

**CREA - Centro di Ricerca per lo Studio delle Relazioni tra  
Pianta e Suolo**  
**Via della Navicella, 2 – 00184 Roma**  
**[anna.benedetti@crea.gov.it](mailto:anna.benedetti@crea.gov.it)**

**Anna Benedetti**  
**Tecniche di ripristino della fertilità biologica del suolo**

*Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria*  
*Centro di Ricerca per lo Studio delle Relazioni tra Pianta e Suolo*  
*CREA-RPS*

**[anna.benedetti@crea.gov.it](mailto:anna.benedetti@crea.gov.it)**

***Piacenza 19-20 maggio 2016***

# Definizione di fertilità biologica

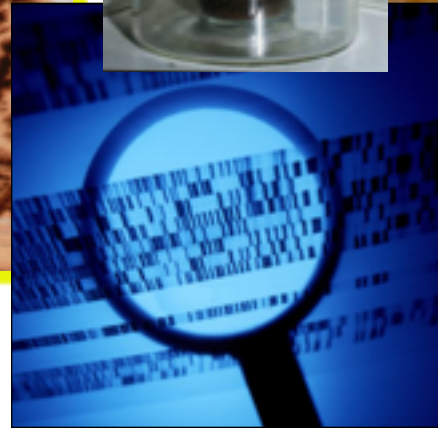
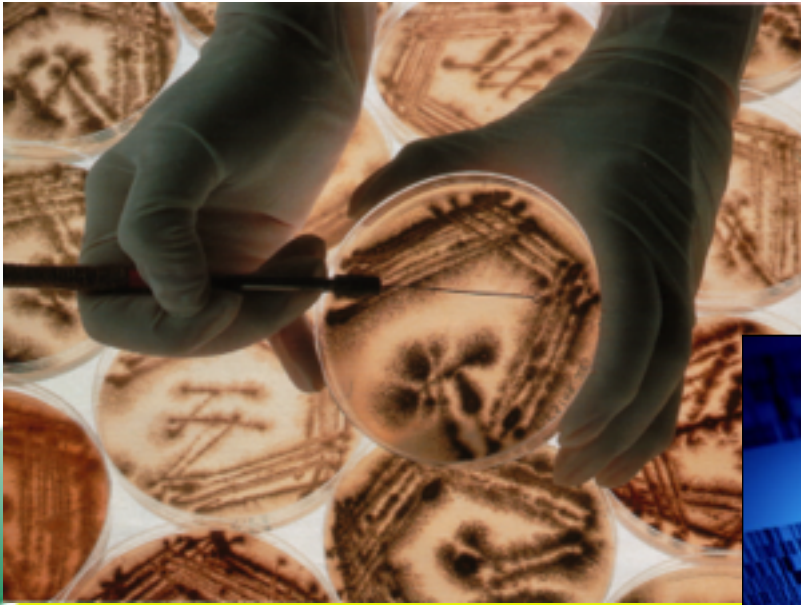


La **fertilità biologica** di un suolo può essere definita come la quantità di **organismi viventi** nel suolo ed il loro potenziale di attività.

E' rappresentata dal grado di fertilità che un suolo riesce ad esprimere nei confronti dei **cicli biogeochimici** degli elementi chimici e del **metabolismo** degli elementi nutritivi del suolo nei confronti del sostegno alla pianta.

E' fortemente correlata al quantitativo di **sostanza organica** presente ed al suo livello di stabilità nonché al livello di biodiversità

# Risorse genetiche microbiche del suolo





# Quali possono essere le cause di perdita di fertilità biologica?

## **Pressioni**

Erosione

Perdita di sostanza organica e fertilità

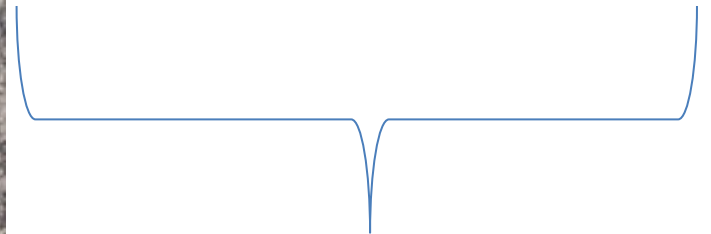
Frane

Cementificazione

Salinizzazione

Compattazione

Inquinamento



**Perdita di biodiversità**



## **Metalli pesanti**

Rame, zinco, cadmio, piombo, cromo, ecc.

- **Elementi indesiderati e xenobiotici**

## **Residui di Fitofarmaci**

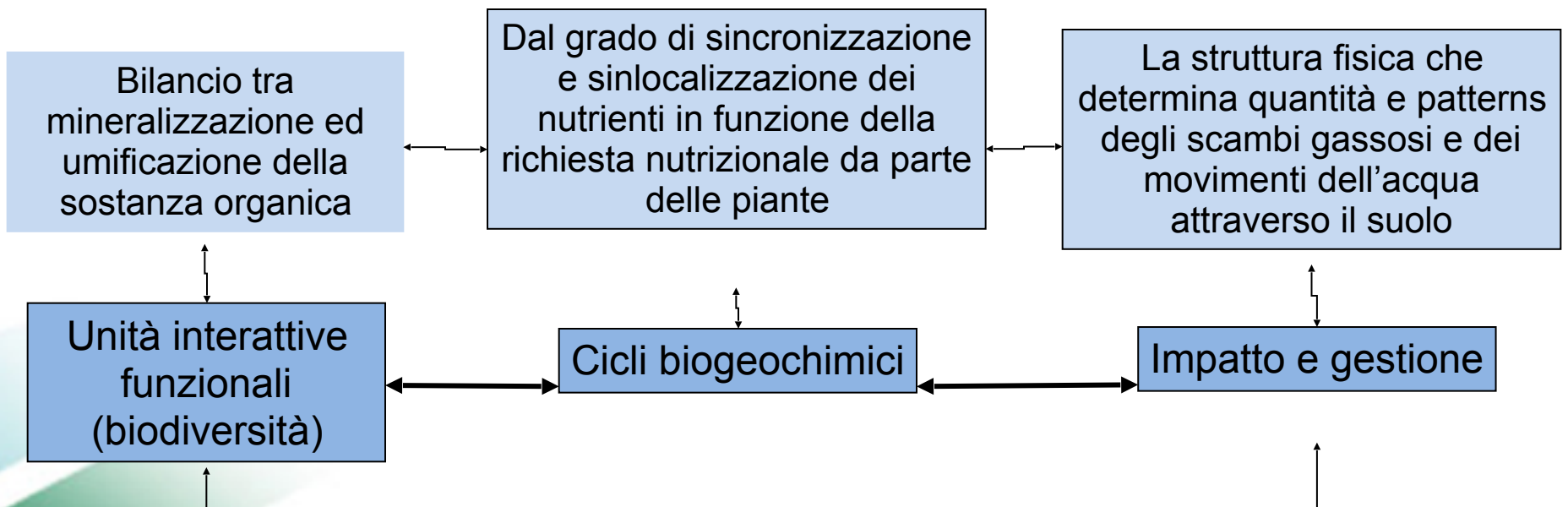
**Nitrati e Nitriti**

**Patogeni**

**OGM**



# Funzionamento del suolo (Lavelle e Spain 2001)



## Ciclo dell'azoto

- a) **azotofissazione biologica;**
- b) **azotofissazione industriale;**
- c) **assorbimento vegetale;**
- d) **immobilizzazione;**
- e) **nitrificazione;**
- f) **denitrificazione;**
- g) **utilizzo da parte degli animali;**
- h) **Mineralizzazione;**

