UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

Dipartimento di Bioscienze e Territorio

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE BIOLOGICHE, BIOMEDICHE, DELL'AMBIENTE E DEL TERRITORIO

Ciclo XXIX

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/03

"EFFETTI DEL BIOCHAR SULLA RIZOSFERA"

Dott.ssa Carla Amendola

A.A 2015-2016

Tutor: Prof.ssa Gabriella Stefania Scippa

Coordinatrice: Prof.ssa Gabriella Stefania Scippa

ABSTRACT

Il biochar è un ammendante prodotto dalla pirolisi di biomasse vegetali o animali, applicato al terreno per le sue potenzialità in campo agricolo e ambientale. Negli ultimi anni esso è stato oggetto di notevole interesse da parte della ricerca scientifica per la sua potenzialità, come tecnologia verde, di sottrarre anidride carbonica all'atmosfera. Tale proprietà è dovuta alla sua struttura amorfa, ad anelli aromatici fusi, poco soggetta alla degradazione. Inoltre, come ampiamente dimostrato nei lavori presenti in letteratura scientifica, grazie ad altre caratteristiche, quali l'elevata estensione superficiale e la porosità, tale prodotto è risultato avere un valore aggiunto per la sua capacità di migliorare le caratteristiche del terreno e di conseguenza incrementare la crescita e lo sviluppo di molte specie di piante di interesse agronomico. Tuttavia è noto che gli effetti del biochar sul terreno e sulle piante possono essere molto variabili, in alcuni casi negativi, poiché sia le proprietà chimico-fisiche del terreno che quelle del biochar influiscono notevolmente sul modo di interagire tra loro e con le relative componenti biotiche.

Nonostante la crescente mole di lavori sugli effetti del biochar sul terreno e sulle rese agronomiche di molte specie di piante, ancora poco studiate sono le interazioni tra biochar e componente biotica e abiotica della rizosfera. Partendo da questi presupposti il lavoro di questa tesi di dottorato ha avuto l'obiettivo di studiare gli effetti di una sola tipologia di biochar sulla componente biotica e abiotica della rizosfera, considerando terreni con diverse caratteristiche chimico fisiche, in condizioni controllate e in campo, al fine di delinearne un possibile meccanismo di azione sul sistema suolo-pianta, attraverso l'apparato radicale ed extraradicale.

Nella sperimentazione in campo sono stati presi in considerazione i terreni relativi alla coltura di vite, olivo e foraggio, trattati con dosi di biochar di 10 t ha^{-1} e, analizzati a diversi intervalli temporali.

Nel suolo terreno della vite lo studio degli effetti del biochar sulla rizosfera, ha previsto l'analisi della crescita delle micorrize e della variazione stagionale della biomassa radicale, calcolando la produzione annuale e il turnover radicale. I risultati ottenuti da questo studio hanno evidenziato che il trattamento di biochar a breve termine induce nella rizosfera della

vite un considerevole incremento di carbonio organico, di macroaggregati, di acqua disponibile, di azoto ammoniacale, di abbondanza microbica e di biomassa e diametro delle radici fini.

Nei suoli dell'oliveto e della foraggera, caratterizzati da un più elevato contenuto di carbonio rispetto alla vite, si è osservato, a seguito del trattamento con biochar un aumento significativo di Corg e CSC. Dalle analisi microbiologiche, invece, è emerso un aumento di batteri aerobi riconducibili, in base ai risultati delle analisi enzimatiche, a specie impegnate nella difesa della pianta nel caso dell'oliveto e un incremento di miceti nel terreno della foraggera.

