

INDICE

1. Il suolo.....	4
1.1 I servizi ecosistemici del suolo, le cause di degradazione e la normativa	5
1.2 Indicatori della qualità del suolo	7
1.2.1 La sostanza organica.....	8
1.2.2 La biomassa microbica	10
1.2.3 La respirazione microbica	11
1.2.4 Le attività enzimatiche	11
1.2.5 La diversità microbica del suolo e le metodiche di studio	12
1.2.6 Macro e micro-nutrienti ed elementi potenzialmente tossici nel suolo...	14
2. Gli agroecosistemi	18
3. Il compost ed il processo di compostaggio.....	20
3.1 Elementi potenzialmente tossici nel compost e variazione di disponibilità nel suolo.....	22
4. Obiettivo della ricerca	23
MATERIALI E METODI	24
5. Area di studio e disegno sperimentale	24
5.1 Colture impiegate e tecniche agronomiche di coltivazione.....	26
6. Attività biologiche e comunità microbiche del suolo	28
6.1 Biomassa microbica.....	28
6.2 Respirazione microbica	29
6.3 Attività idrolasica totale	29
6.4 Attività β -glucosidasica.....	29
6.5 ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis).....	30
7. Carbonio organico del suolo.....	30

7.1 Frazionamento chimico attraverso idrolisi acida.....	30
8. Nutrienti ed elementi potenzialmente tossici.....	31
8.1 Preparazione dei campioni.....	31
8.2.1 Colture	31
8.2.2 Concentrazione totale nel suolo.....	31
8.2.3 Frazione disponibile nel suolo	31
9. Analisi statistica	32
RISULTATI	33
10. Parametri chimici e biologici	33
10.1 Biomassa e respirazione microbica	33
10.2 Attività Idrolasica Totale ed Attività β -glucosidasica	34
10.3 Carbonio organico totale e sua ripartizione in pools a diversa stabilità chimica.....	38
10.4 Correlazioni tra i parametri chimici e biologici e sintesi dei risultati	42
10.5 Diversità microbica del suolo	46
11. Nutrienti ed elementi potenzialmente tossici nel suolo e nelle colture	48
11.1 Macronutrienti	48
11.2 Micronutrienti	52
11.3 Elementi potenzialmente tossici	56
11.4 Fattori di traslocazione.....	60
11.5 Sintesi dei risultati	60
CONCLUSIONI	65
BIBLIOGRAFIA	67

1. Il suolo

Con il termine suolo si definisce lo strato più superficiale della crosta terrestre, formato da particelle minerali, sostanza organica, acqua, aria e organismi viventi (ISO, 1996). Da un punto di vista ecologico, il suolo è il prodotto di interazioni complesse tra clima, geologia, vegetazione, attività biologica, tempo e utilizzo del terreno (figura 1) ed è una risorsa non rinnovabile, caratterizzata da velocità di degradazione potenzialmente rapide e processi di formazione e rigenerazione estremamente lenti. Il suolo è caratterizzato da un'abbondante biodiversità: la diversità biologica edafica è di diversi ordini di grandezza più grande di quella trovata all'esterno di questo comparto ambientale (Heywood, 1995) ed è considerata come l'ultima frontiera nello studio sulla biodiversità della terra (Gardi et al., 2009). L'attività biologica contribuisce alla struttura e alla fertilità dei suoli, giocando un ruolo chiave nel ciclo della materia e dell'energia, ed è quindi fondamentale per la maggior parte delle sue funzioni (Lavelle et al., 2006). Il suolo influenza ed è influenzato dalla qualità e dalla quantità delle acque superficiali e sotterranee, dalla composizione dell'atmosfera, per lo scambio di gas quali CO₂, CH₄ e NO₂ (Mosier et al. 1998, Fanguero et al., 2007), e dalla biodiversità, tutti fattori che possono incidere significativamente sulla componente biologica (Doran & Zeiss, 2000, Underwood et al. 2011). Il suolo è un comparto ambientale particolarmente sensibile all'impatto del clima e delle attività dell'uomo, a causa dei suoi lunghi tempi di rigenerazione.

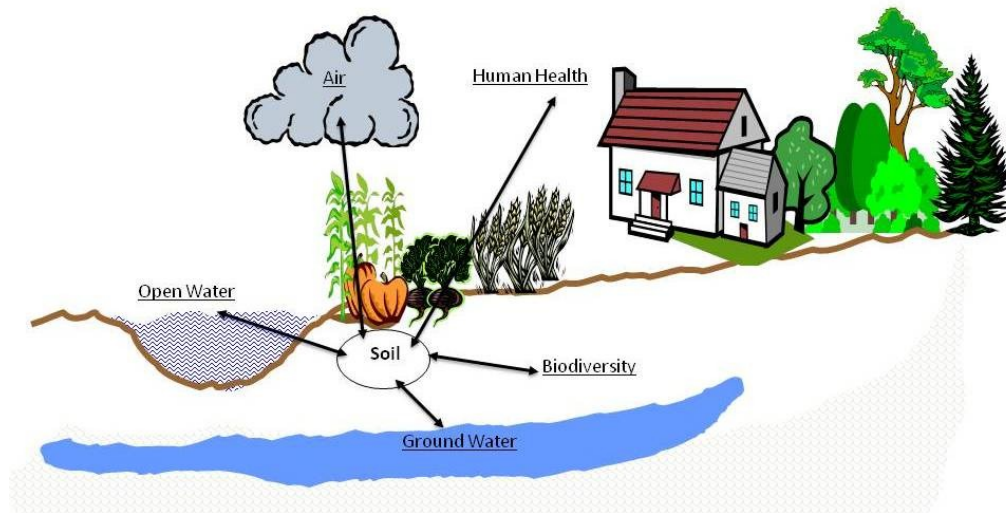


Fig. 1. Interazioni tra il suolo e gli altri comparti ambientali

La fertilità del suolo è la caratteristica fondamentale nel determinare la produttività dei sistemi coltivati (Watson et al., 2002); tuttavia è molto più utile considerare la fertilità come un concetto ecosistemico che integra le differenti funzioni del suolo, incluso il fornire i nutrienti che promuovono la produttività delle piante (Swift & Palm, 2000).

1.1 I servizi ecosistemici del suolo, le cause di degradazione e la normativa

Il Millennium Ecosystem Assessment (MEA, 2005) è un programma lanciato dalle Nazioni Unite nel 2001 che ha avuto come obiettivo ambizioso la valutazione delle conseguenze del cambiamento degli ecosistemi sul benessere umano, ponendo le basi scientifiche per intraprendere azioni volte a migliorare la conservazione e l'uso sostenibile degli ecosistemi ed i benefici che essi apportano. Il MEA ha coinvolto più di 1360 esperti di tutto il mondo: i 5 volumi tecnici e i 6 report sintetici forniscono lo stato dell'arte sulla valutazione scientifica delle condizioni degli ecosistemi e dei servizi che essi forniscono nonché le opzioni di recupero, conservazione e miglioramento della loro gestione. Il Millennium Ecosystem Assessment introduce il concetto di **Servizi Ecosistemici** (SE) che non sono altro che *"i benefici multipli forniti dagli ecosistemi al genere umano"* e li classifica (figura 2) in:

- servizi di supporto;
- servizi di approvvigionamento;
- servizi di regolazione;
- servizi culturali;



Fig. 2. Servizi Ecosistemici (modificato da MEA, 2005)

La Commissione Europea, già precedentemente con la **COM 2002/179/CE** "Verso una strategia tematica per la protezione del suolo", aveva definito una serie di funzioni chiave dal punto di vista ambientale, economico, sociale e culturale che sono assicurate dal suolo e sono indispensabili per la vita:

- produzione alimentare e di altre biomasse;

La produzione alimentare agricola, essenziale per la sopravvivenza umana, e la silvicoltura dipendono interamente dal suolo. Quasi tutta la vegetazione, tra cui i pascoli, le colture arabili e gli alberi, ha bisogno del suolo per rifornirsi di acqua e sostanze nutritive e per fissare le proprie radici.

- immagazzinamento, filtrazione e trasformazione (tali funzioni si riferiscono principalmente all'acqua, ai nutrienti, agli elementi chimici e alla sostanza organica);

Il suolo immagazzina e in parte trasforma minerali, sostanza organica, acqua, energia e diversi composti chimici. Funge inoltre da filtro naturale per le acque sotterranee, la fonte principale di acqua potabile, e rilascia nell'atmosfera CO₂, CH₄ e altri gas.

- habitat e patrimonio genetico;

Il suolo è l'habitat di una enorme quantità e varietà di organismi che vivono sotto e sopra la sua superficie, ognuno dei quali è caratterizzato da corredo genico unico. Per questo motivo assicura funzioni ecologiche essenziali.

- supporto fisico per le infrastrutture e le attività umane, elemento del paesaggio e sede di testimonianze archeologiche e paleontologiche;

Il suolo è la piattaforma dell'attività umana, oltre ad essere un elemento del paesaggio e del patrimonio culturale.

- fonte di materie prime

Il suolo fornisce materie prime, quali argilla, sabbia, minerali e torba.

La stessa **COM 2002/179/CE** elenca e descrive sinteticamente le cause di degradazione del suolo tra cui le principali sono l'erosione, l'acidificazione, la diminuzione di sostanza organica, l'impermeabilizzazione, la contaminazione locale e

diffusa e la perdita di biodiversità. In particolare, il declino della sostanza organica del suolo è accompagnato da una parallela riduzione della fertilità: si stima che il 74% delle terre nell'area Mediterranea sono coperte da suoli contenenti meno del 2% di carbonio organico con un decremento di circa il 50% del contenuto originale (Van-Camp et al., 2004). In questo contesto, la Commissione Europea ritiene necessaria una strategia globale dell'UE per la protezione del suolo, che deve prendere in considerazione tutte le diverse funzioni che esso può svolgere, la variabilità e la complessità che le caratterizzano e i diversi processi di degrado che possono avvenire, senza dimenticare gli aspetti socio-economici (**COM 231/2006/CEE**). La strategia che la Commissione propone si articola attorno a quattro pilastri fondamentali:

(1) adozione di una legislazione quadro finalizzata principalmente alla protezione e all'uso sostenibile del suolo;

(2) integrazione della protezione del suolo nella formulazione e nell'attuazione delle politiche nazionali e comunitarie;

(3) riduzione del divario oggi esistente in termini di conoscenze in alcuni settori della protezione del suolo, sostenendo la ricerca attraverso programmi di ricerca comunitari e nazionali;

(4) maggiore sensibilizzazione in merito alla necessità di difendere il suolo.

In particolare il punto 1 sottolinea l'importanza di creare una legislazione comunitaria specifica attraverso l'adozione di una direttiva quadro, che, però, attualmente esiste solo come bozza, la **COM 232/2006/CEE**, non essendo stata ancora approvata dal parlamento europeo; inoltre la **COM 46/2012/CEE** "Attuazione della strategia tematica per la protezione del suolo e attività in corso" fornisce una visione d'insieme sull'attuazione della Strategia tematica per la protezione del suolo sin dall'adozione avvenuta a settembre 2006. La relazione illustra inoltre le tendenze attuali di degradazione del suolo in Europa e nel resto del mondo, nonché le sfide future per garantirne la protezione.

La normativa italiana è stata orientata maggiormente verso la gestione indiretta del suolo, puntando l'attenzione su aspetti specifici come il rischio idrogeologico (Parte III del D. Lgs. 152/2006) e la bonifica dei siti contaminati (Parte IV al D. Lgs. 152/2006), piuttosto che verso un approccio organico e diretto volto alla sua protezione e gestione. La tutela del suolo, pertanto, non ha ricevuto ancora quell'attenzione che merita, e alla quale sono soggetti matrici ambientali come l'aria e l'acqua. La legislazione vigente affronta solo alcuni problemi che riguardano il suolo perché più direttamente legati alla salute e all'incolumità umana.

E' necessario e propedeutico alla creazione di una legislazione organica la predisposizione di un sistema di informazioni e di monitoraggio della qualità del suolo attraverso indicatori, come già stato fatto per le acque, per determinare le condizioni prevalenti e valutare l'impatto delle diverse politiche e pratiche di intervento (Biagini et al., 2006).

1.2 Indicatori della qualità del suolo

Il suolo è un sistema estremamente variabile nello spazio e nel tempo, caratterizzato da una vasta gamma di proprietà fisiche, chimiche e biologiche: definirne la "qualità" vuol dire considerare contemporaneamente molti aspetti con approcci e criteri che

possono essere anche differenti a seconda delle funzioni di interesse (Ruf et al., 2003).

Diverse sono le definizioni di qualità del suolo formulate da vari autori. Karlen et al. (1997), definiscono la qualità del suolo come *"la capacità di uno specifico tipo di suolo di funzionare all'interno di un ecosistema naturale o gestito, di sostenere la produttività delle piante e degli animali, mantenendo o migliorando la qualità delle acque e dell'aria, e supportando la salute umana e le abitazioni"*, mentre Doran & Safley (1997) la definiscono come *"la continua capacità del suolo di funzionare come un sistema vivente, sostenendo la produttività biologica, promuovendo la qualità dell'aria e dell'acqua e mantenendo la salute delle piante, degli animali e degli uomini"*.

Nella letteratura scientifica vengono utilizzati numerosi indicatori della qualità del suolo che sono stati classificati dall'USDA in quattro categorie: visivi, chimici, fisici e biologici (Martinez-Salgado et al., 2010). Considerata l'enorme complessità del sistema edafico, appare evidente come l'utilizzo di pochi parametri non permetta di rappresentare pienamente lo stato di un suolo ed i processi che avvengono in esso, processi che, a loro volta, sono il risultato di numerose interazioni; allo stesso tempo, è necessario individuare quali parametri siano maggiormente indicativi, vista la necessità di contenere l'impegno di lavoro e quello economico. Negli ultimi anni la tendenza riscontrata nella valutazione dello stato di qualità di una determinata matrice ambientale è stata quella di integrare i parametri chimico-fisici con metodiche di tipo biochimico e biologico attraverso l'utilizzo di bioindicatori. Iserentant & De Sloover (1976) definiscono un **bioindicatore** *"un organismo o sistema biologico usato per valutare una modificazione (generalmente degenerativa) della qualità ambientale qualunque sia il livello di organizzazione ed uso che se ne fa"*; rientrano in questa definizione gli individui, le popolazioni, le comunità ma anche organi, tessuti e prodotti metabolici. Gli indicatori biologici includono misurazioni della biomassa dei microrganismi, della concentrazione nel suolo di composti da essi sintetizzati e dell'intensità di particolari processi metabolici, quali respirazione e attività enzimatiche. Grazie al rapido turn-over delle popolazioni microbiche, questi indicatori risultano particolarmente sensibili e rispondono rapidamente a cambiamenti delle condizioni ambientali e della gestione del suolo.

Qui di seguito vengono descritti i principali parametri chimici e biologici utilizzati nel mio progetto di ricerca, i processi che descrivono e l'influenza che può avere l'ambiente su di essi.

1.2.1 La sostanza organica

La sostanza organica del suolo (**Soil Organic Matter - SOM**), di cui il carbonio è il maggiore costituente, è definita come l'insieme di parti vegetali ed animali riconoscibili e del materiale che è stato alterato, tanto che la sua organizzazione strutturale originale non è più riconoscibile (Oades, 1988).

Le proprietà fisiche e chimiche della SOM sono altamente e continuamente variabili nello spazio e nel tempo e sono alla base dei processi di stabilizzazione nel suolo: la **stabilizzazione** è definita come la protezione della sostanza organica dalla mineralizzazione e deriva dall'effetto integrato della resistenza alla degradazione, dell'interazione con le particelle minerali e dell'accessibilità fisica da parte dei microrganismi (von Lutzow et al., 2006, Christensen, 1996; Stevenson, 1994). In particolare, la SOM è costituita sia da composti facilmente degradabili da parte di

numerosi gruppi di microrganismi, sia da composti decomponibili attraverso l'attività enzimatica di pochi gruppi specializzati; ciò si riflette nel tempo medio di turnover della SOM nel suolo che varia da giorni ad anni a millenni (Davidson & Janssens, 2006). La dinamica della sostanza organica è fortemente influenzata dalla struttura e dalla tessitura del suolo. Infatti, la SOM che si trova nelle zone più esterne degli aggregati del suolo è fisicamente più accessibile alla degradazione rispetto a quella protetta all'interno degli aggregati (Six et al., 1998). 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 che ne rallentano la mineralizzazione.

La SOM rappresenta una delle più grandi riserve (sink) di carbonio, di cui ne costituisce il 60% su scala globale e gioca un ruolo chiave nel ciclo biogeochimico di questo elemento; su scala globale il suolo contiene 1500 Pg (1 Pg=10¹⁵ g) di carbonio organico nello strato superficiale (0-100 cm) e questa quantità è considerata essere più grande di quella contenuta nella biomassa terrestre (Schlesinger, 1997; Amundson, 2001).

La quantità di SOM in un determinato tempo riflette il bilancio a lungo termine tra il tasso di input dovuto alla produzione primaria netta (qualità e quantità), e il tasso di decomposizione (von Lutzow et al., 2006).

La sostanza organica, svolge una funzione positiva su molte proprietà del suolo (figura 3) favorendo, ad esempio, l'aggregazione delle particelle del terreno e la stabilità degli aggregati, con l'effetto di ridurre l'erosione, il compattamento, il crepacciamento e la formazione di croste superficiali, legando in modo efficace numerosi ioni e molecole, migliorando la capacità tampone del suolo, l'attività microbica e la disponibilità di nutrienti per le piante, il tutto con ripercussioni positive sulla fertilità.



Fig. 3. Effetti della sostanza organica sulle proprietà del suolo.

La **qualità (q)** è un concetto chiave nello studio della sostanza organica del suolo e può essere definita come *"la capacità della SOM di essere utilizzata dalla comunità microbica del suolo come fonte di energia e come scheletro carbonioso per le proprie strutture"* (Rovira & Vallejo, 2002). Essa è principalmente funzione delle caratteristiche chimiche e biologiche e numerosi indici si sono basati su questo

fondamento logico, come i rapporti C/N (Vallejo, 1993), lignina/N (Taylor et al., 1989), cellulosa/lignina (McClaugherty & Berg, 1987), cellulosa/lignina/N (Entry & Backman, 1995), riflettendo la proporzione dei composti labili e recalcitranti. Nell'approccio teorico di Bosatta & Agren (1991), la SOM è considerata come la somma integrale di infiniti pool, e la sua qualità complessiva è il risultato della differente qualità di ogni pool; dal punto di vista pratico i vari pool sono ristretti ad un numero finito. Berendse et al. (1985) suggeriscono che il materiale vegetale in decomposizione può essere diviso in tre pool di base: (a) carboidrati liberi, non mascherati dalla lignina, (b) carboidrati mascherati da lignina, principalmente cellulose, (c) la stessa lignina.

Sono vari i metodi per l'analisi quantitativa e qualitativa della sostanza organica del suolo, alcuni dei quali hanno la capacità di isolare frazioni omogenee, in termini di turnover, che rappresentano i pool funzionali di SOM che si sono formati attraverso uno specifico meccanismo di stabilizzazione (e.g. recalcitranza, inaccessibilità spaziale e interazioni organo-minerali). Essi si possono dividere in metodi di frazionamento fisico, chimico o entrambi (von Lützow et al., 2007).

I metodi di **frazionamento fisico** sono basati sulla premessa che l'associazione delle particelle del suolo e il loro spaziale arrangiamento giocano un ruolo chiave nella dinamica della SOM, perché la sua accessibilità è il requisito principale per la sua decomposizione. Il frazionamento fisico coinvolge l'applicazione di vari livelli di trattamenti disaggreganti (setacciamento a secco e bagnato), dispersione (in bagnetto ad ultrasuoni), separazione per gradiente di densità e sedimentazione.

Il **frazionamento chimico** è basato su procedure che prevedono l'estrazione della SOM in soluzioni acquose con o senza elettroliti, in solventi organici, con acqua a temperature elevate o con acidi a differente concentrazione (idrolisi acida). L'idrolisi acida (Rovira & Vallejo, 2002; Silveira, 2008) è un metodo semplice di frazionamento chimico per valutare la qualità della SOM, potendola dividere in un pool labile di piccola taglia a rapido turnover e in una frazione recalcitrante e maggiormente stabile di taglia maggiore e a turnover più lento (Mcclauchlan & Hobbie, 2004); questa procedura è facile da eseguire e può essere applicata ad un gran numero di campioni.

La frazione di carbonio idrolizzabile in ambiente acido, definita carbonio labile, è largamente composta da carboidrati semplici e complessi, polisaccaridi, proteine, acidi nucleici ed alcuni gruppi carbossilici, mentre acidi grassi, cere, resine e suberina sono resistenti all'idrolisi acida e, insieme con la lignina, dominano la frazione recalcitrante (Rovira & Vallejo, 2002), altamente resistente alla decomposizione.

Lo studio del carbonio organico del suolo ha ricevuto un ulteriore interesse in relazione ai cambiamenti climatici, essendo una potenziale fonte di gas serra quali CO₂ e CH₄. Burke et al. (1989), ad esempio, mostrano che all'aumentare dell'ammontare annuo delle precipitazioni incrementa anche il carbonio organico, mentre all'aumentare della temperatura media annua, il carbonio organico del suolo diminuisce, con rilascio di CO₂ in atmosfera.

1.2.2 La biomassa microbica

La biomassa microbica rappresenta la componente vivente della materia organica del suolo con l'esclusione degli animali e delle radici delle piante (Gil-Sotres et al. 2005). Batteri e funghi sono gli organismi dominanti all'interno della biomassa microbica (Schloter et al., 2003) e, anche se essa rappresenta meno del 5% della materia organica del suolo (Dalal, 1998), esplica funzioni fondamentali in molti processi: è contemporaneamente fonte e riserva di nutrienti, partecipa alla trasformazione dei

principali elementi di cui è costituita la sostanza organica intervenendo, ad esempio, nel ciclo del carbonio, dell'azoto, del fosforo e dello zolfo, interviene attivamente nella degradazione di composti organici xenobiotici e nei processi di immobilizzazione dei metalli pesanti (Nannipieri, 2002). Considerando il ruolo chiave che le comunità microbiche del suolo svolgono, non sorprende come la biomassa venga utilizzata come indicatore della qualità del suolo.

1.2.3 La respirazione microbica

Una stima dell'attività della popolazione microbica del suolo è possibile attraverso la misura in laboratorio della CO₂ prodotta nel processo di respirazione che è indicativa del tasso di mineralizzazione della sostanza organica. Le tecniche di laboratorio utilizzano terreno setacciato, per cui viene escluso il contributo dovuto alla respirazione della macrofauna e delle radici. La respirazione del suolo dipende dallo stato fisiologico delle cellule microbiche ed è influenzata dall'umidità, dalla temperatura e dalla struttura del suolo (che incide sull'efficienza degli scambi gassosi con l'atmosfera). E' altamente dipendente dalla quantità e dalla qualità della sostanza organica ed è utile per determinare l'influenza di vari fattori ambientali sui processi di ossidazione della materia organica (Nannipieri et al., 1990). E' inoltre influenzata da trattamenti agronomici e tecniche di coltura (è infatti frequentemente usata per la valutazione degli effetti di pesticidi e fertilizzanti), nonché della contaminazione da metalli pesanti e inquinanti organici.

1.2.4 Le attività enzimatiche

Una funzione essenziale della componente microbica del suolo è la degradazione della materia organica che porta alla liberazione di nutrienti disponibili per le piante ma anche alla mineralizzazione e alla mobilitazione di inquinanti e xenobiotici; questi processi spesso richiedono l'attività di enzimi extracellulari (Caldwell, 2005) la cui misurazione può evidenziare l'eventuale effetto di determinanti ambientali, di origine naturale o antropica, sul suolo.

L'attività di un determinato enzima dipende anche dalle diverse localizzazioni nel suolo; si possono infatti avere, per un determinato enzima, le seguenti localizzazioni (Burns, 1982):

- enzimi presenti in cellule metabolicamente attive con localizzazione intracellulare, periplasmatica o sulla superficie esterna della cellula;
- enzimi in cellule non proliferanti quali spore batteriche e cisti;
- enzimi ancora attivi presenti nelle cellule morte o nei residui cellulari che derivano dalla degradazione delle cellule morte;
- enzimi extracellulari che sono stati rilasciati nella fase acquosa del suolo durante la normale vita di una cellula microbica o dopo la morte e lisi cellulare;
- enzimi immobilizzati dai fillosilicati e/o dalle molecole umiche del suolo.

L'attività enzimatica del suolo è stata collegata alle caratteristiche chimiche e fisiche del suolo (Amador et al. 1997), alla struttura della comunità microbica (Waldrop et al., 2000; Kourtev et al., 2002), alla vegetazione (Sinsabaugh et al., 2002; Kourtev et al., 2002) e alla presenza di fattori di disturbo (Bolton et al., 1993; Eivazi & Bayan, 1996; García & Hernández, 1997; Boerner et al., 2000).

Nello studio delle attività enzimatiche del suolo si è ricorso all'utilizzo di substrati artificiali che mostrano particolari affinità per determinati gruppi di enzimi che intervengono nei vari cicli biogeochimici come quello del carbonio, dell'azoto e del fosforo.

Le attività enzimatiche studiate in questa tesi sono l'attività idrolasica totale e l'attività β -glucosidasica.

L'**attività idrolasica totale** è un indice dell'abbondanza e dell'attività eterotrofica della microflora batterica e fungina. Le idrolasi trasformano le macromolecole in composti più semplici, rompendo legami covalenti per aggiunta di una molecola d'acqua (reazione di idrolisi). Tale attività è svolta prevalentemente da cellule metabolicamente attive ed è dovuta ad un ampio gruppo di enzimi ad attività lipasica, proteasica ed esterasica, capaci, in condizioni sperimentali, di idrolizzare il diacetato di fluorescina (Schnurer & Rosswall, 1982).

La **β -glucosidasi** è un enzima coinvolto nel ciclo del carbonio ed appartiene ad un gruppo di enzimi, le glicosidasi, che catalizzano l'idrolisi di differenti glucosidi (Eivazi & Tabatai, 1988). Svolge un ruolo importante nella fase finale della degradazione della cellulosa, con liberazione di unità di glucosio che rappresentano un'importante fonte di energia per i microrganismi del suolo (Esen, 1993). Questo enzima è stato ampiamente utilizzato nella valutazione della qualità dei suoli sottoposti a differenti pratiche di gestione ed è significativamente più basso nei suoli agrari rispetto a quelli di foreste e praterie (Saviozzi et al., 2001); alcune pratiche agricole, come la fertilizzazione organica, possono incrementare l'attività di questo enzima (Iovieno et al., 2009; Bastida et al., 2008).

1.2.5 La diversità microbica del suolo e le metodiche di studio

Il suolo costituisce un habitat complesso ed eterogeneo dove vive una gran varietà di microrganismi (figura 4). Si stima che il numero di specie microbiche presenti in un grammo di suolo sia di circa 4000 (Torsvik et al., 1990).