# E' possibile recuperare un suolo dal punto di vista biologico?



- Funzioni biologiche del suolo  
Biological systems of regulation (BSR)
- Sono garantite dall'attività degli organismi viventi nel suolo, definiti unità interattive funzionali, delle quali l'80-85% a carico dei microrganismi in relazione ai differenti pools funzionali del suolo:
- Rapidamente decomponibile "metabolica" (0,1-1 anno)
- Strutturalmente resistente (2-5 anni)
- Sostanza organica attiva (2-4 anni)
- Lenta o fisicamente stabilizzata (20-50 anni)
- Passiva o chimicamente protetta (800-1200 anni)

(Jenkinson 1987)

# Conoscere per recuperare



Individuare la causa

Individuare il metodo diagnostico

Quantificare l'entità del danno

Quantificare il livello di intervento

Individuare la tecnica

Definire la procedura

Stabilire la tempistica

Dotarsi di indicatori di efficacia  
del trattamento

Effettuare il monitoraggio nel tempo  
per valutare il successo dell'azione di  
rispristino

Stabilire l'uso del suolo



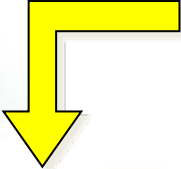


**Fertilità biologica del suolo**

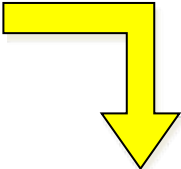


**Metodi convenzionali  
Chimici e Biochimici**

**Biotecnologie molecolari**



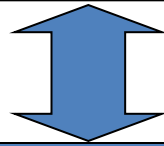
**Indicatori di qualità e sostenibilità del  
suolo**



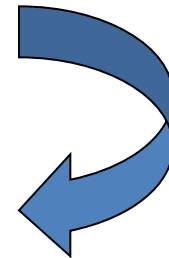
**Biodiversità e risorse genetiche microbiche  
del suolo**



Pool metabolico  
Servizi ecosistemici



Biodiversità



**Funzionale**  
Metodi biochimici  
Metodi Microbiologici  
Metodi ecofisiologici

**Genetica**  
Metodi molecolari

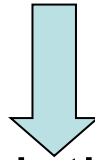
Metafenomica

Metagenomica

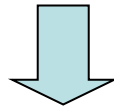


# La respirazione del terreno

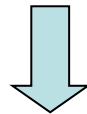
- La respirazione del terreno come indice di fertilità biologica



- Effetto di sostanze xenobiotiche sulla respirazione / impatto sulla fertilità biologica



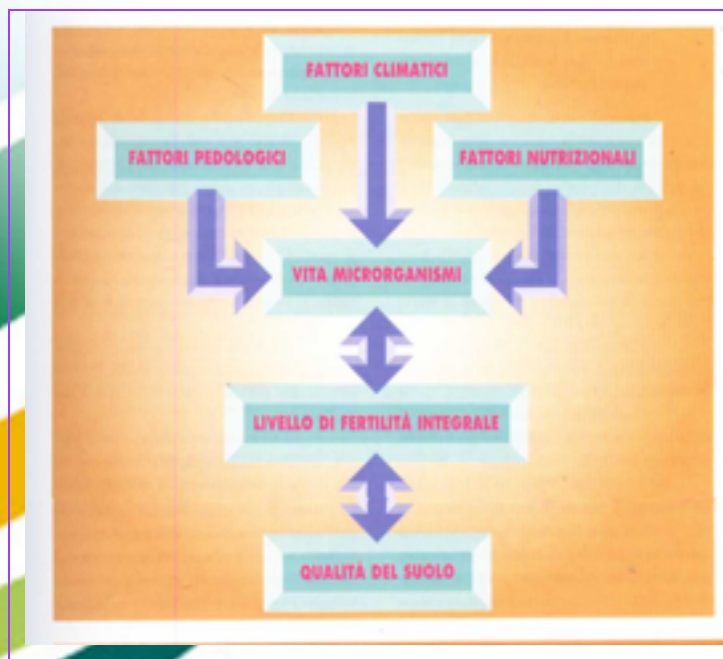
- La respirazione del terreno come indicatore di qualità del suolo



- Analisi seriale della fertilità biologica (caratterizzazione della fertilità biologica dei suoli)



La fertilizzazione organica dei suoli





**QUALITÀ DEL SUOLO**

**USO DEL SUOLO**

**INDICATORI ADATTI PER CIASCUN OBIETTIVO**





La qualità ambientale di un'area o di un territorio può essere stimata e rappresentata con l'uso di opportuni indicatori. Questi possono essere definiti come strumenti in grado di rappresentare, con differenti livelli di approssimazione, particolari condizioni (eventi, processi, stati complessivi di qualità o criticità) dell'ambiente.

Un buon indicatore deve avere alcune caratteristiche riassumibili in: rappresentatività, accessibilità, affidabilità e operatività.

Gli ecosistemi suolo sono di una tale complessità che i microrganismi, anche in un suolo sano, sono difficilmente esposti alla fluttuazione di un singolo fattore ancorché naturale; inoltre la combinazione di più fattori di stress produce, nella comunità microbica, risposte non ravvisabili attraverso lo studio di un'unica proprietà del suolo (Nannipieri e coll, 1990).

- La biomassa microbica del suolo è composta in ogni istante di un insieme di cellule attive ed in continua crescita e da cellule dormienti o quiescenti (Lynch, Panting; 1980).

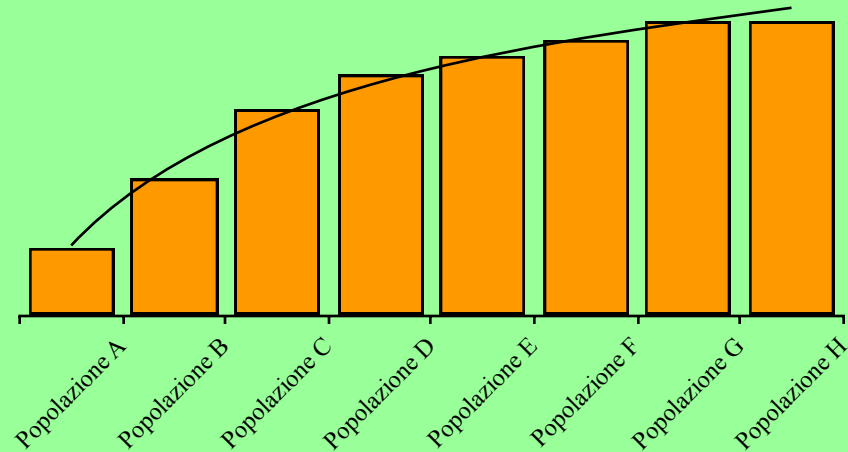


Appare di fondamentale importanza, individuare la relazione esistente tra il mantenimento della funzionalità di un agroecosistema e la variabilità microbica indotta da mutamenti nei costituenti dell'ecosistema stesso.



