

Progetto SOILSINK

Linea 4: Carbon sink e cicli biogeochimici (Capofila Dr.ssa Anna Benedetti).

UO 8: Flussi di carbonio e azoto nelle comunità microbiche. Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale, CNR (Capofila Dr.ssa Daniela Lippi).

attività 8: Attività enzimatiche del suolo. Università degli Studi della Tusica, Dip, Agrobiologia e Agrochimica. Prof. Stefano Grego, Dr.ssa Alessandra Lagomarsino, Dr.ssa M. Cristina Moscatelli, Dr.ssa Sara Marinari

Relazione sulle attività svolte nel 2° anno di attività (01/07/2007-30/06/2008)

L'attività di ricerca ha riguardato l'attività enzimatica della biomassa microbica del suolo nei siti di Agugliano (Ancona) e Berchidda (Sassari).

Agugliano

Sono state effettuate le analisi sui suoli campionati ad Agugliano nel giugno 2007. Come riportato nella relazione per l'anno precedente, i campioni sono stati prelevati nelle due colture presenti (grano duro e mais) alla profondità di 0-20 cm a due livelli di lavorazione (CT e NT) e a due livelli di fertilizzazione (2 colture x 2 livelli di lavorazione x 2 livelli di fertilizzazione). I suoli coltivati a mais sono stati analizzati presso l'Università di Hohenheim, Institut für Bodenkunde und Standortslehre, Bodenbiologie, Stuttgart, Germany. L'attività è stata svolta con l'ausilio dell'Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) con un progetto dal titolo: "Distribution of extracellular enzymes in soil particle-size fractions at two tillage and fertilization levels".

Le tesi sperimentali sono: lavorazione (CT) vs. non lavorazione (NT) e fertilizzazione (+N) vs. non fertilizzazione per le parcelle coltivate a mais.

I suoli sono stati frazionati mediante sonicazione a bassa energia (50 J s^{-1} per 2 minuti). Le frazioni della sabbia grossa ($>250 \mu\text{m}$) e fine ($250\text{--}63 \mu\text{m}$) sono state separate mediante setacci. Le particelle limose ($63\text{--}2 \mu\text{m}$) e argillose ($<2 \mu\text{m}$) mediante centrifugazioni successive.

I principali risultati sono riportati nelle figure 1-4 e possono essere riassunti come segue:

1. il contributo percentuale dei microorganismi nelle frazioni granulometriche è stato più elevato nel limo (in media il 63%), mentre è stata osservata una percentuale minore nell'argilla e nella sabbia (fig. 2). Tale distribuzione è stata probabilmente determinata dalla protezione dovuta alla presenza di microaggregati nella frazione limosa. I valori assoluti delle attività enzimatiche hanno mostrato, ad eccezione dell'arilsulfatasi, tassi più elevati nelle frazioni sabbiose, le quali contengono un'elevata quantità di residui vegetali (fig. 3 e 4). La differente distribuzione rispetto alla biomassa microbica è probabilmente imputabile al processo di diffusione degli enzimi nel suolo verso siti ricchi in substrati decomponibili, mentre i microorganismi sono concentrati in siti che possano offrire maggiore protezione fisica, come le argille. Questo meccanismo può essere di grande importanza per la strategia di acquisizione dei nutrienti da parte delle popolazioni microbiche.

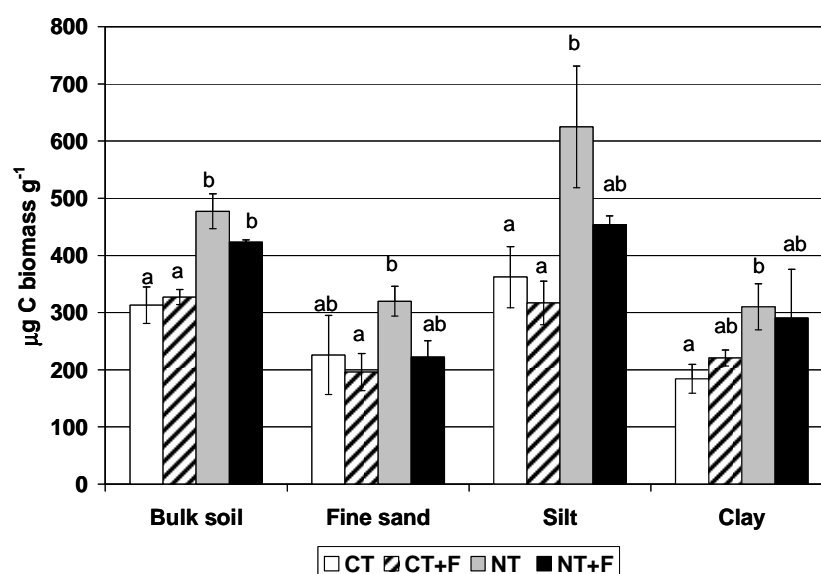


Figura 1. C della biomassa microbica associato alle frazioni granulometriche nei suoli a regime convenzionale (CT), non lavorati (NT) fertilizzati (+F) e non fertilizzati.

2. L'assenza delle lavorazioni ha favorito un aumento significativo della biomassa microbica nel suolo non frazionato, nel limo e nell'argilla (fig. 2), suggerendo una maggiore protezione fisica nelle frazioni fini del suolo non lavorato che ha incrementato la colonizzazione microbica. Nel suolo non lavorato gli enzimi hanno mostrato un'attività più elevata nel suolo non frazionato, nella sabbia grossa, nel limo e nell'argilla (fig. 3 e 4). Per gli enzimi del ciclo del C l'aumento è stato massimo nella frazione sabbiosa grossa in assenza di fertilizzazione azotata (+ 630 % nei suoli non fertilizzati rispetto a + 130% nei suoli fertilizzati in media).
3. L'aumento delle attività enzimatiche nei suoli non lavorati può essere messa in relazione alla maggiore disponibilità di residui vegetali in questo sistema, in particolare nella frazione > 250 µm. L'aumento è risultato significativo soprattutto nei suoli non fertilizzati, dove i microorganismi sono presumibilmente più dipendenti dalla decomposizione enzimatica per l'assimilazione dei nutrienti, suggerendo la possibilità di limitare l'uso di fertilizzanti in tali sistemi gestionali. L'effetto della fertilizzazione è stato variabile a seconda dell'enzima e della frazione considerata. In media la fertilizzazione ha indotto un aumento degli enzimi nella gestione convenzionale.
4. L'analisi discriminante ha dimostrato che le attività enzimatiche hanno permesso di separare in maniera significativa la sabbia grossa dalla sabbia fine ed entrambi dal limo e dall'argilla e dal suolo non frazionato (fig. 5). Questo risultato suggerisce che la diversità funzionale nel suolo ha raggiunto i valori più elevati in "hot spots" con maggiore disponibilità di substrati. Il suolo non frazionato non è risultato diverso dalla frazione limosa, che comprende la maggior parte del totale (55 %). All'interno delle singole frazioni il suolo lavorato è risultato diverso da quello non lavorato nella sabbia grossa e fine e nell'argilla. Tale risultato dipende principalmente dalla maggiore presenza di substrati nelle frazioni sabbiose e dall'eterogeneità della frazione argillosa dove i complessi organo-minerali possono fornire protezione fisica e disponibilità di nutrienti.