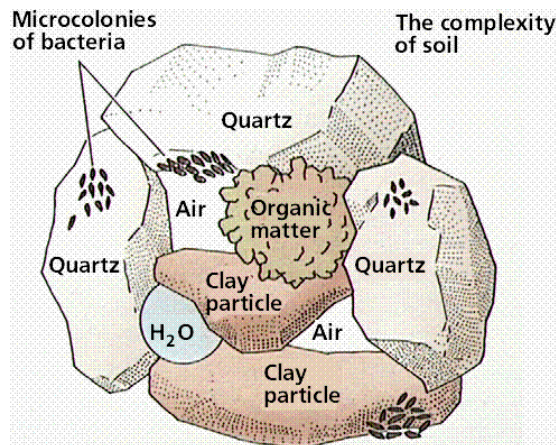


Fig. 4. Habitat dei microrganismi del suolo

Tuttavia la maggior parte di questi microrganismi rimane di difficile individuazione, come dimostrato dallo stesso Torsvik et al. (1996), che evidenziarono come solo l'1% del numero totale di cellule batteriche presenti in campioni di suolo può essere coltivato in laboratorio. La diversità dei microrganismi e l'abbondanza relativa di ciascun gruppo microbico variano enormemente sia all'interno di suoli con caratteristiche fisiche e chimiche differenti, sia in relazione, ad esempio, alle specie vegetali che costituiscono il soprassuolo. La composizione delle comunità microbiche del suolo può variare, inoltre, nel tempo, in conseguenza dei cambiamenti che si verificano nell'ambiente o per azione dei microrganismi che ne fanno parte e/o a causa di variazioni climatiche, topologiche, biochimiche ed antropiche. Ad esempio, la struttura fisica del suolo, l'umidità, il pH, la temperatura e i nutrienti presenti, influenzano la vita microbica e selezionano gli organismi più adatti (Garbeva et al., 2004). Visto la quota estremamente bassa di microrganismi coltivabili in laboratorio negli ultimi anni sono stati sviluppati numerosi metodi molecolari, indipendenti dalla coltivazione in laboratorio, per lo studio della diversità microbica di differenti matrici ambientali. Molte di queste metodologie producono un "*molecular fingerprint*", un'impronta molecolare della comunità microbica esaminata. Per un preliminare approccio allo studio della diversità microbica delle parcelle sottoposte a sperimentazione e per evidenziare un eventuale influenza dei trattamenti su di essa, è stata utilizzata la tecnica dell'**Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis** (ARISA), una metodica di fingerprint molecolare delle comunità microbiche di matrici ambientali che sfrutta i polimorfismi di lunghezza di regioni spaziatriche comprese tra i geni codificanti l'rRNA 16S e l'rRNA 23S, dette Internal Transcribed Spacers (ITS) (Lounghney et al., 1983). La tecnica si basa sulla amplificazione delle sequenze spaziatriche mediante l'utilizzo di primer che si allineano in zone particolarmente conservate dei geni codificanti gli rRNA 16S e 23S. Uno o entrambi i primer sono marcati in posizione 5' con molecole cromofore fotoeccitabili a lunghezze d'onda rilevabili in un comune sequenziatore (5-FAM, 6-FAM, HEX, etc...). I frammenti amplificati tramite PCR sono caricati poi su un sequenziatore per la successiva separazione mediante corsa in elettroforesi capillare, restituendo dei cromatogrammi in cui ogni picco corrisponde ad un OTU (Unità Operativa Tassonomica.) L'ARISA è stata applicata all'analisi delle comunità batteriche del suolo (Ranjard et al., 2001; Brusetti et al., 2004), di suoli contaminati (Hery et al., 2003), di compost (Schloss et

al., 2003) e al batterioplancton di acque dolci (Yannarell and Triplett, 2004; 2005) e di acque salmastre (Hewson and Fuhrnman, 2005).

1.2.6 Macro e micro-nutrienti ed elementi potenzialmente tossici nel suolo

La presenza di SOM, attraverso l'attività dei microrganismi edafici, garantisce la fertilità dei suoli, per apporto di nutrienti indispensabili per la crescita, come N, K, Mg, Ca e Na (Tab 1).

Tabella 1. Caratteristiche e ruolo biologico dei macronutrienti studiati in questa tesi

Magnesio - Mg	Il magnesio svolge un ruolo fondamentale nella fisiologia della pianta essendo il costituente centrale della molecola della clorofilla. Nel terreno è normalmente contenuto in quantità soddisfacente, per cui, i casi di carenza di magnesio sono spesso indotti da eccessi di calcio e potassio, elementi antagonisti, che ne determinano un mancato assorbimento. Oltre ad essere importante per la fotosintesi clorofilliana, il magnesio partecipa alla formazione di pigmenti come il carotene e le xantofille, facilita il trasferimento del fosforo negli apici vegetativi e nei semi, entra nella sintesi degli zuccheri e dell'amido ed è attivatore di numerosi enzimi. In generale, la disponibilità è più alta in suoli basici e neutri e più bassa in suoli acidi, dove si può trovare una deficienza (Allen, 1989). Il magnesio viene assorbito dalle piante nella sua forma ionica Mg^{2+} . Il contenuto di magnesio dei suoli non magnesiaci oscilla tra 0,05 e 0,50% p.s., con punte massime nei suoli argillosi e minime in quelli sabbiosi. La distribuzione del Mg lungo il profilo non presenta di norma notevoli differenze; l'eventuale maggior contenuto negli strati superficiali dei suoli agrari dipende in genere dalle pratiche di fertilizzazione (Sequi, 1993).
Potassio - K	La maggior parte del potassio si trova nella crosta terrestre in minerali, come feldspati ed argilla. Il potassio è infatti un elemento strutturale della maggior parte dei minerali dei suoli ed è da essi rilasciato tramite erosione, che spiega come mai c'è molto di questo elemento nel mare (0,75 g/litro). Il potassio, a differenza del fosforo e dello zolfo, ma soprattutto dell'azoto, si trova nel suolo essenzialmente in forma minerale, nella quasi totalità in forma non assimilabile dai vegetali o come ione positivo (K^+) molto solubile (Sequi, 1993). Nei terreni sabbiosi è facilmente dilavato dalle piogge, mentre nei terreni argillosi è saldamente legato alle particelle del suolo ed è facilmente assorbito dalle piante. In valore assoluto le quantità di potassio assorbito dalle piante eguagliano quelle dell'azoto e superano quelle del fosforo; eppure il potassio non partecipa alla formazione di particolari composti organici, ma si trova nelle cellule come ione libero. L'elemento è essenziale per la vita e le piante ne hanno necessità come macronutriente, sebbene non abbia funzione strutturale né in animali né in piante. È riconosciuta la sua indispensabilità per alcuni processi e funzioni fisiologiche, come il metabolismo dei carboidrati, il bilancio idrico della pianta e lo sviluppo dei tessuti meristematici. Il contenuto di K totale nel suolo è variabile. Nei terreni agrari il contenuto medio è pari all'1,50% p.s., in quelli non coltivati varia dallo 0,15 al 4,00% e nei suoli salini può superare il 7,00% (Allen, 1989).
Calcio - Ca	Il calcio è un metallo alcalino terroso tenero, grigio, usato come agente riducente nell'estrazione mineraria di torio, uranio e zirconio. È il quinto elemento in ordine di abbondanza nella crosta terrestre, ed è essenziale per tutta la vita sulla Terra. Il calcio è il quinto elemento per abbondanza nella crosta terrestre (di cui costituisce il 3%) ed è parte essenziale di foglie, ossa, denti e gusci di conchiglie. A causa della sua reattività chimica con l'acqua, il calcio puro non è reperibile in natura, tranne che in alcuni organismi viventi dove lo ione Ca^{2+} gioca un ruolo chiave nella fisiologia cellulare. Questo elemento metallico si trova in grandi quantità nel calcare, nel gesso e nella

	fluorite, ed è un componente fondamentale di tutte le rocce.
Sodio - Na	Il sodio è un metallo soffice, ceroso, argenteo, reattivo. Appartiene alla categoria dei metalli alcalini che è abbondante nei composti naturali. È altamente reattivo, brucia con una fiamma gialla, si ossida a contatto con l'aria e reagisce violentemente con l'acqua. Come gli altri metalli alcalini, il sodio è soffice, leggero, color bianco argento, reattivo. Non si trova libero in natura. Il sodio galleggia nell'acqua e la riduce rilasciando idrogeno e formando idrossido. Se tritato in una polvere abbastanza fine, il sodio si incendia spontaneamente nell'acqua. Comunque, questo metallo non si infiamma nell'aria sotto i 388 K (114,85 °C) ^[1] .

Oltre agli elementi essenziali e richiesti in quantità elevate dalle piante, nel suolo possono essere presenti elementi richiesti in quantità più basse ed elementi tossici che, in relazione alla loro disponibilità, possono accumularsi nei tessuti vegetali ed essere trasferiti lungo le catene alimentari. Molti di essi sono "**metalli pesanti**", ossia elementi con una densità atomica maggiore di 6 g cm^{-3} . Tra essi vi sono sia elementi biologicamente essenziali come il rame, il ferro, il manganese e lo zinco, sia elementi non essenziali e tossici, come il cadmio, il piombo ed il mercurio. Tra i metalli pesanti, gli elementi essenziali non solo per le piante, ma anche per gli animali, sono richiesti in basse concentrazioni e sono anche conosciuti come "elementi in traccia" o "micronutrienti", mentre i metalli non essenziali, ampiamente conosciuti come "elementi potenzialmente tossici", possono risultare pericolosi anche a basse concentrazioni. In ogni caso, sono tossici per le piante, per gli animali e/o per l'uomo ad elevate concentrazioni (Adriano, 2001).

La funzione di essenzialità negli organismi può essere ricondotta a quattro tipologie:

- 1) Funzione stabilizzatrice (ferro nell'eme e cobalto nella vitamina B12);
- 2) Funzione di struttura (silicio nel tessuto connettivo);
- 3) Funzione ormonale (iodio negli ormoni tiroidei);
- 4) Funzione di cofattore enzimatico (zinco nella carbossipeptidasi e selenio nella glutadione perossidasi).

I principali fattori che influenzano la disponibilità dei metalli nel suolo sono il pH, il potenziale redox, l'attività biologica, la sostanza organica, la quantità e il tipo di argilla e la capacità di scambio cationico. Di seguito sono elencati i metalli pesanti analizzati in questo lavoro, l'eventuale ruolo biologico che essi svolgono e gli effetti tossici che possono esercitare sugli organismi, in particolare sull'uomo.

Tabella 2. Caratteristiche ed eventuale ruolo biologico dei micronutrienti e degli elementi potenzialmente tossici studiati in questa tesi.

Ferro - Fe	Il ferro (Fe) è uno dei metalli più abbondanti nella crosta terrestre, viene prodotto in grandi quantità negli altiforni per riduzione di ossidi di ferro con carbone. Il ferro è un microelemento catalitico indispensabile alla vita dei vegetali perché entra nella costituzione di vari enzimi e perché regola numerosi processi biochimici come la sintesi della clorofilla, la fotosintesi, la respirazione cellulare. Il Fe è uno dei maggiori componenti della gran parte dei suoli. Nel terreno il ferro è contenuto normalmente in quantità soddisfacente nella forma di ione ferrico (Fe^{3+}), ma per essere assimilato ed utilizzato dalla pianta deve essere ridotto nella forma ferrosa (Fe^{2+}). Non è quindi certamente la mancanza di ferro a provocare fenomeni di carenza, quanto quella di forme assimilabili per la vegetazione. Il pH del terreno
-------------------	---

	<p>ha un ruolo assai importante nella disponibilità del ferro. Nei terreni caratterizzati da pH elevato, con un alto contenuto in calcare, non si ha la riduzione dello ione ferrico a ferroso, determinando il mancato assorbimento dell'elemento per insolubilizzazione. Altre cause di Fe-carezza sono da ascrivere a fenomeni di antagonismo da parte dei cationi bivalenti (Ca, Mg, Zn e Cu) che competono nella formazione di complessi, e alla presenza eccessiva di ioni fosfato che provocano l'insolubilizzazione del ferro (Allen, 1989).</p>
Rame - Cu	<p>Il rame (Cu) è uno dei più importanti ed essenziali elementi per piante e animali. Relativamente scarso nella litosfera, si trova, come ione idrato, solo lo ione rameico Cu^{2+}. Tale elemento è associato con la sostanza organica nel suolo, con gli ossidi di ferro e di manganese, con i silicati e altri minerali. I composti rameosi esistono solo come composti insolubili o, in soluzione acquosa, come complessi. Fonti di inquinamento sono i tubi per l'acqua, gli utensili da cucina di rame o ramati, la presenza di industrie del ferro e dell'acciaio, la combustione del carbone e i rifiuti urbani. Il rame è scarsamente tossico per l'uomo e per gli animali, al contrario può risultare tossico anche a concentrazioni basse per le piante. Fonti atmosferiche di Cu al suolo sono riconducibili alla pioggia e alle deposizioni secche. La concentrazione di rame nel suolo è funzione del tipo di suolo, delle caratteristiche del materiale parentale e dell'utilizzo di sostanze contenenti metalli pesanti utilizzate per la difesa antiparassitaria, in particolare contro insetti e funghi infestanti le piante, o per la fertilizzazione, soprattutto con reflui zootecnici. In particolare l'elevato contenuto di rame nelle deiezioni zootecniche è dovuto all'utilizzo di integratori e additivi alimentari che contengono questo elemento.</p>
Zinco - Zn	<p>Lo zinco (Zn) è un elemento non nocivo né per animali né per piante. Le fonti principali di emissione sono il traffico veicolare, le fonderie, gli inceneritori, la combustione del carbone, la preparazione di vernici e gomma, fertilizzanti e pesticidi. La concentrazione di zinco nel suolo è riconducibile in parte a naturali processi di degradazione dei substrati geologici, da cui i suoli stessi traggono origine, in parte è funzione dell'utilizzo di prodotti per la difesa antiparassitaria o per la fertilizzazione. In particolare, l'elevato contenuto di zinco nelle deiezioni zootecniche è dovuto all'utilizzo di integratori e additivi alimentari che contengono questo elemento. L'importanza relativa dei differenti apporti di Zn al suolo (Kiekens, 1995) varia secondo tale ordine: letame (70%) > fall-out atmosferico (25%) > fertilizzanti minerali (4,5%) > compost (0,3%) > fanghi (0,2%). Zn^{2+} sembra essere la forma predominante in cui è assorbito dalle radici delle piante, ma anche lo Zn idratato, diversi altri complessi e lo Zn organico chelato possono essere assorbiti (Kabata-Pendias e Pendias, 1992). I fattori che influiscono sulla disponibilità dello Zn nei suoli sono principalmente il pH, la sostanza organica, l'attività microbica e l'umidità. Altri fattori che giocano un ruolo importante sono anche le condizioni climatiche e le interazioni tra Zn e altri nutrienti a livello del suolo e della pianta. Insieme con Cu, Ni e Cr, lo Zn è fitotossico: eccessive concentrazioni comportano effetti dannosi alle colture e alla fertilità del suolo. Lo Zn può essere considerato, insieme con il Cd, un metallo mobile e biodisponibile, che può essere accumulato nelle colture e quindi entrare nella catena alimentare e raggiungere l'uomo.</p>
Manganese- Mn	<p>Il manganese (Mn) è un elemento largamente rappresentato negli ecosistemi naturali, è estratto in grande quantità e trova importanti applicazioni in molti prodotti industriali. Esso ha origine litogena ed è tra i meno tossici sia per gli animali che per le piante (per queste ultime diviene tossico solamente in suoli acidi). Fonti secondarie possono essere le attività industriali (fonderie, combustione di carbone o petrolio, inceneritori) e l'uso di fertilizzanti. Il contenuto di Mn nel suolo riflette la composizione del substrato pedogenetico ed in esso si trova comunemente come ossido. Gli ossidi di manganese variano nella loro solubilità e ciò può implicare una relazione con la loro capacità di fornire Mn alle radici delle piante. L'assorbimento di Mn da parte delle piante è funzione della concentrazione di questo elemento in forma ionica (Smith, 1995)</p>
Vanadio - V	<p>Il vanadio è un metallo leggero, duttile, di colore argenteo, molto resistente alla corrosione. Il vanadio, come numero di composti chimici che forma, è secondo soltanto al carbonio. La produzione di vanadio è associata a quella di altri metalli, come ferro, uranio, titanio e alluminio. Per la durezza, la resistenza agli acidi e la capacità di formare leghe, il vanadio è utilizzato nella produzione di ferro-vanadio, una lega d'acciaio duro impiegata nella fabbricazione di macchinari e utensili. Il</p>

	<p>vanadio si trova nella crosta terrestre in percentuali stimate dello 0,02%. L'elemento è presente principalmente nel petrolio, nei materiali carboniferi e bituminosi, dove è associato alla frazione pesante. Alcuni depositi petroliferi hanno un alto contenuto dell'elemento.</p> <p>Il contenuto di vanadio nei suoli varia considerevolmente in relazione al tipo di roccia madre che lo origina: le più alte concentrazioni sono state trovate nelle argille e negli scisti. Il vanadio è uniformemente distribuito negli orizzonti del suolo, ma a volte i livelli più elevati si trovano negli orizzonti più superficiali. Le sorgenti naturali di emissione aerea di vanadio sono gli aerosol marini e le polveri continentali, mentre le emissioni vulcaniche danno un contributo modesto. Il vanadio si trova in piccole quantità in tutti i tessuti vegetali a concentrazioni di pochi mg/g p.s. In una determinata specie le variazioni nelle concentrazioni, comunque contenute, dipendono dai livelli di vanadio nel suolo, dall'acidità del suolo e dalle condizioni di crescita. Il contenuto di vanadio è più basso nelle porzioni aeree della pianta e non è generalmente correlato a quello del suolo.</p>
<p>Nichel - Ni</p>	<p>In natura il nichel (Ni) è uno degli elementi più abbondanti. Come gli altri metalli in traccia, anche il nichel è tossico per le piante e gli animali in concentrazioni superiori ai livelli medi di esposizione. Le sorgenti naturali di emissione sono dovute, ad esempio, all'attività vulcanica, agli incendi, allo spray marino, ma più dell'80% delle emissioni di Ni è di origine antropica. La maggiore sorgente antropica è la fusione di combustibili e residui di oli. La concentrazione di nichel nel suolo è funzione delle caratteristiche dei materiali originari (riconducibili a naturali processi di degradazione dei substrati geologici) e dell'utilizzo, per la difesa antiparassitaria o per la fertilizzazione, di sostanze contenenti metalli pesanti. In diversi suoli il Ni, come il Fe e il Mn, può essere accumulato nell'orizzonte B come ossido, mentre in altri il Ni si può accumulare nella lettiera e nell'humus (McGrath, 1995). Questo accumulo in superficie comporta effetti deleteri sull'attività microbica, sulla germinazione dei semi e sulla crescita delle piante (Hutchinson, 1981). Inoltre, la solubilità del Ni aumenta a pH basso.</p>
<p>Piombo - Pb</p>	<p>Il piombo (Pb) è un metallo tossico sia per le piante che per gli animali. Le emissioni di questo elemento sono dovute principalmente al traffico veicolare mentre altre fonti sono le fonderie, le miniere e la combustione di carbone. La concentrazione di piombo nel suolo è riconducibile in parte a naturali processi di degradazione dei substrati geologici, da cui i suoli stessi traggono origine. Fonte primaria di arricchimento della naturale dotazione è però l'attività antropica agricola con l'apporto di composti per la difesa antiparassitaria o per la fertilizzazione con concimi organici, ma anche attraverso processi di fallout atmosferico. Quando il Pb è rilasciato nell'ambiente esso ha un lungo tempo di residenza comparato con gli altri inquinanti. Il Pb tende ad accumularsi nei suoli e nei sedimenti dove, a causa principalmente della sua bassa solubilità e indipendenza dalla degradazione microbica, è altamente biodisponibile (Davies, 1995).</p> <p>Tale elemento si accumula naturalmente nell'orizzonte più superficiale del suolo, mentre per lisciviazione si assiste alla perdita di Pb. Generalmente è stata osservata una relazione positiva tra la concentrazione di Pb nel suolo e quella nella pianta. Diversi parametri del suolo influenzano l'assorbimento di Pb. Tale elemento può influenzare le attività microbiche nel suolo e in tal modo ridurre la produttività, ad esempio inibendo la mineralizzazione dell'azoto e la nitrificazione (Davies, 1995).</p>
<p>Cadmio - Cd</p>	<p>Il cadmio (Cd) è un metallo nocivo per qualsiasi organismo vivente, con sperimentato potere cancerogeno.</p> <p>Le concentrazioni di Cd che normalmente ci sono nell'ambiente non sono causa di tossicità acuta mentre il maggior rischio per la salute umana è rappresentato dall'accumulo cronico nei reni, dove esso può causare varie disfunzioni. Raramente si trova come composto puro, di solito si trova sotto forma di CdS e CdCO₃. Molto ricche di Cd sono le miniere di piombo, zinco e ferro; esso è ritrovato come coprodotto quando questi minerali sono processati. Fonti di inquinamento sono gli inceneritori, i depositi di rifiuti, il fumo di sigaretta, le industrie chimiche o petrolchimiche, siderurgiche, la combustione del carbonio, i settori della galvanoplastica, delle vernici e dei coloranti (Alloway, 1995). La concentrazione di cadmio nel suolo è funzione delle caratteristiche dei materiali originari e dell'utilizzo di prodotti agricoli contenenti metalli pesanti, utilizzati per la difesa antiparassitaria o per la fertilizzazione (concimi fosfatici, fanghi di</p>

	depurazione, pesticidi). Il Cd si trova normalmente concentrato negli orizzonti più superficiali ma, diversamente da Cu e Pb, il Cd (insieme a Zn e Ni) ha una tendenza a penetrare lungo il profilo sebbene l'estensione e la percentuale dipendano da varie proprietà del suolo (Kabata-Pendias e Pendias 1992).
--	--

La disponibilità di elementi nel suolo dipende anche dalla loro speciazione chimica e il conoscere le diverse forme o specie chimiche in cui è presente un elemento, permette di ottenere informazioni circa la sua reale biodisponibilità e tossicità. Mentre la speciazione fisica fa riferimento alla distribuzione di un elemento tra forme solubili, colloidali o particolate, quella chimica fa riferimento alla distribuzione tra varie e distinte specie chimiche in soluzione, comprendendo sia la distinzione tra metallo complessato e libero, ma anche tra i suoi diversi stati di ossidazione. La somma delle concentrazioni delle varie forme dà la concentrazione totale, ma la determinazione della sola concentrazione totale del metallo non fornisce informazioni circa la sua effettiva biodisponibilità e la sua interazione con il suolo, i sedimenti, le particelle in sospensione, ecc.

2. Gli agroecosistemi

Per **agroecosistema** (Fig. 5) si intende un ecosistema supportato dall'uomo per fornire prodotti agricoli di buona qualità: essi coprono circa il 40% della superficie terrestre e differiscono radicalmente in come essi sono gestiti (Power, 2010).

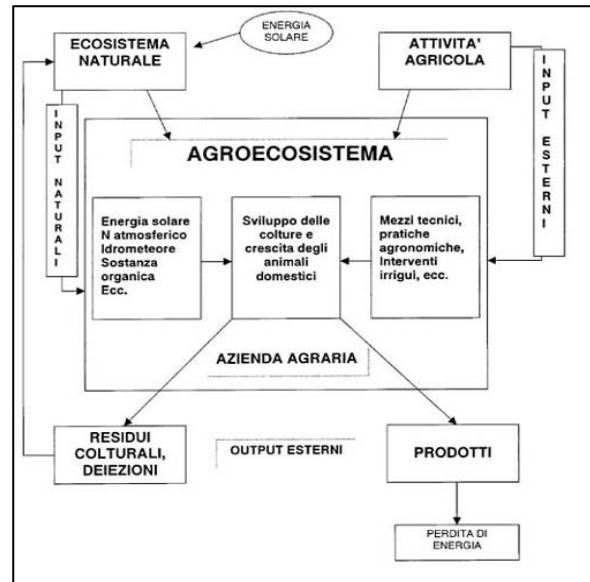


Fig. 5. Relazioni all'interno di un agroecosistema

Il compito fondamentale dell'agricoltura è di provvedere ad un progressivo incremento di produzione degli alimenti e delle materie prime, in risposta all'aumento della popolazione mondiale. Questa dinamica ha portato ad una sempre più marcata differenziazione tra agroecosistemi ed ecosistemi naturali (tabella 3, Odum, 1969); tuttavia i processi, le strutture e le caratteristiche di un ecosistema naturale possono essere osservate in un agroecosistema.

Tabella 3. Importanti differenze strutturali e funzionali tra ecosistemi naturali ed agroecosistemi.

Fonte: Odum, E.P. 1969, Science

	Ecosistemi Naturali	Agroecosistemi
Produttività netta	Media	Alta
Interazioni trofiche	Complesse	Semplici
Diversità specifica	Alta	Bassa
Diversità genetica	Alta	Bassa
Ciclo dei nutrienti	Chiuso	Aperto
Stabilità (resilienza)	Alta	Bassa
Controllo umano	Indipendente	Dipendente
Permanenza temporale	Lunga	Breve
Eterogeneità di habitat	Complessa	Semplice

Fino agli anni 50' lo sviluppo dell'agricoltura si basava essenzialmente sulla conservazione sostenibile della sostanza organica del suolo attraverso la rotazione delle colture (per esempio l'introduzione di una fase sodiva costituita da una coltura foraggera pluriennale, come l'erba medica) e gli apporti di letame. L'agricoltura convenzionale, a partire dagli anni 50', si è basata sullo sviluppo poderoso della meccanizzazione, sulla stretta dipendenza da input esterni, come ad esempio la disponibilità sempre più larga di concimi minerali e di pesticidi, nonché sull'utilizzo poco razionale di risorse naturali come le acque superficiali e sotterranee, modificando gradatamente la fisionomia ed il funzionamento di base (come ad esempio il ciclo dei nutrienti, figura 6); le lavorazioni sono state attuate con più frequenza e a maggiore profondità, amplificando la fase di mineralizzazione a scapito del processo di umificazione. I contraccolpi ambientali di questo modo di condurre l'agricoltura non hanno tardato a manifestarsi, contribuendo a numerosi problemi come l'inquinamento delle acque (Pimentel et al., 2005; Hayes et al., 2010), la degradazione chimico-fisica dei suoli (Guo et al., 2010; Horrigan et al., 2002), la semplificazione delle comunità biologiche che da esso traggono sostentamento, il potenziale rischio per la salute umana associato con la contaminazione di cibo e acqua (Ward et al., 2010; Winchester et al., 2009; Mattix et al., 2007).

Sulla base dei precedenti cambiamenti ed evidenze, rispetto ad un ecosistema naturale un agroecosistema ha queste principali caratteristiche:

- gli input derivano primariamente da fonti umane e l'energia viene portata fuori dal sistema piuttosto che essere conservata nella biomassa;
- il riciclo dei nutrienti è minimo e considerevoli quantità possono essere perse attraverso la raccolta delle colture, l'erosione e la lisciviazione;
- la diversità biologica è ridotta e la struttura trofica diviene semplificata;
- a causa della riduzione della struttura e della diversità funzionale rispetto ad un ecosistema naturale, gli agroecosistemi hanno molta meno resilienza.

Nel paragrafo 1.1 abbiamo elencato tra le cause di degradazione dei suoli la diminuzione della sostanza organica che ha come effetto la perdita di fertilità del suolo e della sua qualità; le azioni che puntano verso la direzione di un'agricoltura sostenibile ed ecologicamente compatibile non possono prescindere da pratiche agricole che prevedono il ripristino della sostanza organica del suolo, soprattutto in aree dove il depauperamento della SOM rischia di compromettere irreversibilmente la sua qualità. L'interramento di residui organici, provenienti da fonti differenti, può rappresentare sicuramente una strategia volta a chiudere, il più possibile, il ciclo della materia e dei nutrienti ed avvicinando le caratteristiche di un agroecosistema a quelle di un ecosistema naturale.

Naturalmente è fondamentale studiare gli effetti sul sistema suolo di ripetuti ammendamenti nel tempo e, sulla base di questo, una più profonda conoscenza dei fondamenti biologici che regolano il funzionamento degli agroecosistemi può permettere una migliore gestione di essi ed una sostenibilità delle pratiche agricole, rispetto anche alla mitigazione dei cambiamenti climatici, così come previsto dal protocollo di Kyoto.

