

Impatto del rame sulle comunità microbiche del suolo

I LIMITI DELLA TOSSICITÀ DI RAME

La concentrazione di rame totale (Cu totale) nel suolo pari a 100-150 mg kg⁻¹ è convenzionalmente riconosciuto come la soglia al di sopra della quale la crescita delle piante e il funzionamento del suolo possono essere negativamente influenzati. Questa soglia deriva da prove di fitotossicità svolte in laboratorio con dosi crescenti di contaminazione artificiale su un numero di suoli e di colture limitato. Tali condizioni di laboratorio hanno anche evidenziato che dosi di rame fra 250-500 mg kg⁻¹ di suolo sono fitotossiche su mais e riducono la diversità batterica con la predominanza di una o poche specie (Ippolito et al., 2010).

L'effetto della contaminazione con rame osservato in laboratorio sui batteri è quello tipico osservato nei suoli contaminati da idrocarburi o metalli pesanti che in termini di indici di biodiversità si può sintetizzare come segue: la *Richness* (numero di taxa) si riduce; ma cambia il rapporto fra le specie, ovvero, una o poche specie diventano dominanti, aumenta pertanto il valore della *Dominance* ($D = 1/\text{Simpson index}$).

La tessitura, il pH e la sostanza organica del suolo influenzano fortemente l'immobilizzazione del rame perché il rame è un microelemento a bassa biodisponibilità e può essere presente in diverse forme nel suolo. Questo spiega anche la risposta molto variabile in letteratura delle comunità batteriche osservata su suoli diversi nelle prove di fitotossicità di rame in laboratorio. Poco invece si sa dell'effetto a lungo termine di rame nel suolo.

* CREA - Agricoltura Ambiente, Bologna

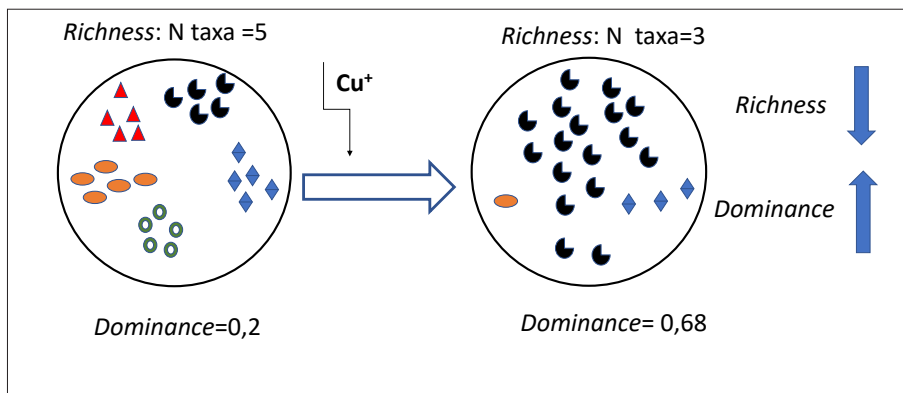


Fig. 1 Rappresentazione schematica delle variazioni in termini di biodiversità della comunità batterica del suolo in risposta alla contaminazione con rame nel breve periodo in laboratorio

LA CONTAMINAZIONE CON RAME DEI SUOLI

Dalla fine del XIX secolo fino agli anni '60, e in molti casi anche dopo, le applicazioni di fungicidi rameici sui vigneti sono state l'unico metodo per la peronospora della vite (*Plasmopara viticola*). Pertanto, la natura non biodegradabile del rame in combinazione con la sua scarsa mobilità nei suoli ne ha determinato l'accumulo nello strato coltivato nei vigneti dei paesi produttori di vino in Europa. Alcuni casi indicativi del contenuto di rame totale nello strato coltivato dei vigneti al di sopra della quantità naturalmente presente nei suoli, in base alla letteratura scientifica degli ultimi 20 anni varia da 22-398 mg kg⁻¹ in Francia (Chaignon et al., 2003); da 33 a 1120 mg kg⁻¹ in Spagna (Fernandez-Calvino et al., 2010); da 215 a 800 mg kg⁻¹ suolo in Italia (dell'Amico et al., 2008; Kelderer et al., 2012).

