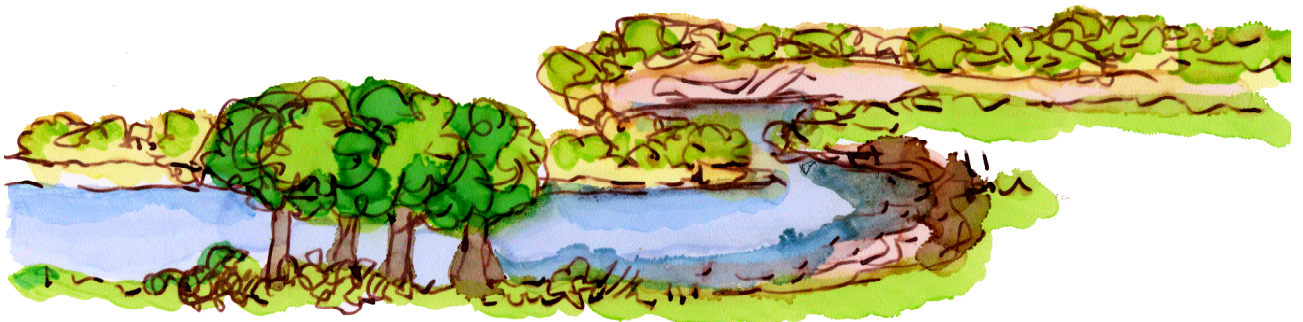


quattro

capitolo

INDICATORI CHIMICI PER LA QUALITÀ DEL SUOLO



4. INDICATORI CHIMICI PER LA QUALITÀ DEL SUOLO

Maria Teresa Dell'Abate, Anna Benedetti, Alessandra Trinchera, Silvia de Bertoldi
CRA - Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante

La sostanza organica, caratterizzata sotto diversi aspetti, è stata scelta come indicatore di qualità. Il suo contenuto nel suolo, infatti, è un potenziale indicatore ambientale in quanto si correla con numerosi aspetti della produttività e sostenibilità degli agroecosistemi e della conservazione ambientale (Smith et al., 2000). In generale, alla presenza di elevate quantità di sostanza organica nel suolo vengono attribuiti molteplici benefici; tuttavia sono stati evidenziati anche alcuni impatti negativi a livello ambientale o di produttività, da valutarsi nell'ambito di contesti e processi specifici (Sojka e Upchurch, 1999). La sostanza organica influenza non solo le proprietà chimiche e biologiche del suolo, ma anche quelle fisiche. La sola proprietà fisica non modificabile è la tessitura, mentre la stabilità di struttura, la ritenzione idrica, il colore e la capacità termica sono in relazione con la quantità e qualità della sostanza organica nel suolo. Proprio questa relazione tra stabilità di struttura e sostanza organica sta alla base della scelta di quest'ultima, insieme ad altri parametri correlati, come indicatore di qualità nel presente atlante.

Sono stati quindi considerati i seguenti parametri, il cui elenco non è da considerarsi esaustivo: C organico totale, carbonio delle frazioni umica e fulvica, parametri dell'umificazione (grado, tasso ed indice di umificazione), azoto totale e rapporto C/N, il comportamento alla focalizzazione isoelettrica e la stabilità all'analisi termica.

4.1. LA SOSTANZA ORGANICA

Le motivazioni della scelta della sostanza organica come indicatore chimico della qualità del suolo sono molteplici; infatti pur rappresentando una quota minoritaria tra tutte le componenti solide che costituiscono il suolo, la sostanza organica assume un ruolo estremamente importante nel definire la fertilità globale di un terreno (Fig. 4.1). In pratica, la sostanza organica ha un ruolo trasversale nel sistema suolo, in relazione con le sue proprietà fisiche, chimiche e biologiche, l'insieme delle quali ne costituisce il livello di fertilità integrale.

Tra i diversi costituenti del suolo la sostanza organica è di gran lunga la parte più reattiva dal punto di vista chimico. Essa, insieme ai minerali argillosi, contribuisce in maniera sostanziale alla superficie specifica totale. Infatti nel suolo la maggior parte delle reazioni chimiche avvengono all'interfaccia tra la fase solida e la fase liquida, dove i numerosi gruppi funzionali reattivi delle molecole umiche e degli altri costituenti della sostanza organica interagiscono con i soluti presenti nella soluzione del terreno.

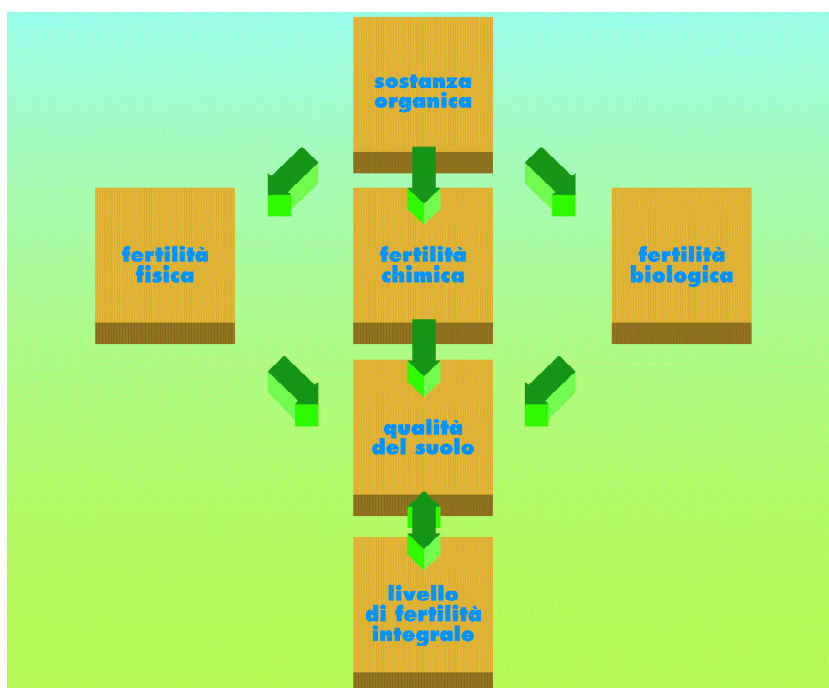


FIGURA 4.1.
RUOLO DELLA SOSTANZA ORGANICA

La sostanza organica esplica infatti la propria azione su:

Proprietà fisiche del terreno: grazie prevalentemente all'azione sulla struttura che a sua volta condiziona molte proprietà fisico-meccaniche del suolo.

Interazione che le particelle di suolo hanno con i prodotti organici di sintesi, modificandone attività e persistenza.

Proprietà nutrizionali del terreno, sia perché costituisce una riserva di elementi nutritivi ed energetici per i microrganismi del suolo e di elementi nutritivi per le piante, sia perché attraverso i meccanismi di scambio, adsorbimento, complessazione e chelazione, modula la disponibilità degli elementi medesimi.

Inoltre alla sostanza organica vengono attribuite attività fisiologiche da parte di alcune molecole organiche, in particolare le sostanze umiche, che modificano direttamente il metabolismo dei microrganismi e delle piante. Le proprietà della sostanza organica nel suolo sono riassunte nella tabella 4.1.

TABELLA 4.1.

PROPRIETÀ DELLA SOSTANZA ORGANICA ED I SUOI EFFETTI NEL SUOLO

Proprietà	Osservazioni	Effetti nel suolo
Colore	Il tipico colore scuro di molti suoli è determinato dalla sostanza organica	Facilita il riscaldamento
Ritenzione idrica	La sostanza organica può trattenere 20 volte il suo peso in acqua	Aiuta a prevenire l'essiccamento. Migliora il trattenimento dell'acqua nei suoli sabbiosi
Combinazione con i minerali argillosi	Cementa le particelle del suolo in unità strutturali chiamate aggregati	Permette lo scambio dei gas. Stabilizza la struttura. Incrementa la permeabilità
Chelazione	Forma complessi stabili con Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} ed altri cationi bivalenti	Accresce la disponibilità dei micronutrienti per le piante superiori
Solubilità in acqua	L'insolubilità della sostanza organica in acqua è dovuta alla sua associazione con le argille; inoltre i cationi bivalenti e trivalenti associati con la sostanza organica ne aumentano l'insolubilità in acqua	La sostanza organica può accumularsi nel suolo (carbon sink) e costituire una riserva di nutrienti
Azione tampone	Presenta azione tampone in range di pH leggermente acidi, basici e neutri	Aiuta a mantenere una reazione uniforme nel suolo
Scambio cationico	L'acidità totale delle frazioni isolate di humus varia da 300 a 1400 cmoli/kg	Incrementa la capacità di scambio cationico del suolo. La sostanza organica provoca l'aumento del 20-70% della CSC di molti suoli
Mineralizzazione	La decomposizione della sostanza organica produce CO_2 , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} e SO_4^{2-}	Fonte di nutrienti per la crescita delle piante
Si combina con gli xenobiotici	Influenza la biodegradabilità, la persistenza e la bioattività dei pesticidi	Modifica il tasso di applicazione dei pesticidi

Negli ultimi tempi, tuttavia si sta assistendo ad una generalizzata e graduale riduzione del contenuto di sostanza organica nei terreni coltivati del nostro paese. Le cause di questo fenomeno sono molteplici e spesso interconnesse. Alcune sono collegate alla riduzione degli apporti di sostanza organica (separazione tra le attività produttive zootecniche da quelle vegetali, mancato reimpiego dei residui colturali; specializzazione colturale; semplificazione degli avvicendamenti; utilizzo quasi esclusivo dei fertilizzanti inorganici ecc.), altre invece sono dovute all'aumento della sua velocità di mineralizzazione (esecuzione di lavorazioni sempre più frequenti e profonde, maggiore diffusione degli interventi irrigui ecc.).

La media nazionale del contenuto di sostanza organica dei suoli agrari italiani si aggira intorno al 1,5%; inoltre in ambiente mediterraneo, senza le dovute reintegrazioni, si perde mediamente ogni anno l'1,5% di humus. Un *database* pedologico sul contenuto di carbonio organico negli orizzonti superficiali (0-30 cm) di suolo nell'Europa meridionale è stato elaborato a cura dell'European Soil Bureau (Montanarella e Jones, 1999). Stime preliminari sono state effettuate assegnando le unità della mappa dei suoli europei a due sole classi di contenuto di carbonio organico: valori $\leq 2\%$ e valori $> 2\%$. Secondo tali stime (Zdruli et al., 2004) l'86,4% della superficie di suolo totale in Italia è caratterizzata da valori di carbonio organico $\leq 2\%$ mentre solo il 12,4% ne contiene più del 2%.

Il contenuto di sostanza organica nel terreno dipende dai principali fattori di formazione del suolo (Stevenson, 1994), la cui importanza relativa diminuisce secondo l'ordine *clima > vegetazione > topografia e materiale d'origine > età*, ed è anche fortemente influenzato dall'uso del suolo e dalle pratiche agricole. A parità di condizioni climatiche, la presenza di argilla favorisce l'accumulo di sostanza organica nel suolo, probabilmente a causa dell'effetto di protezione chimico-fisica esercitato nei confronti di alcuni costituenti organici, rallentandone la mineralizzazione. Per questo motivo, tessitura del suolo e dotazione di carbonio organico sono correlati tra loro (Tabella 4.2).

TABELLA 4.2.