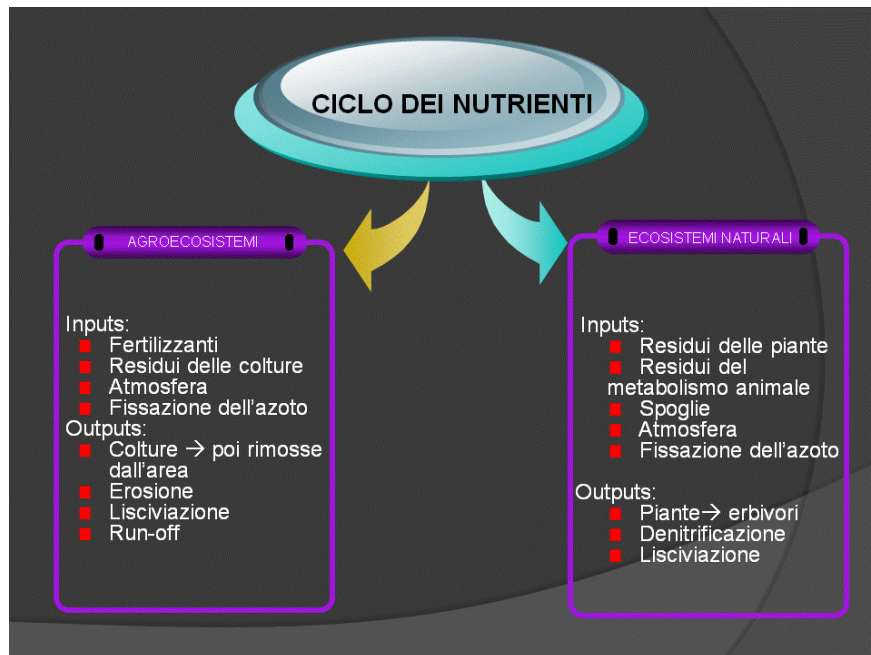


Fig. 6. Ciclo dei nutrienti in un ecosistema naturale ed in un agro-ecosistema.

3. Il compost ed il processo di compostaggio

L'aumento del recupero di tutte le frazioni dei rifiuti solidi urbani è ormai un dato consolidato e la frazione organica (F.O.R.S.U.) rappresenta la parte più cospicua del recupero di materia da raccolta differenziata. Il Rapporto "Rifiuti Urbani 2013" (ISPRA, 2013) evidenzia, tra il 2010 e il 2011, un incremento di 314 mila tonnellate (+7,5%) della raccolta differenziata della frazione organica (umido + verde), che fa seguito alla crescita di oltre 440 mila tonnellate (+11,8% circa) rilevata tra il 2009 e il 2010. Tra il 2011 e il 2012, in base ai dati preliminari elaborati da ISPRA, si rileva un ulteriore incremento di 307 mila tonnellate (+6,8%), che porta il dato nazionale di raccolta dell'organico a un valore superiore a 4,8 milioni di tonnellate; parallelamente si è assistito anche all'incremento dell'impiantistica per il trattamento di tale frazione (Centemero, 2012).

Il compostaggio è un processo aerobico di decomposizione biologica della sostanza organica che avviene in condizioni controllate (Keener et al., 1993) e che permette di ottenere un prodotto biologicamente stabile in cui la componente organica presenta un elevato grado di evoluzione.

Il termine "compost" deriva dal latino *compositum*, cioè miscelato: infatti, all'origine del processo del compostaggio c'è quasi sempre la miscelazione di scarti diversi, che possono derivare sia dall'attività agricola che da altri settori (rifiuti domestici, urbani, industriali, ecc.).

L'utilizzo del compost è regolato dal D.Lgs. 75/2010 che descrive, nell'allegato 2, le tipologie di ammendanti e quali caratteristiche chimico-fisiche e biologiche essi devono avere: lo stesso decreto legislativo, all'articolo 2, comma 1, lettera z, definisce **ammendante** *"i materiali da aggiungere al suolo in situ, principalmente per conservarne o migliorarne le caratteristiche fisiche o chimiche o l'attività biologica, disgiuntamente o unitamente tra loro, i cui tipi e caratteristiche sono riportati nell'allegato 2"*.

Tra gli ammendanti riportati nell'allegato 2 vi sono l'ammendante compostato verde (**ACV**) e l'ammendante compostato misto (**ACM**): il primo è ottenuto a partire da rifiuti organici che possono essere costituiti da scarti di manutenzione del verde ornamentale, sanse vergini (disoleate o meno) od esauste, residui delle colture e altri rifiuti di origine vegetale, mentre l'ACM deriva da F.O.R.S.U., da rifiuti di origine animale, compresi liquami zootecnici, da rifiuti di attività agroindustriali e da lavorazione del legno e del tessile non trattati, da reflui e fanghi nonché dalle matrici utilizzate per la produzione dell'ACV; entrambe le tipologie di ammendanti compostati, per poter essere impiegate in agricoltura, devono rispettare i requisiti previsti dall'all. 2 del D.Lgs. 75/2010.

L'attività biologica dei microrganismi presenti nei rifiuti organici è l'elemento imprescindibile di tutto il processo di compostaggio: la fase fondamentale consiste nella decomposizione, in condizioni controllate di temperatura, umidità e ossigeno, delle molecole organiche da parte di batteri e funghi, con demolizione delle sostanze originarie e formazione di molecole più o meno complesse, più stabili e a loro volta ulteriormente degradabili, soprattutto nelle condizioni dell'ambiente edafico. Questo processo è il risultato di numerosissime reazioni biochimiche diverse che si svolgono più o meno contemporaneamente e che sono condizionate dalla disponibilità di substrati, prodotti da altre reazioni.

Il processo biologico di compostaggio avviene in quattro stadi:

- Fase psicrofila, di innesco delle reazioni, definita anche tempo di latenza;
- Fase mesofila di accelerazione della reazione con aumento della temperatura complessiva, caratterizzata da una intensa attività biologica che permette di ottenere la maggiore resa in molecole organiche complesse ad alto valore di fertilizzante;
- Fase termofila di massima attività batterica, con il raggiungimento di temperature molto elevate, che consentono l'inattivazione dei semi di infestanti e degli organismi patogeni per le piante, gli animali e l'uomo eventualmente presenti;
- Fase mesofila post-termofila, o di raffreddamento, in cui si ha una decelerazione delle reazioni di ossidazione per l'esaurimento di composti organici labili e l'accumulo di cataboliti

Il processo di compostaggio, in sintesi, si compone essenzialmente di due fasi:

- **bio-ossidazione**, nella quale si ha l'igienizzazione della massa: è questa la fase attiva (nota anche come high rate, active composting time), caratterizzata da intensi processi di decomposizione delle componenti organiche più labili;
- **maturazione**, durante la quale il prodotto si stabilizza arricchendosi di molecole umiche: si tratta della fase di cura (nota come curing phase),

caratterizzata da processi di trasformazione della sostanza organica la cui massima espressione è la formazione di sostanze umiche.

3.1 Elementi potenzialmente tossici nel compost e variazione di disponibilità nel suolo

Come già sottolineato precedentemente, oltre agli elementi nutritivi nel compost possono essere presenti elementi tossici che derivano spesso da una scorretta raccolta della frazione organica dei rifiuti solidi urbani, per la presenza di pile, pellame, vernici, plastiche, carta, cosmetici, medicine e pesticidi (Bardos, 2004).

Gli elementi che generalmente destano preoccupazione sono Zn, Cu, Ni, Cd, Pb, Cr, Hg perché essi possono essere presenti nel compost in quantità più elevate del livello di background del suolo o perché l'aggiunta di sostanza organica al suolo può modificarne la capacità di scambio cationico e quindi la disponibilità degli elementi per le colture. L'accumulo a lungo termine dei metalli nel suolo può avere un'importante conseguenza sulle piante e sui processi microbici, nonché sulla salute dell'uomo (Smith et al., 2009). Nella maggioranza dei casi la concentrazione di metalli pesanti nel compost prodotto dalla frazione organica collezionata separatamente è minore di quella legata a compost prodotto con frazioni organiche separate meccanicamente (Amlinger et al., 2004); inoltre Bardos (2004) mostra che i metalli pesanti sono principalmente associati alla frazione più fine del materiale, cosa che Sharma et al. (1997) notano in cluster molto fini, di diametro minore di 1 mm.

Uno dei principali approcci allo studio del comportamento dei metalli pesanti nel compost è quello di eseguire estrazioni chimiche sequenziali per rimuovere i legami metallici. Molti di questi studi riportano la riduzione dell'estraibilità chimica e della solubilità acquosa dei metalli da residui organici compostati, la cui disponibilità diminuisce con il tempo di maturazione e di compostaggio (Chiang et al., 2001; Eneji et al., 2003). Così, la potenziale lisciviazione dei metalli pesanti dal compost maturo è considerata essere molto bassa (Leita & De Nobili, 1991); Tisdell & Breslin (1995) e Garcia et al. (1995) spiegano questo comportamento con la formazione di stabili complessi humus-metallo durante il processo di compostaggio.

L'aggiunta di compost in suoli contenenti una larga frazione di elementi labili riduce la complessiva biodisponibilità dei metalli per processi di assorbimento e rappresenterebbe così un'efficace tecnica di biorimediazione (Brown et al., 2003, 2004). L'estraibilità dei metalli pesanti può apparentemente diminuire a seguito dell'applicazione del compost in suoli contenenti basse concentrazioni di metalli (Zheljzakov & Warman, 2004b). Tuttavia questo potrebbe derivare dal fatto che anche se i metalli sono presenti in forme relativamente resistenti, essi sono più labili rispetto ai pool di metalli di origine geologica presenti in suoli non contaminati (Smith, 2009). Tipologie differenti di residui organici compostati, con concentrazioni di metalli comparabili, manifestano simili effetti sul comportamento dei metalli nel suolo, a prescindere dall'origine o natura delle materie prime di partenza.

Il pH del suolo ha un ruolo critico nel controllare la disponibilità degli elementi e la diminuzione del pH incrementa la mobilità degli elementi più labili (Smith, 1994a, b): l'applicazione di compost, in questo senso, riduce la biodisponibilità dei metalli, incrementando il valore del pH (Zheljzakov & Warman, 2004b; Jordao et al., 2006).

L'incremento della concentrazione totale di metalli ed il cambiamento della loro disponibilità in suoli ammendati a lungo termine con compost generalmente

determinano un incrementano di concentrazione dei metalli pesanti nei tessuti delle piante cresciute sullo stesso suolo (Gigliotti et al., 1996; Zhao et al., 1997; Wei & Liu, 2005).

4. Obiettivo della ricerca

Il trattamento di suoli agrari poveri di sostanza organica con ammendanti organici come il compost rappresenta, rispetto all'agricoltura convenzionale e ai problemi ad essa collegati, una strategia ad alta valenza ecologica per affrontare contemporaneamente, e secondo criteri di sostenibilità, due problematiche ambientali di grande attualità: da una parte la perdita di fertilità naturale dei suoli agricoli, dovuta al depauperamento della componente organica a causa dello sfruttamento intensivo, dall'altra, l'esigenza sempre più pressante di dare una collocazione ecocompatibile ai rifiuti, in particolare alla frazione organica. Affinché l'impiego del compost in agricoltura come fertilizzante possa essere proposto come una pratica di routine è importante investigare gli effetti a medio e lungo termine della sua applicazione periodica sulle proprietà fisiche, chimiche e biologiche del suolo e sulla qualità delle produzioni agricole. La gestione di prove sperimentali di lunga durata rappresenta una modalità di sperimentazione atta a valutare la sostenibilità di determinate pratiche agricole che, modificando interazioni complesse, tendono ad essere chiaramente comprensibili solo con gli anni (Poulton, 1995).

Grazie alle prove agronomiche a lungo termine è possibile studiare gli effetti di determinati sistemi di gestione su svariati aspetti, quali cambiamenti nelle proprietà chimiche, fisiche, biologiche e sequestro di CO₂ nel suolo, influenza di fattori edafici e climatici sulle piante coltivate, eco-fisiologia delle colture, dinamiche delle popolazioni di piante infestanti o dei patogeni vegetali, conservazione dell'acqua, rischi di inquinamento da nitrati, bilancio energetico ed economico dei sistemi colturali e loro sostenibilità.

Il mio progetto di dottorato ha avuto lo scopo di valutare, nell'ambito di una sperimentazione agronomica pluriennale di fertilizzazione organica con compost:

- la distribuzione della sostanza organica del suolo in pool di diversa stabilità;
- la dinamica dell'azoto con particolare riguardo alla sua immobilizzazione nella biomassa microbica;
- la struttura e l'attività delle comunità microbiche del suolo, attraverso l'analisi di specifici biomarker e la determinazione di specifiche attività metaboliche;
- la disponibilità di nutrienti e di elementi potenzialmente tossici nel suolo a seguito dell'impiego di compost;
- la qualità dei prodotti orticoli con particolare riferimento al contenuto di nutrienti e alla presenza di elementi tossici nella loro porzione edule.

Materiali e metodi

5. Area di studio e disegno sperimentale

La prova di campo è stata condotta presso l'azienda sperimentale del Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura (C.R.A.) - Unità di ricerca per le colture Alternative al Tabacco (C.A.T.) ricadente nel comune di Scafati, all'interno dell'agrocerino-sarnese (figura 7).

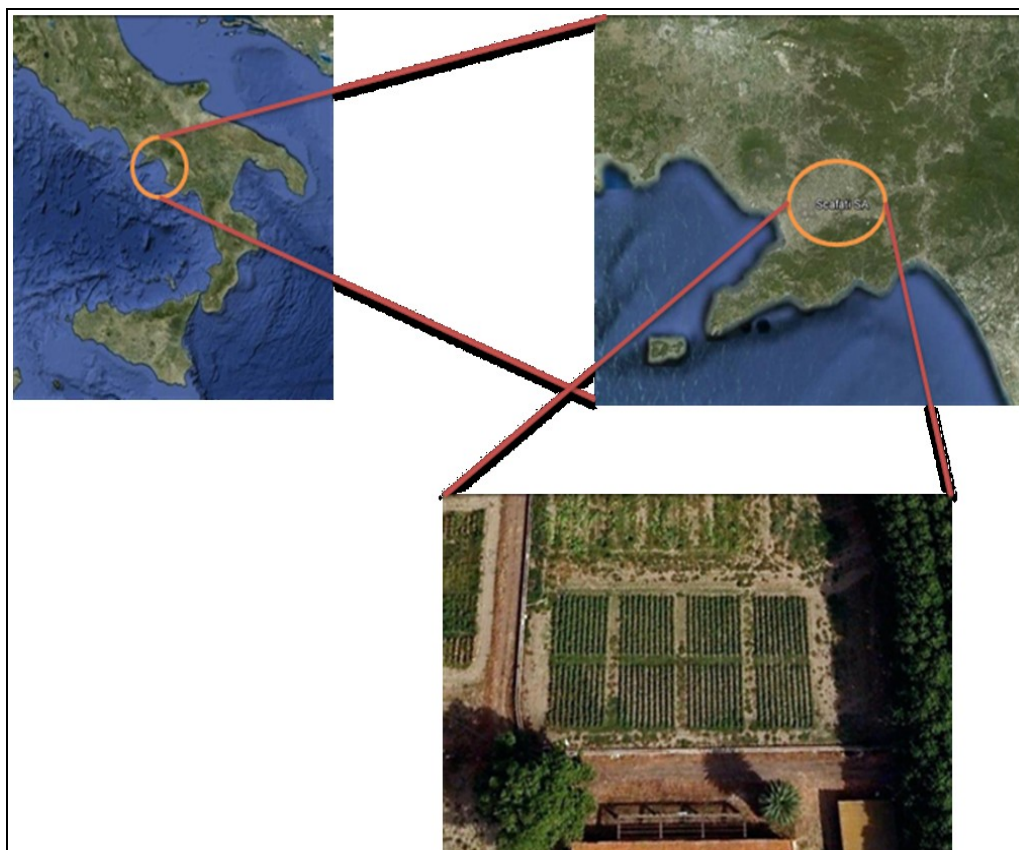


Fig. 7. Area di studio e immagine satellitare del campo sperimentale

La prova è stata condotta su un suolo agrario con tessitura limoso-sabbiosa e, all'inizio dell'esperimento (2007), possedeva le seguenti caratteristiche:

Tessitura	sabbia 45%, limo 50%, argilla 5%
pH	8,0
calcare totale	3,4 %
cond. elettrica	0,34 dS/m
carbonio organico	11 g/kg p.s.
sostanza organica	1.9 % p.s.
N totale	1,5 g/kg p.s.
C/N	7,3
P assimilabile	115 ppm
K scambiabile	758 ppm

Il suolo è stato sottoposto a quattro differenti strategie di fertilizzazione:

- suolo non fertilizzato come controllo (CNT);
- suolo sottoposto a fertilizzazione minerale alla dose ottimale definita in base alla Guida alla Concimazione dalla Regione Campania (2003), per ogni coltura in avvicendamento (MIN);
- suolo fertilizzato con compost proveniente da F.O.R.S.U. (frazione organica dei rifiuti solidi urbani) alla dose annua di 30 t ha⁻¹ di sostanza secca (s.s.) per i primi tre anni e alla dose di 15 t ha⁻¹, come dose di mantenimento, dal quarto anno in poi. (CMP).
- suolo fertilizzato con compost proveniente da F.O.R.S.U. alla dose annua di 15 t ha⁻¹ s.s. integrato con azoto minerale ad una dose pari a 1/2 di quella distribuita nella tesi MIN (CMP+N/2).

Le dosi di compost sono state scelte in base ai risultati emersi in una precedente sperimentazione, in due terreni coltivati ad ortaggi (Morra et al., 2007; Zaccardelli et al., 2007). Il disegno sperimentale è a blocchi randomizzati con quattro parcelle per ogni trattamento. L'aggiunta di compost è stata effettuata sempre prima del trapianto della coltura primaverile-estiva. Dal quarto anno la successione colturale è stata pomodoro San Marzano (ciclo primaverile-estivo) e cipolla Bianca di Pompei (ciclo autunno-vernino) (figura 8a e 8b). I residui della coltura di pomodori sono stati interrati mentre quelli della colture di cipolle sono stati rimossi con la raccolta dei bulbi. Lo schema di campionamento, con le colture ed i periodi di ammendamento, è mostrato in figura 9. I prelievi di suolo sono stati effettuati nello strato 0-30 cm., mediante una trivella, da tre punti di ogni parcella; i tre subcampioni di ogni parcella sono stati mescolati per ottenere un campione medio. I terreni sono stati setacciati con un setaccio a maglie di 2 mm e conservati a 4 °C per le analisi biologiche o essiccati a 75 °C per le analisi chimiche.



Fig. 8a. Coltura primaverile-estiva (pomodoro San Marzano)



Fig. 8b. Coltura autunno-vernina (Cipolla Bianca di Pompei)

L'agroecosistema è stato gestito in modo da limitare il numero di lavorazioni annuali che in genere è così descrivibile: il terreno, ogni anno, in primavera, è stato sottoposto a discissura verticale fino a 50 cm e fresato a 30 cm; successivamente, mediante un passaggio con motocoltivatore a 20 cm, sono stati interrati i concimi o il compost dove previsto. Durante la coltura primaverile-estiva, le lavorazioni del terreno sono state evitate grazie alla sua pacciamatura con teli in Mater-Bi, un monomero brevettato dalla Novamont che parte da amido di mais o patata e oli vegetali (tipo girasole) ed è completamente e realmente biodegradabile. A fine ciclo colturale, i residui colturali sono stati interrati con un'altra fresatura a 20 cm. Per le colture autunno-vernine sono state effettuate un paio di fresature a 20 cm prima del trapianto e durante lo sviluppo della coltura.

5.1 Colture impiegate e tecniche agronomiche di coltivazione

I **pomodori** (*Solanum lycopersicum*, Fam. *Solanaceae* var. San Marzano) sono stati coltivati con pali e fili per allevamento verticale. La dose di concimazione utilizzata nella dose MIN è composta da 175 kg/ha di N, 50 kg/ha di K₂O e 50 kg/ha di P₂O₅, quest'ultimo fornito tutto in pre-impianto, mentre l'azoto ed il potassio sono stati distribuiti in piccola parte in pre-impianto e, successivamente, attraverso circa 10 fertirrigazione localizzata con ali gocciolanti, durante la fase di crescita. Sono state trapiantate 2 piante per m² con una distanza di 1 metro tra i filari e di 50 cm tra le piante della stessa fila. Per il piano di difesa antiparassitaria sono stati utilizzati i

seguenti principi attivi: azadiractina contro l'attività nematostatica, rame, cyproxanil, mandipropamide e azoxistrobina contro la peronospora e imidacloprid, indoxacarb e spinosad contro gli afidi ed il lepidottero *Tuta absoluta*.

La **cipolla** (*Allium cepa*, Fam. *Liliaceae*, var. Bianca di Pompei) è stata trapiantata con una densità di 24 piante per m², concimate nella tesi MIN con una quantità di azoto pari a 90 kg/ha fornito come nitrato di ammonico distribuito in 3 interventi in copertura: il 20% una settimana prima del trapianto, il 40% a metà gennaio e il restante 40% a metà febbraio. Interventi di diserbo sono stati effettuati con pendimetalin, ioxinil e fluozilop-parabutile. Gli interventi di sarciatura sono stati effettuati a mano.

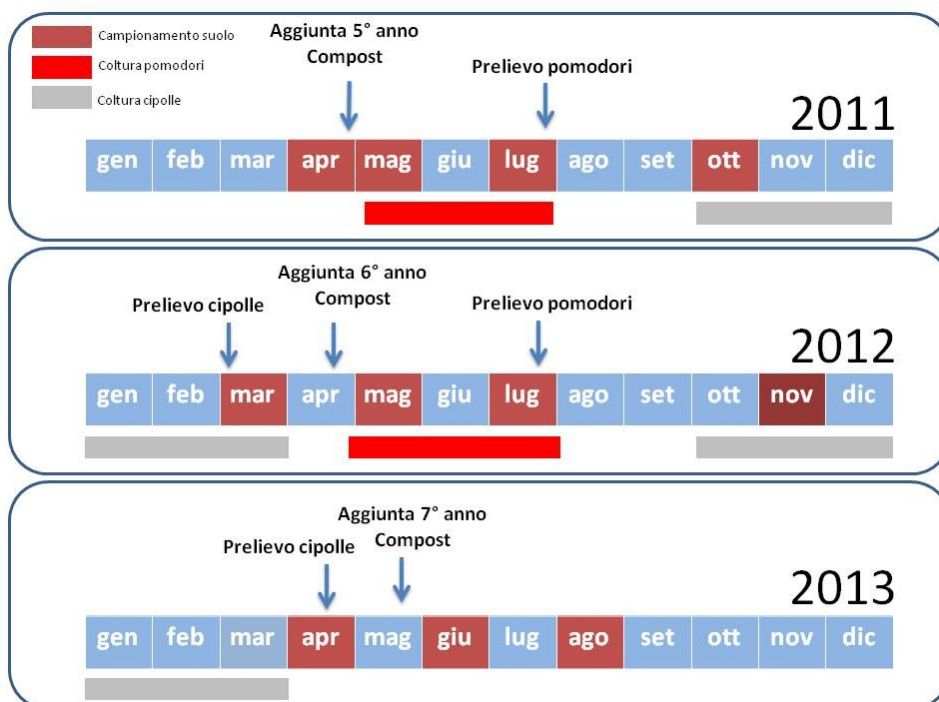


Fig. 9. Schema di campionamento

Il compost impiegato per la sperimentazione è di qualità certificata secondo i parametri previsti dal D. lgs. 75/2010, ed è stato ottenuto dalla frazione organica dei rifiuti solidi urbani (F.O.R.S.U) proveniente dalla raccolta differenziata degli scarti alimentari e da ramaglia derivante da potatura del verde urbano, in rapporto 1:1. Nella successiva tabella sono descritte le principali caratteristiche del compost impiegato:

pH	7,9
C organico	28 % p.s.
acidi umici e fulvici	14,2 % p.s.
N totale	2,1 % p.s.
N organico	2 % p.s.
P ₂ O ₅	0,8 % p.s.
K ₂ O	1,8 % p.s.
C/N	13,3
salinità	53 meq/100 g
metalli pesanti	nei limiti

6. Attività biologiche e comunità microbiche del suolo

6.1 Biomassa microbica

La biomassa microbica è stata valutata attraverso il metodo della fumigazione con cloroformio ed estrazione del carbonio e dell'azoto microbico (Vance et al, 1987). 4 grammi di suolo fresco precedentemente setacciato sono stati posti in capsule di vetro, portati al 55% della capacità idrica massimale (previamente determinata per gravimetria) e posti in un essiccatore di vetro contenente un becker con 50 ml di cloroformio purificato con acido solforico. Dopo aver sigillato il bordo dell'essiccatore, all'interno è stato creato il vuoto per permettere all'atmosfera di saturarsi di vapori di cloroformio. Dopo qualche minuto l'essiccatore è stato coperto e lasciato al buio per 24 ore. Contemporaneamente sono state preparate un egual numero di subcampioni di suolo non sottoposti al trattamento di fumigazione con cloroformio: tali subcampioni sono stati sottoposti a estrazione mediante agitazione per 30 minuti in una soluzione di solfato di potassio 0,5 M. Al termine delle 24 h anche i suoli sottoposti a fumigazione sono stati sottoposti a estrazione in solfato di potassio con le stesse modalità descritte per i suoli non fumigati. Gli estratti sono stati analizzati con il TOC/TN analyzer (Shimadzu, TOC-V_{CHS}, TNM-1) per la determinazione del carbonio e dell'azoto. L'analizzatore di carbonio organico totale (TOC) è a combustione catalitica con catalizzatore a platino e detector a infrarosso. Prima dell'analisi della soluzione sono stati allontanati carbonati e bicarbonati aggiungendo acido cloridrico e flussando aria ultrapura. Il carbonio della biomassa microbica è stato calcolato come $C_{mic} = E_c/K_C$, dove E_c è uguale alla differenza tra carbonio organico estratto dai suoli fumigati ed il carbonio organico estratto dai suoli non fumigati, mentre K_C è un fattore di conversione uguale a 0,45 (Joergensen et al., 2011); l'azoto microbico è stato calcolato come $N_{mic} = E_n/K_N$, dove E_n è la differenza tra l'azoto estratto dai suoli fumigati e l'azoto estratto dai suoli non fumigati e K_N è un fattore di conversione uguale a 0,54 (Brookes et al., 1985).

6.2 Respirazione microbica

La respirazione microbica del suolo è stata determinata come emissione di CO₂. 4 g di terreno fresco, idratato al 55% della sua capacità idrica massimale, sono stati posti in vials di vetro che sono state sigillate ermeticamente con tappi di butile e ghiere in alluminio. I campioni sono stati incubati per 48 ore a 25°C al buio. Al termine dell'incubazione la concentrazione di CO₂ nello spazio di testa è stata misurata per gascromatografia, utilizzando un Agilent Technologies 6850, Network GC System, dotato di TCD (Thermal Conductivity Detector) e di colonna capillare HP-PLOT Q (lunghezza = 30 m; diametro interno = 0,32 mm). Come carrier è stato utilizzato elio; la temperatura del forno è stata costantemente mantenuta a 50°C; la temperatura del detector è stata impostata a 250°C, mentre la temperatura di iniezione a 200°C; il flusso in colonna è stato impostato a 2,5 ml/min. Per evitare l'interferenza da parte del vapore acqueo eventualmente presente, il campione di aria è stato preriscaldato nella valvola di iniezione a 150°C. La concentrazione di CO₂ è stata espressa come µg di CO₂ per grammo di peso secco (p.s.), per unità di tempo.

6.3 Attività idrolasica totale

L'attività idrolasica totale è stata determinata attraverso l'idrolisi del diacetato di fluoresceina (Schnürer & Rosswall, 1982). Campioni di terreno del peso fresco di un grammo sono stati posti in vials di vetro da 35 ml a cui sono stati aggiunti 6 ml di tampone fosfato 0,1 M a pH 7.6 e 0,1 ml di substrato, preparato sciogliendo il diacetato di fluoresceina in acetone (2 mg ml⁻¹). Le analisi sono state effettuate su due repliche per ogni parcella e inoltre, per ognuno dei quattro trattamenti sperimentali, è stato preparato un bianco costituito da 1 g di una miscela del terreno delle quattro repliche di campo a cui è stato aggiunto solo il tampone. I campioni e i bianchi sono stati incubati a 25 °C per due ore, al buio e in agitazione.

Terminata l'incubazione è stata aggiunto il substrato ai bianchi e la reazione è stata bloccata aggiungendo 6 ml di acetone a tutti i campioni. Questi, dopo essere stati agitati con un vortex, sono stati centrifugati a 5000 giri per 5 minuti e, dopo aver filtrato il surnatante, è stata letta l'assorbanza della fluoresceina a 490 nm per via spettrofotometrica.

