

Analisi della biodiversità del suolo – Caso Studio

Stefano Mocali

CRA- Centro di Ricerca per lo Studio delle Relazioni tra Pianta e Suolo

Caso studio Trotta

In questo caso specifico, le analisi sono state condotte su campioni di suolo già precedentemente prelevati per la valutazione della qualità dei suoli. Infatti, l'azienda considerata pratica su tutti gli appezzamenti dedicati a seminativi una rotazione quadriennale che prevede l'alternarsi di grano, avena (in genere in erbaio da sfalciare a fine aprile-maggio), brassica e maggese. Pertanto poiché la biodiversità microbica del suolo, a differenza di quella animale e vegetale non varia tanto con le colture allevate quanto soprattutto con la tipologia e la qualità del terreno (Fierer and Jackson, 2006; Girvan et al. 2003), in questo caso specifico le analisi sono state condotte su campioni già disponibili e precedentemente prelevati.



Protocollo applicativo

1. Valutazione del territorio
2. Campionamento (già fatto!)
3. Trattamento campione
4. Analisi (indicatori di I° livello)
 - Caratterizzazione chimico-fisica
 - Determinazione dei parametri microbiologici
5. Trattamento dei risultati (calcolo dell'IBF)

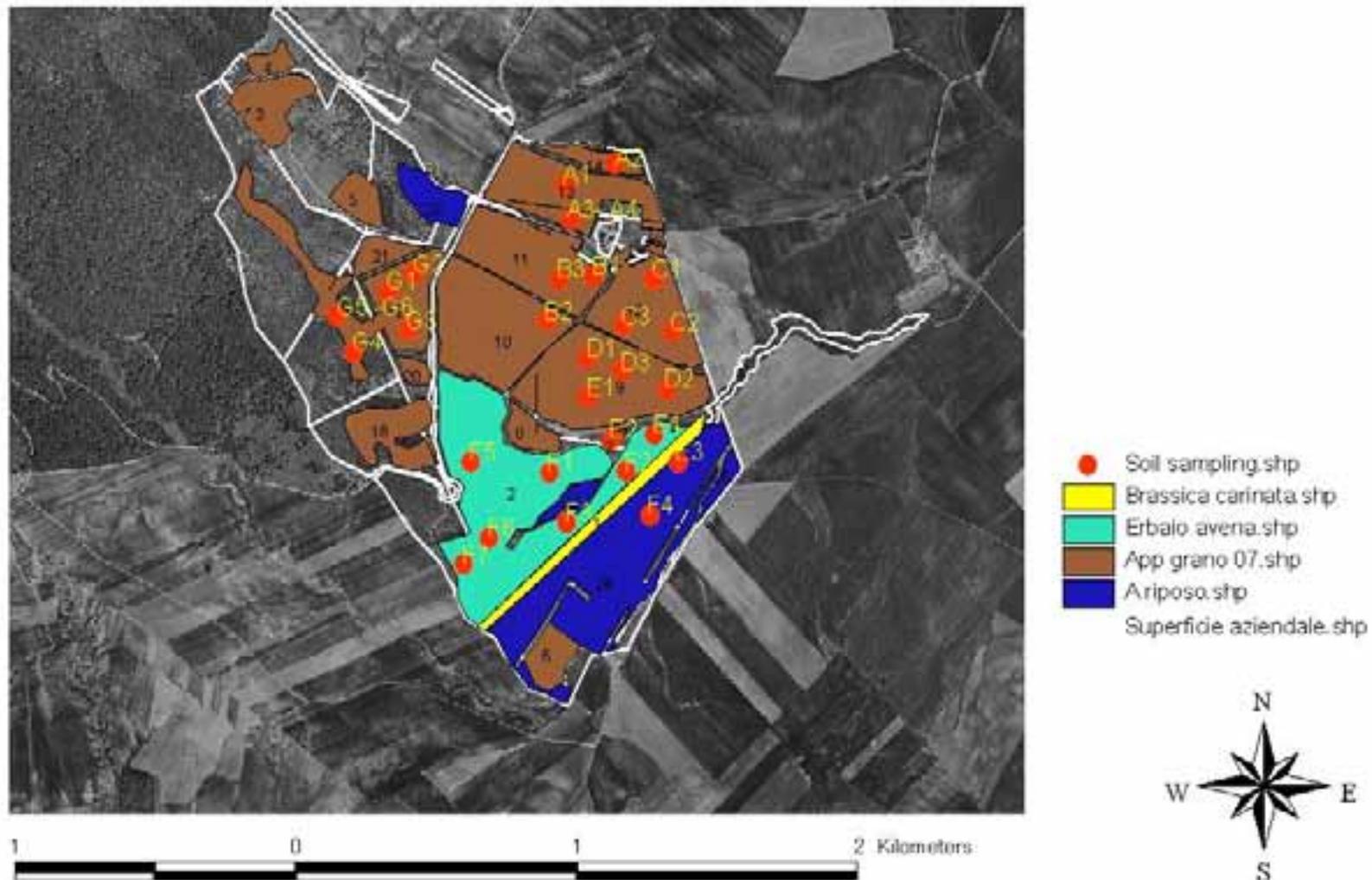
1 - VALUTAZIONE DEL TERRITORIO

Il **sopralluogo** rappresenta il primo passo utile alla comprensione della natura e delle caratteristiche del sito individuato. A questo livello viene effettuata la prima raccolta di informazioni.

L'agricoltore rappresenta la fonte di informazione più preziosa in merito all' **uso del suolo** e a situazioni particolari specifiche di quella determinata area.



