LU) nel marzo scorso, ove venne presentato il primo censimento effettuato dall'Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti della SISS inerente i concimi a denominazione CE (Supplemento al n. 14, 1999, de L'Informatore Agrario), presentiamo ora il censimento dei concimi organici ed organo-minerali sempre ai sensi della legge nazionale sui fertilizzanti 748/84. A giudicare dal successo che ha riscosso il censimento sui concimi a denominazione CE, ci siamo resi conto che effettivamente mancava una catalogazione dei prodotti presenti sul mercato a livello nazionale, secondo quanto stabilito dalla legge 748/84. Non poche richieste sono altresì giunte alla Segreteria dell'Osservatorio, da parte di singoli utenti e dai Servizi di Sviluppo Agricolo Regionali, circa il completamento del censimento per le altre categorie di fertilizzanti, ivi compresi gli ammendanti ed i correttivi.

Per realizzare un censimento su ammendanti e correttivi, l'Osservatorio avrà sicuramente bisogno di un tempo maggiore di quello intercorso tra il censimento dei concimi CE e quello degli organici ed organo-minerali, in quanto esiste una grande multiformità di prodotti e ne vengono immessi continuamente di nuovi sul mercato nazionale, cosicché l'organizzazione di una catalogazione si presenta piuttosto difficoltosa. Altro problema di non facile soluzione circa gli ammendanti riguarda ad esempio la categoria prevista dalla *Legge 748/84 Allegato 1C punto 2.3 "Ammendanti e correttivi diversi"*. Questa categoria di ammendanti raccoglie infatti prodotti fertilizzanti delle tipologie più disparate che vanno dagli idrolizzati proteici alle resine ecc., che stando alle definizioni di ammendante e concime data dalla legge, sono inseriti lì come in un vaso di Pandora, creando non pochi dubbi interpretativi.

*Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti - Gruppo N. 1

Definizioni ai sensi della legge 748/84

Ammendante e correttivo: Per ammendante e correttivo si intende qualsiasi sostanza, naturale o sintetica, minerale od organica, capace di modificare e migliorare le proprietà e le caratteristiche chimiche, fisiche, biologiche e meccaniche di un terreno.

Concime: Per concime si intende qualsiasi sostanza, naturale o sintetica, minerale od organica, idonea a fornire alle colture l'elemento o gli elementi chimici della fertilità a queste necessarie per lo svolgimento del loro ciclo vegetativo e produttivo, secondo le forme e le solubilità prescritte dalla presente legge.

Purtroppo il rigore delle due definizioni sopra riportate, utilissime per alcuni versi (siamo infatti uno dei pochi paesi in Europa ad avere ben chiara la differente funzione di una concimazione organica rispetto ad un ammendamento), costituisce certamente un ostacolo alla corretta classificazione dei nuovi prodotti non previsti nel lontano 1984 quando venne emanata la legge. Come poter dare allora il giusto spazio all'innovazione tecnologica in materia di fertilizzanti? Certamente il percorso più logico sarebbe stato quello di una modifica dell'articolo della legge 748/84, ma non il più rapido, lasciando in un vuoto legislativo spazio libero alla fioritura di frodi e di prodotti di scarsa qualità, con nocumento non solo degli utenti ma anche degli stessi produttori. Questo ha comportato la scelta obbligatoria, in attesa di una revisione della legge, di regolare in un allegato che si potrebbe definire "miscelanea tecnologica" tutti quei prodotti che si trovano a cavallo tra concimi ed ammendanti, oppure sono concimi con proprietà particolari e quindi a basso titolo, ma che comunque aumentano la fertilità del suolo. Un esempio forse riuscirà a chiarire la situazione: prendiamo il caso dei prodotti definiti commercialmente "Biostimolanti" (Prodotti caratterizzati da diversa azione e modalità d'uso che contribuiscono a migliorare lo sviluppo delle specie vegetali coltivate).

I prodotti biostimolanti hanno trovato un notevole sviluppo sul mercato in questi ultimi cinque anni, anche se esplicitamente tale funzione non è contemplata dalla legislazione nazionale, tanto che non è ancora possibile controllare la reale validità agronomica di tutti i prodotti. Nonostante questo, basta entrare in un consorzio agricolo per trovare moltissimi prodotti ad azione biostimolante. Ora andiamo a vedere in legge dove può essere catalogato un tale prodotto. La risposta più logica sarebbe tra i concimi, ma se viene dato a dosi massicce, perde la proprietà biostimolante e quindi è un concime e non un biostimolante. Allora proviamo a collocarlo tra gli ammen-

danti; anche qui si genera confusione. Come si può pensare ad un ammendamento del suolo se il trattamento per essere efficace deve essere fogliare?

Un altro problema che abbiamo incontrato sia nel censimento dei concimi CE sia in quello dei concimi Nazionali, è stato trovare una collocazione per quei prodotti che presentano un contenuto espressamente dichiarato di acidi umici, ma con caratteristiche di concimi minerali, organici o organo-minerali. Non potendoli collocare in questi gruppi, né tantomeno tra gli ammendanti organici naturali dove si trova la voce "Estratti umici", ci riserviamo di pubblicarne una lista a parte in occasione della prossima pubblicazione del censimento degli *Ammendanti e correttivi*, in attesa di una più idonea collocazione nella legge 748/84.

Questi argomenti certamente provocatori sottolineano l'esigenza di un rimpasto della legge nazionale sui fertilizzanti e ci auguriamo di avere reso piuttosto evidente la difficoltà di procedere ad un censimento e ad una catalogazione ai sensi della legge di prodotti tanto diversi senza perdere in razionalità e correttezza scientifica.

Dopo questo primo sforzo prodotto dall'Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti, certamente verrà effettuato il censimento degli ammendanti, ma non è possibile oggi dare una scadenza realistica per la sua divulgazione.

Attualmente l'Osservatorio è impegnato nella realizzazione di un glossario sui fertilizzanti, altro argomento richiesto *corum populo* nel convegno di Pietrasanta, che speriamo invece di pubblicare in occasione della seconda giornata di studio dell'Osservatorio, programmata per il marzo 2000.

Infine vogliamo qui ringraziare, quali soci SISS promotori dell'Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti, L'Informatore Agrario per aver dato voce al lavoro dell'Osservatorio e reso fruibile dal grande pubblico il censimento dei fertilizzanti a denominazione CE, organici ed organo-minerali. Un particolare ringraziamento sentiamo di doverlo a tutte le Ditte che hanno aderito al censimento; ad Assofertilizzanti per aver garantito gli indispensabili contatti tra l'Osservatorio e l'Industria. Ultime, ma non ultime per importanza del lavoro svolto, il nostro grazie va alle Dott.sse Silvia de Bertoldi e Silvia Dell'Orco dell'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante di Roma, che con la costanza e la pazienza di frati certosini, ma con le conoscenze scientifiche di studiosi della scienza del suolo hanno interpretato ogni singola scheda di censimento (più di 2000!) organizzando e rendendo organiche le informazioni raccolte.

La segreteria dell'Osservatorio sarà ben lieta di raccogliere sug-

gerimenti migliorativi del lavoro svolto, invitando tutte le Ditte, che per motivi certamente non voluti siano rimaste escluse dal censimento, a produrre le loro schede oppure a segnalare eventuali errori riscontrati per un aggiornamento del lavoro svolto nel corso del 1999.

Segreteria Osservatorio:

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante

Via della Navicella 2-4, 00184 Roma.

Tel. 06.7000720/ 06.7008721 Fax. 06.7005711

e-mail: nutrazotata@isnp.it

(Dr.ssa Anna Benedetti

Presidente IV commissione SISS)

e-mail: psequi@uni.net psequi@uni.net

(Prof. Paolo Sequi, presidente SISS)

LA DISTRIBUZIONE DEI FERTILIZZANTI IN ITALIA

Mario Adua (*)

Istituto Nazionale di Statistica
Via Adolfo Ravà, 150 - 00142 ROMA

1. Introduzione

L'agricoltura attraversa una complessa fase di trasformazione e ridefinizione del proprio ruolo socio-economico nell'attuale contesto nazionale ed internazionale: l'aumento della produzione agricola non è più il fine ultimo delle pratiche agronomiche in quanto acquistano sempre più rilievo problematiche relativamente recenti, quali la salvaguardia ambientale, l'agricoltura sostenibile o ecocompatibile, la difesa idrogeologica, la biodiversità, la qualità della vita, la presenza dell'uomo sul territorio, ecc.

Nell'ambito delle differenti funzioni specifiche che l'agricoltura va acquisendo e svolgendo a favore della società e di un generale miglioramento della qualità della vita, la distribuzione e l'impiego dei mezzi di produzione si caricano di nuovi e più salienti significati economico-sociali e demografico-ambientali.

L'obiettivo del presente lavoro è quello di descrivere l'utilizzo dei fitofarmaci, mangimi, sementi e concimi in agricoltura, mediante i risultati delle specifiche indagini condotte dall'Istituto nazionale di statistica (ISTAT).

La presente relazione si suddivide in due parti:

- la prima parte costituisce un contributo alla conoscenza delle indagini eseguite annualmente in maniera esaustiva, sulla distribuzione provinciale dei principali mezzi di produzione impiegati dagli agricoltori;
- la seconda parte si sofferma, più in dettaglio nell'esaminare la rilevazione sulla distribuzione, per uso agricolo, dei fertilizzanti.

2. Indagini sui mezzi di produzione

Le principali finalità perseguite dall'ISTAT con le indagini sui mezzi di produzione possono essere così sintetizzate:

*Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti – Gruppo N. 2

- seguire, nel tempo, l'evoluzione dei fenomeni indagati, aumentando, laddove possibile, sia la quantità che la qualità delle notizie rilevate;
- raccogliere elementi utili alla Contabilità nazionale per il calcolo dei costi di produzione, nell'elaborazione del conto economico dell'agricoltura;
- diffondere dati disaggregati a livello di provincia per specifici gruppi di prodotti e di principi attivi distribuiti;
- predisporre indici, indicatori e serie storiche relative all'impiego dei mezzi di produzione, nell'ambito complessivo della filiera agro-industriale ed agro-alimentare;
- verificare la congruità, all'interno del Sistema delle statistiche agricole, dei dati sulle coltivazioni e sugli allevamenti rilevati con altre indagini svolte dall'ISTAT in collaborazione con le Regioni;
- disporre di elementi di base necessari per analisi ambientali e territoriali su inquinamento, salubrità delle acque, qualità della vita ecc.;
- fornire informazioni utili alle diverse figure economiche e sociali interessate, nonché ai ricercatori ed ai decisori pubblici impegnati nella regolamentazione e controllo del settore;
- colloquiare con altre Istituzioni ed Enti di ricerca, sia nazionali che internazionali, per migliorare l'impianto delle singole rilevazioni e la fruibilità dei risultati conseguiti.

L'evoluzione del concetto di agricoltura (la produzione non è più l'unico fine) e dell'esecuzione delle pratiche agricole (rivolte sempre più ad un diverso rapporto con l'ambiente) accrescono le aspettative degli utilizzatori sulla rilevazione di fitofarmaci, mangimi, sementi e concimi, in particolare per:

- la valutazione del rapporto costi-benefici a carico delle diverse categorie economiche coinvolte;
- i risvolti in termini di occupati ed investimenti, sia diretti che indiretti, nell'agro-industria;
- la tutela del territorio e la salvaguardia dell'ambiente;
- la biodiversità e le produzioni ecocompatibili e biologiche;
- la salubrità delle acque e delle derrate alimentari;
- la salute dell'uomo e la qualità della vita.

Nell'ottica di una maggiore attenzione alla qualità globale, si ri-

chiede alla statistica ufficiale di evidenziare con crescente tempestività, efficienza e precisione l'andamento del settore, per poter fornire dati scientifici attendibili e aggiornati sempre più indispensabili per un armonico sviluppo dei mezzi di produzione e per un rigoroso controllo di sostanze chimiche che, spesso, interagiscono significativamente con il substrato agricolo.

Pertanto, le indagini ISTAT rappresentano un contributo significativo al monitoraggio di un settore strategico che ha ripercussioni quotidiane su ciascuno di noi e sull'ambiente che ci circonda.

3. Rilevazione sulla distribuzione, per uso agricolo, dei concimi

La rilevazione sulla distribuzione, per uso agricolo, dei concimi è regolata dalla normativa vigente, è compresa nel Programma statistico nazionale (PSN), ove è catalogata con la sigla IST-167, ed ha cadenza annuale; l'indagine è esaustiva e si svolge mediante autocompilazione dei modelli di rilevazione inoltrati per via postale; le unità di rilevazione sono costituite da tutte le imprese che, indipendentemente dall'essere produttori, esportatori e/o importatori di concimi, distribuiscono fertilizzanti, con il proprio marchio, sul territorio nazionale.

Lo scopo dell'indagine è la rilevazione delle quantità di fertilizzanti, distinti in concimi, ammendanti, correttivi e deiezioni animali, distribuiti, per uso agricolo, nelle singole province durante l'anno di riferimento.

La distribuzione per uso agricolo comprende soltanto i quantitativi destinati agli agricoltori ed ai commercianti, compresi i Consorzi agrari; debbono essere quindi escluse le distribuzioni effettuate per uso diverso da quello agricolo quali, ad esempio, le quantità fornite alle industrie, i prodotti esportati, ecc.

Per l'edizione 1998 dell'indagine, oltre ai concimi minerali ed organo-minerali, si sono rilevati anche i fertilizzanti organici, gli ammendanti, i correttivi e le deiezioni animali.

Attualmente, l'ISTAT sta provvedendo a rivedere la classificazione dei fertilizzanti, sempre sulla base della legislazione vigente, in collaborazione con l'Osservatorio nazionale permanente per i fertilizzanti.

La legge 748/84 distingue i fertilizzanti in due principali categorie, i concimi e gli ammendanti e correttivi, e stabilisce che i concimi devono contenere titoli minimi in elementi fertilizzanti, mentre gli ammendan-

ti e correttivi devono presentare titoli minimi non in elementi fertilizzanti bensì in sostanza organica.

La classificazione utilizzata per il 1998 applica le indicazioni contenute nella legge, ma si è ritenuto opportuno considerare una terza categoria di fertilizzanti, le deiezioni animali, in quanto utilizzabili, a seconda del trattamento subito, sia come concimi organici che come ammendanti.

Per fertilizzante si intende qualsiasi sostanza che, per il suo contenuto in elementi nutritivi e/o per le sue peculiari caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche, contribuisce al miglioramento della fertilità del terreno agrario, al nutrimento delle specie vegetali coltivate o, comunque, ad un loro migliore sviluppo.

La classificazione e le definizioni adottate sono le seguenti:

- **concimi**, sono quelle sostanze naturali o sintetiche, minerali od organiche, idonee a fornire alle colture uno o più degli elementi chimici della fertilità. I concimi possono essere commercializzati in forma sia solida (granuli, polveri, pellettati) che fluida. Nella categoria dei concimi sono compresi i prodotti minerali, organo-minerali, organici e specialistici che, a loro volta, sono distinti in semplici e composti a seconda del contenuto di un solo elemento o di combinazioni fra più elementi fertilizzanti;
- **concimi minerali**, sono quei prodotti che contengono uno solo o combinazioni, secondo vari rapporti, degli elementi chimici principali della fertilità. I prodotti minerali semplici sono distinti in: azotati, potassici e fosfatici; quelli minerali composti sono suddivisi in binari (azoto-potassici, azoto-fosfatici e fosfo-potassici) ed in ternari (azoto-fosfo-potassici);
- **concimi organo-minerali**, riuniscono formulati ottenuti per reazione o miscela di uno o più concimi organici con uno o più concimi minerali semplici oppure composti. I concimi organo-minerali semplici comprendono soltanto gli azotati mentre quelli composti raggruppano sia i binari che i ternari;
- **concimi organici**, sono quei prodotti formati da composti organici del carbonio di origine animale oppure vegetale, legati chimicamente in forma organica agli elementi principali della fertilità. I concimi organici semplici comprendono soltanto gli azotati, mentre quelli composti riuniscono i binari azoto-fosfatici;
- **concimi specialistici**, raggruppano quei formulati che, per le loro caratteristiche, vengono utilizzati in condizioni particolari del terreno e

della vegetazione. I concimi specialistici semplici comprendono soltanto gli azotati, mentre quelli composti raggruppano i binari (azoto-potassici, azoto-fosfatici) ed i ternari (azoto-fosfo-potassici). Nei concimi specialistici, oltre ai semplici ed ai composti, rientrano anche quei prodotti a base di microelementi distinti dall'essere a base minerale (quando i microelementi sono in forma libera) o sotto forma di chelati (quando i microelementi sono legati all'agente chelante);

- **ammendanti e correttivi**, comprendono qualsiasi sostanza, naturale o sintetica, minerale od organica, in grado di modificare e migliorare le proprietà e le caratteristiche chimiche, fisiche, biologiche e meccaniche di un terreno. La categoria è classificata distinguendo gli ammendanti dai correttivi. Per correttivi si intendono i fertilizzanti a base di calcio, magnesio o zolfo ed altri elementi correttivi;
- **deiezioni animali**, riuniscono quei prodotti di derivazione animale che, in base al trattamento subito, possono essere utilizzati sia come ammendanti che come concimi. Le deiezioni vanno comprese fra i concimi quando hanno subito un trattamento industriale e devono contenere titoli minimi in elementi fertilizzanti, mentre sono considerate ammendanti quando provengono da un procedimento diverso e devono contenere titoli minimi in sostanza organica. Le deiezioni animali semplici comprendono soltanto le azotate, mentre quelle composte raggruppano le binarie azoto-fosfatiche.

I modelli di rilevazione utilizzati sono tre e precisamente:

- **Modello A 43.1** per i concimi minerali, organo-minerali e specialistici. Il modello riporta i tre elementi fondamentali di cui deve essere specificato il titolo in azoto (nitrico, ammoniacale, cianamidico, ureico e organico), in anidride fosforica (solubile e insolubile) ed in ossido potassico;

- **Modello A 43.2** per i concimi organici. Il modello riporta i tre elementi fondamentali di cui deve essere specificato il titolo in azoto (organico e totale), in anidride fosforica (solubile e insolubile) ed in ossido potassico;

- **Modello A. 43.3** per gli ammendanti o correttivi e per le deiezioni animali. Il modello riporta gli elementi fondamentali delle deiezioni, quando assumono le caratteristiche dei concimi, di cui deve essere specificato soltanto il titolo in azoto (organico e totale) ed in anidride fosforica. Mentre per gli ammendanti o correttivi non deve essere, come ovvio, compilata la parte relativa al titolo, per le deiezioni animali occorre indicare se si tratta di ammendanti o concimi e compilare la parte relativa al titolo soltanto se si tratta di concimi.

Le informazioni rilevate sono le seguenti:

- **denominazione del concime**, va riportata secondo le diciture indicate nella classificazione ufficiale (esempio calciocianamide, solfato potassico ecc.);

- **provenienza**, va specificato se il prodotto è di origine nazionale o di importazione;

- **titolo del concime**, vanno indicate le percentuali di ciascun elemento fertilizzante contenuto, con due cifre intere e due decimali. Per anidride fosforica solubile va intesa la somma di quella solubile in acqua più quella solubile in citrato ammonico; pertanto la differenza tra anidride fosforica totale e quella solubile, va indicata come insolubile;

- **codice**, rappresenta il numero di codifica del concime riportato nella classificazione utilizzata;

- **quantità distribuite per provincia**, i dati richiesti debbono fare riferimento alla distribuzione, per uso agricolo, effettuata nelle singole province dall'insieme degli stabilimenti o depositi gestiti da una medesima ditta. I valori devono essere riportati in quintali. Qualora i prodotti, ad esempio quelli commercializzati in forma fluida, presentassero unità di misura diversa occorre che sia effettuata una conversione in quintali;

- **notizie sull'andamento della distribuzione**, comprendono brevi informazioni atte a chiarire l'andamento del fenomeno rilevato durante l'anno considerato.

Per le imprese coinvolte nella rilevazione, è possibile inviare i dati richiesti anche per via informatica; diverse ditte medio-grandi già utilizzano tale sistema che consente di accorciare i tempi e di risparmiare energie.

I dati raccolti nell'ambito della presente indagine, compresa nel Programma statistico nazionale approvato con il D.P.C.M. del 18 febbraio 1999 (pubblicato nel Supplemento ordinario alla G.U. n. 89 del 17 aprile 1999), sono tutelati dal segreto statistico e sottoposti alle regole stabilite, a tutela della riservatezza, dalla legge n. 675/96 (art.1, finalità e definizioni; 8, responsabile; 10, informazioni rese al momento della raccolta; 13, diritti dell'interessato), e successive modifiche e integrazioni. Essi possono essere esternati solo in forma aggregata, in modo che non se né possa fare alcun riferimento individuale; possono essere utilizzati solo per scopi statistici (art. 9 D.lg. 6 settembre 1989 n. 322, come modificato dall'art. 12, comma 4 del D.lg. n. 281/99).

E' fatto obbligo alle amministrazioni, enti ed organismi pubbli-

ci, nonché ai soggetti privati, per le rilevazioni indicate nel D.P.R. 5 luglio 1999 (G.U. 19 agosto 1999, n. 194, SG) di fornire tutti i dati e le notizie richieste nel modello di rilevazione. Coloro che non li forniscono, o li forniscono scientemente errati od incompleti sono soggetti alle previste sanzioni amministrative (artt. 7 e 11 del citato D.lg. n. 322/89 come modificato dal D.lg. n. 281/99).

I risultati vengono divulgati a livello di Provincia, Regione e totale Italia, in forma anonima ed aggregata, mediante le principali pubblicazioni ISTAT (Statistiche dell'Agricoltura, Informazioni, Annuario Statistico Italiano, ecc.).

E' possibile, nel rispetto della normativa vigente, richiedere apposite elaborazioni particolari per tipo di prodotto e per Provincia, con diversi incroci di modalità.

4. Principali risultati relativi al 1997

Attualmente, è in corso l'allestimento dell'indagine sui concimi relativi al 1999; contemporaneamente si stanno ultimando le elaborazioni dei risultati finali relativi al 1998.

Le ultime elaborazioni statistiche pubblicate fanno riferimento al 1997; è possibile commentare brevemente i principali risultati riportati nelle tavole riepilogative, relative ai fertilizzanti minerali ed organo-minerali, contenute nella presente relazione (*vedi Allegato statistico*).

In base all'andamento del mercato, alle normali pratiche agronomiche ed alle giacenze e scorte delle aziende agricole, si può ritenere che, annualmente, le quantità distribuite di fertilizzanti corrispondano a quelle effettivamente utilizzate dagli agricoltori e che, pertanto, il terreno agrario concimabile abbia ricevuto, a livello provinciale e regionale, le quantità rilevate dall'indagine.

Analizzando i principali risultati conseguiti nel 1997 rispetto all'anno precedente, si evidenzia per i concimi minerali, saliti da 38,0 a 41,5 milioni di quintali, un aumento complessivo pari al 9,2%; i concimi organo-minerali sono passati da 2,8 a 3,3 milioni di quintali, conseguendo un incremento del 15,2%.

All'aumento dei concimi minerali ha contribuito in maniera prevalente la distribuzione al consumo dei prodotti minerali semplici azotati (16% in più rispetto al 1996); il dato nazionale risulta di poco superiore al-

la media conseguita dalle regioni meridionali.

I concimi binari e ternari (16,2 milioni di quintali distribuiti) sono cresciuti soltanto dell'1,5% rispetto al 1996: l'aumento contenuto dei concimi composti è la risultante di variazioni positive per quei prodotti che contengono come elemento fertilizzante l'azoto, a cui si contrappone la diminuzione dei formulati binari fosfo-potassici.

A livello territoriale e per il complesso dei concimi, minerali ed organo-minerali, pari a 44,8 milioni di quintali distribuiti, si osserva che i 2/3 dei prodotti sono immessi al consumo nelle regioni del Centro-Nord; a livello regionale, il maggior ricorso ai concimi minerali si ha in Emilia Romagna, Lombardia, Veneto e Puglia, ove è concentrata una quota rilevante della distribuzione nazionale (pari al 47,2%).

Attraverso l'indagine sui concimi vengono rilevati anche i quantitativi dei singoli elementi fertilizzanti distribuiti.

I principali elementi fertilizzanti dei concimi minerali ed organo minerali considerati sono l'azoto, l'anidride fosforica e l'ossido potassico:

- dell'azoto viene rilevato il titolo in azoto nitrico, ammoniacale, ammidico ed organico;
- dell'anidride fosforica viene considerato il titolo in anidride fosforica solubile e insolubile;
- dell'ossido potassico viene valutato il titolo in ossido potassico.

L'ammontare complessivo di elementi fertilizzanti distribuiti ha raggiunto, nel 1997, i 17,6 milioni di quintali aumentando, rispetto all'anno precedente, dell'8,6%.

In particolare, la quantità di azoto utilizzato è pari a 8,6 milioni di quintali, con un aumento del 13,2% rispetto al quantitativo distribuito nel 1996; l'anidride fosforica (5,6 milioni di quintali) e l'ossido potassico (3,5 milioni di quintali) risultano, nel 1997, aumentati entrambi del 5,4% rispetto all'anno precedente.

La percentuale di azoto è pari al 24,3% delle quantità totali distribuite di concimi minerali azotati, sia semplici che composti ed al 9,4% di quelli organo-minerali.

La quota di anidride fosforica è pari al 35,5% del quantitativo complessivo distribuito di concimi minerali fosfatici, sia semplici che composti, mentre raggiunge l'11,1% nei concimi organo-minerali.

La percentuale di ossido potassico risulta pari al 25,3% delle

quantità totali distribuite di concimi minerali potassici, sia semplici che composti, mentre scende al 9,0% nei concimi organo-minerali.

L'esame delle quantità totali di elementi fertilizzanti, per tipo di concime e titolo in azoto, anidride fosforica ed ossido potassico, mette in evidenza importanti caratteristiche dei diversi gruppi di prodotti distribuiti.

L'azoto ammoniacale, presente in misura maggiore nei concimi azoto-fosfatici e nel nitrato ammonico (rispettivamente 1,1 ed 1,0 milioni di quintali), raggiunge i 3,7 milioni di quintali; l'azoto ammidico, che ammonta a 3,4 milioni di quintali, è contenuto al 97% nell'urea agricola, mentre l'azoto organico, presente nei concimi organo-minerali, è inferiore ai 50 mila quintali.

L'anidride fosforica è concentrata prevalentemente nei concimi minerali composti azoto-fosfatici (2,6 milioni di quintali), nei composti ternari (1,4 milioni di quintali) e nei perfosfati minerali (1,2 milioni di quintali) ed è di tipo solubile per una quota pari al 96%.

L'ossido potassico è maggiormente presente nei concimi minerali ternari (1,7 milioni di quintali) e nel cloruro potassico (1 milione di quintali).

A livello territoriale, le regioni che utilizzano maggiormente l'azoto come elemento fertilizzante sono la Lombardia e l'Emilia Romagna che superano il milione di quintali; l'anidride fosforica è prevalentemente consumata nel Veneto (783 mila quintali) ed in Emilia Romagna (quasi 650 mila quintali); l'ossido potassico, invece, viene distribuito principalmente nel Veneto (689 mila quintali) ed in Lombardia (671 mila quintali).

La quantità di azoto utilizzata nel 1997 su di un ettaro di superficie concimabile è risultata pari, a livello nazionale, a circa 82 chilogrammi, con un aumento rispetto all'anno precedente dell'8,3%; per l'anidride fosforica e l'ossido potassico, rispettivamente 54 e 33 chilogrammi, l'aumento rispetto all'anno precedente ha raggiunto appena lo 0,7%.

Esaminando i dati regionali, è possibile rilevare l'estrema variabilità della presenza di elementi fertilizzanti contenuti nei concimi minerali per ettaro di superficie concimabile; in particolare si evidenzia che:

- per l'azoto, si passa da 157 kg. ad ettaro calcolati per la Lombardia, a 4 kg. per la Valle d'Aosta;

- per l'anidride fosforica, il valore massimo, pari a 92 kg., si riscontra in Veneto, mentre quello minimo, pari a 4 kg., è relativo alla Valle d'Aosta;

- per l'ossido potassico, a fronte di 98 kg. riscontrati per il Veneto, si scende a 5 kg. calcolati per la Sardegna.

5. Problematiche e prospettive

Quantunque l'indagine vanti una lunga tradizione ed un impianto ben congeniato ed aggiornato, restano aperte numerose problematiche.

A livello commerciale, i prodotti distribuiti sono estremamente numerosi; ciò determina spesso difficoltà per le stesse ditte produttrici e/o distributrici, sia nell'esatta ottemperanza alla legislazione vigente, che nella corretta classificazione e precisa titolazione dei fertilizzanti. Si ritiene, pertanto, importante che l'Associazione di categoria e l'Osservatorio nazionale permanente sui fertilizzanti proseguano nella meritoria azione di informazione e supporto tecnico alle aziende; in tal senso, il recente Censimento dei fertilizzanti curato dall'Osservatorio rappresenta un contributo essenziale per una migliore conoscenza del settore e, di conseguenza, per l'ottenimento di più precisi dati statistici.