EFFETTO A LUNGO TERMINE DI CONTAMINAZIONI DI RAME SULLE COMUNITÀ MICROBICHE DEI SUOLI. CASI STUDIO

Caso studio su meleti dell'Alto Adige

Il primo caso studio sull'effetto della contaminazione a lungo termine di rame dei suoli, in realtà deriva da un'osservazione nell'ambito di uno studio svolto in Alto Adige dal Centro di Sperimentazione Laimburg e dal CREA - Agricoltura e Ambiente. Questa ricerca mirava a valutare l'opportunità di trapiantare le piante dei giovani meleti sulla inter-fila come opzione agronomica per

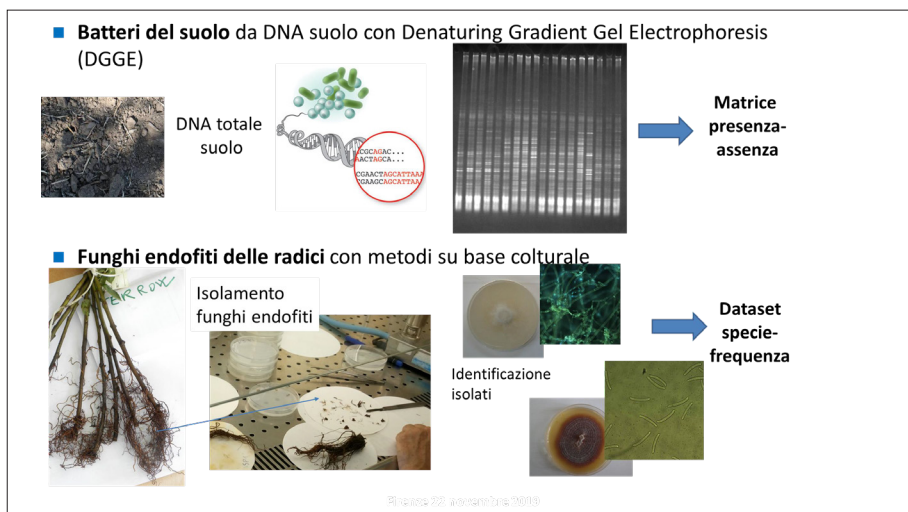


Fig. 2 Metodologia

ridurre le problematiche di reimpianto dei meleti di terza e più generazione nella provincia di Bolzano, ovvero, la più importante zona di produzione della melicoltura italiana. Dalla fine degli anni '90 infatti le problematiche di reimpianto dei meleti quali: lento accrescimento delle giovani piante, ritardo in produzione e ridotta capacità di superare gli stress abiotici, sono state osservate anche in questa zona di produzione (Manici et al., 2003). Questo studio è stato svolto in 5 frutteti di riferimento con degli indicatori microbici: i batteri del suolo e i funghi tellurici che colonizzano le radici (Kelderer et al., 2012). La metodologia di valutazione di questi indici è sintetizzata in figura 2.

Le popolazioni batteriche sono risultate diverse fra i 5 frutteti, ma molto simili fra file e inter-fila entro ogni frutteto con similarità fra 60 e 80% in 4 casi su 5, si veda la similarità fra fila alberata (**R**) e inter-fila (**IR**) dei frutteti n. 1, 2, 3, 5 in figura 3. Solo il frutteto n. 4 aveva una composizione della comunità batterica dei suoli profondamente diversa fra file e inter-fila (similarità intorno al 10%), come evidenziato con un cerchio rosso sul dendrogramma dalla *Cluster analysis* in figura 3. L'unico fattore evidente per cui il frutteto n. 4 differiva dagli altri era una concentrazione di rame nel suolo molto al di sopra dei limiti di tossicità (fig. 3). Questa contaminazione di rame dei suoli ha incrementato la variabilità delle comunità batteriche inducendo una ampia differenza qualitativa anche entro lo stesso frutteto. Questa alta concentrazione di rame dello strato coltivato derivava dai trattamenti rameici di un vigneto precedente alla conversione in meleto di quell'appezzamento (almeno