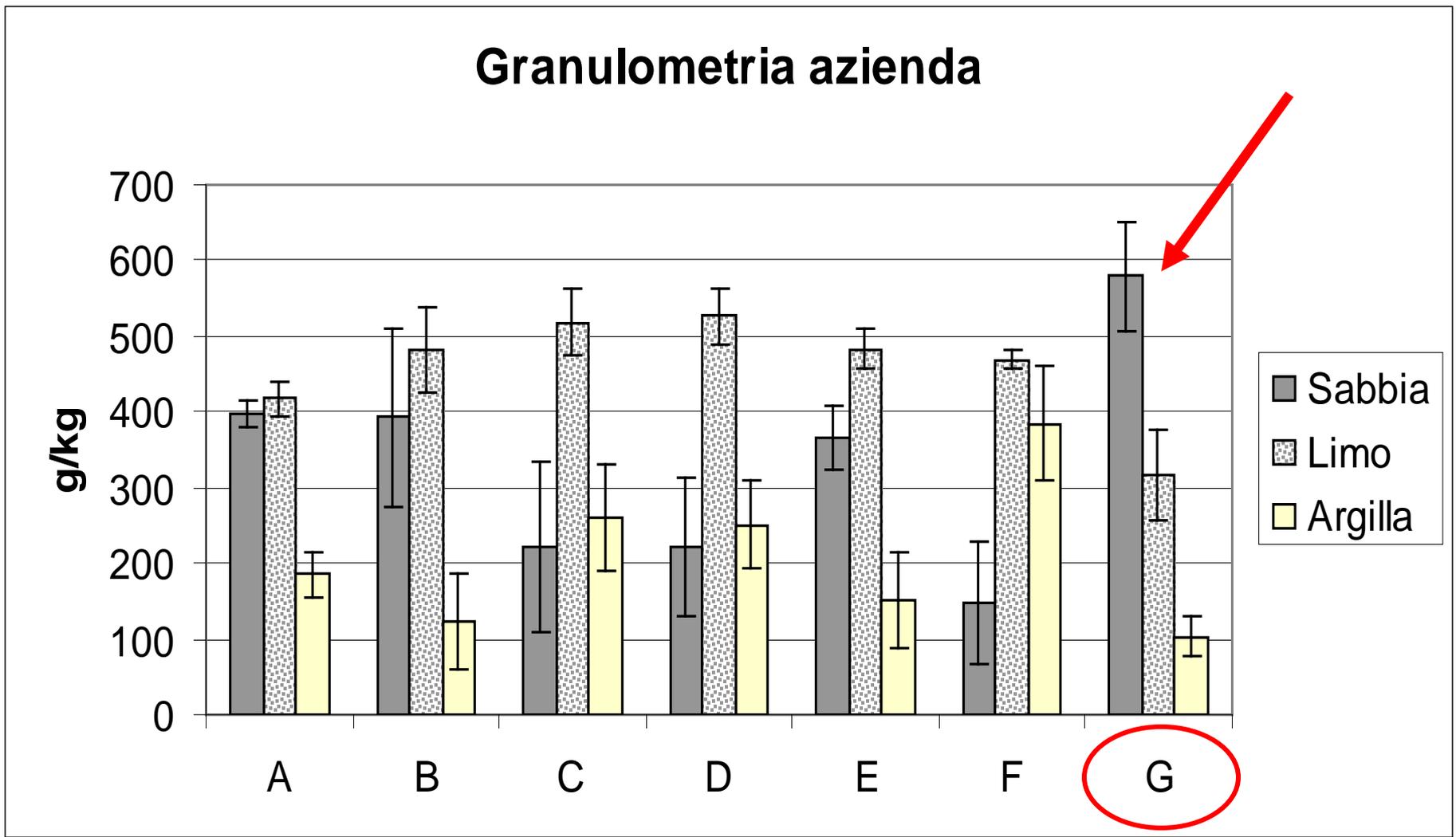
2 - Campionamento Azienda Trota (Gravina in Puglia)



Principali caratteristiche chimico-fisiche dell'azienda di Gravina in Puglia

Campione		A	B	C	D	E	F	G
Sabbia	g/kg	397,5 (18,4)	393,3 (117,8)	222,3 (112,8)	221,3 (90,5)	365,3 (42,1)	146,7 (81,6)	579,8 (72,2)
Limo	g/kg	417,8 (22,2)	482,3 (55,3)	517,7 (43,8)	527,3 (37,1)	483,3 (26,4)	468,7 (12,2)	316,8 (60,8)
Argilla	g/kg	184,8 (29,3)	124,3 (63,8)	260,0 (69,3)	251,3 (56,9)	151,3 (64,1)	384,7 (76,5)	103,5 (25,0)
Tessitura (USDA)		Limosa	Limosa	Franco Limosa	Franco Limosa	Limosa	Franco Argilloso- Limosa	Sabbioso Limosa
pH (in H ₂ O, 1:2,5)		8,4 (0,1)	8,3 (0,2)	8,3 (0,2)	8,3 (0,1)	8,2 (0,1)	8,4 (0,2)	8,2 (0,1)
Carbonati		119,0 (68,8)	102,3 (42,7)	136,7 (44,3)	119,0 (33,7)	70,7 (23,7)	187,3 (12,7)	99,8 (39,5)
TOC	g/kg	9,1 (0,5)	6,5 (0,1)	9,0 (0,2)	8,3 (0,7)	7,3 (0,1)	4,8 (0,3)	8,1 (0,4)
Sostanza Organica	%	1,57 (0,86)	1,12 (0,17)	1,55 (0,34)	1,43 (0,12)	1,26 (0,17)	0,83 (0,05)	1,39 (0,07)
Azoto totale	g/kg	0,8 (0,1)	0,8 (0,2)	1,1 (0,1)	1,2 (0,1)	1,4 (0,6)	1,2 (0,1)	1,2 (0,3)