6.4 Attività β-glucosidasica

L'attività β-glucosidasica è stata determinata attraverso il protocollo messo appunto da Rodríguez-Loinaz et al. (2008). La mix di reazione è composta da 1 grammo di suolo fresco, 1,6 ml di tampone MUB (Modified Universal Buffer) 20 mM a pH 6,0 e 0,4 ml di substrato di reazione, il 4-nitrofenil β-D-glucopiranoside (1.5% wv⁻¹). La mix di reazione è stata incubata per 1 h a 37 °C al buio, in agitazione. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati raffreddati rapidamente a 4°C per qualche minuto e sono stati aggiunti 0,4 ml di CaCl₂ 0,5M, 1,6 ml di NaOH 0,5 M e 6 ml di acqua distillata. I campioni sono poi stati centrifugati a 5000 rpm per 5 minuti e filtrati ed è stata misurata per via spettrofotometrica l'assorbanza a 398 nm.

6.5 ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

L'estrazione e la purificazione del DNA è stata ottenuta da 250 mg di suolo essiccato all'aria mediante l'uso del kit commerciale Power Soil DNA isolation Kit (MO.BIO.) seguendo le istruzioni riportate sul manuale fornito dalla ditta. I DNA estratti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% insieme al DNA genomico di Fago lambda (Fermentas – Milano) a concentrazione nota (λ 25 ng, λ 50 ng, λ 75 ng). La concentrazione e il grado di purezza (rapporto tra l'assorbanza a 260 e 280 nm) dei DNA estratti sono stati valutati, inoltre, attraverso lo spettrofotometro UV/visibile "Picopet01" (Picodrop - UK). Il DNA è stato sottoposto ad amplificazione in PCR in un termocicizzatore ABI 9600 (Applied Biosystem) utilizzando il seguente programma di amplificazione: un ciclo di 3 minuti a 94°C; 30 cicli di 45 secondi a 94°C, 1 minuto a 55°C e 2 minuti a 72°C; un ciclo di estensione finale a 72°C per 10 minuti. I primer utilizzati nella reazione di amplificazione sono ITSF (5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3'), marcato con il fluorocromo Hex all'estremità 5', e ITSReub (5'-GCCAAGGCATCCACC-3'). Successivamente, 3 μ l di prodotto di amplificazione sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1,5%. A 2 μ l di campione sono stati aggiunti 2 μ l di Formammide e 1 μ l di marcatore di peso molecolare ROX 500. I campioni così preparati sono stati denaturati a 95°C per 10 minuti e trasferiti velocemente in ghiaccio per altri 10 minuti. I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante corsa elettroforetica capillare su sequenziatore automatico (Applied Biosystem ABI 310 Genetic Analyzer), dotato di capillare lungo 47 cm e polimero di separazione POP4 (Applied Biosystem), applicando i seguenti parametri di corsa: 5 secondi di iniezione a 15000 Volts e 45 minuti di corsa elettroforetica. L'elettroferogramma è stato interpretato grazie al software dedicato Gene Mapper v.3.7, che permette di determinare l'esatta dimensione dei frammenti sottoposti a corsa elettroforetica, mediante il confronto con il marcatore ROX500. L'analisi dei picchi è stata effettuata escludendo i frammenti con peso molecolare inferiore a 50 bp.

7. Carbonio organico del suolo

7.1 Frazionamento chimico attraverso idrolisi acida

La caratterizzazione dei differenti pool di sostanza organica del suolo è avvenuta tramite idrolisi acida (Rovira & Vallejo, 2002; Rovira & Vallejo, 2007). Inizialmente, a 4 grammi di suolo fresco posti in tubi Pyrex sono stati aggiunti 60 ml di H₂SO₄ 2,5 M. I campioni così preparati sono stati agitati e incubati in un bagno termostato a 100 °C per 30 min. Dopo che i campioni si sono raffreddati, i tubi sono stati centrifugati a 3500 rpm/min per 3 min. 10 ml di surnatante sono stati prelevati dai tubi e posti in vials di vetro a 4 °C fino all'analisi. Questo pool idrolizzato è definito come carbonio organico labile (COL). Il rimanente surnatante è stato scartato dai tubi Pyrex ed il residuo solido lavato con acqua deionizzata ed essiccato a 60°C. Successivamente, i tubi contenenti il residuo solido non idrolizzato sono stati addizionati con 4,58 ml di H₂SO₄ 13 M e lasciati tutta la notte su un oscillatore orizzontale. La mattina successiva i tubi sono stati addizionati con 52,56 ml di acqua distillata e posti in un

bagnetto termostato a 100 °C per 3 ore, agitandoli occasionalmente. Dopo averli centrifugati a 3500 rpm/min per 3 min, sono stati prelevati 10 ml di surnatante: questo è il pool di carbonio organico recalcitrante (COR). Il residuo non idrolizzato è stato nuovamente lavato con acqua distillata ed essiccato a 60 °C: il pool di carbonio contenuto in quest'ultimo è definito come carbonio organico stabile (COS). Il carbonio del pool labile e di quello recalcitrante sono stati analizzati mediante TOC analyzer (Shimadzu, TOC-V_{CSH}) mentre il residuo stabile è stato analizzato con un analizzatore elementare CHNS (Carlo Erba 1500). Il carbonio organico totale (COT) è stato calcolato come somma dei tre pools.

8. Nutrienti ed elementi potenzialmente tossici

Le concentrazioni di nutrienti ed elementi potenzialmente tossici sono state misurate sia nelle colture orticole sia nel suolo al termine del ciclo colturale. In particolare per i pomodori sono stati analizzati i frutti mentre per le cipolle sono state analizzate sia le radici che i bulbi. Nel suolo è stata misurata sia la concentrazione totale che la frazione disponibile.

8.1 Preparazione dei campioni

8.2.1 Colture

Le matrici vegetali da analizzare sono state previamente essiccate in stufa a 75 °C per 2 giorni. Successivamente sono state polverizzate manualmente in azoto liquido e poste nuovamente in stufa alla stessa temperatura, fino a peso costante. 250 mg di materiale polverizzato sono stati posti in cilindri di teflon ed il campione è stato mineralizzato tramite aggiunta di acido nitrico (65%) e fluoridrico (50%) nel rapporto 2:1 (v:v), in un fornetto a microonde della Milestone (Digester/Dryng Module mls 1200, Ethos). Lo stesso procedimento è stato applicato per il materiale standard di riferimento "1575a" - *pine needles* a concentrazioni certificate degli elementi.

8.2.2 Concentrazione totale nel suolo

Il suolo, setacciato a 2 mm ed essiccato in stufa con le stesse modalità delle matrici organiche, è stato polverizzato con un mortaio di agata in un mulino polverizzatore Retsch (mod. PM4). Successivamente, 250 mg di ciascun campione di suolo polverizzato e di suolo certificato "NCS DC73321" sono stati sottoposti a mineralizzazione acida in fornetto a microonde con le stesse modalità descritte per il materiale vegetale.

8.2.3 Frazione disponibile nel suolo

Il metodo per la determinazione della frazione disponibile di calcio, magnesio, sodio e potassio prevede l'estrazione con una soluzione a base di bario cloruro (BaCl₂) e

trietanolammina (TEA) a pH 8,1 (Goldberg e Farini, 2004). A 2,5 g di terreno sono stati aggiunti 50 ml della suddetta soluzione ed i campioni sono stati posti in agitazione per 60 minuti e poi filtrati.

La frazione disponibile dei micronutrienti e degli elementi potenzialmente tossici è stata estratta secondo il metodo di Lindsay e Norvell (1978): il metodo prevede l'estrazione dei metalli mediante una soluzione tamponata a pH=7,3 a base di DTPA (acido dietilentriamminopentacetico), cloruro di calcio (CaCl_2) e trietanolammina (TEA). A 25 g di terreno sono stati aggiunti 50 ml di soluzione estraente; i campioni sono stati posti in agitazione per 120 minuti e poi filtrati.

Sia la concentrazione dei nutrienti che quella degli elementi tossici è stata misurata mediante spettrometria ad assorbimento atomico o spettrometria ad emissione ottica (OES) con plasma induttivamente accoppiato (ICP-*Inductively Coupled Plasma*).

I fattori di bioaccumulo (BAF) sono stati calcolati come rapporto tra concentrazione totale del metallo negli organi della pianta e concentrazione totale nel suolo mentre il fattore di traslocazione (TF) è il rapporto tra concentrazione del metallo nelle parti aeree e concentrazione del metallo nelle radici (Bose and Bhattacharyya, 2008) ed è stato calcolato solo per le cipolle visto l'assenza di analisi sulle radici delle piante di pomodoro.

9. Analisi statistica

Per verificare contemporaneamente se i differenti trattamenti hanno avuto un'influenza significativa sulle variabili studiate è stata applicata l'Analisi Multivariata della Varianza, o più semplicemente MANOVA: in particolare, in modo analogo all'ANOVA, è stata applicata la One-Way MANOVA alle concentrazioni degli elementi nella coltura di pomodoro (considerando come fattore principale il trattamento) e la Two-Way MANOVA all'analisi dei parametri chimici e biologici e alla concentrazione totale e disponibile degli elementi nel suolo (considerando come fattori principali il trattamento ed il periodo di campionamento), nonché alle concentrazioni degli elementi nelle radici e nei bulbi di cipolla (considerando come fattori principali il trattamento e l'organo). I dati relativi all'azoto microbico, per il quale abbiamo un numero di misure inferiore rispetto agli altri parametri chimici e biologici, sono stati analizzati mediante Two-Way ANOVA, considerando come fattori principali il trattamento ed il periodo di campionamento. Dove l'interazione è risultata significativa è stata effettuata la One-Way MANOVA, considerando come nuovo fattore l'interazione tra i due fattori principali mentre la molteplicità delle singole ANOVA è stata corretta con la procedura di Benjamini & Hochberg (1995), detta anche FDR (False Discover Rate). Per le variabili risultate statisticamente influenzate dall'interazione è stato effettuato il confronto delle medie attraverso il test post-hoc di Tukey (con $\alpha=0.05$ /numero di variabili significative, attraverso la correzione di Bonferroni). La relazione tra i parametri biologici e quelli chimici è stata saggiata mediante analisi dei coefficienti di correlazione di Pearson mentre la normalità delle variabili è stata valutata attraverso il test di Shapiro-Wilk ($\alpha = 0.05$); le variabili non normali sono state trasformate mediante logaritmo in base dieci. Le sopracitate analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software open-source R (version 3.0.1) mentre i grafici sono stati costruiti attraverso l'utilizzo del software SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc). Il *non metric multidimensional scaling method* (NMDS) è

applicato ai dati di presenza/assenza dell'analisi ARISA, utilizzando come distanza l'indice di dissimilarità di Jaccard.

Risultati

10. Parametri chimici e biologici

I risultati della MANOVA, effettuata utilizzando i dati di tutti i parametri chimici e biologici, ad eccezione dell'azoto microbico, per il quale erano disponibili un minor numero di osservazioni avendo cominciato a misurare questo parametro successivamente, mostrano come l'effetto del trattamento, del periodo di campionamento e della loro interazione sia significativo:

Fattore	Parametri chimici e biologici
Trattamento	p<0.001
Tempo	p<0.001
Trattamento*Tempo	p<0.001

10.1 Biomassa e respirazione microbica

Il carbonio microbico (figura 10a), indice della biomassa microbica, in tutti i campionamenti, ha valori mediamente più alti nelle parcelle CMP con un incremento significativo ($p<0,0065$) rispetto a CNT e MIN a maggio 2012. L'aggiunta di compost determina un incremento del carbonio microbico del 174 e del 91% per CMP e del 124 e 60% per CMP+N/2 (tabella 4a) a maggio del 2012 e a giugno del 2013 rispettivamente dopo il 6° ed il 7° ammendamento. Invece ad aprile 2011, dopo il 5° ammendamento, si assiste solo ad un minore incremento di carbonio microbico nelle parcelle a fertilizzazione organica (66%), mentre nelle parcelle a fertilizzazione mista vi è addirittura un decremento rispetto alle parcelle controllo. Ros et al. (2006) hanno riscontrato un aumento significativo (+40%), rispetto al controllo, del carbonio microbico misurato dopo 13 anni di ripetuti ammendamenti rispetto alle condizioni iniziali. I valori di azoto microbico (figura 10b) riscontrati in CMP e CMP+N/2 sono significativamente più alti rispetto a CNT e MIN ($p<0,05$) e gli incrementi maggiori si hanno subito dopo il 6° ed il 7° ammendamento. L'azoto microbico non è influenzato significativamente dall'interazione tra trattamento e periodo di campionamento ($p=0,12$) mentre è significativamente influenzato da entrambi i fattori considerati singolarmente. Chang et al. (2007) hanno trovato un incremento lineare del numero di batteri, attinomiceti e funghi dopo tre anni di ammendamento con differenti dosi di compost, con valori due-tre volte maggiori per la dose più alta rispetto al controllo non fertilizzato, mentre nessun effetto è stato evidenziato rispetto alla fertilizzazione minerale. Anche la respirazione microbica (figura 10c), nella maggior parte dei campionamenti risulta mediamente più alta nelle parcelle CMP e CMP+N/2 con i valori assoluti e gli incrementi più elevati a giugno 2013, dopo il 7° ammendamento (tabella 4c) e risulta essere significativamente più alta in CMP+N/2 rispetto a CNT e MIN a maggio 2012 e in CMP e CMP+N/2 rispetto a CNT e MIN a giugno 2013. Valori elevati di respirazione microbica, indipendentemente dai trattamenti, si osservano ad ottobre 2011 e a novembre 2012: ciò potrebbe essere dovuto ad un aumento dell'attività microbica del suolo successivamente all'interramento di materiale vegetale fresco, rappresentato in particolare dai residui colturali delle piante di pomodoro, effettuato nei giorni precedenti il trapianto della coltura autunno-

vernina. Sánchez-Monedero et al., 2008 mostrano come l'aggiunta al suolo di residui vegetali freschi provochi un consistente incremento di evoluzione di CO₂ nei primi 15-20 giorni, che è compatibile con il periodo di tempo intercorso tra l'interramento dei residui della coltura di pomodoro e il campionamento del nostro esperimento.

L'incremento della biomassa e del catabolismo microbico dopo l'ammendamento con il compost può essere attribuito all'incorporazione di risorse trofiche rappresentate da un'ampia varietà di composti organici labili derivati dal compost che stimolano la comunità microbica autoctona (Saison et al., 2006).

Tabella 4. Incremento (espresso in %) del carbonio (a), dell'azoto (b) e della respirazione microbica (c) nelle parcelle fertilizzate rispetto alle parcelle controllo nel periodo di studio considerato.

a)

	apr.11	mag.11	lug.11	ott.11	mar.12	mag.12	lug.12	nov.12	apr.13	giu.13	ago.13
MIN	5	0	0	0	0	19	1	0	0	10	0
CMP	47	66	63	35	48	174	68	30	25	91	71
CMP+N/2	30	0	29	0	52	124	50	15	34	60	28

b)

	lug.11	mar.12	mag.12	lug.12	nov.12	apr.13	giu.13	ago.13
MIN	16	3	177	8	7	<0	2	0
CMP	89	125	316	76	31	41	153	84
CMP+N/2	85	67	266	26	48	72	93	35

c)

	apr.11	mag.11	lug.11	ott.11	mar.12	mag.12	lug.12	nov.12	apr.13	giu.13	ago.13
MIN	0	32	0	19	3	0	20	0	13	2	6
CMP	30	149	41	30	46	56	31	13	55	127	44
CMP+N/2	26	51	18	72	70	95	53	37	28	92	19

10.2 Attività Idrolasica Totale ed Attività β -glucosidasi

L'attività idrolasica totale mostra, per tutti i periodi di campionamento, valori mediamente più alti nelle parcelle fertilizzate con compost (figura 11a), rispetto alle parcelle controllo e a fertilizzazione minerale: in particolare, tale aumento risulta essere significativo ($p < 0,0065$) in CMP e CMP+N/2 rispetto a MIN e CNT ad aprile 2011, in CMP rispetto a CNT e MIN a marzo e maggio 2012 e a giugno 2013, e in CMP rispetto a CNT a maggio 2011. L'incremento percentuale (tabella 5a) rispetto alle parcelle controllo varia tra il 37 e il 115% in CMP e tra il 4 ed il 64% in CMP+N/2. Il differente incremento tra le parcelle a fertilizzazione organica e quelle a fertilizzazione mista, dopo l'aggiunta della stessa quantità di compost (15 t/ha), è probabilmente dovuta alla maggior quantità di sostanza organica presente nelle parcelle CMP per effetto dei primi tre anni di sperimentazione quando la dose aggiunta era doppia (30 t/ha p.s) e potrebbe aver migliorato la risposta fisiologica della comunità microbica rispetto alle parcelle CMP+N/2. L'attività degli enzimi idrolitici è regolata dalla presenza di substrato disponibile e facilmente mineralizzabile

dai microrganismi (Burns, 1982) e, pertanto, l'aumento dell'attività idrolasica in determinati periodi di campionamento, in particolare dopo l'aggiunta di compost, rifletterebbe una maggiore disponibilità di composti organici nelle parcelle CMP e CMP+N/2 rispetto alle parcelle CNT e MIN. Si assiste ad una diminuzione, indipendente dai trattamenti, nel periodo estivo ed in quello autunnale (figura 11a) dovuta, probabilmente, alla minore disponibilità di composti organici labili utilizzati prontamente dalla comunità microbica.

Anche l'attività β -glucosidasi, che rispetto all'attività idrolasica presenta un andamento temporale differente, è mediamente più alta nelle parcelle a fertilizzazione organica e a fertilizzazione mista (figura 11b). In particolare i valori risultano significativamente più alti in CMP e CMP+N/2 rispetto a CNT ad ottobre 2011 e a giugno 2013, ed in CMP rispetto a MIN e CNT a marzo 2012. Gli incrementi rispetto alle parcelle controllo (tabella 5b) variano tra il 20 ed il 94% per CMP e tra il 16 ed il 101% in CMP+N/2. In alcuni periodi di campionamento la β -glucosidasi risulta essere incrementata anche nelle parcelle con fertilizzazione minerale come riportato anche da Iovieno et al. (2009) e Yu et al. (2012) rispettivamente dopo tre e dopo diciotto anni di sperimentazione.

Anche se l'ammendante compostato può contenere enzimi, l'incremento delle attività enzimatiche dopo l'aggiunta di compost è attribuita generalmente all'aumento di produzione da parte della comunità microbica del suolo, anziché all'input di enzimi esogeni (Martens et al. 1992). Questi ultimi possono essere assorbiti sulla superficie di particelle minerali argillose o dalla sostanza organica che li protegge dalle proteasi (Burns, 1982).

Tabella 5. Incremento (espresso in %) dell'attività idrolasica totale (a) e della β -glucosidasi (b) nelle parcelle fertilizzate rispetto alle parcelle controllo nel periodo di studio considerato.

a)

	apr.11	mag.11	lug.11	ott.11	mar.12	mag.12	lug.12	nov.12	apr.13	giu.13	ago.13
MIN	0	12	0	12	0	6	1,7	0	10	0	0
CMP	69	59	37	62	83	90	94	63	43	115	70
CMP+N/2	63	26	19	55	64	50	42	51	4	53	47

b)

	apr.1 1	mag.1 1	lug.1 1	ott.1 1	mar.1 2	mag.1 2	lug.1 2	nov.1 2	apr.1 3	giu.1 3	ago.1 3
MIN	3	0	36	32	23	25	1	0	24	6	22
CMP	68	50	87	94	94	40	40	20	78	68	50
CMP+N/ 2	50	24	98	101	37	32	42	16	53	63	37

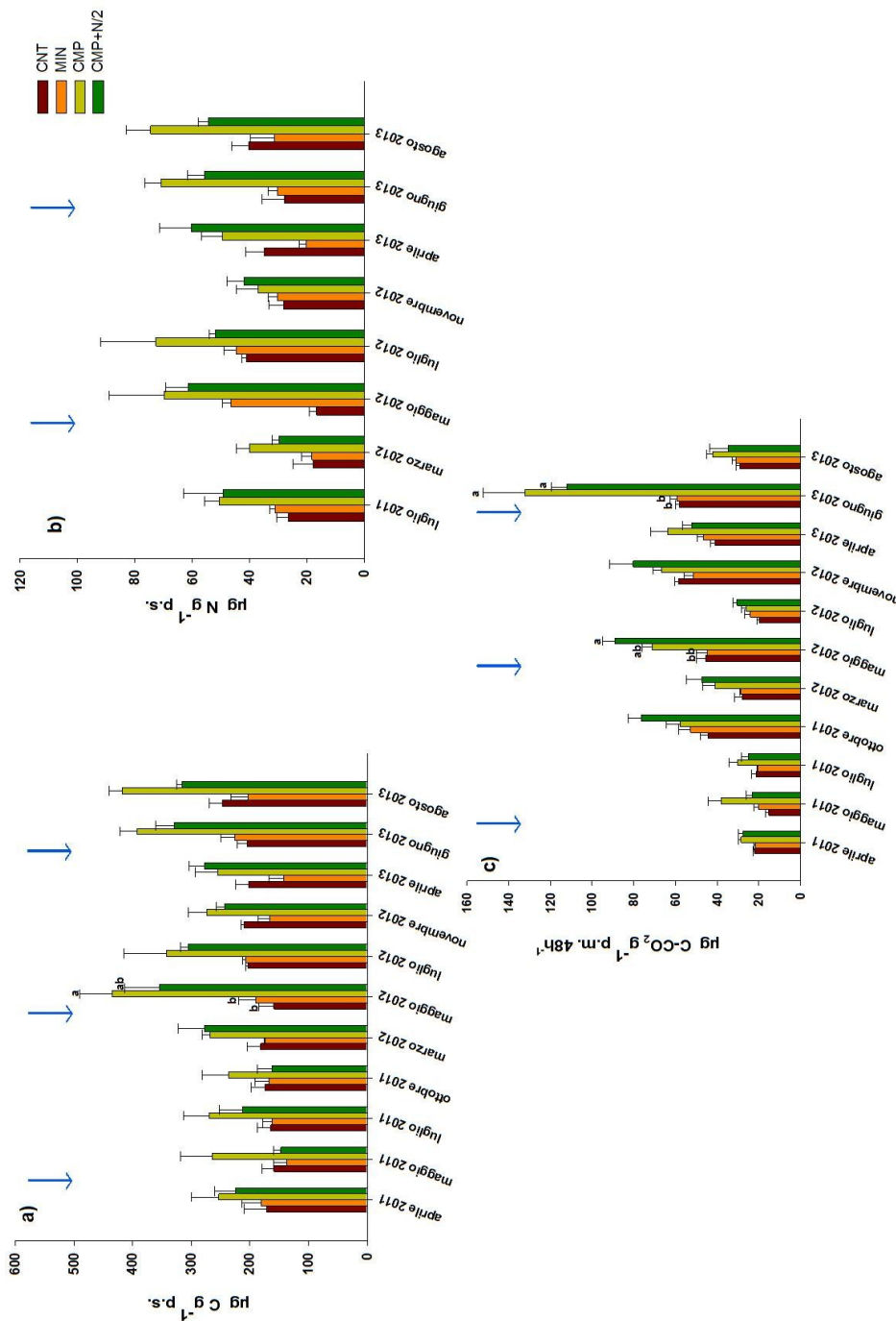


Fig.10 Biomassa microbica del suolo espressa come carbonio (a) ed azoto (b), e respirazione microbica (c). Per il carbonio e la respirazione microbica, all'interno dello stesso periodo di campionamento, lettere differenti indicano differenze significative tra i trattamenti ($p < 0.00625$). Le barre di errore indicano l'errore standard della media. Le frecce indicano i periodi in cui è stato aggiunto il compost.

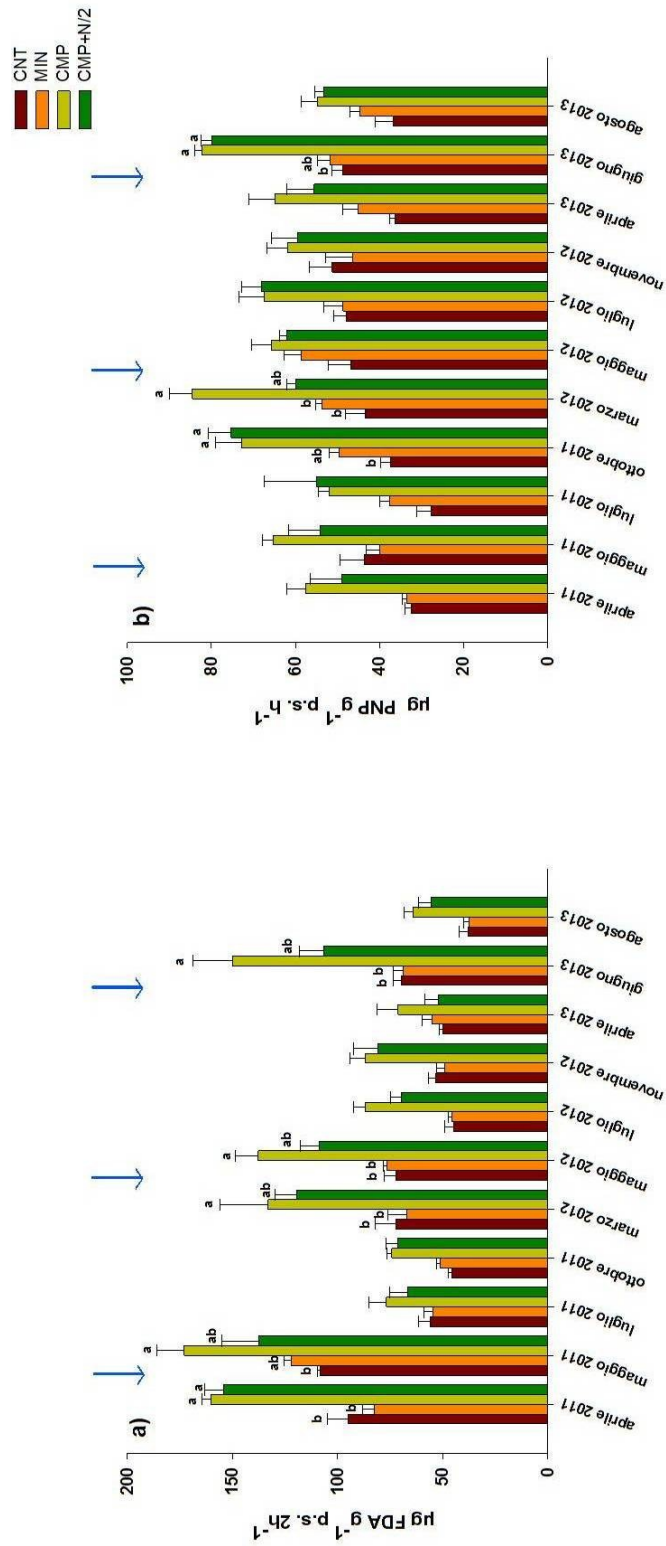


Fig. 11. Attività idrolasica totale (a) e attività β -glucosidasi (b) del suolo. All'interno dello stesso periodo di campionamento, lettere differenti indicano differenze significative tra i trattamenti ($p < 0.00625$). Le barre di errore indicano l'errore standard della media. Le frecce indicano i periodi in cui è stato aggiunto il compost.

10.3 Carbonio organico totale e sua ripartizione in pools a diversa stabilità chimica

Il carbonio organico totale aumenta per tutti i campionamenti in CMP e CMP+N/2 (figura 12), con un incremento medio, nel periodo considerato, del 47,5 e del 34,2% rispetto al controllo (tabella 6). Solo a novembre 2012 e ad aprile 2013 le differenze non sono significative tra le parcelle CMP e CMP+N/2 e le parcelle CNT e MIN. Dopo tre anni di trattamento con il compost proveniente dalla frazione organica dei rifiuti solidi urbani, il carbonio organico è risultato incrementare significativamente rispetto alle parcelle non fertilizzate (Montemurro et al. 2006; Iovieno et al. 2009). Tale incremento risulta essere evidente in Iovieno et al. nelle parcelle a cui sono state aggiunte le più alte dosi di compost (30 e 45 t/ha di sostanza secca).

