

**Effetti delle acque reflue del frantoio e di due estratti naturali come inibitori della attività dei batteri nitrificanti e della perdita per lisciviazione di nitrati. Prove su coltura in vaso di sedano (*Apium graveolens* L.)**

***Effects of Olive Mill Wastewater and Two Natural Extracts as Nitrification Inhibitors on Activity of Nitrifying Bacteria, Soil Nitrate Leaching Loss, and Nitrogen Metabolism of Celery (*Apium graveolens* L.)***

Catello Di Martino <sup>1</sup>, Pasqualino Minotti<sup>1</sup>, Erika Di Iorio<sup>1</sup>, Claudio Colombo<sup>1</sup>, Thomas W. Crawford Jr<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Agricoltura, Ambiente e Alimenti (DIAAA), Università degli Studi del Molise, via De Sanctis, 86100 Campobasso, (CB), Italia

<sup>2</sup> Global Agronomy, LLC, Marana, AZ 85658, USA

Abstract

Minimizing nitrification of fertilizer ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) can reduce nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) contamination of groundwater and increase nitrogen (N) use efficiency (NUE). Olive mill wastewater (OMW), hydroalcoholic extracts of *Mentha piperita* L. (Mp) and *Artemisia annua* L. (Aa), and the synthetic nitrification inhibitor (NI) dicyandiamide (DCD) were investigated. The three natural products and DCD reduced activity of nitrifying bacteria and decreased  $\text{NO}_3^-$  leached, compared to the untreated control. OMW proved to be an almost equally effective natural alternative to DCD as a NI.