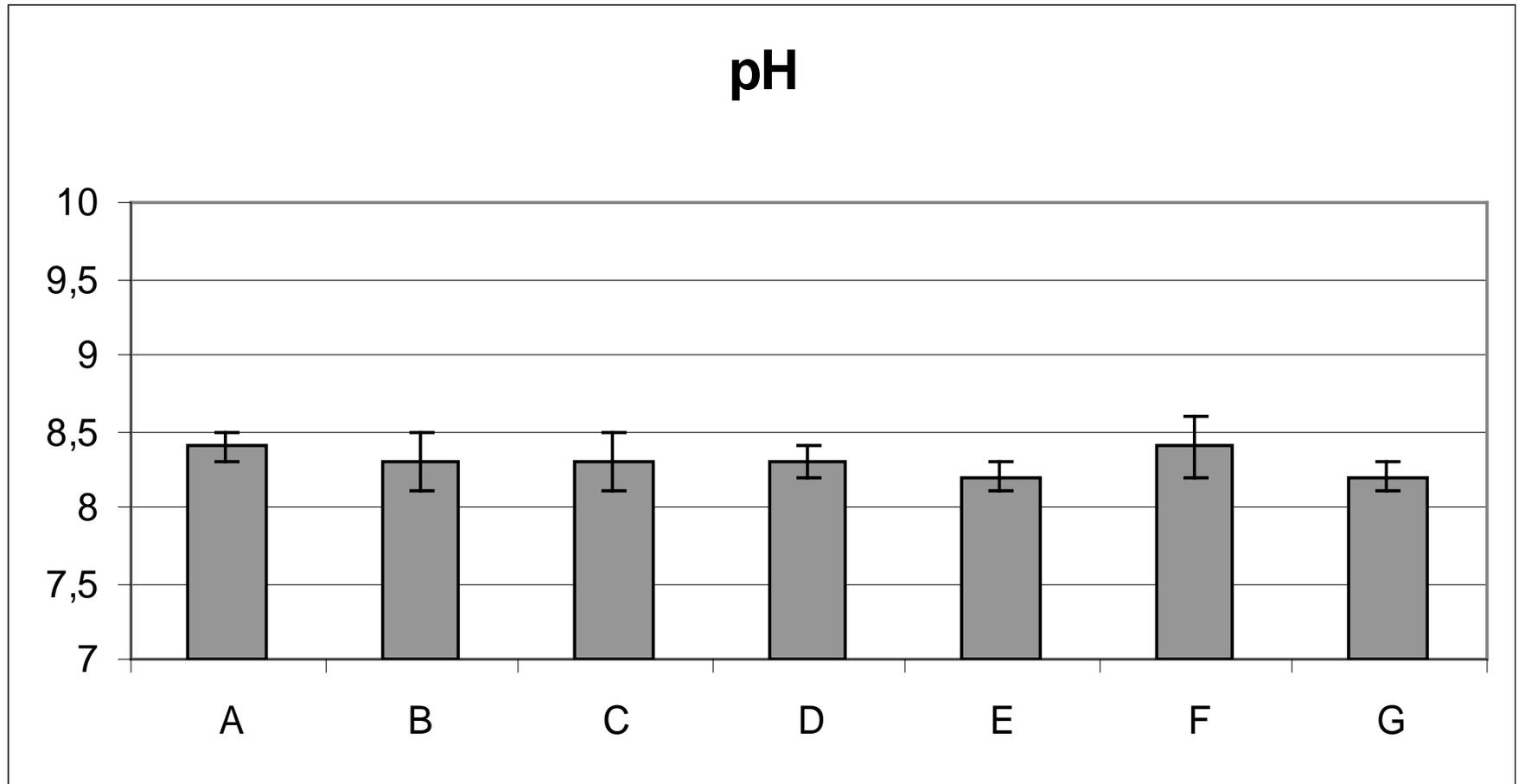
Granulometria azienda



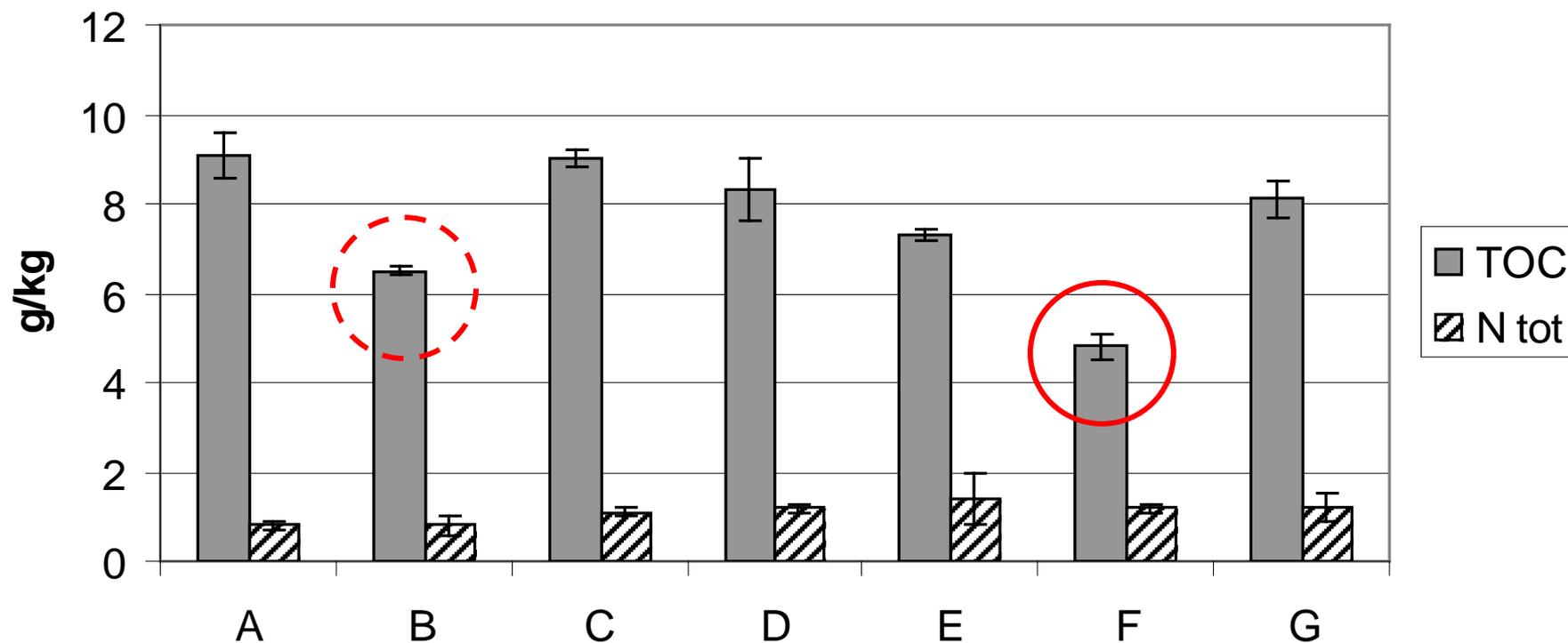


- Soil sampling.shp
- Brassica carinata.shp
- Erbaio avena.shp
- App grano 07.shp
- A riposo.shp
- Superficie aziendale.shp