La maggior parte del carbonio organico è rappresentato dalla frazione stabile (tabella 7), con una percentuale media che varia tra il 59 (in CNT) e il 64% (in CMP) mentre il carbonio labile varia tra il 20 (in CMP) ed il 23% (in CNT) e la frazione recalcitrante tra il 16 (in CMP) ed il 18,1% (in MIN). Questi risultati sono in accordo con altri studi che mostrano come, indipendentemente dall'aggiunta di residui organici, la maggior parte del carbonio organico del suolo sia presente nella frazione non idrolizzata chimicamente, e quindi teoricamente sottoforma di composti stabili e più recalcitranti alla mineralizzazione (Ding et al., 2012; Gonzales-Ubierna, 2012).

Tabella 6. Incremento medio (espresso in %) delle frazioni di carbonio organico e del carbonio organico totale nelle parcelle fertilizzate rispetto alle parcelle controllo nel periodo di studio considerato.

	<i>Labile</i>	<i>Recalcitrante</i>	<i>stabile</i>	<i>Totale</i>
<i>MIN</i>	1,81	2,8	3,8	3,5
<i>CMP</i>	25,1	31,2	60	47,5
<i>CMP+N/2</i>	20,9	23,2	42	34,3

La frazione labile e quella recalcitrante, nella maggior parte dei campionamenti, mostrano valori mediamente più alti nelle parcelle CMP e CMP+N/2 (figura 13a e 13b): per entrambe le frazioni un aumento significativo si ha a giugno 2013 in CMP rispetto a CNT, subito dopo il 7° ammendamento. La frazione stabile, che rappresenta la parte più consistente del carbonio organico totale (figura 13c) aumenta in CMP e CMP+N/2 in tutti i campionamenti, e, in particolare, risulta essere significativamente più alta in CMP rispetto a CNT e MIN ad aprile, maggio ed ottobre 2011, a luglio 2012 e a giugno e agosto 2013.

Gli incrementi medi dei pools di carbonio organico nelle parcelle sottoposte a fertilizzazione rispetto alle parcelle controllo (tabella 6) mostrano come l'incremento di sostanza organica conseguente all'apporto di compost riguardi principalmente la frazione stabile piuttosto che quella labile e recalcitrante: questo incremento può essere attribuito alla resistenza biochimica dei composti organici stabilizzati presenti

nel compost a differenza dei composti labili che sono più facilmente degradabili ed utilizzati dalle comunità microbiche (Lopez-Capel et al., 2008).

Tabella 7. Distribuzione (espressa in % medio) del carbonio organico nei differenti pools.

	Labile	Recalcitrante	Stabile
<i>CNT</i>	23,0	17,0	59,0
<i>MIN</i>	22,3	18,1	59,6
<i>CMP</i>	20,0	16,0	64,0
<i>CMP+N/2</i>	21,0	16,5	62,5

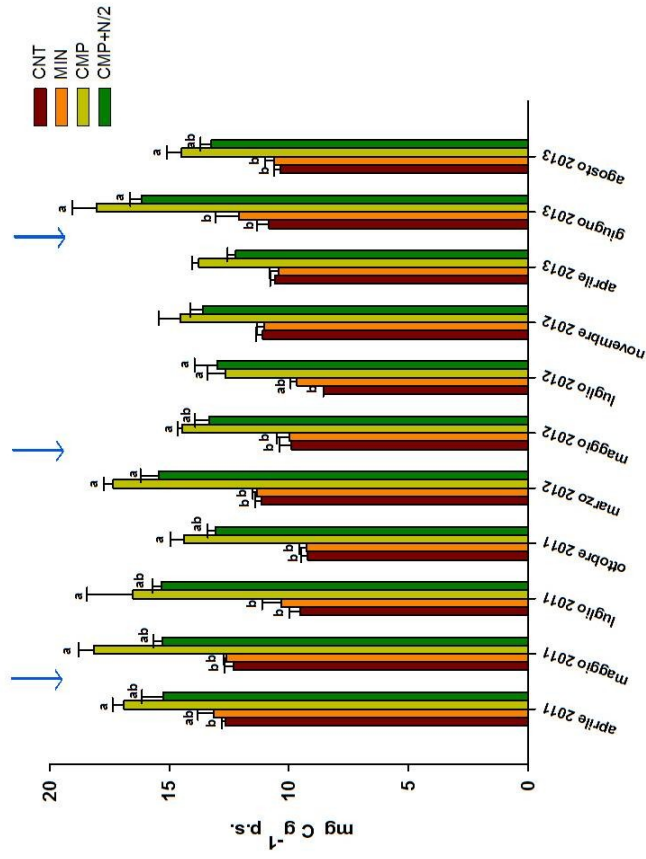


Fig 12. Carbonio organico totale del suolo. All'interno dello stesso periodo di campionamento, lettere differenti indicano differenze significative tra i trattamenti ($p < 0.00625$). Le barre di errore indicano l'errore standard della media. Le frecce indicano i periodi in cui è stato aggiunto il compost.

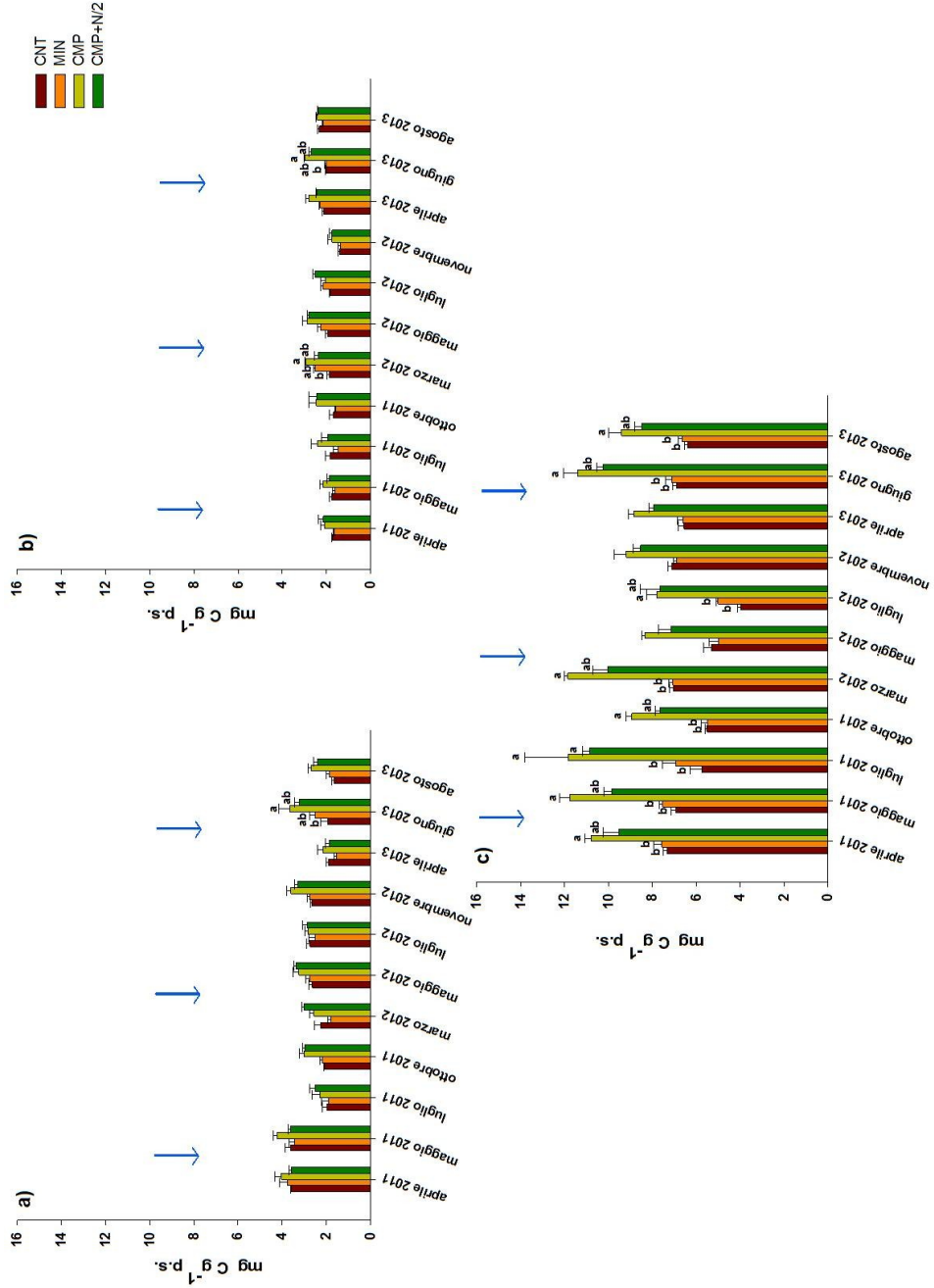


Fig 13. Carbonio Organico Labile (a), Recalcitrante (b) e Stabile (c). All'interno dello stesso periodo di campionamento, lettere differenti indicano differenze significative tra i trattamenti ($p < 0.00625$). Le barre di errore indicano l'errore standard della media, le frecce indicano i periodi in cui è stato aggiunto il compost

10.4 Correlazioni tra i parametri chimici e biologici e sintesi dei risultati

La tabella 8 mostra i coefficienti di correlazione lineari tra i parametri biologici e quelli chimici mentre in figura 14 sono riportati i grafici più significativi (correlazione tra l'attività idrolasica con il carbonio organico labile e quello totale). Quasi tutti i parametri hanno tra di loro (eccetto tra il carbonio organico labile e quello recalcitrante) correlazioni altamente significative: i coefficienti di correlazione più elevati si ritrovano tra l'attività idrolasica ed il carbonio organico labile ($r=0,66$, $p<0,001$), il carbonio organico stabile ($r=0,60$, $p<0,001$) e quello totale ($r=0,70$, $p<0,001$); tra l'attività β -glucosidasi e l'azoto microbico ($r=0,51$, $p<0,001$), la respirazione microbica ($r=0,66$, $p<0,001$), il carbonio organico recalcitrante ($r=0,58$, $p<0,001$) e quello totale ($r=0,54$, $p<0,001$); tra il carbonio microbico, l'azoto microbico ($r=0,74$, $p<0,001$), il carbonio organico recalcitrante ($r=0,50$, $p<0,001$) ed il carbonio organico totale ($r=0,45$, $p<0,001$); tra il carbonio organico totale, quello labile ($r=0,60$, $p<0,001$) e stabile ($r=0,95$, $p<0,001$). La relazione tra contenuto di sostanza organica e alcuni dei parametri biologici monitorati, nel periodo di studio considerato, evidenzia un effetto collegato alle pratiche di gestione del suolo come mostrato recentemente anche da Yu et al. (2012) i quali hanno evidenziato una stretta correlazione tra alcune attività enzimatiche coinvolte nel ciclo del carbonio (tra cui anche la β -glucosidasi) e il contenuto di sostanza organica in un suolo sottoposto a differenti trattamenti di fertilizzazione minerale, organica e mista. Inoltre, questi risultati confermano come l'aumento di sostanza organica abbia un effetto positivo sull'attività microbica del suolo fornendo composti organici da cui essi traggono energia: in particolare, l'alta correlazione tra attività idrolasica totale ed il carbonio labile e tra attività β -glucosidasi e carbonio recalcitrante mostra che in queste due pools di carbonio organico del suolo può esserci la prevalente localizzazione dei substrati di questi enzimi. Queste evidenze confermano che in pieno campo l'attività idrolasica totale abbia come substrato preferenziale composti facilmente degradabili (Schnurer & Rosswall, 1982) mentre l'attività β -glucosidasi abbia come substrato preferenziale polimeri di cellulosa (Caldwell, 2005).

Tabella 8. Coefficiente di correlazione lineare (r) e significatività (p) tra i parametri biologici e chimici.

		ldr	Glu	Cmic	Nmic	Resp	Clab	Crec	Csta	Ctot
ldr	r		0,41	0,26	0,34	0,22	0,66	0,28	0,60	0,703
	p		<0,001	<0,001	<0,001	0,003	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Glu	r			0,47	0,51	0,55	0,21	0,58	0,47	0,54
	p			<0,001	<0,001	<0,001	0,006	<0,001	<0,001	<0,001
Cmic	r				0,74	0,42	0,20	0,50	0,39	0,45
	p				<0,001	<0,001	0,003	<0,001	<0,001	<0,001
Nmic	r					0,29	0,32	0,43	0,36	0,44
	p					<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Resp	r						0,16	0,39	0,25	0,31
	p						0,03	<0,001	<0,001	<0,001
Clab	r							0,05	0,42	0,60
	p							0,47	<0,001	<0,001
Crec	r								0,32	0,41
	p								<0,001	<0,001
Csta	r									0,95
	p									<0,001

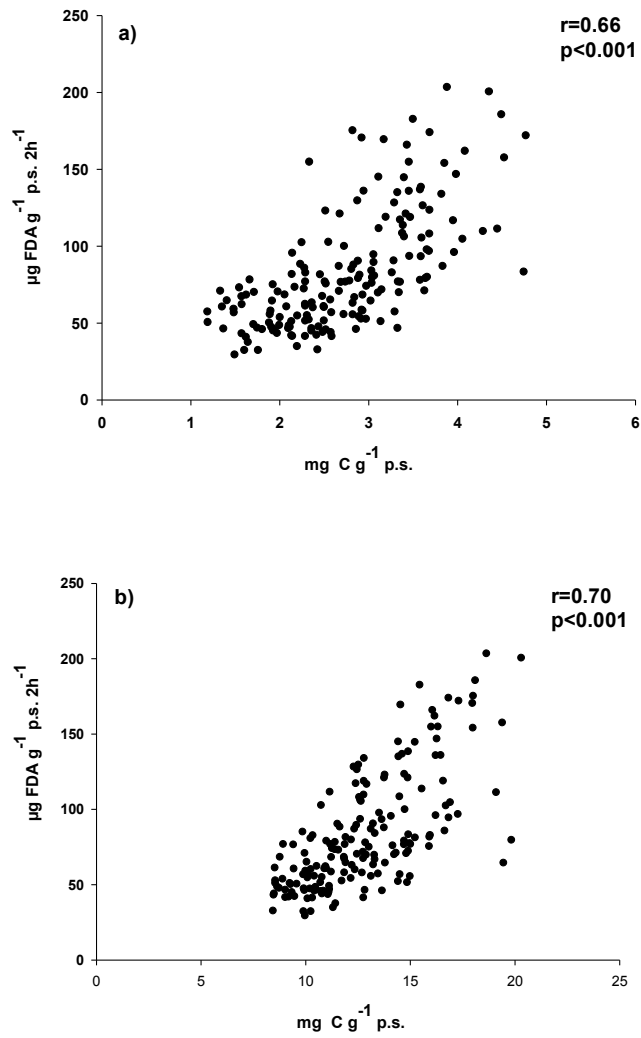


Fig.14. Grafici della correlazione tra attività idrolasica e carbonio organico labile (a) e tra l'attività idrolasica ed il carbonio organico totale (b). Per ogni grafico sono presentati il valore del coefficiente di correlazione (r) e la significatività (p).

I box plot in figura 15 descrivono in modo sintetico i risultati dei parametri chimici e biologici e mettono bene in evidenza le differenze fra i trattamenti. La frazione stabile del carbonio organico è fortemente influenzata dall'aggiunta di compost. Rispetto alle parcelle controllo e a fertilizzazione minerale, con un contenuto simile, la frazione stabile è incrementata rispettivamente del 60 e del 40% nel suolo di CMP e CMP+N/2. All'opposto, le frazioni di carbonio più facilmente degradabili quale quella labile e quella recalcitrante non mostrano lo stesso aumento, probabilmente per il rapido turn-over che queste frazioni hanno nel suolo dove sono prontamente utilizzate dalla comunità microbica. Quest'ultima subisce l'influenza positiva dell'aumento di sostanza organica: si assiste, infatti, sia ad un aumento della biomassa microbica (espressa come carbonio ed azoto microbico) che ad un aumento dell'attività, come mostrato dall'attività idrolasica totale e dall'attività β -glucosidasica, che presentano valori circa doppi rispetto alle parcelle controllo e alle parcelle a fertilizzazione minerale. I cambiamenti delle caratteristiche biologiche dopo l'ammendamento con il compost sono essenzialmente dovute all'input di materiale organico esogeno e solo marginalmente dall'input di microrganismi proveniente dal compost, come mostrato da Saison et al. (2006).

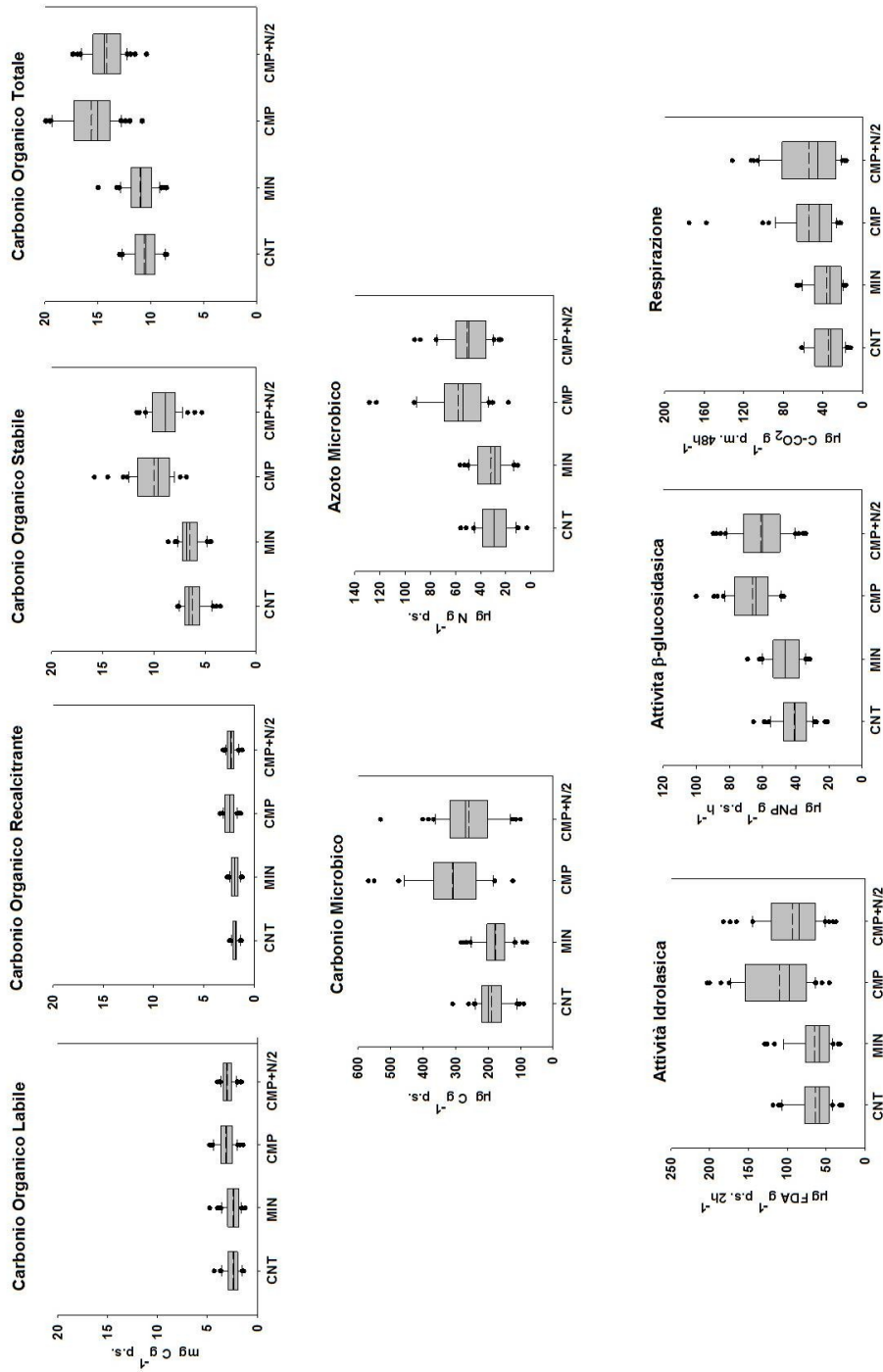


Fig.15 Box plot dei dati aggregati dei parametri chimici e biologici.

10.5 Diversità microbica del suolo

Le comunità batteriche nelle parcelle sottoposte ai differenti trattamenti, alla fine del 5° anno di sperimentazione (marzo 2012), e subito dopo il 6° ammendamento (maggio 2012), sono state analizzate mediante ordinamento NMDS, utilizzando come matrice di distanza l'indice di similarità di Jaccard. I risultati sono rappresentati dai plot in figura 16. Si osserva, per entrambi i campionamenti, una separazione tra le comunità microbiche delle parcelle trattate con il compost (CMP e CMP+N/2) e quelle delle parcelle non trattate con il compost (CNT e MIN). Questo potrebbe essere dovuto alla differente quantità di sostanza organica presente nel terreno alla fine del 5° anno di sperimentazione. L'analisi del suolo subito dopo il 6° ammendamento evidenzia anche una separazione tra la comunità batterica delle parcelle CMP e quelle CMP+N/2, nonostante la stessa quantità di compost utilizzata, lasciando ipotizzare un differente adattamento della comunità microbica all'aggiunta dell'azoto minerale e alla diversa quantità di sostanza organica presente nel suolo (Fig. 12). L'incremento dell'attività enzimatica mostrato in figura 10 potrebbe derivare non solo da una più efficace risposta fisiologica ma anche per la presenza di gruppi tassonomici che sfruttano in maniera più efficiente la diversa tipologia di composti organici aggiunti con il compost. Questo è da attribuire al fatto che l'ammendamento organico con compost attiva gruppi differenti di microrganismi rispetto all'aggiunta di azoto minerale, sottolineando come essi possano giocare un ruolo importante nel ciclo del carbonio e dell'azoto in suoli sottoposti a differenti pratiche di gestione: ad esempio, Chaudhry et al. (2012), trovano che nelle parcelle ammendate con il compost risultano essere più abbondanti gruppi come Proteobacteria, Bacteroidetes, and Gemmatimonadetes; mentre nelle parcelle a fertilizzazione minerale risultano essere più abbondanti Actinobacteria and Acidobacteria. L'apporto di sostanza organica determina sicuramente la disponibilità di risorse diverse e una maggiore diversità di micro-habitat che possono influenzare la struttura della comunità microbica, in relazione anche a nuove nicchie ecologiche e trofiche che si rendono disponibili nel suolo.

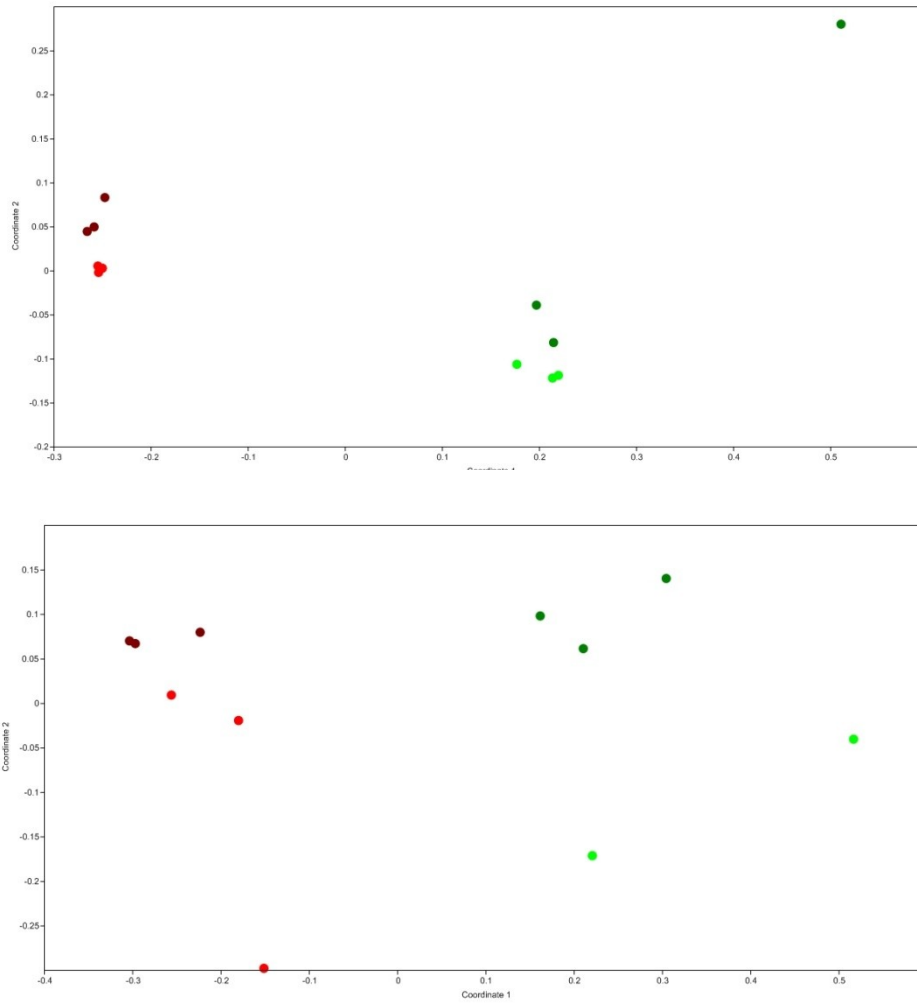


Fig. 16 NMDS dei profili molecolari derivanti dall'analisi ARISA alla fine del 5° (a) e dopo il 6° (b) anno di sperimentazione. In marrone sono rappresentate le parcelle CNT, in rosso le parcelle MIN, in verde chiaro le parcelle CMP ed in verde scuro le parcelle CMP+N/2.

11. Nutrienti ed elementi potenzialmente tossici nel suolo e nelle colture

L'analisi multivariata della varianza, effettuata considerando separatamente sia la concentrazione totale che quella disponibile degli elementi nel suolo che la loro concentrazione nelle matrici vegetali, ha mostrato un effetto significativo del trattamento, del periodo di campionamento e della loro interazione (tabella 9). La concentrazione nelle porzioni vegetali analizzate è risultata significativamente influenzata dal trattamento nei frutti di pomodoro, e dal trattamento, dall'organo e dalla loro interazione nella coltura di cipolla.

Tabella 9. Risultati della MANOVA considerando la concentrazione degli elementi nel suolo e nelle colture.

Fattore	Conc. Tot.	Fraz. Disp.	Fattore	Pomodoro 2011	Pomodoro 2012	Fattore	Cipolla 2012	Cipolla 2013
Tr	p=0,002	p<0,001	Tr.	p=0,029	p=0,04	Tr.	p<0,001	p<0,001
Te	p<0,001	p<0,001				Or.	p<0,001	p<0,001
Tr.*Te	p=0,023	p<0,001				Tr.*Or	p<0,001	p<0,001

Tr.=Trattamento; Te=Tempo di campionamento; Or.=Organo

11.1 Macronutrienti

In figura 17 sono mostrate le concentrazioni totali (a) e le frazioni disponibili (b) dei macronutrienti (Ca, K, Mg, Na) nel suolo, nei periodi di campionamento analizzati. La concentrazione totale di potassio è risultata significativamente più alta, rispetto alle parcelle controllo ($p<0,0045$), in CMP+N/2 e CMP a luglio 2012 e in CMP+N/2 ad aprile 2013, dove aumenta significativamente anche la frazione disponibile nelle parcelle CMP+N/2 e CMP. Ad aprile 2013 aumenta anche la frazione disponibile di calcio, nelle parcelle fertilizzate con solo compost rispetto alle parcelle controllo ($p<0,0045$).