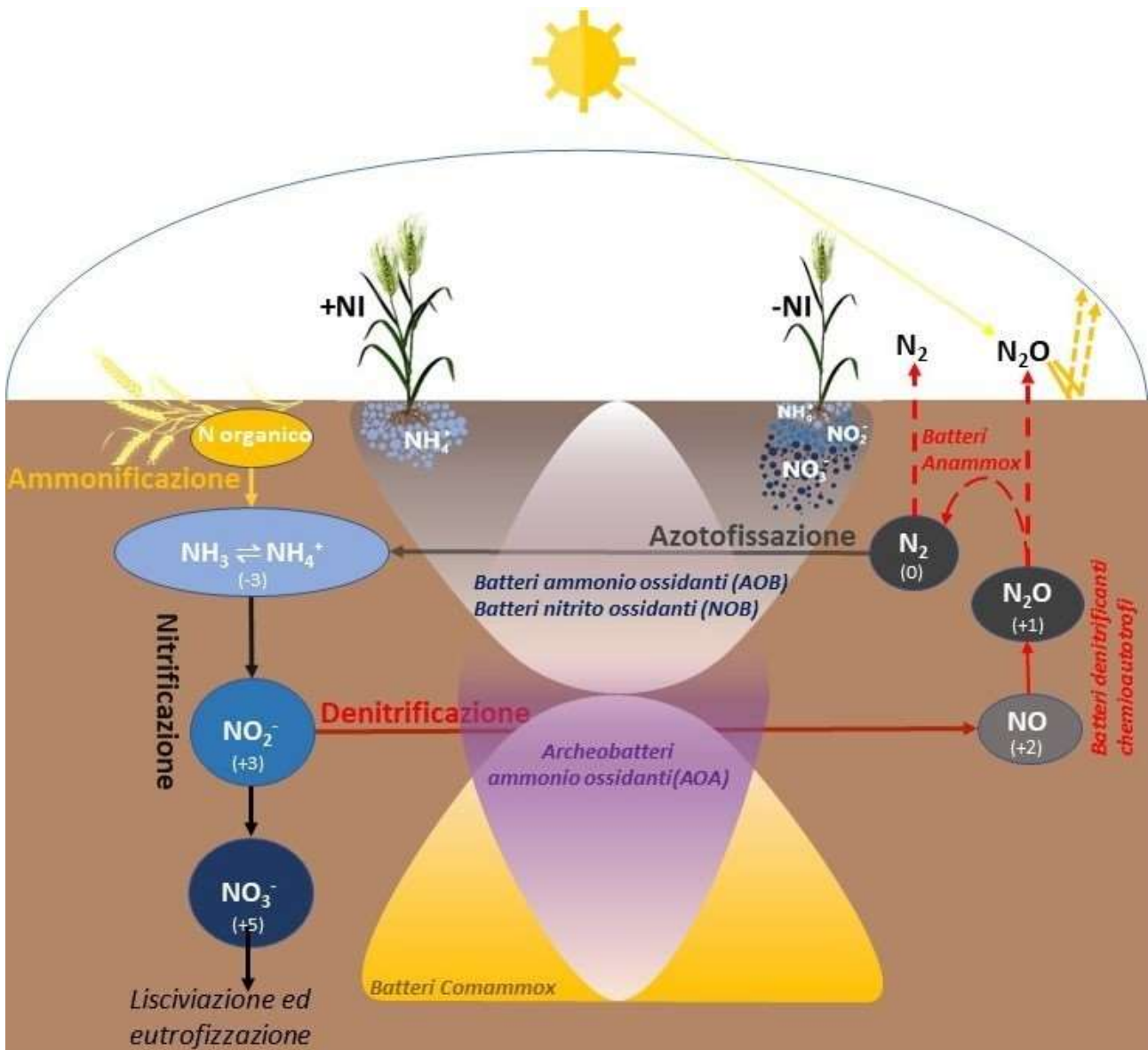
L'azoto è uno dei nutrienti più importanti per la crescita delle piante e quindi fortemente impiegato nei sistemi agricoli tramite la fertilizzazione. La mineralizzazione delle matrici biologiche del suolo attraverso il processo di decomposizione organica (batteri ammonificanti) e la fissazione biologica dell'azoto (batteri azoto-fissatori) rappresentano le principali fonti naturali della forma ammoniacale nel suolo. L'azoto, infatti, come ben noto, può essere organicato dalla cellula solo se presente nello stato di massima riduzione, ovvero in forma ammoniacale ( $-3$ ). La presenza dell'ammonio nel suolo, di origine biologica o inorganica, comunque ha una vita media limitata e in alcuni casi la permanenza può risultare troppo breve per un'efficiente assimilazione da parte delle radici e ciò per un processo di nitrificazione operato da batteri chemioautotrofi del suolo, che ossidando l'ammonio a nitrato alimentano attraverso il potere energetico generato la propria autotrofia nei confronti del carbonio.

La nitrificazione, cioè la conversione dell'ammonio, tramite nitrito, in nitrato da parte dei microrganismi del suolo, tuttavia, porta alla lisciviazione dei nitrati e alla produzione di monossido di azoto gassoso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) e come tale a una perdita fino al 50% della disponibilità di azoto per la pianta. La lisciviazione dei nitrati può provocare anche l'eutrofizzazione delle acque sotterranee, potabili e sanitarie, proliferazioni di alghe tossiche e perdita di biodiversità, mentre il monossido di azoto è un gas a effetto serra con un potenziale di riscaldamento globale 300 volte maggiore dell'anidride carbonica.

Logicamente, l'inibizione della nitrificazione è un'importante strategia utilizzata in agricoltura per ridurre le perdite di azoto e contribuire a una pratica più rispettosa dell'ambiente. Tuttavia, la microflora identificata e cruciale nella nitrificazione, cioè i batteri ossidanti l'ammoniaca (AOB), e batteri nitriti-ossidanti (NOB) o i batteri comammox scoperti di recente (cioè batteri ossidanti l'ammoniaca completi) [1, 2] (Figura 1), sembrano essere poco studiati a questo riguardo. In questo paper, forniamo un aggiornamento sui diversi percorsi nell'ossidazione dell'ammoniaca, l'importanza per l'agricoltura e l'interazione con gli inibitori della

nitrificazione. Pertanto, speriamo di individuare possibili strategie per ottimizzare l'efficienza dell'inibizione della nitrificazione a basso impatto ambientale.