I	II	III	IV
Biomassa e carica microbica del suolo	Attività microbica del suolo	Diversità microbica nel suolo e struttura della comunità	Relazioni pianta-microrganismi
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tecniche di fumigazione con cloroformio</li> <li>- Respirazione indotta da substrato</li> <li>- ATP</li> <li>- Conte dirette</li> </ul>	<p>(Senza substrato)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Respirazione del suolo</li> <li>- Mineralizzazione dell'azoto</li> </ul> <p>(con substrato)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nitrificazione</li> <li>- Incorporazione di timidina e leucina</li> <li>- Test ecotossicologici</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Metodi microbiologici molecolari</li> <li>- Profili di utilizzo di substrati (CLPP)</li> <li>- Phospholipid ester-linked fatty acids (PFLA)</li> <li>- Profilo di attività enzimatica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Micorrize</li> <li>- Fissazione N<sub>2</sub></li> <li>- Capacità repressive</li> <li>- Microrganismi associativi</li> </ul>

Curva Cumulativa di Respirazione del Suolo



## COMPOSIZIONE DELLA COMUNITA'

### PRIMA dello stress

- 4 % A
- 8 % B
- 12 % C
- 14 % D
- 15 % E
- 16 % F
- 17 % G
- 17 % H

### DOPO lo stress

- 16 % A
- 14 % B
- 12 % C
- 17 % D
- 15 % E
- 4 % F
- 8 % G
- 17 % H



**NON CAMBIA LA  
DIVERSITA'  
FUNZIONALE MA  
CAMBIA LA DIVERSITA'  
GENETICA**

# Indice di fertilità del suolo basato sui parametri biochimici

I parametri biochimici scelti per la determinazione di questo indice sono quelli generalmente utilizzati per l'analisi e lo studio della qualità del suolo.

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

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

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

Classe di Fertilità	I	II	III	IV	V
	stanchezza allarme	stress preallarme	media	buona	alta
Punteggio	1-6	7-12	13-18	19-24	25-30

# Caso studio Maccarese

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

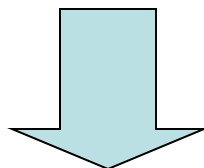
Sono stati quindi applicati alcuni indicatori per valutare il grado di fertilità biologica del suolo e, soprattutto, della sua diversità microbica



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



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



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

# Calcolo dell'IBF

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



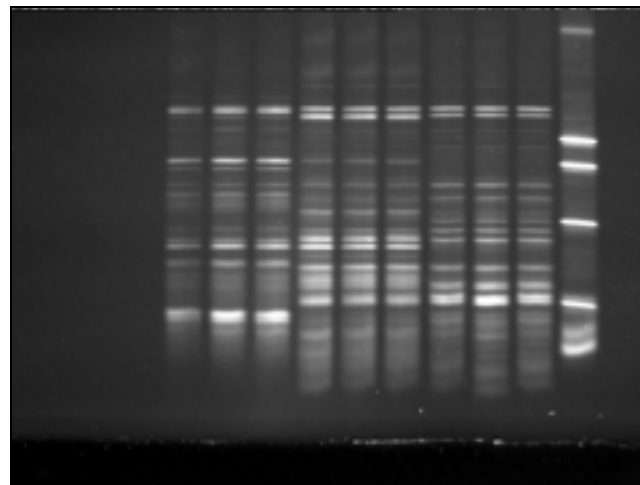
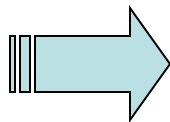
<u>Parametri analizzati</u>	<u>Punteggi assegnati</u>
Sostanza organica	1
Respirazione basale	1
Respirazione cumulativa	2
Carbonio microbico	1
Quoziente metabolico	2
Quoziente di mineralizzazione	3
<b>IBF</b>	<b>10</b>