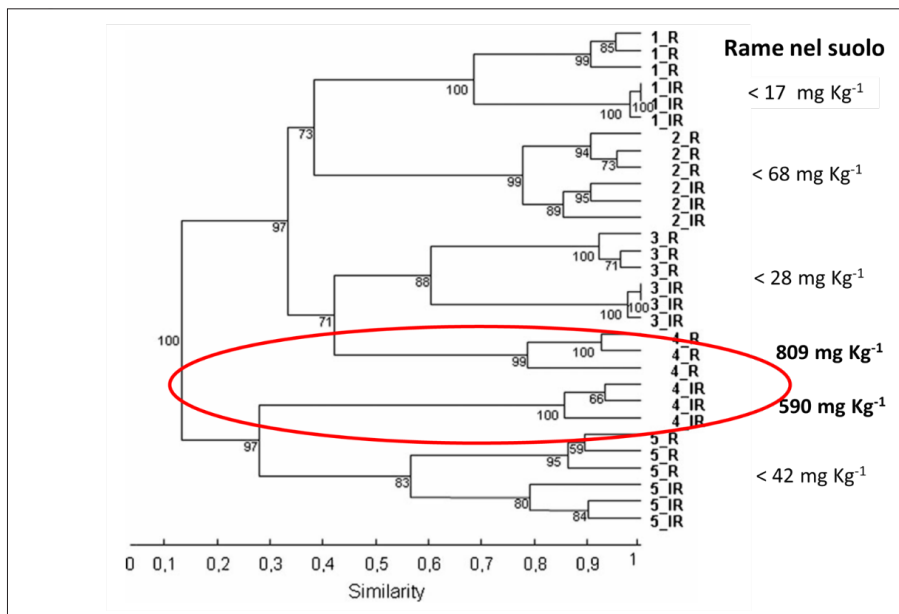


Fig. 3 Effetto di rame sulle comunità batteriche di 5 mele

40 anni prima). Inoltre, il meleto contaminato con rame è stato l'unico in cui la diversità batterica nella fila (800 mg kg^{-1} suolo) differiva da quella della inter-fila (500 mg kg^{-1} suolo). Anche in questo caso, tale differenza è stata imputata al rame; quindi, la contaminazione a lungo termine dei suoli con rame ha indotto un aumento della biodiversità batterica (Kelderer et al., 2012).

I funghi endofiti delle radici delle radici invece non differivano per composizione fra i mele, né fra fila e inter-fila. Questo perché il ritorno di melo sullo stesso appezzamento ha influenzato la composizione delle comunità fungine favorendo così l'instaurarsi dei tipici patogeni non obbligati responsabili della riduzione di sviluppo radicale associata al reimpianto di melo (Kelderer et al., 2012; Manici et al., 2013). Il frutteto contaminato da rame era solo caratterizzato da un minore numero delle specie di minore importanza, mentre le specie più rappresentate erano le stesse osservate negli altri frutteti (riduzione della *richness*).

Caso studio Podere Pantaleone

Questo caso studio parte da una preliminare analisi del suolo svolta nei laboratori di Chimica Agraria del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-

