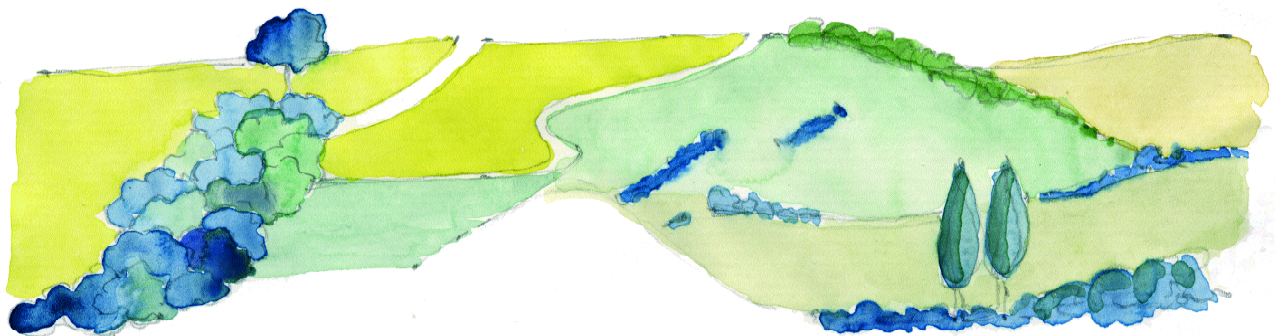


cirque

capitolo

INDICATORI MICROBIOLOGICI E BIOCHIMICI DELLA QUALITÀ DEL SUOLO



5. INDICATORI MICROBIOLOGICI E BIOCHIMICI DELLA QUALITÀ DEL SUOLO

Anna Benedetti, Maria Teresa Dell'Abate, Stefano Mocali, Letizia Pompili
CRA - Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante- Roma

5.1 INTRODUZIONE

Il suolo, nella sua accezione moderna, è considerato un sistema polifasico la cui costituzione ideale può essere così schematizzata:

fase solida	50%	inorganica 96-97%
fase liquida	25%	
fase gassosa	25%	organica 3-4%

La fase vivente comprende batteri, funghi, alghe, attinomiceti, protozoi, vermi e artropodi.

Il terreno entra in relazione con le piante a cui fa da supporto, formando un ecosistema unico con esse e con i microrganismi. In particolare, per quanto attiene al terreno agrario si deve precisare che, oltre alla funzione di sostenere e nutrire le piante, deve renderne possibile la loro coltivazione con un utile economico. La fertilità viene infatti definita come la capacità del terreno di rendere produttive le colture. Si parla normalmente di **fertilità chimica** (somma degli elementi nutritivi in forma assimilabile a disposizione delle colture), di **fertilità fisica** (struttura, tessitura del terreno etc.) e di **fertilità biologica**. Il concetto di fertilità biologica, però, è andato affermandosi solo in questi ultimi venti anni e con esso si vuole caratterizzare l'espressione del metabolismo e del turnover microbico.

La funzione dei microrganismi del suolo è di molteplice natura: si esplica sia nei processi pedogenetici che nella nutrizione delle piante. I microrganismi intervengono infatti nella mineralizzazione della sostanza organica, nella sintesi dell'azoto, nella formazione dell'humus e agiscono inoltre sulla mobilizzazione degli elementi minerali. Particolarmente importante a questo riguardo è la solubilizzazione del fosforo ad opera della CO₂ di provenienza microbica; infatti è stato notato che esiste un parallelismo tra CO₂ svolta e fosforo disponibile.

Oltre a ciò occorre ricordare i rapporti che i microrganismi instaurano con le piante nella fascia rizosferica, fillosferica e spermosferica, nonché nella simbiosi micorrizica.

I microrganismi rappresentano dunque una componente di fondamentale importanza per la fertilità dei terreni e svolgono un ruolo insostituibile, in mancanza del quale il terreno rappresenterebbe semplicemente un inerte supporto meccanico.

RUOLO DEI MICRORGANISMI NELLA PEDOGENESI

Il terreno prende origine dalla roccia madre, attraverso processi di natura fisico-meccanica, chimica e biologica, che si svolgono in tempi geologici lunghissimi.

L'azione fisico-meccanica dipende da agenti endocinetici, quali la temperatura, ed esocinetici, tra i quali vanno ricordati il ghiaccio, il vento e l'acqua, che agiscono sulla roccia determinandone la frammentazione e l'erosione.

I fattori chimici che intervengono nella pedogenesi sono rappresentati dall'ossigeno, dall'anidride carbonica e ancora dall'acqua che agisce in questo caso idrolizzando i silicati.

Di fatto l'acqua rappresenta il fattore quantitativamente più rilevante operando nella pedogenesi come agente sia fisico che chimico.

I fattori biologici sono dovuti sia all'azione dei microrganismi che delle piante.

I residui vegetali subiscono infatti nel terreno una complessa serie di reazioni biochimiche, solo in parte note, che portano sia alla mineralizzazione (con produzione di CO_2 , H_2O etc.) che all'umificazione.

L'apparato radicale delle piante superiori svolge inoltre un'azione sia di tipo meccanico, penetrando in profondità e frammentando la roccia, che chimico ad opera degli essudati radicali e della respirazione radicale.

Anche gli animali, soprattutto gli invertebrati, svolgono un'azione pedogenetica di notevole interesse; i lombrichi, ad esempio, ingerendo il terreno ne provocano uno sminuzzamento (aratura biologica), ed inoltre, con la loro flora intestinale, lo arricchiscono di materiale gommoso contribuendo al miglioramento della struttura.

Di notevole rilievo è anche l'azione dei microrganismi sulla struttura del terreno, fattore questo di fondamentale importanza per la produttività del suolo.

La microflora e la microfauna tellurica intervengono infatti mediante la formazione di polisaccaridi, gomme ed altri prodotti di sintesi che operano una aggregazione delle particelle primarie del terreno.

TABELLA 5.1

RIPARTIZIONE DEI MICRORGANISMI DEL SUOLO

Peso della massa microbica in Kg/ha		
Batteri	450	- 7000
Funghi	600	- 1000
Attinomiceti	150	- 700
Protozoi	100	- 200
Alghe	25	- 100

Nell'ambito della microbiologia del suolo, la classificazione più importante è quella per "gruppi fisiologici" proposta per primo da Winogradsky.

I gruppi fisiologici vanno intesi come l'insieme di individui sistematicamente diversi, ma in grado di svolgere la medesima funzione. Così si parla per esempio di azotofissatori, amilolitici, pectinolitici, solfossidanti e solforiduttori, focalizzando l'interesse sul processo biochimico più che sulle singole specie, recentemente la comunità scientifica ha affrontato questo tema parlando spesso di diversità genetica e funzionale delle popolazioni microbiche del suolo riconoscendo validità informativa ad entrambe le dimensioni Lynch et al. (2004).

È ancora di Winogradsky la suddivisione dei microrganismi in autoctoni e zimogeni, i primi con una attività scarsamente influenzata dalle variazioni ambientali, i secondi particolarmente sensibili alla presenza di determinati materiali organici ed inorganici.

I microrganismi possono inoltre essere classificati in base alle fonti nutrizionali da essi utilizzati, si distinguono cioè gli eterotrofi, che costituiscono la stragrande maggioranza, dagli autotrofi. Questi ultimi, che rappresentano una minima parte, vengono suddivisi in chemioautotrofi, se utilizzano sostanze minerali (batteri nitrificanti), e fotolitotrofi se utilizzano la luce (batteri anaerobi fotosintetici rossi e verdi).

La speciazione della carica microbica dei diversi terreni è comunque influenzata da fattori ambientali, nonché dalle caratteristiche fisico-chimiche del terreno stesso e dal suo grado di fertilità. Si è visto, inoltre, che la carica microbica diminuisce con la profondità del terreno, soprattutto per il decremento della sostanza organica. Esperienze di laboratorio hanno infatti confermato che l'apporto di sostanza organica al terreno provoca un incremento della popolazione microbica.

Si deve inoltre precisare che la capacità delle diverse specie microbiche nell'utilizzare differenti sostanze nutritive porta ad una ineguale distribuzione nell'ambito dei terreni.

La distribuzione dei microrganismi dipende ancora dalla presenza di specie tra loro competitive e per alcune di esse dalla capacità di sopravvivenza mediante sporificazione ed inoltre dalla presenza di organi di locomozione.

LA FERTILITÀ BIOLOGICA DEL TERRENO

Il terreno naturale è un sistema ecologico aperto, che riceve e perde energia. Le modificazioni energetiche a cui va incontro sono determinate dalla nutrizione e dalla respirazione delle popolazioni microbiche, dal trasferimento e circolazione ciclica degli elementi, dalla sintesi e degradazione della sostanza organica.