L'azoto è uno dei nutrienti più importanti per la crescita e la produttività della pianta. Le due principali forme di azoto che vengono utilizzate nei fertilizzanti e che vengono assorbite in modo efficiente dalle radici delle piante sono ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). L'ammonio viene utilizzato direttamente per sintetizzare la glutammina e successivamente anche altri amminoacidi. Il nitrato, d'altra parte, per poter essere assimilato deve essere ridotto ad ammonio con un inevitabile impiego di potenziale riducente che il parenchima radicale o il mesofillo fogliare spendono in termini di equivalenti NAD(P)H [3]. In quanto tale, l'applicazione di ammonio come fertilizzante azotato, risulta più efficiente, con conseguente aumento dei livelli di clorofilla, amido, monosaccaridi e amminoacidi, tutti parametri importanti della coltura [4]. Inoltre, l'ammonio stimola la ramificazione delle radici, aumentando la superficie per l'assorbimento dei nutrienti [5,6]. Il nitrato tuttavia, stimola l'allungamento laterale della radice per captare più nutrienti ed inoltre la presenza di isoforme plastidiche della Nitrato reductasi assimilativa (NAR) (NADP) dipendente e della Nitrito Reduttasi (NIR) (Ferridossina dipendente [7], potrebbero esercitare un effetto drenante sugli equivalenti di riduzione tilacoidali, limitando così i rischi di inneschi pseudociclici di trasporto elettronico. Pertanto, miscele di entrambi le fonti di azoto favoriscono la crescita delle piante [8]. Nel suolo, il nitrato non aderisce bene alle particelle di terreno caricate negativamente, e quindi percola facilmente e, con la lisciviazione, non è più disponibile per le piante. L'ammonio, invece, con la sua carica elettrica positiva è attratto dalle particelle di terreno cariche negativamente sia per la fase minerale che per la sua porzione organica. Quindi, l'ammonio è la forma d'azoto più efficiente in campo, ma viene parzialmente rimosso dalla rizosfera a causa dell'ossidazione dell'ammoniaca, con conseguente produzione di nitrato meno preferibile. In altri termini potremmo riassumere affermando che il nitrato rappresenta la forma d'azoto più disponibile, l'ammonio la più appetibile.