Alla base dell'indagine ISTAT, vi è il mantenimento, la revisione e l'aggiornamento dell'archivio delle ditte distributrici; non potendo ancora disporre di un albo ufficiale, sono necessari continui sforzi investigativi per l'aggiornamento dello schedario. Si auspica, in collaborazione con i Ministeri e le Istituzioni pubbliche e private interessate, il superamento di tale situazione, onde evitare che talune imprese possano sfuggire alla rilevazione.

Il tasso di risposta dei rispondenti è molto elevato e pari mediamente al 90%; agli inadempienti vengono inviati ripetuti solleciti per via postale e telefonica. Quantunque si cerchi di instaurare un rapporto diretto e personale fra ISTAT e singola impresa, talvolta le ditte non inviano i dati richiesti, oppure li forniscono in forma troppo aggregata o con notevole ritardo, con conseguente slittamento delle tempistiche previste che si riflettono sul ritardo nella diffusione dei risultati. E' necessaria la massima concertazione possibile, per svolgere una decisa azione di pressing volta a far comprendere alle imprese l'importanza sociale, il valore economico e la necessità inderogabile di adempiere all'obbligo statistico previsto dalla legge.

La legislazione corrente, per quanto unanimemente considerata una delle migliori al mondo, presenta talune zone d'ombra e lacune che non consentono sempre né la corretta classificazione di ogni singolo prodotto commercializzato, né la determinazione dell'esatto titolo del formulato. Si auspica che, almeno nel Regolamento di attuazione, la normativa possa essere celermente aggiornata per rispondere meglio sia alle esigenze delle varie componenti della filiera fertilizzanti, che ad un miglioramento nel controllo e repressione delle frodi, nonché nella rilevazione statistica del settore.

I dati mancanti, a causa dell'inadempienza di taluni rispondenti, vengono integrati in base sia alle tendenze provinciali sulla distribuzione di prodotti simili, che alle informazioni rilevate, per la medesima ditta, l'anno precedente. Sono in corso studi ed elaborazioni per perfezionare la metodologia di integrazione dei dati mancanti e/o palesemente errati.

Per migliorare il rapporto con i rispondenti, è altresì allo studio, così come avviene per altre indagini agricole, una forma di ritorno tempestivo delle informazioni rilevate alle imprese intervistate.

La collaborazione con l'Associazione di categoria e con l'Osservatorio va ulteriormente incrementata per meglio rispondere alle esigenze conoscitive sui fertilizzanti. A tale attività, si intende dare maggior risalto ed impegno; si ritiene che l'Osservatorio sia la sede naturale più adatta per l'espletamento di una azione sinergica.

L'ISTAT sta cercando di ridurre le tempistiche dell'indagine per abbreviare i tempi di lavorazione, in modo da diffondere rapidamente i risultati conseguiti. Si stanno sperimentando forme nuove per una più efficace diffusione e fruibilità in modo da consentire l'utilizzo dei dati ad un pubblico più vasto; anche in tale ambito si è attenti ad eventuali consigli e collaborazioni.

Infine, si ravvisa anche l'importanza di maggiori confronti internazionali e di ulteriori contributi ed analisi sull'evoluzione del settore, anche in relazione alla maggiore attenzione sociale per la salvaguardia ambientale e per una più attenta tutela della qualità della vita.

6. Considerazioni conclusive

In conclusione, si ritiene che la rilevazione sulla distribuzione, per uso agricolo, dei concimi rappresenti un esempio di servizio pubblico concreto, svolto nell'interesse generale dei cittadini e degli utenti specifici (produttori, distributori, agricoltori, ricercatori scientifici e decisori pubblici nazionali e locali).

La crescente attenzione alle problematiche relative all'ambiente, al territorio ed alla più generale qualità della vita caricano l'indagine di nuove e significative valenze economico-sociali e demografico-ambientali.

L'evoluzione delle politiche agrarie comunitarie e l'impulso per lo sviluppo e la regolamentazione delle produzioni ecocompatibili, biologiche e di qualità (prodotti a Denominazione di origine protetta ed a

Indicazione geografica protetta) richiedono all'indagine una sempre maggiore precisione, tempestività e disaggregazione dei risultati per singoli principi attivi e per piccole aree.

L'impegno dell'ISTAT, per il breve e medio periodo, è quello di rispondere alle accresciute esigenze informative della società civile e del mondo rurale sia dando maggiore impulso alla rilevazione e alla fruibilità dei risultati conseguiti, che incrementando la collaborazione con gli imprenditori ed i tecnici impegnati nella filiera fertilizzanti.

7. Bibliografia

ISTAT (1999) - *Statistiche dell'agricoltura* - Anno 1996, Istat, Roma.

ISTAT (2000) - *Statistiche dell'agricoltura* - Anno 1997, Istat, Roma.

Legge (1984) - Legge n. 748 del 19 ottobre 1984, Nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti, *Gazzetta Ufficiale*, Roma.

S.I.S.S (1999) - *Bollettino* n. 4 (Vol. 48, 1999) - S.I.S.S., Roma.

8. Allegato e Tavole statistiche ⇒

CLASSIFICAZIONE DEI FERTILIZZANTI ANNO 1999

CO DI CE	CATEGORIA	CODICE	DENOMINAZIONE PRODOTTO	TITOLO MINIMO IN ELEMENTI FERTILIZZANTI (percentuale in peso)	
				STATO SOLIDO	STADIO FLUIDO
1000	CONCIMI				
1100	CONCIMI MINERALI				
1110	Semplici				
1111	Azotati				
		111101	Calciocianamide	18% N tot. di cui 3/4 cianamidico	-
		111102	Nitrato ammonico	20% N tot. tra nitrico e ammoniacale	-
		111103	Nitrato di calcio	15% N tot. tra nitric. e am. titolo max am.1,5%	8% N tot. tra nitric. e am. titolo max am.1%
		111104	Nitrato di magnesio	10% N nitrico + 14%MgO	6%N nitrico+9%MgO
		111105	Solfato ammonico	20% N ammoniacale	6%N ammoniacale
		111106	Urea	44% N ureico	-
		111107	Altri azotati	10% N totale	10% N totale
1112	Fosfatici				
		111201	Perfosfato semplice	16% P ₂ O ₅	-
		111202	Perfosfato triplo	38% P ₂ O ₅	-
		111203	Altri fosfatici	10% P ₂ O ₅	28% P ₂ O ₅
1113	Potassici				
		111301	Solfato potassico	47% K ₂ O	-
		111302	Cloruro potassico	37% K ₂ O	30% K ₂ O
		111303	Altri potassici	10% K ₂ O	10% K ₂ O
1120	Composti				
1121	Binari NK (azoto-potassici)				
		112101	Nitrato di potassio	12% N nitrico + 42% K ₂ O	-
		112102	Concimi composti NK in miscela	3% N tot. + 5% K ₂ O	-
		112103	Concimi NK con altri elementi aggiunti	3% N tot. + 5% K ₂ O	-
		112104	Altri azoto-potassici	3% N tot. + 5% K ₂ O	3% N tot. + 5% K ₂ O
1122	Binari NP (azoto-fosfatici)				
		112201	Fosfato monoammonico	3% N ammoniacale + 5% P ₂ O ₅	-
		112202	Fosfato biammonico	N ammoniacale >3% + 5% P ₂ O ₅	-
		112203	Concimi composti NP in miscela	3% N tot. + 5% P ₂ O ₅	-
		112204	Concimi NP con altri elementi aggiunti	3% N tot. + 5% P ₂ O ₅	-
		112205	Urea fosfato	44% N ureico + 5% P ₂ O ₅	-
		112206	Altri azoto-fosfatici	3% N tot. + 5% P ₂ O ₅	3% N tot. + 5% P ₂ O ₅

SEGUE:

CLASSIFICAZIONE DEI FERTILIZZANTI ANNO 1999

CO DI CE	CATEGORIA	CODICE	DENOMINAZIONE PRODOTTO	TITOLO MINIMO IN ELEMENTI FERTILIZZANTI (percentuale in peso)	STATO SOLIDO	STADIO FLUIDO
1123	Binari PK (fosfo-potassici)					
		112301	Fosfato monopotassico	5% P ₂ O ₅ + 5% K ₂ O	-	-
		112302	Concimi PK con altri elementi aggiunti	5% P ₂ O ₅ + 5% K ₂ O	-	-
		112303	Altri fosfo-potassici	5% P ₂ O ₅ + 5% K ₂ O	-	5% P ₂ O ₅ + 5% K ₂ O
1124	Ternari NPK (azoto-fosfo-potassici)					
		112401	Concime complesso a BTC*	3% N + 5% P ₂ O ₅ + 5% K ₂ O	-	-
		112402	Concime complesso Cl **	3% N + 5% P ₂ O ₅ + 5% K ₂ O	-	-
		112403	Concimi NPK con altri elementi aggiunti	3% N + 5% P ₂ O ₅ + 5% K ₂ O	-	-
		112404	Altri azoto-fosfo-potassici	3% N + 5% P ₂ O ₅ + 5% K ₂ O	-	2% N + 3% P ₂ O ₅ + 3% K ₂ O
1200	CONCIMI ORGANO-MINERALI					
1210	Semplici					
1211	Azotati					
		121101	Azotati	12% N tot. di cui 1% organico	-	8%N tot. di cui 0,3 organico
		121102	Azotati con altri elementi aggiunti	12% N tot. di cui 1% organico	-	8%N tot. di cui 0,3 organico
1220	Composti					
1221	Binari NK					
		122101	Concimi NK (azoto-potassici)	3%N tot. di cui 1% organico + 5% K ₂ O	-	3%N tot. di cui 0,3% organico + 5% K ₂ O
		122102	Concimi NK con altri elementi aggiunti	3%N tot. di cui 1% organico + 5% K ₂ O	-	3%N tot. di cui 0,3% organico + 5% K ₂ O
1222	Binari NP					
		122201	Concimi NP (azoto-fosfatici)	3%N tot. di cui 1% organico + 5% P ₂ O ₅	-	3%N tot. di cui 0,3% organico + 5% P ₂ O ₅
		122202	Concimi NP con altri elementi aggiunti	3%N tot. di cui 1% organico + 5% P ₂ O ₅	-	3%N tot. di cui 0,3% organico + 5% P ₂ O ₅
1223	Ternari NPK					
		122301	Concimi NPK (azoto-fosfo-potassici)	3%N tot. di cui 1% organico + 5% P ₂ O ₅ + 5% K ₂ O	-	2%N tot. di cui 0,3% org. +4% P ₂ O ₅ +4 %K ₂ O
		122302	Concimi NPK con altri elementi aggiunti	3%N tot. di cui 1% organico + 5% P ₂ O ₅ + 5% K ₂ O	-	2%N tot. di cui 0,3% org. +4% P ₂ O ₅ +4 %K ₂ O
1300	CONCIMI ORGANICI					
1310	Semplici					
1311	Azotati					
		131101	Residui animali (da macellazione, conceria, ecc.)	4%N organico	-	3%N tot. di cui 1,7% organico
		131102	Letame essiccato	3%N tot. di cui 2% organico	-	-
		131103	Residui vegetali (panelli, borlande, ecc.)	3%N organico	-	1,5%N organico+4% K ₂ O
		131104	Miscele di concimi organici	5%N organico	-	-

SEGUER:

CLASSIFICAZIONE DEI FERTILIZZANTI ANNO 1999

CO DI CE	CATEGORIA	CODICE	DENOMINAZIONE PRODOTTO	TITOLO MINIMO IN ELEMENTI FERTILIZZANTI (percentuale in peso)	STATO SOLIDO	STADIO FLUIDO
1320	Composti					
1321	Binari NP (azoto-fosfatici)					
		132101	Residui animali (farina d'ossa, farina di pesce, ecc.)	1%N organico + 2% P ₂ O ₅	-	-
		132102	Pollina essiccata (di volatili domestici)	2%N totale + 2% P ₂ O ₅	-	-
		132103	Altro letame (guano, letame suino essiccato, ecc.)	2,5%N totale + 2% P ₂ O ₅	-	-
		132104	Miscele di concimi organici NP	3%N totale + 3% P ₂ O ₅	-	-
1400	CONCIMI SPECIALISTICI					
1410	Semplici					
1411	A base di un solo mesoelemento *					
		141101	A base di un solo mesoelemento	12%CaO; 24,5%SO ₃		13%MgO
1412	A base di un solo microelemento **					
		141201	In forma minerale	8%B; 2%Co; 5%Cu; 5%Fe; 5%Mn; 35%Mo; 5%Zn		2%B; 2%Co; 3%Cu; 2%Fe; 3%Mn; 3%Mo;3%Zn
		141202	In forma chelata	8%B; 2%Co; 5%Cu; 5%Fe; 5%Mn; 35%Mo; 5%Zn		2%B; 2%Co; 3%Cu; 2%Fe; 3%Mn; 3%Mo;3%Zn
1420	Composti					
1421	A base di più mesoelementi *					
		142101	Miscele di mesoelementi	25%CaO + 15%MgO + 28%SO ₃		5%MgO +10%SO ₃
1422	A base di più microelementi **					
		142201	Miscele in forma esclusivamente minerale	3,74% di microelementi in totale		3,74% di microelementi in totale
		142202	Miscele in forma chelata o complessata	0,82% di microelementi in totale		0,82% di microelementi in totale
2000	AMMENDANTI E CORRETTIVI					
2100	AMMENDANTI					
		210001	Amm. vegetale non compostato	35% S.O.(sostanza organica)	-	-
		210002	Amm. vegetale compostato	20% S.O.(sostanza organica)	-	-
		210003	Letame	60% S.O.(sostanza organica)	-	-
		210004	Amm. compostato misto (vegetale ed animale)	20% S.O.(sostanza organica)	-	-
		210005	Amm. torboso composto	35% S.O.(sostanza organica)	-	-
		210006	Torba (acida, neutra, umificata e leonardite)	40% S.O.(sostanza organica)	-	-
		210007	Altri ammendanti (vermicompost, estratti umici, letame artificiale, ammendante animale idrolizzato, ecc.)	30% S.O.(sostanza organica)		4,8% S.O.(sostanza organica)

SEGUE:

CLASSIFICAZIONE DEI FERTILIZZANTI ANNO 1999

CO DI CE	CATEGORIA	CODICE	DENOMINAZIONE PRODOTTO	TITOLO MINIMO IN ELEMENTI FERTILIZZANTI (percentuale in peso)	STATO SOLIDO	STADIO FLUIDO
2200	CORRETTIVI					
		220001	Calci, calcari, dolomiti, ecc. *	20%CaO; 8%MgO		20%CaO
		220002	Solfato di calcio, anidrite e gessi	25%CaO e 35%SO ₃		-
		220003	Zolfo per uso agricolo	50% S		-
		220004	Altri correttivi (solfato di magnesio, ossido di magnesio, solfato ferroso, correttivo calcico-solfo-magnesiaco, pirite per uso agricolo, ecc.)	30%CaO; 8%MgO; 12%SO ₃ ; 90FeSO ₄ ; 2%N tot.; 2% K ₂ O; 0,2% P ₂ O ₅ totale; 90%poliacrilammide anionica		9%CaO; 1MgO; 18%poliacrilammide anionica

Concimi minerali ternari NPK:

* BTC = a basso tenore di cloro (<= 2%)

** Cl = con cloro (>2% Cl)

Concimi specialistici:

* i mesoelementi (elementi secondari della fertilità) considerati sono: calcio, magnesio e zolfo.

Il titolo dei mesoelementi viene indicato:

per il calcio (Ca), in ossido di calcio (CaO);

per il magnesio (Mg), in ossido di magnesio (MgO);

per lo zolfo (S), in ossido di zolfo (SO₃).

** I microelementi (oligoelementi) considerati sono: boro(B), cobalto(Co), rame(Cu), ferro(Fe), manganese(Mn), molibdeno(Mo) e zinco(Zn).

Correttivi:

* CaO deve essere sempre presente, mentre MgO può anche mancare.

Tavola 1 - Concimi minerali azotati distribuiti al consumo, per regione - Anno 1997 (in quintali)

REGIONI	Solfato ammonico 20-21%	Calcio- amide	NITRATO		Urea agricola	Totale	
			AMMONICO				
			Minore del 27%	27% ed oltre			
				Di calcio			
Piemonte	66.717	6.253	337.924	158.431	40.876	795.923	1.406.124
Valle d'Aosta	-	-	-	-	-	-	-
Lombardia	109.503	2.409	406.274	223.835	20.028	1.852.238	2.614.287
Trentino-Alto Adige	16.869	45	6.597	68.866	7.364	20.520	120.261
<i>Bolzano-Bozen</i>	<i>7.068</i>	-	<i>1.153</i>	<i>64.348</i>	<i>7.328</i>	<i>15.802</i>	<i>95.699</i>
<i>Trento</i>	<i>9.801</i>	<i>45</i>	<i>5.444</i>	<i>4.518</i>	<i>36</i>	<i>4.718</i>	<i>24.562</i>
Veneto	193.443	9.050	246.938	263.554	31.555	1.136.931	1.881.471
Friuli-Venezia Giulia	93.713	500	79.804	47.696	1.914	354.192	577.819
Liguria	20.176	-	2.873	29.789	510	6.097	59.445
Emilia-Romagna	370.806	5.868	1.014.652	226.692	32.219	755.035	2.405.272
Toscana	62.144	45	504.107	59.938	32.459	400.888	1.059.581
Umbria	7.639	-	180.396	49.715	22.130	281.493	541.373
Marche	81.563	15	338.811	67.686	6.297	217.719	712.091
Lazio	69.839	35	309.127	65.471	43.192	260.985	748.649
Abruzzo	69.015	-	101.314	20.944	12.508	104.664	308.445
Molise	13.735	-	129.115	38.996	3.935	76.384	262.165
Campania	515.092	-	375.594	93.411	36.775	170.841	1.191.713
Puglia	620.506	60	853.267	143.105	45.549	302.842	1.965.329
Basilicata	56.641	-	234.862	42.281	579	73.234	407.597
Calabria	266.545	-	172.369	22.269	24.371	69.600	555.154
Sicilia	383.875	-	284.508	75.662	9.415	252.286	1.005.746
Sardegna	4.098	-	87.166	3.569	10.880	32.762	138.475
ITALIA	3.021.919	24.280	5.665.698	1.701.910	382.556	7.164.634	17.960.997
Nord-Centro	1.092.412	24.220	3.427.503	1.261.673	238.544	6.082.021	12.126.373
Mezzogiorno	1.929.507	60	2.238.195	440.237	144.012	1.082.613	5.834.624

Tavola 2 - Concimi minerali fosfatici distribuiti al consumo, per regione - Anno 1997
(in quintali)

REGIONI	PERFOSFATI MINERALI			Totale
	Minore del 25%	25% ed oltre	Scorie di defosforazione	
Piemonte	32.261	22.307	24.645	79.213
Valle d'Aosta	-	-	-	-
Lombardia	262.986	154.870	7.340	425.196
Trentino-Alto Adige	8.100	6.724	1.806	16.630
<i>Bolzano-Bozen</i>	<i>7.058</i>	<i>6.615</i>	<i>1.806</i>	<i>15.479</i>
<i>Trento</i>	<i>1.042</i>	<i>109</i>	-	<i>1.151</i>
Veneto	358.378	189.792	80	548.250
Friuli-Venezia Giulia	39.596	26.640	-	66.236
Liguria	2.520	38.250	-	40.770
Emilia-Romagna	730.154	498.594	32.692	1.261.440
Toscana	23.208	67.988	-	91.196
Umbria	18.702	44.110	-	62.812
Marche	124.155	132.715	-	256.870
Lazio	40.528	20.990	5.050	66.568
Abruzzo	195.274	20.078	-	215.352
Molise	34.558	8.819	-	43.377
Campania	238.125	6.543	-	244.668
Puglia	444.894	70.464	-	515.358
Basilicata	93.017	7.247	-	100.264
Calabria	233.401	5.082	560	239.043
Sicilia	452.082	69.723	-	521.805
Sardegna	6.799	27.746	6.570	41.115
ITALIA	3.338.738	1.418.682	78.743	4.836.163
Nord-Centro	1.640.588	1.202.980	71.613	2.915.181
Mezzogiorno	1.698.150	215.702	7.130	1.920.982

Tavola 3 - Concimi minerali potassici distribuiti al consumo, per regione - Anno 1997
(in quintali)

Regioni	CLORURO					Totale
	Fino al 45%	Oltre il 45%	Solfato potassico	Sali greggi di potassio	Solfato doppio di potassio e magnesio	
Piemonte	1.845	181.678	21.247	14.400	12.545	231.715
Valle d'Aosta	-	1.690	-	-	-	1.690
Lombardia	324	592.424	28.963	-	19.680	641.391
Trentino-Alto Adige	110	5.572	5.546	-	5.828	17.056
<i>Bozano-Bozen</i>	<i>110</i>	<i>5.157</i>	<i>3.674</i>	-	<i>3.213</i>	<i>12.154</i>
<i>Trento</i>	-	<i>415</i>	<i>1.872</i>	-	<i>2.615</i>	<i>4.902</i>
Veneto	595	324.906	193.174	6.260	37.334	562.269
Friuli-Venezia Giulia	360	107.659	29.478	1.920	2.951	142.368
Liguria	18	9.876	1.012	240	406	11.552
Emilia-Romagna	500	282.478	139.418	-	17.076	439.472
Toscana	190	23.297	84.045	-	7.033	114.565
Umbria	-	3.335	24.950	-	4.080	32.365
Marche	25	252	8.693	-	1.928	10.898
Lazio	190	3.086	19.557	-	7.189	30.022
Abruzzo	-	44	22.125	180	18.170	40.519
Molise	10	8.260	2.134	410	-	10.814
Campania	130	1.391	34.867	-	5.680	42.068
Puglia	340	26.365	36.192	-	29.035	91.932
Basilicata	-	240	3.841	1.110	1.120	6.311
Calabria	-	13.783	19.833	-	1.155	34.771
Sicilia	-	1.278	20.429	-	2.729	24.436
Sardegna	-	4.640	10.880	-	1.105	16.625
ITALIA	4.637	1.592.254	706.384	24.520	175.044	2.502.839
Nord-Centro	4.157	1.536.253	556.083	22.820	116.050	2.235.363
Mezzogiorno	480	56.001	150.301	1.700	58.994	267.476

Tavola 4 - Concimi minerali composti ed organo minerali distribuiti al consumo, per regione - Anno 1997 (in quintali)

REGIONI	BINARI			Ternari (a)	Totale composti	Organo- minerali
	Azoto-fosfatici	Fosfo-potassici	Azoto-potassici			
Piemonte	290.224	21.538	45.414	1.275.094	1.632.270	96.886
Valle d'Aosta	-	-	-	336	336	274
Lombardia	556.691	41.703	35.417	1.248.462	1.882.273	85.222
Trentino-Alto Adige	11.542	30	359	200.021	211.952	8.354
<i>Bolzano-Bozen</i>	<i>10.121</i>	<i>30</i>	<i>258</i>	<i>119.438</i>	<i>129.847</i>	<i>4.677</i>
<i>Trento</i>	<i>1.421</i>	-	<i>101</i>	<i>80.583</i>	<i>82.105</i>	<i>3.677</i>
Veneto	393.082	54.394	10.067	1.645.355	2.102.898	217.655
Friuli-Venezia Giulia	192.196	9.502	112	280.815	482.625	85.658
Liguria	96.308	-	352	44.899	141.559	40.118
Emilia-Romagna	618.384	66.511	32.078	642.221	1.359.194	540.439
Toscana	459.204	1.138	6.369	363.419	830.130	313.278
Umbria	293.157	18.898	3.295	127.869	443.219	119.378
Marche	464.555	1.694	24.190	172.819	663.258	183.260
Lazio	431.669	-	16.136	383.093	830.898	180.658
Abruzzo	136.487	895	4.203	273.056	414.641	202.226
Molise	77.029	-	410	27.261	104.700	17.518
Campania	348.957	-	30.393	483.505	862.855	246.218
Puglia	811.102	135	12.817	869.662	1.693.716	400.318
Basilicata	242.215	-	1.740	111.295	355.250	51.153
Calabria	127.653	208	8.728	451.871	588.460	86.633
Sicilia	447.052	-	86.174	761.180	1.294.406	378.222
Sardegna	200.116	-	3.538	92.538	296.192	8.818
ITALIA	6.197.623	216.646	321.792	9.454.771	16.190.832	3.262.286
Nord-Centro	3.807.012	215.408	173.789	6.384.403	10.580.612	1.871.180
Mezzogiorno	2.390.611	1.238	148.003	3.070.368	5.610.220	1.391.106

(a) Concimi fosfo-azoto-potassici.

Tavola 5 - Contenuto in elementi fertilizzanti, per tipo di concime - Anno 1997 (in migliaia di quintali)

TIPO DI CONCIME	AZOTO				ANIDRIDE FOSFORICA			Ossido potassico	
	Nitrico	Ammoniacale	Ammidico	Organico	Totale	Solubile	Insolubile		Totale
AZOTATI									
Solfato ammonico	-	625,46	-	-	625,46	-	-	-	-
Calcio-cianamide	-	-	4,78	-	4,78	-	-	-	-
Nitrato ammonico	989,21	989,44	-	-	1.978,65	-	-	-	-
Nitrato di calcio	63,85	-	-	-	63,85	-	-	-	-
Urea agricola	-	-	3.264,34	-	3.264,34	-	-	-	-
FOSFATICI									
Perfosfati minerali	-	-	-	-	-	1.203,92	4,4	1.208,32	-
Scorie di defosforazione	-	-	-	-	-	7,42	3,23	10,65	-
POTASSICI									
Cloruro potassico	-	-	-	-	-	-	-	-	956,05
Solfato potassico	-	-	-	-	-	-	-	-	352,12
Altri sali	-	-	-	-	-	-	-	-	62,32
COMPOSTI									
Azoto-fosfatici	69,37	1.058,22	3,83	-	1.131,42	2.561,94	3,28	2.565,22	-
Azoto-potassici	31,05	24,04	2,78	-	57,88	-	-	-	84,58
Fosfo-potassici	-	-	-	-	-	34,85	0,38	35,22	47,04
Azoto-fosfo-potassici	317,73	766,61	51,36	-	1.135,71	1.432,13	9,78	1.441,91	1.661,00
ORGANO MINERALI									
In complesso	4,21	208,15	45,53	49,47	307,36	348,94	13,37	362,31	292,68
TOTALE	1.475,42	3.671,92	3.372,62	49,47	8.569,45	5.589,20	34,44	5.623,63	3.455,79

Tavola 6 - Elementi fertilizzanti contenuti nei concimi minerali ed organo minerali, per regione - Anno 1997 (in quintali)

REGIONI	AZOTO				Totale
	Nitrico	Ammoniacale	Ammidico	Organico	
Piemonte	114.269	242.212	370.615	1.776	728.872
Valle d'Aosta	16	36	4	3	59
Lombardia	117.778	302.110	857.829	1.273	1.278.990
Trentino-Alto Adige	20.737	32.154	9.682	298	62.871
<i>Bolzano-Bozen</i>	<i>15.469</i>	<i>21.926</i>	<i>7.360</i>	<i>236</i>	<i>44.991</i>
<i>Trento</i>	<i>5.268</i>	<i>10.228</i>	<i>2.322</i>	<i>62</i>	<i>17.880</i>
Veneto	112.492	317.643	515.155	3.550	948.840
Friuli-Venezia Giulia	26.553	97.882	160.478	994	285.907
Liguria	7.264	32.931	4.174	592	44.961
Emilia-Romagna	205.547	440.420	359.860	6.975	1.012.802
Toscana	97.766	225.941	192.358	4.960	521.025
Umbria	39.475	104.616	132.383	1.859	278.333
Marche	68.057	180.099	105.021	2.206	355.383
Lazio	80.912	188.054	125.575	3.013	397.554
Abruzzo	31.547	90.633	51.840	2.836	176.856
Molise	25.194	42.834	35.463	236	103.727
Campania	103.428	288.966	85.519	3.567	481.480
Puglia	221.463	481.621	153.173	5.650	861.907
Basilicata	42.948	102.339	35.459	738	181.484
Calabria	52.974	152.082	36.896	1.373	243.325
Sicilia	88.925	292.648	125.524	7.349	514.446
Sardegna	18.086	56.697	15.620	220	90.623
ITALIA	1.475.431	3.671.918	3.372.628	49.468	8.569.445
Nord-Centro	890.866	2.164.098	2.833.134	27.499	5.915.597
Mezzogiorno	584.565	1.507.820	539.494	21.969	2.653.848

SEGUE Tavola 6 - Elementi fertilizzanti contenuti nei concimi minerali ed organo minerali, per regione - Anno 1997 (in quintali)

REGIONI	ANIDRIDE FOSFORICA			Ossido potassico
	Solubile	Insolubile	Totale	
Piemonte	340.975	3.823	344.798	410.091
Valle d'Aosta	62	-	62	1.095
Lombardia	570.238	2.379	572.617	670.754
Trentino-Alto Adige	27.401	1.381	28.782	40.440
<i>Bolzano-Bozen</i>	<i>18.797</i>	<i>1.343</i>	<i>20.140</i>	<i>25.272</i>
<i>Trento</i>	<i>8.604</i>	<i>38</i>	<i>8.642</i>	<i>15.168</i>
Veneto	645.236	4.704	649.940	689.290
Friuli-Venezia Giulia	165.271	507	165.778	150.046
Liguria	70.717	112	70.829	17.317
Emilia-Romagna	780.551	2.944	783.495	417.178
Toscana	333.325	4.085	337.410	138.994
Umbria	196.665	604	197.269	53.200
Marche	329.415	2.283	331.698	38.543
Lazio	269.483	2.441	271.924	88.205
Abruzzo	157.907	704	158.611	80.367
Molise	48.828	425	49.253	10.824
Campania	257.850	2.539	260.389	111.369
Puglia	516.257	2.346	518.603	207.600
Basilicata	145.906	301	146.207	24.408
Calabria	174.296	400	174.696	89.664
Sicilia	438.380	1.979	440.359	190.213
Sardegna	120.419	489	120.908	26.190
ITALIA	5.589.182	34.446	5.623.628	3.455.788
Nord-Centro	3.729.339	25.263	3.754.602	2.715.153
Mezzogiorno	1.859.843	9.183	1.869.026	740.635

Tavola 7 - Elementi fertilizzanti contenuti nei concimi minerali per ettaro di superficie concimabile, per regione (a) - Anno 1997 (in chilogrammi)

REGIONI	Azoto	Anidride fosforica	Ossido potassico
Piemonte	102,08	48,29	57,43
Valle d'Aosta	3,62	3,81	67,26
Lombardia	155,99	69,84	81,80
Trentino-Alto Adige	106,09	48,57	68,24
<i>Bolzano-Bozen</i>	<i>153,72</i>	<i>68,81</i>	<i>86,34</i>
<i>Trento</i>	<i>59,61</i>	<i>28,81</i>	<i>50,57</i>
Veneto	134,98	92,46	98,06
Friuli-Venezia Giulia	137,75	79,87	72,29
Liguria	51,20	70,90	18,70
Emilia-Romagna	95,46	73,85	39,32
Toscana	76,16	49,32	20,32
Umbria	94,02	66,64	17,97
Marche	69,29	64,67	7,51
Lazio	70,30	48,09	15,60
Abruzzo	56,01	50,23	25,45
Molise	54,76	26,00	5,71
Campania	95,46	51,63	22,08
Puglia	69,09	41,57	16,64
Basilicata	48,70	39,24	6,55
Calabria	53,03	38,08	19,54
Sicilia	45,52	38,97	16,83
Sardegna	16,90	22,55	4,88
ITALIA	82,26	53,98	33,17
Nord-Centro	104,47	66,30	47,95
Mezzogiorno	55,81	39,31	15,58

(a) Nella superficie concimabile sono compresi i seminativi (esclusi i terreni a riposo) e le coltivazioni legnose agrarie.