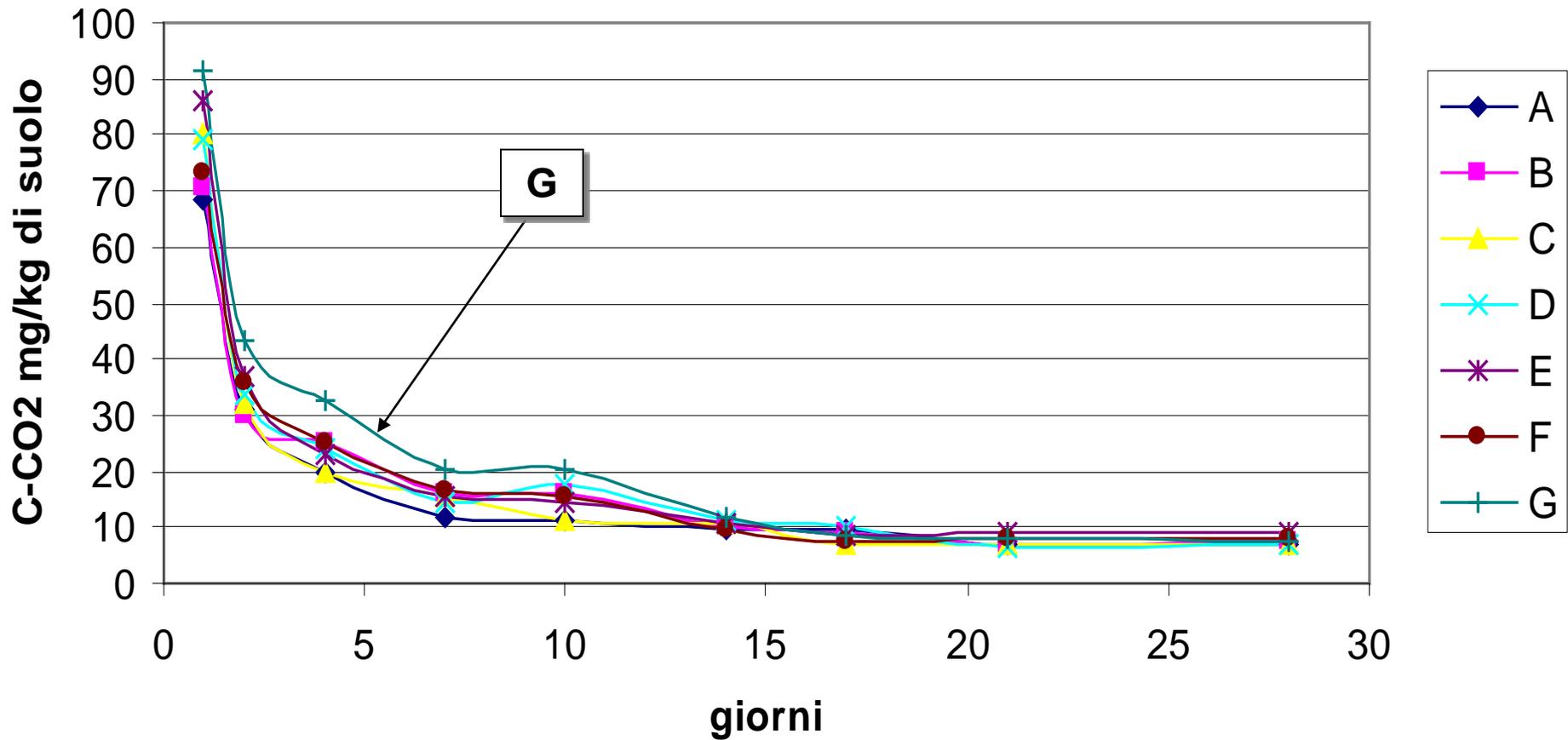
Carbonio org. e azoto totale



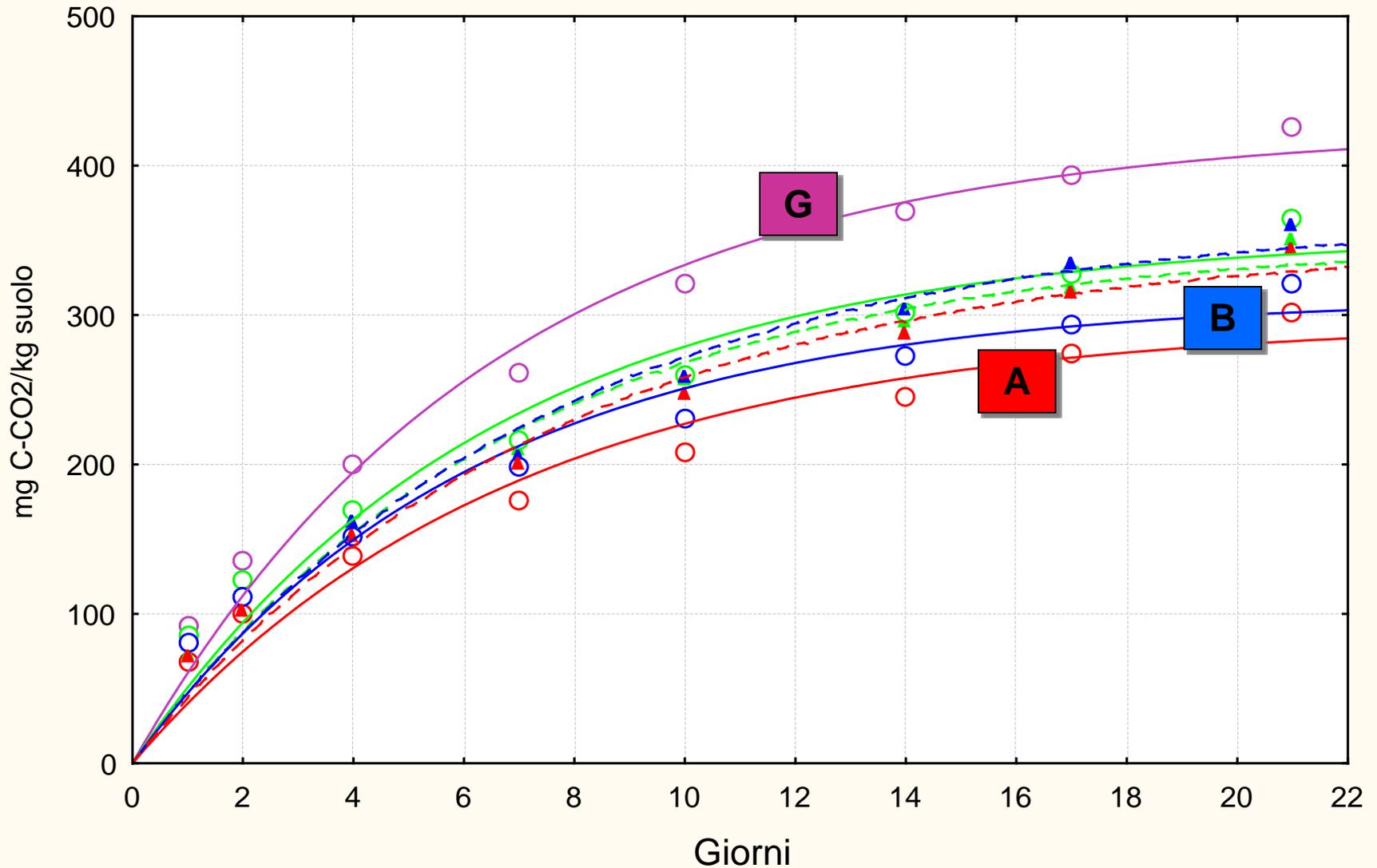
Analisi microbiologiche

Campione		A	B	C	D	E	F	G
C_{mic}	mg C/kg suolo	151,5 (19,3)	114,5 (13,3)	103,5 (14,6)	170,4 (26,0)	196,5 (6,6)	132,8 (27,8)	153,0 (18,0)
C₀	mg C-CO ₂ /kg suolo	296,5 (14,4)	350,3 (13,4)	311,8 (16,3)	365,9 (13,6)	354,5 (15,5)	349,9 (14,5)	425,7 (15,3)