# analisi ARDRA

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

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

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



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

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

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



**Analisi  
tassonomica**



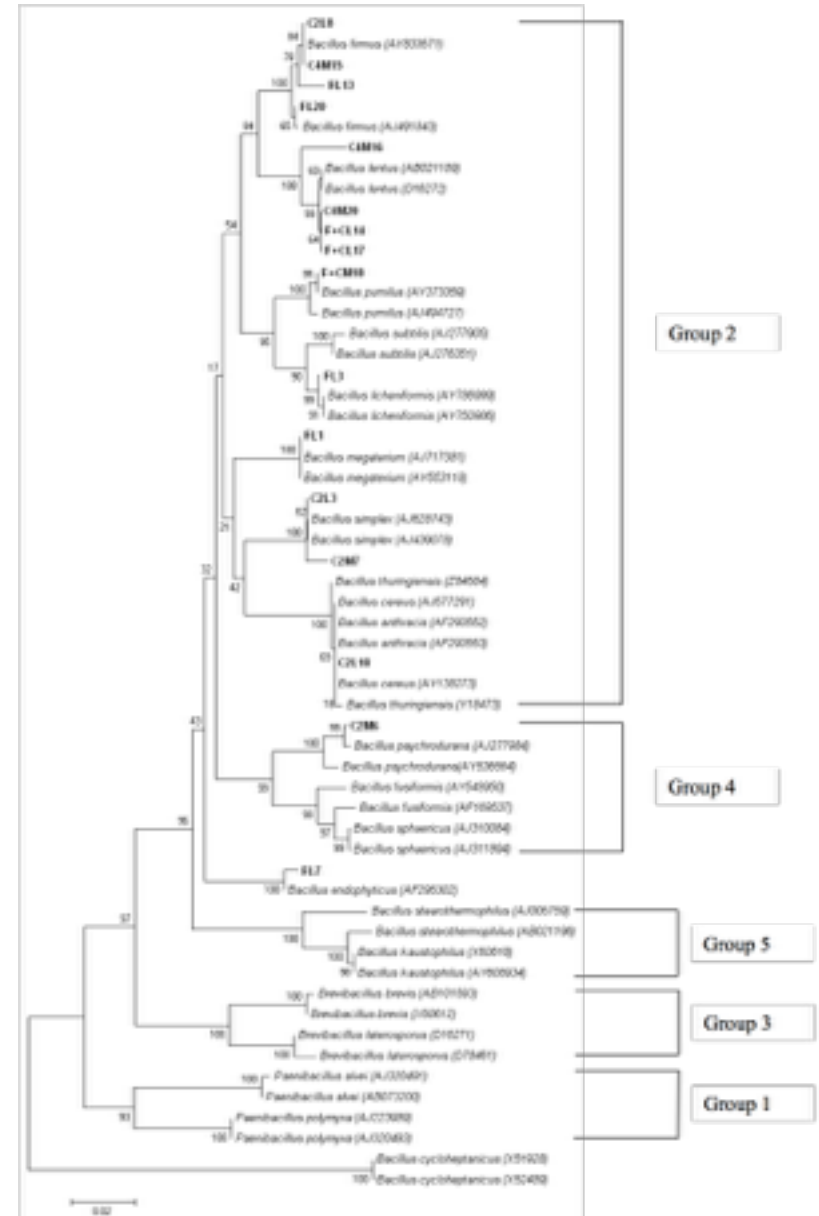
# Analisi tassonomica

# Sequenziamento del gene 16S rDNA



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

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





## 40% *B. firmus*, *B. simplex*

### Ipotesi:

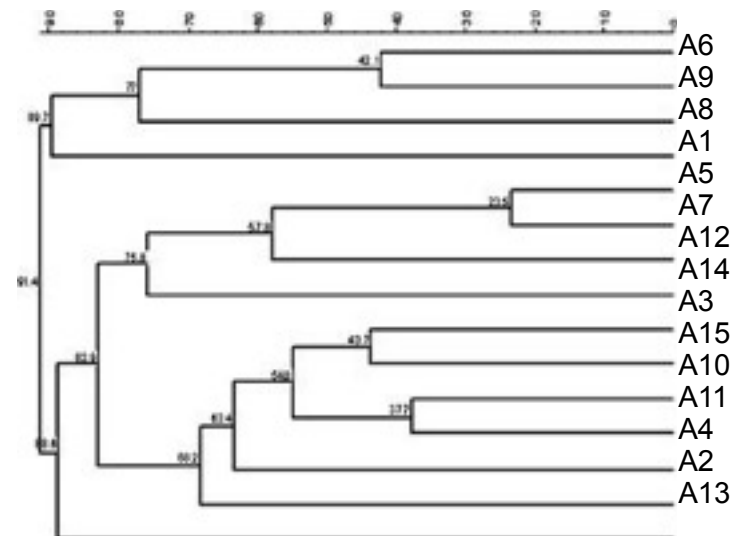
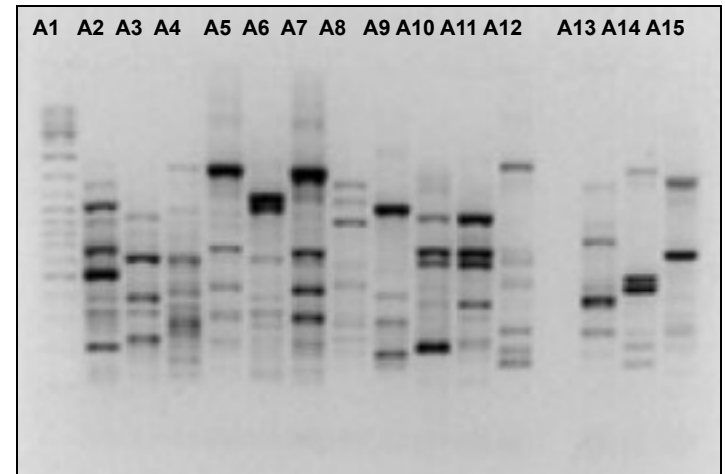
1) È possibile che la pressione selettiva indotta dal 1,3-D abbia fortemente favorito microrganismi resistenti ai fumiganti grazie alla formazione di spore.

2) Alcuni ceppi potrebbero essere sopravvissuti grazie alla capacità di degradare l'agente fumigante.

In questo caso l'analisi RAPD avrebbe dovuto evidenziare la selezione di ceppi particolari. La diversità intraspecifica tuttavia, non è influenzata dai diversi trattamenti (analisi AMOVA).

Il dato conferma l'ipotesi che la elevata presenza di batteri gram-positivi, in particolare di *Bacillus*, in suoli fumigati possa essere correlata alla loro capacità di formare spore come protezione contro il fumigante piuttosto che supporre la presenza di un set di geni per la degradazione del 1-3-D.

### Analisi RAPD dell'aplotipo A



# Che fare?

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

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

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

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

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



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

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

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

# CONCLUSIONI

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

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

# Quali tecniche adottare

Dispersione di microrganismi nel suolo (Bioaugmentation)

Inoculazione di microrganismi in piante (Biofertilizzazione)

Trattamento del suolo con microrganismi incorporati in biomasse  
(Ammendamento attraverso substrati arricchiti)

Potenziamento delle comunità autoctone attraverso pratiche agricole

Sinergia tra fitodepurazione e biodepurazione



# **FITORIMEDIO**

Negli ultimi trenta anni numerosi studi hanno permesso di stabilire che le piante sono in grado di svolgere funzioni utili per rimuovere sostanze inquinanti da suolo, terreni umidi, acque ed aria.

---

Piante con funzione di tolleranza verso la tossicità degli inquinanti

Piante dotate di meccanismi che permettono di assorbire un inquinante, trasportandolo nel suo interno e confinandolo in un compartimento per disattivare la sua tossicità sia mediante la sua completa o parziale degradazione metabolica, oppure mediante il suo sequestro (per esempio attraverso complessazione ed insolubilizzazione)

---



## **Assorbimento di nutrienti ed inquinanti a livello radicale**

Gli inquinanti entrano nelle piante attraverso un processo di assorbimento sulla superficie radicale. In una prima fase le molecole che sono vicine a zone di questa superficie, in cui si trovano derivati di fosfati, pectine, altri polisaccaridi e proteine, sono sottoposte a varie forze attrattive che le avvicinano e le concentrano trattenendole con debolissimi legami chimici.



FAO

## Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture

- The Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture is a permanent forum where governments discuss and negotiate matters relevant to biodiversity for food and agriculture. The main objectives of the Commission are to ensure the conservation and sustainable utilization of genetic resources for food and agriculture, as well as the fair and equitable sharing of benefits derived from their use, for present and future generations.
- Climatic change and microorganism genetic resources for food and agriculture:  
state of knowledge, risks and opportunities

*Spatial and time-related heterogeneity of complex soil microbial communities represents a thorny and challenging issue to investigate.*

*The perception of environmental variability and the scale at which specific properties, like salinity, are measured can misrepresent the spatial scale at which microbial groups differentiate their structure*