QUALITÀ DI PROCESSI E PRODOTTI

Sandro Silva (*)

Istituto di Chimica Agraria ed Ambientale U.C.S.C.
Università del Sacro Cuore

Via Emilia Parmense, 84 - 29100 Piacenza

Il G.d.L. in parola – Qualità di processi e prodotti – mette a confronto processi e prodotti cercando di stabilire quale priorità spetti agli uni e agli altri o quanto meno di verificare se esistono correlazioni tra la qualità di processi e la qualità di prodotti.

La serie di scenari che si presenta nel settore dei fertilizzanti è piuttosto variegata e le risposte che si possono dare sono necessariamente diversificate.

Una prima riflessione porterebbe a ritenere che la qualità di processo dovrebbe essere preminente rispetto a quella del prodotto, dato che quest'ultima dipende da una serie di operazioni che devono essere effettuate per ottenere un certo prodotto.

Tale indicazione non sembra però condivisibile per tutte le tipologie di concimi ma solo per quelli la cui tecnologia di produzione è semplice e consolidata, tenuto conto che le caratteristiche del prodotto sono strettamente dipendenti dal processo utilizzato e non dalle materie prime impiegate: è questo il caso dei concimi di sintesi come l'ammoniaca e i suoi derivati.

Per questi fertilizzanti, se la filiera produttiva realizza una corretta sequenza di fasi, tra loro collegate, allora il prodotto sarà valido sotto il profilo qualitativo altrimenti presenterà manchevolezze che potrebbero comprometterne la potenzialità agronomica. Così ad es., nel processo di produzione dell'urea, se il prodotto finale viene mantenuto a lungo, a temperatura elevata, si può formare il biureto che è fitotossico: il legislatore ha giustamente stabilito per tale composto un limite massimo dell'1,2%.

Un altro grave pericolo che può manifestarsi con ingenti danni all'ambiente oltre alla perdita del prodotto è la possibilità di incendi che talora avvengono, in assenza di ossigeno, in seguito alla decomposizione termica di concimi NPK contenenti nitrato di ammonio, che può essere evitata aggiungendo il cloruro di potassio alla massa di reazione dopo la fase di ammoniatura e non prima.

*Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti – Gruppo N. 3

Generalmente per questa tipologia di fertilizzanti dunque è la qualità del processo industriale che condiziona e garantisce la qualità del prodotto finale e non viceversa. Oggi la tecnologia nel settore di produzione dei fertilizzanti di sintesi ha raggiunto livelli elevati che difficilmente potranno essere superati.

Diverso è il discorso circa altre tipologie di concimi minerali legati all'attività estrattiva e segnatamente i fosfatici, i potassici ed i concimi composti. Per questi concimi è la qualità del prodotto che va tenuta sotto controllo, in considerazione del fatto che essa è strettamente dipendente dalla qualità delle materie prime impiegate.

Si rende perciò necessario un monitoraggio costante della qualità del prodotto commercializzato con l'individuazione di sostanze tossiche o indesiderate che possono costituire un potenziale pericolo per la salute umana e per l'ambiente, non essendo il loro controllo previsto dalla vigente legislazione.

Ad es., per i concimi fosfatici si rende necessario monitorare la presenza di fluoro, cadmio, uranio ed altri metalli. Per i concimi potassici sarebbe utile quantificare la presenza di sodio, elemento che compromette la stabilità di struttura dei colloidi del suolo, definendo un limite massimo.

Si resta perplessi di fronte all'esclusione del cloruro di potassio ottenuto per reazione chimica dai concimi utilizzabili in agricoltura biologica quando, di contro, le scorie Thomas vi hanno il diritto di ospitalità.

Un altro problema riguarda la preparazione di concimi composti mediante miscelazione di prodotti granulari secchi (*bulk blending*), costituiti da concimi semplici o binari o combinazione di entrambi. Tale tecnica è abbastanza diffusa in Italia tra gli importatori ma molto di più all'estero (Francia, USA).

L'inconveniente che si manifesta per questi concimi è la segregazione dei componenti con violazioni, a volte pesanti, dei titoli dichiarati. Si è cercato di ovviare a questi inconvenienti utilizzando sonde più grandi con ripetute sondate dai cumuli, ma senza successo.

Su questo fronte si è aperto un contenzioso che rischia di mettere in difficoltà lo stesso Servizio Repressione Frodi. Occorrerà in futuro avere più attenzione a questa problematica.

Oggi la tecnologia di processo più complessa e che coinvolge competenze di ordine chimico, agronomico, microbiologico e ingegneristico è quella della produzione di compost, settore nel quale i rischi maggiori per gli operatori e i consumatori sono di ordine igienico-sanitario.

Per ottenere un compost di qualità occorre rispettare alcuni parametri di processo che sarà necessario indicare nella modalità di preparazione, così come vengono fissati i tenori massimi in metalli pesanti e in agenti patogeni e valori minimi per gli elementi fertilizzanti nel prodotto finito. Inoltre, al fine di garantire una sufficiente stabilizzazione dei rifiuti organici è necessario che la sostanza organica sia adeguatamente umificata controllandone sia il grado che il tasso di umificazione, parametri per i quali dovrà essere stabilito un valore minimo.

Vorrei ancora segnalare alcuni concimi tra quelli organici naturali, azotati e fosfoazotati, che non solo ingenerano confusione tra gli utilizzatori ma si prestano, cosa ancora più grave, a frodi con commercializzazione di sostanze che probabilmente dovrebbero essere conferite in discarica, non essendo ancora parametrati per questi materiali le condizioni per testare la qualità del prodotto.

Trattasi del concime organico azotato indicato al N.13 del paragrafo 5.1 sotto la denominazione "miscela di concimi organici azotati" e del concime organico NP indicato al N.8 del paragrafo 5.2 sotto la denominazione "miscela di concimi organici NP".

Per tali concimi occorrerà fare un esame critico che potrebbe anche portare alla loro esclusione dalla Legge 748/84.



BIOMASSE

Fabio Tittarelli (*)

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

Il G.d.L. "Biomasse" ha individuato, nella totale assenza di statistiche disponibili sulle quantità di biomasse di rifiuto prodotte annualmente sul territorio nazionale, uno dei punti chiave per poter successivamente intraprendere delle iniziative specifiche riguardanti la loro potenziale utilizzazione come fertilizzanti.

Si è deciso pertanto, che la prima fase di attività del gruppo di lavoro dovesse concentrarsi sulla raccolta di dati, possibilmente disaggregati, dei volumi di produzione delle diverse tipologie di biomasse nel nostro Paese. Nell'individuazione di tali biomasse, si è fatto riferimento ai "Rifiuti compostabili" così come sono elencati al punto 16 dell'Allegato 1, suballegato 1 del Decreto del Ministero dell'Ambiente del 5 febbraio 1998 "Individuazione dei rifiuti non pericolosi sottoposti alle procedure semplificate di recupero ai sensi degli articoli 31 e 33 del decreto legislativo 5 febbraio 1997, n. 22". Una priorità è stata attribuita ai rifiuti vegetali derivanti da attività agro-industriale ed alla frazione organica degli RSU proveniente da raccolta differenziata.

Da un'analisi delle principali attività agro-industriali relative alla produzione di conserve vegetali, è stato possibile rilevare la presenza di due principali filiere: pomodoro ed agrumi.

Entrambe queste filiere sono caratterizzate da un'elevata quantità di prodotto trasformato, con una concentrazione stagionale che impedisce un adeguato riutilizzo dello scarto nel settore mangimistico. In particolare, nel caso del pomodoro, questo rappresenta, da solo, il 92% della quantità totale di ortaggi trasformati in Italia in un anno. Inoltre, le industrie conserviere, che trasformano circa 4.000.000 di tonnellate di pomodori annualmente, sono concentrate in Campania (150 aziende) ed Emilia-Romagna (30 aziende) aumentando di conseguenza le problematiche relative ad una gestione ambientalmente compatibile degli scarti prodotti.

*Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti – Gruppo N. 4

Nel caso della filiera agrumi, le problematiche sono molto simili a quelle evidenziate per il pomodoro. Anche in questo caso, infatti, circa 800.000 tonnellate di agrumi sono trasformati annualmente in Sicilia con la produzione di 500.000 tonnellate di pastazzo, una miscela di bucce e polpe di agrumi, che rappresenta il principale sottoprodotto di questa attività agro-industriale. Nonostante una potenziale utilizzazione del pastazzo nell'alimentazione del bestiame sia una pratica consolidata, agli operatori del settore si pone un problema economico ed ambientale che riguarda lo smaltimento in discarica e/o il riutilizzo in agricoltura di tale residuo. L'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante, in collaborazione con l'Istituto Sperimentale per l'Agrumicoltura, ha affrontato già da alcuni anni tale problematica proponendo un'attività di ricerca e sperimentazione volta alla realizzazione di compost di qualità da utilizzare in agricoltura biologica e convenzionale. I primi risultati ottenuti, non ancora pubblicati, sono estremamente interessanti ed indicherebbero nel compostaggio una modalità di utilizzazione di tali biomasse con elevate potenzialità di sviluppo.

Un contributo all'attività del G.d.L. "Biomasse", relativamente ad un'ipotesi di utilizzo delle biomasse di rifiuto in acquacoltura, è venuto dal Dr. Bruno Pennelli della Sezione di Nutrizione Minerale dell'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante. Nella sua analisi del settore, il Dr. Pennelli ha evidenziato che l'attività dell'acquacoltura è in fase di crescita costante in Italia. Le specie che più hanno contribuito al fenomeno e le relative produzioni sono riportate in tabella 1 (FAO, 1999).

Tab. 1. Produzioni ittiche italiane in maggior crescita.

Specie	Quantitativo prodotto (tonnellate)	
	1988	1997
Trota	30000	51000
Spigola	930	4600
Orata	750	3900

I reflui delle attività d'itticoltura consistono di particolato organico in sospensione, composto per lo più da cibo non consumato e deiezioni, le cui quantità possono essere desunte, per stima, dalle quantità di mangime consumato. Un quantitativo pari a circa 4900 t di C, 656 t di N e 328 t di P potrebbero essere, secondo tali stime, potenzialmente recuperabili in agricoltura.

Infine, per quanto riguarda la raccolta della frazione organica dei residui solidi urbani, un contributo interessante è arrivato dal CERMEC

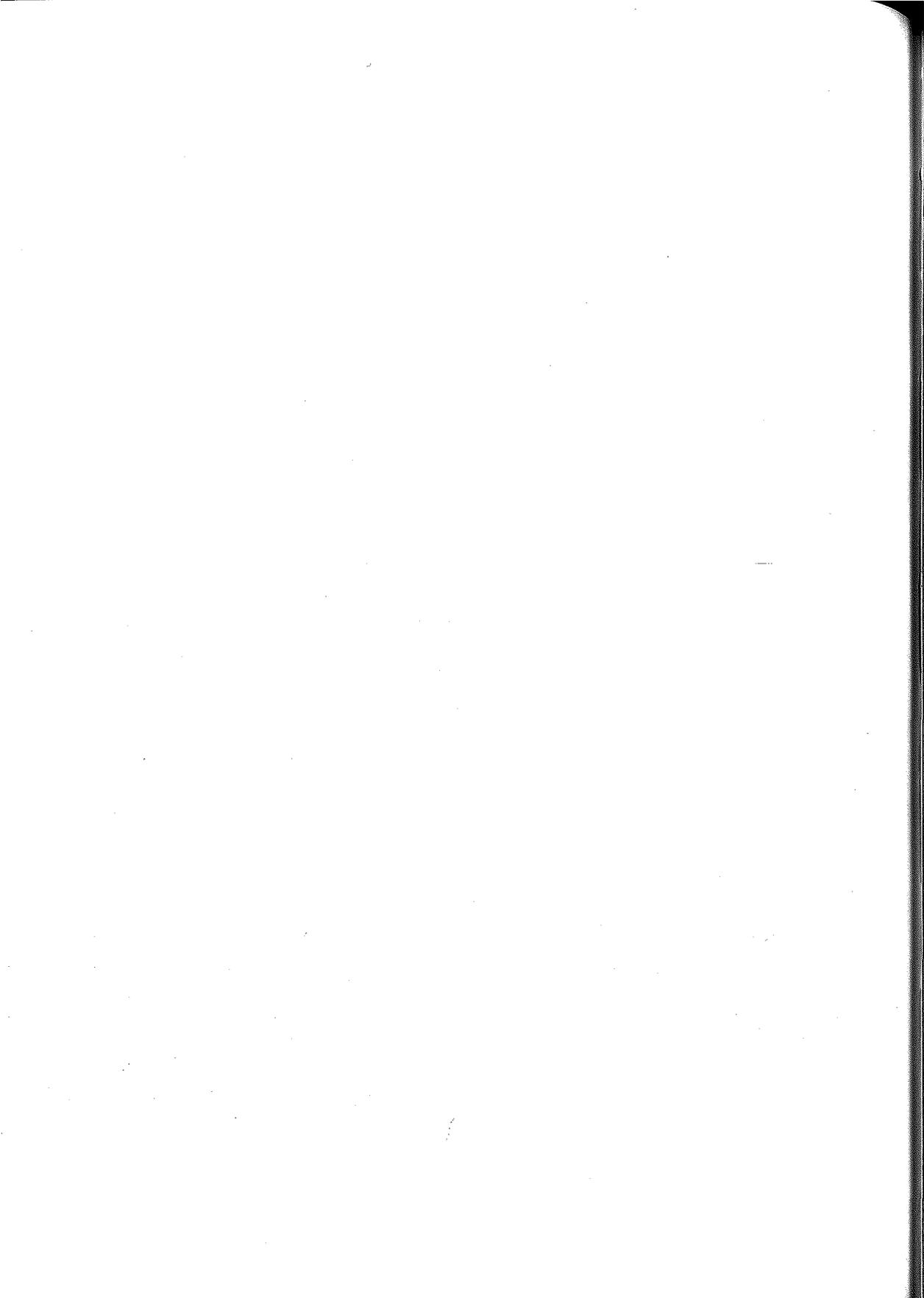
(Consorzio Eliminazione Rifiuti Massa e Carrara) che ha fornito i dati relativi alle quantità da loro raccolte negli ultimi anni ed i prezzi di conferimento praticati, suddivisi per tipologia di rifiuto (tabella 2).

Tab. 2: Prezzi di conferimento praticati alle aziende

Tipologia di rifiuto	Prezzo (L/Kg)
Organico	120-135
Verde	85-135
RSU	178-250

Bibliografia consultata

FAO (1999). Aquaculture Production Statistics. *FAO Fisheries Circular No. 815, Revision 11*, FAO of the UN-Rome.



SOSTANZE ED ELEMENTI INDESIDERATI

Corrado Nigro (*)

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2-4 - 00184 Roma

Gli argomenti di lavoro attribuiti al Gruppo 5 sono a dir poco molto vasti e dai confini imprecisi. L'elenco delle sostanze indesiderate potrebbe infatti essere lunghissimo; fra esse si possono comprendere, solo per citare degli esempi, i metalli pesanti, gli idrocarburi policiclici e clorurati, gli additivi di diverso genere dalle sostanze coloranti a quelle impaccanti, non necessariamente sostanze indesiderate. Gli esempi potrebbero continuare. È chiaro che in una materia così vasta è opportuno considerare prioritariamente quelle sostanze che oggi sono causa di maggiore incertezza e preoccupazione per la produzione dei fertilizzanti, siano esse concimi o ammendanti. E la priorità spetta ai metalli pesanti e ai problemi connessi di fito e zootossicità, nonché ai limiti di compatibilità ambientale, argomento di vaste proporzioni, causa di reenti vivaci polemiche. Basti ricordare tutto quanto di negativo era stato detto in passato sul cromo, letteralmente diabolizzato. L'approfondimento della ricerca scientifica ha invece dimostrato che questo elemento, ovviamente in quantità limitate, interviene nel metabolismo dei carboidrati ed è quindi legato alle problematiche del diabete. Un altro esempio è quello del selenio. Ricerche americane, riprese anche in Germania, hanno accertato che una causa delle violente epidemie che negli anni passati hanno sconvolto lo Zaire è da ricercarsi nell'assoluta mancanza in quei terreni del selenio, che svolge un'azione di contenimento nei riguardi dell'aggressività dei virus.

Per affrontare le problematiche dei metalli pesanti occorre chiarire molti concetti. Vale la pena di ricordare anzitutto che il problema dei metalli pesanti data di poco più di un ventennio. Per lungo tempo le preoccupazioni di molti ricercatori sono state di altro genere. Si temeva cioè una carenza nel terreno, con possibili danni per le colture, dei cosiddetti microelementi, di quelli cioè contenuti nelle piante, secondo la definizione di Trocmé, in quantità inferiore a 100 mg/kg. Negli anni 80 il concetto di **metallo pesante** ha sostituito quello di **microelemento**, in modo del tutto improprio. Metalli pesanti infatti sono quelli con densità cinque volte superiore a quella dell'acqua, con comportamento cationico, caratterizzati da almeno due gradi di ossidazione, nonché dalla notevole attitudine a formare complessi. Con i metalli pesanti tuttavia vengono considerati anche elementi che non lo sono, solo in quanto presentano simili meccanismi di azione, come l'As e il B, ed altri, come il Mo, che hanno carattere anionico.

*Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti - Gruppo N. 5

La presenza dei metalli pesanti è una caratteristica di quasi tutti i terreni, il che non comporta automaticamente fenomeni di tossicità. Questi possono verificarsi invece a seguito dell'apporto di materiali estranei quali fanghi, compost, reflui vari ecc.

Dopo questa premessa è opportuno segnalare alcune **tendenze**, che vanno decisamente combattute. La prima è quella oggi molto in voga di recepire in Italia valori limiti fissati in Paesi dell'Europa Settentrionale o Centrale caratterizzati da condizioni pedoclimatiche che sono in alcuni casi esattamente l'antitesi di quelli italiane. Basti ricordare che l'assimilabilità per le piante dei metalli pesanti diminuisce sensibilmente con l'aumentare del pH (la più importante eccezione in proposito è il Mo); pertanto limiti, ad esempio del Ni, validi per l'Olanda e per la Germania non possono essere "trasportati" in modo semplicistico in Italia dove prevalgono terreni a pH neutro e subalcalino. Meno che mai può essere poi accettata la tendenza, molto cara a determinati ambienti scientifici e burocratici, di considerare tanto più valido un limite quanto più basso. In realtà in taluni casi dovrebbe essere fissata accanto ad un limite **massimo** anche un limite **minimo**, che garantisca l'assunzione da parte delle piante di determinati elementi, assolutamente necessari nella dieta alimentare.

Ancora va combattuta la tendenza di far riferimento nella definizione di un limite al solo valore dell'elemento in forma **totale**. Occorre considerare anche la frazione **assimilabile** di grande importanza in quanto consente di valutare la frazione immediatamente disponibile per le piante. Purtroppo i valori degli assimilabili forniti dalla letteratura sono molto pochi.

Non mi dilungherò in altri esempi ritenendo sufficienti quelli che ho enunciato, sia pure in modo disordinato. È tuttavia evidente che in questo campo vi è necessità di approfondire lo studio e la ricerca, cosa che questo Gruppo di propone di fare. Purtroppo nell'unica riunione tenuta il 1/03 il numero dei partecipanti è stato alquanto deludente. Una prossima riunione è stata fissata per il 30/05 nella quale dovrebbero essere fissate le linee di ricerca.

Esprese sinteticamente queste potrebbero essere così definite per il prossimo futuro:

- Indagini dei metalli non ancora considerati dall'attuale legislazione; in particolare B, As, Se.
- Valutazione della frazione assimilabile di Zn, Cu, Cd; possibilmente anche di Pb ed Ni.
- Proposte di limiti compatibili nella doppia forma totale ed assimilabile per i fanghi ed il compost di qualità. Come è noto infatti i limiti attualmente considerati dalla legge dei fertilizzanti per il compost di qualità sono a dir poco troppo restrittivi; al contrario quelli previsti dalla ex DL 915 sono estremamente elevati.

PATOGENI: POSIZIONE DEL PROBLEMA

Marco de Bertoldi¹, Flavia Pinzari² (*)

¹Dipartimento Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Udine
Via Marangoni, 97 - 33100 Udine

²Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

Nella legge 748/84 "Nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti" sono riportate diverse tipologie di concimi organici e di ammendanti la cui provenienza, vegetale o animale, pone una serie di questioni in merito alla possibile presenza in essi di organismi patogeni per l'uomo, gli animali, le piante o per l'ambiente in generale. Le biomasse utilizzate nella produzione dei concimi organici sono in genere gli scarti di altri processi produttivi attraverso i quali il materiale organico viene in diversa misura trasformato e sottoposto a trattamenti sterilizzanti. E' questo ad esempio il caso degli scarti di conceria o dei residui delle lavorazioni agroindustriali che possono provenire da trattamenti chimici forti o da pastorizzazioni. Molte biomasse comunque non giungono all'uso in agricoltura in condizioni igieniche adeguate ed anche nei casi migliori, ovvero in presenza di precedenti trattamenti di sterilizzazione, il pericolo di inquinamenti successivi è comunque reale. Molte di queste biomasse infatti possono costituire il substrato ideale per la crescita di organismi che oltre a modificare talvolta le caratteristiche chimiche della biomassa stessa, possono costituire un rischio per la salute sia degli operatori che dei consumatori. Si pensi ad esempio alla crescita di funghi saprofiti sui cumuli di biomasse ricche in zuccheri: talvolta i miceli fungini possono produrre sostanze fortemente tossiche e con attività teratogena (le micotossine) o produrre enormi quantità di spore fortemente allergeniche. Esistono inoltre alcuni casi particolari che richiederebbero ulteriori approfondimenti e che in questa sede possono essere solo accennati. Basti citare il caso della BSE (Encefalopatia Spongiforme del Bovino), nota con l'appellativo di sindrome della "mucca pazza", il cui agente infettivo, una proteina prionica, è risultato stabile ai trattamenti comunemente utilizzati (enzimi proteolitici, calore). L'allarme per questa grave patologia ha coinvolto anche il settore dei fertilizzanti, chiamando in causa i concimi a base di sangue, cornunghia, cuoio idrolizzato, pelli, farina di carne, farina di ossa etc. Questi prodotti infatti pur essendo soggetti alle norme sanitarie sulla trasformazione ed immissione sul mercato di rifiuti di origine animale (Benedetti e Sequi, coordinatori, 1998) restano a rischio BSE in quanto i trattamenti igienizzanti previsti non tengono conto della resistenza dei prioni.

*Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti - Gruppo N. 6

Nella normativa italiana il problema della presenza dei patogeni viene affrontata solo in relazione agli ammendanti, per i quali vengono forniti limiti per la presenza di alcuni organismi utilizzati come indicatori di una maggior o minore igienicità del prodotto. Rispetto ai concimi organici gli ammendanti in effetti possono prevedere l'utilizzo di biomasse non preventivamente sterilizzate ed una valutazione della qualità biologica del prodotto fermentato è opportuna. L'orientamento normativo per i concimi organici è invece verso l'emanazione di regole rigide che più che indicare limiti di presenza per i patogeni, individuino i processi di produzione di volta in volta più opportuni. A livello della Comunità Europea, pur non essendoci ancora una normativa comune, si avverte una generale sensibilità alla problematica per la quale si prevede quindi una sempre maggiore attenzione, anche per le modalità di conservazione e trasporto dei prodotti.

C'è da sottolineare come le tipologie di materiali organici, la loro provenienza e le diverse specie di organismi patogeni siano una moltitudine. Volev trovare soluzioni in grado di risolvere problematiche tanto diverse potrebbe risultare semplicistico. Alcune considerazioni possono comunque accomunare situazioni anche molto eterogenee. Di seguito saranno valutati alcuni aspetti riguardanti la valutazione del rischio biologico nella produzione e nell'utilizzo degli ammendanti, di seguito chiamati per praticità "compost", ad intendere l'insieme di prodotti ottenuti per fermentazione aerobica di biomasse di diversa natura e provenienza.

Gli organismi patogeni che possono essere presenti nei rifiuti e nelle biomasse utilizzate per produrre il compost possono essere di natura diversa (tabella 1). Molti di questi organismi comunque non sopravvivono a lungo al di fuori del loro ambiente ideale e pertanto se la loro presenza nei rifiuti è solo accidentale, il loro numero è naturalmente destinato a decrescere con il tempo. I parassiti obbligati ed i virus che si riproducono solo in presenza dei loro ospiti possono resistere nei rifiuti in forme quiescenti, senza potersi accrescere numericamente. Differente è il caso di quei patogeni che sono invece capaci di nutrirsi e di moltiplicarsi a spese della sostanza organica presente nei rifiuti e che in caso di contatto possono risultare nocivi per l'uomo, gli animali e le piante. Oltre agli organismi patogeni nei rifiuti sono presenti tutti quei microrganismi saprofiti che attraverso processi di fermentazione, decomposizione, e trasformazione dei composti organici ed inorganici permettono la realizzazione del processo di compostaggio.

Il compost, pertanto, a seconda dei rifiuti utilizzati in partenza per produrlo, può contenere organismi patogeni. Per ridurre il più possibile questa eventualità, oltre a controllare in una certa misura l'origine dei materiali utilizzati, è necessario sanitizzare il compost in modo da ridurre il contenuto in patogeni e da evitare una loro eventuale crescita e moltiplicazione successiva.

Tabella 1 Alcuni gruppi di patogeni che possono essere rinvenuti nei fanghi urbani, nei rifiuti e nei compost ed alcuni esempi specifici con la relativa patologia.