Si può affermare che l'equilibrio del suolo naturale, cioè non coltivato, è governato da quattro parametri: bioenergetica, trasformazioni cicliche, umificazione e pedogenesi, strettamente connessi l'uno con l'altro in modo da mantenere in equilibrio ecologico il terreno con l'ambiente.

Lo sfruttamento agricolo modifica questi rapporti, le pratiche agronomiche ad esempio accelerano le trasformazioni cicliche. Questa maggiore dinamicità fa sì che il terreno agrario abbia rispetto al terreno naturale un minor grado di stabilità. Una delle funzioni più importanti dei microrganismi è appunto quella di presiedere alle trasformazioni a carico degli elementi nutritivi in modo da mantenere un equilibrio di scambio tra suolo e pianta, contribuendo così allo stato di fertilità dei terreni.

I processi del metabolismo del suolo, intesi come trasformazioni di materiali ed energetiche, sono fondamentalmente connessi al turnover microbico sotto l'azione di fattori limitanti sia abiologici che di coazione biologica. La moderna agricoltura dovrebbe infatti prefiggersi lo scopo di raggiungere la massima produttività consentita dalle condizioni edafiche, mantenendo elevato non solo il livello della fertilità chimica, ma anche quello della fertilità biologica.

La fertilità biologica di un terreno può essere dunque definita come una espressione della vita microbica dei suoli e dipende soprattutto dalla sostanza organica e dall'ambiente. L'ambiente inteso come clima non solo condiziona lo sviluppo dei microrganismi ma anche la loro attività e quindi l'evoluzione della sostanza organica, che è la fonte di energia necessaria per lo svolgimento della vita microbica. In particolare, per quanto riguarda la sostanza organica, si deve sottolineare che i residui vegetali sono costituiti da circa il 75% di cellulosa, il 15% di lignina, il 5% di proteine ed il 5% di ceneri. I residui ipogei ed epigei soggiacciono a decomposizione batterica prevalentemente aerobica. La quantità dei residui vegetali che si accumula nel terreno varia moltissimo, specie in rapporto alle diverse condizioni ambientali. Le proteine vengono trasformate in proteine microbiche, attraverso una serie di passaggi intermedi, la cellulosa viene ossidata in gran parte ad anidride carbonica dai microrganismi, quale fonte di energia, oppure utilizzata per la formazione di sostanza microbica. La lignina è molto più resistente alla degradazione ed è considerata il materiale principale da cui si produce l'humus. La sostanza organica dunque è un parametro molto importante per la fertilità biologica perché interviene non solo sulla formazione dell'humus, ma anche sulla formazione di sostanze specifiche microbiche e sul loro metabolismo.

I microrganismi eterotrofi si servono infatti di monosaccaridi e azoto per le loro sintesi cellulari ed è stato dimostrato che il tenore in carbonio di un terreno influenza grandemente il metabolismo dell'azoto. Un substrato con un elevato C/N favorisce l'immobilizzazione dell'azoto, mentre un C/N basso favorisce la mineralizzazione.

La fertilità biologica unitamente alla fertilità chimica ed a quella fisica costituisce la fertilità agromeconomica o integrale dalla quale dipende la produttività. La fertilità tuttavia non è sinonimo di produttività in quanto la prima dipende dal terreno mentre la seconda sia dal terreno che dalla pianta. Inoltre le basi biologiche della produttività riferite ad un terreno naturale non coincidono con quelle della produttività agromeconomica in quanto quest'ultima rappresenta un livello produttivo superiore a quello naturale.

La produttività di un suolo è strettamente correlata, invece, al concetto di "qualità" (Rodale Institute, 1991). In questi ultimi anni sono state date molte definizioni di qualità del suolo, ma quella che sembra riassumere meglio il concetto è stata proposta da Doran e Parkin (1994): "La capacità del suolo di interagire con l'ecosistema per mantenere la produttività biologica, la qualità ambientale e promuovere la salute animale e vegetale". Nell'ambito di numerosi dibattiti sono state avanzate proposte sulle procedure da adottare a livello internazionale per la valutazione della qualità del suolo, e sono stati indicati dei parametri fisici, chimici e biologici come indicatori base per la qualità del suolo.

I microrganismi, ad esempio, vengono utilizzati come indicatori della qualità del suolo perché svolgono delle funzioni chiave nella degradazione e nel riciclo della sostanza organica e dei nutrienti o rispondono prontamente ai cambiamenti dell'ambiente suolo. Inoltre l'attività microbica nel suolo rispecchia la somma di tutti i fattori che regolano la degradazione e la trasformazione dei nutrienti.

La biomassa microbica è una parte importante degli ingredienti attivi del suolo, responsabile della circolazione dei nutrienti e della degradazione degli inquinanti organici. In modo figurato Doran et al. (1996) definirono l'importanza della biomassa microbica come "ciò che include: sia decompositori primari che secondari, aerobici e anaerobici, consumatori specializzati e consumatori generici, organismi schizzinosi occupanti bizzarre nicchie ambientali ed opportunisti estremamente adattabili, organismi frenetici che vanno a tutta velocità e altri sfaticati che mineralizzano lentamente, commensali di substrati ricchi e grassi ed individui che suppliscono ad una esistenza rosicante con un pezzetto di legno duro. Come gruppo la comunità delle popolazioni microbiche si comporta senza pensare al futuro, ma risponde invece velocemente alle immediate condizioni favorevoli, riproducendosi e nutrendosi selvaggiamente finché le limitazioni del substrato non provocano un declino nella popolazione, vittima della sua golosità. Molti organismi vengono cannibalizzati a turno dai loro stessi compatrioti sopravvissuti. Il risultato è un continuo balletto ciclico di assorbimento e rilascio dei nutrienti che consente alle forme di vita meno effimere nel suolo di sopperire alle proprie necessità nutrizionali attraverso vie regolate in qualche modo".

È estremamente difficile applicare i risultati dei valori microbiologici poiché i microrganismi del suolo reagiscono molto rapidamente anche a variazioni stagionali e si adattano alle diverse necessità ambientali. Perciò diventa problematico distinguere fluttuazioni naturali da alterazioni causate da attività antropiche, specialmente quando il dato viene determinato tardi e sprovvisto di controllo.

Diversi autori hanno proposto vari suggerimenti, per esempio Domsh (1980) e Domsh et al. (1983) hanno stabilito che qualsiasi alterazione provocata sia da agenti naturali che da inquinanti che ritorna a valori microbiologici normali entro 30 giorni è da considerarsi come una fluttuazione normale. Diversamente, alterazioni che durano 60 giorni sono tollerabili, mentre quelle che persistono per più di 90 giorni sono veri e propri agenti di stress. Brookes (1995) ha affermato che nessun parametro possa essere utilizzato da solo, ma che si dovrebbero identificare altri parametri correlati da utilizzare insieme come "controllo interno", es. C della biomassa e C organico totale del suolo. Quando i suoli presentano marcate variazioni rispetto a ciò che è considerato il valore normale (C biomassa/ C organico totale del suolo) in un particolare sistema di gestione del suolo, clima e tipo di suolo, tale valore diventa un indicatore del deterioramento e del cambiamento nelle funzioni dell'ecosistema suolo. Infatti c'è una relazione quasi lineare tra queste due variabili, anche se ci possono essere rilevanti discrepanze tra suoli con diverse caratteristiche fisiche o suoli gestiti in modo diverso.

D'altra parte, Brookes ha proposto i seguenti criteri per selezionare i parametri microbiologici e biochimici da adottare come indicatori dell'inquinamento del suolo.

**CRITERI SELETTIVI DELLE PROPRIETÀ MICROBIOLOGICHE
UTILIZZATE COME INDICATORI DI INQUINAMENTO DEL SUOLO**

(Brookes, 1995)

1. *La proprietà può essere determinata accuratamente e con precisione su una vasta gamma di tipi di suoli e di relative condizioni.*
2. *Sono richieste determinazioni tanto più facili e a basso costo quanto più campioni devono essere analizzati.*
3. *La natura del parametro deve permettere anche determinazioni del controllo in modo che l'effetto dell'inquinante possa essere stimato con precisione.*
4. *Il parametro dev'essere sufficientemente sensibile da rilevare l'inquinante, ma anche sufficientemente stabile da non provocare falsi allarmi.*
5. *Il parametro deve avere una validità scientifica basata su conoscenze scientifiche affidabili.*
6. *Se l'affidabilità di un singolo parametro è limitata, dovrebbero essere scelti altri due o più parametri indipendenti. In questo caso si dovrebbero conoscere anche le loro inter-relazioni in aree non inquinate.*

5.2. METODI

Si dovrebbe rispondere a molte domande a livello metodologico per poter definire quale metodo adottare per definire la qualità del suolo. La questione va dai problemi relativi al campionamento, allo stoccaggio e alla pre-incubazione del suolo per le analisi microbiologiche fino alla scelta dei metodi più efficaci e di indicatori efficaci (Stenberg, 1999).