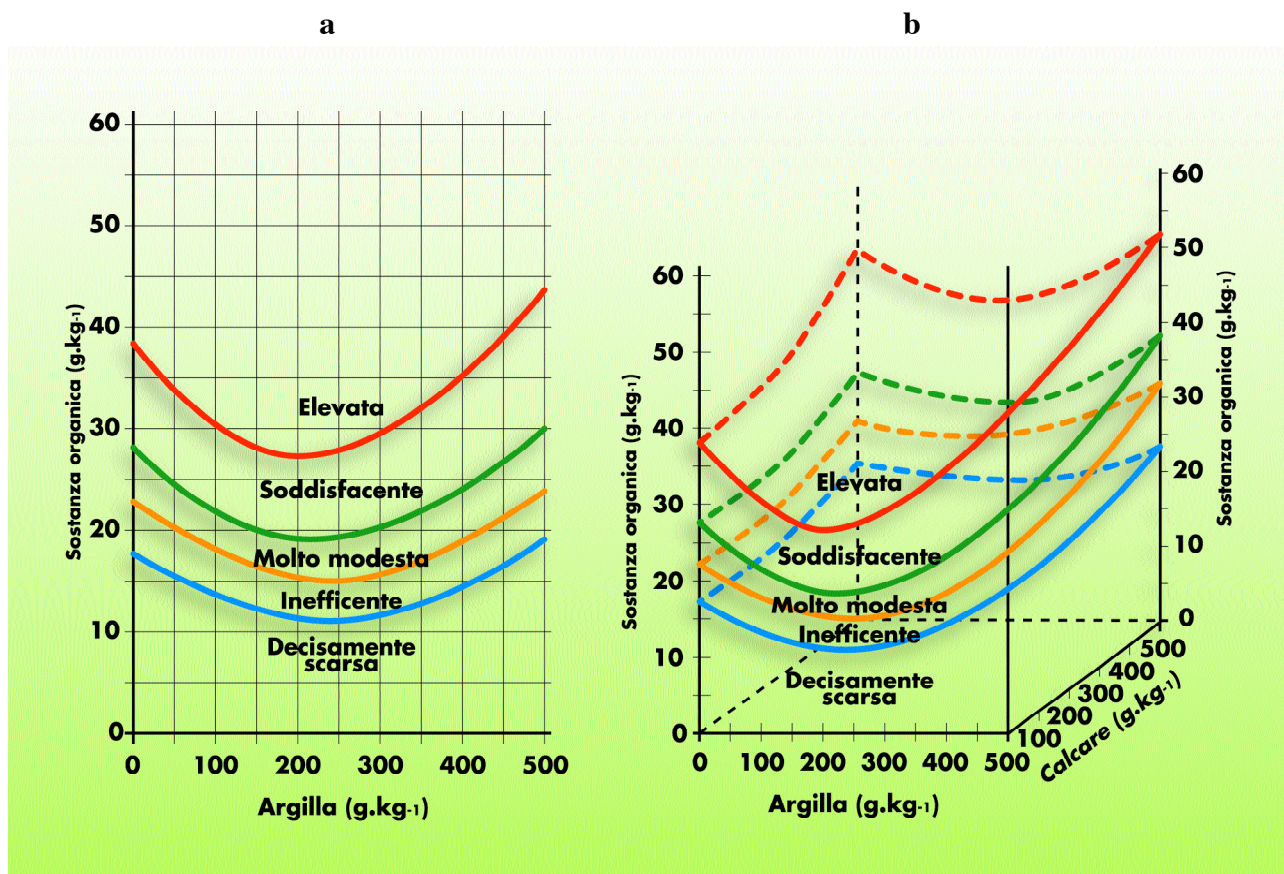
VALORI INDICATIVI DI DOTAZIONE DI CARBONIO ORGANICO IN FUNZIONE DELLA TESSITURA DEL SUOLO (DA "METODI DI ANALISI CHIMICA DEL SUOLO", FRANCO ANGELI ED., CAP. VIII)

Classi tessiturali secondo USDA			
Sabbioso		Franco	Argilloso
Sabbioso-franco		Franco-sabbioso-argilloso	Franco-argilloso
Franco-sabbioso		Franco-limoso	Argilloso-limoso
		Argilloso-sabbioso	Franco-argilloso-limoso
		Limoso	

Dotazione	Carbonio organico (g kg ⁻¹)		
Scarsa	< 7	< 8	< 12
Normale	7-9	8-12	10-15
Buona	9-12	12-17	12-22
Molto buona	>12	> 17	> 22

La dotazione in sostanza organica di un suolo, quindi, può essere valutata correttamente in funzione del solo contenuto di argilla in suoli privi di calcare (Figura 4.2a) ed in funzione sia del contenuto di argilla che di carbonato di calcio negli altri (Figura 4.2b).

FIGURA 4.2. SCHEMA PER LA VALUTAZIONE DELLA DOTAZIONE DI SOSTANZA ORGANICA IN FUNZIONE DEL CONTENUTO DI: (A) ARGILLA, (B) ARGILLA E CARBONATO DI CALCIO (DA “METODI DI ANALISI CHIMICA DEL SUOLO”, FRANCO ANGELI ED., CAP. VIII)



Tutte le zone a clima mediterraneo sono tra le più esposte al rischio di perdita della fertilità dei suoli agrari a causa della velocità con la quale avvengono i processi di mineralizzazione della sostanza organica. È noto infatti che i microrganismi del suolo, ai quali è deputato il ruolo di rendere disponibili per le piante gli elementi nutritivi, hanno quali fattori limitanti la temperatura e l'umidità e pertanto nelle stagioni primaverili ed autunnali trovano le condizioni ideali per la mineralizzazione della sostanza organica. A questo si aggiungono tutte le aree a colture estive irrigue ed invernali che in alcune regioni della penisola non raggiungono mai temperature al di sotto dei 5°C (temperature alle quali l'attività di mineralizzazione si arresta).

Quando parliamo di sostanza organica ci riferiamo a tutto il materiale organico del suolo inclusi la lettiera decomposta e in via di decomposizione, la biomassa microbica, materiali organici solubili e sostanza organica stabilizzata (humus). Si tratta quindi di materiale estremamente eterogeneo, a composizione chimica complessa. La sostanza organica può essere suddivisa in quattro classi di costituenti (Landi et al., 2000):

Classe I	Organismi viventi (biomasse vegetali, animali e microbiche);
Classe II	Tessuti animali e vegetali, cellule microbiche non ancora decomposte o in fase di demolizione delle strutture cellulari;
Classe III	Prodotti derivati dai processi di degradazione dei residui vegetali, animali e microbici in via di trasformazione;
Classe IV	Humus libero o labile
	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 10px; width: 10px; margin-bottom: 5px;"></div> <div style="border-left: 1px solid black; height: 10px; width: 10px; margin-top: 5px;"></div> </div> <div> Sostanze umificate Humus legato in complessi organo-minerali. </div> </div>

Bisogna sottolineare che esiste una certa differenza nella costituzione delle diverse classi a seconda che ci si trovi in suoli agrari o in suoli forestali (Tab. 4.3).

TABELLA 4.3.

LE CLASSI DELLA SOSTANZA ORGANICA E I DIVERSI STADI DELL'UMIFICAZIONE NEI TERRENI AGRARI E NELL'ORIZZONTE SUPERFICIALE DEI SUOLI FORESTALI (MODIFICATO DA P. SEQUI "SOSTANZA ORGANICA E CICLO DEL CARBONIO", 1989)

I	Organismi viventi
II	Apporti organici al suolo di vegetali e microrganismi, spoglie radicali, spoglie radicali e di microrganismi
III	Materiali in corso di degradazione
IV	Materiali unificati liberi o in complessi organo-minerali
Suoli forestali, orizzonte organico	
I	Organismi viventi. Pedofauna prevalentemente associata alla seconda classe; microrganismi associati alla terza e quarta
II	Foglie cadute di recente, indecomposte (orizzonte O_1 ; stadio di umificazione L, ossia lettiera)
III	Foglie bruno scure colonizzate da funghi (O_e , stadio di umificazione F, dove F equivale a fermentazione) Foglie grigiastre, frammentate, compresse ma riconoscibili; mesofillo completamente decomposto; abbondante presenza di deiezioni della mesofauna e di frammenti di ife (stadio di umificazione F)
IV	Massa amorfa bruno scura di deiezioni della mesofauna, foglie e spoglie microbiche (O_a , stadio di umificazione H) Complessi organo-minerali dell'orizzonte A_1 sottostante

Influenza della sostanza organica sulla capacità di scambio cationico

In media sembra che la sostanza organica contribuisca per il 50% alla CSC di un suolo. Essa infatti presenta una capacità di scambio elevata: l'intervallo dei valori riscontrati più frequentemente è compreso tra 100 e 200 meq/100 g di carbonio organico (De Nobili e Maggioni, 1993). La CSC della sostanza organica del terreno varia a seconda del tipo di copertura vegetale e delle condizioni climatiche per l'incidenza dei fenomeni di ossidazione dovuti all'attività microbica. In linea generale, la CSC a parità di latitudini aumenta passando da zone più secche a zone più umide. Essa varia anche in base al tipo di suolo: nei mollisuoli il contributo della sostanza organica è di circa 250 meq/100 g Corg, negli spodsuoli di 150 meq/100 g Corg e nei suoli poco evoluti è di 138 meq/100 g Corg.

Acidificazione del terreno

Il contenuto di sostanza organica risulta strettamente correlato alla biomassa microbica e costituisce di conseguenza uno dei principali fattori di acidificazione. Essa, infatti, produce attraverso la respirazione elevate quantità di anidride carbonica, che sciogliendosi nella soluzione del terreno libera idrogenioni che tendono a saturare i siti di scambio presenti sulla sostanza organica e sulle argille. In assenza dell'azione tamponante dei carbonati tale processo provoca col tempo la diminuzione del tasso di saturazione basica del terreno e l'instaurarsi di una reazione acida. Le radici stesse, sia attraverso la respirazione che mediante l'emissione di essudati radicali, contribuiscono all'acidificazione. Gli estratti acquosi delle lettiere forestali contengono inoltre una varietà considerevole di acidi organici originati dalla decomposizione aerobica e, soprattutto, anaerobica dei residui vegetali. L'acidificazione del suolo è un processo che può esercitare effetti negativi nel suolo, come la maggiore solubilità dei metalli che così possono migrare lungo il profilo ed il minore effetto tampone esercitato nei confronti delle "piogge acide". Questi fenomeni si riscontrano più frequentemente nelle regioni umide, dove le piogge abbondanti favoriscono la lisciviazione delle basi; al contrario, piogge di lieve entità e poco frequenti determinano un arricchimento in basi dell'orizzonte di superficie per il fenomeno della risalita capillare.

Nell'intervallo di pH compreso tra 6,5 e 7,5 l'assimilabilità dei principali elementi nutritivi da parte delle piante è massima, anche se vi sono alcune specie che preferiscono un ambiente leggermente acido o leggermente basico.