Gli enzimi legati al ciclo del C si sono dimostrati essere i più efficaci nel discriminare i due sistemi.

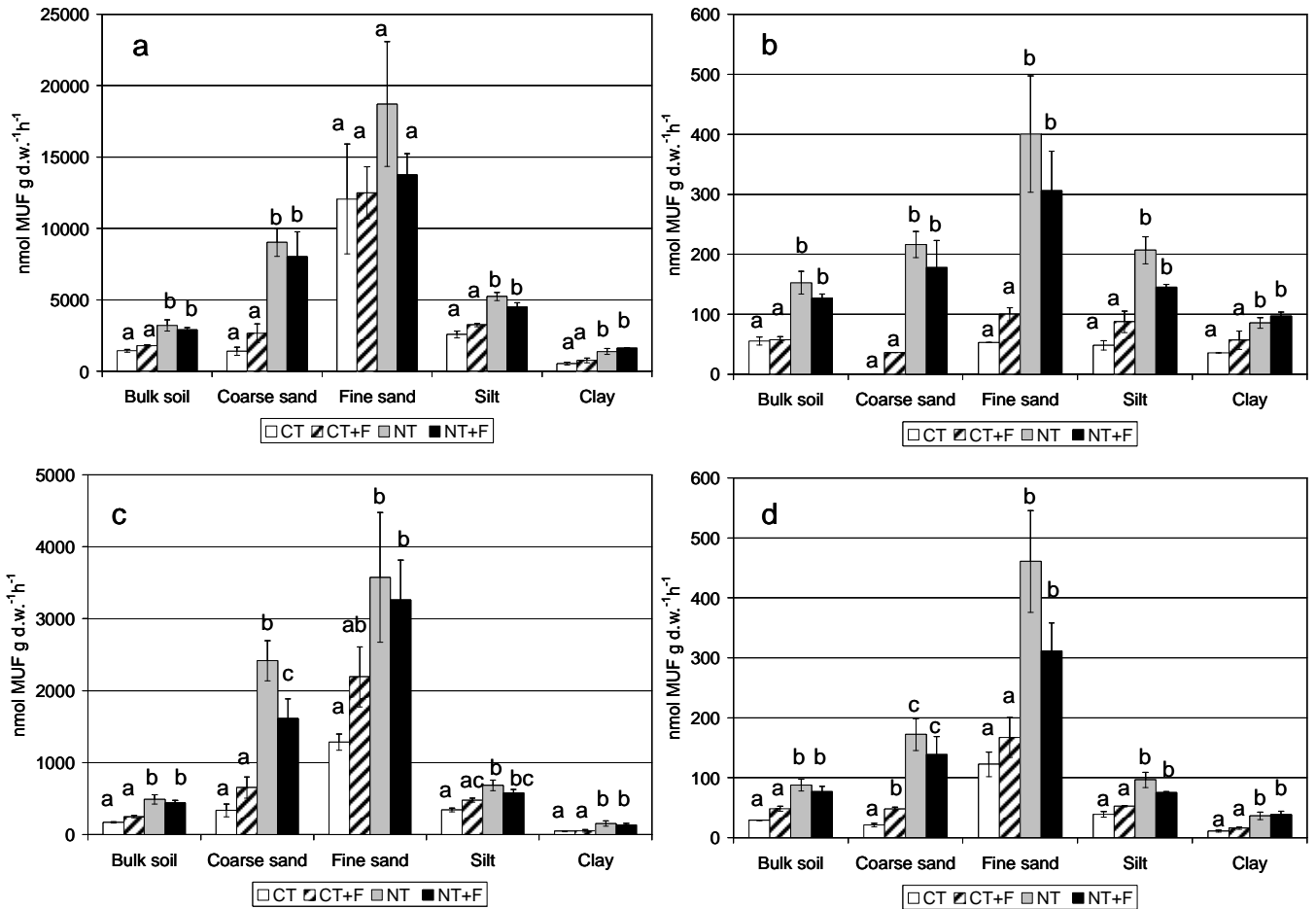


Figura 2. Attività della β -glucosidasi (a), α -glucosidasi (b), cellulasi (c), β -xylosidasi (d) associate alle frazioni granulometriche nei suoli a regime convenzionale (CT), non lavorati (NT) fertilizzati (+F) e non fertilizzati.