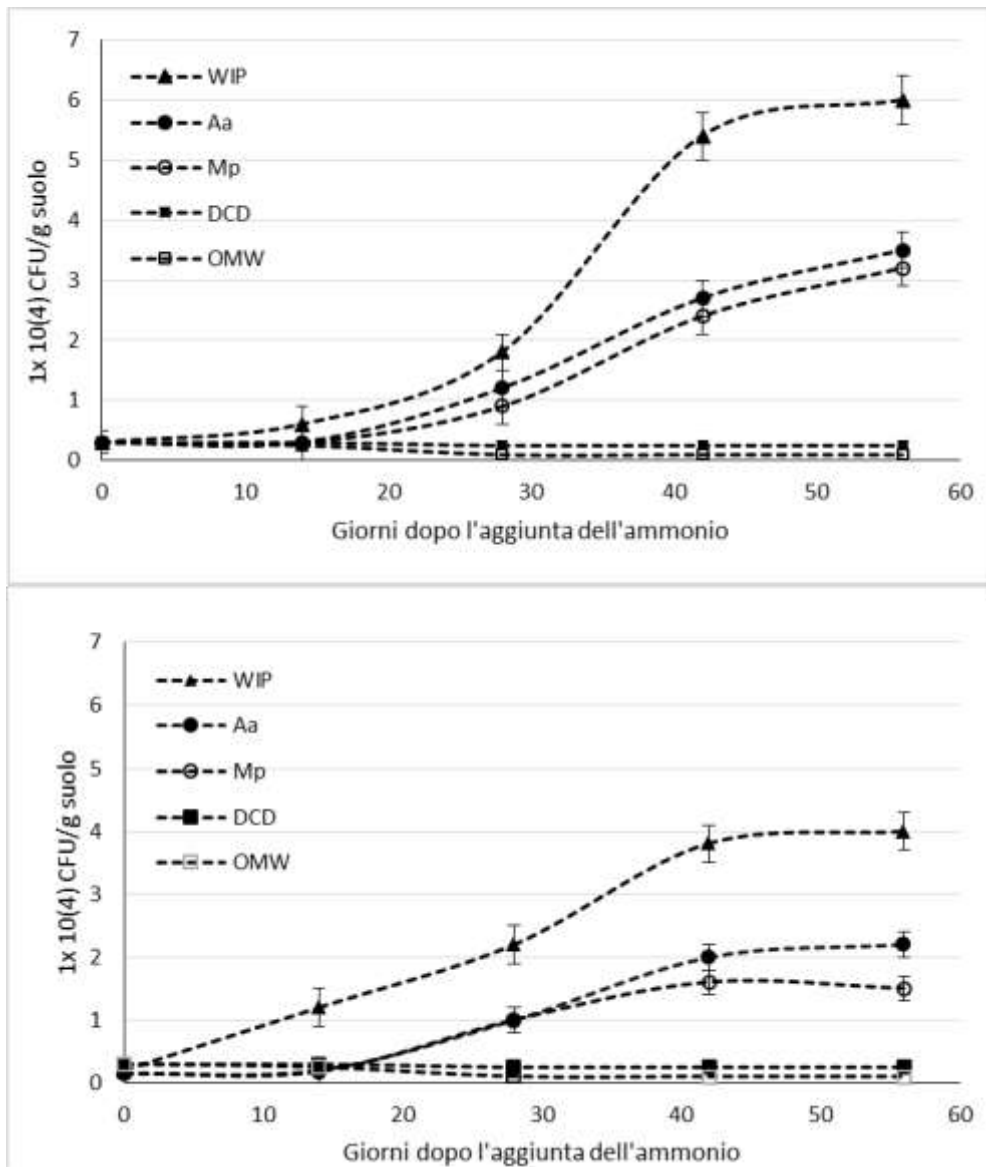
**Figura 1** Schema del ciclo dell'azoto nel suolo, comprese le distribuzioni relative dei batteri AOB, NOB (alone grigio), AOA (alone viola) e comammox (alone giallo) nel suolo e l'impatto ambientale dell'uso di un inibitore della nitrificazione. La nitrificazione (frecche nere) è un processo aerobico in due fasi in cui l' $\text{NH}_4^+$  viene ossidato a  $\text{NO}_3^-$  tramite  $\text{NO}_2^-$ . Il prodotto  $\text{NO}_3^-$  viene successivamente riconvertito in  $\text{NO}_2^-$  e quindi  $\text{NH}_4^+$  dalle piante tramite riduzione assimilativa dei nitrati. Una parte non poco consistente dei nitrati viene invece persa tramite lisciviazione, portando all'eutrofizzazione di acque sotterranee, fiumi e oceani, causando problemi ambientali come la contaminazione dell'acqua potabile, fioriture di alghe tossiche e perdita di biodiversità. La denitrificazione, d'altra parte, si traduce in emissioni di  $\text{N}_2$  da parte dei batteri Anammox che convertono anaerobicamente,  $\text{NO}_2^-$ , in  $\text{N}_2$  gassoso, insieme ad altri batteri chemioautotrofi che possono produrre  $\text{N}_2\text{O}$  utilizzando  $\text{NO}_2^-$  come accettore di elettroni per l'ossidazione di composti inorganici come  $\text{S}_2$  e  $\text{Fe}^{2+}$ . L' $\text{N}_2\text{O}$  è un gas a effetto serra con un grave potenziale di riscaldamento globale. In definitiva i microrganismi ossidanti l'ammoniaca e le piante competono per l'azoto disponibile nel suolo. Gli inibitori della nitrificazione (NIs) possono essere utilizzati per ridurre la concorrenza tra piante e microrganismi e, di conseguenza, perdite di azoto tramite  $\text{NO}_3^-$  per lisciviazione e le emissioni di  $\text{N}_2\text{O}$  saranno ridotte mentre più  $\text{NH}_4^+$  rimane disponibile nel terreno per l'assorbimento delle piante. Questo aumento della disponibilità di  $\text{NH}_4^+$ , generalmente stimola la ramificazione laterale delle radici e promuove la crescita delle piante attraverso un maggiore foraggiamento di nutrienti. Senza NI, le perdite di azoto si traducono in una riduzione della resa del raccolto.