Complessazione dei metalli

La solubilità dei metalli della prima serie di transizione della tavola periodica degli elementi chimici, tra cui si trovano importanti microelementi nutritivi, quali Fe, Zn, Cu, Ni, Co e Mn, è regolata dalla formazione di idrossidi insolubili che si producono attraverso la complessiva polinucleazione degli ioni idrati all'aumentare del pH. Questo processo dipende dalla natura dello ione ed è determinante quando il pH è neutro o alcalino. La formazione di un complesso solubile tra il metallo ed altri ioni o molecole (legandi) sottrae lo ione libero all'equilibrio e tende quindi, per effetto della legge di azione di massa, ad aumentare la solubilità di tale ione ad un dato pH. L'andamento della solubilità del rame e dello zinco, in soluzioni poste in equilibrio in suoli diversi a diversi valori di pH, si discosta fortemente dalle isoterme di solubilità dei rispettivi idrossidi e idrossicarbonati. In particolare la solubilità dei metalli risulta maggiore nel terreno a pH superiore a 7: tale comportamento può essere giustificato solo dalla formazione di complessi tra la sostanza organica solubile e gli ioni metallici (Bremner *et al.*, 1986). La sostanza organica infatti ha una funzione di controllo della disponibilità dei microelementi, in quanto le sostanze umiche, in particolare, presentano dei gruppi funzionali con doppietti liberi di elettroni che possono quindi facilmente formare dei complessi con i metalli, caratterizzati da elevata stabilità, detti chelati. Un chelato si forma quando due o più dei gruppi funzionali che legano il metallo appartengono alla stessa molecola organica, che in tal caso viene chiamata chelante. Sono soprattutto i gruppi funzionali acidi CO-OH ed i gruppi OH fenolici presenti in gran numero a permettere la formazione dei chelati. L'importanza della chelazione risiede nel fatto che metalli come il ferro, che sono solubili solo a pH acidi, si rendono disponibili per le piante incrementando la loro solubilità anche a pH neutri. In linea generale, quindi, la formazione di complessi con la sostanza organica tenderà a deprimere l'assorbimento del metallo nei suoli acidi e a favorirlo invece nei terreni in cui il pH sia sufficientemente elevato da provocare la formazione di idrossidi.

Effetti sul potenziale di ossidoriduzione

Il contenuto di sostanza organica è uno dei fattori che contribuiscono maggiormente su questa proprietà chimico-fisica del suolo, che riflette lo stato di ossidazione di alcuni dei principali componenti inorganici. Il potenziale di ossido-riduzione viene definito come la differenza del potenziale elettrico (espressa in volts) misurata tra un elettrodo di misura (ad esempio di platino) ed un elettrodo di riferimento (ad esempio a calomelano), che risulta dal trasferimento di elettroni da un donore di elettroni ad un accettore. Esso dipende dal pH ed è una misura della tendenza di ioni e molecole ad accettare (riduzione) o perdere (ossidazione) elettroni, per cui è una caratteristica dello stato ossidato o ridotto del sistema in esame. Il suo valore assoluto è riferito all'elettrodo standard ad idrogeno che ha un potenziale assegnato pari a zero a tutte le temperature (Stevenson, 1994). La sostanza organica influenza indirettamente il potenziale di ossidoriduzione poiché contribuisce a mantenere una buona struttura con adeguata porosità e permette quindi l'esistenza di condizioni ottimali di areazione e drenaggio del suolo che impediscono l'instaurarsi di condizioni asfittiche.

L'effetto più diretto e importante della sostanza organica è però quello esercitato sull'intensità dei processi di riduzione che avvengono in condizioni di saturazione o sommersione del suolo. Tale effetto si manifesta attraverso l'azione di microrganismi eterotrofi che ricavano l'energia loro necessaria dall'ossidazione dei componenti organici del suolo utilizzati come substrato. Quando il terreno si trova in condizioni asfittiche gli anaerobi facoltativi utilizzano infatti, in alternativa all'ossigeno, alcuni dei principali costituenti inorganici del suolo, quali nitrati, ossidi e idrossidi di manganese e ferro come accettori finali di elettroni. In genere un suolo ben aerato possiede un potenziale di ossidoriduzione intorno a +0.4 V, mentre suoli in condizioni spinte di anaerobiosi possono avere potenziale di ossidoriduzione di -0.4 V (De Nobili e Maggioni, 1993).

4.1.1. Le sostanze umiche

Le sostanze umiche costituiscono il 60-80% della sostanza organica nella maggior parte dei terreni e si formano dalla degradazione chimica e biologica dei residui vegetali e animali e dall'attività di sintesi dei microrganismi. I prodotti così formati tendono ad associarsi in strutture organiche complesse che sono più stabili alla degradazione chimica e biologica dei materiali di partenza. L'insieme di tali reazioni complesse, condizionate da fattori climatici, biotici (funghi, batteri, attinomiceti e protozoi) ed abiotici, nonché da fattori antropici, viene indicato complessivamente come *processo di umificazione*. Il restante 40-20% della sostanza organica nel terreno consiste principalmente di sostanze proteino-simili, polisaccaridi, acidi alcanoici e alcani.

Sulla base della loro solubilità in alcali ed acidi, le sostanze umiche sono di norma suddivise nelle seguenti tre frazioni principali.

Acidi umici (HA): frazione solubile in alcali diluiti ma che precipita per acidificazione dell'estratto alcalino.

Acidi fulvici (FA): frazione umica che rimane in soluzione quando l'estratto alcalino viene acidificato, essendo solubile sia in alcali diluiti che in acidi diluiti.

Umina: frazione umica che non può essere estratta dal terreno per mezzo di alcali diluiti o di acidi.

Le sostanze umiche (acidi umici e fulvici in particolare) sono state oggetto di ampie ricerche rivolte alla loro caratterizzazione chimico-strutturale, che può essere effettuata con diverse tecniche di tipo chimico-fisico, delle quali è stato ampiamente riferito da vari autori (Nannipieri, 1993; Landi et al., 2000). Meno studiata, invece, è l'umina, probabilmente a causa della sua insolubilità nelle soluzioni estraenti convenzionali. I più moderni mezzi analitici ora disponibili, quali ad esempio la termoanalisi e la risonanza magnetica nucleare applicata a campioni allo stato solido, potranno fornire risposte sulla struttura chimica dell'umina e sul tipo di interazione che questa instaura con le componenti inorganiche del suolo.

Una delle caratteristiche più importanti delle sostanze umiche è la loro capacità di interagire con ioni metallici, ossidi, idrossidi, minerali e sostanze organiche, inclusi gli agenti inquinanti tossici, e di formare associazioni sia solubili che insolubili in acqua, aventi stabilità chimica e biologica totalmente diverse.

Nelle acque e nei terreni generalmente si riscontrano questo tipo di reazioni:

1. Formazione di complessi metallici semplici solubili in acqua

2. Formazione di complessi misti solubili in acqua

3. Assorbimento e deassorbimento dei complessi metallo-umati e degli HA insolubili in acqua

4. Dissoluzione dei minerali

5. Adsorbimento sulle superfici minerali esterne

6. Assorbimento negli interstrati argillosi.

I materiali umici possono dissolvere, mobilitare e trasportare nei terreni e nelle acque metalli e sostanze organiche, attraverso la formazione di complessi solubili in acqua. I complessi insolubili in acqua sono invece accumulati in alcuni orizzonti di terreno e nei sedimenti. La capacità complessante delle molecole umiche verso i metalli riduce l'impatto dei metalli pesanti, mentre la capacità di adsorbire sostanze tossiche presenti nel suolo impedisce che queste vengano metabolizzate dai microrganismi.

L'assorbimento sulle superfici argillose e negli interstrati dei minerali argillosi stabilizza i materiali umici e li protegge dalla decomposizione chimica e biologica per lunghi periodi di tempo. Pertanto la formazione di complessi argillo-umici, metallo-umati e metallo-fulvati è importante per avere una buona struttura del terreno e per la disponibilità di sostanze nutritive, in particolare di quelle presenti a basse concentrazioni (microelementi).

Le sostanze umiche presentano notevoli proprietà chimiche, fisiche e biologiche. In primo luogo svolgono un ruolo fisico di tipo indiretto, aumentando la capacità di ritenzione idrica e la capacità termica del terreno, inoltre contribuiscono alla strutturazione del suolo, stabilizzando i legami tra particelle e favorendo le interazioni organo minerali.

Più complesso è invece l'insieme delle proprietà chimiche e biologiche delle sostanze umiche; infatti, oltre ad avere funzioni nutrizionali, i composti umici sono in grado di chelare i metalli come il ferro e l'alluminio, di aumentare la capacità di scambio cationico del terreno, di proteggere i siti enzimatici extracellulari quali quelli delle permeasi (permettendo l'ingresso selettivo del substrato enzimatico), di formare complessi con gli enzimi rilasciati in seguito alla lisi cellulare (Burns, 1982; Nannipieri et al., 1990), di influire sulla trascrizione, traduzione e biosintesi proteica ed infine di interagire con inibitori e alcuni ormoni naturali.

L'insieme di tutte queste caratteristiche e proprietà suggerisce che le molecole umiche stesse possano fornire indicazioni sulla qualità del suolo. Numerosi sono gli studi concernenti sia la caratterizzazione chimica e strutturale delle sostanze umiche, che il loro ruolo negli ecosistemi terrestri ed acquatici; si segnalano a tale proposito le raccolte di lavori curate da Senesi e Miano (1994) e Drozd et al. (1997).

4.2. CARATTERIZZAZIONE DELLA SOSTANZA ORGANICA

Uno dei maggiori obiettivi nello studio della sostanza organica del suolo è quello di correlare i valori riguardanti il numero e la composizione dei vari pools con la produttività del suolo, in funzione della sua vocazione d'uso; in particolare c'è un forte bisogno di definire uno o più metodi accurati per determinare la cosiddetta frazione attiva (biomassa e la lettiera in via di decomposizione) e la velocità con cui i nutrienti in questa contenuti sono rilasciati in forme minerali disponibili. Per questo motivo, lo studio della dinamica della sostanza organica nel suolo non può prescindere da quello dell'attività della biomassa microbica. Infatti, i principali parametri chimici relativi alla chimica del carbonio forniscono una visione "statica" o all'equilibrio, in quanto consentono di individuare cambiamenti intervenuti nel lungo periodo, mentre i parametri relativi alla frazione vivente della sostanza organica (biomassa microbica), alla sua attività ed al pool organico labile (residui microbici, organismi viventi, prodotti di trasformazione ed azoto potenzialmente mineralizzabile) consentono di ricavare una visione "dinamica", ottenendo degli indicatori particolarmente sensibili nel segnalare cambiamenti nel breve periodo. Questi ultimi indicatori e parametri, strettamente correlati alla sostanza organica del suolo, verranno discussi separatamente nel capitolo V.

I suoli variano molto nel loro contenuto di sostanza organica. Nei suoli indisturbati (non coltivati) la quantità presente è governata dai fattori di formazione del suolo, età, roccia madre, topografia, vegetazione, clima. Nei suoli coltivati, invece, le pratiche di gestione (lavorazioni, rotazioni colturali, fertilizzazione, pratiche irrigue) possono modificare in modo consistente il *turnover* e quindi il contenuto di sostanza organica nel suolo.

Dato che la mineralizzazione della sostanza organica apporta nutrimento alle piante e l'umificazione condiziona alcune proprietà dei terreni, non può essere sottovalutato l'interesse che le trasformazioni del materiale organico e umico possono rivestire nello svolgimento dei processi pedogenetici e nella fertilità dei suoli. In questo senso, studi sulla determinazione chimica quantitativa e qualitativa della sostanza umificata risultano di estremo interesse. In particolare le determinazioni del carbonio organico totale, delle frazioni unificate e dei parametri di umificazione del terreno costituiscono un set di elementi diagnostici fondamentali per lo studio dell'evoluzione della sostanza organica di un suolo.

Per la caratterizzazione della sostanza organica del suolo, al fine di dedurre degli indicatori di qualità del suolo, sono stati presi in considerazione sia i parametri di umificazione che due diverse tecniche strumentali per lo studio del livello di stabilizzazione della sostanza organica, quali i metodi di termoanalisi e la focalizzazione isoelettrica, secondo livelli crescenti di approfondimento.