**Macro Scale**



*aggregation*

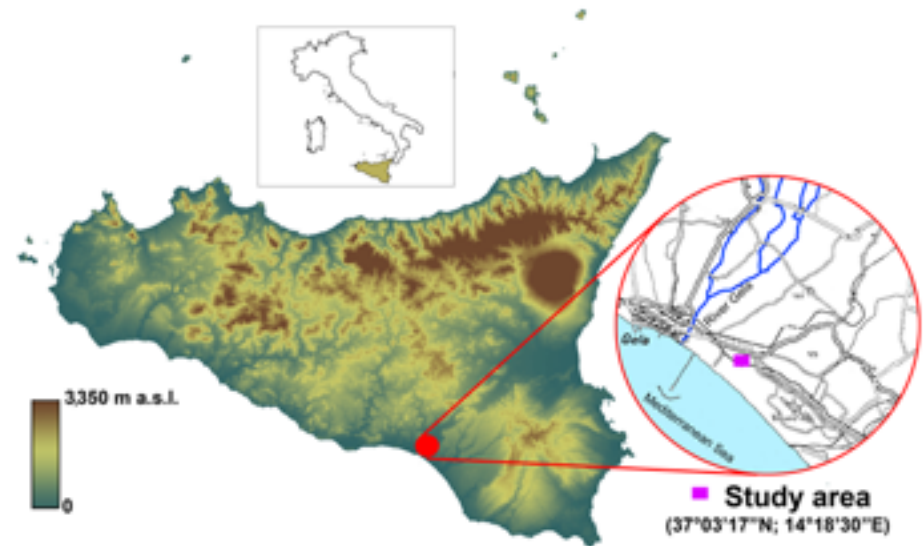


**Micro Scale**



# The study area

....some ecological contrasting variables acted as strong drivers in fungal, and bacterial spatial distribution. Furthermore, in this study the interface between biological and geochemical components in the surface of that peculiar habitat was investigated to evaluate the organization and diversity of the phototrophic and heterotrophic bacteria.

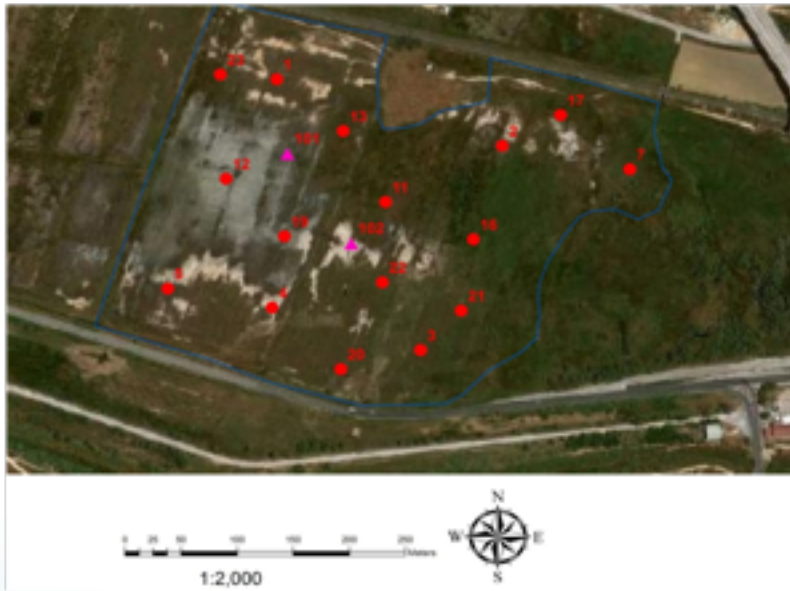


Canfora L\*, Bacci G., Pinzari F., Lo Papa G., Dazzi C Benedetti A. (2014) *Salinity and bacterial diversity: to what extent does the concentration of salt affect the bacterial community in a saline soil?* PLoS ONE 9(9): e106662. doi:10.1371/journal.pone.0106662.

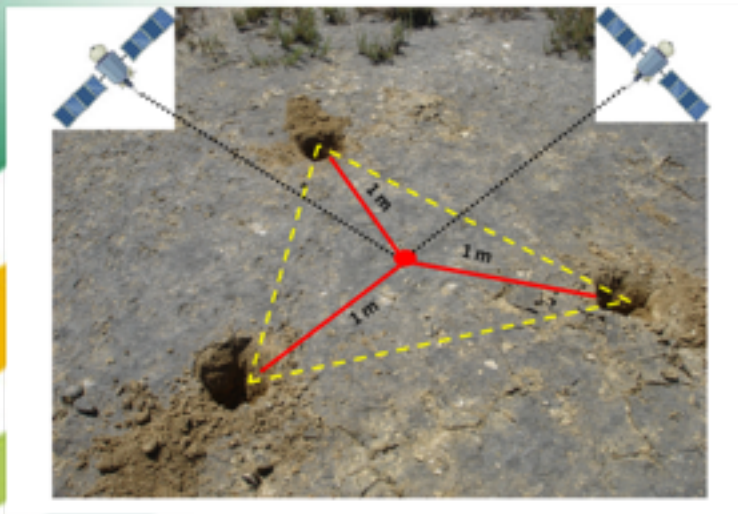
Canfora L\*, Lo Papa G., L. Vittori Antisari, Dazzi C., Benedetti A. (2015) *Spatial microbial community structure and biodiversity analysis in "extreme" hypersaline soils of a semiarid Mediterranean area.* Applied Soil Ecology 2015 93C, 120-129, doi: 10.1016/j.apsoil.2015.04.014.

Canfora L., Vendramin E., Vittori Antisari L., Lo Papa G., Dazzi C., Benedetti A., Iavazzo P., Adamo P. and Pinzari F\*. *Compartmentalization of gypsum and halite associated with cyanobacteria in saline soil crusts.* FEMS Microbial Ecology 2016, doi: 10.1093/femsec/fiw080.





**Salt soil crust in the site**



In the present study, the physical, chemical and microbiological soil properties were investigated in the shallower horizon of natural salt affected soils in Sicily (Italy)