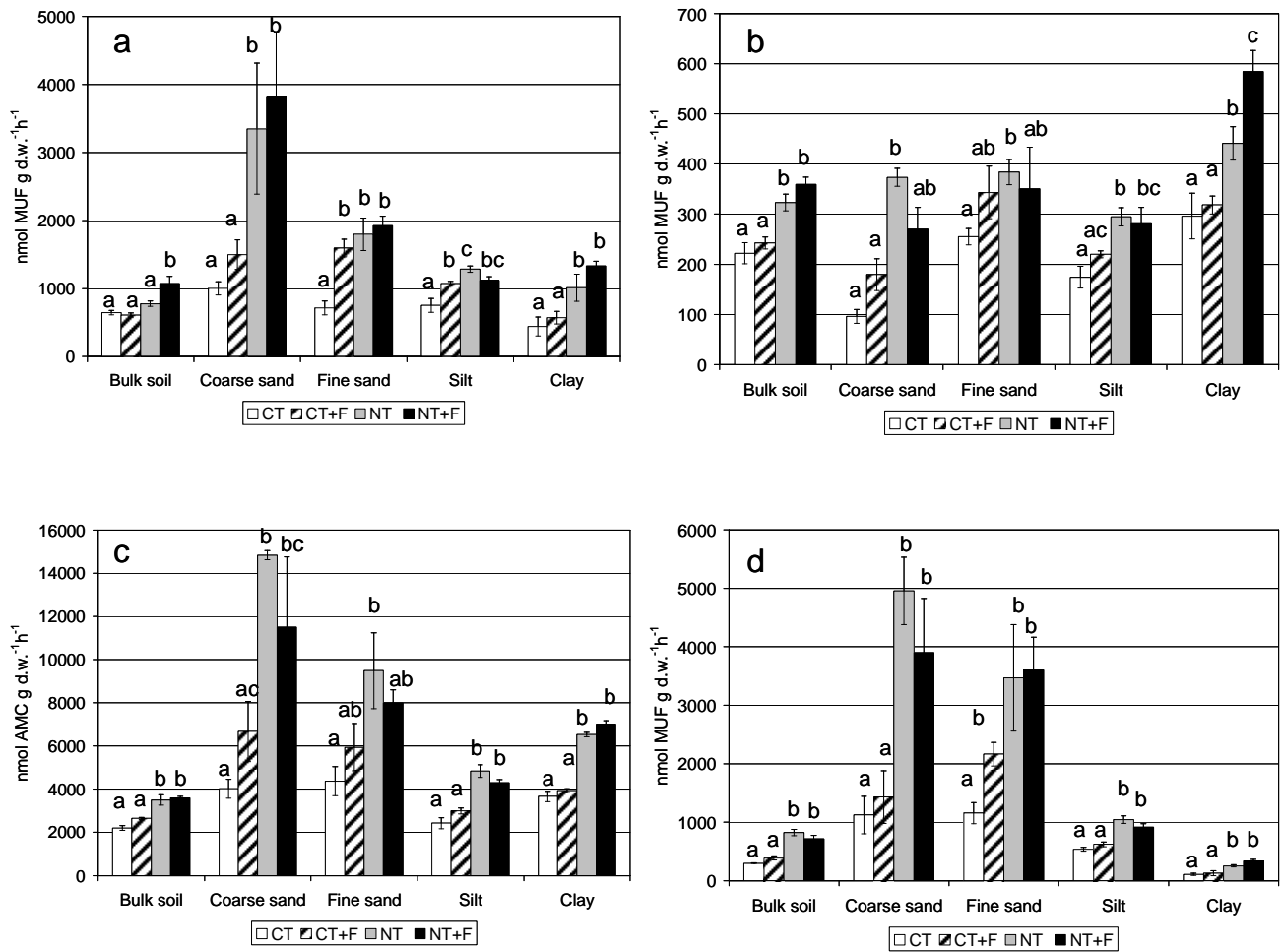


Figura 3. Attività della fosfatasi acida (a), arilsulfatasi (b), leucina aminopeptidasi (c), N-acetyl- β -glucosaminidasi (d) associate alle frazioni granulometriche nei suoli a regime convenzionale (CT), non lavorati (NT) fertilizzati (+F) e non fertilizzati.

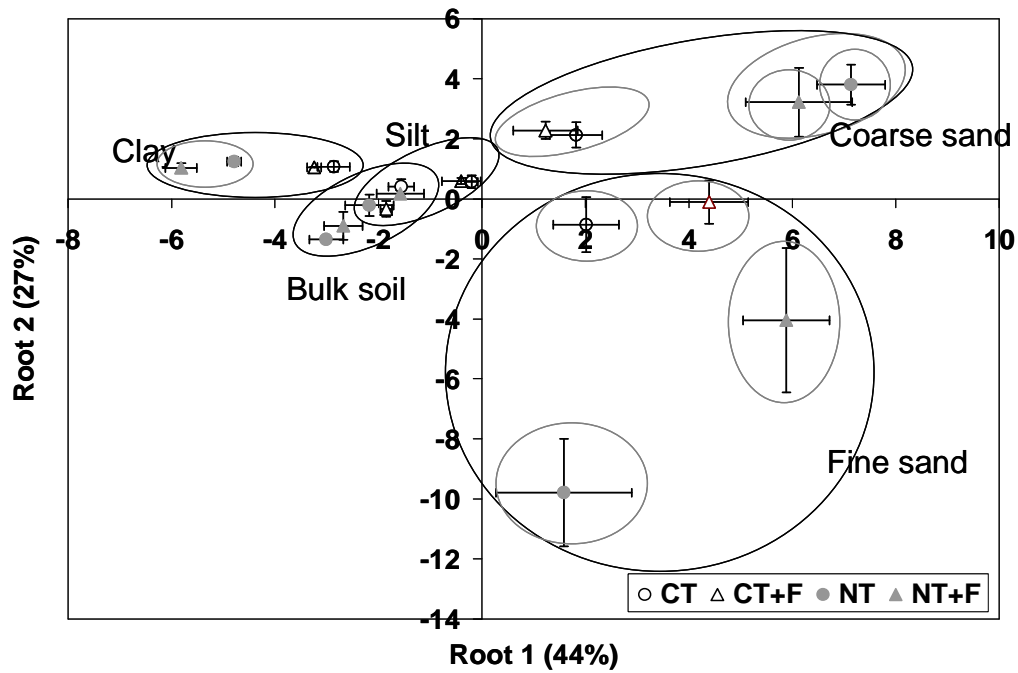


Figura 4. Analisi discriminante delle attività enzimatiche nel suolo tal quale e nelle diverse frazioni granulometriche nei campioni a regime convenzionale (simboli aperti), non lavorati (simboli chiusi), non fertilizzati (cerchi) e fertilizzati (triangoli). I centroidi di ogni gruppo, rappresentanti la media di tre repliche, sono riportati con gli errori standard. Gli ovali neri rappresentano le diverse frazioni, gli ovali grigi i gruppi all'interno delle frazioni. Quando gli ovali non si intersecano i gruppi sono significativamente diversi ($p < 0.05$).

Berchidda

Sono state effettuate le analisi sui suoli campionati a Berchidda il 2 maggio 2007. Come riportato nella relazione dell'anno precedente sono stati campionati 21 campioni di suolo lungo la serie vegetazionale secondo lo schema seguente: 6 campioni nel vigneto lavorato a due profondità (0-20 e 20-40), 6 campioni nel vigneto inerbito a due profondità (0-20 e 20-40), 3 campioni nell'erbaio, 3 campioni nel pascolo e 3 campioni nella sughereta alla profondità di 0-20 cm.