4.2.1. Carbonio organico totale

La determinazione del carbonio organico totale del terreno rientra tra le analisi di routine più importanti: il contenuto di carbonio, infatti, viene utilizzato sia come elemento diagnostico per la tassonomia dei suoli che come parametro cardine nelle valutazioni agronomiche. Sebbene la determinazione del contenuto di sostanza organica nel suolo sia

un'analisi fondamentale, tuttavia non esiste un metodo univoco per la sua determinazione. Comunemente il contenuto di sostanza organica viene stimato indirettamente moltiplicando la concentrazione del carbonio organico per un coefficiente di conversione: per molti anni è stato utilizzato il coefficiente di conversione Van Bemmelen (1,724), che si basa sull'assunto che la sostanza organica del suolo contenga il 58% di carbonio, ma è noto che il contenuto percentuale dell'elemento nella sostanza organica nel suolo varia in un ampio range ed ogni valore scelto sarebbe comunque un'approssimazione. Inoltre il fattore di conversione può variare non solo da suolo a suolo ma anche tra orizzonti dello stesso suolo e pertanto il fattore più appropriato dovrebbe essere determinato sperimentalmente per ogni terreno. La maggior parte degli autori propone fattori di conversione compresi tra 1,724 e 2,5 per ottenere delle stime approssimative. Tutto questo suggerisce come sia più appropriato esprimere il dato come carbonio, che convertire questo dato nel contenuto in sostanza organica. Il carbonio organico può essere determinato mediante diverse metodologie, tuttavia quella più utilizzata è quella del metodo di Springer e Klee (1954) oltre che per semplicità, rapidità e adattabilità a tutti i tipi di suoli, anche perché è quella che garantisce la mineralizzazione completa del C organico. Questa prevede la riduzione del $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ad opera della componente organica e successiva determinazione del $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ residuo mediante titolazione ossido-riduttiva con Fe^{2+} o mediante tecniche colorimetriche. In questo metodo si assume che il carbonio presente nella sostanza organica del suolo abbia in media stato di ossidazione zero. Poiché tutta la sostanza organica viene ossidata, questa risulta essere una metodica quantitativa. Il dato analitico relativo al carbonio organico viene generalmente espresso su base ponderale (generalmente riferito al campione secco a 105°C); tuttavia, quando il dato analitico deve essere estrapolato alla realtà di campo per ottenere una descrizione spaziale del suolo in esame, sia orizzontale (area) che verticale (profilo), allora è necessario considerare la densità del suolo ed effettuare il campionamento su una profondità tale da includere, idealmente, il contributo di tutta la sostanza organica presente. È evidente che ciò non è sempre realizzabile né significativo per tutti gli scopi prefissati, pertanto nella pratica vengono adottati dei compromessi in funzione della finalità dello studio. Uno di questi consiste nell'esprimere il dato su base volumetrica; un altro corregge le misure volumetriche scegliendo la profondità di campionamento fino ad ottenere masse equivalenti (Smith et al., 2000).

In sintesi, dato che la sostanza organica segue una distribuzione stratificata lungo il profilo del suolo, il metodo di campionamento più aderente alla realtà pedologica è quello secondo gli orizzonti; in questo caso la modalità di espressione del contenuto di sostanza organica del suolo avrà un valore convenzionale, in quanto tutti i dati sensibili per descrivere il pedon (spessore degli orizzonti, volume apparente, ecc.) permetteranno di elaborare i risultati nel modo più opportuno per le finalità dello studio.

4.2.2. Azoto totale

Nel suolo l'azoto è presente in varie forme, due delle quali sono assimilabili dalle piante: prontamente quella nitrica, più lentamente quella ammoniacale. La determinazione delle varie forme di azoto è essenziale per una razionalizzazione della concimazione azotata al fine di contenere l'impatto ambientale. I metodi di analisi ufficiali prevedono la determinazione dell'azoto totale e di quello minerale. A queste forme vanno aggiunte poi quelle relative alle riserve azotate del suolo, ossia la frazione potenzialmente mineralizzabile dell'azoto organico e quella potenzialmente assimilabile dell'ammonio fissato ai minerali argillosi nelle posizioni d'interstrato dei reticoli cristallini.

La determinazione dell'azoto totale deve comprendere tutte le forme azotate del suolo, sia organiche che inorganiche, e questo rende l'analisi particolarmente difficile. Due metodi sono generalmente accettati, il più utilizzato dei quali è il metodo Kjeldahl, che si basa su un processo di ossidazione per via umida. Il contenuto di azoto determinato con questo metodo è spesso collegato al contenuto in sostanza organica e oscilla nei suoli agrari tra 0,8 e 2 g/kg; più elevato nei suoli a prato permanente (3,5-5 g/kg) e soprattutto nei suoli forestali di latifoglie (3-12 g/kg).

La sempre più frequente disponibilità di strumenti automatizzati, infine, negli ultimi anni ha reso di uso comune anche le tecniche basate su combustione per via secca (analizzatori elementari secondo il metodo Dumas).

4.2.3. C/N

Questo rapporto è un indice della disponibilità di azoto per le colture in funzione della quantità di carbonio presente nella sostanza organica. La sostanza organica può essere classificata anche in base al valore del rapporto C/N che presenta valori che variano da 10 a 40 (Tab. 4.4). Quanto più il rapporto C/N è basso tanto più l'azoto è reso disponibile per le colture. Il rapporto considerato "ideale" per la migliore disponibilità di azoto è circa 12.

TABELLA 4.4

Tipo di sostanza organica	C/N
Mull calcico	10
Mull forestale	20
Anmoor	20
Moder	15-25
Mor	25
Torba	30-40

4.2.4. Determinazione dei parametri di umificazione

Si è già ampiamente descritto il ruolo della frazione umica nell'ambito della sostanza organica nel suolo: la presenza dell'humus, in virtù delle sue molteplici funzioni di miglioramento delle proprietà fisiche, chimico-strutturali e biologiche di un terreno, risulta fondamentale per la definizione della sua *qualità* o *status*.

Vi sono, in realtà, due aspetti da approfondire in relazione alla presenza delle sostanze umiche nel suolo: da un lato, è necessario effettuare la caratterizzazione chimica di tali sostanze, attraverso l'uso di tecniche differenti in grado di integrarsi e di fornire adeguate informazioni. Dall'altro, è quanto mai importante conoscere il valore quantitativo delle sostanze umiche in un terreno, non tanto in valore assoluto, quanto in relazione al suo contenuto di sostanza organica totale. Proprio tale dato è indicativo, infatti, della attitudine di un suolo, o meglio della sua comunità microbica, a trasformare, mineralizzare o conservare la sostanza organica che ad esso perviene nel tempo.

A questo scopo, sono stati definiti per il suolo dei *parametri di umificazione*, utili alla quantificazione dell'aliquota di sostanze umiche presenti in un terreno in relazione al contenuto sia di carbonio organico totale che estraibile (in condizioni di pH controllate). Nella pagina accanto viene riportata la metodologia relativa alla determinazione di tali parametri.

I parametri di umificazione permettono di interpretare con maggiore accuratezza i dati analitici di carbonio organico totale, estraibile ed umico di un terreno. Essi rappresentano una normalizzazione dei dati rispetto al carbonio organico totale (HR%) o a quello estraibile (DH%), mentre HI indica il rapporto tra la frazione non umica estratta e quella umica: essi, pertanto, descrivono la "qualità" rispettivamente del carbonio organico totale (HR) e di quello estraibile (DH e HI) (Dell'Abate, 2000).

Il tasso di umificazione HR, ad esempio, è un parametro strettamente quantitativo, in quanto informa sulla entità della frazione umificata di un terreno, (intesa come HA+FA) rispetto alla sostanza organica totale. Può assumere valori che vanno da 0 a 100, essendo correlato al valore del C_{HA+FA} . Esso, tuttavia, non tiene conto della frazione umica non estratta, in quanto sotto forma di umina (Dell'Abate et al., 2002).

Nel caso del grado di umificazione DH, invece, si può parlare di un parametro quali-quantitativo in quanto ci informa sul contenuto percentuale in sostanze umiche relativamente ad una frazione (quella estraibile) che non può essere considerata come interamente umica. Esso fornisce quindi un dato relativo anche alla *qualità* della sostanza organica estratta. Anche questo parametro oscilla tra 0 e 100, e tanto più elevato risulta questo valore, tanto più elevata è l'attitudine di un suolo ad umificare i materiali organici disponibili. Valori comuni di DH oscillano tra 70-80 %.

L'indice di umificazione HI, infine, è un parametro adimensionale, che fornisce una informazione sul rapporto tra la sostanza organica estratta ma non umificata, rispetto a quella umificata. È un valore che oscilla tra 0 e 1, e risulta tanto più basso

METODOLOGIA ANALITICA

(metodi tratti da “Metodi di Analisi Chimica del Suolo”, FrancoAngeli Ed., 2000)

Per calcolare i parametri di umificazione di un terreno, il primo dato del quale è necessario disporre è il contenuto in carbonio organico totale (TOC %), determinato con il metodo di Springer e Klee (1954).

Per quel che riguarda il frazionamento delle diverse componenti umiche del suolo, esso si basa sulle loro differenti caratteristiche acide. Come già accennato, le sostanze umiche si distinguono in *umina* (non estraibile in alcali ed acidi diluiti), *acidi umici* (solubili in alcali diluiti e non solubili in acidi concentrati) ed *acidi fulvici* (solubili in alcali diluiti ed acidi concentrati, insolubili in acidi diluiti).

Ciò permette la separazione di tali frazioni mediante una estrazione di 2-4 grammi di terreno in 100 mL di una soluzione di NaOH/Na₄P₂O₇ 0,1 N, dibattendo tale sospensione per 48 ore a 65°C a 80 scosse/minuto. In tal modo, l'*umina* insolubile rimane nel residuo, mentre gli acidi umici e fulvici, assieme a tutte le altre sostanze organiche estraibili non umiche, vanno in soluzione. L'estratto che si ottiene viene analizzato per determinare la quantità di carbonio organico totale estraibile (TEC %) del terreno considerato. Tale analisi si effettua su 10 mL di estratto, aggiungendo 5 mL di soluzione di K₂Cr₂O₇ 1/6 M e 20 mL di H₂SO₄ concentrato, mineralizzando la sostanza organica a 160°C per 10 minuti (metodo di Springer e Klee, 1954).

La sostanza organica estratta nella soluzione di soda e sodio pirofosfato contiene, come già accennato, oltre agli acidi umici (HA) e fulvici (FA), anche altre sostanze definite *non umiche* (NH), che occorre eliminare. Poiché tali sostanze (peptidi, amminozuccheri, ecc.) sono generalmente di peso molecolare (e quindi di dimensioni) paragonabili agli acidi fulvici, su questi ultimi viene operata una purificazione cromatografica.

Pertanto, 25 mL di estratto in NaOH/Na₄P₂O₇ vengono acidificati per H₂SO₄ al 50 %, fino a pH < 2,0. In tal modo, gli acidi umici precipitano, mentre gli acidi fulvici e le sostanze interferenti rimangono in soluzione (sono infatti più acidi rispetto agli acidi umici). Dopo centrifugazione e filtrazione del surnatante, la soluzione fulvica viene purificata su colonna di polivinilpirrolidone (PVP), ove per lavaggi successivi con acido solforico diluito (0,005 %) gli acidi fulvici vengono adsorbiti dal PVP e le sostanze interferenti non umiche vengono eliminate per eluizione. A seguito dell'aggiunta di soluzione di NaOH 0,5 N, gli acidi fulvici si risolubilizzano. Tale frazione fulvica viene così eluita e riunita alla frazione umica precipitata. L'ambiente alcalino per NaOH 0,5 N permette infine la solubilizzazione del sistema acidi umici + acidi fulvici (HA + FA) (Ciavatta et al., 1990).