C_{bas}	mg C-CO ₂ /kg suolo	6,86 (0,93)	7,12 (0,18)	7,01 (0,45)	6,62 (0,13)	9,25 (0,21)	7,96 (0,18)	7,77 (0,44)
q(CO₂)		0,188	0,259	0,282	0,162	0,196	0,249	0,211
qM		0,75	1,10	0,78	0,80	1,27	1,66	0,96

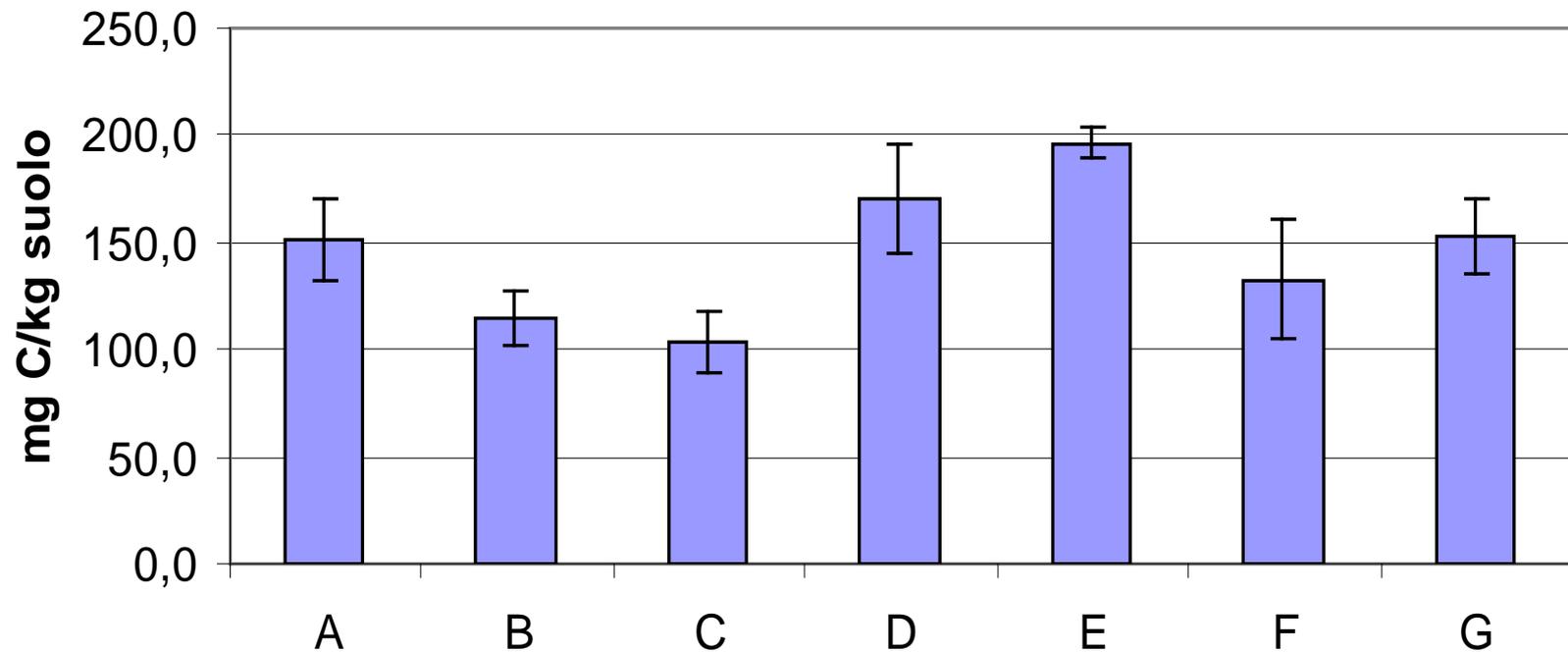
Respirazione basale azienda Trotta



Respirazione cumulativa (potenziale)