Patogeno	Patogenesi
Virus	
Virus dell'epatite A	L'Epatite di tipo A è una malattia infettiva trasmessa dal virus dell'epatite A, presente nelle feci e nel sangue di persone affette dalla patologia. Il virus può diffondersi per contaminazione dell'acqua, del latte e dei cibi.
Echovirus	Sono un gruppo di agenti infettivi responsabili di affezioni gastriche ed intestinali nell'uomo. Possono manifestarsi anche come forme di infezione dell'apparato respiratorio.
Batteri	
<i>Salmonella</i> spp.	Varie specie del genere <i>Salmonella</i> possono causare forme più o meno gravi di infezioni enteriche. In alcuni casi le infezioni possono condurre a febbri molto alte ed a setticemie.
<i>Salmonella typhi</i>	Si tratta della forma patologica più grave attribuibile al genere <i>Salmonella</i> . Il tifo viene trasmesso soprattutto nei paesi in cui non esiste una sufficiente cura nella purificazione dell'acqua destinata al consumo umano. Il batterio del tifo può sopravvivere a lungo anche fuori dall'ospite.
<i>Escherichia coli</i>	Assieme ad altri coliformi l' <i>E. coli</i> è implicato in diversi tipi di infezioni gastroenteriche.
<i>Bacillus anthracis</i>	L'antrace è un'affezione grave di pecore, mucche, cavalli e suini. Sebbene le infezioni sull'uomo siano rare, le spore dell'antrace sono presenti negli effluenti degli allevamenti e sono molto resistenti ai trattamenti.
<i>Leptospira</i> spp.	Più specie del genere (<i>L. interrogans</i> , <i>L. pomona</i> , <i>L. canicola</i>) causano la leptospirosi nell'uomo, gli animali (ratto, cane, bestiame) sono portatori spesso sani. Le urine sono il principale veicolo d'infezione.
Funghi	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Presente come micelio ed in forma conidiale in grande quantità nei cumuli di compost, questo fungo partecipa attivamente al processo di compostaggio ma si rivela talvolta un patogeno se inspirato in elevate quantità. L'aspergillosi è infatti un'affezione talvolta molto grave che colpisce chi si trova ad inalare un'elevata quantità di spore (tipicamente polverulente e di facile dispersione). Gli operatori degli impianti di trattamento dei rifiuti e di compostaggio sono soggetti a rischio. In alcuni casi l'effetto nocivo può consistere anche solo nell'effetto allergico delle spore su soggetti sensibili. Oltre all' <i>A. fumigatus</i> altre specie e generi di funghi apparentemente non patogeni possono causare malattie simili.
<i>Sporothrix schenckii</i>	La sporotricosi è un'affezione della pelle, talvolta grave, che colpisce soggetti che vengono a contatto con il suolo e con materiale vegetale marcescente. L'infezione ha luogo in genere se la pelle che viene a contatto con il patogeno è già affetta da escoriazioni o da ferite.
Protozoi	
<i>Entamoeba histolytica</i>	La patologia in questione è l'amebiasi (o dissenteria amebica), facilmente trasmissibile con l'uso agricolo dei liquami ed il successivo utilizzo di vegetali non cotti. Più frequente comunque nei paesi caldo-umidi. L'infezione avviene attraverso l'ingestione delle cisti, le quali sono resistenti alla disinfezione.
<i>Giardia lamblia</i>	La giardiasi è un'affezione che può presentarsi in forme di diversa intensità. La malattia dura dai 2 ai 3 mesi ed interessa il sistema gastro-intestinale con fenomeni di malassorbimento anche gravi.
<i>Balantidium coli</i>	Presente in tutto il mondo anche se particolarmente nei paesi tropicali, causa un'affezione simile a quella della dissenteria amebica. Fra i principali vettori le feci dei suini.
Elminti	
<i>Taenia saginata</i> (cestode)	Verme a sezione piatta, possiede uova molto resistenti ed è presente nei fanghi e nei liquami. Il pascolamento del bestiame su prati trattati con acque reflue è causa di una sempre maggior diffusione della malattia. Nell'uomo l'adulto si fissa con il capo alle pareti interne dell'intestino e si moltiplica con le uova o per frammentazione del corpo.
<i>Ascaris lumbricoides</i> (nematode)	E' un verme a sezione circolare che può raggiungere i 40 cm e parassita l'intestino dell'uomo e di altri animali. Fanghi e liquami sono pericolosi vettori delle loro uova. L'ingestione di quest'ultime è la causa di infezione.

L'utilizzo di compost contenente patogeni non rappresenta, d'altra parte, un rischio certo: il suolo infatti possiede in genere comunità di micro e meso-organismi ben strutturate ed in grado di limitare od impedire la moltiplicazione degli organismi introdotti con il compost. La competizione naturale fra organismi nativi e organismi introdotti artificialmente si traduce infatti con la tendenza dei primi a mantenere l'omeostasi del sistema naturale, attraverso l'eliminazione dei secondi.

Ciò non esclude comunque del tutto il rischio ambientale che la somministrazione di compost contenente patogeni comporta. Casi di contaminazione diretta per l'uomo o per gli animali, o di contaminazione di cibi e bevande, acqua compresa, sono comunque da tenere in debita considerazione.

Resta pertanto la necessità di individuare, da un lato, metodi rapidi ed economici per il monitoraggio quali-quantitativo della presenza di patogeni nei compost pronti per la commercializzazione e, dall'altro, tecniche efficaci per la sanitizzazione del prodotto.

La sterilizzazione del compost quale metodologia di sanitizzazione va esclusa per più motivi, primo fra tutti l'aspetto economico. Tutti i metodi di sterilizzazione oggi a disposizione (calore, UV, raggi gamma, etc.) sono infatti costosi se rapportati al tipo di prodotto per cui dovrebbero essere utilizzati. Inoltre, la sterilizzazione interesserebbe oltre ai patogeni anche i microrganismi "buoni" del compost, ovvero i decompositori di sostanze organiche complesse, presenti tipicamente anche nel suolo. Inoltre si è visto (de Bertoldi *et al.*, 1982) che la sterilizzazione può non eliminare del tutto alcuni patogeni, come alcune specie del genere *Salmonella* che anzi sono in grado di approfittare dell'assenza, nel compost sterilizzato, di altri organismi, in modo da crescere massivamente a spese del substrato ed in assenza di competitori.

Una sterilizzazione totale del compost peraltro non avrebbe senso in considerazione della sua principale destinazione: il suolo. Quest'ultimo infatti contiene di per se organismi potenzialmente patogeni per l'uomo, le piante ed il bestiame; basti pensare alle specie del genere *Clostridium*, come il *C. tetani*, oppure ai funghi inferiori presenti in grande quantità nel terreno che possono essere causa di specifiche patologie nell'uomo (*Aspergillus fumigatus*). Eliminare dal compost quei patogeni che in percentuale anche superiore sono presenti naturalmente nel suolo è chiaramente una spesa inutile.

I patogeni che invece non sono naturalmente presenti nei suoli (perlomeno in quelli sani) non devono essere presenti nei compost o comunque la loro concentrazione deve essere tale da non comportare problemi igienici per l'uomo o l'ambiente. E' necessario cioè che il compost maturo

contenga organismi patogeni ed organismi estranei al suolo in un numero sufficientemente basso da escludere la probabilità di contagio dell'uomo o del cibo a lui destinato e ciò deve essere raggiunto mantenendo competitivi i processi produttivi.

La normativa italiana a tale proposito esprime un parere nella L. 748 del 19 ottobre 1984 e nel Decreto Legislativo 161 del 16 febbraio 1993. I parametri di natura biologica fissati sono identici per gli ammendanti torbosi composti, gli ammendanti torbosi verdi e gli ammendanti torbosi misti. Per le tre tipologie viene infatti richiesto che la *Salmonelle* siano assenti in 25 g di campione tal quale, dopo rivivificazione; che le *Enterobacteriaceae* totali siano presenti al massimo come 10×10^2 UFC per 1 g di prodotto; che gli *Streptococchi* fecali siano presenti al massimo in numero di 1×10^3 (MPN x g); che su 50 g di prodotto risultino assenti Nematodi, Trematodi e Cestodi (come uova vitali).

Appare chiaro che i limiti fissati nella normativa italiana sono valori di massima che non rispecchiano l'ampia casistica che le diverse tipologie di compost oggi sul mercato possono offrire. Inoltre l'importazione di compost da altri paesi pone un problema ulteriore, di cui non si è ancora sufficientemente discusso, ovvero l'importazione di nuovi patogeni in concentrazioni elevate. I valori di riferimento sopra riportati costituiscono comunque un insieme di indici che hanno la principale funzione di indicare il grado di sanitizzazione del prodotto; si tratta cioè di indicatori biologici del processo di compostaggio.

La ricerca di un singolo patogeno in un cumulo di compost è equiparabile alla famosa ricerca dell'ago nel pagliaio: il costo di analisi biologiche specifiche non è peraltro competitivo ai fini della commercializzazione del prodotto finale. Ecco quindi che assumono un ruolo importante gli indicatori, ovvero quegli organismi non necessariamente patogeni, ma particolarmente resistenti alle fasi termiche del processo, la cui presenza o assenza permette di definire l'efficienza dei diversi passaggi della catena produttiva. E' noto infatti che il processo di compostaggio prevede una o più fasi nelle quali il cumulo di biomasse raggiunge spontaneamente temperature di 65-80°C, mantenendole fino a qualche giorno. I processi responsabili dell'innalzamento della temperatura (fase termofila) sono le ossidazioni biologiche che hanno luogo a carico della frazione più labile della sostanza organica presente nel cumulo, ad opera dei microrganismi termofili. Queste naturali "rampe termiche" se ben condotte e gestite dagli operatori possono da sole abbattere la carica di patogeni del cumulo. Ecco quindi che la persistenza, nel prodotto maturo, di organismi sensibili alle alte temperature è indice di una fase termofila inadeguata.

Il concetto su cui si fonda l'utilizzo di una specie indicatrice è che la sua assenza in una quantità stabilita di prodotto indica l'assenza anche di altri gruppi di organismi in confronto meno tolleranti ai processi di igienizzazione. Sono stati utilizzati finora sperimentalmente diversi gruppi di organismi anche molto distanti fra loro: i Coliformi fecali, gli Streptococchi fecali, le Enterobacteriaceae, alcuni virus e le uova di alcuni parassiti hanno mostrato un'elevata efficacia nella definizione del grado di igienizzazione del prodotto. Le caratteristiche che un gruppo utilizzato come indicatore biologico per la valutazione del grado di igienizzazione del compost deve avere sono diverse:

- 1) deve essere presente costantemente in elevata concentrazione nel materiale fresco utilizzato come matrice per la produzione del compost;
- 2) deve appartenere ad un gruppo che reagisca fisiologicamente ai trattamenti allo stesso modo dei patogeni di cui si vuole valutare la presenza o assenza;
- 3) deve presentare una resistenza più elevata del patogeno ai trattamenti di sanitizzazione, in modo da poter contare su un certo margine di sicurezza;
- 4) deve essere determinabile attraverso test univoci il più possibile semplici ed economici, chiaramente di utilizzo più immediato dei test necessari al rilevamento dei patogeni stessi.

Gran parte della ricerca sul campo riguarda due classi di patogeni, le Salmonelle e le uova di parassiti, e due gruppi indicatori, gli Streptococchi fecali ed i Coliformi fecali (Enterobacteriaceae).

Rimane comunque ancora da definire la correlazione quantitativa fra gli indicatori ed i patogeni nel senso della individuazione dei limiti entro cui considerare il compost igienicamente sicuro o meno. I valori riportati nella normativa italiana sono il frutto di un certo numero di osservazioni, che non trovano comunque accordo totale a livello dell'Unione Europea la quale non si è ancora pronunciata in tal senso. In Italia inoltre non ci sono attualmente limiti all'importazione di prodotti confezionati in paesi con una legislazione in materia molto più permissiva o assente ed il rischio biologico in termini di introduzione di nuovi patogeni o di specie alloctone di microrganismi o di mesofauna più competitive ed invasive di quelle nostrane è molto elevato.

Oltre a disporre metodi di rilevazione e di monitoraggio della qualità biologica dei compost, è importante ai fini di quest'ultima, conoscere nel dettaglio quali siano i fattori che possono stimolare la crescita e la resistenza dei patogeni nel compost. Le caratteristiche della sostanza organica

presente nel compost a fine processo, l'acqua disponibile, la temperatura che il prodotto raggiunge nella fase termofila, la maggiore o minore disponibilità di ossigeno ed i fenomeni di competizione e di antagonismo fra le specie saprofiti sono fra i principali fattori che singolarmente o sinergicamente definiscono igienicamente il prodotto finale.

La sostanza organica ha un ruolo determinante ai fini della crescita nel compost di quei patogeni che possono moltiplicarsi da eterotrofi fuori dall'ospite. Batteri e funghi patogeni sono infatti spesso capaci di crescere come saprofiti a spese della sostanza organica prontamente assimilabile, ovvero chimicamente semplice, composta da acidi organici alcoli zuccheri aminoacidi ecc. Molecole organiche complesse, che richiedono ai microrganismi attività enzimatiche specifiche, quali la cellulosa, la lignina, o gli acidi umici, non vengono in genere utilizzate dalle specie patogene che tipicamente non sono "attrezzate" per un simile metabolismo. Nelle prime fasi del processo di compostaggio, le matrici organiche utilizzate nella preparazione del cumulo vengono attaccate da molte specie di microrganismi poiché offrono un'elevata varietà di sostanze prontamente assimilabili. Le specie che danno luogo alla successione ecologica del processo di compostaggio mimano ciò che avviene a carico delle matrici vegetali in un sistema naturale (es. la lettiera di un suolo). In questo modo si avvicendano organismi sempre più specialisti che al termine del processo, ovvero a compost maturo, lasciano substrati di difficile ulteriore decomposizione, assai simili all'humus dei suoli, corrispondenti alla frazione più stabile della sostanza organica naturale. Se le matrici organiche di partenza non sono mescolate in modo opportuno, se il rapporto carbonio/azoto non è idoneo all'instaurarsi del processo e soprattutto se la maturazione non avviene in modo uniforme nel cumulo, il prodotto finale contiene ancora elevate percentuali di sostanza organica facilmente assimilabile. Quest'ultima, in un simile sistema, può indurre un arricchimento del cumulo in organismi patogeni, i quali, infatti, trovandosi alla fine del processo in bassa percentuale e, talvolta in forme resistenti (es. spore), possono tornare a moltiplicarsi indisturbati, facendo di un compost sanitizzato un prodotto rischioso per la salute pubblica. Viceversa, un compost prodotto facendo attenzione alla uniformità del processo ed alla stabilizzazione finale della sostanza organica, garantisce un ambiente ostile per i patogeni che, anche se presenti in piccole percentuali, non costituiscono un rischio in quanto le caratteristiche chimiche del substrato non gli permettono di moltiplicarsi da saprofiti.

L'umidità è un altro fattore decisivo nella moltiplicazione dei patogeni a fine processo. L'acqua disponibile condiziona tutti i processi biologici e la crescita microbica è fortemente condizionata dalle condizioni di

umidità e di ossigenazione del mezzo di crescita. In gran parte delle matrici utilizzate nei processi di compostaggio la disponibilità di acqua è elevata e talvolta, affinché il processo abbia luogo in modo appropriato è comunque necessario aggiungere acqua al cumulo. A fine processo, comunque, un compost stabile e prodotto in modo corretto deve presentare un'umidità del 25-30%, valori questi che risultano troppo bassi per la crescita di gran parte dei patogeni. Un prodotto quindi con poca acqua libera, se conservato in modo opportuno, ovvero in modo da non assorbire umidità atmosferica, dovrebbe non presentare problemi di ricrescita successiva di patogeni.

La temperatura possiede un ruolo chiave non tanto nel prodotto finito quanto nella fase termofila del processo di compostaggio. Tutti i microrganismi patogeni possiedono infatti una soglia specifica di resistenza alle alte temperature, la quale varia da specie a specie ed in funzione delle condizioni ambientali. Tutti i microrganismi termofili sporigeni e non sporigeni sono tipicamente capaci di sopravvivere a temperature anche superiori ai 100°C. Ciò implica che i processi di compostaggio, che arrivano a temperature massime di circa 85°C, non portano mai alla sterilizzazione del prodotto poiché almeno le specie termofile non risentono delle temperature raggiunte. Fortunatamente gran parte degli organismi patogeni non sono termofili e non hanno in genere la capacità di produrre spore di resistenza alle alte temperature. I patogeni possono cioè essere eliminati per mezzo di trattamenti termici anche relativamente blandi. L'efficacia del trattamento, nel senso dell'abbattimento del numero dei patogeni, dipende in primo luogo dalla temperatura raggiunta e quindi dal tempo che questa viene mantenuta. Le variabili "tempo" e "temperatura" nei processi di compostaggio sono in genere fra loro inversamente correlate (cfr. tabella 2).

L'umidità ha pure un ruolo importante ai fini dell'igienizzazione termica del prodotto: l'acqua infatti aumenta la conducibilità del calore all'interno della massa, che essendo comunque eterogenea, è suscettibile di zone di discontinuità dei valori di temperatura. Basti infatti pensare al gradiente che si crea necessariamente fra il centro del cumulo, in cui i processi di fermentazione sono più spinti, e la zona esterna che scambia umidità e calore con l'ambiente circostante. La sanitizzazione del compost è quindi il risultato delle temperature elevate (65°C circa) che il cumulo raggiunge spontaneamente durante il processo quando questo avviene correttamente ed, in particolare, quando l'umidità è sufficiente ad assicurare un riscaldamento uniforme del materiale. Se durante la produzione vengono riscontrate delle grosse differenze di temperatura nello spazio e nel tempo all'interno della biomassa compostata, è possibile che la sanitizzazione non sia avvenuta in modo efficace.

Tabella 2 - I dati della tabella sono tratti da Gotaas (1956) e da Roaediger* (1967)

Temperature e tempi necessari per l'eliminazione di alcuni patogeni in fanghi urbani				
Agente infettivo	T °C	Tempo (minuti)	T °C	Tempo (minuti)
<i>Salmonella thyphosa</i>	55-60	30	60	20
<i>Salmonella</i> sp..	55	60	60	15-20
<i>Shigella</i> sp	55	60	---	---
<i>Entamoeba histolytica</i> (cisti)	45	5-10	55	pochi secondi
<i>Taenia</i> sp.	55	5-10	---	---
<i>Trichinella spiralis</i> (larve)	55	<3	60	pochi secondi
<i>Brucella abortis</i>	62,5	3	55	60
<i>Micrococcus pyogenes</i>	50	10	---	---
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	66	15-20	67	<3
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	55	45	---	---
<i>Ascaris lumbricoides</i> (uova)	50	60	---	---
<i>Escherichia coli</i>	55	60	60	15-20
Virus*	70	25	---	---

Temperature di 80°C, riscontrabili in alcuni punti del cumulo non sono infatti una garanzia nei confronti dell'eliminazione dei patogeni. E' sufficiente, infatti, che in alcuni punti la temperatura non raggiunga i 40-50°C perché i patogeni sopravvivano in numero sufficiente da rovinare dal punto di vista igienico l'intero cumulo.

E' chiaro quindi, da quanto evidenziato, che un prodotto valido dal punto di vista igienico si possa ottenere solo facendo molta attenzione al processo. Si richiede cioè una continua misura della temperatura in più punti del cumulo ed una particolare cura nel mantenere l'omogeneità del materiale attraverso continui mescolamenti nella fase termofila in modo da assicurare un riscaldamento uniforme di tutta la biomassa.

Come accennato, il riscaldamento della biomassa avviene grazie ai processi esotermici attraverso cui i microrganismi saprofiti ricavano energia dall'ossidazione della sostanza organica. Si tratta cioè di processi che richiedono la presenza di ossigeno, senza il quale la sostanza organica sarebbe fermentata e quindi trasformata in molecole ancora ricche in energia e con scarsa produzione di calore. L'ossigenazione del cumulo rappresenta quindi uno dei principali limiti al riscaldamento del materiale. Il rivoltamento delle biomasse quindi, oltre ad assicurare una maggiore omogeneità del substrato, permette l'ossigenazione delle zone più profonde del cumulo e quindi l'innalzamento della temperatura ai valori considerati igienizzanti. Il

compost prodotto per mezzo di impianti specifici può essere, invece che rivoltato, insufflato con aria. Una volta fissate le regole di base per ottenere un prodotto di qualità, è infatti possibile ottimizzare i procedimenti con mezzi tecnici adeguati.

Come ultima variabile, non per importanza, ma per maggiore aleatorietà, va ricordata l'interazione nel compost fra organismi saprofiti e patogeni. I fenomeni di competizione interspecifica e di antagonismo rappresentano infatti un potenziale potente mezzo di controllo delle popolazioni di patogeni ma, dato il grande numero di variabili da cui questi fenomeni dipendono, è assai complesso poterne prevedere l'efficacia o poterne gestire in qualche modo gli effetti. I microrganismi responsabili della naturale successione trofica a carico delle biomasse nel compost appartengono infatti a molte specie e sono più facilmente raggruppabili in base alla funzione piuttosto che individuabili singolarmente. A seconda delle matrici di partenza infatti la lista di specie può essere assai differente, anche se poi nel processo di compostaggio i risultati sono spesso confrontabili. I patogeni, in genere, sono numericamente insignificanti rispetto ai saprofiti e, come accennato, la loro competitività è spesso scarsa. Dove il compost non rappresenta l'ambiente ideale per un patogeno, l'antagonismo e l'efficienza metabolica di un qualunque saprofita è in grado di impedirne la crescita se non anche la sopravvivenza.

Oltre quindi a curare in un processo di compostaggio l'idratazione, l'ossigenazione e l'omogeneità del cumulo, è importante tenere conto del ruolo delle comunità microbiche presenti che proteggono il prodotto dalla ricrescita dei patogeni. L'uso di antibiotici o di processi di sterilizzazione a prodotto finito, alla luce di quanto esposto, possono avere pertanto un risultato deleterio sulla sua qualità poiché più che eliminare i patogeni finirebbero per spazzare via le comunità "buone", tanto simili per ruolo e funzione a quelle presenti nei suoli fertili.

E' necessario, nel complesso, approfondire le conoscenze sui meccanismi che portano i patogeni a sopravvivere nei compost e soprattutto individuare gli aspetti quantitativi del fenomeno, in rapporto alle diverse tipologie di processo. Ai fini di una produzione igienicamente più sicura e, soprattutto, per la messa a punto di una normativa che rispetti sia il produttore che il consumatore e che si basi su metodi di monitoraggio semplici ed efficaci, è fondamentale approfondire lo studio dei bioindicatori e dei meccanismi di trasmissione delle patogenesi dal compost. A proposito di quest'ultimo aspetto, è necessario in Italia raccogliere informazioni epidemiologiche presso gli operatori del settore e presso i principali consumatori, in modo da supportare eventuali posizioni normative con dati sul campo. Infine, una mag-

giore attenzione andrebbe posta nei confronti dell'uso di compost di importazione poiché, come accennato, soprattutto se utilizzati in serre e quindi con temperature ed umidità elevate, potrebbero favorire l'introduzione di organismi non autoctoni potenzialmente pericolosi per l'uomo o per l'ambiente.

Riferimenti bibliografici

- BERTOLDI M. de, VALLINI G., PERA A., ZUCCONI F. (1982). Health implications in sewage sludge composting. Proceedings of Workshop on Disinfection of Sewage Sludge: Technical, Economical and Microbiological Aspects. Zutrich, 11-14 May (C.E.C. Ed.). Bruxelles.
- Decreto Legislativo 161 del 16 febbraio 1993 – *Gazzetta Ufficiale* n. 122 del 27 maggio 1993.
- GOTAAS H.B. (1956). Composting – Sanitary disposal and reclamation of organic wastes. *World Health Organization. Mono. Ser. No 31.*
- Legge 748 del 19 ottobre 1984 – Nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti – Supplemento ordinario n.64 alla *Gazzetta Ufficiale* n. 305 del 6 novembre 1984.
- ROEDIGER H.J. (1967). The technique of sewage sludge pasteurization: actual results obtained in existing plants. *International Research Group on Refuse Disposal information, Bulletin* 21-31.
- SEQUI P., BENEDETTI A. (1998). Coordinatori. *I fertilizzanti organici*. Edizioni L'Informatore Agrario - Verona. Progetto editoriale PANDA, Ministero per le Politiche Agricole.



LEGISLAZIONE E NORMAZIONE

Anna Benedetti (*)

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2-4 - 00184 Roma

L'Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti è stato promosso dalla Società Italiana per la Scienza del Suolo **per la raccolta, la diffusione e la catalogazione delle informazioni scientifiche al fine di sviluppare gli aspetti tecnici, produttivi e legislativi dei fertilizzanti**. Mentre per gli aspetti tecnici e produttivi il travaso delle acquisizioni scientifiche sembra più immediato, invece l'interfaccia tra il mondo scientifico e quello legislativo appare più difficile.

La mancanza di travaso delle informazioni tra scienza ed applicazione deriva spesso dal fatto che pochi tra ricercatori e studiosi si accostano ai problemi legislativi e viceversa non sempre i legislatori supportano le loro scelte con solide argomentazioni scientifiche. Abbiamo numerosi esempi di questi problemi che hanno generato leggi inapplicabili, norme senza adeguati strumenti di rilevamento, ecc. (Benedetti, 1999). L'Osservatorio, in particolare il Gruppo 7, vuole tentare ove possibile di colmare questo spazio.

La legislazione in materia di fertilizzanti non è poi così copiosa, in Italia, come è noto a tutti abbiamo quale riferimento principale la legge 748/84 "Nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti" e le sue successive modifiche ed integrazioni (Tab.1). Per la legislazione dell'U.E. abbiamo invece la Direttiva CEE 76/116 (Tab.2). Più complicato diventa individuare tutte le leggi sia a livello nazionale che europeo che in qualche modo sono connesse con la produzione e l'uso dei fertilizzanti, come ad esempio il D.M. 5 febbraio 1997 n. 22 che recepisce la Direttiva Comunitaria 91/676 sulla protezione delle acque dai nitrati, oppure il D.L. 99/92 sull'utilizzo agronomico dei fanghi in agricoltura, con le quali produttori e utilizzatori molto spesso trovano a scontrarsi. Infine molte norme, che successivamente possono anche costituire la base per direttive comunitarie derivano dagli organismi di standardizzazione internazionale come l'ISO ed il CEN. Queste informazioni sono le notizie più difficili da ottenere perché non tutti sempre conoscono i legami che intercorrono tra i diversi organismi nazionali ed internazionali e quindi trovano difficoltà ad accedere ai canali giusti di informazione (Benedetti *et al.*, 1998).

*Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti - Gruppo N. 7

L'Osservatorio non potrà certamente distribuire standard ISO, UNI, CEN ecc. (tutti rigorosamente di proprietà dell'ISO, dell'UNI, del CEN ecc. e quindi a pagamento), ma potrà essere il primo anello della conoscenza, essere cioè un punto di riferimento per sapere se esiste o no una norma ed eventualmente a chi chiederla o dove reperirla.

Attività programmatica

A seguito dei contatti intercorsi con i soci aderenti al Gruppo 7 è stato concordato, e successivamente approvato dal Comitato Scientifico, di procedere alla raccolta e catalogazione, innanzitutto in forma cartacea, della legislazione nazionale ed europea principale in materia di fertilizzanti Tab. 1 e 2. Si procederà poi alla catalogazione e raccolta delle principali legislazioni connesse a quelle dei fertilizzanti. Sarà importante in questa fase ricevere la collaborazione di tutti coloro che vorranno segnalarci ed eventualmente inviarci documentazione aggiuntiva.

Progetto successivo e più ambizioso riguarda il trasferimento del materiale cartaceo su supporto magnetico in modo da riuscire a produrre alcuni CD-rom con la raccolta dei testi delle normative.

Altro lavoro che si vorrebbe intraprendere riguarda la raccolta della legislazione dei diversi Stati Membri dell'U.E. in materia di fertilizzanti e tradurle quanto meno l'articolato. Conoscere la legislazione degli altri Paesi Europei è importante per vari aspetti. È utile soprattutto nei confronti dei prodotti non coordinati dalla 76/116 al fine di capire l'orientamento dei diversi Paesi ad esempio sui problemi di attualità, come biostimolanti, biofertilizzatori o prodotti speciali. Conoscere la normativa è il primo passo per conoscere la realtà produttiva e la qualità dei prodotti. Si può altresì essere di aiuto ai nostri legislatori avere dei riferimenti legislativi di altri Paesi per capire eventualmente l'impatto di una norma e quindi decidere a livello nazionale anche sull'esperienza maturata da altri. Queste sono solo alcuni esempi, ma disporre di documenti di non facile reperibilità è sicuramente di aiuto a produttori, esportatori, imprenditori.