La determinazione del contenuto in carbonio di quest'ultima soluzione (C_{HA+FA} %) viene effettuata mediante la medesima procedura già descritta per la determinazione del carbonio organico estraibile (TEC), su 5-10 mL di soluzione.

Disponendo dei valori di carbonio organico totale (TOC %), di carbonio totale estraibile (TEC %) e di carbonio degli acidi umici e fulvici (C_{HA+FA} %), è possibile calcolare i parametri di umificazione così definiti:

Tasso di umificazione: $HR \% = (C_{HA+FA} \times 100)/TOC$ (Ciavatta et al., 1990)

Grado di umificazione: $DH \% = (C_{HA+FA} \times 100)/TEC$ (Ciavatta et al., 1990)

Indice di umificazione: $HI = C_{NH}/C_{HA+FA}$ (Sequi et al., 1986)

ove: $C_{NH} = TEC - C_{HA+FA}$ rappresenta il carbonio non umico.

quanto più i processi di umificazione hanno prevalso su quelli di mineralizzazione. Infatti, esso è relativamente elevato nei suoli sottoposti a monocoltura (0,7-0,8), oscilla intorno a 0,4 nei suoli sotto prato permanente o bosco, varia da 0,2-0,3 nelle torbe, fino a raggiungere valori prossimi a zero in depositi organici fossili. Esso può essere considerato, quindi, un indice della attività umificante del terreno stesso, nonché della disponibilità di frazioni organiche labili non umificate.

Come interpretare i dati di umificazione relativamente ad uno specifico terreno? Occorre innanzitutto considerare la destinazione d'uso del terreno stesso (terreno agrario, terreno forestale, ecc.), le sue caratteristiche chimico-fisiche, oltre che l'ambiente pedoclimatico in cui si pone. I parametri di umificazione sono stati utilizzati, ad esempio, quali indicatori di qualità per verificare la presenza di uno stato di alterazione in terreni sottoposti ad intenso pascolamento, o su terreni forestali, al fine di studiare l'influenza della copertura vegetale sul turnover della sostanza organica del suolo.

Nel caso specifico, si può affermare che un suolo con elevati quantitativi di sostanza organica totale, ma con valori di tasso e grado di umificazione piuttosto bassi, costituisce un sistema poco "conservativo", dove la attività dei microorganismi è volta principalmente ad un rapido recupero di energia per mineralizzazione della sostanza organica, a scapito della formazione di composti organici stabili (le sostanze umiche): è il caso di un terreno sottoposto a stress metabolico, caratterizzato da un elevato turnover del carbonio e da una bassa attività umificante.

Un risultato di questo tipo è stato ottenuto, ad esempio, nello studio di un *terreno adibito a pascolo*, degradato per la attività di scavo di animali selvatici: tale attività sembra determinare da un lato il degrado degli orizzonti organici, dall'altro la prevalenza di meccanismi metabolici della biomassa microbica, atti alla mineralizzazione delle sostanze organiche, a scapito dei processi di umificazione (Trinchera et al., 1998a). In questo terreno, infatti, sono stati rilevati valori di tasso e grado di umificazione rispettivamente di 41 % e 43 %, alquanto simili fra loro e particolarmente bassi. L'interpretazione di questi dati è legata alla bassa attività di stabilizzazione della sostanza organica, che si presenta al 90 % (TEC 100/TOC) come estraibile, ma solo in piccola parte umificata: ciò può portare, a lungo termine, ad una riduzione della fertilità biologica di tale terreno, che si traduce in una accresciuta vulnerabilità ambientale.

Al contrario, un terreno che presenti valori di sostanza organica bassi, ma parametri di umificazione elevati, potrebbe semplicemente avere quale fattore limitante una scarsa quantità di apporti organici. È ad esempio il caso di un *terreno agrario* (Trinchera et al., 1999) sottoposto a set-aside. I dati relativi al tasso ed al grado di umificazione di tale terreno corrispondono al 58 % ed al 76 % rispettivamente, mentre il contenuto in carbonio organico totale è solo dello 0,85 %. La gestione a set-aside sembra comportare una forte ripresa della attività umificante del suolo, soprattutto a seguito di pratiche agricole che possono aver causato il progressivo depauperamento delle riserve umiche: in tal caso, la scarsa quantità di apporti organici (dovuta probabilmente alla scarsa copertura vegetale presente sul terreno considerato) limiterebbe a lungo termine il processo di formazione delle sostanze umiche a causa della impossibilità, da parte dei microorganismi del suolo, di reperire materiale organico.

Diverso è il caso di *terreni forestali*, dove un adeguato apporto di sostanza organica al suolo è principalmente garantito dalla presenza di lettiera (Pinzari et al., 1999). La tipologia di copertura vegetale gioca un ruolo chiave in questo tipo di suolo: è ben nota infatti l'influenza che le specie arboree hanno nei processi di mineralizzazione/umificazione del suolo, soprattutto su scala limitata (Dyer et al., 1990). Nel lavoro di Trinchera et al. (1998b), lo studio del turnover della sostanza organica in suoli forestali a differente copertura vegetale (lecceta, pineta, bosco misto mediterraneo e bosco idrofilo retro-dunale) ha evidenziato differenze significative proprio mediante l'uso dei parametri di umificazione come indicatori chimici. In particolare, è stato osservato come il sistema forestale a macchia mista (tipico della zona costiera mediterranea) presenti, oltre che un contenuto in carbonio organico sensibilmente superiore rispetto a quello degli altri sistemi studiati, anche valori di parametri di umificazione notevolmente più elevati, sia nello strato di terreno superficiale (DH = 91%) che in quello profondo (DH = 98 %). Ciò fa supporre che una maggiore eterogeneità nella copertura vegetale favorisca una più efficace dinamica della sostanza organica del suolo, elemento che è confermato dai dati relativi al sistema a pineta, dove i parametri di umificazione, seppure elevati in valore assoluto, risultano relativamente minori, sia nello strato superficiale (DH = 60 %) che in quello profondo (DH = 78 %).

Dopo quanto detto, risulta chiaro come i parametri chimici di umificazione costituiscano un set di indicatori della qualità del suolo di semplice determinazione e di immediata interpretazione, sebbene occorra sempre tenere presente che tali indicatori non possono da soli considerarsi esaustivi (elemento peraltro comune a tutti gli indicatori di qualità), essendo comunque necessarie conferme e verifiche a mezzo di ulteriori parametri a supporto.

4.2.5. *Analisi termica*

La termoanalisi, o analisi termica, comprende un gruppo di tecniche che sfruttano le proprietà chimiche e fisiche di una sostanza o di una miscela in funzione della temperatura in ambiente controllato (atmosfera statica o dinamica, in presenza di gas inerti, ossidanti o riducenti, etc.). Il campione viene sottoposto ad un programma di temperatura controllato che può includere degli stadi preselezionati di riscaldamento, raffreddamento o isotermitici (Dell'Abate, 1995). In particolare, l'analisi termica differenziale (DTA) rileva, mediante una termocoppia, le differenze di temperature tra un campione ed un materiale di riferimento termicamente inerte, in funzione della temperatura, nel corso di una scansione termica in ambiente controllato, mentre nella calorimetria a scansione differenziale (DSC) viene misurata l'energia richiesta per ristabilire l'equilibrio termico tra il campione e la sostanza di riferimento termicamente inerte.

I termogrammi ottenuti mediante DTA o DSC sono delle curve caratterizzate da una serie di picchi che possono essere endotermici o esotermici, la cui sequenza ed entità è in relazione con la composizione chimico-strutturale del campione e con i diversi livelli di energia coinvolta nelle reazioni registrate. In ascissa è generalmente riportata la temperatura (o il tempo di riscaldamento), mentre in ordinata la differenza di temperatura (μV) tra il campione e la sostanza di riferimento termicamente inerte o la quantità di energia (μW). Parametri caratteristici di un termogramma sono: la temperatura di picco, ovvero la temperatura alla quale si registra il flusso di calore massimo o la massima differenza di temperatura tra il reagente ed il riferimento, le temperature di inizio e fine reazione, mentre l'area sottesa dal picco è proporzionale alla quantità di energia coinvolta. Scansioni termiche condotte con materiali organici di diversa origine e diverso livello di umificazione danno luogo a picchi caratteristici per temperatura, intensità e sequenza, associati a frazioni di sostanza organica aventi differenti gradi di stabilità termica.

La termogravimetria (TG) è un'altra tecnica basata su una scansione termica in ambiente controllato che consente di registrare mediante una termobilancia il peso del campione in funzione della temperatura o del tempo di riscaldamento, mentre la termogravimetria derivativa (DTG) consiste nella derivata prima della curva TG. La DTG non fornisce informazioni aggiuntive sul campione in esame, ma permette una migliore risoluzione degli intervalli di temperatura o tempo in cui le reazioni registrate si sono verificate.

I termogrammi risultanti sono curve aventi in ascisse la temperatura ed in ordinate la perdita di peso, espressa come massa (mg) o in percentuale (%) rispetto al peso iniziale per quanto riguarda la TG, mentre l'ordinata della DTG (derivata prima della TG in funzione del tempo) è espressa come variazione di peso rispetto al tempo ($\% \text{ min}^{-1}$).

La termogravimetria è una tecnica essenzialmente quantitativa, perciò quando applicata alla sostanza organica del suolo, i dati di perdita di peso, dovuti alle reazioni di decomposizione e ossidazione termica di frazioni di sostanza organica aventi differenti gradi di stabilità termica, sono in relazione direttamente con le differenze di composizione e permettono stime sull'abbondanza relativa di tali frazioni. Anche la DSC, se condotta in condizioni opportune, può fornire misure relative al processo di combustione aventi significato quantitativo, ma l'estrapolazione di dati "calorimetrici" è concettualmente più problematica quando si analizzano sostanze eterogenee a composizione chimica complessa e variabile, quali la sostanza organica del suolo, in quanto numerosi fattori (sia strumentali che ambientali) influenzano il tracciato DSC o DTA, mentre i dati termogravimetrici risultano meno affetti. Al contrario, la DSC si dimostra uno strumento diagnostico importante quando applicata in combinazione con la TG: in questo caso, la cinetica di decomposizione e ossidazione della sostanza organica descritta dal tracciato DSC funziona da "controllo" dell'andamento del processo, la cui valutazione quantitativa può essere effettuata attraverso i dati termogravimetrici. In alcuni strumenti la determinazione TG è simultanea a quella DTA o DSC, in altri invece i due moduli sono separati. Il modulo simultaneo presenta il vantaggio che le due misure DSC (o DTA) e TG sono effettuate simultaneamente

sullo stesso processo in corso, pertanto tutti i fattori ambientali sono necessariamente identici. È utile sottolineare che le due misure sono indipendenti, ancorché effettuate sullo stesso campione, nelle stesse condizioni microambientali (all'interfaccia solido-gas) e simultaneamente nel corso dello stesso processo. Per approfondimenti sulla fisica delle tecniche di termanalisi e per un compendio delle principali applicazioni si rimanda a testi base quali MacKenzie (1970), Speyer (1994), Brown (1998), Brown e Gallagher (2003).