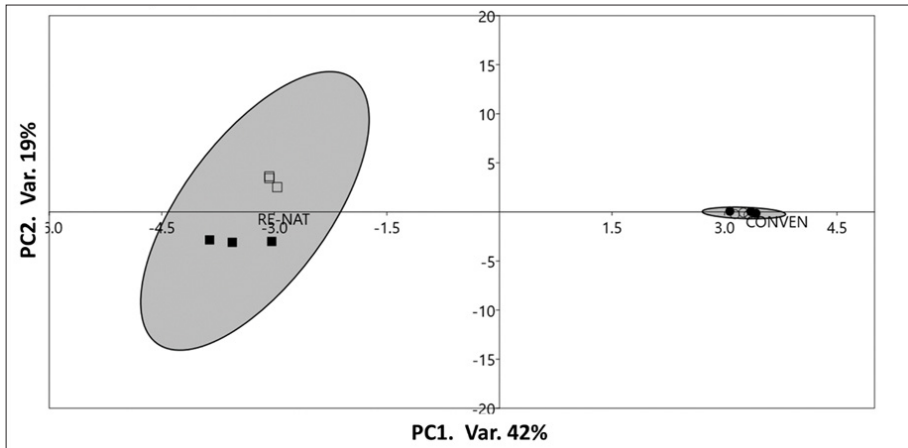


Fig. 4 *Analisi delle componenti principali. Composizione delle comunità batteriche del sito re-naturalizzato (RE-NAT, vigneto con fila contaminata da rame) e convenzionale (CONVEN, pescheto). File, simboli pieni, inter-fila simboli vuoti*

Alimentari dell'Università di Bologna e il rilevamento di un contenuto di rame molto al di sopra dei 150 mg kg^{-1} di suolo in un vecchio vigneto allevato a "vite maritata" entro il Podere Pantaleone (Bagnocavallo, RA) (Cavani et al., 2016). Questo era in passato un'azienda agricola gestita tradizionalmente che comprendeva un vigneto fino agli anni '60, poi abbandonata e trasformata prima in area protetta nel 1989 e poi dal 2006 inclusa nel network del EU Natura 2000 come 'Site of Community Importance' in the Mediterranean biogeographical region.

In base ai risultati preliminari è stato impostato uno studio comparativo fra le comunità microbiche del vecchio vigneto a gestione conservativa da più di 50 anni e un adiacente pescheto a gestione convenzionale. Il primo fattore di variabilità era: la gestione, ovvero conservativa (vecchio vigneto a vite maritata) *vs* intensiva (pescheto), il secondo: siti di campionamento: ovvero, fila alberata *vs* inter-fila.

Dalle analisi dei campioni di suolo prelevati nei primi 30 cm, il sito a gestione conservativa è risultato migliorato come contenuto in sostanza organica e biomassa microbica. Il suolo sotto al filare del vecchio vigneto è risultato contaminato con una concentrazione di rame totale intorno a $1000 \text{ mg per kg}^{-1}$ di suolo, mentre quantità variabili da 60 a $80 \text{ mg per kg}^{-1}$ di suolo sono state rilevate nel pescheto e nella inter-fila del vecchio vigneto (Cavani et al., 2016). La composizione delle comunità batteriche, valutata con la tecnica molecolare già illustrata nel caso studio precedente ed elaborate con analisi multivariata per dati non pa-

rametrici, differiva sia per gestione (CONVEN *vs.* RE-NAT) che per posizione di campionamento entro frutteti. Tuttavia, nel pescheto a gestione convenzionale (CONVEN, fig. 4), le comunità della fila e dell'inter-fila (3 cerchi pieni e vuoti rispettivamente nel quadrante +X in figura 4), erano molto simili, come facilmente rilevabile dalla sovrapposizione dei punti che le rappresentano intorno all'asse +X (fig. 4). Al contrario, nel vigneto re-naturalizzato (RE-NAT), la composizione delle comunità batteriche sotto il vecchio filare (3 quadrati pieni nel quadrante -X -Y del grafico in figura 4) differivano ampiamente da quelle dell'inter-fila inerbita che nel grafico della PCA sono posizionate nell'altro quadrante (+Y, fig. 4). L'ampiezza della differenza di composizione batterica entro le due diverse gestioni (fig. 4) può essere dedotta dall'ampiezza dell'ellisse che raggruppano le comunità della stessa gestione con il 95% di probabilità.

Inoltre, nella fascia alberata del vigneto, con contenuto di rame totale pari a $\approx 1000 \text{ mg kg}^{-1}$ di suolo, le comunità batteriche avevano un indice di diversità superiore di tutti gli altri punti campionati.