A novembre 2007 è stato effettuato un terzo campionamento nel sito di Berchidda. I campioni sono stati prelevati secondo lo schema di maggio 2007, a cui si aggiungono 3 campioni prelevati in un vigneto abbandonato nelle immediate vicinanze degli altri vigneti. In totale sono stati prelevati ed analizzati 24 campioni: 6 campioni nel vigneto lavorato a due profondità (0-20 e 20-40), 6 campioni nel vigneto inerbito a due profondità (0-20 e 20-40), 3 campioni nell'erbaio, 3 campioni nel pascolo, 3 campioni nella sughereta e 3 campioni nel vigneto abbandonato alla profondità di 0-20 cm.

Sui suoli provenienti da entrambi i campionamenti sono state effettuate le seguenti attività enzimatiche: fosfatasi, β -glucosidasi, α -glucosidasi, cellulasi, N-acetil- β -glucosaminidasi, arilsulfatasi, β -xilosidasi, leucina aminopeptidasi.

Maggio 2007

I risultati delle analisi enzimatiche relative al campionamento di maggio 2007 sono riportati in fig. 5 e 6.

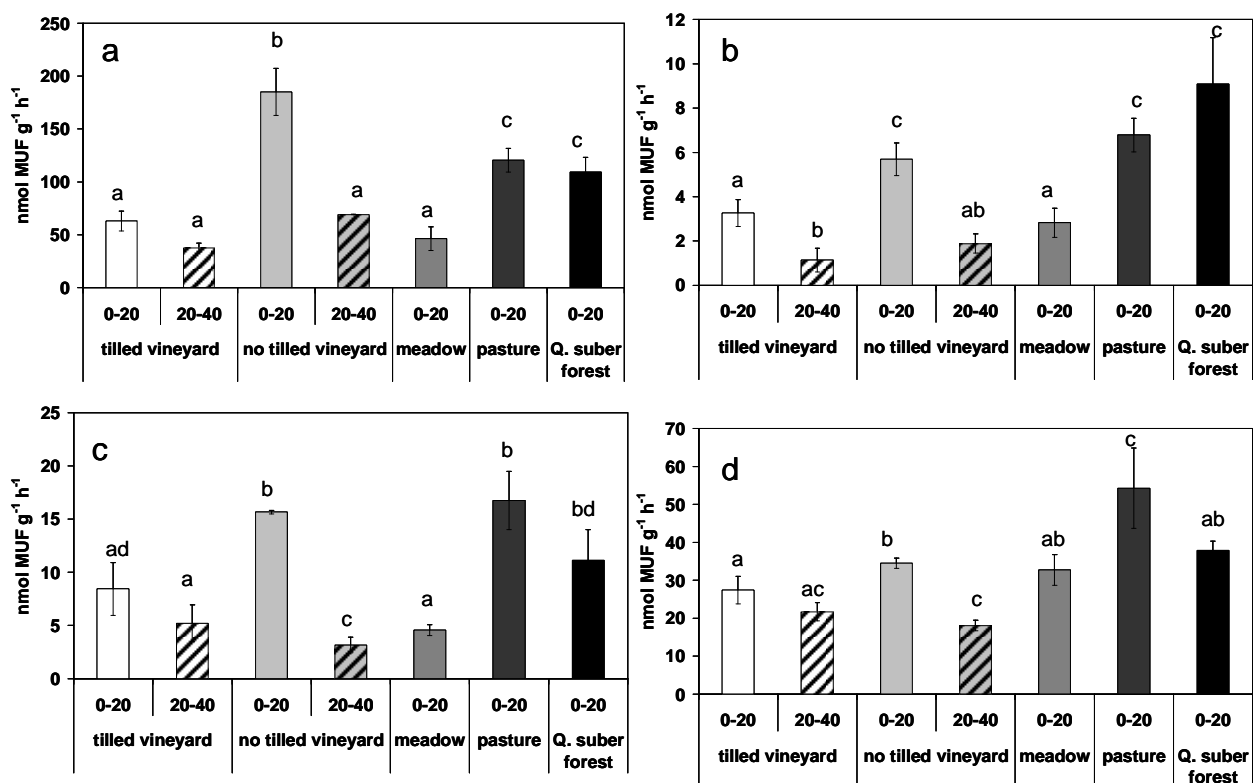


Fig. 5. Attività della β -glucosidasi (a), α -glucosidasi (b), cellulasi (c), xilosidasi (d) nei suoli del vigneto lavorato (profondità 0-20 e 20-40 cm), vigneto inerbito (profondità 0-20 e 20-40 cm), erbaio, pascolo e sughereta campionati a maggio 2007. Lettere diverse rappresentano differenze statisticamente significative (Fisher's LSD Post hoc test).