Anche in questo caso ad una raccolta cartacea dovrebbe seguire la produzione di CD rom. Attualmente in corso è la catalogazione di tutte le norme ISO, CEN ed UNI in materia di fertilizzanti compresi gli stessi documenti in discussione presso i predetti organismi (Tab. 3).

Il Gruppo 7 è strettamente collegato con quasi tutti i gruppi dell'Osservatorio ai quali potrà eventualmente segnalare, per le proprie com-

petenze, eventuali spunti di approfondimento. Non pochi sono i dibattiti che tra gli utenti della legislazione sui fertilizzanti vengono generati proprio dall'esigenza di modificare una determinata norma. È questo il caso ad esempio dei limiti in patogeni nei compost (DM 27 marzo 1998).

I compostatori contestano questi parametri perché impossibili da raggiungere anche dalle migliori tecnologie applicate alle migliori matrici compostabili, gli esperti invece li contestano perché non rispondenti ad una reale qualificazione igienico-sanitaria dei prodotti, gli organismi di controllo invece li contestano perché non si hanno metodi di analisi ufficiali di riferimento ecc. Certamente tutte le osservazioni mosse giustificano un riesame della questione e l'Osservatorio può garantire il dibattito scientifico necessario a supportare una nuova proposta normativa.

Bibliografia

- BENEDETTI A. (1999). La fertilizzazione del suolo: scienza e applicazione. In: *Atti XVI Convegno Nazionale della Società Italiana della Chimica Agraria*, Ravello (SA), 30 settembre-2 ottobre 1998, SBR Edizioni, Portici (1999). pp. 177-185.
- BENEDETTI A., SALVO N. E MORANDI G. (1998). La legislazione europea e gli organismi di normazione internazionale. In: Benedetti A. e Sequi P. coordinatori *"I fertilizzanti organici"* Edizioni L'Informatore Agrario, Verona. pp. 319-328.

Tab. 1 - LEGISLAZIONE ITALIANA SUI FERTILIZZANTI

- Legge 19 ottobre 1984, n. 748 Nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti (Suppl. Ord. alla n. 305 del 6 novembre 1984). Recepisce la Direttiva CEE 76/116.
- Decreto legislativo 16 febbraio 1993, n. 161 (G.U. n. 122 del 27 maggio 1993). Vengono inserite come elementi "secondari" della fertilità calcio, magnesio, zolfo e sodio. Recepisce le direttive CEE 89/284 e 89/530.
- Decreto 7 maggio 1997, (G.U. n. 141 del 19 giugno 1997). Approvazione del metodo di calcolo dell'indice di sfruttamento sistematico della tolleranza nella produzione di fertilizzanti e dell'indice di qualità della produzione complessiva di ogni singolo produttore di fertilizzanti.
- Circolare 20 dicembre 1994 n. 30023, (G.U. n. 30 del 6 febbraio 1995). Inerente gli aspetti applicativi di alcune norme vigenti in materie di commercializzazione dei fertilizzanti. Legge 19 ottobre 1984/748.
- Circolare 11 gennaio 1996 (G.U. n. 72 del 26 marzo 1996). Guida all'elaborazione del fascicolo tecnico da presentare a corredo delle istanze di modifica degli allegati alla legge 19 ottobre 1984 n. 748, previsto a norma degli articoli 8 e 9 della medesima legge.

Aggiornamenti a modifiche degli allegati della legge

Decreto 30 dicembre 1986, del Ministero dell'agricoltura e delle foreste di concerto con il Ministero dell'industria, del commercio e dell'artigianato. Modificazioni ed integrazioni agli allegati alla legge 19 ottobre 1984, n. 748, concernente: "Nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti". (*Gazzetta Ufficiale n. 31 del 7 febbraio 1987*).

CONCIMI NAZIONALI O CONCIMI

- Concimi fosfatici fluidi: *Acido fosforico (riduzione titolo al 28%)*
- Concimi organici (*dichiarazione K_2O solubile in acqua dopo incenerimento*)
- Concimi organo-minerali (*dichiarazione K_2O solubile in acqua dopo incenerimento*)
- Concimi organici azotati: *Borlanda essiccata (dichiaraz. K_2O solubile in acqua dopo incenerimento)*
- Concimi organici azotati fluidi: *Borlanda fluida*
- Concimi organici NP: *Pollina essiccata "Escrementi di volatili domestici con o senza lettiera"*
Miscela di concimi organici NP: o NP + N
- Concimi organo-minerali azotati: *torba fra matrici organiche.*
- Concimi organo-minerali NP: *torba fra matrici organiche.*

AMMENDANTI E CORRETTIVI

- Ammendanti organici naturali:
 - Torba acida: no massimo N, indice di salinità*
 - Torba neutra: no massimo N, indice di salinità*
 - Ammendante torboso composto: no massimo N, indice di salinità*
 - Torba umificata
 - Leonardite
 - Estratti umici
 - Vermicompost da letame
- Correttivi calcici e magnesiaci:
 - Sospensione di calcare
 - Solfato di magnesio per uso agricolo
- Ammendanti e correttivi diversi:
 - Zolfo per uso agricolo
 - Pirite per uso agricolo
- Correttivi a base di microelementi:
 - Correttivo a base di boro
 - Correttivo a base di manganese
 - Correttivo a base di zinco
 - Correttivo a base di rame
 - Correttivo a base di molibdeno
 - Correttivo a base di cobalto
 - Correttivo a base di ferro
 - Correttivo a base di microelementi

Correttivi fluidi a base di microelementi:

- Correttivo liquido a base di boro
- Correttivo liquido a base di manganese
- Correttivo liquido a base di zinco
- Correttivo liquido a base di rame
- Correttivo liquido a base di molibdeno
- Correttivo liquido a base di cobalto
- Correttivo liquido a base di ferro
- Correttivo liquido a base di microelementi

Decreto 5 novembre 1987, n. 484, del Ministero dell'agricoltura e delle foreste di concerto con il Ministero dell'industria, del commercio e dell'artigianato. Integrazioni e modificazioni agli allegati alla legge 19 ottobre 1984, n. 748, recante nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti. (*Gazzetta Ufficiale n. 279 del 28 novembre 1987*).

CONCIMI NAZIONALI O CONCIMI

- Concimi azotati fluidi: Soluzione di nitrato di calcio
- Concimi organo-minerali azotati fluidi in sospensione.
- Concimi organo-minerali NP fluidi in sospensione.
- Concimi organo-minerali NK fluidi in sospensione.
- Concimi organo-minerali NPK fluidi in sospensione.

AMMENDANTI E CORRETTIVI

- Correttivi calcici e mangesiaci:
 - Ossido di magnesio
 - Soluzione di cloruro di calcio
 - Soluzioni miste di sali di calcio e magnesio

Decreto 26 settembre 1989, del Ministero dell'agricoltura e delle foreste di concerto con il Ministero dell'industria, del commercio e dell'artigianato. Integrazioni e modificazioni agli allegati alla legge 19 ottobre 1984, n. 748, recante nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti. (*Gazzetta Ufficiale n. 233 del 5 ottobre 1989*).

CONCIMI NAZIONALI O CONCIMI

- Concimi azotati solidi:
 - Ossammide
 - Urea-Calcionitrato
 - Soluzione di nitrato di calcio (tolleranza)*
- Concimi potassici fluidi:
 - Soluzione di sali potassici B.T.C. (a basso tenore di cloruri)
 - Soluzione di cloruro di potassio
- Concimi organici (*dichiarazione K_2O solubile in acqua*).
- Concimi organo-minerali (*dichiarazione K_2O solubile in acqua*).
- Concimi organici azotati: Epitelio animale idrolizzato
- Concimi organici azotati fluidi:
 - Borlanda fluida (tolleranza)*
 - Carniccio fluido in sospensione
- Concimi organici NP:
 - Residui di macellazione idrolizzati

AMMENDANTI E CORRETTIVI

- Ammendanti organici naturali:
 - Ammendante animale idrolizzato
 - Estratti umici (peso componenti fra le caratteristiche)*
- Ammendanti e correttivi diversi:
 - Sospensione di zolfo in acqua
 - Resina sintetica insolubile a scambio ionico

Decreto 27 settembre 1991, del Ministero dell'agricoltura e delle foreste di concerto con il Ministero dell'industria, del commercio e dell'artigianato. Integrazioni e modificazioni agli allegati alla legge 19 ottobre 1984, n. 748, recante nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti. (*Gazzetta Ufficiale n. 238 del 10 ottobre 1991*).

CONCIMI CEE

- Concimi potassici:
 - Kieserite con solfato di potassio
- Concimi semplici:
 - Soluzione di concimi azotati
 - Soluzione di nitrato di ammonio-urea
 - Soluzione di nitrato di calcio
- Concimi composti:
 - Soluzione di concime NPK
 - Sospensione di concimi NPK
 - Soluzioni di concimi NP
 - Sospensione di concimi NP
 - Soluzione di concime NK
 - Sospensione di concimi NK
 - Soluzione di concime PK
 - Sospensione di concime PK

CONCIMI NAZIONALI O CONCIMI

- Concimi azotati solidi:
 - Solfato ammonico con diciandiamide (DCD)
 - Urea con diciandiamide (DCD)
- Concimi azotati fluidi:
 - Ammoniaca anidra
 - Soluzione ammoniacale
 - Soluzione di concimi azotati
 - Soluzione di nitrato di ammonio-urea
 - Soluzione di solfato ammonico
 - Soluzione di nitrato di calcio
- Concimi minerali composti fluidi:
 - Soluzione di concime NPK
 - Sospensioni di concimi NPK
 - Soluzione di concime NP
 - Sospensioni di concimi NP
 - Soluzione di concime NK
 - Sospensione di concimi NK
 - Soluzione di concime PK
 - Sospensione di concime PK

AMMENDANTI E CORRETTIVI

Ammendanti organici naturali: Umami solubili

Decreto 11 gennaio 1993, del Ministero dell'agricoltura e delle foreste di concerto con il Ministero dell'industria, del commercio e dell'artigianato. Integrazioni e modificazioni agli allegati alla legge 19 ottobre 1984, n. 748, recante nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti. (*Gazzetta Ufficiale n. 12 del 16 gennaio 1993*).

CONCIMI NAZIONALI O CONCIMI

- Concimi organici azotati: Letame essiccato
- Concimi organici azotati fluidi: Sangue fluido
- Concimi organici NP: Letame suino essiccato

AMMENDANTI E CORRETTIVI

Ammendanti organici naturali: *Letame, in luogo di Letame essiccato*

Correttivi calcici e magnesiaci: Gesso di defecazione

Decreto Legislativo 16 febbraio 1993, n. 161. Attuazioni delle direttive 89/284/CEE del Consiglio del 13 aprile 1989 e 89/530/CEE del Consiglio del 18 settembre 1989 concernenti il riavvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative ai concimi. (*Gazzetta Ufficiale n. 122 del 27 maggio 1993*).

Modifiche all'articolato, fra cui: concime sostanza che fornisce qualunque elemento della fertilità e non solo quelli principali; aggiunta del sodio agli elementi secondari; aggiunta alla Commissione Tecnico-Consultiva del rappresentante del Ministero dell'Ambiente.

CONCIMI CEE

Concimi a base di calcio, magnesio e sodio:

- Solfato di calcio
- Soluzione di cloruro di calcio
- Zolfo elementare
- Kieserite
- Solfato di magnesio
- Soluzione di cloruro di magnesio

Concimi a base di microelementi; a base di un solo microelemento:

- Boro
- Acido borico
- Borato di sodio
- Borato di calcio
- Boro etanolammina
- Concime borato in soluzione o in sospensione
- Cobalto
- Sale di cobalto
- Chelato di cobalto
- Soluzione di concime al cobalto
- Rame
- Sale di rame
- Ossido di rame
- Idrossido di rame
- Chelato di rame
- Concime a base di rame
- Soluzione di concime di rame
- Ferro
- Sale di ferro
- Chelato di ferro
- Soluzione di concime a base di ferro
- Manganese
- Sale di manganese
- Chelato di manganese
- Ossido di manganese
- Concime a base di manganese
- Concime in soluzione a base di manganese
- Molibdeno
- Molibdato di sodio
- Molibdato di ammonio
- Concime a base di molibdeno
- Concime in soluzione al molibdeno
- Zinco
- Sale di zinco
- Chelato di zinco
- Ossido di zinco
- Concime a base di zinco
- Concime in soluzione a base di zinco

Miscele di microelementi (solide e fluide)

- Miscela di microelementi solida
- Miscela di microelementi fluida

Seguono prescrizioni sulla non commerciabilità dei concimi a base dei microelementi allo stato sfuso, sulle quantità dichiarabili nei concimi CEE contenenti elementi principali e secondari e sugli agenti chelanti ammessi (sette).

CONCIMI NAZIONALI O CONCIMI

Segue il recepimento di tutto quanto previsto a proposito dei concimi CEE anche per i concimi nazionali o concimi.

Decreto 21 aprile 1994, del Ministro delle risorse agricole, alimentari e forestali. Recepimento della Direttiva n. 93/69/CEE della Commissione del 23 luglio 1993 concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative ai concimi. (*Gazzetta Ufficiale n. 99 del 30 aprile 1994*).

CONCIMI CEE

Concimi azotati

- Nitrato di magnesio
- Crotonilidendiurea
- Isobutilidendiurea
- Urea formaldeide
- Concime azotato contenente crotonilidendiurea
- Concime azotato contenente isobutilidendiurea
- Concime azotato contenente urea-formaldeide
- Solfato ammonico con inibitore della nitrificazione (diciandiammide)
- Solfonitrato d'ammonio con inibitore della nitrificazione (diciandiammide)

Concimi NPK

- Concime NPK contenente crotonilidendiurea o isobutilidendiurea o urea-formaldeide

Concimi NP

- Concime NP contenente crotonilidendiurea o isobutilidendiurea o urea-formaldeide

Concimi NK

- Concime NK contenente crotonilidendiurea o isobutilidendiurea o urea-formaldeide

Concimi liquidi

- Soluzione di nitrato di magnesio

Concimi a base di calcio, magnesio o zolfo

- Soluzione di solfato di magnesio

Concimi a base di un solo microelemento

- Ossicloruro di rame
- Ossicloruro di rame in sospensione

In luogo del concime borato in soluzione o in sospensione

- Concime borato in soluzione
- Concime borato in sospensione

Decreto 15 gennaio 1996, del Ministro delle risorse agricole, alimentari e forestali di concerto con il Ministri dell'industria, del commercio e dell'artigianato, dell'ambiente e della sanità. Modificazione agli allegati 1C e della Legge 19 ottobre 1984, n. 748, concernente: "nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti". (*Gazzetta Ufficiale n. 52 del 2 marzo 1996*).

AMMENDANTI E CORRETTIVI

Ammendanti organici naturali:

- Estratto unico derivante da acque di vegetazione delle olive

Tolleranze per i vari ammendanti organici naturali

Decreto 10 dicembre 1996, del Ministro delle risorse agricole, alimentari e forestali. Recepimento della Direttiva n. 96/28/CEE del Consiglio del 18 dicembre 1975, concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative ai concimi. (*Gazzetta Ufficiale n. 32 del 8 febbraio 1987*).

CONCIMI NAZIONALI O CONCIMI

Concimi azotati:

- Urea-ammonio solfato

Concimi a base di calcio, magnesio o zolfo:

- Idrossido di magnesio
- Sospensione dell'idrossido di magnesio

Decreto 3 marzo 1997, del Ministro delle risorse agricole, alimentari e forestali di concerto con i Ministro dell'industria del commercio e dell'artigianato, dell'ambiente e della sanità. Modificazioni agli allegati 1B, 2 e 3 della Legge 19 ottobre 1984, n. 748, in materia di fertilizzanti. (*Gazzetta Ufficiale n. 123 del 29 maggio 1997*).

Prescrizioni sulla necessità della rispondenza al D.Lgs. 508/92; dichiarazione di parametri dell'umificazione sempre consentita purchè i valori non siano inferiori a.; dichiarabilità del B.T.C. nei concimi organo-minerali; agenti chelanti consentiti (sette).

CONCIMI NAZIONALI O CONCIMI

Concimi minerali semplici: Soluzione di tiosolfato di ammonio

Concimi minerali composti: Nitrato di potassio

Concimi organici azotati:

Cuoiazzoli trattati con ac. solforico ed essiccati senza l'eventualmente cuoio torrefatto titolo minimo da 5 a 8%;

Borlanda essiccata, variazione descrizione (lievito)

Cuoio e pelli idrolizzati

Borlanda fluida, variazione descrizione (lievito)

Decreto 4 marzo 1997, del Ministro delle Risorse agricole alimentari e forestali di concerto con i Ministri dell'industria, del commercio e dell'artigianato, dell'ambiente e della sanità. Modificazioni agli allegati 1B, 1C e 3 della Legge 19 ottobre 1984, n. 784, in materia di fertilizzanti. (*Gazzetta Ufficiale n. 123 del 29 maggio 1997*).

CONCIMI NAZIONALI O CONCIMI

Concimi azotati fluidi:

Sospensione di solfato ammonico

AMMENDANTI E CORRETTIVI

Ammendanti e correttivi diversi:

Poliacrilammide anionica

Poliacrilammide anionica in soluzione acquosa

Decreto 18 settembre 1997, del Ministro per le Politiche Agricole di concerto di i Ministri dell'industria del commercio e dell'artigianato, dell'ambiente e della sanità. Modificazioni agli allegati 1B e 3 della Legge n. 748/1984, in materia di fertilizzanti. (*Gazzetta Ufficiale n. 259 del 6 novembre 1997*).

CONCIMI NAZIONALI O CONCIMI

Concimi azotati solidi:

Nitrato di magnesio

Concime azotato contenente urea-formaldeide

Concime azotato contenente crotonilidendiurea

Concime azotato contenente isobutilidendiurea

Solfonitrato d'ammonio con inibitore della nitrificazione (diciandiammide)

Urea-formaldeide (variazioni diverse)

Crotonilidendiurea (variazioni diverse)

Isobutilidendiurea (variazioni diverse)

Solfato ammonico con inibitore della nitrificazione (diciandiammide): v. D.M. 27.9.91

Concimi azotati fluidi: Soluzione di nitrato di magnesio

Concimi minerali composti: Prodotto ottenuto per via chimica senza incorporazioni di materia organica fertilizzanti di origine animale o vegetale e contenente crotonilidendiurea o isobutilidendiurea o urea formaldeide

Concimi NP: Prodotto ottenuto per via chimica senza incorporazione di materie organiche fertilizzanti di origine animale o vegetale e contenente crotonilidendiurea o isobutilidendiurea o urea formaldeide

Concimi NK: Prodotto ottenuto per via chimica senza incorporazione di materie organiche fertilizzanti di origine animale o vegetale e contenente crotonilidendiurea o isobutilidendiurea o urea formaldeide

Concimi a base di calcio, magnesio o zolfo: Soluzione di solfato di magnesio

Concimi a base di un solo microelemento:

Concime borato in soluzione

Concime borato in sospensione

Decreto 27 marzo 1998, del Ministro per le Politiche Agricole di concerto con i Ministri dell'industria, del commercio e dell'artigianato, dell'ambiente e della sanità. Modificazioni all'allegato 1C della Legge 19 ottobre 1984, n. 748, recante nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti. (*Gazzetta Ufficiale n. 146 del 25 giugno 1998*).

AMMENDANTI E CORRETTIVI

Ammendanti organici naturali:

- Ammendante vegetale semplice non compostato
- Ammendante compostato verde
- Ammendante compostato misto
- Ammendante torboso composto

Decreto 6 luglio 1998, del Ministro delle Politiche Agricole. Ulteriore modificazione agli allegati 1A e 3 della Legge n. 748/1984 concernente: "nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti". (*Gazzetta Ufficiale n. 204 del 2 settembre 1998*).

CONCIMI NAZIONALI O CONCIMI

Concimi liquidi semplici:

- Sospensione di nitrato di calcio
- Soluzione di concime azotato con urea formaldeide
- Sospensione di concime azotato con urea formaldeide

Decreto 5 ottobre 1998, del Ministro per le Politiche Agricole di concerto con i Ministri dell'industria, del commercio e dell'artigianato, dell'ambiente e della sanità. Modificazioni all'allegato 1.B, 1C e 3 della Legge 19 ottobre 1984, n. 748, recante nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti. (*Gazzetta Ufficiale n. 22 del 28 gennaio 1999*).

CONCIMI NAZIONALI O CONCIMI

Concimi NPK ricoperti: materiali di ricopertura (Polygen W3 per ora) e aggiunta elementi secondari e microelementi

Concimi azotati solidi: urea-ammonio solfato

Concimi minerali composti: concimi NPK ricoperti

Concimi organici azotati:

- Concime organico azotato di origine vegetale e animale.
- Epitelio animale idrolizzato fluido

Concimi organici NP

Concime organico azotato di origine animale e vegetale.

Concimi a base di calcio, magnesio e zolfo

Idrossido di magnesio

Sospensione dell'idrossido di magnesio

Concimi a base di microelementi

Ligninsolfonato di ferro - Complesso del ferro

AMMENDANTI E CORRETTIVI

Calce di defecazione: titolo in CaCO_3 anziché CaO

Carbonato di calcio di defecazione

PROVVEDIMENTI DEL MINISTERO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE RELATIVI ALLE METODOLOGIE ANALITICHE

- Decreto Ministeriale 24 marzo 1986. Approvazione dei metodi ufficiali per i fertilizzanti (Suppl. Ord. alla G.U. n. 180 del 5 agosto 1986)
- Decreto Ministeriale 19 luglio 1989. Approvazione dei metodi ufficiali per i fertilizzanti - Supplemento n. 1 (Suppl. Ord. alla G.U. n. 196 del 23 agosto 1989)
- Decreto Ministeriale 23 gennaio 1991. Approvazione dei metodi ufficiali per i fertilizzanti - Supplemento n. 2 (Suppl. Ord. alla G.U. n. 29 del 4 febbraio 1991)
- Decreto Ministeriale 10 marzo 1993. Approvazione dei metodi ufficiali per i fertilizzanti

- Supplemento n. 3 (G.U. n. 29 del 29 marzo 1993)
 - Decreto Ministeriale 28 settembre 1993. Approvazione dei metodi ufficiali per i fertilizzanti - Supplemento n. 4 (G.U. n. 238 del 9 ottobre 1993)
 - Decreto Ministeriale 5 dicembre 1995. Approvazione dei metodi ufficiali per i fertilizzanti - Supplemento n. 5 (G.U. n. 18 del 23 gennaio 1996)

I metodi ufficiali di analisi possono rappresentare il recepimento di direttive comunitarie o scaturire da esigenze nazionali. Il Decreto Ministeriale 25 marzo 1992 (G.U. n. 81 del 6 aprile 1992) delimita il campo di applicazione delle metodologie analitiche nazionali riportate nei metodi ufficiali di cui sopra ai fertilizzanti prodotti in Italia

Sono degne di nota anche le circolari ministeriali 20 dicembre 1994, pubblicate sulla G.U. n. 30 del 6 febbraio 1994, e 11 gennaio 1996, pubblicata sulla G.U. n. 72 del 26 marzo 1996. La prima concerne alcuni aspetti applicativi di norme vigenti in materia di commercializzazione dei fertilizzanti fra i Paesi dell'Unione Europea. La seconda contiene le norme per la presentazione delle istanze di modifica degli allegati della legge e del fascicolo tecnico che le deve accompagnare.

(Tabella a cura di A. Benedetti e P. Sequi)

Tab. 2 - LEGISLAZIONE DELL'U.E. SUI FERTILIZZANTI DIRETTIVE RELATIVE ALLE METODOLOGIE ANALITICHE

- Direttiva della Commissione 77/535/CEE-G.U. n. L. 213 del 22.8.1977. Metodi di campionatura e di analisi dei concimi
- Direttiva della Commissione 79/138/CEE-G.U. n. L. 39 del 14.2.1979. Modifica la Direttiva 77/535 CEE inerente il ravvicinamento degli Stati Membri in materia di metodi per campionamento e analisi dei fertilizzanti
 - Direttiva della Commissione 87/566/CEE-G.U. n. L. 342 del 4.12.1987. Modifica la Direttiva 77/535 CEE inerente i metodi di campionamento e di analisi per i fertilizzanti
 - Direttiva della Commissione 89/519/CEE-G.U. n. L. 265 del 12.9.1989. Modifica ed amplia la 76/116/CEE relativamente ai metodi di analisi sui fertilizzanti
 - Direttiva della Commissione 93/1/CEE-G.U. n. L. 113 del 7.5.1993. Modifica la 77/535/CEE relativamente ai metodi di analisi per i fertilizzanti a base di oligoelementi con contenuto inferiore o uguale al 10%
 - Direttiva della Commissione 95/8/CE-G.U. n. L. 86 del 20.4.1995. Modifica la 76/116 relativamente ai metodi di analisi per concimi a base di oligoelementi con tenore superiore al 10%

Direttive relative alle metodologie analitiche

- Direttiva del Consiglio 76/116/CEE-G.U. n. L. 24 del 30.1.1976. Concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri relativa ai concimi
 - Direttiva del consiglio 80/876/CEE-G.U. n. L. 250 del 23.9.1980. Concimi semplici a base di nitrato d'ammonio ad elevato tenore in azoto
 - Direttiva della Commissione 87/94/CEE 88-G.U. n. L. 38 del 7.2.1987. Concernente il controllo delle caratteristiche ed i limiti per l'esplosività dei concimi semplici a base di nitrato d'ammonio ad elevato tenore in azoto
 - Direttiva della Commissione 88/126/CEE-G.U. n. L. 63 del 9.3.1988. Modifica la Direttiva 87/94 CEE inerente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri sulle procedure del controllo delle caratteristiche e dei limiti per la resistenza alla detonazione di concimi ammonionitrato ad elevato contenuto in azoto
 - Direttiva del Consiglio 88/183/CEE-G.U. n. L. 83 del 29.3.1988. Modifica la Direttiva 76/116/CEE relativamente ai concimi fluidi

• Direttiva del Consiglio 89/284/CEE-G.U. n. L. 111 del 22.4.1989. Modifica ed amplia la 76/116 CEE

Vengono inseriti come elementi "secondari" della fertilità calcio, magnesio, zolfo e sodio

• Direttiva del Consiglio 89/530/CEE-G.U. n. L. 1 del 30.9.1989. Modifica ed amplia la 76/116/CEE per quanto concerne gli elementi in tracce: boro, cobalto, rame, ferro, magnesio, molibdeno e zinco contenuti nei fertilizzanti

Relativa agli elementi in tracce

• Direttiva della Commissione 93/69/CEE-G.U. n. L. 185 del 28.7.1993. Modifica la 76/116 aggiungendo concimi minerali composti NPK, NP ed NK contenente azoto a lento rilascio

• Nota della Commissione 94/C 138/04-G.U. C/138 del 20.5.1994. Guida all'elaborazione del fascicolo tecnico relativo ai concimi che potrebbero ottenere la denominazione di "Concime CEE" ai sensi della Direttiva 76/116/CEE

• Direttiva della Commissione 96/28/C.E.-G.U. n. L. 140 del 13.6.1996. Modifica la 76/116 aggiungendo ammonio solfato, idrossido di magnesio e sospensione dell'idrossido di magnesio

Allegato 1B

• Direttiva 97/63/CEE del parlamento europeo e del Consiglio del 24 novembre 1997 che modifica le direttive 76/116/CEE, 80/876/CEE, 89/284/CEE e 89/530/CEE del Consiglio concernenti il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri relativa ai concimi. (Modifica la dicitura "Concime CEE" in "Concime CE").