Le sfumature colorate indicano le densità relative presunte e l'attività dei batteri AOB-NOB, AOA e comammox con l'aumentare della profondità del suolo: rispettivamente a profondità bassa, intermedia e alta.

**Abbreviazioni:** AOB, ammonio-ossidanti batteri; AOA, ammonio-ossidante archaea; comammox, batteri ossidanti l'ammonio completi; anammox, batteri anaerobici che ossidano l'ammoniaca; NO, ossido nitrico; DNRA, nitrito dissimilatorio riduzione ad ammoniaca, N<sub>2</sub>, azoto; NH<sub>3</sub>, ammoniaca; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ammonio, NI, inibitore della nitrificazione.

La perdita di nitrato, per lisciviazione, può causare l'eutrofizzazione oppure portare, attraverso un'ulteriore trasformazione, alla produzione del monossido d'azoto (N<sub>2</sub>O) [9] (Figura 1), gas a effetto serra. In quanto tali, questi microrganismi non solo competono con le piante per l'ammonio disponibile spostandolo sull'equilibrio dei nitrati, ma possono causare anche notevoli perdite di azoto col rischio di un significativo impatto sui cambiamenti climatici e eutrofizzazione ambientale. Logicamente, strategie per inibire la nitrificazione sono state sviluppate nel corso degli anni, e attualmente inibitori della nitrificazione come DCD (diciandiamide), N-serve (nitrapirina) o ENTEC (DMPP; 3,4-dimetilpirazolo fosfato) sono ampiamente applicati in campo per mitigare gli effetti negativi della nitrificazione. Tuttavia, mentre tutti questi inibitori si sono sviluppati nel XX secolo, la conoscenza fondamentale in materia di nitrificazione è in rapida evoluzione e l'utilizzo di inibitori naturali della nitrificazione meno impattanti e in alternativa agli inibitori di sintesi chimica è già una realtà. A tale scopo, per la nostra sperimentazione, sono state studiati come potenziali inibitori naturali della nitrificazione le acque reflue di frantoio (OMW), gli estratti idroalcolici di *Mentha piperita* L. (Mp) e di *Artemisia annua* L. (Aa) per essere successivamente comparati, come capacità inibente dei batteri nitrificanti, alla diciandiamide (DCD) inibitore della nitrificazione (NI) di origine sintetica comunemente impiegato in agricoltura. La sperimentazione è stata eseguita in cella climatica utilizzando *Apium graveolens* L. come pianta di riferimento, trapiantata dopo 30 giorni dalla germinazione, in vasi da 1,3 Lt in una miscela 2:0,5:0,5 in volume, di terreno, sabbia, torba, preventivamente trattate con i suindicati agenti naturali seguendo opportune metodiche sperimentali, (ovvero dosaggi dei principi attivi e fissaggio su supporti inerti a saturazione come la polvere di pomice). Le piante venivano irrigate (solo per la prima volta) con una miscela nutriente avente come unica fonte d'azoto l'ammonio solfato ad una concentrazione ammoniacale pari a 200 mmol Kg<sup>-1</sup> suolo. Successivamente venivano irrigate a giorni alterni raccogliendo ogni 7 giorni 20mL di percolato dal sottovaso in alluminio. La quantità di nitrato percolato (ovvero persa per lisciviazione) risultava essere a 56 giorni dal trapianto per DCD, OMW, Mp e Aa il 24%, 26%, 67%, and 78% rispetto al nitrato lisciviato del campione controllo non trattato. Questa evidente riduzione di lisciviazione di nitrato nel suolo che in campo si tradurrebbe in un minor inquinamento delle falde, veniva confermata dal dosaggio della carica batterica degli AOB e NOB già presenti nel suolo durante i 56 giorni dell'esperimento, attraverso il conteggio microbiologico, per unità di colonie formate (CFU) in capsula petri, nei campioni dei terreni trattati (Fig 2). Come si può facilmente evidenziare dalla Fig. 2 la carica batterica dei nitrificanti a tempo zero di tutti i campioni esaminati è molto bassa ovvero dell'ordine di 0,2-0,3 x 10<sup>4</sup> CFU/g suolo.