METODOLOGIA ANALITICA

Dal punto di vista analitico, l'esecuzione delle misure è di assoluta semplicità, ma è necessario determinare preliminarmente quali siano le migliori condizioni di misura, in termini di risoluzione e riproducibilità, ed attenersi ad esse per ogni gruppo di campioni che si intendono porre a confronto. Le misure, inoltre, devono essere accompagnate da chiare indicazioni sulle condizioni operative adoperate. Infatti, più di uno sono i fattori che influenzano una misura DTA o DSC, alcuni strumentali ed altri dipendenti dalle caratteristiche del campione. I primi comprendono: atmosfera della fornace, forma e grandezza della stessa, materiale di cui è costituito il portacampioni (detto "crogiolo") e geometria di questi, tipo di termocoppia e sua collocazione rispetto alla massa del campione, velocità di riscaldamento, velocità e risposta dell'apparato di registrazione. I fattori dipendenti dalle caratteristiche del campione sono: granulometria, conducibilità termica, impaccamento, quantità di campione, effetto dell'eventuale presenza di materiale diluente termicamente inerte, grado di cristallizzazione.

Dato un determinato strumento, molti dei fattori strumentali su elencati sono fissi, pertanto le variabili si riassumono in:

- **tipo di strumento (marca, modello e tipo di termocoppia)**
 - **tipo di crogiolo**
 - **atmosfera di gas**
 - **velocità di riscaldamento**
- **quantità di campione e pretrattamento (macinazione e/o diluizione, ecc.)**
 - **materiale di riferimento.**

Le prove termiche di calorimetria a scansione differenziale (DSC) e termogravimetria (TG), riportate nelle schede applicative del presente atlante, sono state condotte con un termoanalizzatore simultaneo Netzsch STA 409, munito di testa di misura TG/DSC a flusso di calore avente termocoppia di platino-platino/rodio (PtRh10-Pt). Questo tipo di strumento, detto "DSC a flusso di calore", può effettuare delle misure di tipo calorimetrico in quanto soddisfa la condizione che la quantità $M = \text{area sottesa dal picco} / (\text{calore latente di fusione per grammo} \times \text{massa del campione})$ è costante per trasformazioni in differenti materiali standard. I campioni liofilizzati di estratti umici sono stati analizzati nelle seguenti condizioni di misura: velocità di riscaldamento $10^\circ\text{C min}^{-1}$ da 20 a 900°C , atmosfera di aria statica, crogioli di allumina, riferimento inerte caolino calcinato, peso del campione circa 5 mg. Il sistema DSC è stato calibrato nelle stesse condizioni di misura, utilizzando uno standard di zaffiro e sottraendo una linea di base ottenuta da una scansione termica con i crogioli vuoti. La termobilancia è stata calibrata per l'effetto buoyancy al fine di ottenere stime quantitative di perdite di peso. I dati sono stati elaborati mediante il software applicativo Netzsch SW/cp/311.01. Le prove sono state condotte in doppio al fine di verificare la riproducibilità delle misure.

INTERPRETAZIONE DEI TERMOGRAMMI

Un tracciato DSC si presenta come una curva caratterizzata da picchi esotermici (associati a reazioni che implicano una cessione di calore da parte del campione reagente) e da picchi endotermici (associati a reazioni in cui il campione assorbe energia), la cui sequenza ed intensità descrive il comportamento termico del campione nell'intervallo di temperatura considerato.

I principali parametri di una curva DSC sono:

- **temperatura di picco: temperatura in cui il flusso di calore tra il campione ed il riferimento termicamente inerte è massimo o minimo; ne risultano delle esoterme o endoterme;**
- **temperatura di “onset” e di “fine”: sono, rispettivamente, le temperature a cui si registra uno scostamento sensibile dalla linea di base (onset) per inizio di una trasformazione, oppure il ripristino dell'equilibrio termico (ritorno alla linea di base) per conclusione di una trasformazione termica (fine);**
- **energia coinvolta in una trasformazione termica: si determina a partire dall'area sottesa dal picco (generalmente considerata tra i punti di “onset” e di “fine”), dopo opportuna calibrazione con sostanze standard, ovvero sostanze che hanno quantità note di calore associate a determinate trasformazioni di fase, in numero tale da ottenere una curva di “sensitivity” sull'intero intervallo di temperatura termicamente attivo per il campione sotto esame.**

Un tracciato termogravimetrico (TG) è una curva continua che indica o la massa o le variazioni di peso eventualmente subite dal campione a seguito di reazioni di decomposizione termicamente indotte (si avrà allora una perdita di peso) oppure a reazioni di combinazione chimica con uno o più componenti dell'atmosfera gassosa con cui il campione è a contatto (aumento di peso).

I parametri termoanalitici dedotti sono perciò:

- **variazioni di peso;**
- **intervalli di temperatura corrispondenti alle variazioni di peso registrate;**
- **quantità di campione residuo a fine scansione termica.**

La derivata prima della curva TG (DTG) fornisce indicazioni cinetiche sulla velocità con cui le variazioni di peso si sono verificate. La sua utilità consiste nel fatto che permette di distinguere i singoli steps in cui si sono verificate reazioni associate a variazioni di peso. I parametri che vengono dedotti dalla curva DTG sono:

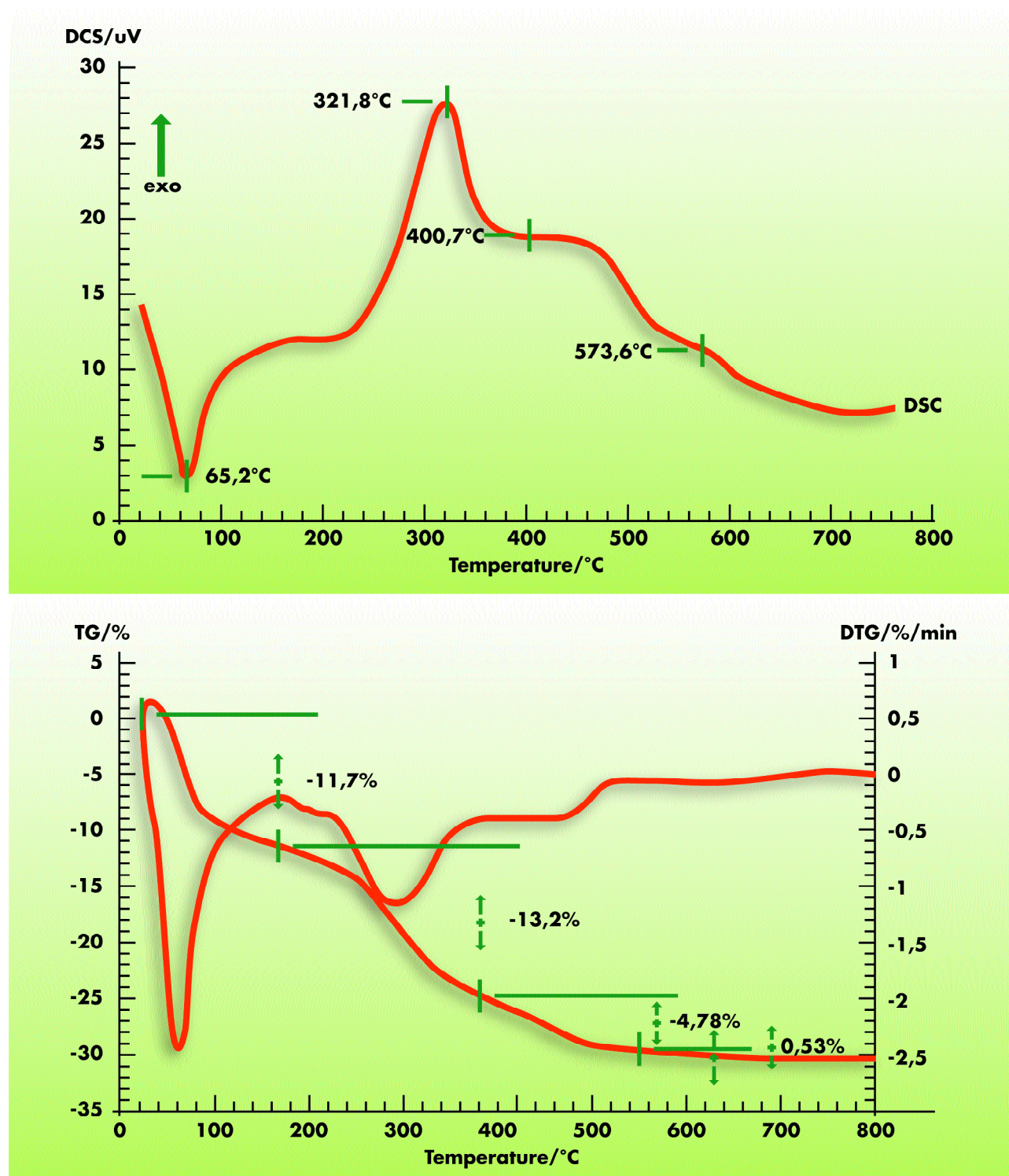
- temperature di inizio e fine reazione: corrispondono ai punti nei quali si registra uno scostamento minimo dalla linea di base prima e dopo il picco; tali punti definiscono l'intervallo di temperatura in cui è avvenuta la trasformazione in esame;

- **temperatura di picco: temperatura alla quale la velocità di reazione è massima;**
- **intensità di picco: velocità massima con la quale la reazione si è verificata.**

Nei sistemi simultanei DSC/TG o DTA/TG l'analisi comparata dei termogrammi permette di distinguere efficacemente gli effetti termici dovuti a transizioni di fase (ad esempio fusioni) da quelli dovuti a decomposizioni con perdite di peso. Nella Figura 4.3 sono riportati separatamente i tracciati DSC e TG/DTG, sui quali si possono notare il picco endotermico a circa 65°C dovuto a deidratazione, associato a perdita di peso, seguito da tre esoterme, a circa 320, 400 e 575°C, aventi intensità decrescente ed associate a tre distinte perdite di peso.

FIGURA 4.3.

TERMOTRACCIATI DSC E TG/DTG DELLA SOSTANZA ORGANICA ESTRATTA DA UNA PARCELLA TRATTATA CON LETAME ED UREA IN PROVE A LUNGO TERMINE (DELL'ABATE ET AL., 2000).



L'applicazione di questa tecnica allo studio della sostanza organica del suolo e delle sostanze umiche, in particolare, consente di trarre informazioni sulle condizioni di degradazione della sostanza organica del suolo in funzione dei fattori che maggiormente ne influenzano il turnover, come le condizioni climatiche e pedomorfologiche e la gestione agraria cui il suolo è sottoposto, con notevoli implicazioni sulla sua qualità. Questo tipo di approccio è stato utilizzato nello studio condotto da Grisi et al. (1998), in cui sono stati posti a confronto la sostanza organica e le dinamiche della biomassa microbica di suoli sviluppati in condizioni tropicali e temperati. Gli estratti liofilizzati di sostanza organica sottoposti ad analisi DTA e TG hanno evidenziato la presenza di maggiori quantità di frazioni organiche termicamente labili nei suoli temperati che in quelli tropicali; le perdite termogravimetriche associate a ciascuna frazione sono risultate, inoltre, correlate con i valori di biomassa microbica e di carbonio dopo 150 giorni di incubazione a 35°C. Da questo studio è stata dedotta la possibilità di ricavare delle stime sullo *status* energetico del pool di sostanza organica in relazione con le dinamiche microbiche nel suolo.