• Nota della Commissione n. 97/C 112/06-G.U. n. C./112 del 12/4/1997. Corrigendum alla guida per l'elaborazione del dossier tecnico per la presentazione di nuove domande ai sensi della Direttiva 76/116/CEE

(Tabella a cura di A. Benedetti e P. Sequi)

Tab. 3: NORME ISO E CEN RELATIVE AI FERTILIZZANTI

NORMATIVE	POSIZIONE INTERNAZIONALE
NORMATIVE GENERALI PER FERTILIZZANTI E CORRETTIVI	
Marchi - Presentazioni e Dichiarazioni	ISO 7409
Fertilizzanti e correttivi del suolo	ISO 8157
Fertilizzanti e correttivi - Classificazione	ISO 7851
Fertilizzanti e correttivi - Vocabulary	ISO 8157
Fertilizzanti e correttivi - Campioni finali - Trattamenti pratici	ISO 7410
Fertilizzanti e correttivi - Vocabolario - Parte 1: Terminologia generale	EN 12944
Fertilizzanti e correttivi - Vocabolario - Parte 2: Terminologia relativa ai fertilizzanti	EN 12944
Fertilizzanti e correttivi - Vocabolario - Parte 3: Terminologia relativa ai correttivi	EN 12944
Campionamento di fertilizzanti solidi e correttivi	EN 1482
Fertilizzanti e correttivi - Classificazione	EN13535
Fertilizzanti e correttivi - Determinazione del contenuto in acqua - Metodo gravimetrico per essiccamento a 105°C	ISO 8190
Fertilizzanti e correttivi - Determinazione del contenuto in acqua - Metodo gravimetrico per essiccamento a pressione ridotta	ISO 8189
FERTILIZZANTI	
Fertilizzanti - Denominazioni e specificazioni	CR 12949
Fertilizzanti - Presentazione delle modalità di campionamento	ISO 5306
Fertilizzanti - Campionamento - Massa minima da considerare rappresentativa quale unità di campionamento	ISO/TR 7553

Fertilizzanti - Campionamento da trasportatore per blocco del nastro	ISO 3963
Fertilizzanti - Determinazione della viscosità apparente in fertilizzanti in sospensione - Metodo del viscosimetro rotante	ISO 10187-1
Fertilizzanti - Determinazione della viscosità apparente in fertilizzanti in sospensione - Metodo del viscosimetro a tubo	ISO 10187-2
Fertilizzanti - Determinazione della massa volumica (in forma sciolta)	ISO 3944
Fertilizzanti - Determinazione della massa volumica (in imballo)	ISO 5311
Fertilizzanti - Determinazione della massa volumica (in forma sciolta) di fertilizzanti in polvere	ISO 7837
Fertilizzanti - Determinazione del contenuto in polveri	CEN/TC 260/WG 2 N 195
Fertilizzanti - Determinazione dell'omogeneità	CEN/TC 260/WG 2 N186
Fertilizzanti - Determinazione della resistenza allo schiacciamento dei granuli di fertilizzante	CR 12333
Fertilizzanti - Determinazione del contenuto in acqua - Metodi di Karl Fisher: Parte 1: Estraeante metanolo	EN 13466-1
Fertilizzanti - Determinazione del contenuto in acqua - Metodi di Karl Fisher: Parte 2: Estraeante propanolo	EN 13466-2
Fertilizzanti - Determinazione del contenuto di azoto totale - Metodo titrimetrico dopo distillazione	ISO 5314
Fertilizzanti - Determinazione del contenuto in azoto nitrico - Metodo gravimetrico	ISO 5315
Fertilizzanti - Determinazione del contenuto di azoto ammoniacale - Metodo titrimetrico dopo distillazione	ISO 4176
Fertilizzanti - Determinazione del contenuto di azoto ammoniacale in presenza di altre sostanze che rilasciano ammonio se trattate con idrossido di sodio	ISO 7408
Fertilizzanti - Estrazione dei fosfati solubili in acqua	ISO 5316
Fertilizzanti - Estrazione dei fosfati solubili in acidi minerali	ISO 7497
Fertilizzanti - Determinazione del contenuto in potassio - Metodo titrimetrico	ISO 5310
Fertilizzanti - Determinazione del contenuto in potassio solubile in acqua - Preparazione della soluzione da analizzare	ISO 5317
Fertilizzanti - Determinazione del contenuto in potassio - Metodo gravimetrico del potassio tetrafenilborato	ISO 5318
Fertilizzanti - Determinazione del contenuto in potassio - Metodo gravimetrico del chinolin-fosfomolibdato	ISO 6598
Fertilizzanti - Determinazione del contenuto in potassio solubile in acido - Preparazione della soluzione da analizzare	ISO 7407
Fertilizzanti - Determinazione degli agenti chelanti nei fertilizzanti mediante cromatografia ionica Parte 2: EDDHA e EDDHMA.	EN 13368-2
Fertilizzanti - Determinazione degli elementi chelati e della frazione chelata degli oligo-elementi nei fertilizzanti per trattamento con resine a scambio cationico.	CEN/TC 260/WI 030
Fertilizzanti - Determinazione della reattività del carbonato di calcio	CEN/TC 260/WG 3/P1
FERTILIZZANTI SOLIDI	
Fertilizzanti solidi - Preparazione dei campioni per analisi chimiche e fisiche.	ISO 8358
Fertilizzanti solidi - Riduzione dei campioni	ISO 7742
Fertilizzanti solidi - Criteri di campionamento per la valutazione di grandi distribuzioni	ISO 8634
Fertilizzanti solidi - Derivazione di un piano di campionamento per la valutazione di grandi distribuzioni	ISO/TR 5307

Fertilizzanti solidi – Metodo semplificato di campionamento per piccole confezioni	ISO 8633
Fertilizzanti solidi – Metodo di stima della bontà del campionamento meccanico di prodotti in grandi confezioni	ISO 5308
Fertilizzanti solidi – Test di setacciamento	ISO 8397
Fertilizzanti solidi – Misura dell'angolo statico di riposo	ISO 8398
Fertilizzanti solidi – Determinazione della velocità di flusso	EN 13299
Fertilizzanti solidi – Determinazione del contenuto di azoto ureico – Metodo gravimetrico mediante xantidrola	ISO 8603
Fertilizzanti solidi – Determinazione del contenuto di solfato solubile in acidi minerali – Metodo gravimetrico	ISO 10084

FERTILIZZANTI LIQUIDI

Fertilizzanti liquidi – Esame visivo preliminare e preparazione di campioni per test fisici	ISO 10249
Fertilizzanti liquidi – Determinazione della stabilità in sospensione	ISO/DIS 10186
Fertilizzanti liquidi – Deaerazione di campioni in sospensione	ISO 10248
Fertilizzanti liquidi – Determinazione della densità	ISO 10188
Fertilizzanti liquidi – Determinazione della temperatura di saturazione di fertilizzanti in soluzione	ISO 10189

FERTILIZZANTI A LENTO RILASCIO

Fertilizzanti a lento rilascio – Determinazione della velocità di rilascio dei nutrienti – Metodo per i fertilizzanti ricoperti	EN 13266
---	----------

CORRETTIVI

Correttivi – Determinazione del contenuto in calcio – Metodo dell'ossalato	EN 13475
Correttivi – Determinazione del diossido di carbonio	CEN/TC 260/W1 023
Correttivi – Determinazione del contenuto in calcio ed in magnesio – Metodo complessometrico	EN 12946
Correttivi – Determinazione del contenuto in magnesio – Spettrometria per assorbimento atomico	EN 12947
Correttivi – Determinazione della distribuzione dimensionale mediante setacciamento a secco od a umido	EN 12948

AMMENDANTI E SUBSTRATI CULTURALI

Ammendanti e substrati culturali - Campionamento	EN 12579
Ammendanti e substrati culturali – Preparazione del campione per analisi chimiche e fisiche, determinazione della sostanza secca, dell'umidità e della massa volumica da compattamento in laboratorio	EN 13040
Ammendanti e substrati culturali – Determinazione della quantità	EN 12580
Ammendanti e substrati culturali – Determinazione della conduttività elettrica	EN 13038
Ammendanti e substrati culturali – Determinazione del pH	EN 13037
Ammendanti e substrati culturali – Determinazione delle proprietà fisiche – Massa volumica a secco, volume in aria, volume in acqua, indice di contrazione e volume totale dei pori	EN 13041
Ammendanti e substrati culturali – Determinazione della sostanza organica e delle ceneri	EN 13039

(Tabella a cura di A. Benedetti e P. Sequi)

Ringraziamenti

Si ringrazia la Dott.ssa Francesca Baroccio dell'ISNP di Roma per la preziosa collaborazione fornita al Gruppo 7 nella catalogazione e nel riferimento della documentazione citata.

RAZIONALIZZAZIONE DELL'USO DEI FERTILIZZANTI E DISCIPLINARI DI PRODUZIONE

Francesco Intrigliolo (*)

Istituto Sperimentale per l'Agrumicoltura
Corso Savoia, 190 - 95024 Acireale (CT)

Al congresso sui "Nuovi indirizzi per la produzione", tenutosi presso la Scuola Superiore di Studi Universitari e di Perfezionamento S. Anna lo scorso 24 marzo 2000, ho avuto l'opportunità di incontrarmi con diversi componenti del gruppo 8°. Avrei voluto continuare la nostra riunione ma problemi legati a uno sciopero aereo mi hanno costretto ad allontanarmi repentinamente e grazie alla gentilezza della d.ssa Anna Benedetti è stato esposto quanto finora realizzato dal gruppo, ma soprattutto le prospettive future di lavoro. Siamo stati tutti concordi sulla notevole mole di materiale già elaborato nelle varie Regioni e sull'importanza d'iniziare prima possibile a raccogliere questa documentazione, che reitero, è poco coordinato a causa della difficoltà di operare in diverse realtà ambientali e culturali.

Come specificato nella prima lettera e ribadito nel breve colloquio con alcuni componenti del gruppo otto, i punti operativi rimangono sempre i seguenti:

- 1) raccogliere tutti i disciplinari, differenti per coltura e per regione;
- 2) analizzarli criticamente;
- 3) proporre alle amministrazioni regionali la base tecnico-scientifica per la revisione dei disciplinari, nell'ottica della razionalizzazione delle tecniche di fertilizzazione, ma anche per un'uniforme applicazione delle politiche agricole.

Diventa in conseguenza importante aprire un dibattito con il significativo apporto dei ricercatori che operano nelle diverse realtà culturali e scientifiche. Naturalmente per l'ingente mole di lavoro e le peculiari competenze dei singoli ricercatori e tecnici impegnati nel nostro gruppo riterrei opportuno dividerci in "unità di lavoro" per affrontare il problema sia per coltura o gruppo di colture, sia per ambito territoriale.

*Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti - Gruppo N. 8

Solo in una seconda fase potremmo passare a un'attenta valutazione dei manuali di analisi del suolo e delle foglie, differenziati naturalmente per singola coltura. Ma di questo parleremo successivamente.

Dai colleghi Bartolini, Canali, Coppola, Lacertosa, Rocuzzo e Montemurro ho avuto la loro disponibilità a collaborare e soprattutto mi hanno indicato l'area geografica dove effettuare la raccolta del materiale. Gradirei ricevere da loro, ma anche da tutti gli altri componenti la propria disponibilità nonché l'impegno a iniziare questa raccolta, specificando la regione o l'area geografica dove s'intende operare.

Al nostro gruppo si è aggiunto qualche altro componente, ed altri solleciterò la loro possibile collaborazione.

Proprio per la collegialità delle scelte e dei successivi interventi operativi, ritengo sia opportuno incontrarci, se possibile con il materiale già in nostro possesso, per un'attenta programmazione delle attività da intraprendere nel corrente anno. Senz'altro ci potremo vedere alla riunione della SICA che si terrà a Catania il 20-22 settembre di quest'anno. Trovandomi l'ultima settimana di giugno a Metaponto ed essendo diversi componenti del nostro gruppo operativi in quell'area, potremo cogliere l'occasione per incontrarci, se il numero dei "volontari" sarà sufficiente, a Metaponto dal dr. Lacertosa presso la Metapontum Agrobios il giorno 28 giugno. Per ufficializzare quest'incontro sono naturalmente in attesa della vostra adesione.

In allegato, vi trasmetto l'elenco dei colleghi che si sono resi disponibili, alcuni anche da recente, a collaborare alle attività del gruppo 8°. Nel contempo, gradirei conoscere la vostra opinione sui modi e sui tempi per iniziare l'attività.

Mi auguro di avere un vostro parere al più presto, per organizzare al meglio la prossima riunione.

Vi ricordo gli indirizzi di posta elettronica dove inviarmi le vostre comunicazioni, ma anche idee e suggerimenti sugli argomenti che può affrontare il nostro gruppo:

isa@mailgte.it oppure intri@iol.it

Nome	Titolo	Nome Organizzazione	Indirizzo	Tel.	Fax	e-mail
Barbanti Lorenzo	Dottore Agronomo	Agronomica S.r.l.	Via R. Gessi 20, 48100 Ravenna	0544-35078	0544-36589	agronomica@ra.nettuno.it
Bartolini Daniele	Rep. Fertilizzanti O.M.	SCAM	Strada Bellaria, 164 - 41050 S. Maria di Mugnano MO	059-586531	059-460133	dsbartol@tin.it
Benedetti Anna	Direttore di Sezione	Istituto Sperimentale Nutrizione Piante	Via della Navicella,2-4 00184 Roma	06-7008721	06-7005711	a.benedetti@isnp.it
Bizzoni Fabio	Direttore tecnico	Fertil srl	Via Ninola, 34 24050 Calcinato (Bg)	035-4423299	035-4423302	bizzoni@fertil.it
Bonino Mario	Qualità di processi e prodotti	I.P.S.A.A. "P.Barbero"	Fraz. Cussanio 13 12045 Fossano CN	0172-691189	0172-691090	ipafossano@infosys.it
Bonotto Roberto	Product Manager	FOMET Sas	Via Larga, 25 37045 S. Pietro di Morubio	045-6969004	045-6969011	fomet@netbusiness.it
Buondonno Andrea	Prof. Associato	Dip. Scienze Ambientali S.U.N.	Via Vivaldi,43 81100 Caserta	0823-274606	0823-274605	andrea.buondonno@unina2.it
Canali Stefano	Ricercatore	Istituto Sperimentale Nutrizione Piante	Via della Navicella,2-4 00184 Roma	06-7008721	06-7005711	ste.canali@tiscalinet.it
Ciavatta Claudio	Prof. Associato	Istit. Chimica Agraria,	Via S. Giacomo, 7 Bologna	051-2099796	051-2099792	ciavatta@kaiser.alma.unibo.it
Coppola Elio	Ricercatore	Dip. Produzione Vegetale	Via N. Sauro, 85 85100 Potenza	0971-202384	0971-202269	
Esposito Salvatore	Agronomo - Direttore produzione	Distillerie Bonollo Spa	località Paduni-Anagni Frosinone	0775-778214	0775-778231	
Infantino Salvatore	Divulgatore	Az. sper. Chiancalata	c.d a Rotondella, fermo posta ads 75100 Matera	0835309978		chiancalata@netsystem.it
Intrigliolo Francesco	Direttore di Sezione	Istituto Sperimentale per l'Agrumicoltura	Corso Savoia, 190 95024 Acireale CT	095-7653106	095-7653113	isa@mail.gte.it intri@iol.it
Lacertosa Giovanni	Ricercatore	Metapontum Agrobios	SS 116 ionica Km 448,2 Metaponto (MT)	0835-740263	0835-740204	glacertosa@agrobios.it
Mancini Maurizio	Perito Agrario	SVG Italia	Via Majami, Bologna	051-277011	051-277070	mancini@vegatel.it

Marchionni Maria	Naturalista	Istituto Sperimentale Nutrizione Piante	Via della Navicella, 2-4 00184 Roma	06-7008721	06-7005711	nutrazotata@isnp.it
Marino Gallina Pietro	Agronomo	Istituto di Agronomia Mi	Via Celoria,2 Milano	02-70600164	02-70633243	
Modugno Giuseppe	Cotitolare	Modugno Agrochimica	Via G Fortunato, 2/E Laretto (PZ)	0972-85889	0972-877684	
Montemurro Franco	Ricercatore	Istituto Sperimentale Agronomico	Via Celso Ulpiani 5 Bari	080-5475011	080-5475023	agrobari@interbusiness.it
Natale Giuseppe	Direttore Generale	Valagro SpA	Zona industriale Piazzano di Atessa (CH)	0872-8811	0872-897416	g.natale@valagro.com
Piaggese Alberto	Responsabile Tecnico	Valagro SpA	Zona industriale Piazzano di Atessa (CH)	0872-8811	0872-897416	a.piaggese@valagro.com
Pierandrei Fernando	Perito agrario	Istituto Sperimentale Nutrizione Piante	Via della Navicella,2-4 00184 Roma	06-7002636	06-7005711	fisveg@isnp.it
Pisciotta Gennaro	Perito Agrario	I.P.S.S.A. "F.Silvestri" Na	Via Lagopatria 104 Giuliano NA	081-5091348	081-8678156	christie@newage.it gpisciotta@iou.i
Rea Elvira	ricercatore	Istituto Sperimentale Nutrizione Piante	Via della Navicella, 2-4 00184 Roma	06-7002636	06-7005711	fisveg@isnp.it
Rocuzzo Carlo	Agronomo	Istituto Sperimentale Nutrizione Piante	Via della Navicella, 2-4 00184 Roma	06-7008721	06-7005711	nutrazotata@isnp.it
Rossi Nino	Professore	Istituto Chimica Agraria Bologna	Viale Berti Pichat, 10 40127 BO	051-243104	051-243362	nrossi@agrsci.unibo.it
Schipa Mauro	Agronomo	Hi-Agri srl	Viale Gozzadini,13 40124 Bo	051-583015	051-581155	mauro@hi-agri.it
Sequi Paolo	Professore Ordinario	Istituto Sperimentale Nutrizione Piante	Via della Navicella, 2-4 00184 Roma	06-7000720	06-7005711	psequi@uni.net
Soldati	Perito Chimico	Trevilab sas	Via S. Pio X 30 31038 Castagnole TV	0422-451354	0422-950049	trevilab@tin.it
Tittarelli Fabio	Ricercatore	Istituto Sperimentale Nutrizione Piante	Via della Navicella, 2-4 00184 Roma	06-7008721	06-7005711	f.tittarelli@tiscalinet.it

AGRICOLTURA BIOLOGICA: LA CIRCOLARE DEL MIPA SUI FERTILIZZANTI

Stefano Canali (*)

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

Il modello agricolo biologico si basa sulla razionale utilizzazione delle risorse native dell'agroecosistema.

Questo principio, per quello che riguarda la gestione della fertilità del suolo, si traduce nell'ottimizzazione degli avvicendamenti colturali e nell'utilizzo delle colture intercalari e/o consociate, nonché nel reimpiego dei residui organici che l'attività produttiva dell'azienda mette a disposizione. Il principio esposto nelle righe precedenti evidenzia la più importante delle differenze tra il modello agricolo biologico ed il modello intensivo; quest'ultimo, infatti, è caratterizzato dal massiccio impiego delle risorse ausiliarie (o esterne).

Tuttavia, non sarebbe corretto affermare che in agricoltura biologica le risorse ausiliarie non devono essere utilizzate, ma piuttosto che il loro impiego deve essere decisamente subordinato a quello delle potenzialità native dell'agroecosistema.

Tra le risorse ausiliarie si devono comprendere anche i fertilizzanti che non derivano direttamente dal comprensorio (o sistema) agro-ecologico considerato, ma da sistemi differenti, non funzionalmente collegati a questo. In altri termini i fertilizzanti che, generalmente, vengono reperiti sul mercato.

Al fine di chiarire il quadro delle possibilità di impiego dei fertilizzanti commercializzati secondo le norme previste dalla Legge n. 748/84 ed idonei all'impiego in agricoltura biologica, il MIPA, avvalendosi del lavoro svolto nell'ambito del Gruppo di Lavoro "Fertilizzazione in Agricoltura Biologica" (GL_FertAB), ha emanato la Circolare n. 8 del 13 settembre 1999, pubblicata sulla G.U. n. 258 del 3 novembre 1999.

La Circolare ministeriale è composta da una parte introduttiva e da due tabelle, delle quali la prima è la più corposa.

*Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti - Gruppo N. 9

La tabella 1 è una "lista positiva", ovvero un prospetto dove vengono considerati esclusivamente i fertilizzanti ammessi all'impiego in agricoltura biologica. Di conseguenza, ciò che non è espressamente citato non è ammesso.

Tra i fertilizzanti esclusi figurano quelli (inorganici ed organici) prodotti con materie prime non elencate nell'allegato IIA del Reg. CEE 2092/91, come, ad esempio, tutti i concimi inorganici azotati o gli ammendanti a base di leonardite. Inoltre, sono stati esclusi tutti i prodotti che, pur ottenuti a partire da matrici citate nell'Allegato IIA del Regolamento per il biologico, non sono considerati fertilizzanti ai sensi della Legge n. 748/84. Tra questi, ancora quale esempio, rientrano i prodotti contenenti o costituiti da alghe.

Tutti i fertilizzanti previsti dalla tabella 1 dovranno, ovviamente, rispettare i requisiti della Legge n. 748/84 quali modo di preparazione, componenti essenziali, titolo in elementi nutritivi, solubilità, ecc.

Inoltre, i fertilizzanti elencati nella citata tabella dovranno simultaneamente possedere gli eventuali ulteriori requisiti, specificati nella colonna (iii), necessari a rendere adatto il mezzo tecnico impiegato in agricoltura generale all'uso in agricoltura biologica. A titolo di esempio si consideri il caso dei concimi fosfatici, per i quali viene imposto il limite per il Cd (90 mg kg^{-1} di P_2O_5) che non è previsto dalla normativa per agricoltura generale. Rilevante è anche il caso dei fertilizzanti organici costituiti o contenenti deiezioni zootecniche e per i quali, ai fini dell'ammissibilità in agricoltura biologica, viene richiesto il rispetto delle condizioni imposte dalla Circolare esplicativa del MiRAAF n. 9594661 del 10 ottobre 1995.

Nella tabella 2 vengono precisate le possibilità di impiego in agricoltura biologica dei reflui zootecnici e delle acque di vegetazione e delle sanse dei frantoi oleari. Tali biomasse, impiegate comunemente per la gestione della fertilità del suolo, non sono prese in esame, come è noto, dalla Legge n. 748/84. Le modalità del loro utilizzo sono regolate da specifiche norme che la Circolare, volendo indicare il quadro normativo di insieme, ha richiamato.

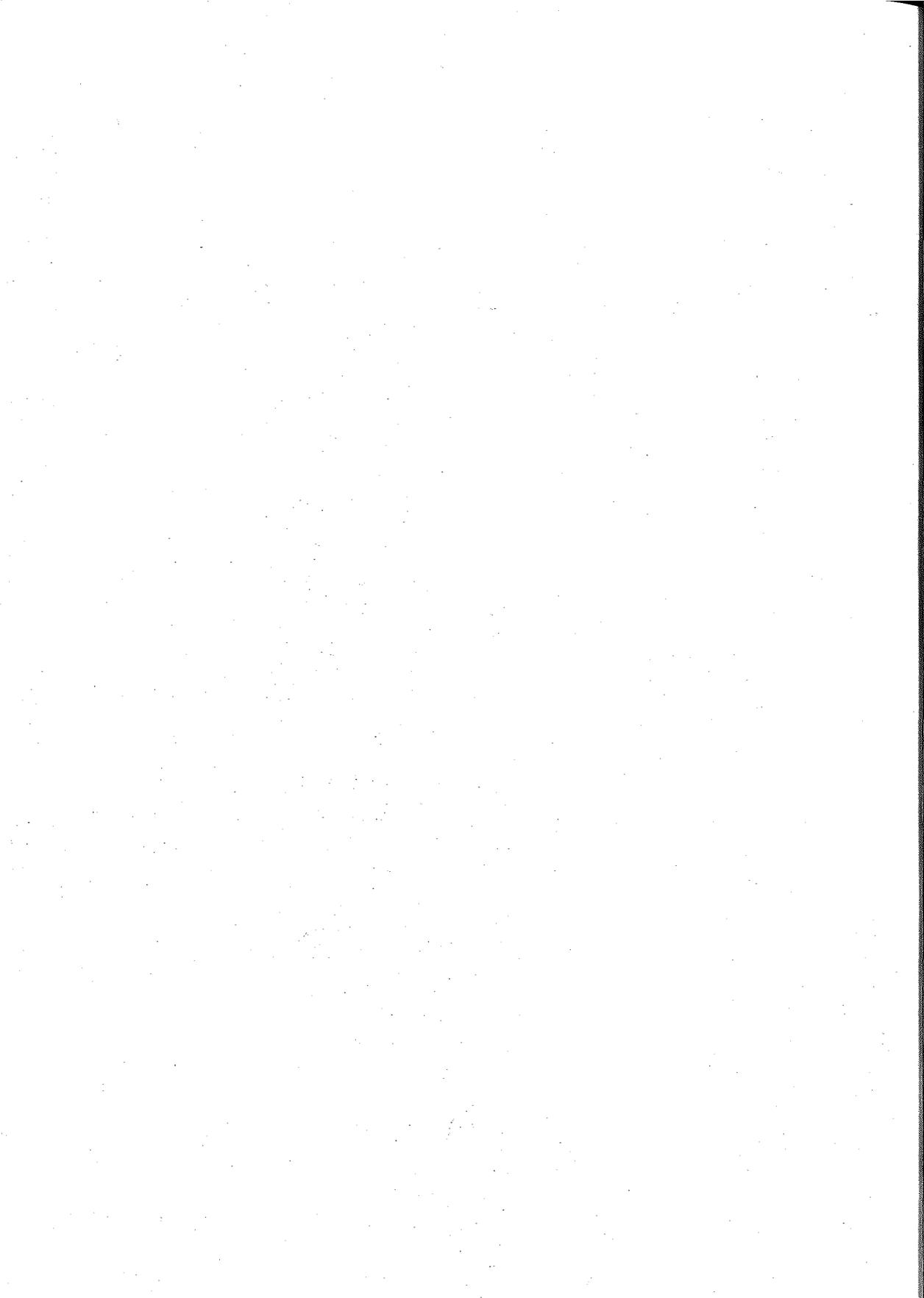
Con la promulgazione della Circolare viene previsto che i produttori che intendono produrre fertilizzanti conformi ai dettami previsti dalla Circolare, abbiano la possibilità di etichettare i fertilizzanti con una dicitura che esplicita l'ammissibilità all'impiego in agricoltura biologica. Naturalmente, la dichiarazione in etichetta impegna il produttore a rispettare tutti i requisiti richiesti ed il sistema pubblico di controllo ad eseguire le necessarie verifiche, e ad irrogare le previste sanzioni in caso di mancato rispetto di quanto dichiarato.

Inoltre, viene chiesto a chi produce e/o commercializza fertilizzanti per agricoltura biologica di depositare presso l'Istituto Sperimentale per la Nutrizione della Pianta di Roma, preventivamente alla messa in commercio di uno specifico mezzo tecnico, un dossier contenente indicazioni relative alla gestione ed alla verifica della qualità del processo produttivo e del prodotto nonché un facsimile dell'etichetta del fertilizzante.

La Circolare ministeriale precisa anche i compiti attribuiti agli Organismi di Controllo riconosciuti per ciò che riguarda le verifiche inerenti la gestione della fertilità del suolo. In particolare, viene chiesto agli Organismi ed ai tecnici che operano il controllo di verificare, prioritariamente, se il metodo di coltivazione biologico venga correttamente applicato, così come previsto dall'Allegato I del Reg. CEE 2092/91. L'esito positivo di questa verifica consentirà, ovviamente, di affrontare la fase successiva dell'azione di controllo, individuando i fertilizzanti ausiliari impiegati e la loro ammissibilità nel processo produttivo agricolo biologico.

Bibliografia utilmente consultata

- CANALI S. (1997). Aspetti tecnici e normativi della fertilizzazione in agricoltura biologica. In *Atti del Seminario internazionale sull'agricoltura biologica e sostenibile nel Mediterraneo*. Acireale (CT), 12-16 maggio (curatore F. Ancona). Cooperativa Universitaria Editrice Catanese di Magistero, Catania, pp. 319-331.
- Circolare 13 settembre 1999, n. 8. Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Quadro di riferimento per l'utilizzazione dei fertilizzanti in agricoltura biologica - Reg. CEE n. 2092/91 - Legge n. 748/1984. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 258 del 3/11/1999.
- Circolare n. 9692448 del 14 maggio 1996. Ministero delle Risorse Agricole Alimentari e Forestali, Direzione Generale delle Politiche Agricole ed Agroindustriali Nazionali, Associazionismo Accordi Interprofessionali e Agricoltura Biologica.
- Legge n. 748, 19 ottobre 1984 - Nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti. M.A.F. - Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste. *Supplemento Ordinario Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 305 del 6/11/84.
- Regolamento (CEE) n. 2092/91 del Consiglio del 24 giugno 1991. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* n. L. 198 del 22 luglio 1991.



PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

Claudio Ciavatta¹, Paolo Nannipieri² (*)

¹ U.C.I. - Scienze e Tecnologie Agroindustriali ed Agroambientali

Istituto di Chimica Agraria, Università degli Studi di Bologna
Via Berti Pichat, 10 - 40127 Bologna

² Dipartimento di Scienza del Suolo e Nutrizione della Pianta - Università di Firenze
Piazzale delle Cascine, 16 - 50144 Firenze

L'Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti della SISS ha tenuto il giorno 22 novembre 1999, presso l'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante di Roma, una riunione del Comitato Scientifico dell'Osservatorio nella quale ha formalizzato la proposta di istituire il Gruppo 10 "Pubblicazioni scientifiche" e di affidarne il coordinamento agli scriventi.

Il Gruppo "Pubblicazioni scientifiche" si occuperà, fondamentalmente, della raccolta e catalogazione delle pubblicazioni riguardanti il settore dei fertilizzanti nella sua accezione più completa del termine (concimi, ammendanti, correttivi, ecc...).