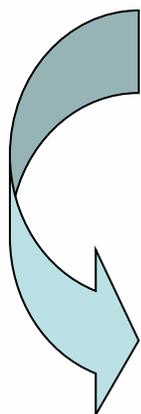


Biomassa microbica (Cmic)



Calcolo dell'IBF

<u>Parametri utilizzati</u>	Punteggio				
	1	2	3	4	5
Sostanza organica	<1	1 – 1,5	1,5 – 2	2 – 3	>3
Respirazione basale	<5	5 – 10	10 – 15	15 – 20	>20
Respirazione cumulativa	<100	100 – 250	250 – 400	400 – 600	>600
Carbonio microbico	<100	100 – 200	200 – 300	300 – 400	>400
Quoziente metabolico	>0,4	0,3 – 0,4	0,2 – 0,3	0,1 – 0,2	<0,1
Quoziente di mineralizzazione	<1	1 – 2	2 – 3	3 – 4	>4



	A	B	C	D	E	F	G
Sostanza organica	3	2	3	2	2	1	2
Respirazione basale	2	2	2	2	2	2	2
Respirazione cumulativa	3	3	3	3	3	3	4
Carbonio microbico	2	2	2	2	2	2	2
Quoziente metabolico	4	3	3	4	4	3	3
Quoziente di mineralizzazione	1	2	1	1	2	2	1
IBF	15	14	14	14	15	13	14

Non sono state rilevate differenze significative tra i differenti punti dell'azienda presa in considerazione, in linea con i parametri chimico-fisici riportati in tabella 1. Il valore medio di IBF aziendale è **14,1**.

<i>Classe di Fertilità</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>
	stanchezza allarme	stress preallarme	media	buona	alta
IBF	0-6	6-12	12-18	18-24	24-30

Sulla base del punteggio di IBF ottenuto, tutti i campioni analizzati rientrano nella classe di fertilità **MEDIA**. Pertanto il livello di biodiversità aziendale dei suoli analizzati, direttamente correlato con l'indice IBF, risulta essere medio.

Azienda PACE

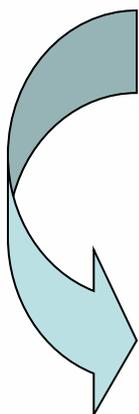
- Valutazione del territorio
- Campionamento (già fatto!)
- Trattamento campione
- Analisi (indicatori di I° livello)
 - Caratterizzazione chimico-fisica
 - Determinazione dei parametri microbiologici
- Trattamento dei risultati (calcolo dell'IBF)

Analisi microbiologiche

Campione		1-3	5-7	8-9
C_{mic}	mg C/kg suolo	62,5 (33,7)	71,9 (9,3)	63,1 (4,2)
C_{cum}	mg C-CO ₂ /kg suolo	230,4 (14,4)	224,6 (13,4)	226,3 (16,3)
C_{bas}	mg C-CO ₂ /kg suolo	6,17 (1,21)	6,91 (0,08)	5,89 (0,54)
q(CO ₂)		0,411	0,400	0,389
qM		1,14	1,73	0,71

Calcolo dell'IBF

<u>Parametri utilizzati</u>	Punteggio				
	1	2	3	4	5
Sostanza organica	<1	1 – 1,5	1,5 – 2	2 – 3	>3
Respirazione basale	<5	5 – 10	10 – 15	15 – 20	>20
Respirazione cumulativa	<100	100 – 250	250 – 400	400 – 600	>600
Carbonio microbico	<100	100 – 200	200 – 300	300 – 400	>400
Quoziente metabolico	>0,4	0,3 – 0,4	0,2 – 0,3	0,1 – 0,2	<0,1
Quoziente di mineralizzazione	<1	1 – 2	2 – 3	3 – 4	>4



	A	B	C
Sostanza organica	1	1	2
Respirazione basale	2	2	2
Respirazione cumulativa	2	2	2
Carbonio microbico	1	1	1
Quoziente metabolico	1	2	2
Quoziente di mineralizzazione	2	2	1
IBF	9	10	10

<i>Classe di Fertilità</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>
	stanchezza allarme	stress preallarme	media	buona	alta
IBF	0-6	6-12	12-18	18-24	24-30

L'azienda Trotta presenta un valore di IBF maggiore rispetto a quello dell'azienda Pace, pertanto il suo livello di biodiversità a livello di suolo è superiore!

Caso studio Maccarese

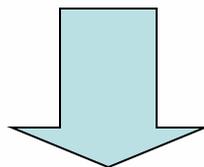
Il campo dell'azienda è stato trattato con agenti fumiganti (1,3-dicloropropene) per oltre 20 anni per combattere i nematodi che danneggiavano la coltura. Tuttavia i fumiganti hanno provocato anche gravi problemi di biodiversità e sostenibilità a livello di suolo.

Sono stati quindi applicati alcuni indicatori per valutare il grado di fertilità biologica del suolo e, soprattutto, della sua diversità microbica



La caratterizzazione chimica-fisica di base del suolo non ha evidenziato differenze significative nella tessitura (sabbiosa-franca) nel campo: un elevato contenuto in sabbia (92%), un pH pari a 8,3 e un basso contenuto in azoto totale (0,4 g/kg).