I parametri e i relativi metodi si possono dividere in quattro gruppi a seconda del tipo di informazione che riescono a dare:

I Biomassa e carica microbica del suolo**II Attività microbica del suolo****III Diversità microbica nel suolo e struttura della comunità****IV Relazioni pianta-microrganismi**

Questo tipo di approccio è stato adottato dai ricercatori coinvolti nel COST Action 831 sulla Biotecnologia del suolo: Monitoraggio, Conservazione e Risanamento (Chairperson: Anna Benedetti) e nell'edizione del Manuale "Microbial methods for assessing soil quality" (Bloem J., Hopkins D., Benedetti A., 2006).

I metodi discussi nel manuale Cost sono riportati in tabella 5.2.

TABELLA 5.2.

GRUPPI DI METODI MICROBIOLOGICI, BIOCHIMICI E MOLECOLARI (IN ACCORDO CON IL MANUALE “METODI DI ANALISI MICROBIOLOGICA DEL SUOLO”, FRANCO ANGELI, 2002)

I	II	III	IV
Biomassa e carica microbica del suolo	Attività microbica del suolo	Diversità microbica nel suolo e struttura della comunità	Relazioni pianta microrganismi
Tecniche di fumigazione con cloroformio	Respirazione del suolo	Metodi microbiologici molecolari	Micorrize
Respirazione indotta da substrato	Mineralizzazione dell'azoto	Profili di utilizzo di substrati (CLPP)	Fissazione N ₂
ATP	Nitrificazione	Phospholipid ester-linked fatty acids (PFLA)	Capacità repressive
Conte dirette	Incorporazione di timidina e leucina	Profilo di attività enzimatica	Microrganismi associativi
	Test ecotossicologici		

Prima di dare una breve descrizione dei diversi gruppi di metodi, è necessario sottolineare che tutti i parametri determinati in laboratorio hanno caratteristiche potenziali poichè tali determinazioni vengono effettuate in condizioni controllate di temperatura e umidità e spesso in presenza di substrati specifici. Questi ultimi richiedono determinazioni *in situ* che difficilmente vengono effettuate in condizioni ottimali, la temperatura e l'umidità di campo possono variare molto e raggiungere valori anche estremamente sfavorevoli per l'attività microbica. Inoltre, la concentrazione del substrato e i valori di pH sono raramente ottimali. Si possono anche identificare l'attività di campo massima e attiva raggiungibile con la correzione in campo dei fattori limitanti correggibili, come l'umidità, pH e contenuto di nutrienti. Infatti l'attività della biomassa microbica può essere suddivisa in *potenziale* e *attuale*. Per *attività attuale* si intende l'attività che i microrganismi sviluppano quando le variabili chiave non presentano valori ottimali, come accade in campo aperto. Queste ultime possono essere determinate utilizzando sensori da campo aperto e ad oggi non esistono metodi seriali e di routine disponibili. *Attività potenziale* significa attività metabolica, comprendente l'attività enzimatica che i microrganismi del suolo sono in grado di sviluppare in condizioni ottimali di tutte le variabili chiave, come la temperatura, l'umidità e il substrato nutritivo.

I. Biomassa e titolo microbico nel suolo

Questi includono tutti i metodi capaci di definire il peso ed il numero dei microrganismi del suolo, sia come carica totale che come gruppi fisiologici o nutrizionali, come ad esempio la conta su piastra, la microscopia colorimetrica, metodi biochimici in grado di fornire informazioni sulle popolazioni attive.

I metodi convenzionali per la determinazione delle specie microbiche viventi nel suolo sono basate su procedure di conte vitali o dirette (Alef e Nannipieri, 1995; Alef, 1995; Dobereiner, 1995; Lorch et al, 1995; Zuberer, 1994). Le procedure di conteggio di cellule vive comprendono i due seguenti approcci: 1) la tecnica di conta su piastra; 2) il numero più probabile (Most Probable Number-MPN).

Probabilmente alcuni microrganismi non coltivabili del suolo sono potenzialmente coltivabili se in presenza dei nutrienti adeguati per la loro crescita. Tuttavia alcuni dei microrganismi non coltivabili possono rimanere non coltivabili perché rimangono dormienti e richiedono eventi particolari che li risvegliano prima di riacquistare la capacità di crescere; oppure sono non coltivabili ma ancora intatti ed individuabili al microscopio (Madsen, 1996).

Le tecniche di conteggio diretto permettono di contare sia i batteri che i funghi ma non danno alcuna indicazione sulla composizione delle rispettive comunità. Di solito con queste tecniche viene collocata una sospensione contenente una quantità nota di suolo omogeneizzato su un'area nota del vetrino e i microrganismi vengono marcati con una sonda fluorescente e contati al microscopio (Bloem et al., 1995).

II. Attività microbica nel suolo

Questo gruppo abbraccia tutti i metodi biochimici dando informazioni sui processi metabolici della comunità microbica, sia nella sua totalità che in gruppi funzionali.

Come descritto sopra, tutti i risultati di laboratorio possiedono caratteristiche di potenzialità poiché determinati in condizioni ottimali di uno o più fattori, come la temperatura e l'umidità controllate ed utilizzando spesso substrati specifici.

I metodi biochimici si possono dividere in due sottogruppi: il primo include i metodi che contano le popolazioni attive *nella loro totalità* e, a seconda del risultato e del tipo di informazione che forniscono, rientrano nel primo gruppo di metodi menzionati in precedenza riguardanti peso e numero. Il secondo sottogruppo contiene metodi capaci di definire l'attività attuale e l'attività potenziale di *singoli organismi* o gruppi metabolici, ecc., ad esempio test respirometrici, azoto mineralizzabile, ecc. Inoltre ci sono altre metodologie in grado di stabilire l'attività potenziale massima raggiungibile con, ad esempio, substrati specifici. Questo è il caso della nitrificazione o dell'ammonificazione potenziale con gradiente di potenzialità che utilizza caseina lattica ed ammonio-solfato, con il gradiente di potenzialità che aumenta mentre si ottimizzano i diversi fattori limitanti l'attività della biomassa microbica.

III. Diversità microbica del suolo e struttura della comunità

Questo gruppo include tra i più aggiornati metodi di acquisizione di dati ecologici e molecolari.

Per tradizione le analisi della comunità microbica del suolo sono state effettuate con tecniche colturali, tuttavia solo una piccola frazione <0,1% della comunità microbica del suolo è stata caratterizzata con questo approccio. Sono attualmente disponibili diversi metodi per lo studio delle comunità microbiche del suolo. L'uso di tecniche molecolari continua a fornire nuove conoscenze sulla distribuzione e sulla diversità degli organismi negli habitat del suolo. L'uso di sequenze di DNA (o RNA), combinato con sonde oligonucleotidiche fluorescenti, rappresenta un approccio potente per lo studio dei microrganismi del suolo che non può essere paragonato alle tecniche di coltura usuali.

Tra questi metodi i più utili sono quelli nei quali piccole subunità di geni per l'rRNA sono amplificate dagli acidi nucleici estratti dal suolo. Con queste tecniche è possibile caratterizzare e studiare i microrganismi del suolo che attualmente non si possono coltivare. I geni ribosomali microbici possono essere individuati direttamente da campioni di suolo e sequenziati. Queste sequenze possono quindi essere confrontate con quelle di altri microrganismi noti. Inoltre si possono costruire sonde oligonucleotidiche, specifiche per taxon o gruppi a partire proprio da queste sequenze, rendendo possibile la visualizzazione dei microrganismi del suolo direttamente nel loro habitat.

Nel tentativo di ottenere maggiori informazioni sulle comunità microbiche del suolo sono stati utilizzati i profili PLFA (Phospho-Lipid Fatty Acid) e CLPP (Community Level Physiological Profile). Negli ultimi anni le tecniche di analisi molecolare per le comunità microbiche del suolo hanno portato una nuova comprensione della diversità filogenetica dei microrganismi del suolo (Loczko et al., 1997; Insam et al., 1997).

IV. Interazioni pianta-microrganismi

La rizosfera viene riconosciuta come zona di influenza di tutte le radici sui biota e sul suolo circostante. Molti degli studi danno una descrizione ecofisiologica della regione, con particolare enfasi per quanto riguarda l'influenza dei nutrienti sulle piante, comprendente anche quella mediata da simbionti e da microrganismi liberi, e per gli efflussi della fotosintesi come i prodotti della deposizione rizosferica per fornire i substrati per i biota associati. Questi studi qualitativi e quantitativi sono stati molto rivalutati allo scopo di fare stime energetiche per le piante e di produttività dei raccolti.