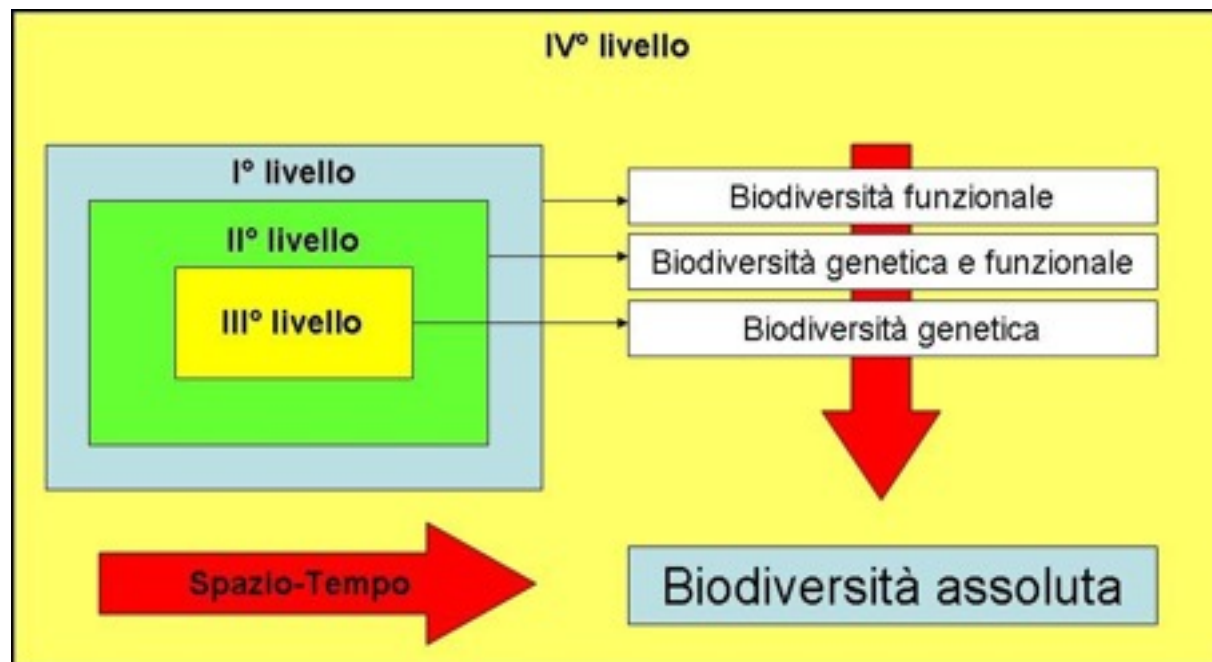
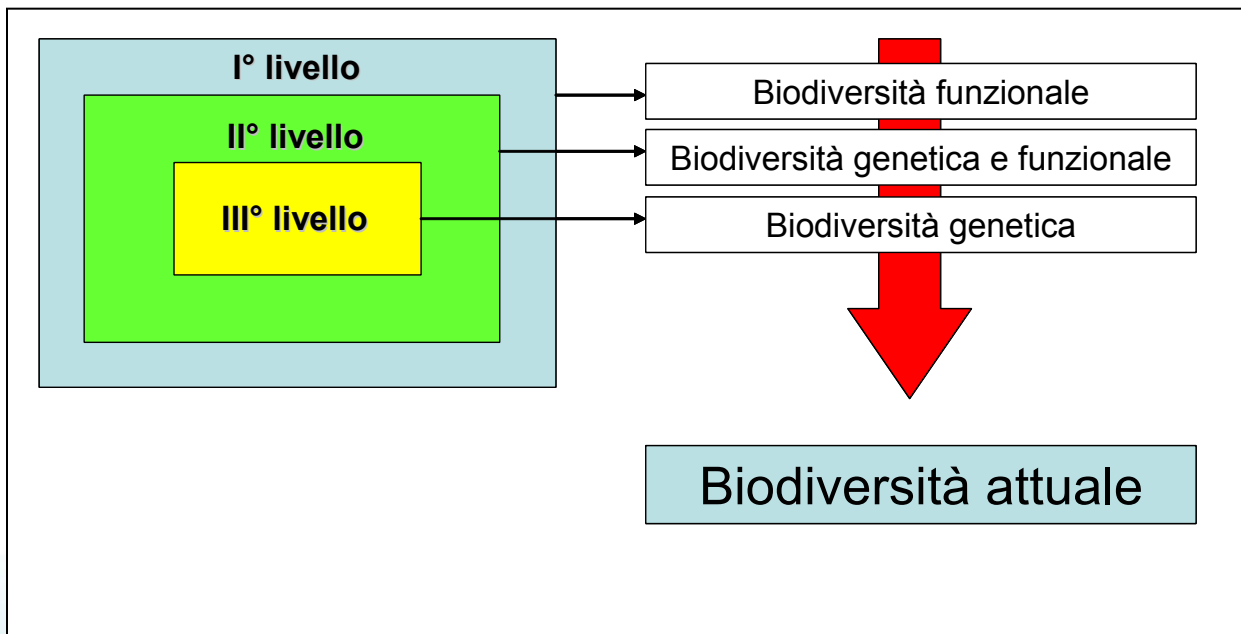


# Gerarchie di indicatori

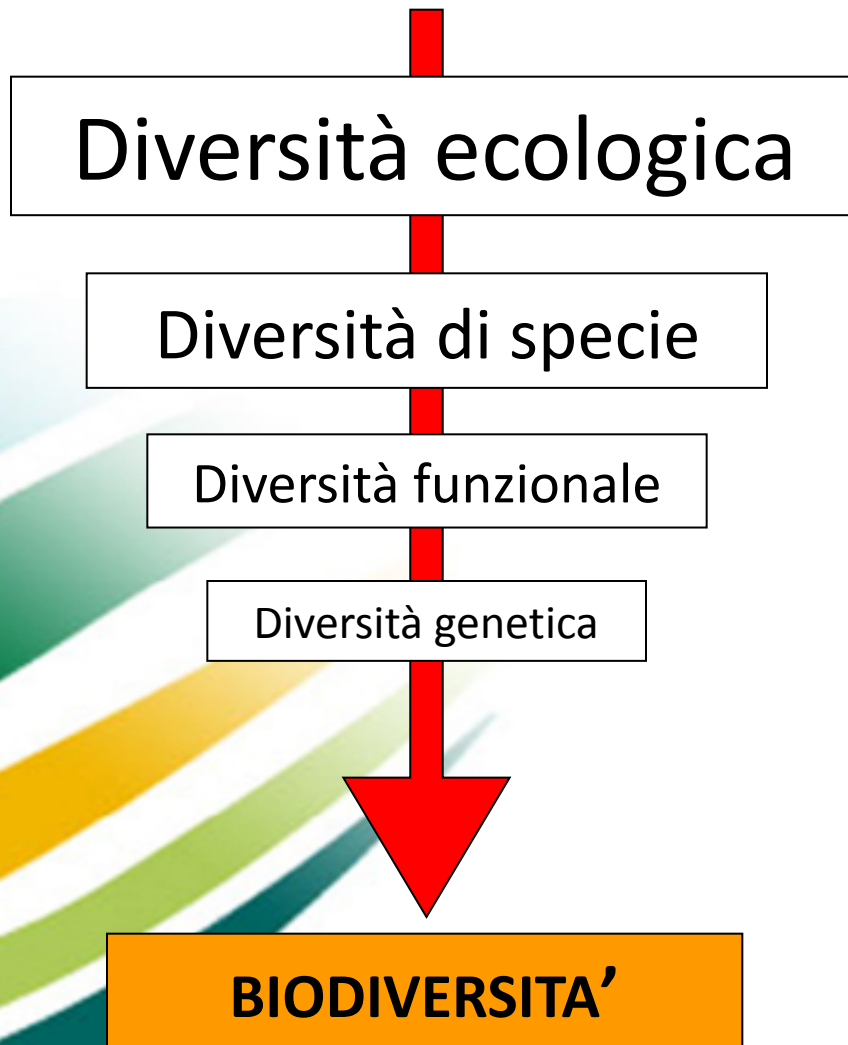
Non esistono veri e propri indici, intesi nel senso comune del termine, ma dei parametri che, se ben integrati, riescono a fornire indicazioni precise sul grado di fertilità biologica del suolo e sulla biodiversità ad essa associata. La caratterizzazione della diversità microbica di un suolo, e della sua biodiversità in genere, va perciò costruita per livelli di approssimazione.