In figura 18 sono mostrate le concentrazioni degli stessi elementi nei frutti di pomodoro (a e b) e nelle radici e nei bulbi di cipolla (c e d) dopo il 5° e il 6° anno di trattamento del suolo. Rispetto a CNT, il potassio aumenta significativamente ($p<0,0045$) nei pomodori al termine del 5° anno di sperimentazione, nelle parcelle CMP e CMP+N/2, e nelle radici delle cipolle, alla fine del 6° anno, in CMP+N/2. Il magnesio aumenta significativamente ($p<0,0045$) nei frutti di pomodoro in CMP+N/2 rispetto alla fertilizzazione minerale dopo il 5° anno di sperimentazione, mentre il sodio incrementa significativamente ($p<0,0045$) nello stesso campionamento in CMP e CMP+N/2 rispetto a CNT e MIN. Inoltre, il sodio incrementa nelle radici di cipolla, alla fine del 6° anno di sperimentazione, nelle parcelle CMP e CMP+N/2 rispetto alle parcelle con fertilizzazione minerale.

I risultati mostrano come l'ammendamento con il compost nel tempo può determinare un aumento del contenuto totale e/o della frazione disponibile nel suolo dei macronutrienti, in particolare di potassio e di calcio, fornendo elementi nutritivi alle

colture. Questi risultati sono in accordo con altri lavori: Liu et al. (2012) mostrano un aumento della frazione disponibile di K nel suolo dopo l'aggiunta di compost mentre l'aggiunta al compost del biochar provoca un aumento anche della frazione disponibile di calcio. Warman et al. (2010) trovano nei tuberi di patate cresciuti in un suolo ammendato con il compost, un aumento significativo di potassio rispetto alle parcelle non fertilizzate. Il potassio rappresenta un importante elettrolita che interviene in molti processi fisiologici umani, e l'aumento nei frutti di pomodoro dovuto all'ammendamento con il compost risulta essere un aspetto positivo dell'utilizzo di questo ammendante organico.

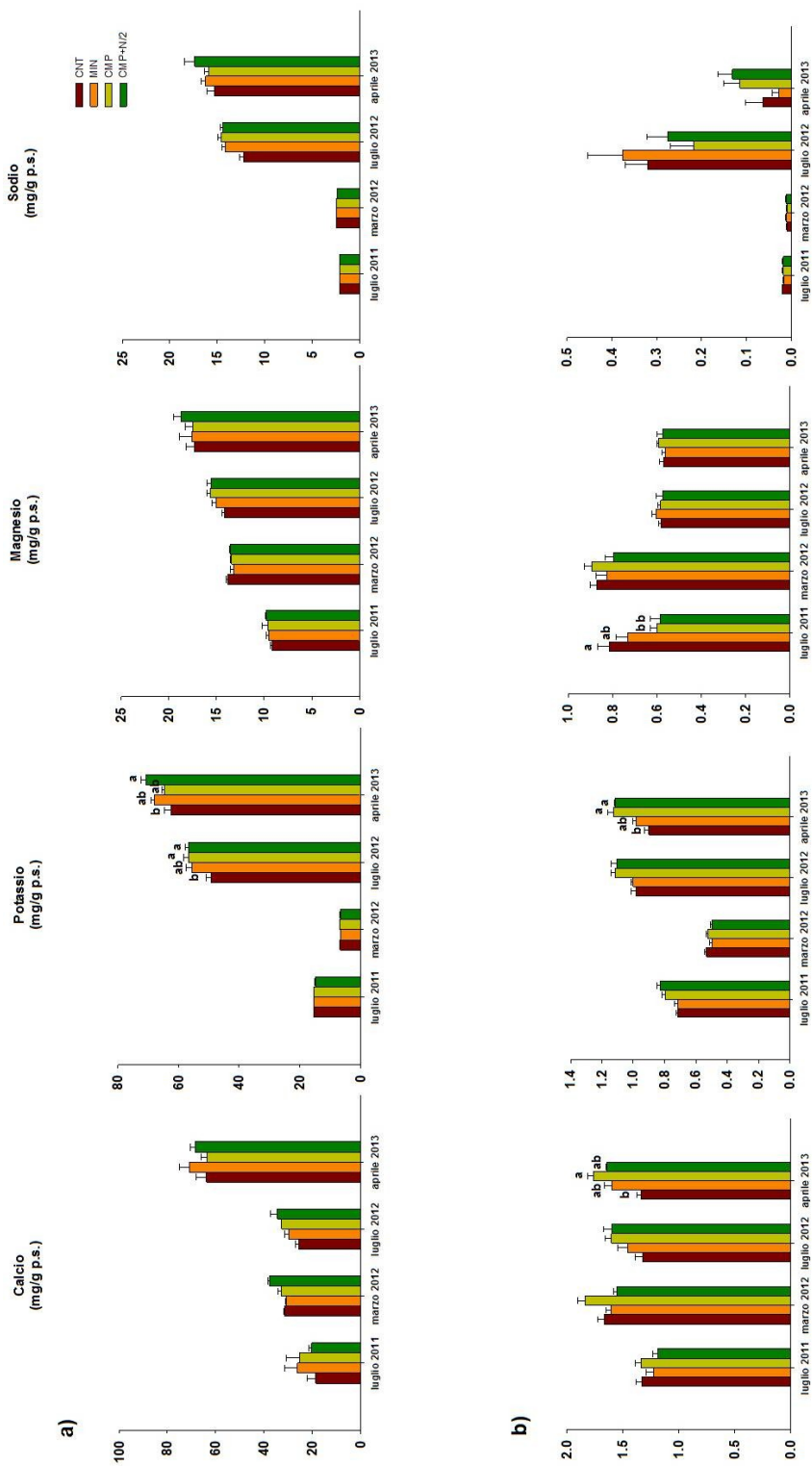


Fig. 17 Concentrazione totale (a) e frazione disponibile (b) dei macronutrienti nel suolo. Per ogni elemento, all'interno dello stesso periodo di campionamento, lettere differenti indicano differenze significative tra i trattamenti ($p < 0,0041$). Le barre di errore indicano l'errore standard della media.

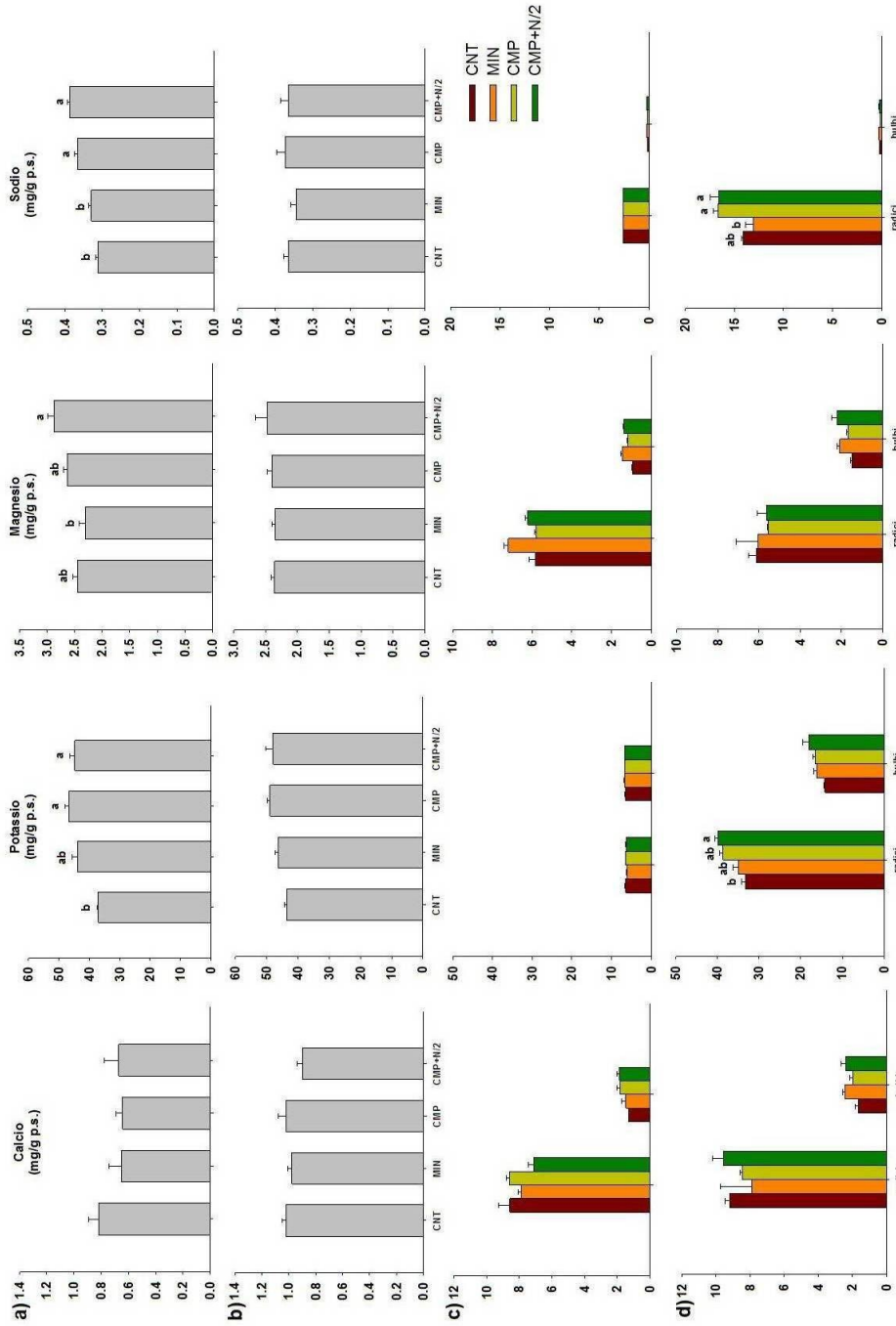


Fig. 18 Concentrazione dei macronutrienti nei frutti pomodori dopo il 5° (a, p<0,00125) ed il 6° anno (b) di sperimentazione e nei bulbi e radici di cipolle dopo il 5° (c, p<0,0045) ed il 6° anno (d, p<0,0041). Per ogni elemento, all'interno dello stesso organo, lettere differenti indicano differenze significative tra i trattamenti. Le barre di errore indicano l'errore standard della media.

11.2 Micronutrienti

In figura 19 sono mostrate le concentrazioni totali (a) e le frazioni disponibili (b) dei micronutrienti (Fe, Cu, Mn, Zn) nel suolo. La concentrazione totale di rame è significativamente più alta nelle parcelle a fertilizzazione mista rispetto alle parcelle controllo ($p < 0,0045$) dopo il sesto anno di ammendamento, sia a luglio 2012 che ad aprile 2013. Le concentrazioni di Fe e Cu totale seguono un trend temporale simile (lug.-'11=mar.-'11 < lug.-'12 < apr.-'13), indipendentemente dal trattamento di fertilizzazione del suolo. La frazione disponibile di ferro è mediamente più alta in CMP e CMP+N/2, anche se questi aumenti non sono statisticamente significativi ($p > 0,0045$) mentre il rame, che aumenta linearmente nel corso del tempo, ha valori mediamente più alti in CNT e MIN, con una riduzione della disponibilità nelle parcelle a fertilizzazione organica e a fertilizzazione mista. Il ferro ha una percentuale di disponibilità rispetto al totale minore dello 0,1% mentre il rame ha una disponibilità media dell'8% (5,94-11,87) e questa, in tutti i campionamenti, sembra diminuire nelle parcelle a cui è stato aggiunto il compost (tabella 10), confermando quanto mostrato precedentemente. Questi risultati sono, in parte, in disaccordo con quelli di altri autori (Zheljzkov & Warman, 2004; Carbonell et al., 2011) che mostrano che l'aggiunta di compost determina un incremento sia della concentrazione totale che della frazione disponibile di rame nel suolo ammendato. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che la sostanza organica aggiunta con il compost, ricca di cariche negative, attenua la concentrazione di rame in soluzione rendendolo meno disponibile per le piante.

Il manganese mostra un aumento significativo della frazione disponibile in CMP rispetto a CNT e MIN ($p < 0,0045$) alla fine della coltura di cipolla, sia dopo il 5° (marzo 2012) che dopo il 6° (aprile 2013) anno di sperimentazione. Infine, lo zinco ha una concentrazione totale nel suolo significativamente più alta in CMP+N/2 rispetto a CNT a luglio 2011 e una frazione disponibile significativamente più alta in CMP in confronto a CNT e in MIN a marzo e luglio 2012. Altri studi mostrano un aumento della concentrazione di zinco e manganese nel suolo (Carbonell et al., 2011) e della loro frazione disponibile (Warman et al., 2011) dopo l'aggiunta ripetuta di compost. Lo zinco ha una disponibilità media intorno al 5% rispetto al totale (1,83-12,20) mentre il manganese ha mediamente una disponibilità minore dell'1% (0,25-1,82).

Ferro, rame, manganese e zinco non mostrano aumenti significativi nelle porzioni eduli delle colture nelle parcelle a cui è stato aggiunto il compost (figura 20). Zinco (0,30-0,75) e rame (0,54-2,27) mostrano, rispetto agli altri elementi, un fattore di bioaccumulo più elevato nelle radici di cipolla (tabella 10), evidenziando una maggiore mobilità di questi elementi essenziali per la pianta.

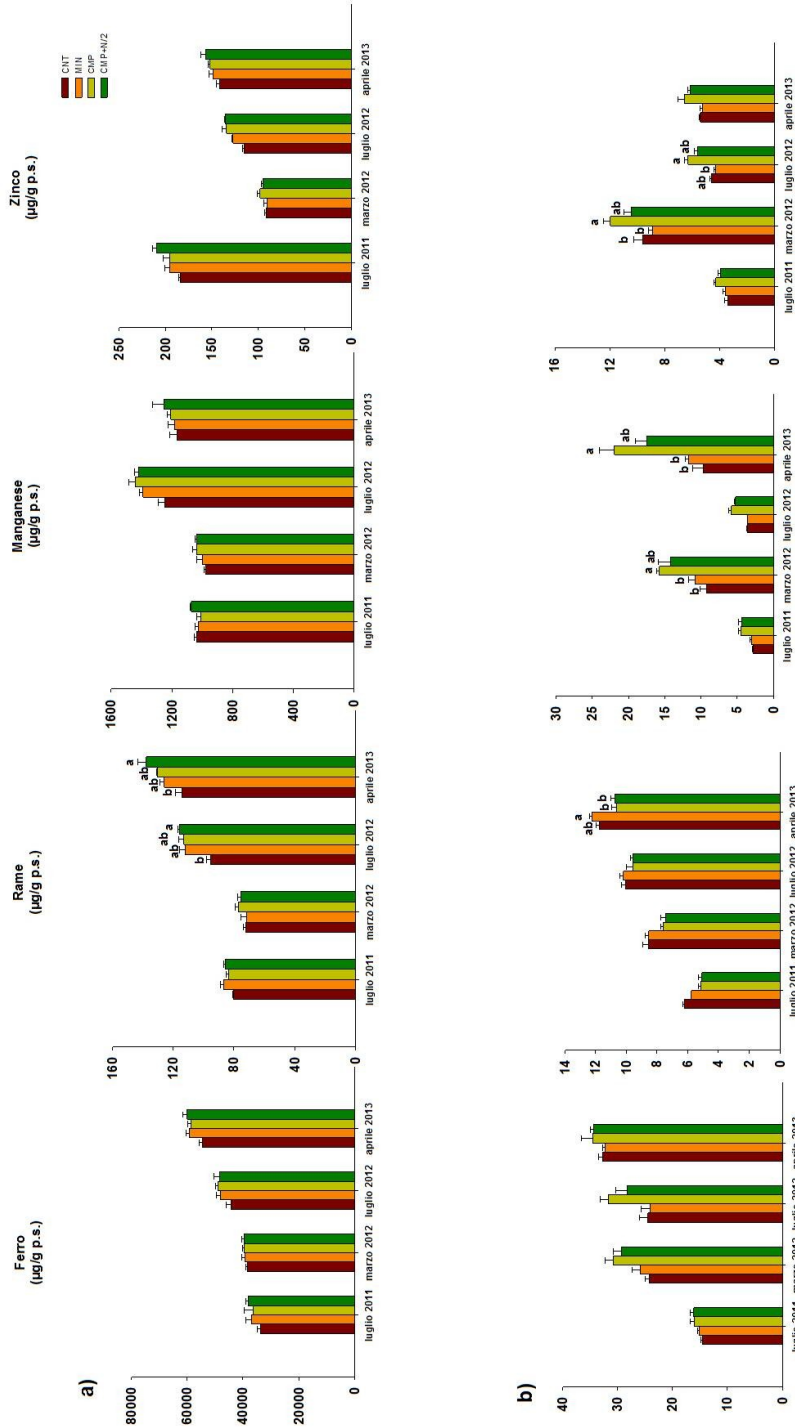


Fig. 19 Concentrazione dei micronutrienti (a) e frazione disponibile (b) nel suolo. Per ogni elemento, all'interno dello stesso periodo di campionamento, lettere differenti indicano differenze significative tra i trattamenti (p<0.0041). Le barre di errore rappresentano l'errore standard della media.

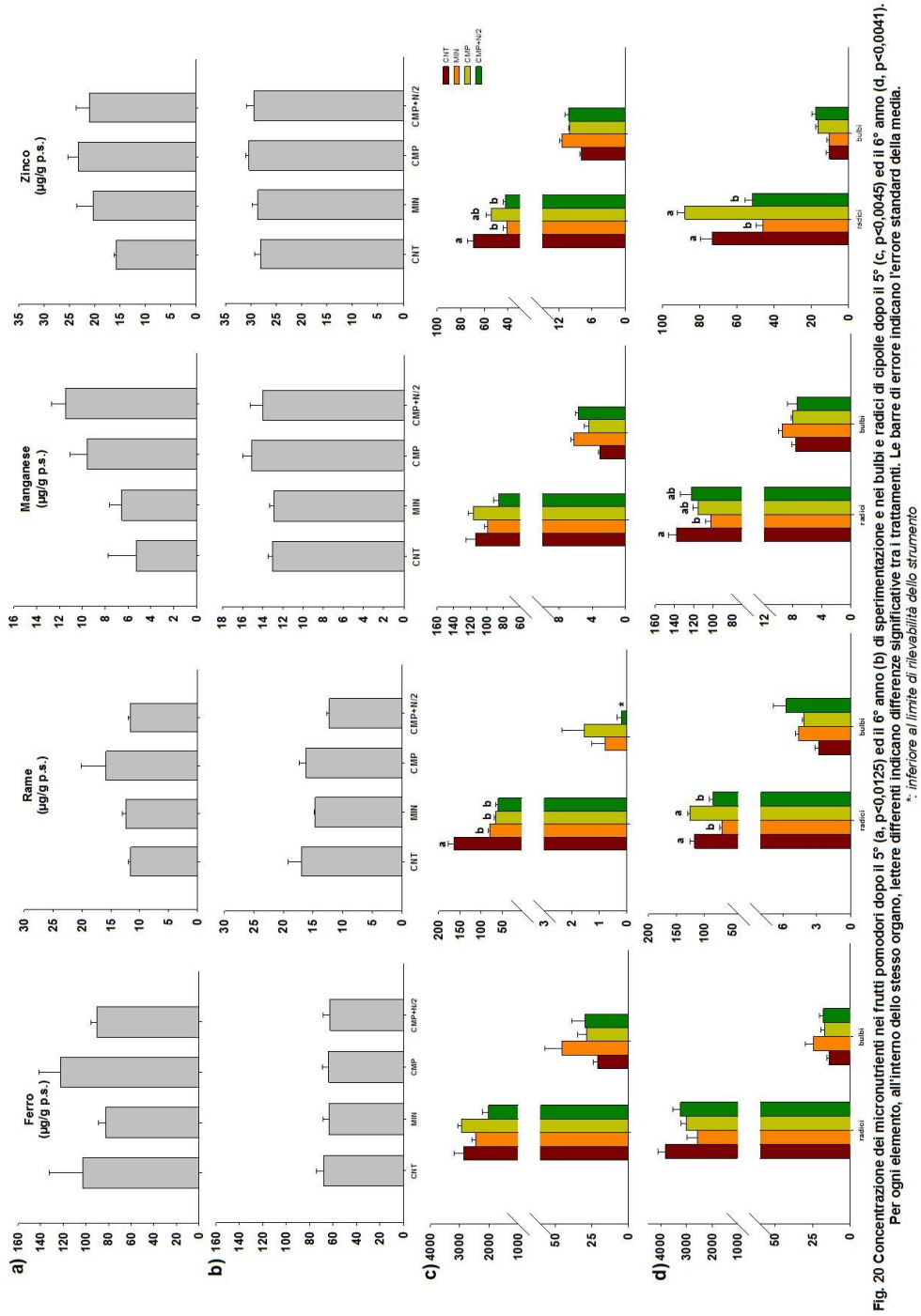


Tabella 10. Percentuale di disponibilità e fattori di bioccamulo (BAF) dei micronutrienti dopo il 5° (a) ed il 6° anno (b) di sperimentazione.

a)		Coltura	Pomodori 2011		Cipolle 2012		
Elemento	Trattamento	% disponibilità	BAF frutto	% disponibilità	BAF radici	BAF bulbo	
Cu	CNT	7,77	0,14	11,85	2,27	0	
	MIN	6,65	0,14	11,87	1,14	0,010	
	C15	6,16	0,19	9,87	0,84	0,020	
	C15+N/2	5,94	0,14	9,81	0,78	0,002	
Fe	CNT	0,04	0,003	0,06	0,07	<0,001	
	MIN	0,04	0,002	0,06	0,06	<0,001	
	C15	0,04	0,003	0,07	0,07	<0,001	
	C15+N/2	0,04	0,002	0,07	0,05	<0,001	
Mn	CNT	0,27	0,01	0,94	0,11	0,003	
	MIN	0,29	0,01	1,09	0,10	0,006	
	C15	0,45	0,01	1,51	0,11	0,004	
	C15+N/2	0,40	0,01	1,37	0,08	0,005	
Zn	CNT	1,86	0,09	10,48	0,75	0,08	
	MIN	1,83	0,10	9,82	0,45	0,12	
	C15	2,20	0,12	12,20	0,54	0,10	
	C15+N/2	1,87	0,10	10,99	0,44	0,10	

b)		Coltura	Pomodori 2012		Cipolle 2012-2013		
Elemento	Trattamento	% disponibilità	BAF frutto	% disponibilità	BAF radici	BAF bulbo	
Cu	CNT	10,52	0,18	10,28	1,02	0,02	
	MIN	9,11	0,13	9,71	0,54	0,03	
	C15	8,48	0,14	8,13	0,96	0,03	
	C15+N/2	8,27	0,10	7,81	0,61	0,04	
Fe	CNT	0,05	0,001	0,06	0,07	<0,001	
	MIN	0,05	0,001	0,06	0,04	<0,001	
	C15	0,06	0,001	0,06	0,05	<0,001	
	C15+N/2	0,05	0,001	0,06	0,05	<0,001	
Mn	CNT	0,28	0,01	0,83	0,11	0,006	
	MIN	0,25	0,01	0,99	0,08	0,007	
	C15	0,40	0,01	1,82	0,09	0,006	
	C15+N/2	0,36	0,01	1,39	0,09	0,006	
Zn	CNT	3,98	0,24	3,81	0,51	0,07	
	MIN	3,38	0,22	3,52	0,30	0,06	
	C15	4,69	0,22	4,32	0,57	0,10	
	C15+N/2	4,13	0,21	3,93	0,32	0,11	

11.3 Elementi potenzialmente tossici

In figura 21 sono mostrate le concentrazioni totali (a) e le frazioni disponibili (b) nel suolo degli elementi non essenziali (Ni, V, Cd, Pb). Esse risultano variare nel tempo, indipendentemente dal trattamento di fertilizzazione, sebbene la concentrazione totale di vanadio nel suolo sia risultata significativamente ($p < 0,0045$) maggiore nelle parcelle a fertilizzazione mista rispetto alle parcelle controllo, dopo il 6° anno di sperimentazione, a luglio 2012. I risultati relativi all'analisi degli elementi potenzialmente tossici sono in disaccordo a quelli di Ayari et al. (2010), che hanno mostrato come, dopo 4 anni di trattamenti annuali con compost proveniente dalla frazione organica dei rifiuti solidi urbani alla dose di 80 t/ha/anno, le concentrazioni totali di Cd, Ni e Pb aumentano significativamente rispetto al suolo non ammendato. La frazione disponibile di cadmio ha mostrato un significativo ($p < 0,0045$) aumento nelle parcelle CMP a luglio 2012 e in quelle CMP e CMP+N/2 ad aprile 2013, rispetto alle parcelle non fertilizzate.

Tranne che per il campionamento al termine della coltura di pomodoro dopo il 5° anno di sperimentazione, indipendentemente dal trattamento, il cadmio mostra percentuali di disponibilità molto elevate (tabella 11), maggiori del 50%, fino ad essere completamente disponibile per le colture, come evidenziato anche da Baldantoni et al. (2010) in un precedente studio. Christensen e Huang (1999) hanno mostrato come, nella maggior parte dei suoli, il 99% del cadmio sia associato ai colloidali, mentre Taylor e Percival (2001) hanno osservato come nel suolo, in soluzione, esso si trovi tra il 55 ed il 90% come ione metallico libero (Cd^{2+}), dimostrando la caratteristica di elevata mobilità del cadmio e, di conseguenza, la facilità con cui esso viene assorbito dalle piante. Il cadmio è l'elemento che mostra i fattori di bioaccumulo più elevati (tabella 11): questo vale sia per i frutti di pomodoro (8,15-79,11) che per le radici ed i bulbi di cipolla (rispettivamente 10,47-142,99 e 3,45-28,59). Ciò potrebbe essere dovuto proprio all'elevata disponibilità e mobilità del Cd, ma anche al fatto che il comportamento del cadmio nelle piante è strettamente in relazione a quello dello zinco, elemento essenziale, avendo entrambi un'elevata affinità per i gruppi solfidrilici (Garrett, 1996). I frutti di pomodoro e i bulbi di cipolla di piante cresciute sulle parcelle ammendate con compost non mostrano incrementi significativi di nichel, vanadio, cadmio e piombo, sia dopo il 5° che dopo il 6° anno di sperimentazione (Fig. 22). Il cadmio presenta però valori elevati nelle parti eduli delle colture, indipendentemente dal trattamento del suolo: questi valori sono molto più alti di quelli generalmente riportati in letteratura. Allen (1989) riporta per il cadmio nei tessuti vegetali l'intervallo 0,01-0,30 $\mu\text{g/g}$ p.s. mentre Kabata-Pendias e Mukherjee (2007) riportano concentrazioni medie nei frutti di pomodori e nei bulbi di cipolla rispettivamente pari a 0,03 e 0,08 $\mu\text{g/g}$ p.s. Per il piombo gli stessi autori riportano un intervallo nei frutti di pomodoro pari a 1,1-3,0 $\mu\text{g/g}$ p.s., mentre nei bulbi di cipolla un intervallo pari a 1-3 $\mu\text{g/g}$ p.s. Il regolamento UE 1881/2006 e ss. mm. ii., che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, prevede come contenuto limite di cadmio e piombo negli ortaggi e nella frutta (esclusi ortaggi a foglia, erbe aromatiche, funghi, ortaggi a stelo, pinoli, ortaggi a radice e patate) la concentrazione rispettivamente di 0,05 e 0,10 mg/kg p.f. Considerando un contenuto di acqua per i frutti di pomodoro e per i bulbi di cipolla intorno al 90%, in alcuni casi i valori di cadmio e piombo misurati nelle parti eduli delle colture studiate superano i valori previsti dal regolamento UE 1881/2006.