Questo capitolo racchiude insieme tutti i metodi che descrivono l'attività microbica del suolo con le piante ospiti e perciò originati dalle metodologie descritte in precedenza per mezzo delle quali si analizza la porzione di suolo in contatto diretto con le radici.

5.2.1. Metodi multifunzionali

Si deve ricordare che nessuno dei quattro gruppi di metodi è efficace da solo. Possono essere spesso affiancati tra loro e la scelta di includere un metodo in una determinata categoria piuttosto che in un'altra dipende dal tipo di interpretazione che si vuol dare ai risultati ottenuti usando quel metodo. Ad esempio, questo è il caso del test per l'ATP che è utilizzato sia come indicatore della biomassa (gruppo I) che dell'attività (gruppo II). La determinazione del contenuto di ATP del suolo si basa sulla quantità di luce ($\lambda = 562$ nm) emessa in seguito alla reazione dell'estratto con luciferina (un composto eterociclico) catalizzata dalla luciferasi (Nannipieri et al., 1990). L'utilizzo del contenuto di ATP nel suolo come indice della biomassa microbica si basa sul presupposto che l'ATP sia presente come componente relativamente costante nelle diverse cellule microbiche e che non sia associato a cellule morte non assorbite dai componenti del suolo. Una significativa correlazione è stata trovata tra il contenuto di ATP e la biomassa microbica di suoli diversi (Jenkinson, 1988). Si ipotizzò che la presenza di ATP extracellulare fosse trascurabile. La relazione lineare tra il contenuto di ATP e la biomassa microbica emergeva quando venivano effettuate entrambe le misure in seguito ad una pre-incubazione in condizioni di temperatura e umidità costanti. Il contenuto di ATP cambia rapidamente, a seconda dello stato fisiologico della cellula. Per questo motivo si ipotizzò che la sua determinazione immediatamente dopo il campionamento potesse rispecchiare più l'attività microbica che la biomassa microbica.

In conclusione l'ATP può essere utilizzato come indice per la biomassa microbica nel suolo quando l'analisi viene effettuata dopo una pre-incubazione del campione di suolo in condizioni controllate. Le analisi immediatamente successive al campionamento rispecchiano lo stato fisiologico globale dei microrganismi del suolo e il contenuto in ATP misurato potrebbe rispecchiare più l'attività microbica che la biomassa microbica. Un problema nell'interpretazione e nel confronto dei valori dell'ATP in diversi suoli dipende tanto dai vari metodi utilizzati per estrarre l'ATP dal suolo quanto dalla manipolazione del suolo (Nannipieri et al., 1990). Lo stesso si può dire per il metodo SIR (Substrate induced respiration) introdotto da Anderson e Domsh (1975 e 1978) per identificare le componenti metabolicamente attive della comunità microbica. L'attività respiratoria microbica (di solito determinata come produzione di CO_2) di un suolo ammendato con glucosio è stimolata da un'attività metabolica minima della biomassa del suolo fino ad un'attività massima se la quantità di substrato aggiunto è in grado di saturare. Il tasso di respirazione iniziale di solito rimane stabile per 6-8 ore e raggiunge un plateau che si ritiene dipendere dal livello di biomassa microbica del suolo (Sparling, 1995). L'incremento dell'attività respiratoria fino alla fase di plateau dipende dalla crescita microbica. Quindi l'iniziale risposta respiratoria al glucosio viene considerata come indice della biomassa microbica del suolo prima ancora che della crescita microbica (Sparling, 1995; Howarth and Paul, 1994).

Le stesse considerazioni possono essere applicate alla tecnica Biolog (che è basata sulla tecnica CLPP) che fornisce risultati su: a) la configurazione ecologica sulla comunità microbica (gruppo III); b) l'efficienza di un determinato gruppo di microrganismi nel metabolizzare substrati nutritivi (gruppi II e III) o la determinazione di tutte le attività enzimatiche (gruppo II). La diversità funzionale riflette sia la diversità genetica che l'attività fisiologica di organismi che abitano in quel sistema ed è molto più importante della diversità a livello tassonomico per la stabilità a lungo termine dell'ecosistema (Garland and Mills, 1991). Un semplice approccio per la valutazione della diversità funzionale della comunità microbica del suolo si basa sulla capacità dei diversi membri della comunità di utilizzare differenti substrati. Questi cosiddetti "metodi multifunzionali" possono essere considerati come aggiunte al concetto di Brookes di "controllo interno" in cui parametri chimici e biochimici sono correlati.

5.3. METODI SELEZIONATI PER ATLAS

5.3.1. Respirazione del suolo

La respirazione del suolo è uno dei parametri più antichi e tuttora frequentemente utilizzati per quantificare le attività microbiche nei suoli. Il metodo è basato sul fatto che le cellule metabolicamente attive richiedono un apporto costante di nutrienti ed energia che, per la microflora eterotrofa, deriva dalla trasformazione della sostanza organica. Le reazioni che richiedono energia nelle cellule sono reazioni redox basate

sul trasferimento di elettroni da un donatore ad un accettore. Nella respirazione, ovvero l'ossidazione della sostanza organica ad opera di microrganismi aerobici, l'ossigeno è l'accettore finale degli elettroni e i prodotti finali del processo sono acqua e anidride carbonica. Le attività metaboliche possono essere dunque quantificate misurando la produzione di CO_2 (o il consumo di O_2). La respirazione è un processo universale e come tale non solo ristretto ai microrganismi ma viene effettuata anche da altri organismi che vivono nel terreno, dipende dallo stato fisiologico delle cellule ed è influenzata da diversi fattori.

Il tasso di *respirazione basale* è una misura della respirazione microbica essenziale ed è comunemente considerata come decomposizione complessiva della sostanza organica (Anderson, 1982). La respirazione basale viene misurata senza l'aggiunta di alcun substrato al suolo; La respirazione indotta da substrato (SIR) è infatti la respirazione misurata in presenza di substrati quali glucosio, aminoacidi, ecc. Il tasso di *respirazione* è invece dato dalla quantità totale di CO_2 prodotta in un tempo t e dipende dai fattori che controllano l'attività microbica: temperatura, apporto di acqua, apporto di nutrienti e aerazione insieme alla disponibilità di materiali e substrati. Con la misura del tasso di respirazione è possibile costruire le *curve di respirazione* basate sia su dati cumulativi che giornalieri. Questi dati mostrano graficamente il tasso di respirazione microbica relativa alla decomposizione della sostanza organica. Infatti, la sostanza organica del suolo è composta da varie frazioni che vengono demolite in modo diverso.

La respirazione può essere determinata sia come evoluzione di CO_2 che come consumo di O_2 . Le differenze tra i due riflette lo stato fisiologico della biomassa microbica che risente delle condizioni dell'ambiente suolo. Sembra che la determinazione della produzione di CO_2 sia la strategia più comunemente utilizzata per la respirazione del suolo, probabilmente a causa sia della numerosa strumentazione disponibile per la stima in continuo della CO_2 , sia per la sua relativa facilità di utilizzo (Nordgren, 1988; Heinemeyer et al., 1989). Tuttavia ci sono delle limitazioni: in suoli contenenti carbonati, ad esempio, il rilascio di CO_2 abiotica può dare dei risultati erranei e perciò in certe condizioni il consumo di O_2 viene preferito (Anderson, 1982). Nell'ambito di fattori come l'aratura è importante consentire alle emanazioni di CO_2 di sparire. Per questo occorre circa una settimana a 20°C (Torstensson and Stenström, 1986; Martens, 1995). Questa pre-incubazione e la misura effettiva dovrebbero essere svolte in condizioni standardizzate di umidità e temperatura per ottenere dei risultati riproducibili e confrontabili.

RESPIRAZIONE DEL SUOLO

Metodo Ufficiale n. II.1. • Supplemento Ordinario G.U. n. 61 del 13.03.2004

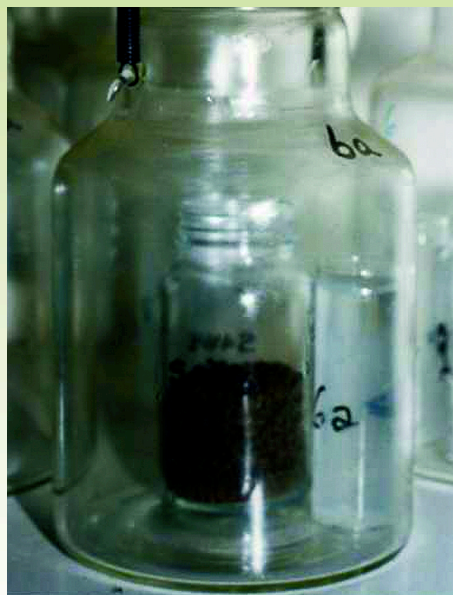
Determinazione della CO_2 per titrimetria

Si pesano 20 g di suolo setacciato (al 55% WHC) in un beaker e si posiziona il beaker sul fondo della fiasca. Si pipettano 4 mL di NaOH 1 N nel recipiente di plastica che viene riposto nell'interno della fiasca adiacente al beaker con il suolo. Si chiude immediatamente il tappo a vite e si accerta che la fiasca sia chiusa ermeticamente.