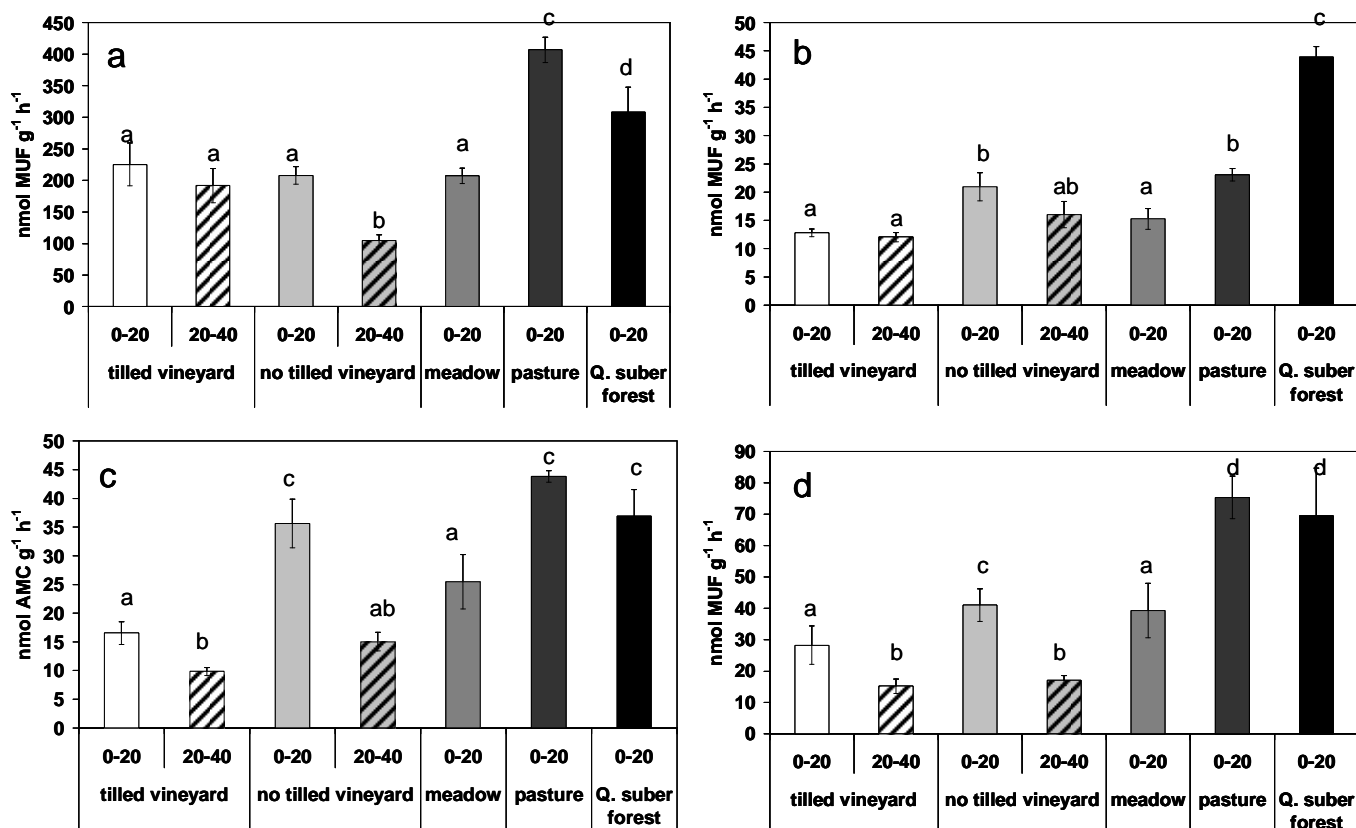


Fig. 6. Attività della fosfatasi acida (a), arilsulfatasi (b), leucina aminopeptidasi (c), N-acetil β -glucosaminidasi (d) nei suoli del vigneto lavorato (profondità 0-20 e 20-40 cm), vigneto inerbito (profondità 0-20 e 20-40 cm), erbaio, pascolo e sughereta campionati a maggio 2007. Lettere diverse rappresentano differenze statisticamente significative (Fisher's LSD Post hoc test).

Le attività enzimatiche mostrano in media una significativa riduzione con la profondità nei vigneti, in particolare nel vigneto inerbito (34 e 56% rispettivamente nel vigneto lavorato e inerbito). Tale risultato è in accordo con quanto osservato nel sito di Agugliano nell'ottobre 2007 (come riportato nella relazione del primo anno di attività).

Tutti gli enzimi mostrano attività più elevate nei suoli a pascolo e sughereta e nel vigneto inerbito alla profondità di 0-20 cm. E' evidente che l'effetto negativo delle lavorazioni è stato il fattore più importante nel determinare le differenze delle attività enzimatiche nei suoli sottoposti a diverso uso. I suoli non lavorati rappresentano infatti un sistema più stabile, che offre maggiore protezione per gli enzimi, probabilmente attraverso il miglior stato di aggregazione del suolo.

I risultati dell'analisi di diversità funzionale dei diversi siti oggetto di studio conferma la particolarità dei siti della sughereta e del vigneto inerbito, significativamente separati dagli altri e con il più elevato indice di Shannon. Le attività enzimatiche mostrano un profilo diverso tra pascolo ed erbaio, ma entrambi non sono dissimili dal vigneto lavorato. In quest'ultimo si rileva una diminuzione della diversità funzionale alla profondità più elevata, un effetto assente nel vigneto inerbito. Quindi possiamo ipotizzare che, pur osservando una diminuzione delle attività nel vigneto inerbito alla profondità 20-40 cm, il sistema mantiene una simile diversità funzionale, che invece è negativamente influenzata dalle lavorazioni, in modo più marcato alla profondità maggiore.