Ciò vuol dire che le colonie dei nitrificanti si sviluppano e diventano batteriologicamente significative solo in presenza del substrato, ovvero ammonio e nitrito. Queste, infatti, restano basse, cioè incapaci di ossidare il substrato, solo se in presenza di inibitori efficaci come dimostrano i vasi trattati con DCD e OMW. Diversamente i trattamenti con Mp e Aa in presenza di substrato consentono lo sviluppo delle colonie nitrificanti AOB e NOB di circa il 50% rispetto ai vasi controllo, Quindi i trattamenti con Mp e Aa anche se rivelano una capacità inibente più attenuata rispetto ai trattamenti con DCD o OMW la loro azione come inibitori della nitrificazione è da considerarsi comunque significativa.



**Figura 2 :** a) Attività ammonio -ossidante dei batteri nitrosanti (AOB); Sviluppo delle colonie batteriche nella miscela di suolo con 4 differenti inibitori della nitrificazione (NI) in funzione del tempo (giorni) dopo l'aggiunta dell'ammonio. WIP = Vaso controllo: suolo senza pianta e senza NI; OMW = suolo + acque reflue olivicole; DCD = suolo + diciandiamide; Aa = suolo + estratto di *A. annua* L.; Mp = suolo + estratto *M. piperita* L. CFU = Unità formante colonia. Le barre dei punti corrispondono a  $\pm$  errore standard (SE) ( $n = 3$ ). b) Attività di nitrito ossidante dei batteri nitricanti (NOB); Sviluppo delle colonie batteriche nella miscela di suolo con 4 differenti inibitori della nitrificazione (NI) in funzione del tempo (giorni) dopo l'aggiunta dell'ammonio. (come a).

Poichè il metabolismo dell'azoto sia nelle foglie che nelle radici, misurato attraverso le attività della Nitrato reductasi assimilativa (NAR), Glutammina sintetasi (GS), la concentrazione di aminoacidi, le clorofille e le proteine totali (Dati non mostrati) differivano in funzione della diversa inibizione della nitrificazione, si è reso necessario sintetizzare il tutto come  $N_{tot}$  in un bilancio dell'azoto ben schematizzato in tabella 1. Dalla tabella 1 è possibile evidenziare un contenuto di  $N_{tot}$  maggiore per le piante trattate con DCD e OMW rispetto al controllo, cosa che si traduceva non solo in un maggior vigore organico e resa produttiva delle piante, ma anche in una minor quantità di nitrati lisciviati nelle falde.