Si preparano 3-5 controlli costituiti dalle fiasche chiuse ermeticamente con all'interno il recipiente con 4 mL di NaOH senza il beaker contenente il suolo.

Si incubano tutte le fiasche a 25°C per un periodo massimo di tre giorni (un periodo più lungo potrebbe creare una condizione di anaerobiosi).

Al termine dell'incubazione si aprono le fiasche, si preleva il recipiente con NaOH, si aggiungono 8 mL di BaCl_2 0,75 N e tre o quattro gocce dell'indicatore fenoltaleina. Si titola il contenuto del recipiente con HCl 0,1 N fino al viraggio dal colore rosa al bianco neutro. Se si dispone di un titolatore automatico si imposta un pH di fine titolazione pari a 8,8. Infatti, a questo valore di pH la solubilità del BaCO_3 equivale a $4,88 \cdot 10^{-4}$; valori di pH minori porterebbero a solubilizzare quantità apprezzabili di BaCO_3 e quindi una parte dell'HCl consumato sarebbe da ascrivere alla titolazione del CO_3^{2-} .



5.3.2. *Biomassa microbica*

La biomassa è l'intera popolazione microbica del suolo trattata come un'unica entità (Powlson, 1994). Un metodo fisiologico per determinare la biomassa microbica fu introdotto da Jenkinson e Powlson (1976): il metodo dell'incubazione-fumigazione con cloroformio (CFI). I metodi più utilizzati oggi sono il CFI, la fumigazione-estrazione col cloroformio (CFE) (Vance et al., 1987) che è uno sviluppo della CFI, e la respirazione indotta da substrato (SIR) (Anderson e Domsch, 1978). La SIR è considerata la tecnica più semplice e rapida, con un basso coefficiente di variabilità, cosa che è auspicabile per misure routinarie (Kaiser et al., 1992). È misurata anche insieme alla respirazione basale che la rende persino più economica. La CFE, tuttavia, consente di analizzare tanto l'azoto microbico quanto il carbonio.

La SIR viene analizzata come produzione di CO_2 dal suolo in seguito ad un'aggiunta ottimale di glucosio. L'iniziale tasso di respirazione è considerato proporzionale alla biomassa totale ed è calibrato contro la CFI-C della biomassa (Anderson e Domsch, 1978). Di solito la SIR viene trasformata in C della biomassa attraverso tali calibrazioni. La precisione di queste calibrazioni sono state tuttavia oggetto di discussione. Wardle e Parkinson (1991) suggerirono che diversi fattori di calibrazione sarebbero necessari (se usati tutti) per diverse "popolazioni" di suoli. Ci sono anche delle differenze principali nella determinazione della CO_2 . Le calibrazioni effettuate per le analisi in cui il suolo è investito da un flusso d'aria o aria priva di CO_2 non sono direttamente confrontabili con quelle in cui il suolo è in equilibrio con una trappola all'idrossido per CO_2 , che è pure comune. Non ci si può aspettare che la ritenzione di CO_2 sia la stessa (Kaiser et al., 1992; Martens, 1995). Tuttavia, con una metodologia standardizzata il tasso di produzione di CO_2 può essere utilizzato come indice della biomassa. Strumenti automatici possono svolgere entrambi i principi per la determinazione della CO_2 . Un sistema areato continuamente basato sull'analisi agli infrarossi del gas fu descritto da Heinemeyer et al. (1989). È stato sviluppato anche un sistema statico basato sulle capacità di conduttività in una trappola all'idrossido per la CO_2 (Nordgren, 1988, 1992).

Una critica più basilare contraria all'utilizzo della CFI per la calibrazione delle misure SIR è che le due tecniche misurano diverse componenti della biomassa, nonostante esista una forte correlazione tra le due (Wardle e Parkinson, 1991). Ad esempio è evidente che la risposta al glucosio sia data dalla parte attiva della biomassa (si presume che stiano crescendo, ad esempio gli organismi *r*) (Van de Werf e Verstraete, 1987). In contraddizione con questo studio Stenström et al. (1998) hanno suggerito l'utilizzo di un'equazione matematica che suddivide la biomassa in una componente che "cresce" e in una che "non cresce". Nella stragrande maggioranza dei suoli analizzati finora, la componente che non cresce supera quella che cresce di circa dieci volte (dati non pubblicati). L'importanza ecologica della relazione tra una popolazione in crescita ed una non in crescita, determinata con questa tecnica, deve essere ancora investigata. Tuttavia, questa relazione si è dimostrata essere un test sensibile per la tossicità dei metalli applicati in condizioni controllate di laboratorio (Johansson et al., 1998).

BIOMASSA MICROBICA

Metodo Ufficiale n. I.1. • Supplemento Ordinario G.U. n. 61 del 13.03.2004

Fumigazione con cloroformio

La fumigazione con cloroformio consiste nel mantenere il campione di suolo in una atmosfera di cloroformio per 20-24 ore, al buio ed a 25°C. Si introduce in un ampio essiccatore un beaker di vetro con 30-40 g di ogni campione di suolo fresco aggiustato al 50% della capacità di ritenzione idrica. Non occorre siglare direttamente i beaker con pennarelli poiché il CHCl_3 scioglie la scrittura, ma piuttosto è bene introdurre in ogni beaker un pezzetto di carta bibula siglato a matita. Poggiare quindi tutti i beaker con i suoli sulla piastra di porcellana forata dell'essiccatore (circa 30 cm di diametro), sul cui fondo sia stato già messo un beaker contenente circa 50 mL di CHCl_3 per cromatografia, cioè stabilizzato con 2-amino-butene (Kaiser et al., 1992) e qualche pallina antiebollizione. Si può anche utilizzare cloroformio stabilizzato con etanolo, purché l'alcool venga previamente eliminato. Sul fondo e ai lati dell'essiccatore è bene sistemare anche qualche striscia di carta bibula imbevuta di acqua in modo da evitare l'abbassamento dell'umidità dei suoli durante la fumigazione. Quindi azionare la pompa rotante da vuoto per creare un'atmosfera di CHCl_3 all'interno dell'essiccatore. Una volta che si formano numerose bollicine nel CHCl_3 , si lascia funzionare la pompa ancora per un minuto. Quindi, chiuso l'essiccatore, si incuba per 20-24 ore al buio e a 25°C. Dopo tale lasso di tempo il CHCl_3 deve essere completamente rimosso dai pori del terreno. Per questo occorre aprire l'essiccatore, rimuovere il beaker con il CHCl_3 (se la fumigazione è stata condotta bene il livello del CHCl_3 dopo le 24 ore si è notevolmente abbassato), riporre i suoli fumigati dentro l'essiccatore; quindi, sempre con la pompa da vuoto, si effettuano 8 successive evacuazioni di 2 minuti ciascuna, intercalate da reimmersioni di aria per 30 secondi.

È bene effettuare tutte le fasi che prevedono l'uso di cloroformio sotto una cappa aspirante ben funzionante. Il CHCl_3 è stato preferito ad altri fumiganti sia perché è un ottimo biocida, sia perché può essere facilmente rimosso dal suolo. Inoltre, onde evitare che la membrana della pompa da vuoto dopo qualche fumigazione venga compromessa, è meglio inserire nel raccordo di gomma fra essiccatore e pompa una trap-pola per il CHCl_3 costituita da una beuta da vuoto tenuta in ghiaccio.

Il cloroformio deve essere previamente purificato dalle sostanze stabilizzanti (di solito etanolo) con cui le ditte produttrici lo immettono sul mercato, poiché diversamente i risultati vengono largamente sovrastimati. In effetti, molti microrganismi del suolo sopravvissuti alla fumigazione sono in grado di ossidare l'etanolo, con produzione di CO_2 durante i 10 giorni d'incubazione. Se d'altro canto si è usato CHCl_3 stabilizzato con amilene (2-amino-butene), normalmente usato in cromatografia, non è necessario eliminare la sostanza stabilizzante (Kaiser et al. 1992).