Le analisi da condurre sono state suddivise in 4 livelli, sulla base del grado di approfondimento dell'informazione cercata:

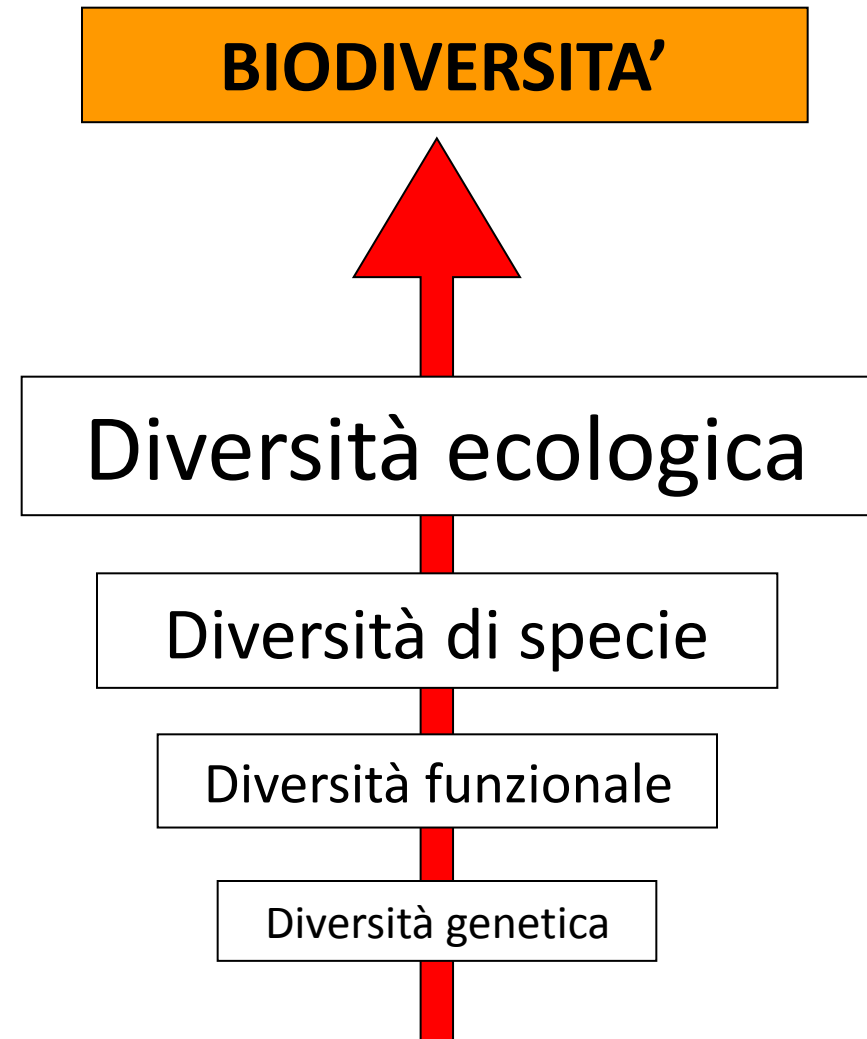
<b>I° livello</b>	Analisi chimico-fisiche e biologiche di base
<b>II° livello</b>	Estrazione e analisi fingerprinting del DNA totale dal suolo
<b>III° livello</b>	Caratterizzazione tassonomica del singolo microrganismo
<b>IV° livello</b>	Monitoraggio spazio-temporale



## *Approccio Top-down*



## *Approccio Bottom-up*



# Microbiological Methods for Assessing Soil Quality

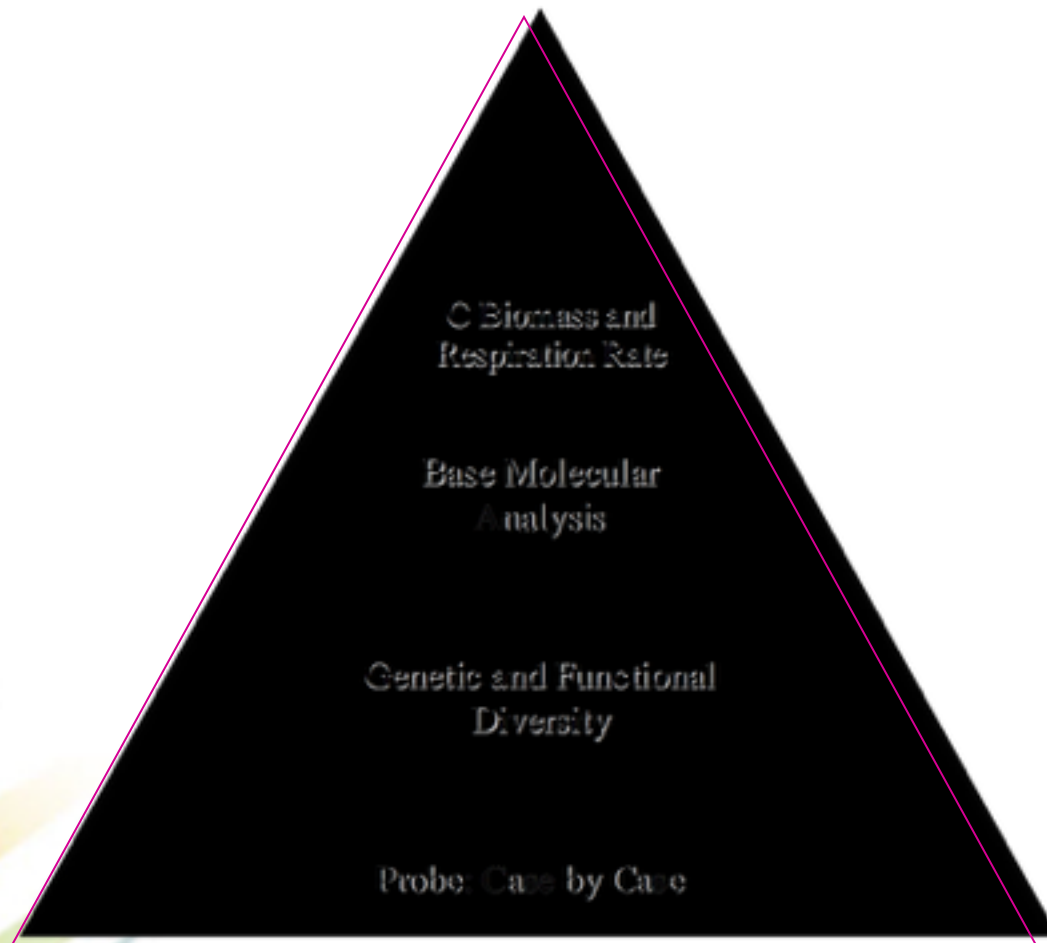


Edited by  
J. Bloem, D.W. Hopkins and A. Benedetti

  
CABI Publishing

## **“Microbial methods to assessing soil quality”**

Bloem, J., Hopkins, D. and  
Benedetti, A. Eds  
(CAB International 2006)