**Tabella 1** Valore medio di N assimilato per pianta ( $N_{ass}$ ), N totale ( $N_{tot}$ ) in 1 kg suolo, e N lisciviato di sei campioni (vasi) a 56 DAP

Trattamento	$N_{ass}$ per pianta		$N_{tot}$ per vaso (1kg)		N lisciviato
	0 GDT	56 GDT	0 GDT	56 GDT	56 GDT
	mmol N/pianta		mmol N/vaso		mmol N/vaso
WI	0	50±4c	190±2a	45±4c	80±6a
DCD	0	95±7a	190±2a	75±6a	18±2c
OMW	0	90±6a	190±2a	78±6a	20±2c
Aa	0	70±6b	190±2a	60±5b	60±5b
Mp	0	64±5b	190±2a	58±7b	68±5b

**Trattamenti:** WI = Controllo con pianta, ma senza inibitore della nitrificazione (NI); DCD = diciandiammide; OMW = acque reflue frantoio; Aa = estratto di *A. annua* L. ; Mp = estratto di *M. piperita* L. Ciascun valore è la media  $\pm$  DS di sei repliche. In ogni colonna, valori contrassegnati da lettere comuni non sono statisticamente differenti a  $P \leq 0,05$  secondo il test di Tukey eseguito tra i diversi trattamenti NI.

L'OMW e in misura minore gli estratti meno efficaci di Mp e Aa, sono potenziali forme alternative al DCD come NI. I risultati ottenuti dal presente studio dimostrano che il terreno trattato con OMW o DCD riesce a custodire e tutelare più efficacemente l' $\text{NH}_4^+$  come fonte d'azoto nel terreno durante la crescita vegetativa della pianta, migliorandone così la nutrizione azotata. Con meno  $\text{NO}_3^-$  lisciviato derivante dall'applicazione degli inibitori della nitrificazione, il fertilizzante ammoniacale è stato utilizzato di più e in modo più efficiente, rispetto a un trattamento di controllo privo di inibitore. I risultati del presente studio mostrano quindi che DCD è un NI efficiente, e OMW come alternativa naturale è quasi altrettanto efficace. Gli inibitori naturali della nitrificazione testati nel presente studio sono gradualmente biodegradati dopo il ciclo colturale e la loro capacità di ridurre perdite per lisciviazione di  $\text{NO}_3^-$ , quando accuratamente miscelati in un terreno, suggerisce un'ipotesi da verificare con ulteriori ricerche, cioè, che OMW, Ap e Mp possono ridurre le perdite per lisciviazione dei nitrati anche se impiegati per rivestire semi o granuli di fertilizzante.

## Bibliografia

- 1 Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertsen M, Jehmlich N, Palatinszky M, Vierheilig J, Bulaev A et al.: Complete nitrification by Nitrospira bacteria. Nature 2015, 528:504-509.
- 2 van Kessel MAHJ, Speth DR, Albertsen M, Nielsen PH, Op den Camp HJM, Kartal B, Jetten MSM, Lu" cker S: Complete nitrification by a single microorganism. Nature 2015, 528: 555-559.
- 3 Salsac L, Chaillou S, Morot-Gaudry J-F, Lesaint C, Jolivet E: Nitrate and ammonium nutrition in plants. Plant Physiol Biochem 1987, 25:805-812.
- 4 Sato S, Yanagisawa S: Characterization of metabolic states of Arabidopsis thaliana under diverse carbon and nitrogen nutrient conditions via targeted metabolomic analysis. Plant Cell Physiol 2014, 55:306-319

- 5 Lima JE, Kojima S, Takahashi H, von Wire´ n N: Ammonium triggers lateral root branching in Arabidopsis in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-dependent manner. *Plant Cell* 2010, 22:3621-3633.
- 6 Xuan W, Beeckman T, Xu G: Plant nitrogen nutrition: sensing and signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2017, 39:57-65.
- 7 Joy, K.W. and Hageman, R.H., *The purification and properties of nitrite reductase from higher plants, and its dependence on ferredoxin*, in *Biochem. J.*, 1966, 100:263–273.
- 8 Hachiya T, Sakakibara H: Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. *J Exp Bot* 2017, 68:2501-2512.
- 9 Stein LY, Klotz MG: The nitrogen cycle. *Curr Biol* 2016, 26: R94-R98