In base ai due casi studio illustrati, la contaminazione a lungo termine di rame (valori fra 600 e 1000 mg kg^{-1} in suoli con pH variabile da 6.5 a 7.5) ha due principali effetti:

- modifica la composizione delle comunità batteriche indigene incrementando la variabilità spaziale. Questo suggerisce un effetto disturbo localizzato del rame sulle popolazioni batteriche;
- incrementa la biodiversità batterica. Questo può essere interpretato come uno sforzo di adattamento delle comunità batteriche agli effetti tossici dovuti alle alte concentrazioni di rame;
- un altro effetto della contaminazione di rame è la riduzione del quoziente metabolico dei suoli ($q\text{Co}_2$), ovvero del rapporto fra respirazione e biomassa microbica. Questo è, di fatto, un indice di efficienza metabolica, il quale suggerisce un chiaro effetto di tossicità di rame sulla funzionalità del microbioma del suolo. Questo dato, sempre dal lavoro di Cavani et al, (2016), è in linea con l'effetto riduttivo di rame sulla quantità di funghi tellurici rilevata nello strato coltivato in corrispondenza dei vecchi filari di vite.

CONCLUSIONI SU RAME E COMUNITÀ MICROBICHE DEI SUOLI

Mentre nei test di laboratorio su effetti nel breve periodo viene osservato quanto segue:

- la contaminazione di rame nel suolo riduce la diversità batterica (riduzione della *Richness*);

- aumenta la prevalenza di poche specie nella comunità batterica dei suoli (aumento della *Dominance*).

Nello strato coltivato dei suoli contaminati da tempo, concentrazioni di rame molto al di sopra dei limiti di tossicità, inducono le seguenti variazioni rispetto ai suoli non contaminati:

- modificano la composizione delle comunità batteriche indigene incrementandone la variabilità spaziale;
- incrementano la biodiversità batterica;
- riducono l'efficienza metabolica dei suoli;
- riducono la massa fungina dei suoli suggerendo un generale effetto riduttivo del rame.

In base ai due casi studio qui descritti (Kelderer et al., 2012; Cavani et al., 2016), l'arricchimento con sostanza organica dei suoli contaminati con rame permette in generale di attenuare gli effetti negativi della contaminazione a lungo termine dei suoli.

In conclusione, poiché a distanza di 40-50 anni dalle ultime applicazioni di rame, gli effetti di disturbo e di tossicità osservati sulle comunità microbiche dello strato coltivato sono persistenti, la decisione presa dalla comunità europea nel 2019 di limitare e poi vietare entro pochi anni l'uso dei prodotti rameici per la protezione delle piante, è condivisibile. Dal 1° febbraio 2019 è concesso l'uso rame per un totale complessivo di 28 kg ha⁻¹ nell'arco di sette anni. Tale decisione ha fatto seguito a valutazioni dell'EFSA pubblicate nel 2018 su uso, limiti e tossicità dei prodotti rameici ed una serie di successive contrattazioni a livello UE che hanno coinvolto tutte le parti interessate.

RIASSUNTO

La concentrazione di rame totale nel suolo pari a 100-150 mg kg⁻¹ è convenzionalmente riconosciuta come la soglia di tossicità di rame per piante e microorganismi del suolo. Queste soglie derivano da prove di fitotossicità in laboratorio con contaminazione artificiale e verifica l'effetto nel breve periodo. Tali condizioni di laboratorio hanno evidenziato che dosi di rame fitotossiche sulle piante (per es. da 250 a 500 mg kg⁻¹ rame totale su mais), riducono la diversità batterica inducendo la predominanza di alcune specie. Tuttavia, poco si sa dell'effetto a lungo termine di rame sui microorganismi del suolo.

Studi recenti hanno evidenziato che l'effetto di disturbo sull'attività microbica a partire da concentrazioni di rame superiori ai limiti, si evidenzia facilmente a distanza di 50-60 anni dalle ultime applicazioni di rame. In questo caso, diversamente dall'effetto al breve periodo dei test di laboratorio, il rame nel suolo aumenta la variabilità delle comunità batteriche e la loro diversità.

Per quanto riguarda la capacità metabolica, alte concentrazioni di rame presenti a lungo termine nei suoli ne riducono l'efficienza metabolica. Tuttavia, si riportano evidenze in cui la gestione conservativa, ed il graduale incremento della sostanza organica attenuano gli effetti tossici di rame su batteri e funghi del suolo, permettendo di raggiungere buoni livelli di fertilità biologica anche in presenza di concentrazioni di rame di gran lunga superiori a quella dei limiti convenzionali di tossicità.