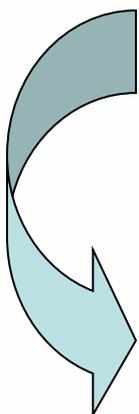
Campione	TOC	C_{bas}	C_{cum}	C_{mic}
	g/kg	mg C-CO ₂ /kg suolo	mg C-CO ₂ /kg suolo	mg C/kg suolo
Suolo non trattato	0,52 (0,06)	3,9 (0,3)	109,3 (7,1)	52,8 (11,5)



Campione	S.O.	qCO₂	qM
	g/kg	mg C-CO ₂ /kg suolo	mg C-CO ₂ /kg suolo
Suolo non trattato	0,90 (0,09)	0,150 (0,047)	2,10 (0,24)

Calcolo dell'IBF

Parametri utilizzati	Punteggio				
	1	2	3	4	5
Sostanza organica	<1	1 – 1,5	1,5 – 2	2 – 3	>3
Respirazione basale	<5	5 – 10	10 – 15	15 – 20	>20
Respirazione cumulativa	<100	100 – 250	250 – 400	400 – 600	>600
Carbonio microbico	<100	100 – 200	200 – 300	300 – 400	>400
Quoziente metabolico	>0,4	0,3 – 0,4	0,2 – 0,3	0,1 – 0,2	<0,1
Quoziente di mineralizzazione	<1	1 – 2	2 – 3	3 – 4	>4



<u>Parametri analizzati</u>	<u>Punteggi assegnati</u>
Sostanza organica	1
Respirazione basale	1
Respirazione cumulativa	2
Carbonio microbico	1
Quoziente metabolico	2
Quoziente di mineralizzazione	3
IBF	10

Confronto Maccarese-Pace

La somma algebrica dei punteggi assegnati a ciascun parametro indica un suolo di classe di fertilità biologica II, ovvero in condizioni di **stress**.

La scarsa fertilità biologica e il basso contenuto di sostanza organica sono indici di bassa biodiversità.

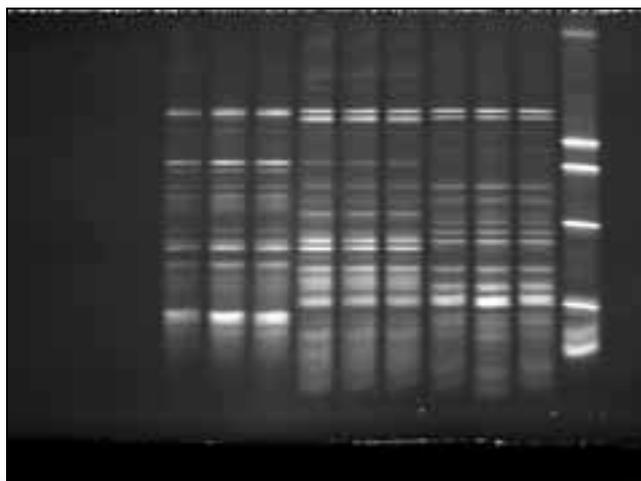
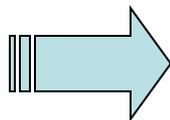
<u>Parametri analizzati</u>	Maccarese	Pace (C)
Sostanza organica	1	2
Respirazione basale	1	2
Respirazione cumulativa	2	2
Carbonio microbico	1	1
Quoziente metabolico	2	2
Quoziente di mineralizzazione	3	1
IBF	10	10

Indici di II° livello: analisi ARDRA

Allo scopo di “misurare” il grado di diversità microbica, è stata deciso di analizzare inizialmente la componente coltivabile dei microrganismi del suolo. Pertanto, dopo aver effettuato l'estrazione delle cellule dal suolo, sono state fatte crescere su piastra Petri in un terreno di coltura massimo. E' stata osservata la crescita di poche colonie batteriche molto simili tra loro.

A questo punto è stato estratto il DNA totale da ciascuna colonia e amplificato il 16S rDNA. Mediante analisi di restrizione del DNA amplificato è stato possibile ottenere il profilo ARDRA (aplotipi) di ciascun campione.

Ad aplotipi uguali corrispondono specie batteriche uguali, perciò sono stati individuati e raggruppati tutti i batteri isolati sulla base del loro profilo ARDRA.



**Ci sono solo
3 specie
batteriche
(aplotipi) !!**

Che fare?

Sono quindi stati testati quattro differenti trattamenti allo scopo di individuare quello che potesse recuperare meglio la fertilità biologica e la diversità microbica ad essa associata.

- 1. Fertirrigazione NPK, (F)**
- 2. Fertirrigazione + Compost, 10t/ha (F+C)**
- 3. Compost x 2, 20 t/ha (C2)**
- 4. Compost x 4, 40 t/ha (C4)**

Dopo 2 mesi sono stati nuovamente effettuati i campionamenti al fine di valutare l'effetto dei trattamenti. Sono perciò stati applicati nuovamente gli indicatori di I° livello.



Campione	TOC	C _{bas}	C _{cum}	C _{mic}
	g/kg	mg C-CO ₂ /kg suolo	mg C-CO ₂ /kg suolo	mg C/kg suolo
Suolo non trattato (T)	0,29 (0,04)	4,9 (0,3)	97,2 (38,7)	81,8 (16,5)
F	0,35 (0,01)	4,9 (1,3)	199,5 (62,1)	93,8 (14,1)
F+C	0,46 (0,03)	5,2 (1,3)	213,2 (44,2)	94,4 (17,3)
C2	0,54 (0,04)	5,4 (1,5)	253,7 (54,8)	184,6 (16,9)
C4	0,62 (0,03)	6,5 (0,6)	315,9 (48,9)	353,4 (41,3)

Campione	S.O.	qCO ₂	qM
	g/kg	mg C-CO ₂ /kg suolo	mg C-CO ₂ /kg suolo
Suolo non trattato (T)	0,50 (0,09)	0,249 (0,110)	3,35 (0,24)
F	0,60 (0,01)	0,217 (0,037)	5,70 (0,31)
F+C	0,79 (0,08)	0,229 (0,068)	4,63 (0,42)
C2	0,95 (0,06)	0,121 (0,044)	4,70 (0,28)
C4	1,07 (0,09)	0,077 (0,012)	5,09 (0,19)

<u>Parametri analizzati</u>	<u>Punteggi assegnati</u>				
	T	F	F+C	C2	C4
Sostanza organica	1	1	1	1	2
Respirazione basale	1	1	1	1	2
Respirazione cumulativa	1	2	2	3	3
Carbonio microbico	1	1	1	2	4
Quoziente metabolico	3	3	3	4	5
Quoziente di mineralizzazione	4	5	5	5	5
IBF	11	13	13	16	21

Come si può osservare dalla tabella, i punteggi di IBF classificano il suolo non trattato (T) ancora una volta nella categoria II dei suoli “stressati”. I suoli F, F+C e C2 invece sembrano aver incrementato il loro grado di fertilità biologica, rientrando nella classe III (media).