5.3.3. Quoziente metabolico per la CO_2

Il quoziente metabolico ($q\text{CO}_2$) o tasso di respirazione specifica non è una misura di per sé ma la respirazione basale in rapporto al C della biomassa. Il parametro ecofisiologico dell'attività specifica fu proposto da Anderson e Domsch (1985) come un adattamento alla microbiologia del suolo della teoria dello sviluppo di ecosistemi bioenergetici (Odum, 1969). Un basso quoziente indica un'utilizzazione economica di energia e si suppone che rispecchi un ecosistema più stabile (Insam and Haseiwandter, 1989; Anderson, 1994). Uno svantaggio notificato da Wardle e Ghani (1995) è che l'effetto di situazioni di stress e altri disturbi potrebbero essere confusi. Lo stress provocato, ad esempio, da un basso pH o da carenza di nutrienti potrebbe portare un alto $q\text{CO}_2$ accoppiato con una bassa biomassa in confronto ad una situazione simile senza i fattori di stress. Allo stesso modo, il $q\text{CO}_2$ aumenterebbe nel caso di disturbi nell'ecosistema come la coltivazione e la concimazione, ma questo aumento è probabilmente da collegare ad un incremento della biomassa.

5.3.4. Mineralizzazione dell'azoto

La mineralizzazione dell'azoto è il rilascio di ammonio quando la sostanza organica viene degradata. Il processo viene svolto da una grande varietà di organismi sia aerobi che anaerobi. Enzimi extracellulari e aspecifici sono tipicamente attivi in questo processo (Ladd e Jackson, 1982).

Il processo è comunemente determinato con un'incubazione in condizioni aerobie ed anaerobie per ottenere un indice dell'azoto disponibile della pianta.

Contemporaneamente alla mineralizzazione avviene l'immobilizzazione. Perciò si misura la mineralizzazione netta, che indica la mineralizzazione potenziale dell'azoto nel suolo.

Il metodo aerobico fu proposto inizialmente da Stanford e Smith (1972). Si basa su un'incubazione aerobica a 30°C a lungo termine e, nel periodo di incubazione, l'azoto minerale prodotto (NH_4^+ , NO_3^- e NO_2^-) viene dilavato a tempi determinati (dopo 2, 4, 8, 16, 22 e 30 settimane). La mineralizzazione è descritta facendo adattare i dati sperimentali cumulativi dell'azoto mineralizzato con un modello cinetico di primo ordine.

Il lungo periodo di incubazione dovrebbe consentire di superare gli inconvenienti relativi alle influenze di pretrattamenti di campioni nel processo di mineralizzazione dell'azoto; a questo scopo Stanford e Smith (1972) suggerirono di non considerare che i risultati ottenuti dalle prime due/tre settimane di incubazione potessero essere indicazioni qualitative/quantitative sulle dimensioni del pool di azoto labile mineralizzabile e/o il pool di azoto della biomassa del suolo.

Inoltre, dopo le prime settimane di incubazione, a seconda delle specifiche caratteristiche dei diversi suoli, il sistema generalmente raggiunge una condizione di stabilità e, quando si osserva tale nuovo equilibrio, si possono ottenere le indicazioni quantitative sulla mineralizzazione basale dell'azoto (NM_e). Perciò, la mineralizzazione basale dell'azoto può essere utilizzata per calcolare il coefficiente di mineralizzazione dell'azoto ($\text{NM}_e/\text{N}_{\text{tot}}$) ed il quoziente di mineralizzazione dell'N ($Q_n = \text{NM}_e/\text{N}_{\text{bio}}$).

Quando il modello cinetico di prim'ordine viene applicato per descrivere risultati sperimentali, vengono calcolati l'azoto potenzialmente mineralizzabile (N_0) e la costante cinetica (K) (Stanford e Smith, 1972). Il primo parametro (N_0) viene considerato come indice della disponibilità dell'azoto e, insieme alla costante K (la cui unità di misura è 1/t) descrive lo stato di fertilità azotata a lungo termine nei suoli.

Benedetti e Sebastiani (1996) hanno determinato il N_0 e la K col metodo di Stanford e Smith su un certo numero di suoli italiani. Questi autori hanno anche confermato che, utilizzando solo i dati fino a 22 settimane, si sono ottenute stime significativamente meno reali dell'azoto potenzialmente mineralizzabile.

Nonostante i vantaggi sopra considerati, questo metodo è caratterizzato da diversi svantaggi che si riferiscono al tempo effettivo e all'apparecchiatura richiesta (Bundy e Meisinger, 1994). Per questo motivo viene normalmente utilizzato solo quando è richiesta informazione sulla reale mineralizzazione a lungo termine dell'N (es. mineralizzazione basale dell'N).

AZOTO POTENZIALE MINERALIZZABILE: METODO BIOCHIMICO (STANFORD E SMITH)

Metodo Ufficiale n. II.2. • Supplemento Ordinario G.U. n. 61 del 13.03.2004

Metodo di Stanford e Smith

Un campione di 15 g di suolo essiccato all'aria e vagliato a 2 mm viene mescolato con sabbia di quarzo in rapporto 1:1 ed inserito in tubi da dilavamento da 50 mL al fondo dei quali è sistemato un filtro di lana di vetro.

Rimuovere l'azoto minerale inizialmente presente mediante dilavamento con 100 mL di CaCl_2 0,01M, seguito dalla somministrazione di 25 mL di una soluzione nutritiva priva di azoto (0,002 M $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,002 M MgSO_4 ; 0,005 M $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 0,0025 M K_2SO_4). Allontanare l'acqua in eccesso sotto vuoto (60 cm Hg). Tappare i tubi ed incubare a 35°C. Lo scambio gassoso attraverso la porzione aperta del tubo di dilavamento è sufficiente a mantenere un sistema aerobico. Dopo due settimane raccogliere l'azoto minerale mediante dilavamento con CaCl_2 0,01 M e con la soluzione nutritiva priva di azoto, seguita dall'applicazione del vuoto come descritto sopra.

Rimettere i tubi ad incubare ed effettuare i dilavamenti dopo 2-4-8-12-16-22 e 30 settimane.

Ripristinare il contenuto ottimale di acqua nel suolo ad ogni dilavamento.

Il dilavato viene trasferito in palloni Kjeldahl da 800 mL e diluito con 300 mL di acqua distillata. In seguito all'aggiunta della lega di Devarda (0,5 g) e di NaOH 10N (2 mL), l'azoto minerale (NO_3^- , NO_2^- ,

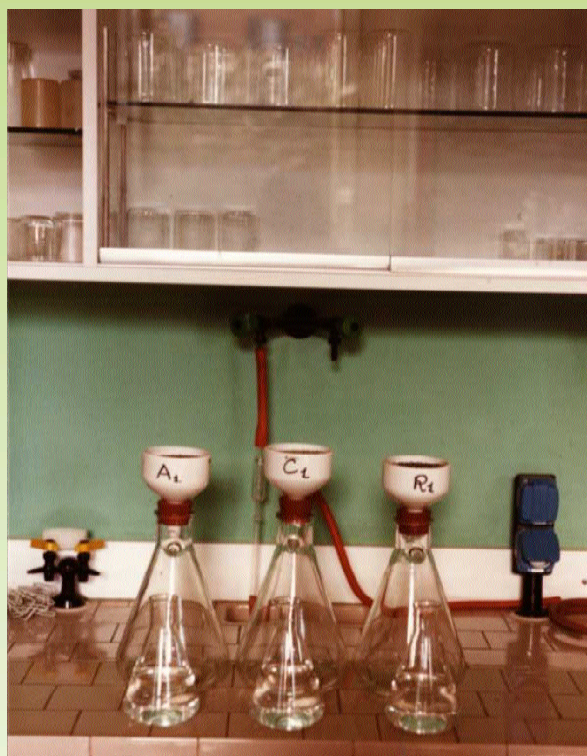
NH_4^+) viene determinato mediante titolazione acida con H_2SO_4 0,005N dopo distillazione con acido bórico.

Benedetti (1983) ha operato alcune modifiche al metodo di Stanford e Smith per semplificarne la procedura analitica e per renderlo più duttile anche nello studio dalle attività potenziali.

50 g di suolo vengono miscelati con 50 g di sabbia di quarzo e disposti in un imbuto buckner di porcellana (diametro esterno 13 cm) sul fondo del quale è stato sistemato un filtro di stoffa di acetato. La miscela deve formare uno strato omogeneo di uno spessore non superiore ai 2 cm. Particolare attenzione va posta alla granulometria della sabbia di quarzo che dovrà essere sempre compresa tra 0,2-0,8 mm poiché, agendo sull'aerazione del campione influisce in modo decisivo sui risultati analitici. La soluzione estraente di CaCl_2 è stata sostituita con CaSO_4 saturo per rendere gli estratti legibili anche con metodi potenziometrici date le note interferenze che lo ione cloro esercita in questo tipo di misure. Infine è stata apportata una modifica alla temperatura di incubazione che è stata abbassata dai 35°C proposti da Stanford e Smith a 30°C per avere una migliore correlazione con la realtà di campo. L'umidità viene ripristinata mediante una pompa aspirante.