ABSTRACT

Impact of copper on soil microbial communities. The total copper (Cu) concentration in the soil equal to 100-150 mg kg⁻¹ is conventionally recognized as the threshold of copper toxicity for plants and soil microorganisms. These thresholds derive from phytotoxicity tests in laboratory where artificial contamination of soil samples is obtained with increasing doses. These laboratory conditions have determined the phytotoxic copper doses on several plant species. For example, doses varying from 250 to 500 mg kg⁻¹ of total Cu are phytotoxic on maize and reduce bacterial diversity by inducing predominance of some species in soil bacterial communities. Therefore, in laboratory tests, copper contamination reduces bacterial richness and conversely increases the values of dominance. However, little is known about the long-term effect of copper on soil microorganisms.

Recent studies have shown that disturbance effect on microbial activity starting from copper concentrations above the limit can be easily detected after 50-60 years from the last copper applications. In this case, unlike the short-term effect of laboratory tests, copper increases spatial variability of bacterial soil communities as well as bacterial diversity. Soil fungi, under the same conditions, are suppressed as biomass, but do not seem overall affected in composition.

Finally, long-term soil contamination with high copper concentration (~ 1000 mg kg⁻¹ soil at 7.5 pH) reduces metabolic quotient which is a measure of metabolic efficiency of soil. However, recent case studies showed that conservative management and gradual increase of organic substance, can mitigate the toxic effects of copper on soil bacteria and fungi, allowing to reach good levels of biological fertility even in the presence of copper concentrations far superior to that of conventional toxicity limits.

BIBLIOGRAFIA

- CAVANI L., MANICI L.M., CAPUTO F., PERUZZI E., CIAVATTA C. (2016): *Ecological restoration of a copper polluted vineyard: Long-term impact of farmland abandonment on soil bio-chemical properties and microbial communities*, «Journal of Environmental Management», 182, pp. 37-47.
- CHAIGNON V., SÁNCHEZ-NEIRA I., JAILLARD B., HINSINGE P. (2003): *Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area*, «Environmental Pollution», 123, pp. 229-238.
- DELL'AMICO E., MAZZOCCHI M., CAVALCA L., ALLIEVI L., ANDREON V. (2008): *Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil*, «Microbiological Research», 163, pp. 671-683.
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY), ARENA ET AL. (2018): *Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance copper compounds cop-*

- per(I), copper (II) variants namely copper hydroxide, copper oxychloride, tribasic copper sulfate, copper(I) oxide, Bordeaux mixture*, «EFSA Journal», 16, 5152, 25 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5152>.
- FERNÁNDEZ-CALVIÑO D., MARTÍN A., ARIAS-ESTÉVEZA M., BÅÅTHC E., DÍAZ-RAVIÑA M. (2010): *Microbial community structure of vineyard soils with different pH and copper content*, «Applied Soil Ecology», 46, pp. 276-282.
- KELDERER M., MANICI L.M., CAPUTO F., THALHEIMER M. (2012): *Planting in the 'inter-row' to overcome replant disease in apple orchards: A study on the effectiveness of the practice based on microbial indicators*, «Plant and Soil», 357, pp. 381-393.
- IPPOLITO J.A., DUCEY T., TARKALSON D. (2010): *Copper impacts on corn, soil extractability and the soil bacterial community*, «Soil Science», 175, pp. 586-592.
- MANICI L.M., CIAVATTA C., KELDERER M., ERSCHBAUMER G. (2003): *Replant problems in South Tyrol: Role of fungal pathogens and microbial population in conventional and organic apple orchards*, «Plant and Soil», 256, pp. 315-324.
- MANICI L.M., KELDERER M., FRANKE-WHITTLE I.H., RÜHMER T., BAAB G., NICOLETTI F., CAPUTO F., TOPP A., INSAM H., NAEF A. (2013): *Relationship between root-endophytic microbial communities and replant disease in specialized apple growing areas in Europe*, «Applied Soil Ecology», 72, pp. 207-214.