Estratti di sostanza organica di campioni provenienti da parcelle interessate da ammendamenti organici a lungo termine hanno rivelato, ad esempio, un arricchimento relativo delle frazioni termicamente più labili (Figura 4.3), e quindi presumibilmente più disponibili per il metabolismo microbico, laddove l'ammendante era costituito da letame rispetto alle parcelle interessate dall'interramento di paglia e stocchi (Dell'Abate et al., 2000).

L'applicazione di queste tecniche allo studio delle sostanze umiche estratte dal suolo consente di verificare quali caratteristiche le sostanze umiche conservino della sostanza organica da cui sono state separate. In particolare, è risultato che il livello di complessità chimico-strutturale delle sostanze umiche (acidi umici più fulvici), espresso sia dalle cinetiche di decomposizione/ossidazione termica (termogrammi DSC) che dai parametri termogravimetrici (TG) associati, riflette in larga misura il tipo di turnover cui la sostanza organica del suolo è stata sottoposta, serbandone in un certo senso "memoria" (Dell'Abate et al., 2002).

4.2.6. Caratterizzazione della sostanza organica del terreno mediante focalizzazione isoelettrica (IEF)

Le sostanze umiche conferiscono al suolo caratteristiche chimico-fisiche e biochimiche ottimali ai fini della sua fertilità biologica. Una tecnica che fornisce informazioni sulla qualità della sostanza organica di un suolo è la focalizzazione isoelettrica.

METODOLOGIA ANALITICA

La focalizzazione isoelettrica (IEF) è una tecnica elettroforetica che permette la separazione di composti organici diversi in funzione del loro punto isoelettrico (pI).

La separazione avviene in un gel di poliacrilammide (spessore 0,5 mm) nel quale viene creato un opportuno gradiente di pH utilizzando una miscela di anfoliti carrier. L'intervallo di pH entro il quale si realizza la separazione elettroforetica è variabile (da un minimo di 3,5 ad un massimo di 10 unità di pH) e si ottiene con differenti miscele di sostanze anfotere, scelte in funzione della matrice in esame. Il gradiente di pH si realizza applicando al gel per 2h e 30' una differenza di potenziale di 2500 V (precorsa IEF), corrispondente ad una intensità di 21 mA, una potenza di 14 W, a temperatura di 1°C. A seguito della precorsa, il gel può fungere da mezzo elettroforetico per la separazione della miscela in esame.

Durante la corsa isoelettrica, le sostanze da caratterizzare (preventivamente purificate, liofilizzate e risolubilizzate in H₂O ad opportuna concentrazione), vengono poste al catodo su feltrino di cellulosa. La corsa IEF viene effettuata secondo le modalità già seguite per la precorsa (2500 V, 21 mA, 14 W, 1°C) per 2 h. Applicando una differenza di potenziale al sistema le molecole organiche, sottoposte a un campo elettrico, migrano all'interno del gel dal catodo (polo negativo) verso l'anodo (polo positivo), focalizzando ad un valore di pH corrispondente al loro punto isoelettrico (pI). Occorre ricordare che, quando ci si riferisce alle sostanze umiche, si considerano molecole di tipo poi-anionico, caratterizzate dalla presenza di numerosi gruppi funzionali acidi di tipo carbossilico e fenolico, in forma ionizzata. Nel passaggio attraverso il gel, quindi, i siti molecolari carichi negativamente (principalmente -COO⁻ e -O⁻) vengono ad essere neutralizzati dagli ioni H⁺ presenti lungo il percorso elettroforetico (a differenti concentrazioni, in funzione del corrispondente valore di pH).

Il valore di pH al quale la molecola (o la miscela di molecole) risulta completamente neutralizzata corrisponde al suo pI.

Al termine della corsa IEF, ogni campione analizzato genera una serie di bande che vengono successivamente evidenziate con colorante organico Blu Coomassie o Basic Blue 3, e quindi rilevate mediante densitometro Laser Ultra-scan-XL.

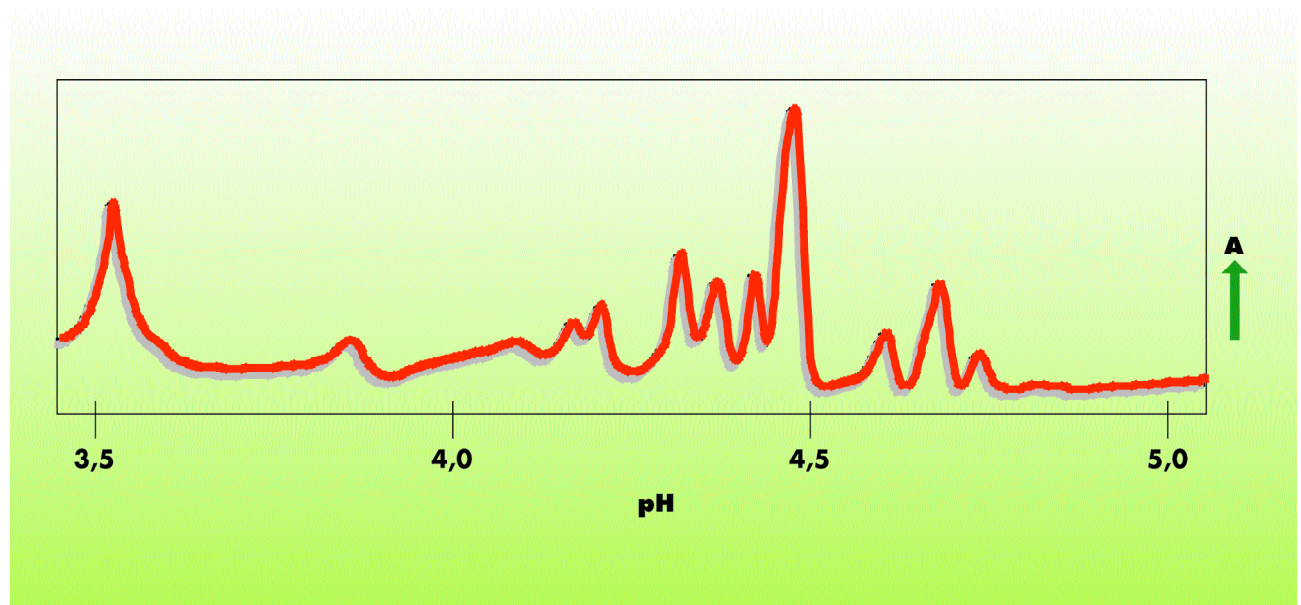
La lettura densitometrica permette di trasformare la sequenza di bande in un profilo isoelettroforetico, che è costituito da una serie di picchi focalizzati a differenti valori di pH e con differente intensità.

In tal modo, ciascuna matrice (suolo, compost o altro) produrrà un profilo IEF caratteristico.

La focalizzazione isoelettrica (IEF) si è rivelata di grande utilità nello studio di materiali di origine biologica, permettendo la separazione di singoli componenti molecolari di una miscela. Nel caso delle sostanze umiche, poiché non è possibile raggiungere una separazione netta in componenti (non è ancora stato isolato e purificato nessun componente delle sostanze umiche), l'interpretazione dei profili risulta maggiormente complessa. La separazione non avviene infatti per singole componenti, ma per formazione di miscele di composizione ignota. La valutazione del profilo IEF non deve quindi essere intesa come un riconoscimento specifico di una o più componenti umiche, ma piuttosto come una caratterizzazione qualitativa della sostanza organica del suolo, in grado di informare sul livello di stabilità di quest'ultima. A tal proposito si ricorda che, al fine di disporre di un "riferimento IEF" per le sostanze umiche del suolo, la tecnica è stata applicata a campioni di acidi umici detti "standard" in quanto preparati dalla Società Internazionale delle Sostanze Umiche (IHSS) secondo una procedura di estrazione e purificazione standardizzata (MacCarthy et al., 2000; IHSS, 2001), in modo tale da disporre di un profilo di confronto al quale riferirsi per la valutazione relativa alle sostanze umiche purificate da diversi terreni. Si riporta di seguito il profilo IEF di un campione di acidi umici standard IHSS estratti da suolo (Figura 4.4).

FIGURA 4.4.

PROFILO IEF DEGLI ACIDI UMICI PURI “STANDARD” IHSS (S102H) ESTRATTI DA SUOLO (DELL’ABATE ET AL., 2002).



Negli ultimi dieci anni, numerosi studi sono stati effettuati sulle sostanze umiche estratte e purificate dal suolo mediante applicazione della tecnica IEF.

Nel 1993, Ciavatta e Govi hanno dimostrato come tale approccio analitico possa fornire utili informazioni in relazione al livello di stabilità della sostanza organica di un terreno, permettendo di differenziare gruppi di sostanze umiche in funzione proprio del loro punto isoelettrico. Quest’ultimo, infatti, rende conto non solo dell’acidità “reale” della molecola (ossia del numero di gruppi acidi presenti), ma anche del suo peso molecolare, dal momento che a parità di carica elettrica, molecole di grandi dimensioni permettono una maggiore distribuzione di carica e quindi una più lenta migrazione all’interno del gel. Conseguentemente, composti organici maggiormente umificati, che generalmente presentano acidità minore e peso molecolare maggiore, focalizzano a valori di pH più elevati, mentre composti caratterizzati da punti isoelettrici minori (più acidi e di minor peso molecolare) sono riconducibili alle frazioni organiche più labili.

Nel lavoro di Benedetti et al. (1994), sono stati considerati alcuni esempi tipici di terreni italiani, sia forestali che agrari, per i quali è stato determinato il profilo elettroforetico della frazione umica purificata. È stato evidenziato che le pratiche agronomiche troppo intensive possono intaccare fortemente la frazione di sostanza organica umificata di più recente formazione. I profili IEF dei terreni intensamente coltivati, infatti, si sono rivelati essere estremamente semplificati, con poche bande elettroforetiche, per di più focalizzate a valori di pH piuttosto bassi (3,5-4,3). Al contrario, i terreni forestali indagati sono stati caratterizzati da profili IEF assai complessi, con bande elettroforetiche di differente intensità, focalizzate in un intervallo molto più ampio (3,5-5,5), elemento in grado di attestare la presenza di materiale organico ad elevato livello di umificazione.