L'ammendamento di 40 t/ha di compost ha invece incrementato la fertilità biologica del suolo fino a portarlo nella classe IV (buona).

A questo punto si è deciso di approfondire l'analisi e utilizzare gli indicatori di II° livello per capire quali batteri fossero resistenti alla prolungata fumigazione del suolo e, soprattutto, quali fossero coinvolti nei processi di recupero della fertilità biologica. E' stata effettuata l'analisi ARDRA delle comunità microbiche coltivabili ed ha permesso di individuare un diverso numero di aplotipi per ciascun campione:

Campione	N° aplotipi
T	3
F	8
F+C	7
C2	9
C4	10



**Indicatori di III°
livello**

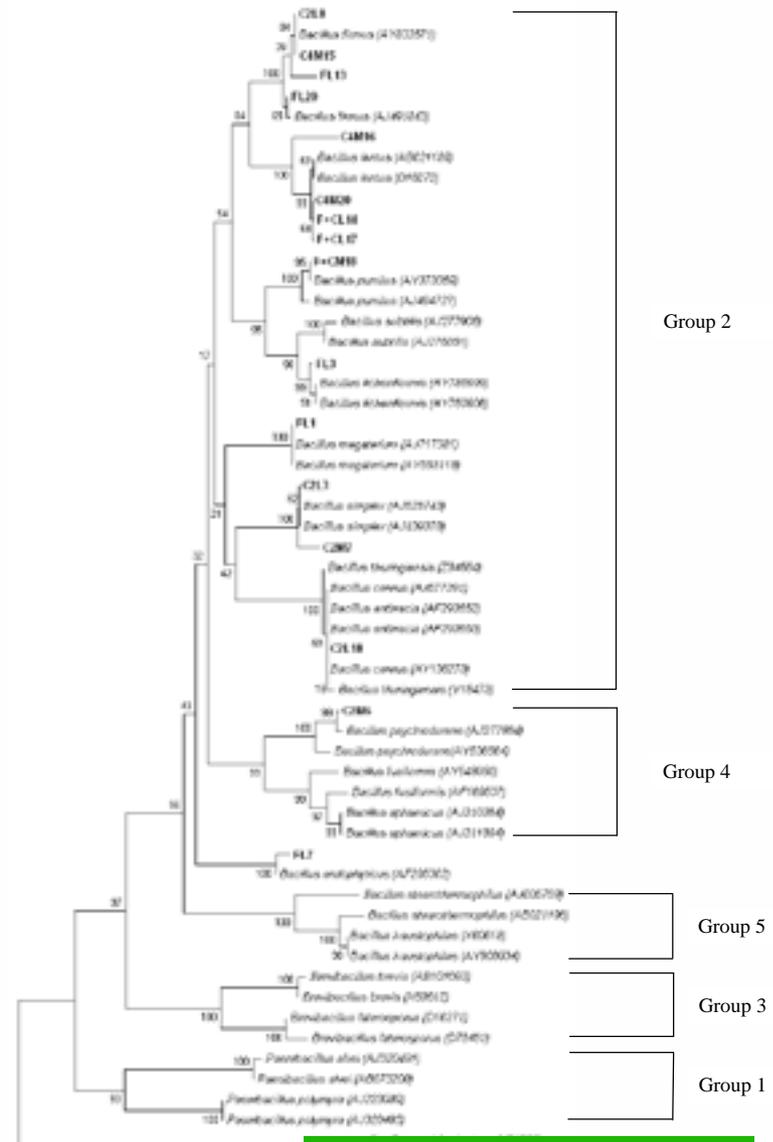
Analisi tassonomica

Sequenziamento del gene 16S rDNA



Aplotipo	Specie	% del totale
C2L8	<i>Bacillus firmus</i>	26
FL13	<i>Bacillus firmus</i>	12,7
C2M7	<i>Bacillus simplex</i>	11,7
FL3	<i>Bacillus licheniformis</i>	8,4
F+CM7	<i>Arthrobacter sp.</i>	5,8

I 5 aplotipi più frequenti corrispondono a specie batteriche che rappresentano oltre il 64% del totale.



CONCLUSIONI

- I 20 anni di fumigazione del suolo avevano portato ad un impoverimento della sua fertilità e della biodiversità. Erano sopravvissute solo 3 specie batteriche, tutte appartenenti al genere *Bacillus*: *B. firmus* (C2L8), *B. firmus* (FL13) e *B. licheniformis* (FL3), tutti gram-positivi sporigeni in grado di sopravvivere anche in situazioni di grave stress ambientale.
- I diversi trattamenti applicati hanno incrementato la **fertilità biologica** del suolo e del **numero di specie** (aplotipi) presenti, fino a 24 diversi.

Questi risultati riflettono il livello di “Biodiversità attuale” del suolo oggetto dello studio e confermano la stretta correlazione esistente tra fertilità, diversità microbica e sostenibilità del suolo. Pertanto si può concludere che, mentre i valori di IBF del suolo T indicano un livello basso di fertilità biologica e quindi di biodiversità, nei suoli ammendati si rilevano valori di IBF di gran lunga maggiori, in particolare nel C4. Questo significa che l’ammendamento con compost ha incrementato il livello di fertilità biologica del suolo, recuperandolo dalla condizione di stress a cui era arrivato. Al recupero della fertilità biologica corrisponde anche un aumento di diversità microbica, come l’utilizzo di indicatori di II° e III° livello ci ha permesso di confermare sperimentalmente.