Il Gruppo ha già iniziato l'attività attraverso una serie di contatti e incontri fra i coordinatori e coloro che hanno aderito all'iniziativa.

Dagli incontri e dai suggerimenti pervenuti, sono state individuate alcune possibili linee guida volte al raggiungimento degli obiettivi che saranno di seguito brevemente esposte.

Innanzitutto è nostro convincimento che questo Gruppo possa interessare la totalità degli aderenti l'Osservatorio e anche tutti coloro che sono impegnati nella Scienza del Suolo, in quanto la conoscenza della letteratura del settore è di fondamentale importanza per chiunque sia impegnato a diverso titolo nel settore dei fertilizzanti, ovvero che in qualche modo ne sia fruitore.

La raccolta e la classificazione delle pubblicazioni scientifiche, come già sottolineato, debba riguardare il settore dei fertilizzanti nella sua accezione più completa. In altri termini dovrà interessare i concimi, gli ammendanti e i correttivi, ai sensi della Legge 19 ottobre 1984 n. 748 e successive modifiche e integrazioni, nonché tutte le biomasse di riciclo e di recupero (fanghi di diversa origine, reflui zootecnici, ecc.) impiegate a scopo fertilizzante.

*Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti - Gruppo N. 10

Dopo avere valutato tutta una serie di possibilità, si è convenuto di raccogliere e catalogare le pubblicazioni a carattere scientifico, senza tralasciare, tuttavia, anche quelle con taglio divulgativo presenti sulle riviste di maggiore importanza e diffusione (nazionali ed estere), nonché reperibili su banche dati. La catalogazione inizierà con i lavori usciti nel 1999.

Al fine di verificare la disponibilità delle riviste si è proceduto alla creazione di un elenco generale, grazie soprattutto alle segnalazioni pervenute da alcune strutture di ricerca. Per questa attività è essenziale la collaborazione di tutti gli aderenti, almeno uno per sede. Un primo elenco di riviste possedute, ad esempio, presso le biblioteche dell'Istituto di Chimica Agraria dell'Università di Bologna e del Di.pto di Scienza Suolo di Firenze dell'Università di Firenze, è già stato fatto circolare, via posta elettronica, fra gli aderenti il Gruppo.

A titolo informativo si riporta l'elenco completo:

1. Acqua Aria
2. Advances in Soil Sciences
3. Agricoltura Mediterranea
4. Agrochimica
5. Agronomy Journal
6. Applied Spectroscopy Journal
7. Arid Soil Research and Rehabilitation
8. ARPA
9. Atti dell'Accademia dei Georgofili
10. Biochemistry
11. Biocycle
12. Biology & Fertility of Soils
13. Bioscience Biotechnology & Biochemistry
14. Canadian Journal of Soil Science
15. Compost: Science & Utilization
16. European Journal of Soil Science
17. Geoderma
18. Informatore Agrario
19. Journal of Biological Inorganic Chemistry
20. Journal of Environmental Quality
21. Journal of Plant Nutrition and Soil Science
22. Nutrient Cycling in Agroecosystems
23. Pest Management Science
24. Plant and Soil
25. Proceedings of the International Fertiliser Society
26. Rivista di Agronomia
27. Science
28. Soil Biology and Biochemistry
29. Soil Science

30. Soil Science and Plant Nutrition
31. Soil Science Society of American Journal
32. Terra & Vita

La raccolta delle informazioni dovrà essere completa, ma al tempo stesso ridotta all'essenziale, come nell'esempio di seguito riportato:

Mace J. M., Amrhein C. and Oster J. D. (1999). Comparison of gypsum and sulphuric acid for sodic soils reclamation. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 13 (2), 171-188.

E' stato inoltre suggerito di aggiungere anche le **parole chiave** riportate nell'articolo, in modo da facilitare la consultazione.

Fra le modalità di **classificazione** degli articoli si ritiene che la più funzionale per la consultazione sia quella **per autore**.

Da una prima verifica si ritiene possibile fornire un elenco degli indirizzi delle sedi dove sono reperibili gli articoli da consultare.

Oltre alle tradizionali riviste possono essere consultate anche banche dati on-line, delle quali saranno fornite le indicazioni del sito WEB.

Per quanto concerne le modalità di diffusione periodica dei dati raccolti, sono allo studio alcune possibilità (E-mail; Sito WEB dell'Osservatorio, CD-ROM, ecc.).

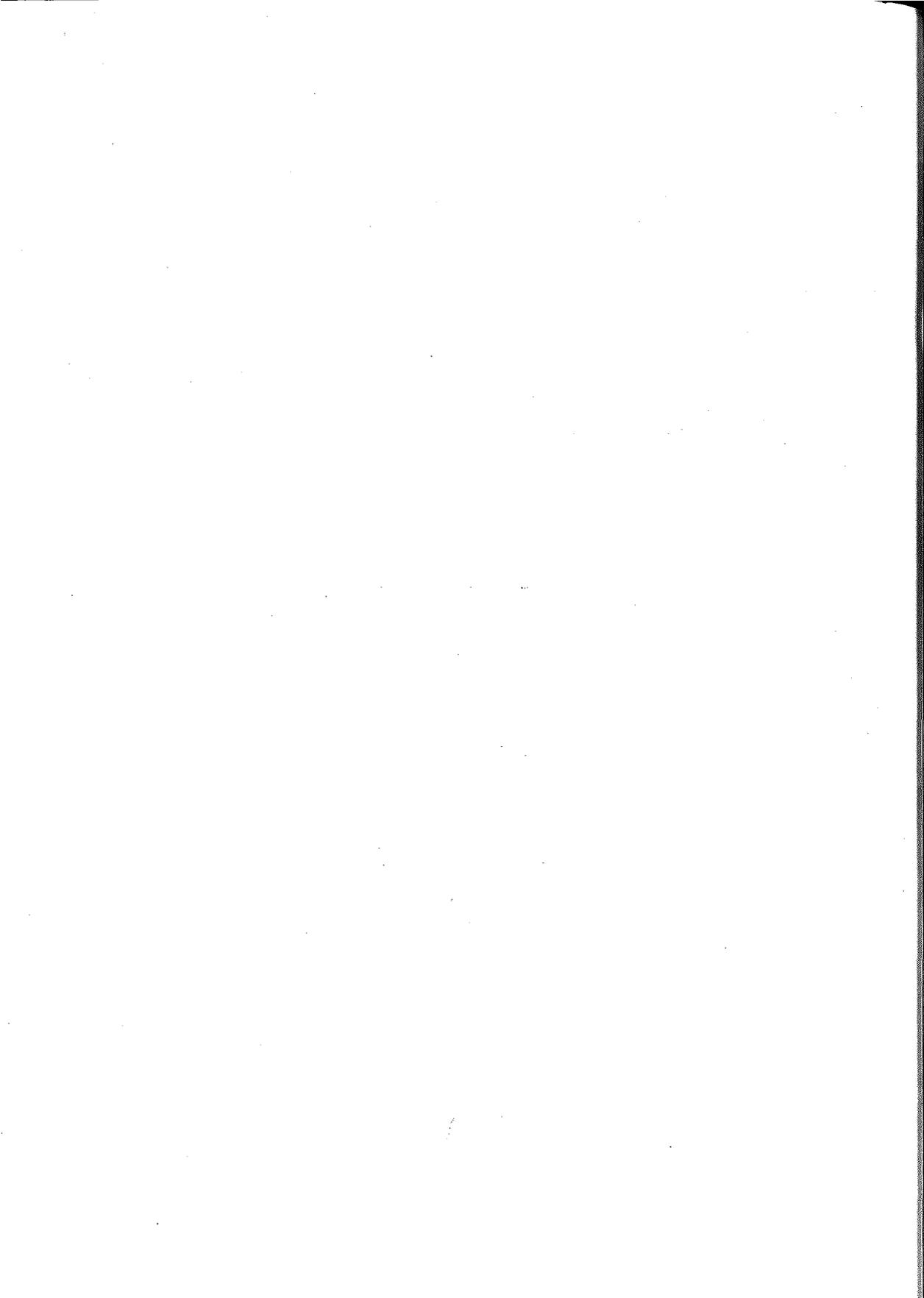
Fra le attività del Gruppo già portate a compimento va segnalata la stesura di un **glossario tematico** per il settore dei fertilizzanti che è stato pubblicato sul numero 13/2000 del settimanale L'Informatore Agrario.

I coordinatori, a nome di tutti gli aderenti a questo Gruppo, intendono ringraziare sin da ora tutti coloro che vorranno inviare suggerimenti e che intenderanno fornire la loro preziosa collaborazione per lo sviluppo delle attività in oggetto e dell'Osservatorio stesso.

e-mail:

Prof. Claudio Ciavatta: ciavatta@kaiser.alma.unibo.it - cciavat@tin.it

Prof. Paolo Nannipieri: nannip@iges.fi.cnr.it



METODI DI ANALISI

Francesco Alianiello¹, Liviana Leita² (*)

¹ Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

² Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via Trieste, 23 - 34170 Gorizia

Al gruppo di lavoro 11 "Metodi di analisi" afferiscono persone provenienti dal mondo della sperimentazione e ricerca e dal comparto produttivo dei fertilizzanti.

In linea generale, l'obiettivo principale che ispira l'attività del gruppo riguarda lo studio, la ricerca, la standardizzazione e proposizione di metodi di analisi per la caratterizzazione di fertilizzanti. Il lavoro viene affrontata in collaborazione con la IV Commissione della SISS (Fertilità del Suolo e Nutrizione delle Piante), che curerà la stesura del Manuale dei metodi di analisi. Si tratta di uno strumento indispensabile, che va ad aggiornare i metodi già esistenti ed a riempire vuoti presenti nella legislazione italiana. La discrasia tra le norme legislative e la loro applicabilità appare evidente se si considera che nel DL 748/84, da un verso viene indicata l'adozione della tecnica analitica della focalizzazione isoelettrica per la caratterizzazione delle matrici organiche in toto ed in miscela, ma dall'altro, la tecnica non è compresa tra quelle previste dai vigenti metodi ufficiali.

La ricerca nel campo dei fertilizzanti propone continuamente nuovi prodotti, con l'intento principale di coniugare la produttività alla difesa dell'ambiente: di molti tra questi prodotti è necessario rivisitare e mettere a punto tecniche analitiche ormai obsolete, o proporle ex novo alla luce delle acquisizioni scientifiche più recenti.

Le novità nel campo dei fertilizzanti coprono una gamma di prodotti molto vasta, come testimoniano le relazioni ad invito di questo convegno. Per quanto riguarda, ad esempio la gamma di fertilizzanti a lento rilascio ed inibitori della nitrificazione, si profila la necessità di reperire, oltre ai metodi necessari per la determinazione del singolo composto, anche della metodica analitica che permetta di determinare peculiari caratteristiche funzionali per la prevenzione della nitrificazione.

*Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti - Gruppo N. 11

Per quanto concerne le tematiche relative all'utilizzo di funghi simbiotici come biofertilizzatori, si apre il settore di indagine sui biofertilizzatori in cui si richiede la messa a punto di nuovi ed adeguati metodi analitici. Si deve infatti tenere presente che gran parte dei biofertilizzatori sono simbiotici obbligati che si moltiplicano su piante "trappola". L'approccio analitico deve quindi necessariamente essere veicolato nella direzione dello studio di protocolli analitici su base chimico-biologica, che comportano un lavoro di standardizzazione di non facile soluzione.

Un ulteriore campo di indagine riguarda lo studio della stabilità dei chelati e loro equilibri in miscela, per i quali si adottano metodi analitici che portano alla caratterizzazione delle singole strutture chelanti e ed alla misura delle relative costanti di stabilità, mentre non è ancora sufficientemente sviluppato il campo di indagine relativo alla determinazione della capacità metallo complessante dei prodotti. I metodi suggeriti a livello internazionale sono difficilmente trasferibili alla caratterizzazione di sostanze chelanti in miscela, per le quali è necessario valutare e quantificare le interferenze sia a livello della chimica analitica preparativa che di quella strumentale. Lo studio e la ricerca rappresentano, nel caso specifico, un elemento particolarmente complesso e delicato, soprattutto nella prospettiva di un ampliamento della gamma degli agenti chelanti in commercio, di quelli iscritti nella 748/84 (sette) e di quelli di ultimissima generazione.

Anche per quanto riguarda la ricerca analitica sulla caratterizzazione dei prodotti biostimolanti si ravvede la necessità di approntare e proporre protocolli di analisi essenzialmente biologici o biochimici che permettano di valutare l'efficienza biostimolante.

L'attività del gruppo 11 quindi si riconosce nell'interesse di studiare e mettere a punto metodi in sintonia con il progresso in campo analitico, attraverso un confronto tra realtà nazionali ed internazionali di ricerca e sperimentazione e, non ultimo, nella proposizione di ring test su specifiche tematiche che possano portare alla validazione e standardizzazione di protocolli analitici che potranno garantire la qualità dei prodotti, alla luce dei canoni di gestione ecocompatibile del suolo, a tutela delle colture e, non ultimo, a vantaggio di produttori e consumatori.

COLLEGAMENTO CON ALTRE SOCIETÀ INTERNAZIONALI

Paolo Sequi (*)

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

Attività svolta:

- Sono stati contattati i presidenti di 74 Società Internazionali della Scienza del Suolo in tutto il mondo, chiedendo se fossero interessati a partecipare all'attività in un gruppo di lavoro nell'ambito della ISSS sui concimi organici e gli ammendanti.

- Un questionario è stato divulgato in ognuna di queste Società Internazionali per individuare i campi di interesse di ogni scienziato.

- 37 di queste Società hanno risposto, comunicando come riferimento nazionale un "Refferee Scientist".

- Circa 100 questionari compilati ci sono pervenuti sino ad ora.

SHORT QUESTIONNAIRE (cross whenever applicable)

I am available to participate in the activities of:

- IUSS WORKING GROUP SOIL ORGANIC FERTILIZERS AND AMENDMENTS
- TECHNICAL COMMITTEE ON COMPOST

In my professional activity I am specially interested in:

- organic fertilizers (high nutrient content)
- organic amendments (low nutrient content)
- mineral fertilizers (please specify your main interests)
- other (specify)
- production processes
- trade (statistics, monitoring, etc.)
- other (please specify)
- analyses, general
- organic C analysis, including fractionation and characterization
- organic N analysis, including fractionation and characterization

*Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti – Gruppo N. 12

- analyses, other nutrients
- analyses, undesired elements
- analyses, other (please specify)
- crop production, yield and quality
- behaviour in soil of nutrients
- influence on soil physical properties
- use for bioremediation
- other (please specify)
- sanitary features
- heavy metals
- other undesired substances
- other health or environment related topics (please specify)

ISSS CONTATTATE NEI SEGUENTI PAESI:

Africa (Cairo)	Egitto	Paesi Bassi
Africa (Kenia)	Equador	Pakistan
Algeria	Etiopia	Polonia
Argentina	Filippine	Portogallo
Armenia	Finlandia	Repubblica Ceca
Australia	Francia	Romania
Austria	Georgia	Russia
Azerbaijan	Germania	Senegal
Bangladesh	Giappone	Slovacchia
Belgio	Gran Bretagna	Spagna
Bielorussia	Grecia	Sri-Lanka
Bosnia	Guatemala	Stati Uniti
Brasile	India	Sud Africa
Bulgaria	Indonesia	Sudan
Burundi	Iran	Svezia
Canada	Iraq	Svizzera
Cile	Israele	Thailandia
Cina	Lituania	Tunisia
Colombia	Malesia	Turchia
Corea del nord	Marocco	Ucraina
Corea del sud	Messico	Ungheria
Costarica	Moldavia	Venezuela
Croazia	Nigeria	Vietnam
Cuba	Norvegia	Zambia
Danimarca	Nuova Zelanda	Zimbawe

**ELENCO DEGLI SCIENZIATI DEI PAESI CONTATTATI CHE HANNO
ADERITO ALL'INIZIATIVA:**

Argentina	Ramon A. Rosell
Australia	Jonnie White; Dr. Creig Russel; Catherine Evans; Philip Mulvey
Austria	Dr. Michael Dachler
Belgio	Prof. J. Duffey; Dr. J.H.V. van Baren; Prof. Marc Culot
Bielorussia	Prof. Vitalij V. Lapa; Prof. Nikolaj Smeyan
Bosnia	Prof. Husnija Resulović; Mr. Esad Bukalo Dr. Elvedin Hanic'; Dr. Bahrija Saciragic Dr. Tidza Muhic-Sarac
Brasile	Prof. Eduardo de Sà Mendoça
Canada	Dr. Darwin W. Anderson
Cile	Dr. Itilie Salazar-Quintana; Dr. Edmundo Ganter Matias Errazuriz
Cina	Prof. Cao Zhi-hong; Prof. Jonathan Wong
Croazia	Prof. F. Basic
Danimarca	Prof. Biarne W. Strobel
Egitto	Prof. Hamed Hussien Salieh
Equador	Dr. Fausto Maldonado; Dr. Washington Padilla G.
Etiopia	Dr. Eyasu Mekonnen; Dr. Yesuf Assen
Filippine	Dr. Gina Villegas-Pangga; Taye Bekele
Finlandia	Dr. Martti Esala; Pasi Mattila; Ritva Makela-Kurtto
Francia	Dr. Marcel Jamagne; Dr. Marc Latham
Georgia	Prof. Urushadze Tengiz; Dr. David R. Kirvalidze
Germania	Dr. D. Steffen; Prof. Stahr K.; Dr. Klaus Dittert Dr. E. Pluquet; Dr. B. Scheffer
Gran Bretagna	Dr. Philip Brookes; Dr. David Powlson; Dr. Conrad Young
Grecia	Dr. Theodore Karyotis
India	(Dr. Narayanasamy); Prof. M. Vikram Reddy Dr. I.P.Abrol; Prof. K. Jeevan Rao
Italia	Prof. Claudio Ciavatta; Prof. Veriano Vidrich Prof. Andrea Buondonno; Prof. G. Pisciotta
Marocco	Dr. Soudi Brahim
Nigeria	Dr. Bernard Vanlauwe; Odunze Azybuike Chidowe Iwuafor E.N.O.
Norvegia	Dr. Trond Haraldsen
Paesi Bassi	Dr. Janssen Bert; Dr. P. de Visser; Dr. K.B. Zwart
Portogallo	Prof. M.F. Cabral; M.J. Souteiro Goncalves Herminia Domingues; Claudia Marques dos Santos Cordovil
Repubblica Ceca	Prof. J. Kulhavy; Ing. Barbora Badaliková; Ing. Blanka Procházková
Slovacchia	Dr. Pavel Jambor; Dr. P. Bielek; Dr. R. Bujnovsky Dr. N. Faltanova; Dr. Z. Kubicova; Dr. M. Medved Phd. S. Torma; Ing. O. Jurcova; Dr. G. Barancikova

Spagna	(Dr. Aguilar Ruiz); Dr. Raul Moral Herrero Dr. F. Guerrero Lopez; Prof. F. Gallardo Lancho
Stati Uniti	Prof. Donald L. Sparks; Dr. L. Bundy; Dr. G. Rehm
Sud Africa	Dr. Alec Wilson
Svizzera	Prof. Michel Aragno; Dr. Peter U. Luscher
Thailandia	Dr. Ssa P. Moncharoen
Tunisia	Dr. Mtimet Amor; Hrmrovni Hedi
Venezuela	Prof.ssa Carmen Riviero
Zambia	Dr. Obed I. Lungu; Dr. C. Malama

Indice Generale Volume 49 (2000)

Numero 1-2

**Proceedings of the International Congress "Soil Vulnerability and Sensitivity",
Florence, 18-21 October 1999**

- | | | |
|--|-----|--|
| R. Francaviglia, P. Scandella,
P. Sequi | 5 | Preface |
| The definition of the problem at international level | | |
| W.E.H. Blum | 7 | Soil resilience. The capacity of soil to react on stress |
| Y. Yokoi | 15 | Measuring the environmental impacts of agriculture. OECD agri-environmental indicators: soil related issues |
| F.O. Nachtergaele | 31 | Soil vulnerability evaluation and location fragility assessment |
| N.H. Batjes | 51 | Soil degradation status and vulnerability mapping in Central and Eastern Europe the SOVEUR project |
| Ongoing experiences at international level | | |
| J.M. Hollis | 69 | Spatial environmental information system for modeling the impact of chemicals |
| T. Prus, B. Vrščaj, F. Lobnik | 89 | Soil vulnerability and land use planning in Slovenia database |
| E. Van Ranst | 105 | Vulnerability of European forest soils to air pollution |
| Normative aspects | | |
| A. Martuccelli | 123 | La Legge nazionale per la difesa del suolo ed il ruolo dei Consorzi di Bonifica per la conservazione e tutela del suolo e dell'ambiente |
| Studies and possible solutions of the problem in Italy - Experiences at municipal level | | |
| A. Buscaroli, M. Gherardi,
G. Vianello | 139 | Investigations about soils and environmental vulnerability applied to the realization of municipal plan instruments |
| P.C. Tesi | 161 | Land planning for sustainable development: rural lands in the general land planning of the Italian Communes. Experience in the Sienese Chianti |
| F. Sacchetti | 183 | Zoning and land use: the case of Comune di Castel S. Pietro Terme, Bologna
e metodologie per una irrigazione ecocompatibile |
| - Experiences at province level | | |
| L. Baracco, V. Bassan, B. Basso,
P. Rosetti, A. Vitturi, P. Zangheri | 193 | Aquifer vulnerability and soil vulnerability. An application in the provinces of Padua and Venice of the Veneto regional regulation concerning mapping of soil suitability applied to spreading of livestock effluents |
| E.A.C. Costantini, L. Sulli | 219 | Land evaluation in areas with high environmental sensitivity and qualitative value of the crops: the viticultural and olive-growing zoning of the Siena province |
| - Experiences at regional level | | |
| R. Barberis, P. Nappi, P. Boschetti | 235 | Knowing the soil to protect the vulnerable and |

- sensitive areas. The role of the National Thematic Centre for soil and contaminated sites
- S. Brenna, R. Rasio 247 Valutazione della funzione protettiva dei suoli a supporto delle decisioni nella regione Lombardia
- A. D'Antonio, D. Tosco, 253 Aspects of soil sensitivity and vulnerability in
G. Aramini, F. Bellino, F. Guaitoli, Southern and Insular Italy
G.A. Di Lisa, M.G. Matranga, G. Loj,
M. Perciabosco, A. Pumo, T. Reale,
L. Viviano
- Experiences in parks and natural areas**
- G.T. Scarascia Mugnozza, 271 Interdisciplinary studies for the management of a
A. Tinelli, A. Benedetti sensitive natural areas
- Experiences at watershed level**
- C. Calzolari, F. Ungaro, E. Busoni, 287 The SINA project in the Padano-Veneto basin
N. Filippi, M. Guermandi, P. Tarocco,
S. Brenna, G. Michelutti, M. Piazzini,
I. Vinci
- M. Pagliai, P. Bazzoffi, 309 Soil physics and soil vulnerability in a typical
S. Pellegrini, N. Vignozzi, R. Papini watershed of the hilly area of Central Italy
- Poster Session**
- R. Marchetti, G. Ponzoni, 323 Simulating water flow in areas at environmental risk
P. Spallacci, E. Ceotto, with the MACRO model. Model evaluation with
F. Ungaro, C. Calzolari data from lysimetric studies
- S. Raimondi 331 Desertification and agricultural activity in the
inner parts of Catania (Sicily - Italy)
- E. Van Ranst, G. Callaert, 339 Sensitivity to acidification of acid forest soils in
B. Gellinck Flanders (Belgium)
- A. Castrignanò, G. Convertini, 351 A new geostatistical approach for assessing soil
N. Martinelli quality
- P. Giandon, I. Vinci, L. Fantinato 359 Heavy metal concentration in soils of the basing
draining in the Venice lagoon
- G. Michelutti, L. Bruggianesi, 367 Map of the soil attenuation capacity concerning
D. Buffoni, S. Zanolla groundwater pollutants. Friuli-Venezia Giulia plain
- L. Cavani, C. Ciavatta, N. Rossi 375 Environmental risk due to soil phosphorus accumu-
lation in farms with intensive animal husbandry
- S. Madrau, P. Mulè, M. Spano 381 First observations of a soil "catena" to evaluate the
vulnerability of the pasture areas in the Gollei
basaltic plateau of Orosei (central-eastern Sardinia)
- S. Lucci, C. Zaghi 389 Criteria to identify vulnerable areas according to
the legislative decree May 11 1999, n° 152 concern-
ing water pollution control
- G. Dessì, M. Deroma, P. Mulè, 401 Influence of grazing on soil degradation and evalua-
tion of the risk of desertification (Rio Astimini
Basin - North West Sardinia)
- L. Padovani, E. Capri, M. Trevisan 407 Potential risk of groundwater pollution from agri-
cultural non-point sources

Numero 3

Atti del Convegno "Strumenti informatici e statistici per la valutazione delle risorse ambientali" - Udine, 24-25 novembre 1999

- A.L. Vergine 415 "Dura lex, sed lex". I difficili rapporti tra cittadino e legislatore visti dal giurista: il caso del D.lgs. 152/99
- Sessione geostatistica**
- G. Bragato 427 Le procedure operative della geostatistica univariata
- A. Castrignanò, N. Martinelli 435 L'applicazione della geostatistica non parametrica alle scienze ambientali
- S. Bocchi 453 La zonazione del territorio per la gestione agronomica dei fanghi di depurazione con l'aiuto della geostatistica non lineare
- Sessione reti neurali e frattali**
- F. Benincasa, B. Arca, M. De Vincenzi 465 Le reti neurali nell'agrometeorologia
- A. Castrignanò, N. Martinelli 481 Applicazione della Geometria Frattale alla Fisica del Suolo
- Sessione modellistica**
- A. Cicogna, M. Gani, F. Danuso 505 Applicazioni modellistiche per la gestione e la pianificazione delle risorse idriche del territorio
- M. Trevisan, L. Padovani, E. Capri 529 Il rischio di contaminazione da xenobiotici nelle falde acquifere. Individuazione di aree a rischio a livello regionale mediante l'uso di strumenti informatici
- E. Capri, M. Trevisan, A. Vicari 555 Previsione della concentrazione dei prodotti fitosanitari nelle acque superficiali. Il ruolo dei modelli matematici nella valutazione dell'esposizione e del rischio
- Sessione Poster**
- G. Vitali 569 La trasformata *wavelet* nell'interpretazione agroclimatologica
- M. Moriondo, M. Mancini, S. Orlandini 581 Rappresentazione territoriale di modelli fenologici
- S. Raimondi, I. Poma, M. Lupo, M. Di Leo 591 Clima, pedoclima e rischi per l'attività vegetativa delle piante erbacee sui monti Sicani (Sicilia)
- C. Vischetti, A. Esposito, R. Francaviglia, A. Marchetti, M. Trevisan, A. Vicari 599 L'uso di modelli matematici per prevedere l'impatto ambientale dei fitofarmaci del tabacco a scala di bacino
- R. Marchetti, P. Spallacci, G. Ponzoni 609 Simulazione della lisciviazione dei nitrati da terreni liquamati in lisimetri: valutazione del modello SOILN
- D. Sacco, L. Zavattaro 615 Analisi geostatistica e fuzzy per la descrizione della variabilità territoriale sulla base della tessitura dei suoli
- D. Accogli, G. Arrivabene, R. Barsanti, P. Belloni, E. Bonari, S. Benvenuti, A. Coli, M. Ginanni, L. Gorreri, P. Lotti, E. Moscheni, S. Pampana, D. Piccotino, R. Risaliti, N. Silvestri, L. Valentini 625 L'attivazione di un sistema informativo territoriale per i terreni del Parco di Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli
- S. Bordignon, C. Gaetan, C. Pattaro 637 Un modello per la ricostruzione di dati pluviometrici mancanti
- S. Rigatti Luchini, A. Schiavon, M.C. Mason 647 Un possibile impiego della geostatistica in agricoltura per la costruzione di carte tematiche territoriali
- Appendice - Tavole a colori** 659-686 Tav. 1-28

Numero 4

Atti I Giornata Nazionale COST Action 831 "Biotecnologie del suolo: monitoraggio, conservazione e ripristino della fertilità biologica" - Roma, 14 dicembre 1999

Presentazione del progetto Azione COST 831

- A. Benedetti 691 Le biotecnologie del suolo per il monitoraggio, ripristino e conservazione della fertilità biologica

Presentazione delle attività dei Working Group

- S. Grego 697 Attività del Working Group 1 (WG1) Azione COST 831 "Soil-root-microbes interactions"
- F. Tittarelli 699 Attività del Working Group 2 (WG2) Azione COST 831 "Management of microbial resources to sustain and improve soil functions"
- N. Miclaus 703 Attività del Working Group 3 (WG3) Azione COST 831 "Molecular biology applied to soil microbial communities"
- L. Badalucco 707 Attività del Working Group 4 (WG4) Azione COST 831 "Microbial and biochemical methods to determine environmental impact"