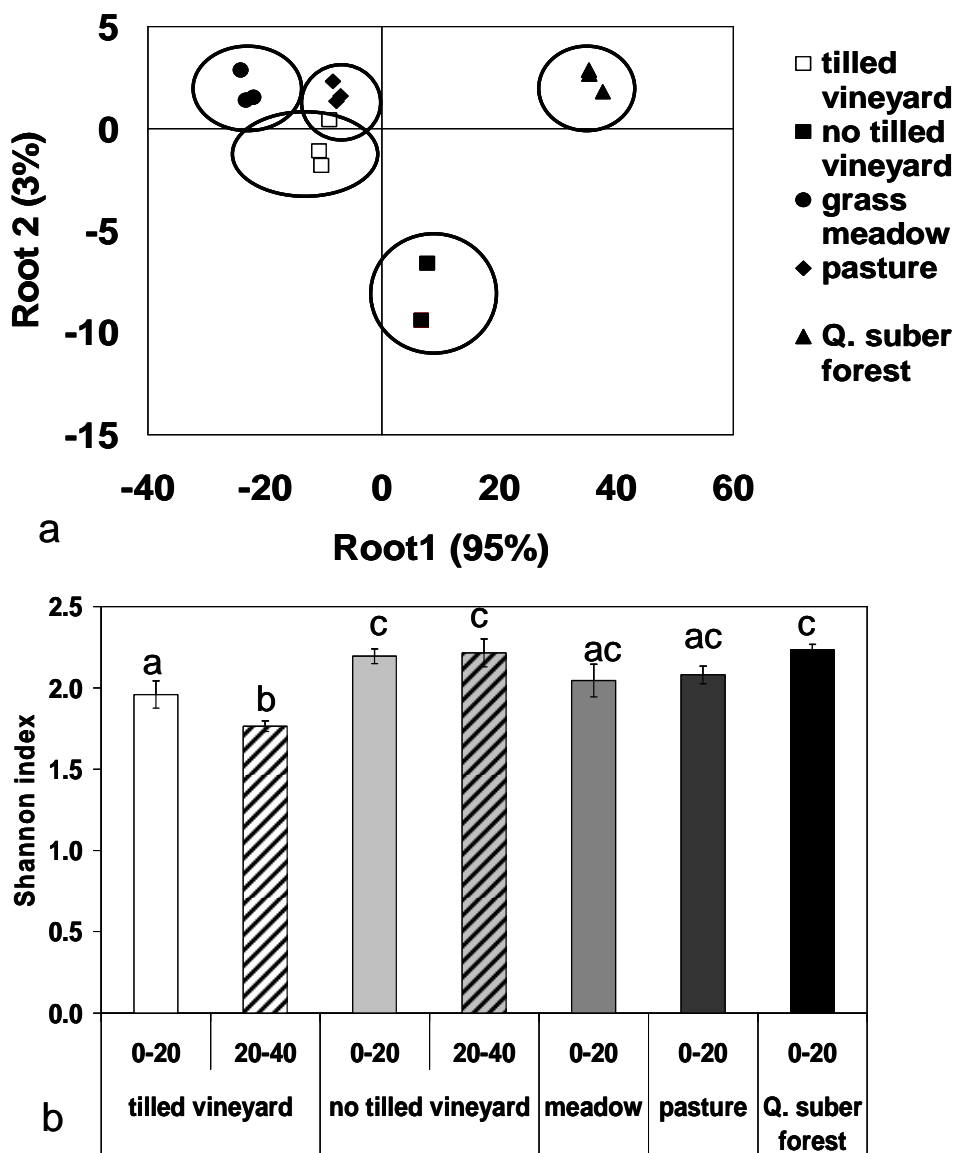


Fig. 7. Discriminant function analysis (a) e Shannon's diversity index (b) dei suoli del vigneto lavorato (profondità 0-20 e 20-40 cm), vigneto inerbito (profondità 0-20 e 20-40 cm), erbaio, pascolo e sughereta campionati a maggio 2007. Nella discriminant function analysis quando gli ovali non si intersecano i gruppi sono significativamente diversi (Squared Mahalanobis Distances, $p < 0.05$). Lettere diverse rappresentano differenze statisticamente significative (Fisher's LSD Post hoc test).

I risultati del campionamento di novembre confermano in parte quelli precedenti. Nei vigneti, infatti, le lavorazioni del suolo hanno determinato una riduzione significativa delle attività enzimatiche, ad esclusione della xilosidasi, della fosfatasi acida e della N-acetil β -glucosaminidasi. Inoltre la riduzione delle attività enzimatiche con la profondità è risultata più evidente nel suolo del vigneto non lavorato, confermando la maggiore naturalità di questo sistema rispetto al vigneto lavorato. A differenza del campionamento di maggio, il suolo della sughereta presenta attività enzimatiche più elevate rispetto al pascolo. Questo risultato può essere imputabile al maggiore apporto di sostanza organica a novembre nella sughereta, che ha fornito materiale per la decomposizione microbica.

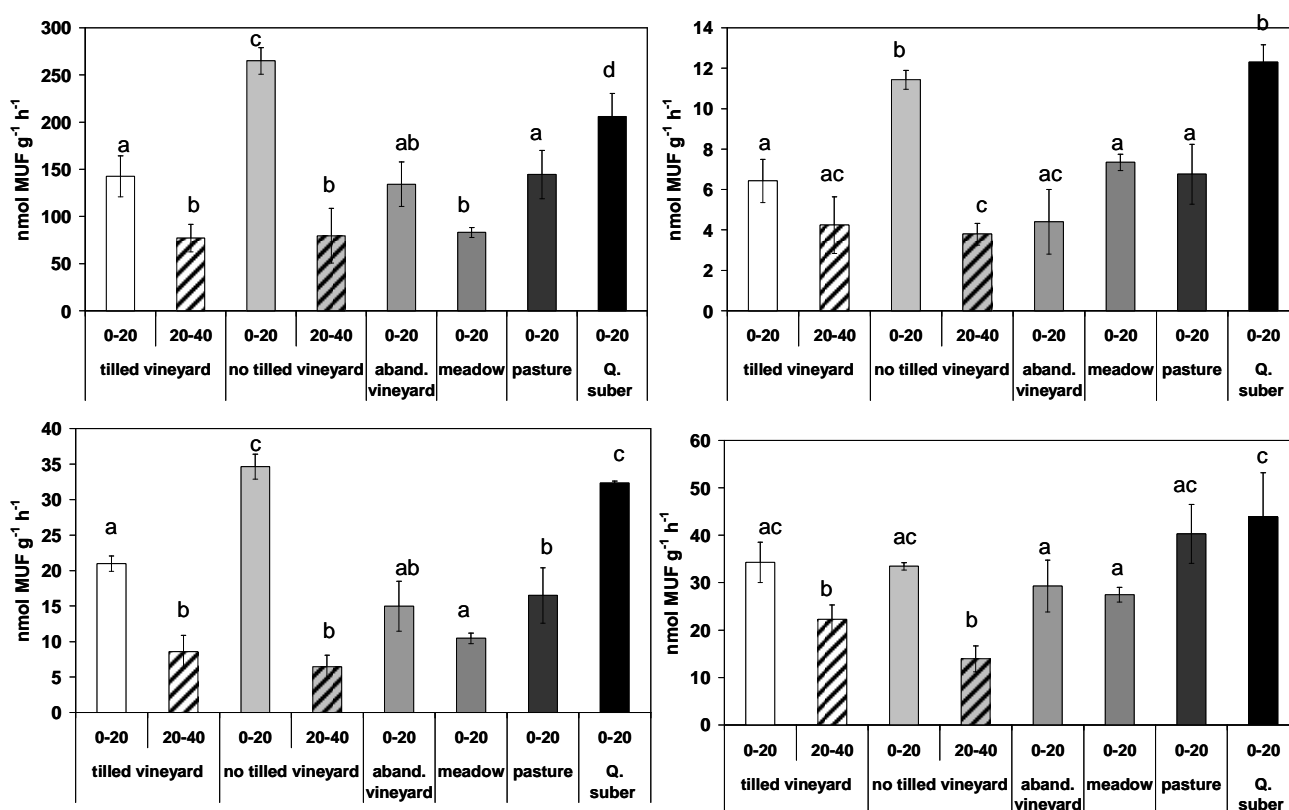


Fig. 8. Attività della β -glucosidasi (a), α -glucosidasi (b), cellulasi (c), xilosidasi (d) nei suoli del vigneto lavorato (profondità 0-20 e 20-40 cm), vigneto inerbito (profondità 0-20 e 20-40 cm), vigneto abbandonato, erbaio, pascolo e sughereta campionati a novembre 2007. Lettere diverse rappresentano differenze statisticamente significative (Fisher's LSD Post hoc test).