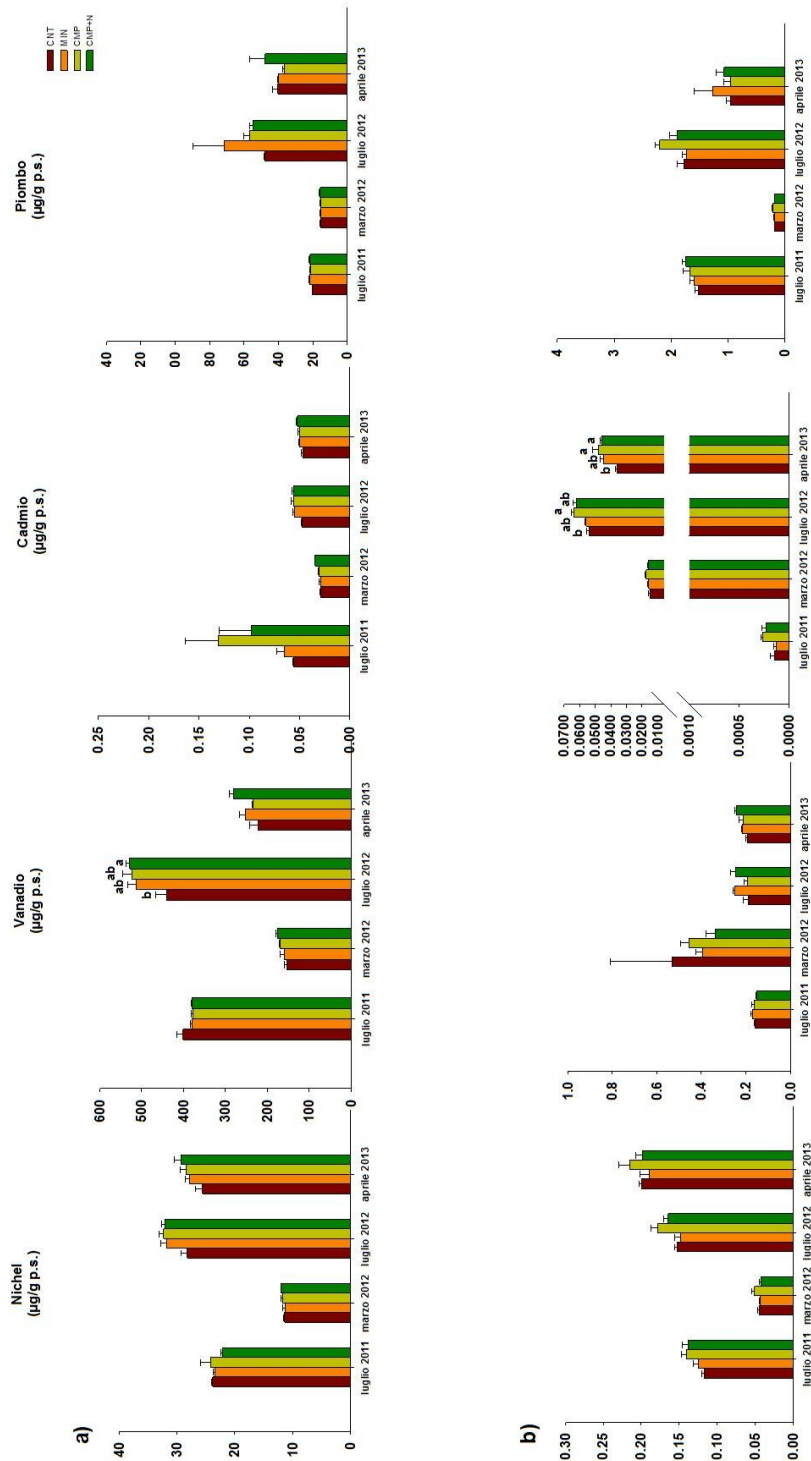


Fig. 21 Concentrazione totale (a) e frazione disponibile (b) degli elementi non essenziali nel suolo. Per ogni elemento, all'interno dello stesso periodo di campionamento, lettere differenti indicano differenze significative tra i trattamenti ($p < 0.0041$). Le barre di errore rappresentano l'errore standard della media.

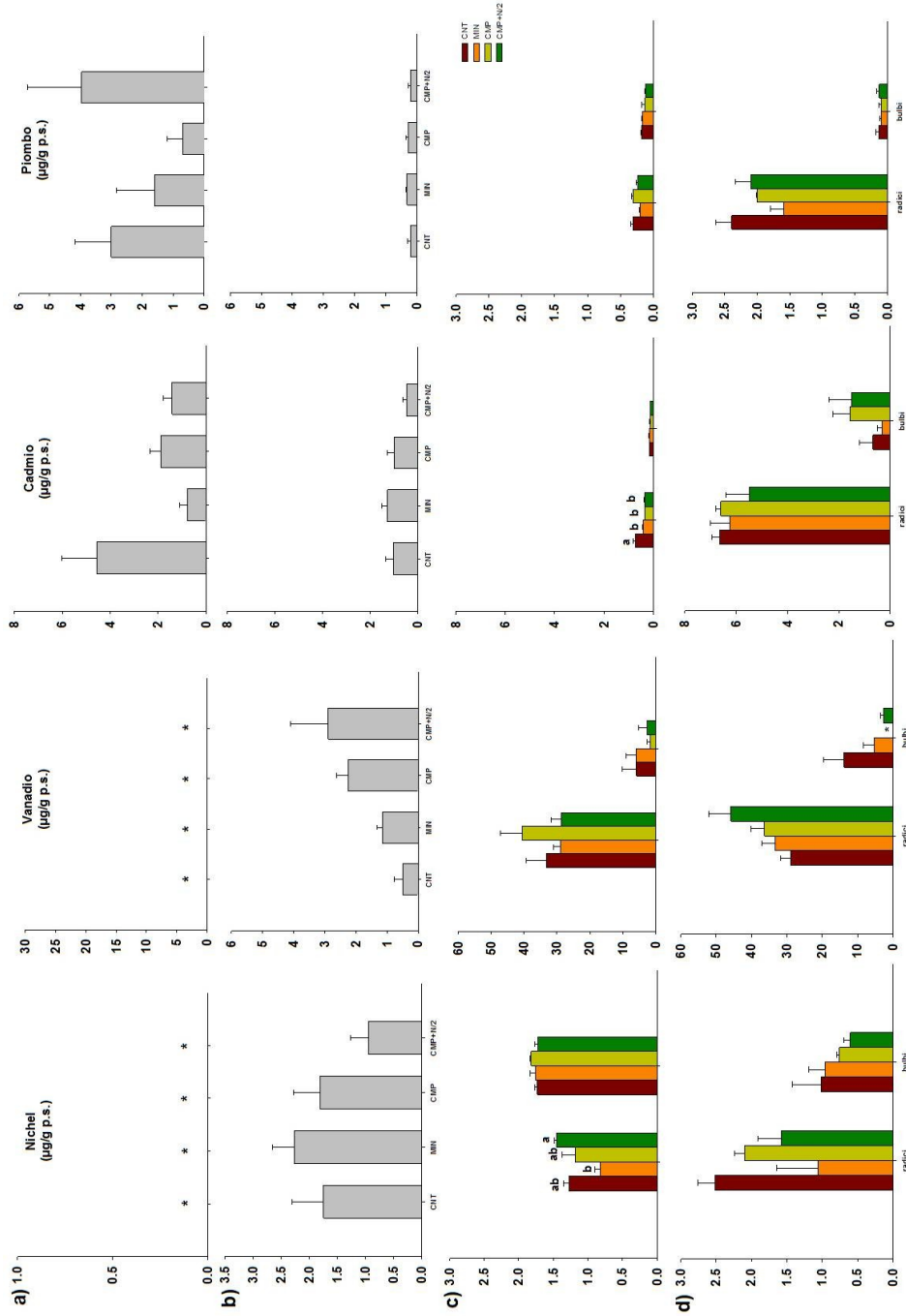


Fig 22. Concentrazione degli elementi non essenziali nei frutti di pomodoro dopo il 5° (a, $p < 0,0125$) ed il 6° (b) anno di sperimentazione e nei bulbi e radici di piante di cipolle dopo il 5° (c, $p < 0,0045$) ed il 6° anno (d, $p < 0,0041$). Per ogni elemento, all'interno dello stesso organo, lettere differenti indicano differenze significative tra i trattamenti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard della media. *inferiore al limite di rilevabilità

Tabella 11. Percentuale di disponibilità e fattori di bioaccumulo (BAF) degli elementi potenzialmente tossici dopo il 5° (a) ed il 6° anno (b) di sperimentazione.

a)		Coltura	Pomodori 2011		Cipolle 2012		
Elemento	Trattamento	% disponibilità	BAF frutto	% disponibilità	BAF radici	BAF bulbo	
Ni	CNT	0,49	n.d.	0,38	0,11	0,15	
	MIN	0,53	n.d.	0,38	0,07	0,15	
	C15	0,58	n.d.	0,43	0,10	0,15	
	C15+N/2	0,52	n.d.	0,34	0,12	0,14	
V	CNT	0,04	n.d.	0,34	0,21	0,03	
	MIN	0,04	n.d.	0,24	0,18	0,03	
	C15	0,04	n.d.	0,26	0,23	0,01	
	C15+N/2	0,04	n.d.	0,19	0,16	0,02	
Cd	CNT	0,26	79,11	52,2	24,92	5,73	
	MIN	0,19	11,90	55,4	14,28	5,96	
	C15	0,20	14,41	58,6	11,01	3,86	
	C15+N/2	0,24	14,52	53,1	10,47	3,45	
Pb	CNT	7,48	0,15	1,12	0,01	0,01	
	MIN	7,25	0,07	1,17	0,01	0,01	
	C15	7,78	0,03	1,34	0,01	0,01	
	C15+N/2	8,03	0,18	1,14	0,01	0,01	

b)		Coltura	Pomodori 2012		Cipolle 2012-2013		
Elemento	Trattamento	% disponibilità	BAF frutto	% disponibilità	BAF radici	BAF bulbo	
Ni	CNT	0,54	0,06	0,77	0,09	0,04	
	MIN	0,46	0,07	0,68	0,03	0,03	
	C15	0,55	0,05	0,75	0,07	0,02	
	C15+N/2	0,51	0,03	0,67	0,05	0,02	
V	CNT	0,04	0,001	0,08	0,12	0,06	
	MIN	0,05	0,002	0,08	0,13	0,02	
	C15	0,04	0,004	0,09	0,15	0,00	
	C15+N/2	0,05	0,005	0,08	0,16	0,01	
Cd	CNT	100	21,14	77,5	142,9	14,3	
	MIN	100	22,78	89,8	125,4	6,3	
	C15	100	17,38	95,8	131,5	31,5	
	C15+N/2	100	8,15	87,5	105,3	28,5	
Pb	CNT	3,69	0,004	2,36	0,05	0,003	
	MIN	2,41	0,004	3,17	0,04	0,002	
	C15	3,88	0,004	2,61	0,05	0,002	
	C15+N/2	3,43	0,004	2,24	0,04	0,002	

11.4 Fattori di traslocazione

Il Fattore di traslocazione TF (Tabella 12) è stato calcolato solo per le piante di cipolla, non avendo potuto analizzare, per quelle di pomodoro, le radici. Solo il nichel mostra, indipendentemente dal trattamento di fertilizzazione del suolo e dopo il 5° anno di sperimentazione, un fattore di traslocazione maggiore di 1. Per tutti gli altri elementi le radici accumulano più dei bulbi, sia dopo il 5° che dopo il 6° anno di sperimentazione: in particolare rame, ferro, manganese e piombo presentano un TF minore di 0,01 mentre Zn, V e Cd presentano un TF compreso tra 0,03 e 0,47 sia dopo il 5° che dopo il 6° anno di trattamento. Questi risultati sono in accordo con quelli di Soudek et al. (2009) che mostrano come le più alte concentrazioni di metalli pesanti si riscontrino nelle radici di queste piante ed il trasporto ai bulbi è piuttosto basso. Inoltre, altri autori hanno mostrato che, in diverse specie vegetali commestibili, le maggiori concentrazioni si ritrovano nelle radici piuttosto che negli altri organi della pianta, come risultato dell'accumulo dei metalli in questo organo che ne limita la traslocazione ad altre parti della pianta (Carbonell et al. 2011).

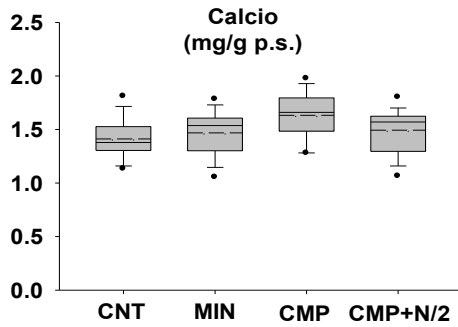
11.5 Sintesi dei risultati

Nelle figura 23, 24 e 25 sono rappresentati i box-plot di sintesi della frazione disponibile degli elementi e le tabelle relative alle concentrazioni misurate nelle porzioni eduli delle colture di pomodoro e cipolla determinate durante il 5° ed il 6° anno di sperimentazione. L'aggiunta di compost determina nel suolo un incremento della frazione disponibile di calcio e potassio (figura 23) nonché di ferro, manganese e zinco (figura 24), tutti elementi indispensabili per la crescita della pianta. In particolare, all'aumento della frazione disponibile di potassio e di manganese corrisponde un incremento della concentrazione di questi due elementi nei frutti di pomodoro, sia dopo il 5° che dopo il 6° anno di ammendamento. Questo incremento della disponibilità di nutrienti nel suolo, che non segue necessariamente l'aumento della concentrazione totale, dimostra come l'aggiunta di compost di qualità, apportando sostanza organica, modifichi i complessi di scambio nel suolo, come supportato anche da altri lavori (Hargreaves et al., 2008; Fagnano et al., 2011). Tali dinamiche possono influenzare positivamente la fertilità del suolo, dimostrando come l'ammendamento organico ottiene un effetto analogo all'aggiunta di fertilizzanti di sintesi.

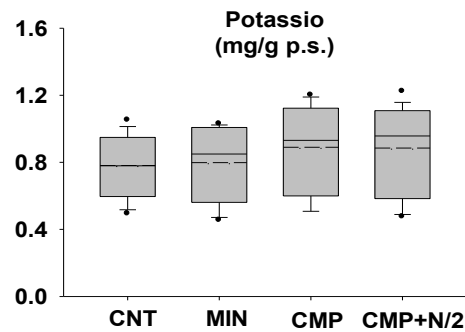
Gli elementi potenzialmente tossici (figura 25), in particolare cadmio e piombo, mostrano un lieve incremento della biodisponibilità nelle parcelle ammendate con compost che non determina relativi incrementi del contenuto nelle colture. I pomodori e le cipolle allevate sulle parcelle ammendate con compost mostrano contenuti confrontabili con quelli delle parcelle controllo e a fertilizzazione minerale. Il dato da evidenziare è comunque, in particolare, la concentrazione di cadmio elevata sia nei pomodori che nelle cipolle rispetto ai valori soglia definiti dalla normativa vigente.

Tabella 12. Fattore di traslocazione (TF) nel suolo e nelle colture dei micronutrienti e degli elementi potenzialmente tossici.

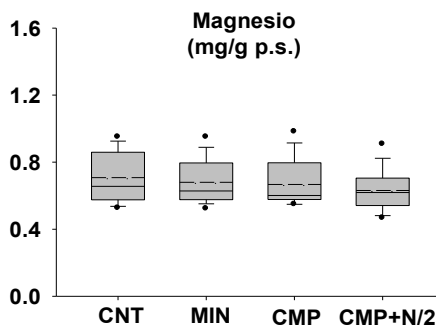
Elemento	Coltura	Cipolla 5° anno	Cipolla 6° anno
	Trattamento	TF	TF
Cu	CNT	0,00	0,02
	MIN	0,01	0,06
	C15	0,02	0,03
	C15+N/2	0,01	0,06
Fe	CNT	0,007	0,003
	MIN	0,018	0,009
	C15	0,009	0,005
	C15+N/2	0,014	0,005
Mn	CNT	0,02	0,05
	MIN	0,06	0,09
	C15	0,04	0,06
	C15+N/2	0,06	0,06
Zn	CNT	0,11	0,13
	MIN	0,27	0,22
	C15	0,18	0,18
	C15+N/2	0,24	0,34
Ni	CNT	1,30	0,40
	MIN	2,13	0,91
	C15	1,15	0,36
	C15+N/2	1,18	0,38
V	CNT	0,17	0,47
	MIN	0,20	0,16
	C15	0,03	0,00
	C15+N/2	0,09	0,05
Cd	CNT	0,23	0,10
	MIN	0,41	0,05
	C15	0,35	0,27
	C15+N/2	0,33	0,27
Pb	CNT	0,58	0,05
	MIN	0,80	0,05
	C15	0,41	0,05
	C15+N/2	0,50	0,06



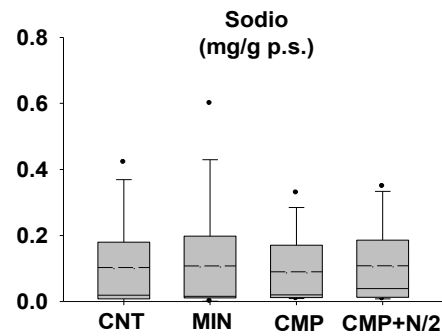
P 2011	0,8	0,6	0,6	0,6
P 2012	1,0	0,9	1,0	0,9
C 2012	1,2	1,4	1,8	1,8
C 2013	1,6	2,4	1,9	2,3



P 2011	37,0	43,8	46,6	44,7
P 2012	43,5	46,2	48,8	47,9
C 2012	6,5	6,7	6,6	6,6
C 2013	14,1	16,1	16,5	18



P 2011	2,4	2,3	2,6	2,8
P 2012	2,3	2,3	2,3	2,4
C 2012	0,9	1,4	1,1	1,3
C 2013	1,4	2,0	1,6	2,2



P 2011	0,3	0,4	0,3	0,3
P 2012	0,4	0,3	0,3	0,3
C 2012	0,1	0,2	0,1	0,2
C 2013	0,2	0,2	0,1	0,2

Fig. 23. Box-plot della frazione disponibile dei macronutrienti e tabelle delle concentrazioni nella porzione edule dei pomodori e delle cipolle alla fine di ogni coltura. La linea intera rappresenta la mediana, la linea tratteggiata rappresenta la media.

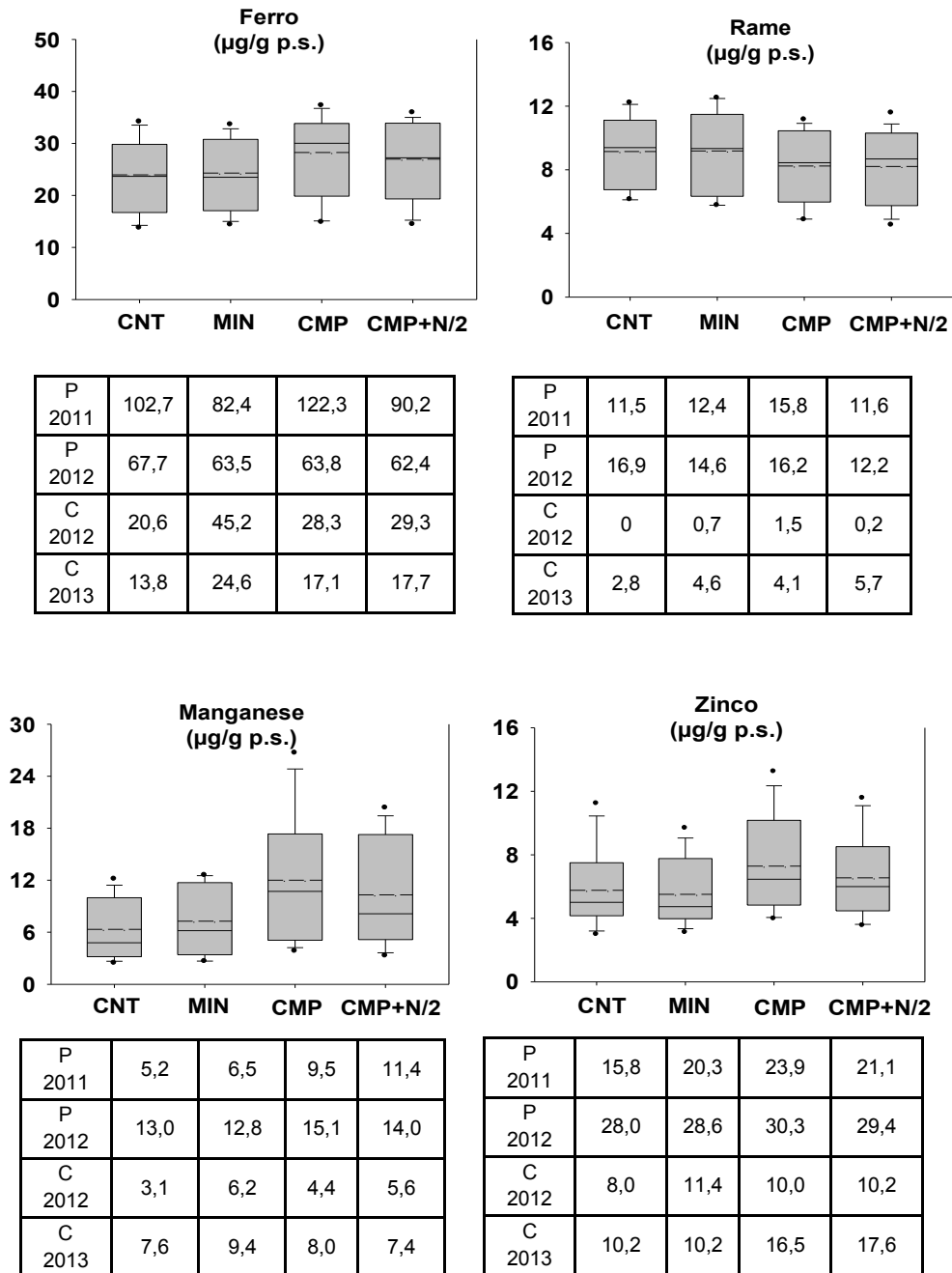
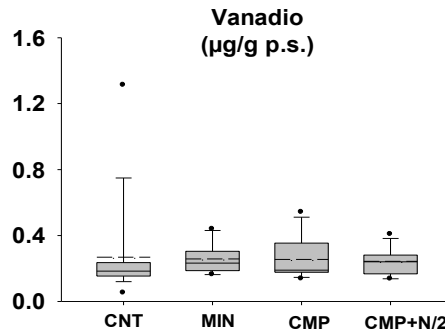
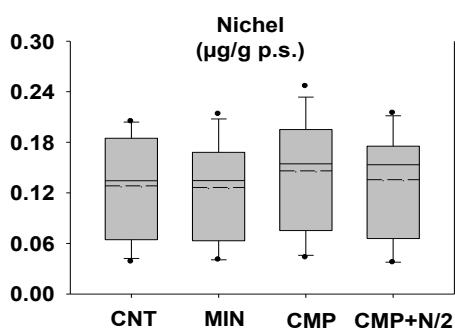
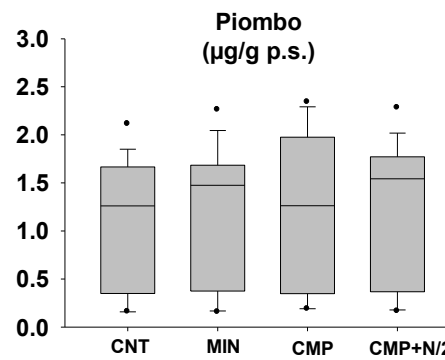
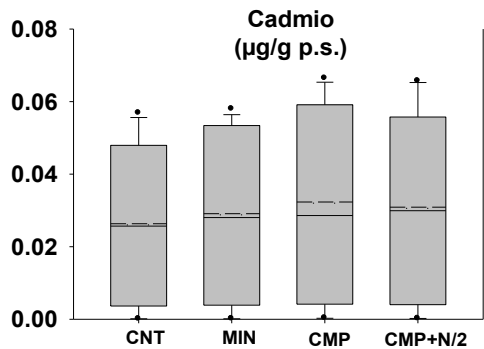


Fig. 24. Box-plot della frazione disponibile dei micronutrienti e tabelle delle concentrazioni nella porzione edule dei pomodori e delle cipolle alla fine di ogni coltura. La linea intera rappresenta la mediana, la linea tratteggiata rappresenta la media.



P 2011	0	0	0	0
P 2012	1,7	2,3	1,8	0,9
C 2012	1,7	1,7	1,8	1,7
C 2013	1,0	0,9	0,7	0,6

P 2011	0	0	0	0
P 2012	0,5	1,1	2,2	2,9
C 2012	5,8	5,9	1,5	2,6
C 2013	13,5	5,3	0	2,6



P 2011	4,5	0,7	1,8	1,4
P 2012	1,0	1,2	1,0	0,4
C 2012	0,2	0,2	0,1	0,1
C 2013	0,6	0,3	1,5	1,4

P 2011	3,0	1,6	0,7	3,9
P 2012	0,2	0,3	0,3	0,2
C 2012	0,2	0,2	0,1	0,1
C 2013	0,1	0,1	0,1	0,1

Fig. 25. Box-plot della frazione disponibile degli elementi potenzialmente tossici e tabelle delle concentrazioni nella porzione edule dei pomodori e delle cipolle alla fine di ogni coltura. La linea intera rappresenta la mediana, la linea tratteggiata rappresenta la media.

Conclusioni

La diminuzione della sostanza organica rappresenta una delle principali cause di degradazione del suolo. La continua asportazione della biomassa vegetale con la raccolta della produzione agricola altera il ciclo della materia causando un decremento della fertilità a cui si è sopperito con l'utilizzo, alcune volte anche massivo ed eccessivo, di fertilizzanti minerali di sintesi. La produzione di questi ultimi ed il loro utilizzo sono fonte di inquinamento dell'aria e delle acque superficiali e sotterranee e, pur sostenendo la produzione agraria, non apportano alcun miglioramento del suolo.

L'ammendamento con il compost rappresenta senza dubbio una soluzione economicamente ed ecologicamente compatibile perché da una parte ripristina la fertilità chimica e biologica del suolo e dall'altra parte permette una gestione sostenibile dei rifiuti organici evitando che vengano smaltiti in discarica o per incenerimento, evitando la formazione di percolato e l'immissione di gas serra in atmosfera.

Questo progetto di dottorato ha avuto l'obiettivo di valutare l'effetto a lungo termine di ripetuti ammendamenti con il compost proveniente dalla frazione organica dei rifiuti solidi urbani sulle caratteristiche chimiche e biologiche del suolo e dell'eventuale accumulo di elementi potenzialmente tossici nelle porzioni eduli delle colture.

L'aggiunta di compost ha determinato un incremento della sostanza organica del suolo con effetti positivi sulla biomassa e sull'attività metabolica della comunità microbica che è risultata anche variare nella struttura. L'incremento del carbonio organico, in particolare della frazione stabile, piuttosto che della frazione labile e recalcitrante, arricchisce la componente organica del suolo determinando un sink di carbonio che viene sottratto all'atmosfera.

E' interessante osservare come i frutti cresciuti sulle parcelle ammendate con il compost mostrano concentrazioni di potassio non inferiori, se non addirittura in alcuni casi, superiori ai pomodori fertilizzati con concimazione minerale dove il potassio è prontamente utilizzabile: ciò dimostra come il compost possa fornire le colture di un nutriente indispensabile per la crescita vegetale e che riveste un ruolo fondamentale anche nel metabolismo umano.

La preoccupazione nell'utilizzo di compost, in particolare per quanto riguarda l'apporto di elementi tossici al suolo ed il possibile accumulo nel tempo, con trasferimento alle catene alimentari e all'uomo, non ha trovato riscontro negli anni di sperimentazione del progetto: non è stato mai osservato un accumulo nelle parti eduli delle colture di elementi tossici, che tendono a rimanere bloccati nelle radici anche quando la parte edule è rappresentata da organi ipogei, come nel caso delle cipolle. Indipendentemente dalla fertilizzazione del suolo con il compost, un'elevata concentrazione di cadmio, elemento tossico e cancerogeno secondo l'International Agency for Research on Cancer, è stata osservata nei frutti di pomodori e nei bulbi di cipolle. I valori alti di cadmio nelle parti eduli, indipendentemente dai trattamenti, suggeriscono, comunque, la necessità di monitorare questo elemento anche in relazione alle differenti pratiche di gestione del suolo, che ne potrebbero influenzare la disponibilità per le colture.

In conclusione, la fertilizzazione con compost ha determinato una stimolazione delle comunità microbiche e un miglioramento della qualità biologica dei suoli, presupposto fondamentale per la realizzazione di agro-ecosistemi rispondenti a criteri di

sostenibilità. Tutti gli indicatori biologici utilizzati nelle ricerche riportate in questa nota hanno mostrato mediamente una buona sensibilità nei confronti dei trattamenti di fertilizzazione suggerendo la loro applicabilità per il monitoraggio dei cambiamenti indotti dai sistemi di gestione nel suolo.