Relazioni sull'attività svolta all'estero da borsisti italiani

- S. Marinari 713 Respirazione indotta dall'aggiunta di substrato nel suolo
- L. Falchini, P.J. Kuikman, P. Nannipieri 717 Ruolo di composti organici a basso peso molecolare sulle dinamiche del carbonio e dell'azoto
- F. Pinzari, H. Insam 729 Uso dell'impronta metabolica nella sistematica e nell'analisi del profilo fisiologico di comunità microbiche (CLPP - community level physiological profiles)
- C. Mondini 741 Analisi delle comunità microbiche per la caratterizzazione del grado di maturità dei compost
- M.T. Ceccherini, G. Pietramellara, M. Castaldini 753 La biologia molecolare applicata allo studio delle comunità microbiche del suolo
- A. Gelsomino 763 Studio della struttura della comunità batterica di un suolo olandese mediante metodi molecolari

Atti Giornata di Studio "Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti - Nuovi indirizzi per la produzione" - Pisa, 24 marzo 2000

Relazioni ad invito

- W. Zerulla 773 Controlled-release fertilizers and fertilizers with nitrification inhibitor
- P. Bonfante 787 I funghi simbiotici come biofertilizzatori: basi tecniche e prospettive di applicazione
- M. Saladini 793 Stabilità dei chelati e loro equilibrio in miscela
- E. Rea 803 Biostimolanti: problematiche e prospettive di impiego

Relazioni libere

- A. Coli, E. Moscheni, R. Risaliti 811 L'impiego dell'inibitore della nitrificazione 3,4 DMPP su frumento duro: effetti sulla produttività e sulla dinamica dei nitrati nel suolo
- M. Gatti, B. Taina, S. Silva 821 Impiego di urea stabilizzata con 3,4-dimetil-pirazolo fosfato in un terreno di risaia: I. Influenza sulla produzione e sulle perdite per lisciviazione di N nitrico

- S. Miele 829 Metilenurea liquida: risultati di un progetto di ricerca italiano
- A. Trinchera, A. Benedetti 837 Studio sull'ottimizzazione dei metodi di analisi dei fertilizzanti a lento rilascio ed a rilascio controllato
- S. Baccella, A.L. Botta, S. Manfroni, 851 Sanitizzazione di lettiere ovine con attinobatteri
C. Fiordigigli, M. Del Gallo, A. Lepidi
- A. Mori, L. Leita, C. Ciavatta, 853 Valutazione della capacità complessante di idrolizzati proteici ad uso fertilizzante
L. Cavani
- M. Quartieri, L. Cavani, 861 Effetto dei trattamenti fogliari con idrolizzati proteici di origine animale sull'attività vegetativa di piante di actinidia
B. Marangoni, M. Tagliavini
- F. Alianiello, F. Baroccio, 869 La focalizzazione isoelettrica come strumento per il riconoscimento delle matrici organiche
A. Benedetti
- O. Francioso, L. Cavani, 881 Caratterizzazione spettroscopica (DRIFT, ¹H-NMR) ed elettroforetica (EF) di torbe, leonarditi e ligniti
V. Tugnoli, C. Gessa
- A. Figliolia, G. Rossi, 891 Utilizzazione agricola di fanghi di depurazione: risultati di sperimentazioni a medio e breve termine
S. Socciarelli, B. Felici
- S. Grego, E. Mincione, 903 Dinamica e stabilità delle frazioni apolari durante il processo di compostaggio
D. Corradini, M. Mezzetti

Relazioni sull'attività svolta nel corso del primo anno dai Gruppi di Lavoro dell'Osservatorio Nazionale Permanente per i Fertilizzanti

- A. Benedetti, S. de Bertoldi, P. Sequi 913 Censimento dei concimi organici ed organo-minerali
- M. Adua 917 La distribuzione dei fertilizzanti in Italia
- S. Silva 941 Qualità di processi e prodotti
- F. Tittarelli 945 Biomasse
- C. Nigro 949 Sostanze ed elementi indesiderati
- M. de Bertoldi, F. Pinzari 951 Patogeni: posizione del problema
- A. Benedetti 963 Legislazione e Normazione
- F. Intrigliolo 977 Razionalizzazione dell'uso dei fertilizzanti e disciplinari di produzione
- S. Canali 981 Agricoltura biologica: la Circolare del MiPA sui fertilizzanti
- C. Ciavatta, P. Nannipieri 985 Pubblicazioni scientifiche
- F. Alianiello, L. Leita 989 Metodi di analisi
- P. Sequi 991 Collegamenti con altre Società Internazionali

Indice Generale Volume 49 (2000) I

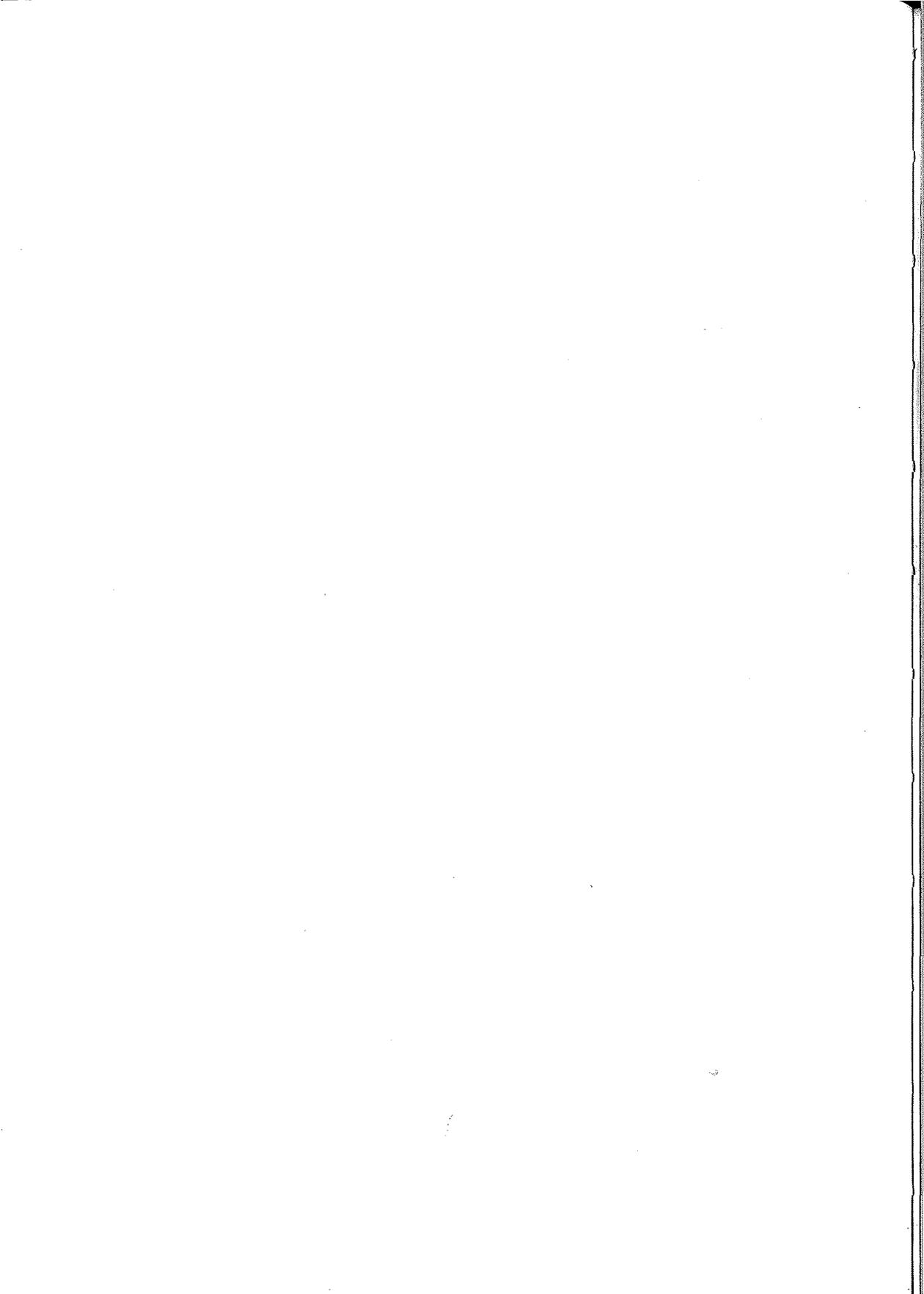
Indice degli Autori VI

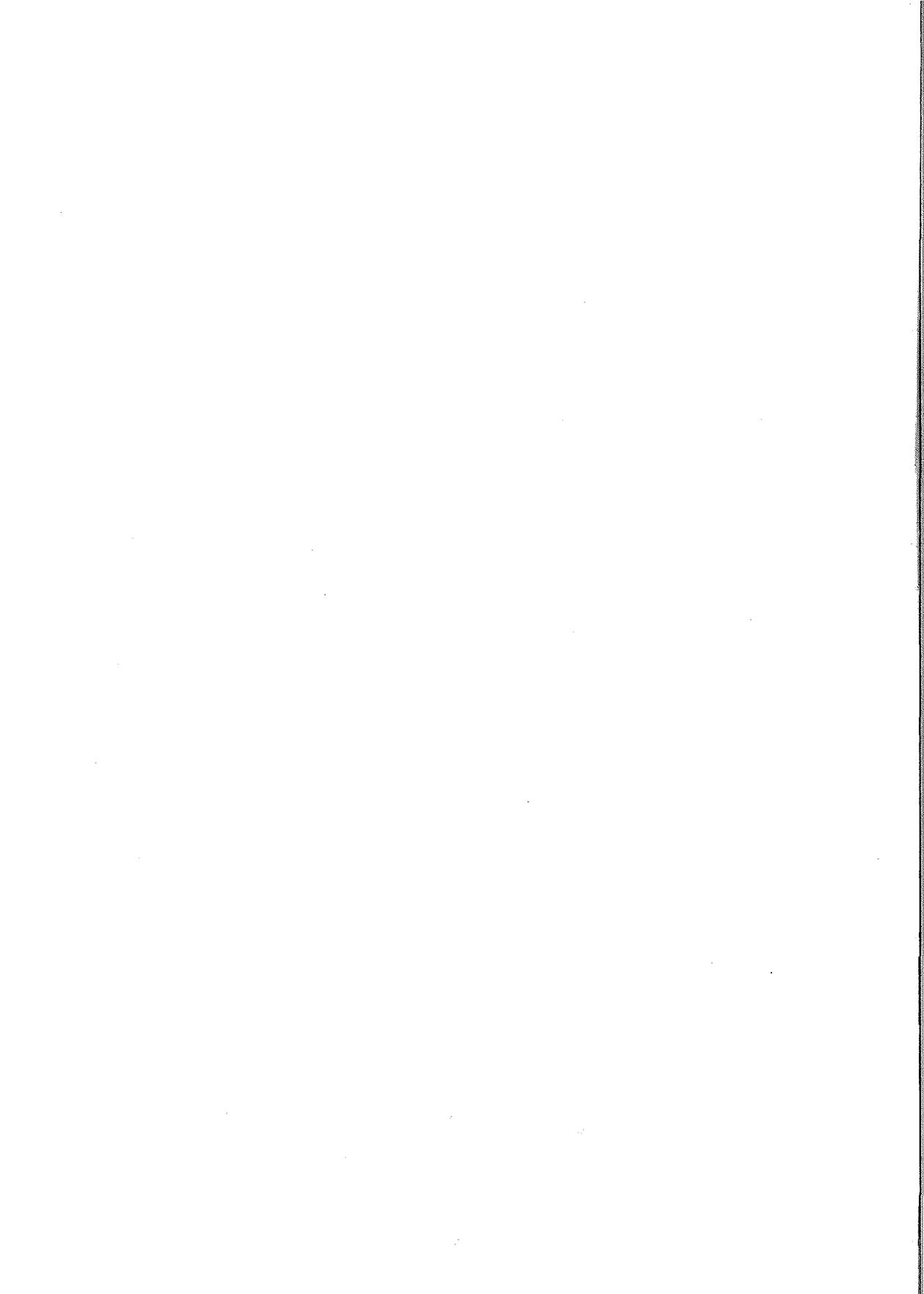
Indice degli Autori

(in parentesi il numero del fascicolo)

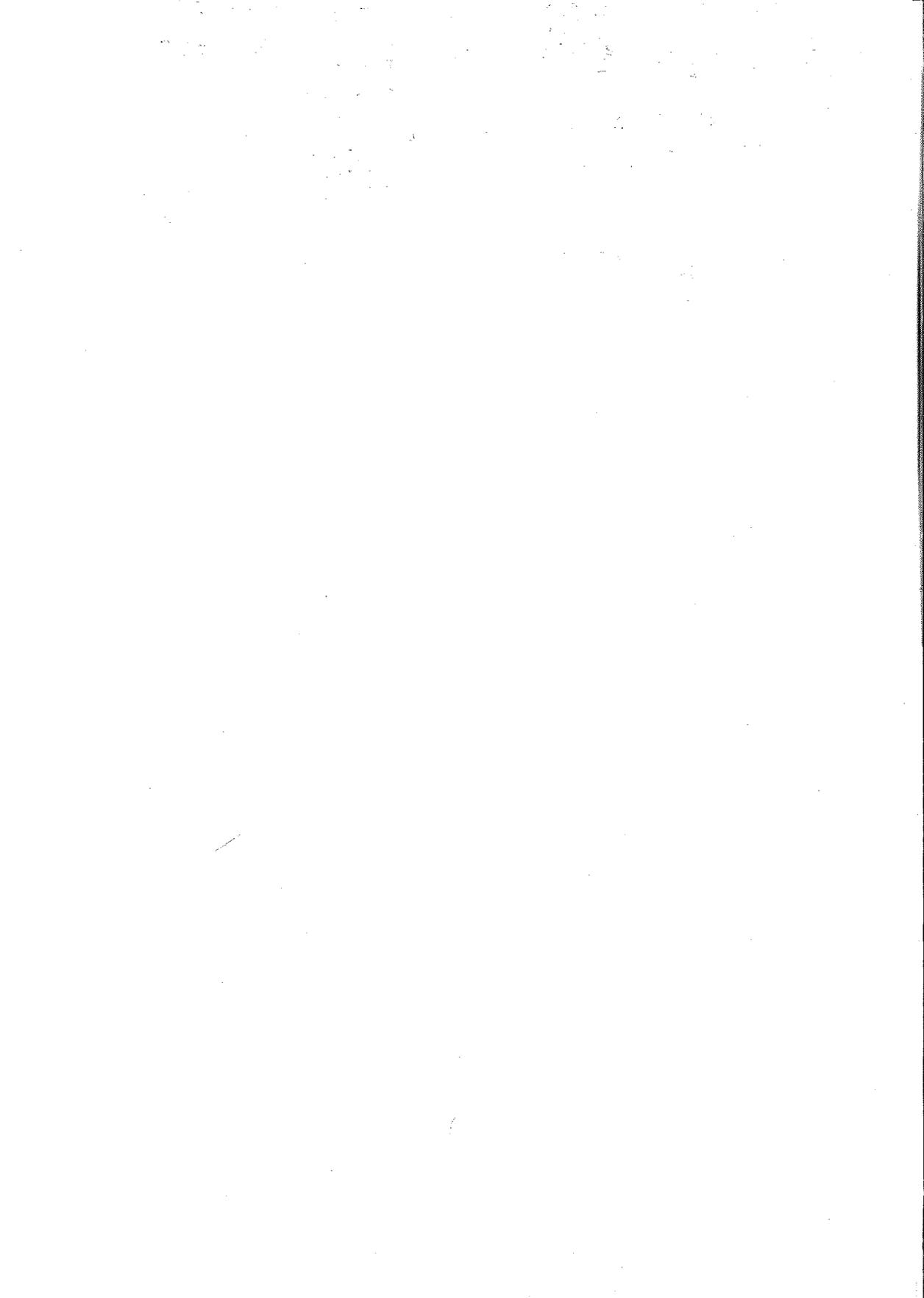
Accogli D.	625 (3)	Corradini D.	903 (4)	Matranga M.G.	253 (1-2)
Adua M.	917 (4)	Costantini E.A.C.	219 (1-2)	Mezzetti M.	903 (4)
Alianiello F.	869, 989 (4)	D'Antonio A.	253 (1-2)	Michelutti G.	287, 367 (1-2)
Aramini G.	253 (1-2)	Danuso F.	505 (3)	Miclaus N.	703 (4)
Arca B.	465 (3)	de Bertoldi M.	951 (4)	Miele S.	829 (4)
Arrivabene G.	625 (3)	de Bertoldi S.	913 (4)	Mincione E.	903 (4)
Baccella S.	851 (4)	Del Gallo M.	851 (4)	Mondini C.	741 (4)
Badalucco L.	707 (4)	Deroma M.	401 (1-2)	Mori A.	853 (4)
Barsanti R.	625 (3)	Dessi G.	401 (1-2)	Moriondo M.	581 (3)
Bellino F.	253 (1-2)	De Vincenzi M.	465 (3)	Moscheni E.	625 (3); 811 (4)
Belloni P.	625 (3)	Di Leo M.	591 (3)	Mulè P.	381, 401 (1-2)
Benedetti A.	271 (1-2); 691, 837, 869, 913, 963 (4)	Di Lisa G.A.	253 (1-2)	Nachtergaele F.O.	31 (1-2)
Benincasa F.	465 (3)	Esposito A.	599 (3)	Nannipieri P.	717, 985 (4)
Benvenuti S.	625 (3)	Falchini L.	717 (4)	Nappi P.	235 (1-2)
Baracco L.	193 (1-2)	Fantinato L.	359 (1-2)	Nigro C.	949 (4)
Barberis R.	235 (1-2)	Felici B.	891 (4)	Orlandini S.	581 (3)
Baroccio F.	869 (4)	Figliolia A.	891 (4)	Padovani L.	407 (1-2); 529 (3)
Bassan V.	193 (1-2)	Filippi N.	287 (1-2)	Pagliai M.	309 (1-2)
Basso B.	193 (1-2)	Fiordigigli C.	851 (4)	Pampana S.	625 (3)
Batjes N.H.	51 (1-2)	Francaviglia R.	5 (1-2); 599 (3)	Papini R.	309 (1-2)
Bazzoffi P.	309 (1-2)	Francioso O.	881 (4)	Pattaro C.	637 (3)
Blum W.E.H.	7 (1-2)	Gaetan C.	637 (3)	Pellegrini S.	309 (1-2)
Bocchi S.	453 (3)	Gani M.	505 (3)	Perciabosco M.	253 (1-2)
Bonari E.	625 (3)	Gatti M.	821 (4)	Piazzi M.	287 (1-2)
Bonfante P.	787 (4)	Gellinck B.	339 (1-2)	Piccotino D.	625 (3)
Bordignon S.	637 (3)	Gelsomino A.	763 (4)	Pietramellara G.	753 (4)
Boschetti P.	235 (1-2)	Gessa C.	881 (4)	Pinzari F.	729, 951 (4)
Botta A.L.	851 (4)	Gherardi M.	139 (1-2)	Poma I.	591 (3)
Bragato G.	427 (3)	Giandon P.	359 (1-2)	Ponzone G.	323 (1-2); 609 (3)
Brenna S.	247, 287 (1-2)	Ginanni M.	625 (3)	Prus T.	89 (1-2)
Bruggianesi L.	367 (1-2)	Gorneri L.	625 (3)	Pumo A.	253 (1-2)
Buffoni D.	367 (1-2)	Grego S.	697, 903 (4)	Quartieri M.	861 (4)
Buscaroli A.	139 (1-2)	Guaitoli F.	253 (1-2)	Raimondi S.	331 (1-2); 591 (3)
Busoni E.	287 (1-2)	Guermanni M.	287 (1-2)	Rasio R.	247 (1-2)
Callaert G.	339 (1-2)	Hollis J.M.	69 (1-2)	Rea E.	803 (4)
Calzolari C.	287, 323 (1-2)	Intrigliolo F.	977 (4)	Reale T.	253 (1-2)
Canali S.	981 (4)	Inzam H.	729 (4)	Rigatti Luchini S.	647 (3)
Capri E.	407 (1-2); 529, 555 (3)	Kuikman P.J.	717 (4)	Risaliti R.	625 (3); 811 (4)
Castaldini M.	753 (4)	Leita L.	853, 989 (4)	Rosetti P.	193 (1-2)
Castrignanò A.	351 (1-2); 435, 481 (3)	Lepidi A.	851 (4)	Rossi G.	891 (4)
Cavani L.	375 (1-2); 853, 861, 881 (4)	Lobnik F.	89 (1-2)	Rossi N.	375 (1-2)
Ceccherini M.T.	753 (4)	Loj G.	253 (1-2)	Sacchetti F.	183 (1-2)
Ceotto E.	323 (1-2)	Lotti P.	625 (3)	Sacco D.	615 (3)
Ciavatta C.	375 (1-2); 853, 881, 985 (4)	Lucci S.	389 (1-2)	Saladini M.	793 (4)
Cicogna A.	505 (3)	Lupo M.	591 (3)	Scandella P.	5 (1-2)
Coli A.	625 (3); 811 (4)	Madrau S.	381 (1-2)	Scarascia Mugnozza G.T.	
Convertini G.	351 (1-2)	Mancini M.	581 (3)		271 (1-2)
		Manfroni S.	851 (4)	Schiavon A.	647 (3)
		Marangoni B.	861 (4)	Sequi P.	5 (1-2); 913, 991 (4)
		Marchetti A.	599 (3)	Silva S.	821, 941 (4)
		Marchetti R.	323 (1-2); 609 (3)	Silvestri N.	625 (3)
		Marinari S.	713 (4)	Socciarelli S.	891 (4)
		Martinelli N.	351 (1-2); 435, 481 (3)	Spallacci P.	323 (1-2); 609 (3)
		Martuccelli A.	123 (1-2)	Spano M.	381 (1-2)
		Mason M.C.	647 (3)	Sulli L.	219 (1-2)
				Tagliavini M.	861 (4)

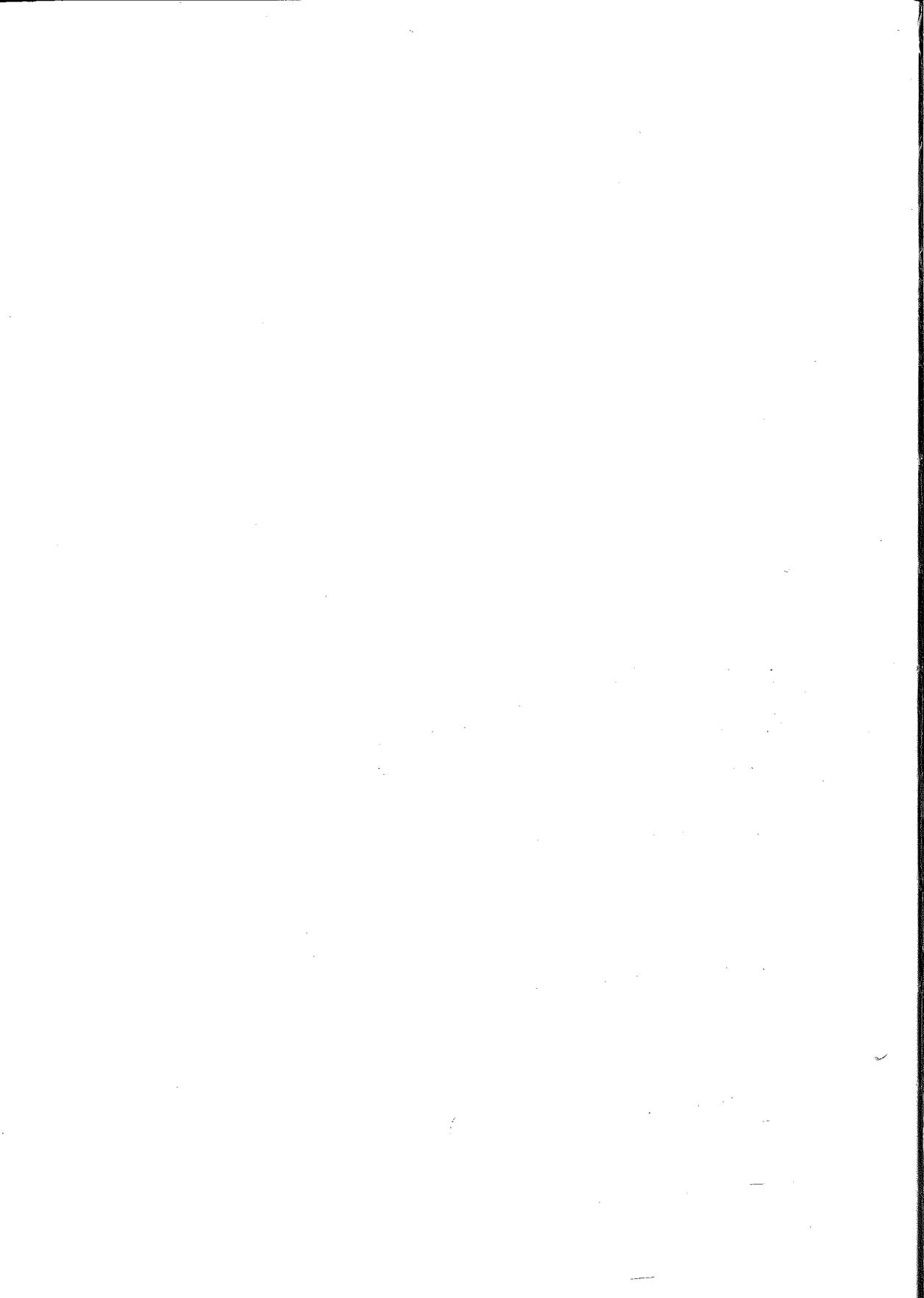
Taina B.	821 (4)
Tarocco P.	287 (1-2)
Tesi P.C.	161 (1-2)
Tinelli A.	271 (1-2)
Tittarelli F.	699, 945 (4)
Tosco D.	253 (1-2)
Trevisan M.	407 (1-2); 529, 555, 599 (3)
Trincherà A.	837 (4)
Tugnoli V.	881 (4)
Ungaro F.	287, 323 (1-2)
Valentini L.	625 (3)
Van Ranst E.	105, 339 (1-2)
Vergine A.L.	415 (3)
Vianello G.	139 (1-2)
Vicari A.	555, 599 (3)
Vignozzi N.	309 (1-2)
Vinci I.	287, 359 (1-2)
Vischetti C.	599 (3)
Vitali G.	569 (3)
Vitturi A.	193 (1-2)
Viviano L.	253 (1-2)
Vrščaj B.	89 (1-2)
Yokoi Y.	15 (1-2)
Zaghi C.	389 (1-2)
Zangheri P.	193 (1-2)
Zanolla S.	367 (1-2)
Zavattaro L.	615 (3)
Zerulla W.	773 (4)











EDIZIONE A CURA DEL COMITATO ISNP

Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma
Tel. 06-7005413, Fax 06-7005711

Registrato presso il Tribunale di Roma
il 07/04/1998 al n. 00138/98

PERIODICO TRIMESTRALE

ISSN - 0390-4865

Spedizione in A.P. - 45% - Art. 2 comma 20/B
L. 662/96 - Filiale di Roma

Direttore Responsabile

Prof. Paolo Sequi

Direttore Editoriale

Dr.ssa Rosa Francaviglia

Direttore Grafica e Impaginazione

Dr. Giampietro Diana

Segretario di Redazione

Sig. Filippo Ilardi

Stampa

Delta Grafica s.r.l. - Via G. Pastore, 9
06012 Città di Castello (PG)
Finito di stampare nel dicembre 2000

Comitato di Redazione

Prof. Paolo Sequi

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma
tel. 06 7005413 - fax 06 7005711 - e-mail psequi@isnp.it

Dr.ssa Rosa Francaviglia

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma
tel. 06 7005299 - fax 06 7005711 - e-mail r.francaviglia@isnp.it

Prof. Pietro Violante

Dipartimento di Scienze Chimico-Agrarie, Università di Napoli
Via dell'Università, 100 - 80085 Portici (NA)
tel. 081 7885206 - fax 081 7755130 - e-mail pieviola@unina.it

Prof. Angelo Arua

Dipartimento di Scienza delle Terra, Università di Cagliari
Via Trentino, 51 - 09100 Cagliari
tel. 070 2006239 - fax 070 282236 - e-mail arua@vaxcal.unica.it

Prof. Paolo Nannipieri

Dipartimento di Scienza del Suolo e Nutrizione della Pianta
Università di Firenze, P.le delle Cascine, 15 - 50144 Firenze
tel. 055 32881 - fax 055 333273 - e-mail nannip@cscs.fi.cnr.it

Presidenza e Segreteria: Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma
Tel. 06-7005413, Fax 06-7005711
e-mail: psequi@isnp.it; r.francaviglia@isnp.it

Sito: <http://www.siss.isnp.it>