Il vigneto abbandonato ha mostrato attività simili al vigneto lavorato per tutte le attività enzimatiche ad eccezione della N-acetil β -glucosaminidasi che è risultata più elevata nel primo. E' possibile ipotizzare che l'effetto negativo delle lavorazioni effettuate in passato sulle attività enzimatiche possa essere tuttora presente. L'analisi di diversità funzionale sembra confermare questa possibilità: i suoli del vigneto lavorato e del vigneto abbandonato presentano caratteristiche funzionali simili. Probabilmente la distruzione degli aggregati e le modificazioni fisico-chimiche del suolo derivate dalle lavorazioni hanno influito in maniera profonda sull'attività microbica; di conseguenza il ripristino delle condizioni naturali richiede tempi più lunghi.

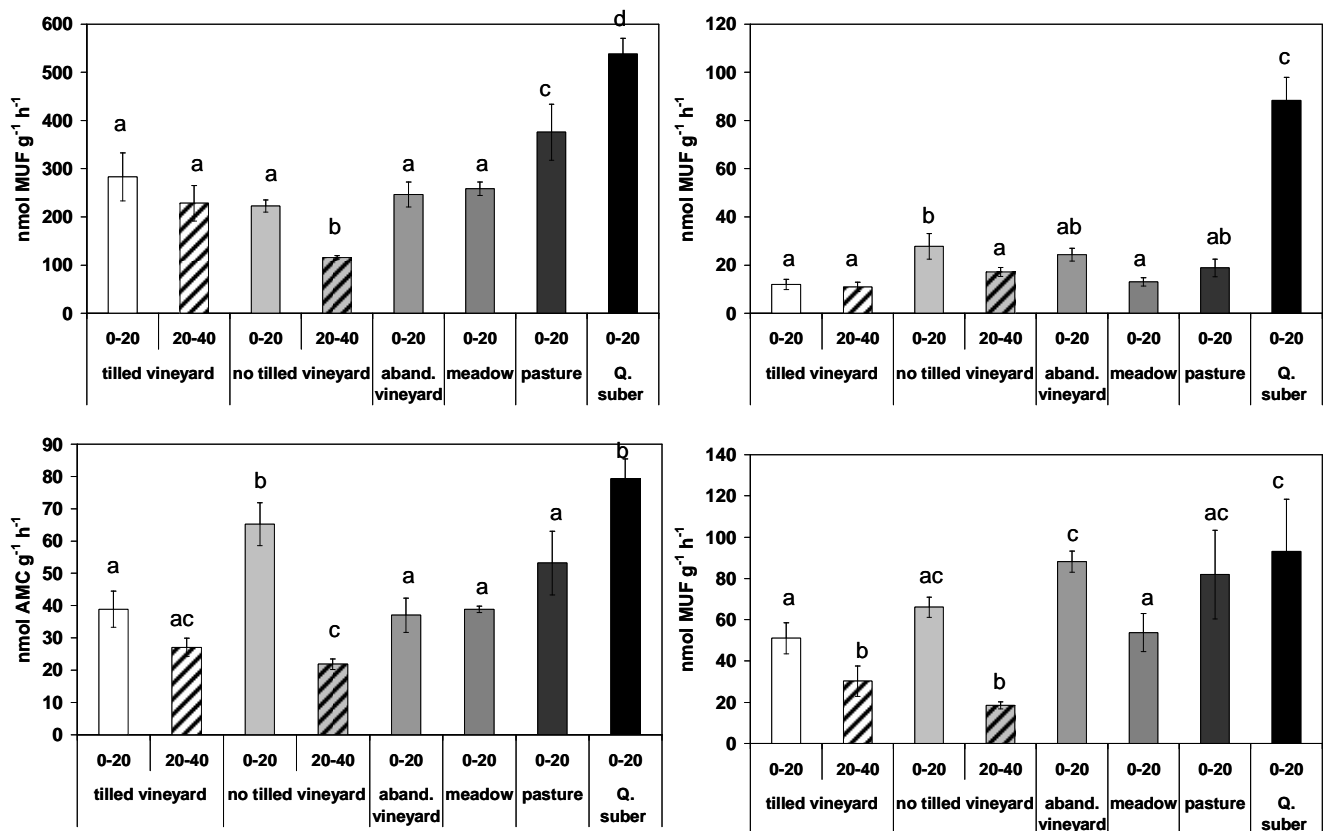


Fig. 9. Attività della fosfatasi acida (a), arilsulfatasi (b), leucina aminopeptidasi (c), N-acetil β -glucosaminidasi (d) nei suoli del vigneto lavorato (profondità 0-20 e 20-40 cm), vigneto inerbito (profondità 0-20 e 20-40 cm), vigneto abbandonato, erbaio, pascolo e sughereta campionati a maggio 2007. Lettere diverse rappresentano differenze statisticamente significative (Fisher's LSD Post hoc test).