Su una aliquota degli estratti dopo filtrazione con filtro a pieghe viene determinato il contenuto in N-NO_3^- , N-NH_4^+ ed N-NO_2^- con i metodi più convenienti (colorimetrico, potenziometrico, ecc.).

Il metodo di Stanford e Smith viene attualmente considerato uno dei metodi migliori di determinazione dell'azoto potenzialmente mineralizzabile per via biochimica in quanto ha introdotto, per la prima volta, la lisciviazione dell'azoto mineralizzato a tempi prefissati per simulare l'asportazione da parte delle piante. In tal modo questo metodo risolve il problema dell'immobilizzazione dell'azoto mineralizzato. Inoltre si è rivelato un ottimo strumento per lo studio delle cinetiche di mineralizzazione della sostanza organica sia endogena che apportata al suolo (Benedetti, 1983; Benedetti et al., 1994). Nonostante questo, la lunghezza del periodo di incubazione costituisce un limite nell'utilizzazione di questo metodo. I tentativi degli studiosi di abbreviare i tempi di esecuzione (Mary e Remy, 1979; Menasseri et al., 1993; Benedetti e Sebastiani, 1996) non hanno conseguito i risultati desiderati e, allo stato attuale, per una reale stima dell'azoto potenzialmente mineralizzabile non è possibile interrompere l'analisi prima della trentesima settimana (Stanford et al., 1974).



5.4. SUGGERIMENTI PER UN CORRETTO UTILIZZO

DEGLI INDICATORI MICROBIOLOGICI

Come già riconosciuto, appropriati metodi biologici del suolo combinati con proprietà fisico-chimiche potrebbero servire come indicatori dei cambiamenti della qualità del suolo. Tuttavia, Kennedy e Papendik (1995) evidenziarono che sebbene gli strumenti per caratterizzare il suolo siano numerosi, mancano le strategie per integrare questi strumenti per determinare la qualità del suolo e che si deve ancora individuare un dato indicatore per una data situazione. Questo problema dell'identificazione è probabilmente pronunciato in modo particolare per gli indicatori microbiologici ed è uno dei motivi principali per cui i test microbiologici non sono inclusi nelle analisi routinarie del suolo. I valori "ideali" per una buona qualità del suolo non sono noti e l'ideale varia talvolta tra differenti tipologie di suolo. Sparling (1997) manifestò l'idea che si doveva essere più specifici su quali trend dovesse avere un indicatore microbiologico. Quando ci saremmo dovuti muovere dall'osservazione per interessarci? Sebbene sia importante sapere che diversi usi dei terreni influenzano gli indicatori, quanto possono cambiare tali indicatori senza provocare allarme? Per questo motivo necessitano ulteriori esperienze su come gli indicatori reagiscono in diverse situazioni.

Tuttavia, sulla base di questa esperienza per qualsiasi valore attuale è necessario l'utilizzo di metodi standardizzati. È importante che si consideri la standardizzazione di ogni aspetto del metodo, dal campionamento, attraverso lo stoccaggio ed il pre-trattamento dei campioni fino all'attuale procedimento analitico, all'interpretazione e alla presentazione dei risultati. Queste materie richiedono anche molto sforzo. A causa della natura molto dinamica dei microrganismi, si deve porre particolare attenzione agli indicatori microbiologici durante lo stoccaggio ed al pre-trattamento dei campioni. Sebbene siano stati pubblicati diversi manuali metodologici, i metodi utilizzati negli studi scientifici sono quasi sempre modificati in qualche modo, e in un numero sorprendentemente alto di studi i campionamenti e i pre-trattamenti vengono descritti solo in modo molto approssimato. Potrebbero esserci anche teorie contraddittorie sulle funzioni di diversi tipi di terreno. Mentre un agricoltore approva una elevata mineralizzazione dell'N per supportare una elevata produttività, l'ambiente può essere a rischio di contaminazione di nutrienti per dilavamento. Tali contraddizioni non sono, tuttavia, specifiche per attributi biologici. Un esempio analogo potrebbe essere uno strato di argilla dura che può inibire la crescita delle radici e di conseguenza la produzione, o può anche prevenire il dilavamento dei nutrienti (Doran e Parkin, 1994). Un'altra ragione per le difficoltà di interpretazione è il caso di ampie fluttuazioni nel tempo dell'attività microbica di campo. L'utilizzo di metodi di laboratorio standardizzati permetterà di ovviare a questo problema. Standardizzando il campionamento in periodi influenzati il meno possibile dalle pratiche agricole, la riproducibilità dovrebbe incrementare. L'inconveniente con la misurazione in laboratorio è che il risultato non può essere direttamente interpretato come una misurazione quantitativa del ciclo dei nutrienti nel suolo.

Nel box che segue viene proposta una procedura interpretativa che combina parametri di tipo chimico e biochimico, come suggerito da Brookes con il controllo interno per la stima della fertilità biologica di un suolo sulla base di intervalli di valori dedotti dalla letteratura.

PROPOSTA PER LA DETERMINAZIONE DI UN INDICE DI FERTILITÀ DEL SUOLO BASATO SUI PARAMETRI BIOCHIMICI

Letizia Pompili, Anna Benedetti

I parametri utilizzati per la determinazione di questo indice, e le loro unità di misura, sono riportati nella seguente tabella. I parametri biochimici scelti sono quelli generalmente utilizzati per l'analisi e lo studio della qualità del suolo.

Parametri utilizzati	Abbreviazione	Unità di misura
Sostanza organica	S.O.	%
Respirazione basale	C _{bas}	ppm
Respirazione cumulativa	C _{cum}	ppm
Carbonio microbico	C _{mic}	ppm
Quoziente metabolico	qCO ₂	(10 ⁻²) h ⁻¹
Quoziente di mineralizzazione	qM	%

Per ciascuno dei parametri sono stati stabiliti 5 intervalli di valori a ciascuno dei quali viene assegnato il punteggio dell'intervallo a cui appartiene.

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

La somma algebrica dei punteggi per ciascun parametro dà origine ad una scala di fertilità biologica riportata nella tabella sottostante.

Classe di Fertilità	I stanchezza allarme	II stress preallarme	III media	IV buona	V alta
Punteggio	0-6	6-12	12-18	18-24	24-30

Esempio:

Ammettiamo che un suolo presenti dei risultati come di seguito riportati.

S.O.	C_{bas}	C_{cum}	C_{mic}	q(CO₂)
1,32	7,68	205,5	111,8	0,286

Possiamo associare a ciascun parametro i seguenti punteggi.

Parametri analizzati	Punteggi assegnati
Sostanza organica	2
Respirazione basale	2
Respirazione cumulativa	2
Carbonio microbico	2
Quoziente metabolico	3
Quoziente di mineralizzazione	3
TOTALE	14

Il risultato ottenuto permette di assegnare a questo terreno una classe di fertilità MEDIA.

N.B.

È consigliabile utilizzare l'indice proposto per suoli a tessitura franco-argillosa e valori di pH compresi tra 6,5 e 7,5. Inoltre è da tenere in considerazione che gli intervalli di valori proposti per i singoli parametri biochimici sono specifici per ambienti dell'area mediterranea. Infine gli stessi sono stati tarati per un tipo di analisi di laboratorio che prevede essiccazione del terreno e ricondizionamento a temperatura ed umidità ottimali per l'attività microbica.