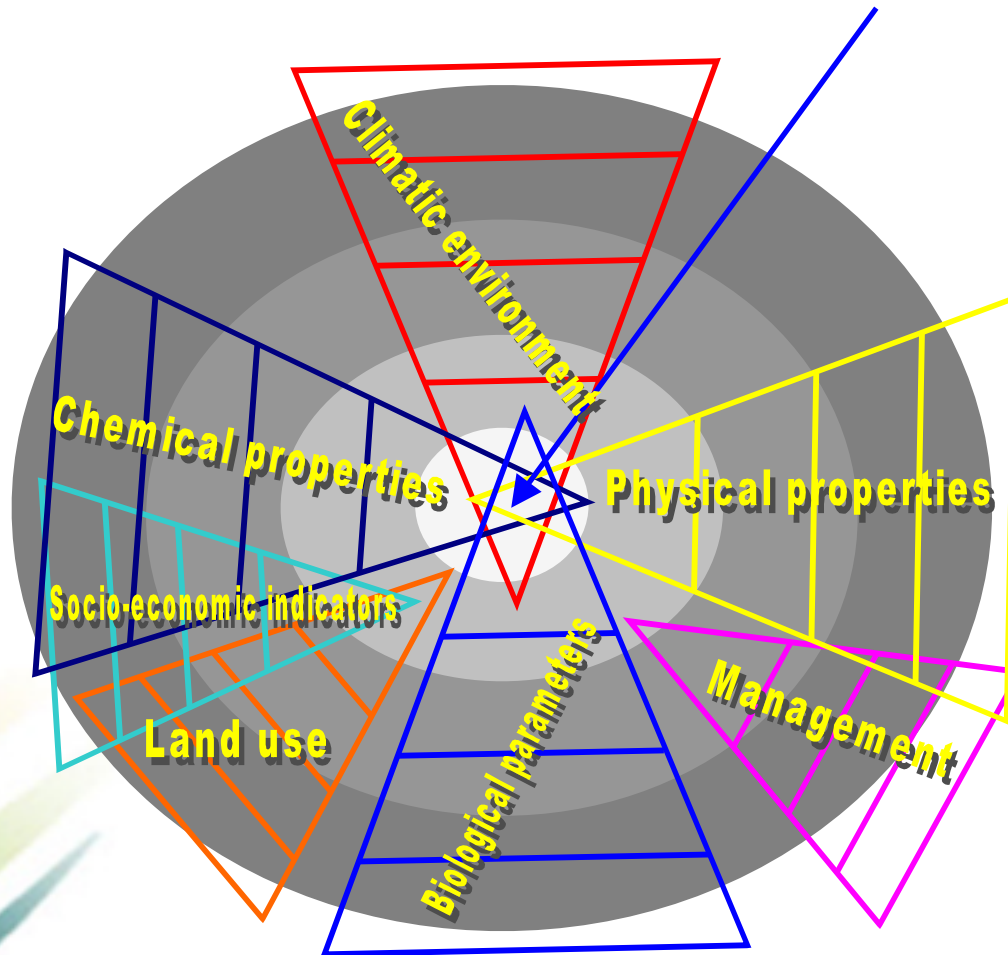


## **SCHEME 1**

**hierarchical level of microbiological biochemical and molecular  
parameters to define biological fertility of soil**



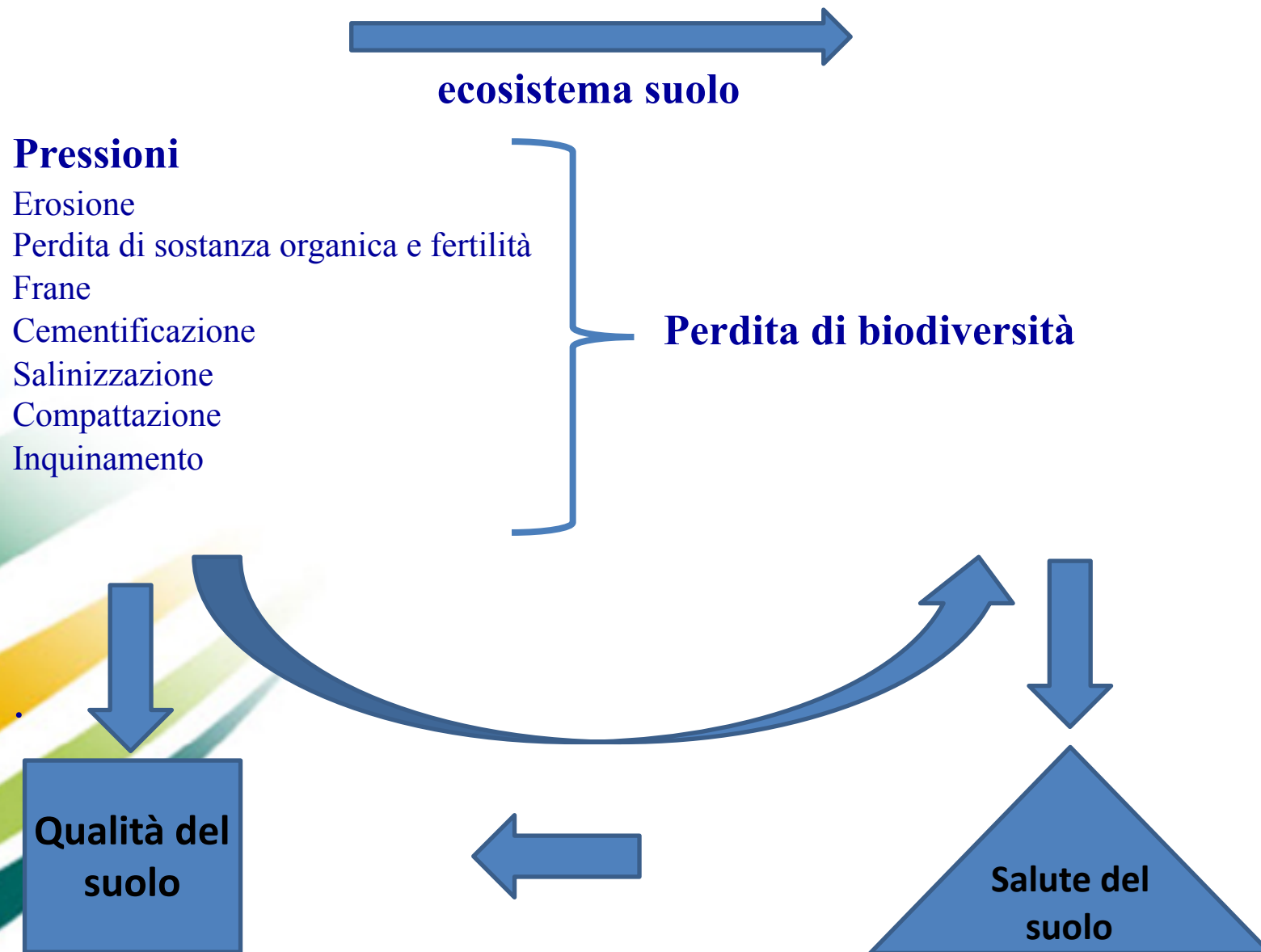
Minimum data set of parameters  
to characterise the site



## SCHEME 2

Model to individuate a minimum data set of soil quality parameters as indicator of environmental sustainability

# La conservazione del suolo è messa sotto pressione da:



2015  
International  
Year of Soils



# 2015 International Year of Soils

Grazie per l'attenzione

**2015**  
**turning point for soils**  
**Punto di partenza per il suolo**