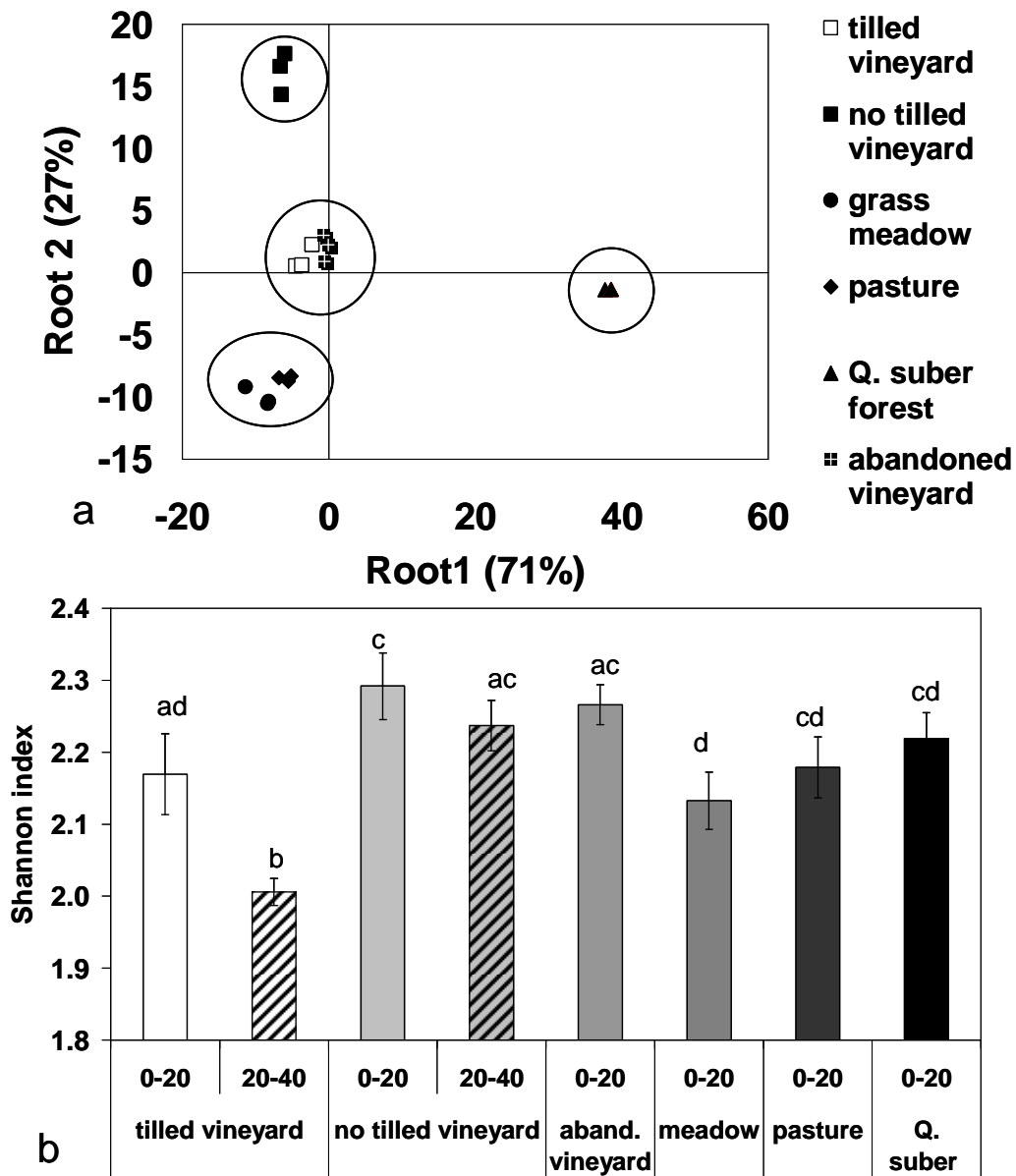


Fig. 10. Discriminant function analysis (a) e Shannon's diversity index (b) dei suoli del vigneto lavorato (profondità 0-20 e 20-40 cm), vigneto inerbito (profondità 0-20 e 20-40 cm), vigneto abbandonato, erbaio, pascolo e sughereta campionati a novembre 2007. Nella discriminant function analysis quando gli ovali non si intersecano i gruppi sono significativamente diversi (Squared Mahalanobis Distances, $p < 0.05$). Lettere diverse rappresentano differenze statisticamente significative (Fisher's LSD Post hoc test).

Proseguimento delle attività

1. Sui suoli campionati a maggio 2007 si sta procedendo a due tipi di frazionamento. Con un primo frazionamento si sta procedendo alla separazione dei macro (250-2000 μm) e microaggregati (53-250 μm) mediante setacciamento umido. Con il secondo frazionamento, dopo distruzione degli aggregati si procederà alla separazione della sabbia grossa (>250 μm) e fine (250–63 μm) mediante setacciamento. Le particelle limose (63–2 μm) e argillose (<2 μm) saranno separate mediante centrifugazioni successive. Sulle frazioni così ottenute saranno determinate le attività enzimatiche e il C organico.
2. Si sta procedendo alla messa a punto di metodi per la determinazione di enzimi ossidativi sia sul suolo tal quale che sulle diverse frazioni granulometriche.
3. Al fine di studiare in maniera più approfondita la diversità funzionale del suolo con diverse gestioni e di validare l'uso degli enzimi come indicatori di diversità funzionale, si procederà all'analisi del profilo fisiologico della comunità microbica (CLPP) attraverso la tecnica del MicroResp e alla comparazione dei risultati di diversità funzionale con le diverse tecniche.

Partecipazione a convegni

1. A. Lagomarsino, S. Grego, S. Marhan, M. C. Moscatelli and E. Kandeler. Impact of tillage and fertilization practices on enzymatic activities in soil particle-size fractions. Presentazione orale al EGU General Assembly 2008. Geophysical Research Abstracts, Vol. 10, EGU2008-A-00234, 2008.
2. A. Lagomarsino, S. Marinari, M. C. Moscatelli, L. Pompili, A. Benedetti, S. Grego. The influence of different land uses in Mediterranean environment on soil biochemical indicators and functional diversity. Presentazione nella sessione poster al EGU General Assembly 2008. Geophysical Research Abstracts, Vol. 10, EGU2008-A-00452, 2008.
3. Pompili, L., Lagomarsino, A., Moscatelli, M.C., Grego, S., Benedetti, A. Soil organic matter, microbial carbon pool and enzymatic activity in differently managed agricultural systems. Presentazione orale al EGU General Assembly 2008. Geophysical Research Abstracts, Vol. 10, EGU2008-A-00626, 2008.
4. Lagomarsino A., Pompili L., Moscatelli M.C., Marinari S., Benedetti A., Grego S. Effetto delle lavorazioni sulla biomassa microbica e la sua attività metabolica in due agroecosistemi del Centro Italia. Presentazione orale al convegno Società Italiana di Scienze del Suolo. Ancona 24-26 giugno 2008.

Lavori sottomessi a riviste

1. Lagomarsino A., Pompili L., Moscatelli M.C., Marinari S., Benedetti A., Grego S. Influence of tillage on microbial functional diversity under maize in mediterranean environment. Submitted to *Agrochimica*.
2. Lagomarsino A., Grego S., Marhan S., Moscatelli M.C., Kandeler E. Soil management modifies micro-scale abundance and function of soil microorganisms in a Mediterranean ecosystem. Submitted to *European Journal of Soil Science*.