Bibliografia

Allen, Stewart E., **1989**. Chemical Analysis of ecological Materials. Blackwell Scientific publications.

Adriano D.C. **2001**. Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risk of Metals. second ed., *Springer*, New York.

Alloway, B.J., **1995**. Cadmium. In: Heavy metals in soils. B.J. Alloway (Ed). Blackie, pp. 123-151
Kabata-Pendias, A. and Pendias, H., **1992**. Trace Elements in Soils and Plants 2nd edition. CRC Press, Baton Rouge, Fa.

Amador, J.A., Glucksman, A.M., Lyons, J.B., Gorres, J.H., **1997**. Spatial distribution of soil phosphatase activity within a riparian forest. *Soil. Sci.* **162**: pp. 808-825.

Amlinger F, Pollak M, Favoino E. Heavy metals and organic compounds from wastes used as organic fertilisers. ENV.A.2./ETU/2001/0024. Final Report to DG Environ- ment, Brussels; **2004**.

Amundson, R. **2001**. The Carbon Budget in Soil. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **29**:535–62

Atkinson, D., Gosling, P., Jackson, L. R., & Rayns, F. W. **2002**. Managing soil fertility in organic farming systems. *Soil Use and Management*, **18(3)**, 239–247.

Ayari, F. **2010**. Heavy metal distribution in soil and plant in municipal solid waste compost amended plots. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, **7(3)**, 465–472.

Baldantoni, D., Leone, A., Iovieno, P., Morra, L., Zaccardelli, M., Alfani, A., **2010**. Total and available soil trace element concentrations in two Mediterranean agricultural systems treated with municipal waste compost or conventional mineral fertilizers. *Chemosphere* **80**:1006–1013

Bardos, P. **2004**. Composting of mechanically segregated fractions of municipal solidwaste – a review. Falfield, Bristol: Sita Environmental Trust; **2004**.

Bastida, F., Kandeler, E., Hernández, T., & García, C. **2008**. Long-term effect of municipal solid waste amendment on microbial abundance and humus-associated enzyme activities under semiarid conditions. *Microbial ecology*, **55(4)**, 651–61.

Benjamini, Y., and Hochberg, Y. **1995**. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* **57**, 289–300

Berendse, F., Berg, B., Bosatta, E., **1985**. The effect of lignin and nitrogen on the decomposition of litter in nutrient-poor ecosystems: a theoretical approach. *Can. J. Bot.* **65**, 1116–1120.

Biagini, B., & Barbuto, M. **2006**. Bioindicatori della qualità del suolo. *Biologia Ambientale*, **20(2)**, 19–41.

Bolton Jr., H., Smith, J.L., Link, S.O., **1993**. Soil microbial biomass and activity of a disturbed and undisturbed shrub-steppe ecosystem. *Soil Biol. Bio-chem.* **25**, 545–552

Bosatta, E., and G.I. Agren. **1991** . Dynamics of carbon and nitrogen in the organic matter of the soil: A generic theory. *Am. Nat.* **138**:227-245

Boerner, R. E. J., Decker, K. L. M., & Kennedy, E. **2000**. Prescribed burning effects on soil enzyme activity in a southern Ohio hardwood forest: a landscape-scale analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**, 899–908.

Bolton H. Jr., Frederickson J.K., and Elliot L.F., **1993**. *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management* (F.B. Metting, ed.), Marcel Dekker, New York, p. 27.

Brookes P. C., Landman A., Pruden G. & Jenkinson D. S.. **1985**. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Bio. Biochem.* **17(6)**, 837–842.

Brown SL, Henry CL, Chaney R, Compton H, DeVolder PS, **2003**. Using municipal biosolids in combination with other residuals to restore metal-contaminated mining areas. *Plant Soil*; **249**:203–15.

Brown S, Chaney R, Hallfrisch J, Ryan JA, Berti WR., **2004**. In situ soil treatments to reduce the phyto-and bioavailability of lead, zinc, and cadmium. *J Environ Qual*; **33**:522–31.

Brusetti, L., P. Francia, C. Bertolini, A. Pagluica, S. Borin, C. Sorlini, A. Abruzzese, G. Sacchi, C. Viti, L. Giovannetti, M. Bazzicalupo, D. Daffonchio, **2004**. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non transgenic counterpart, *Plant Soil* **266**:11–21.

Burns, R.G., **1982**. Enzyme activity in soil: location and possible role in microbial ecology. *Soil Biology & Biochemistry*, **14**: pp. 423-427

Burke, I. C., Yonker, C. M., Parton, W. J., Cole, C. V, Flach, K., & Schimel, D. S. **1989**. Texture, Climate, and Cultivation Effects on Soil Organic Matter Content in U.S. Grassland. *Soils Soil Sci. Soc. Am. J.* **53**:800-805.

Caldwell, B. A. **2005**. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia*, **49(6)**, 637–644.

Carbonell, G., De Imperial, R. M., Torrijos, M., Delgado, M., & Rodriguez, J. A. **2011**. Effects of municipal solid waste compost and mineral fertilizer amendments on soil properties and heavy metals distribution in maize plants (*Zea mays* L.). *Chemosphere*, **85(10)**, 1614–23.

Centemero, **2012**. Stato dell'arte del compostaggio e digestione anaerobica dei rifiuti organici in Italia. *Acta Italus Hortus* **5**:9-13.

Chang E.H., Chung R.S. and Tsai Y.H., 2007. Effect of different application rates of organic fertilizer on soil enzyme activity and microbial population. *Soil Science and Plant Nutrition* **53**, 132–140.

Chaudhry, V., Rehman, A., Mishra, A., Chauchan, P.S., Nautival, C.S., **2012**. Changes in bacterial community structure of agricultural land due to long-term organic and chemical amendments. *Microbial Ecology* **64**, 450:460

Christensen TH, Haung PM **1999**. Solid phase cadmium and the reaction of aqueous cadmium with soil surfaces. In: McLaughlin MJ, Singh BR (eds) Cadmium in soils and plants. Kluwer Acad Publ, London, pp 65–96

Cheryl, P., Mike, S., Drive, K., & Cerrito, E. **1988**. Soil fertility as an ecosystem concept, *17th WCSS, 14-21 August 2002, Thailand (14)*, 1–9.

Chiang K-Y, Yoi S-D, Lin HN, Wang K-S. **2001**. Stabilization of heavy metals in sewage sludge composting. *Water Sci Technol*; **44**:95–100.

COM 179/**2002**/CEE - Verso una strategia tematica per la protezione del suolo.

COM 231/**2006**/CE - Strategia tematica per la protezione del suolo.

COM 232/**2006**/CEE - Proposta di direttiva per la protezione del suolo.

COM 46/**2012**/CEE - Attuazione della strategia tematica per la protezione del suolo e attività in corso.

Christensen, B.T., **1996**. Carbon in primary and secondary organomineral complexes. In: Carter, M.R., Stewart, B.A. (Eds.), *Structure and Organic Matter Storage in Agricultural Soils*. CRC Press, Boca Raton, pp. 97–165.

Dalal, R.C., **1998**. Soil microbial biomass—what do the numbers really mean?. *Aust. J. Exp. Agr.* **38**, 649–665

Davidson, E., & Janssens, I. **2006**. Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature*, **440(7081)**, 165–73.

Davies, B.E., **1995**. Lead. In: Heavy metals in soils. B.J. Alloway (Ed). *Blackie*, pp. 206-223

DECRETO LEGISLATIVO 29 aprile 2010, n. 75. Riordino e revisione della disciplina in materia di fertilizzanti, a norma dell'articolo 13 della legge 7 luglio 2009, n. 88.

DECRETO LEGISLATIVO 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia ambientale.

Ding X., Han X., Liang Y., Qiao Y., Li L., Li N., **2012**. Changes in soil organic carbon pools after 10 years of continuous manuring combined with chemical fertilizer in a Mollisol in China. *Soil & Tillage Research* **122**:36–41

Doran, J. W., & Zeiss, M. R. **2000**. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, **15(1)**, 3–11.

Entry, J.A., Backman, C.B., **1995**. Influence of carbon and nitrogen on cellulose and lignin degradation in forest soils. *Can. J. For. Res.* **25**, 1231–1236.

EnejiAE, HonnaT, Yamamoto S, MasudaT, EndoT, IrshadM. The relationship between total and available heavy metals in composted manure. *J Sustain Agric* 2003;23:125–34

Esen, A. **1993**. β -glucosidases: overview. In: Esen, A., beta glucosidases: biochemistry and molecular biology. American chemical society. Washington DC, pp.1-14.

Eivazi F., Tabatabai, M.A., **1988**. Glucosidases and agalactosidases in soils. *Soil Biol. Biochem.* **20**, 601–606.

Eivazi, F., Bayan, M.R., **1996**. Effects of long-term prescribed burning on the activity of select soil enzymes in an oak-hickory forest. *Canadian Journal of Forest Research*. **26**, 1799–1804.

Fagnano M., Adamo P., Zampella M., Fiorentino N. **2011**. Environmental and agronomic impact of fertilization with composted organic fraction from municipal solid waste: A case study in the region of Naples, Italy. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **141**:100–107

Fangueiro, D., Chadwick, D., Dixon, L., & Bol, R. **2007**. Quantification of priming and CO₂ emission sources following the application of different slurry particle size fractions to a grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **39(10)**, 2608–2620.

Garrett R **1996**. Natural sources of cadmium. In: OECD Proceedings – Sources of cadmium in the environment. OECD, Paris, pp 149–161

Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D., **2004**. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiology Ecology* **47**, 51–64.

García, C., & Hernández, T. **1997**. Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion. *Soil Biology and Biochemistry*, **29(2)**, 171–177.

García C, Moreno JL, Hernández T, Costa F, Polo A., **1995**. Effect of composting on sewage sludges contaminated with heavy metals. *Bioresour Technol*; **53**:13–9.

Gardi, C., Montanarella, L., Arrouays, D., Bispo, a., Lemanceau, P., Jolivet, C., Mulder, C., et al. **2009**. Soil biodiversity monitoring in Europe: ongoing activities and challenges. *European Journal of Soil Science*, **60(5)**, 807–819.

Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. C., & Seoane, S. **2005**. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry*, **37(5)**, 877–887.

Gigliotti G, Businelli D, Giusquiani PL. 1996. Trace metals uptake and distribution in corn plants grown on a 6-year urbanwaste compost amended soil. *Agric Ecosyst Environ*; **58**:199–206

Goldberg, L.F., Farini, A., **1994**. Complejo di scambio. In: *Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo*. Ministero delle Risorse Agricole, Alimentari e Forestali; pp. 139-154.

González-Ubierna S., Jorge-Mardomingo I., Carrero-González B., de la Cruz M.T., Casermeiro M.A., **2012**. Soil organic matter evolution after the application of high doses of organic amendments in a Mediterranean calcareous soil. *J Soils Sediments* **12**:1257–1268

Guo, J. H., Liu, X. J., Zhang, Y., Shen, J. L., Han, W. X., Zhang, W. F., Christie, P., et al. **2010**. Significant acidification in major Chinese croplands. *Science (New York, N.Y.)*, **327(5968)**, 1008–10.

Hargreaves JC, Adl MS,Warman PR., **2008**. A review of the use of composted municipal solid waste in agriculture. *Agric Ecosyst Environ*. **123**:1–14.

Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., et al. **2010**. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107(10)**, 4612–7.

Hewson, I. and J.A. Fuhrman. **2004**. Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 3425-3433.

Heywood V.H. **1993**. Global biodiversity assessment. *United Nations Environment Programme*.

Horrigan, L., Lawrence, R. S., & Walker, P. **2002**. Review How Sustainable Agriculture Can Address the Environmental and Human Health Harms of Industrial Agriculture. *Research Review*, **110(5)**, 445–456.

Hutchinson, T.C., **1981**. In *Effect of Heavy Metal Pollution on Plants*. Vol.1 ed. N.W. Lepp. Applied Science Publishers, London

Iovieno, P., Morra, L., Leone, a., Pagano, L., & Alfani, a. **2009**. Effect of organic and mineral fertilizers on soil respiration and enzyme activities of two Mediterranean horticultural soils. *Biology and Fertility of Soils*, **45(5)**, 555–561.

International Standard Organization (ISO), **1996**. Soil quality. Vocabulary. Part 1: Terms and definitions relating to the protection and pollution of the soil, 22 pp.

Iserentant R, De Sloover JR. **1976**. Le concept de bioindicateur: Communication presente au Symposium MEthods Biologiques de Dete'ction ed d'Evaluation de la Pollution des milieux continentaux. *Soc Roy Bot Belgique* **7**: 15–24.

ISPRA **2013**, *Rapporto Rifiuti Urbani 2013*.

Kabata-Pendias, A. and Pendias, H., **1992**. Trace Elements in Soils and Plants 2nd edition. CRC Press, Baton Rouge, Fa.

Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A.B., **2007**. Trace Elements from Soil to Human. Springer, Berlin, Heidelberg.

Karlen D. L., Mausbach M. J., Doran J. W., Cline R. G., Harris R. F., and Schuman G. E., **1997**. Soil Quality: A Concept, Definition, and Framework for Evaluation. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61:4-10

Keener H M, Marugg C, Hansen R C and Hoitink H. **1993** Optimizing the efficiency of the compost process. In: *Science and engineering of composting: design, environmental, microbiological and utilization aspect* Editors: Hoitink H A and Keener H, Renaissance Publications. Worthington. pp 59-94

Kiekens, L., **1995**. Zinc. In: *Heavy metals in soils*. B.J. Alloway (Ed). Blackie, pp. 284-305

Kourtev, P.S., Ehrenfeld, J.G., Haggblom, M., **2002**. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil. *Ecology* **83**, 3152–3166.

Joergensen, R. G., Wu, J., & Brookes, P. C. **2011**. Measuring soil microbial biomass using an automated procedure. *Soil Biology and Biochemistry*, **43(5)**, 873–876.

Jordão CP, Nascentes CC, Cecon PR, Fontes RLF, Pereira JL. 2001. Heavy metal availability in soil amended with composted urban solids. *Environ Monit Assess* **112**:309–26

Lavelle, P., Decaëns, T., Aubert, M., Barot, S., Blouin, M., Bureau, F., Margerie, P., et al. **2006**. Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology*, **42**, S3–S15.

Leita L, De Nobili M. **1991**. Water-soluble fractions of heavy metals during composting of municipal solid waste. *J Environ Qual*; **20**:73–8.

Lindsay, W.L., Norvell, W.A., **1978**. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **42**:421–428.

Liu J., Schulz H., Brandl S., Miehtke H., Huwe B., and Glaser B., 2012. Short-term effect of biochar and compost on soil fertility and water status of a Dystric Cambisol in NE Germany under field conditions. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **175**, 698–707

Lopez-Capel, E., Krull, E.S., Bol, R., Manning, D.A., **2008**. Influence of recent vegetation on labile and recalcitrant carbon soil pools in central Queensland Australia: evidence from thermal analysis–quadrupole mass spectrometry–isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 1751–1758.

Lounghney, K., Lund, E. & Dahlberg, J.E. **1983**. *Nucl. Acids Res.* 10, 1607–1624.

Martens DA, Johanson JB, Frankenberger Jr WT., **1992**. Production and persistence of soil enzymes with repeated addition of organic residues. *Soil Sci.* **153**:53–61.

Martinez-Salgado M,M., Gutiérrez-Romero, V., Jannsens, M., Ortega-Blu, R. **2010**. Biological soil quality indicators : a review. *Current Research, Technology and Educations Topics in Applied Microbiology*, 319–328.

Mattix, K. D., Winchester, P. D., & Scherer, L. R. T. **2007**. Incidence of abdominal wall defects is related to surface water atrazine and nitrate levels. *Journal of pediatric surgery*, **42(6)**, 947–9.

McClougherty, C., Berg, B., **1987**. Cellulose, lignin and nitrogen concentrations as rate regulating factors in late stages of forest litter decomposition. *Pedobiologia* **30**, 101–112.

McGrath, S.P., **1995**. Chromium and Nickel. In: *Heavy metals in soils*. B.J. Alloway (Ed). Blackie, pp. 152–177.

Mclauchlan, K. K., & Hobbie, S. E. **2004**. Comparison of Labile Soil Organic Matter Fractionation Techniques. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **68**:1616–1625

Millennium Ecosystem Assessment. maweb.org. **2005**.

Montemurro, F., Maiorana, M., Convertini, G., Ferri, D., **2006**. Compost organic amendments in fodder crops: effects on yield, nitrogen utilization and soil characteristics. *Compost Sci. Util.* **14** (2), 114–123.

Morra L., Bilotto M., Pagano L., Calì M., Iovieno P., Tonini A. **2006**. Studio degli effetti dell'ammendamento con compost in un agrosistema orticolo sotto serra attraverso l'analisi della produzione colturale, della fertilità chimica del terreno e della micorrizzazione radicale. *Atti del Convegno "Utilizzo del compost da frazione organica dei rifiuti solidi urbani: attualità e prospettive"*, 55-82.

Mosier, a. R. **1998**. Soil processes and global change. *Biology and Fertility of Soils*, **27**(3), 221–229.

Nannipieri, P., Greco, S & Ceccanti, B., **1990**. Ecological significance of the biological activity in soil. In: *Soil Biochemistry*, vol. 6 ed. J.M Bollag & G. Stozky, pp.293-355. Marcel Dekker, New York.

Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., **2002**. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burn, R.G., Dick, R. (Eds.), *Enzymes in the Environment*. Marcel Dekker, New York, pp. 1–33

Oades, J. M. **1988**. The retention of organic matter in soils. *Biogeochemistry*, **5**(1), 35–70.

Odum E.P., **1969**. The strategy of ecosystem development. *Science*, **164** (3877): 262–270.

Pankhurst, L. J., Whitby, C., Pawlett, M., Larcombe, L. D., McKew, B., Deacon, L. J., Morgan, S. L. **2012**. Temporal and spatial changes in the microbial bioaerosol communities in green-waste composting. *FEMS microbiology ecology*, **79**(1), 229–39.

Pimentel, D., Hepperly, P., Hanson, J., Douds, D., & Seidel, R. **2005**. Environmental, Energetic, and Economic Comparisons of Organic and Conventional Farming Systems. *BioScience*, **55**(7), 573.

Power, A. G. **2010**. Ecosystem services and agriculture: tradeoffs and synergies. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **365**(1554), 2959–71.

Poulton P.R. **1995**. The importance of long-term trials in understanding sustainable farming systems: the Rothamsted experience. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **35**: 825-834.

Ranjard, L., Poly, F., Lata, J.-C., Mougel, C., Thioulouse, J., Nazaret, S., **2001**. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4479–4487

Rodríguez-Loinaz, G., Onaindia, M., Amezaga, I., Mijangos, I., & Garbisu, C. **2008**. Relationship between vegetation diversity and soil functional diversity in native mixed-oak forests. *Soil Biology and Biochemistry*, **40(1)**, 49–60.

Ros, M., Pascual, J.A., Garcia, C., Hernandez, M.T., Insam, H., **2006**. Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biology and Biochemistry* **38**, 3443:3452.

Regione Campania, Assessorato Agricoltura-Sesirca, **2003**. Guida alla concimazione. www.sito.regione.campania.it/agricoltura/concimazione/guida.htm.

REGOLAMENTO (CE) N. 1881/2006 DELLA COMMISSIONE del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari.

Rovira, P., & Ramo, V. **2002**. Labile and recalcitrant pools of carbon and nitrogen in organic matter decomposing at different depths in soil: an acid hydrolysis approach. *Geoderma*, **107**, 109 – 141.

Rovira, P., & Ramón Vallejo, V. **2007**. Labile, recalcitrant, and inert organic matter in Mediterranean forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **39(1)**, 202–215.

Ruf, a., Beck, L., Dreher, P., Hund-Rinke, K., Römbke, J., & Spelda, J. **2003**. A biological classification concept for the assessment of soil quality: “biological soil classification scheme” (BBSK). *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **98(1-3)**, 263–271.

Saison C. Degrange V., Oliver R., Millard P., Commeaux C., Montange D., Le Roux X., **2006**. Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environmental Microbiology* **8**: 247–257

Sánchez-Monedero, M. a., Mondini, C., Cayuela, M. L., Roig, a., Contin, M., & Nobili, M. 2008. Fluorescein diacetate hydrolysis, respiration and microbial biomass in freshly amended soils. *Biology and Fertility of Soils*, **44(6)**, 885–890.

Saviozzi, A., Cardelli, R., & Riffaldi, R. **2001**. A comparison of soil quality in adjacent cultivated , forest and native grassland soils. *Plant and Soil* **233**: 251–259, (1991), 251–259.

Schlesinger W.H. **1997**. Biogeochemistry: An Analysis of Global Change. 2nd. Edition. *Elsevier Academic Press*, San Diego, CA.

Schloss, P.D., Hay, A.G., Wilson, D.B., and Walker, L.P. **2003**. Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting. *FEMS Microbiol Ecol* **46**: 1–9.

Schlöter, M., Dilly, O., & Munch, J. 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **98(1-3)**, 255–262.

Schnurer, J., & Rosswall, T. 1982. Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter. *Applied and Environmental Microbiology*. **43(6)**, 1256–1261.

Sequi, P., 1993. *Chimica del suolo*. Patron Editore

Sharma, V.K., Canditelli, M., Fortuna, F., Cornacchia, G., 1997. Processing of urban and agro-industrial residues by aerobic composting: review. *Energy Convers. Manage.* **38**, 453–478.

Silveira, M. L., Comerford, N. B., Reddy, K. R., Cooper, W. T., & El-Rifai, H. 2008. Characterization of soil organic carbon pools by acid hydrolysis. *Geoderma*, **144(1-2)**, 405–414.

Sinsabaugh, R. L., Carreiro, M. M., & Repert, D. A. 2002. Allocation of extracellular enzymatic activity in relation to litter composition, N deposition, and mass loss. *Biogeochemistry* **60**: 1–24.

Six, J., Elliott, E. T., Paustian, K., & Doran, J. W. 1998. Aggregation and Soil Organic Matter Accumulation in Cultivated and Native Grassland Soils. *Soil Science Society of America Journal*, **62(5)**, 1367.

Smith SR., 1994a. Effect of soil pH on availability to crops of metals in sewage sludge-treated soils. I. Nickel, copper and zinc uptake and toxicity to ryegrass. *Environ Pollut*; **85**:321–7.

Smith SR., 1994b. Effect of soil pH on availability to crops of metals in sewage sludge-treated soils. II. Cadmium uptake by crops and implications for human dietary intake. *Environ Pollut*; **86**:5–13.

Smith, K.A., Paterson, J.E., 1995. Manganese and cobalt. In: Heavy metals in soils. B.J. Alloway (Ed). Blackie, pp. 224-244.

Smith, S. R. 2009. A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environment international*, **35(1)**, 142–56.

Soudek, P., Kotyza, J., Lenikusová, I., Petrová, Š., Benešová, D., & Vaněk, T. 2009. Accumulation of heavy metals in hydroponically cultivated garlic (*Allium sativum* L.), onion (*Allium cepa* L.), leek (*Allium porrum* L.) and chive (*Allium schoenoprasum* L.). *Journal of Food, Agriculture & Environment*. **Vol.7 (3&4)**, 761–769.

Stevenson F.J. 1994. *Humus Chemistry*. 2nd edn. John Wiley & Sons, New York.

Taylor Barry R., Parkinson Dennis, & Parsons William F. J. **1989**. Nitrogen and Lignin Content as Predictors of Litter Decay Rates. *Ecological Society of America*. **70(1)**, 97–104.

Taylor MD, Percival HJ **2001**. Cadmium in soil solutions from a transect of soils away from a fertilizer bin. *Environ Pollut* **113**:35–40

Tisdell SE, Breslin VT, **1995**. Characterization and leaching of elements from municipal solid waste compost. *J Environ Qual*; **24**:827–33.

Torsvik V, Salte K, Sorheim R and Goksoyr J **1990** Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Env.Microbiol.* **56**, 776–781

Torsvik V, Sorheim R and Goksoyr J **1996** Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. *J. Ind. Microbiol.* **17**, 170–178.

Underwood, T., McCullum-Gomez, C., Harmon, A., & Roberts, S. 2011. Organic Agriculture Supports Biodiversity and Sustainable Food Production. *Journal of Hunger & Environmental Nutrition*, **6(4)**, 398–423.

Vallejo, V.R., **1993**. Evaluation of C:N ratio as a parameter of N mineralization. *Mitt. Oesterr. Bodenkd. Ges.* **47**, 71–78.

Vance E. D., Brooke P. C. & Jenkinson D. S. **1987**. An extraction method for measuring microbial biomass c. *Soil Biol. Biochem.* **19(6)**, 703–707.

Van-camp, L., Bujarrabal, B., Gentile, A. R., Jones, R. J. A., Montanarella, L., Olazabal, C., & Selvaradjou, S. **2004**. REPORTS OF THE TECHNICAL WORKING GROUPS VOLUME - IV.

von Lutzow, M., Kogel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Matzner, E., Guggenberger, G., Marschner, B., Flessa, H., **2006**. Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions-a review. *European Journal of Soil Science* **57**, 426:445.

von Lützw, M., Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Flessa, H., Guggenberger, G., Matzner, E., & Marschner, B. **2007**. SOM fractionation methods: Relevance to functional pools and to stabilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, **39(9)**, 2183–2207.

Watson, C.A., Atkinson, D., Gosling, P., Jackson, L.R., Rayns, F.W., **2002**. Managing soil fertility in organic farming systems. *Soil Use and Management* **18**, 239–247.

Waldrop, M. P., Balser, T. C., & Firestone, M. K. **2001**. Linking microbial community composition to function in a tropical soil, *Soil Biology and Biochemistry* **32**, 1837–1846.

Ward MH, Kilfoy BA, Weyer PJ, Anderson KE, Folsom AR, Cerhan JR. **2010**. Nitrate Intake and the Risk of Thyroid Cancer and Thyroid Disease. *NIH Public Access, Epidemiology* **21(3)**, 389–395.

Warman P. R., Vernon Rodd A., Hicklenton P., **2011**. The Effect of MSW Compost and Fertilizer on Extractable Soil Elements, Tuber Yield, and Elemental Concentrations in the Plant Tissue of Potato. *Potato Research* **54**:1–11

Wei Y, Liu Y., **2005**. Effects of sewage sludge compost application on crops and cropland in a 3- year field study. *Chemosphere*. **59**:1257–65.

Winchester, P. D., Huskins, J., & Ying, J. **2009**. Agrichemicals in surface water and birth defects in the United States. *Acta paediatrica*, **98(4)**, 664–9.

Zaccardelli M., Perrone D., Mazzella A., Del Galdo A., Giordano I. , **2006**. Valutazione bio-agronomica di una successione triennale di colture industriali e ortive in un terreno della Piana del Sele ammendato con compost da F.O.R.S.U. *Atti del Convegno "Utilizzo del compost da frazione organica dei rifiuti solidi urbani: attualità e prospettive"*, 55-82.

Zhao FJ, Dunham SJ, McGrath SP. **1997**. Lessons to be learned about soil-plant metal transfers from the 50-year sewage sludge experiment at Woburn, UK. *Fourth international conference on the biogeochemistry of trace elements*, 23–26 June. Berkeley: University of California.

Zheljazkov, V. D., & Warman, P. R. **2004b**. Phytoavailability and fractionation of copper, manganese, and zinc in soil following application of two composts to four crops. *Environmental pollution*, **131(2)**, 187–95.

Yannarell, A. C., and E. W. Triplett. **2004**. Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:214–223

Yannarell AC & Triplett EW **2005**. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl Environ Microbiol* **71**: 227–239.

Yu H.Y., Ding W.X., Luo J.F., Donnison A. & Zhang J.B., **2012**. Long-term effect of compost and inorganic fertilizer on activities of carbon-cycle enzymes in aggregates of an intensively cultivated sandy loam. *Soil Use and Management*. **28**, 347–360