Per quanto riguarda la sperimentazione in serra, sono stati valutati gli effetti del biochar sulla rizosfera di tre diverse colture (lattuga, pomodor, pioppo) allevate su un terreno a scarso contenuto di Corg e nutrienti ed un terreno ricco. I risultati delle indagini sulla rizosfera della lattuga, hanno mostrato che a distanza di due mesi dal trattamento, il biochar induce, sul terreno povero, un incremento di N e P totale e di Ctot e un incremento della composizione delle comunità microbiche correlate al ciclo di tali tre elementi. Nel terreno più ricco, invece, in seguito all'aggiunta di biochar sono state osservate solo variazioni negative in relazione alle attività enzimatiche delle specie microbiche correlate al ciclo dei nutrienti.
Sul terreno povero del pomodoro, dopo quattro mesi di permanenza del biochar, sono stati osservati, incrementi di conducibilità, Ptot, Corg, e di aggregati; nel terreno ricco, invece, dalla tessitura sabbiosa limosa, pH fortemente acido e conducibilità elevata, dopo il trattamento del biochar si è osservato un incremento considerevole di pH, fosforo assimilabile e macroaggregati. Dalle analisi microbiologiche si è osservata una colonizzazione preferenziale da parte dei batteri aerobi, del terreno povero, seguito dal terreno ricco trattato con biochar ed infine dal terreno ricco non trattato e da quello povero trattato con biochar. Lo stesso andamento si è osservato in relazione alla composizione microbica. Per quanto riguarda la massa radicale, non sono state rilevate differenze tra i due terreni e i rispettivi trattamenti con biochar. Per quanto riguarda il terreno povero del pioppo, a tessitura grossolana, suscettibile di lisciviazione dei nutrienti e rapida degradazione del carbonio organico, l'aggiunta di biochar ha provocato, a distanza di un anno, l'incremento di Ntot , Ptot, CSC e un decremento della frazione granulometrica di dimensioni maggiori. Lo stesso terreno, fertilizzato con compost, presenta caratteristiche chimico fisiche migliori: la tessitura è risultata sabbiosa-argillosa-limosa e il contenuto di Corg, Ntot e Ptot soddisfacente, medio e ben dotato, rispettivamente. Dopo

l'aggiunta di biochar si nota un ulteriore incremento di Ntot e Ptot , un decremento della frazione granulometrica di dimensioni superiori a 2 mm e della conducibilità; tuttavia l'entità di tali variazioni non è tale da modificare la valutazione agronomica di tale terreno. Dai risultati relativi alla biomassa radicale, non sono emerse differenze significative né tra le due tipologie di terreno non trattate, nè tra le stesse ed i rispettivi trattamenti.

Si può pertanto concludere che la stessa tipologia di biochar può avere effetti positivi, negativi o neutri a seconda delle caratteristiche del suolo ammendato, delle dosi e dei tempi di permanenza e della tipologia di piante coltivate.

L'elemento sicuramente innovativo di questo lavoro di ricerca è costituito dall'ampliamento delle conoscenze sugli effetti del biochar sulla rizosfera, un sistema di interazioni complesse e dinamiche che rappresenta la prima interfaccia suolo-pianta, ad oggi ancora molto poco studiato.

INDICE

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE 6
La rizosfera 6
Cambiamenti climatici 8
Il biochar 12
Proprietà del biochar ed effetti sul suolo 17
Interazioni suolo-biochar 24
Obiettivi 34
Bibliografia 36
CAPITOLO 2 - SPERIMENTAZIONE IN CAMPO 60
2.1 Materiali e metodi 60
Biochar utilizzato e modalità di applicazione al suolo 61
Caratterizzazione chimico fisica del del biochar 62
Allestimento sperimentazione sul suolo del vigneto 64
Allestimento sperimentazione sul suolo dell'oliveto 68
Allestimento sperimentazione sul suolo della foraggera 71
Caratterizzazione chimico fisica del suolo 72
Caratterizzazione microbiologica del suolo 74
Determinazione delle micorrize 76
Analisi dell'apparato radicale 76
Analisi statistica 78
2.2 Risultati relativi alla caratterizzazione del biochar 78
2.3 Risultati relativi allo studio sul suolo della vigna e relativa discussione 79
Effetto del biochar sui batteri e le comunità microbiche della vigna 91
2.4 Risultati relativi allo studio sul suolo dell' oliveto e relativa discussione 95
Effetto del bichar sulle caratteristiche chimico fisiche del suolo dell'oliveto 96
Effetto del biochar sulle comunità microbiche del suolo dell'oliveto 98
2.5 Risultati relativi allo studio sulla foraggera e relativa discussione 100
Effetto del biochar sulle caratteristiche chimico fisiche del suolo della foraggera 100