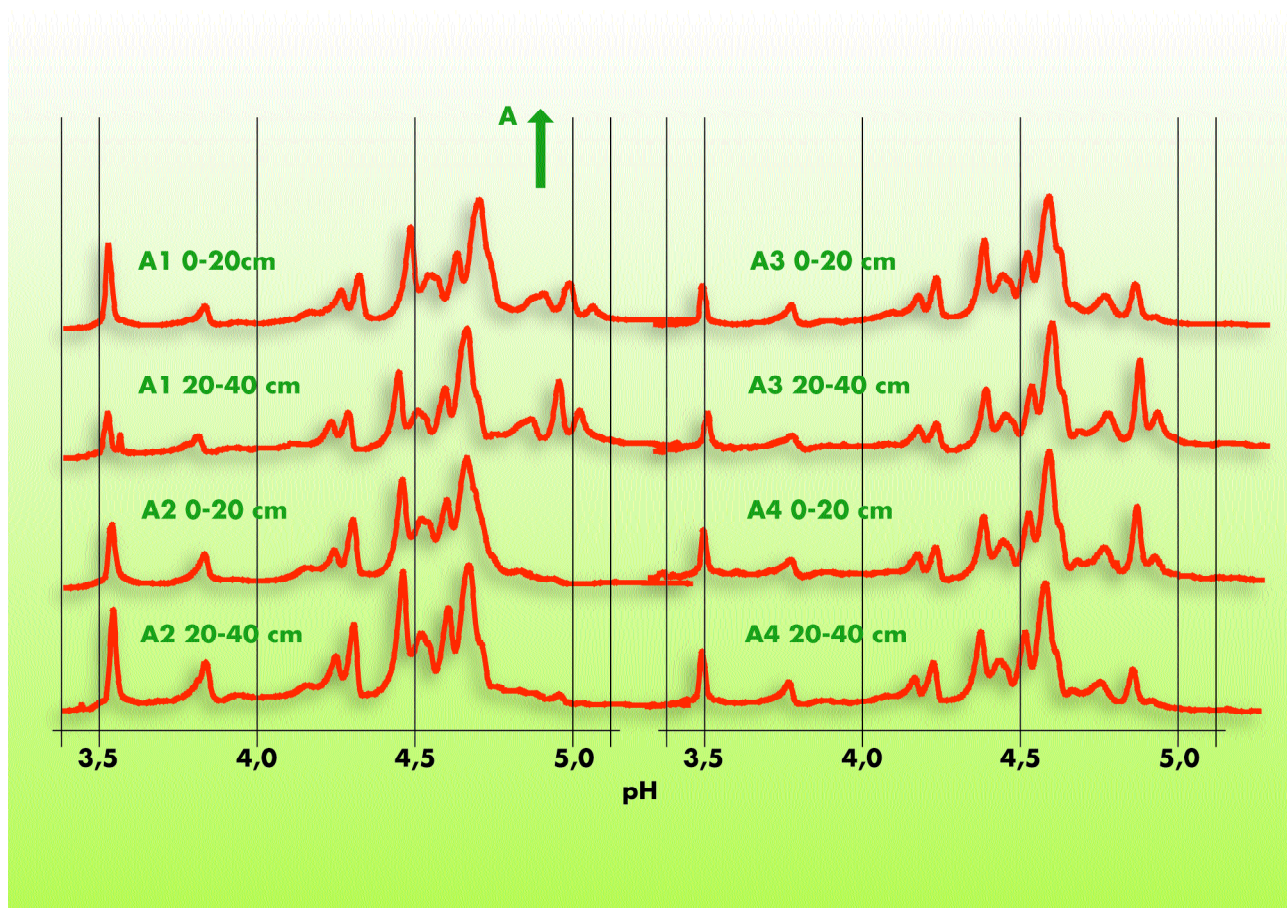
In relazione ai suoli boschivi, nel lavoro di Trinchera et al., (1998b) sono stati considerati alcuni siti forestali dell’Italia centrale, caratterizzati da differente copertura vegetale: *Quercus ilex*; macchia mediterranea; *Pinus Pinea*; bosco misto igrofilo retrodunale.

A titolo esplicativo, si riportano di seguito i profili IEF relativi alla sostanza umica estratta da tali terreni, relativamente alla profondità 0-20 cm e 20-40 cm (Figura 4.5).

FIGURA 4.5.

PROFILI IEF DI ALCUNI TERRENI FORESTALI DELL'ITALIA CENTRALE A PROFONDITÀ 0-20 E 20-40 CM.

A1 = *Quercus ilex*; A2 = macchia mediterranea; A3 = *Pinus Pinea*; A4 = bosco misto igrofilo retrodunale. (Trinchera et al., 1998).



Come è possibile rilevare, sono riscontrabili differenze nei profili isoelettroforetici non solo in relazione alla differente copertura vegetale, ma anche in funzione della differente profondità di prelievo. Dal confronto emerge chiaramente come la copertura vegetale a macchia mediterranea (A2) comporti una minore umificazione del terreno sottostante, sia per lo strato di suolo superficiale che profondo (assenza di bande IEF a pH maggiore di 4,7). Viceversa, nel caso della copertura a lecceta (A1) o a pineta (A3), la sostanza umica purificata sembra essere piuttosto stabile, in particolare nello strato più profondo (presenza di bande a pH 4,7-5,0). Il bosco igrofilo retrodunale mostra invece un andamento inverso, con una umificazione maggiore nello strato superficiale 0-20 cm. Tali informazioni, confortate da dati analitici relativi ai parametri di umificazione nonché al livello di attività mineralizzante del terreno, possono informare non solo sulla umificazione del suolo, ma più in generale possono descrivere efficacemente il turnover della sostanza organica, assumendo così un importante ruolo di "indicatori di stato" del sistema.

BIBLIOGRAFIA

- Benedetti A., Alianiello F., Dell'Orco S. and S. Canali. 1994. *A comparative characterisation of organic matter in agrarian and forest soils from Italy*. Environment International, Vol. 20, No. 3, pp. 419-424. Elsevier Science Ltd.
- Bremmer G.W., Gerth, Herms W. 1986. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **149**, 382-398.
- Brown M.E. (Ed.) 1998. *Handbook of thermal analysis and calorimetry, 1*. Elsevier Science, Amsterdam.
- Brown M.E., Gallagher Patrick (Eds.) 2003. *Handbook of thermal analysis and calorimetry, 2*. Elsevier Science, Amsterdam.
- Burns R. G. 1982. *Enzyme activity in soil: location and possible role in microbial ecology*. Soil Biology and Biochemistry, 14: 217-224.
- Ciavatta C., Govi M., Vittori Antisari L. e Sequi P. 1990. "Characterization of humified compounds by extraction and fractionation on solid polyvinylpyrrolidone". Journal of Chromatography 509: 141-146.
- 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.
- Dell'Abate M. T. 1995. *Caratterizzazione della sostanza organica del suolo mediante tecniche di termoanalisi*. Atti Convegno P.A.N.D.A. Tecnologie Chimiche Avanzate per l'Agricoltura, Roma, 10-11 aprile, 83-92.
- Dell'Abate M.T. 2000. *La sostanza organica del suolo quale indicatore di qualità*. Rendiconti Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL, Memorie di Scienze Fisiche e Naturali 119°, XXIV: 285-298.
- Dell'Abate M.T. 2005. *Applicazione dei metodi di analisi termica alla caratterizzazione di complessi organo-minerali*, Cap. X. In: Metodi di Analisi Mineralogica del Suolo (Coord. P. Adamo), FrancoAngeli.
- Dell'Abate M. T., Benedetti A., Trinclera A., Dazzi C. 2002. *Humic substances along the profile of two Typic Haploxyerent*. Geoderma, 107: 281 - 296.
- Dell'Abate M. T., Benedetti A., Brookes P. C. 2000. *Estimation of the energy in the soil organic matter pool and its relation with soil microbial dynamics*. In: Biotechnology of soil monitoring, conservation and remediation. Proceedings of the COST Action 831 Joint Working Groups Meeting, Round Table : Defining soil quality, Roma 10-11 dicembre 1998. European Commission Directorate-General for Research, pp. 265-274.
- De Nobili M., Maggioni A. 1993. *Regolazione delle proprietà chimiche del suolo da parte della sostanza organica*. In : Nannipieri P. (Ed.), *Ciclo della sostanza organica del suolo*. Aspetti agronomici, chimici, ecologici, selvicolturali. Patron, Bologna, pp.43-54.
- Drodz J., Gonet S. S., Senesi N., Weber J. (eds.) 1997. *The role of humic substances in the ecosystems and in the environmental protection*. Polish Society of Humic Substances, Wroclaw, Poland.
- Dyer M.L. Meentemeyer V. and Berg B. 1990. "Apparent controls of mass loss rate of leaf litter on a regional scale." Litter quality vs. climate. Scand. J. For. Res. 5: 311-323.
- Grisi, B., Grace, C., Brookes, P.C., Benedetti, A., Dell'Abate, M.T. 1998. *Temperature effects on organic matter and microbial biomass dynamics in temperate and tropical soils*. Soil Biol. Biochem. 30: 1309-1315.
- Landi L., Renella G., Nannipieri P. 2000. *Indicatori chimici della qualità del suolo: il ruolo della sostanza organica*. Rendiconti Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL, Memorie di Scienze Fisiche e Naturali 118°, vol. XXIV: 239-248.
- MacCarthy P., Malcolm R. L., Hayes M. H. B., Swift R. S., Schnitzer M., Campbell W. L. 2000. *A collection of standard humic substances established in 1981*. <http://www.ihss.gatech.edu/history.htm>
- Mackenzie R.C. (Ed.). 1972. *Differential Thermal Analysis*, Voll. 1-2, Academic Press, London.
- International Humic Substances Society 2001. IHSS Official Web Page. <http://www.ihss.gatech.edu/>
- Montanarella L., Jones R. S. A. 1999. *The European Soil Bureau*. In: Soil Resources of Europe, P. Bullock, RJA Jones, L Montanarella (Eds). European Soil Bureau Research Report N. 6, EUR 18991 EN, pp. 3-14. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Nannipieri P. 1993. *Ciclo della sostanza organica nel suolo*, Patron Editore.
- Nannipieri P., Ceccanti B., Grego S. 1990. *Ecological significance of the biological activity*. In: Bollag J.M., Stotzky G. (Eds) *Soil Biochemistry*, Vol.6. Marcel Dekker, New York.
- Pinzari F., Trinchera A., Benedetti A., Sequi P. 1999. "Use of biochemical indexes in the mediterranean environment: comparison among soils under different forest vegetation." Journal of Microbiological Methods, 36: 21-28.
- Senesi N., Miano T. M. (Eds) 1994. *Humic substances in the global environment and implications on human health*. Elsevier, Amsterdam.
- Sequi P. (coord.) 1989, *Chimica del Suolo*, Patron.
- Sequi P., De Nobili M., Leita L., Cercignani G. 1988. "A new index of humification". Agrochimica. 30: 175-179.
- Smith O. H., Petersen G. W., Needelman B. A. 2000. *Environmental indicators of agroecosystems*. Advances in Agronomy, vol.69: 75-97.
- Sojka R. E., Upchurch D. R. 1999. *Reservations regarding the soil quality concept*. Soil Sci. Soc. Am. J. 63: 1039-1054.
- Speyer R. F. 1994. *Thermal Analysis of Materials*. Marcel Dekker, New York.
- Springer U., Klee J. 1954 "Prüfung der Leistungsfähigkeit von einigen wichtigeren Verfahren zur Bestimmung des Kohlenstoffs mittels Chromschwefelsäure sowie Vorschlag einer neuen Schnellmethode." Z. Pflanzenernähr. Dang. Bodenk, 64: 1.

- Stevenson F. J. 1994. *Humus chemistry. Genesis, composition, reactions*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Trinchera A., Pinzari F., Benedetti A. 1998a. *Valutazione dell'impatto del pascolamento di cinghiali (Sus scrofa L.) sulla fertilità del suolo in area mediterranea*. Atti del Convegno Annuale della Società Italiana della Scienza del Suolo, Roma, 2-5 Giugno 1997, 295-303.
- Trinchera A., Pinzari F., Benedetti A., Sequi P. 1998b. *Defining soil quality in mediterranean forest systems: Note I: organic matter turnover*. Fresenius Environmental Bulletin, 7: 437-446.
- Trinchera A., Pinzari F., Benedetti A., Sequi P. 1999. *Use of biochemical indexes and changes in organic matter dynamics in a Mediterranean environment: a comparison between soils under arable and set-aside management*. Organic Geochemistry, 30:453-459.
- Zdruli P., Jones R. J. A., Montanarella L. 2004. *Organic matter in the soils of Southern Europe*. European Soil Bureau Research Report, EUR 21083 EN, 16 pp. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.