BIBLIOGRAFIA

- Alef K. 1995. *Nutrient sterilization, aerobic and anaerobic culture technique*. In: Methods in applied soil microbiology and biochemistry (K. Alef and Nannipieri P., eds), pp. 123-133, Academic Press, New York.
- Alef K., Nannipieri P. 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, New York..
- Anderson J.P.E. 1982. *Soil respiration*. In : Page, A.L. (ed.) methods of soil analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Vol. 9, 2nd edn. ASA-SSSA. Madison, WI, pp. 831-871.
- Anderson J.P.E., Domsh K.H. 1975. *Measurement of bacterial and fungal contributions to soil respiration of selected agricultural and forest soil*. Canadian Journal of microbiology 21: 314-322.
- Anderson J.P.E., Domsh K.H. 1978. *A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil*. Soil Biology and Biochemistry 10: 215-221.
- Anderson T.H., Domsh K.H. 1985. *Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state*. Biology and Fertility of Soils 1: 81-89.
- Anderson T.H. 1994. *Physiological analysis of microbial communities in soil: applications and limitations*. In: Ritz, K. Dighton, J & Giller, K.E. (eds) Beyond the Biomass. John Wiley & Sons. Chichester, pp. 67-76.
- Benedetti A. 1983. *Soil biological fertility and slow-release fertilisers*. Annali Istituto Sperimentale Nutrizione delle piante 12: 1-14.
- Benedetti A., Sebastiani G. 1996. *Determination of potentially mineralizable nitrogen in agricultural soil* Biology and Fertility of Soils 21: 114-120.
- Benedetti A., Canali S., Alianiello F. 1994. *Mineralization dynamics of the organic nitrogen: soil management effects*. In: Proceedings of the N-immobilisation workshop. November, Macaulay Land Use Research Institute, Aberdeen, UK.
- Bloem J., Bolhuis P.R., Veninga M.R., Wieringa J. 1995. *Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil*. In: Methods in applied soil microbiology and biochemistry (K. Alef and P. Nannipieri, eds.) pp. 162-173, Academic press, New York.
- Bloem J., Hopkins D., Benedetti A. (eds.). 2006. *Microbial methods assessing soil quality*. CABI Publishing.
- Brookes P.C. 1995. *The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals*. Biology and Fertility of Soils 19: 269-279.
- Bundy L.G., Meisinger J.J. 1994. *Nitrogen availability indices*. In: Weaver R.W., Angle J.S., Bottomley P.D. (eds.) Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
- Dobereiner J. 1995. *Isolation and identification of nitrogen fixing bacteria from soil and plants*. In: Methods in applied soil microbiology and biochemistry. (K. Alef and P. Nannipieri, eds.), pp. 134-135. Academic Press, New York.
- Domsch K.H. 1980. *Interpretation and evaluation of data*. In: Recommended tests for assessing the side-effects of pesticides on the soil microflora. Weed Research Organization Technical Report N.59, pp. 6-8.
- Domsch K.H., Jagnow G., Anderson T.H. 1983. *An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil micro-organism*. Residue Reviews 86: 65-105.
- Doran J.W., Parkin T.B. 1994. *Defining and assessing soil quality*. In: Doran J.W., Coleman D.C., Bezdicek D.F. & Stewart B.A. (eds) Defining soil quality for a Sustainable Environment, 35. American society of agronomy special publication, Madison, WI, pp. 3-21.
- Doran J.W., Parkin T.B. 1996. *Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set*. In: Doran J.W. e Jones A.J. (eds.) Methods of assessing soil quality, Special publication 49. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp. 25-37.
- Garland J.L., Mills A.L. 1991. *Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization patterns*. Applied and Environmental Microbiology 57: 2351-2359.
- Heinemeyer O., Insam H., Kaiser E.A. & Walenzik G. 1989. *Soil microbial biomass and respiration measurements: an automated technique based on infra-red gas analysis*. Plant and Soil 116: 191-195.
- Horwarth W.R., Paul E.A. 1994. *Microbial biomass*. In: methods of soil analysis. Part. 2. Microbiological and Biochemical properties (R. W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai and A. Wollem, eds), pp. 753-773. Soil Science Society of America Madison, WI.
- Insam H., Haselwandter K. 1989. *Metabolic quotient of the soil microflora in relation to plant succession*. Oecologia 79: 174-178.
- Insam H., Amor K., Renner M and Crepaz C. 1997. *Changes in functional abilities of the microbial community during composting of manure*. Microbial Ecology 31: 77-87.
- Jenkinson D.S. 1988. *Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil*. In: Advances in nitrogen cycling in agricultural ecosystems (J.K. Wilson, ed.), pp. 368-386. CAB International, Wallingford, Great Britain.
- Jenkinson D.S., Powlson D.S. 1976. *The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V.A. method for measuring soil biomass*. Soil Biology and Biochemistry 8: 209-213.
- Johansson M., Pell M., Stenström J. 1998. *Kinetics of substrate induced respiration (SIR) and denitrification: applications to a soil amended with silver*. Ambio 27: 40-44.
- Kaiser E.A., Mueller T., Joergensen R.G., Insam H. & Heinemeyer O. 1992. *Evaluation of methods to estimate the soil microbial biomass and the relationship with soil texture and organic matter*. Soil biology and Biochemistry 24: 675-683.

- Kennedy A.C., Papendick R.I. 1995. *Microbial characteristics of soil quality*. Journal of Soil and Water Conservation 50: 243-248.
- Ladd J.N., Jackson R.B. 1982. *Biochemistry of ammonification*. In: Stevenson F.J. (ed.) Nitrogen in Agricultural soils, 22. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 173-228.
- Loczko E., Rudaz A., Aragno M. 1997. *Diversity of anthropogenically influenced or disturbed soil microbial communities*. In: Microbial communities Functional Versus Structural Approaches (H. Insam and A. Ranggner, eds.), pp. 57-67, Springer-Verlag, Berlin.
- Lorch H.J., Benckieser G. and Ottow J.C.G. 1995. *Basic methods for counting microorganisms in soil and water*. In: Methods in applied soil microbiology and biochemistry. (K. Alef and P. Nannipieri, eds), pp. 136-161. Academic press, New York.
- Lynch J.M., Benedetti A., Insam H., Nuti M., Smalla K., Torsvik V., Nannipieri P. 2004. *Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms*. Biology and Fertility of Soils 40: 363-385.
- Madsen E.L. 1996. *A critical analysis of methods for determining the composition and biogeochemical activities of soil microbial communities in situ*. In: Soil Biochemistry vol. 9 (G. Stotzky and J.M. Bollag, eds.), pp. 287-370.
- Mary B., Remy J.C. 1979. *Essai d'appréciation de la capacité de minéralisation de l'azote des sols de grande culture I-Signification des cinétiques de minéralisation de la matière organique humifiée*. Ann. Agron. 1979, 513-527.
- Martens R. 1995. *Current methods for measuring microbial biomass C in soil: potentials and limitations*. Biology and Fertility of Soils 19: 87-99.
- Menasseri S., Houot S., Chaussod R. 1993. *Field test of biological and chemical methods to estimate the soil nitrogen supply under a temperate climate*. European Journal of Agronomy 3: 273-279.
- Nannipieri P., Ceccanti B. and Grego S. 1990. *Ecological significance of the biological activity in soil*. In: Soil Biochemistry, Vol. 6 (J.M. Bollag and G. Stotzky, eds.), pp. 293-355. Marcel Dekker, New York.
- Nordgren A. 1988. *Apparatus for the continuous long-term monitoring of soil respiration rate in large number of samples*. Soil Biology and Biochemistry 20: 955-957.
- Nordgren A. 1992. *A method for determining microbial available N and P in an organic soil*. Biology and Fertility of Soils 13: 195-199.
- Odum E.P. 1969. *The strategy of ecosystem development*. Science 164: 262-270.
- Powlson D.S. 1994. *The soil microbial biomass: Before, beyond and back*. In: Ritz K., Dighton J. & Giller K.E. (eds.) Beyond the biomass. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 3-20.
- Rodale Institute. 1991. *Conference Report and Abstract, International Conference on the assessment and monitoring of soil quality*. Emmaus, Pennsylvania, 11-13 July 1991.
- Sparling G.P. 1995. *The substrate-induced respiration method*. In: Methods in applied soil microbiology and Biochemistry. (K. Alef and P. Nannipieri, eds.), pp. 397-404. Academic press, New York.
- Stanford G., Smith S.J. 1972. *Nitrogen mineralization potentials of soils*. Soil Science Society American Proceedings 38: 99-102.
- Stanford G., Carter J.N., Smith S.J. 1974. *Estimates of potentially mineralizable soil nitrogen based on short-term incubations*. Soil Science Society American Proceedings 38: 99-102.
- Stenstrom J., Stenberg B., Johansson M. 1998. *Kinetics of substrate-induced respiration (SIR): theory*. Ambio 27: 35-39.
- Torsensson L., Stenström J. 1986. *"Basic" respiration rate as a tool for prediction of pesticide persistence in soil*. Toxicity Assess 1: 57-72.
- Van de Werf H., Verstraete W. 1987. *Estimation of activity soil microbial biomass by mathematics analysis of respiration curves: calibration and test procedure*. Soil Biology and Biochemistry 19: 261-265.
- Vance E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S. 1987. *An extraction method for measuring soil microbial biomass C*. Soil Biology and Biochemistry 19: 703-707.
- Wardle D.A., Ghani A. 1995. *A critique of the microbial metabolic quotient (qCO_2) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development*. Soil Biology and Biochemistry 27:1601-1610.
- Wardle D.A., Parkinson D. 1991. *A Statistical evaluation of equations for predicting total microbial biomass carbon using physiological and biochemical methods*. Agric Ecosyst. Environ. 34: 75-86.
- Waring S.A., Bremner J.M. 1964. *Ammonium production in soil under waterlogger conditions as an index of nitrogen availability*. Nature 201: 951-952.
- Zuberer D.A. 1999. *Recovery and enumeration of viable bacteria*. In: Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties (R. W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicsek, S. Smith, A. Tabatabai and A. Wollum, eds), pp. 119-144. American Society of Agronomy, Madison.