Effetto del biochar sulle comunità microbiche del suolo della foraggera 102
Appendice al capitolo II Quadro riepilogativo dei risultati ottenuti nella sperimentazione in campo 104
Bibliografia 108
CAPITOLO 3 - SPERIMENTAZIONE IN SERRA.....116
3.1 Materiali e metodi.....116
Allestimento della sperimentazione su piante di Lactuca sativa 117
Allestimento della sperimentazione su piante di Lycopersicon esculentum 118
Allestimento della sperimentazione su piante di pioppo 120
Caratterizzazione chimico fisica del suolo..... 122
Studio della biomassa radicale..... 122
Analisi statistica 122
3.2 Risultati relativi allo studio sulla lattuga e relativa discussione.....122
3.3 Risultati relativi allo studio sul terreno di crescita del pomodoro e relativa discussione 136
Effetto delbiochar sulle caratteristiche chimico fisiche del terreno di crescita del pomodoro 136
Effetto del biochar sulle comunità microbiche del terreno di crescita delle piante di pomodoro 139
Effetto del biochar sulla biomassa delle radici..... 142
3.4 Risultati relativi allo studio sul terreno di crescita del pioppo e relativa discussione...144
Effetto del biochar sulle caratteristiche chimico fisiche del terreno di crescita del pioppo 144
Effetti del biochar sulla biomassa delle radici.....148
Appendice al Capitolo III Quadro riepilogativo dei risultati ottenuti nella sperimentazione in serra.....149
Bibliografia..... 152
CONCLUSIONI.....156

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

La rizosfera

Il termine "rizosfera", introdotta dal Prof. Lorenz Hiltner nel 1904 (Hiltner, 1904), definisce la parte del suolo interessata dal sistema radicale. Più recentemente la rizosfera è stata definita come la regione del suolo immediatamente circostante alle radici delle piante che, arricchendosi di sostanze organiche prodotte dalle radici, quali molecole poco complesse soggette a facile degradazione, permette l'instaurarsi di una complessa rete trofica che va dai batteri ai microartropodi (Viketoft et al., 2005).

E' noto, infatti, che le radici rilasciano tra il 5% e il 21% del carbonio fissato fotosinteticamente dalla pianta, come zuccheri, aminoacidi o metaboliti secondari (Badri e Vivanco, 2009; Badri et al., 2013b; Chaparro et al., 2013a), che viene utilizzato come fonte di nutrimento e di energia dalle comunità microbiche della rizosfera.

Queste sostanze conosciute come essudati radicali sono raggruppati in due classi: composti a basso peso molecolare, come aminoacidi, acidi organici, zuccheri, composti fenolici e altri metaboliti secondari e composti ad elevato peso molecolare, come polisaccaridi e proteine (Bais et al., 2006; Badri e Vivanco, 2009;Narasimhan et al., 2003).

La composizione qualitativa e quantitativa degli essudati radicali dipende dalla tipologia di cultivar, dalla specie, dallo stadio di sviluppo della pianta e da vari fattori ambientali, come il pH, la temperatura e la presenza di microorganismi (Badri e Vivanco, 2009; Uren 2000).

Sulla base della composizione degli essudati si possono generare comunità microbiche nella rizosfera che hanno un certo grado di specificità per ciascuna specie di pianta e che sono in grado di interagire a loro volta con le stesse e con il suolo circostante, plasmando e mantenendo le proprietà del suolo e le caratteristiche del paesaggio, regolando l'abbondanza e la composizione di specie di piante e di animali (Berg et al., 2010, van der Putten et al., 2013).

Le interazioni che si stabiliscono nella rizosfera tra pianta-suolo e microorganismi possono variare in funzione delle condizioni ambientali circostanti.

Un esempio tipico è quello dei i rizobi, batteri simbiotici azoto-fissatori, che interagiscono con le radici a seconda dei livelli di azoto nel suolo (Davidson e Robson 1986; Zahran, 1999). La loro presenza infatti è favorita da piante le cui radici sono in grado di secernere sostanze organiche quali flavoni e flavonoli.

Il caso più eclatante è quello delle piante leguminse che, sotto condizioni limitanti di azoto, secernono sottoforma di essudati radicali tali sostanze al fine di favorire la simbiosi con i rizobi (Coronado et al., 1995;Zhang et al., 2009).
Ne consegue che la rizosfera è un'entità dinamica, caratterizzata da una grande varietà di interazioni biologiche, chimiche e fisiche, tra le radici della pianta, il suolo, i microrganismi e le radici di piante vicine (Morgan et al, 2005).

Le interazioni che si instaurano nella rizosfera si considerano negative o positive quando l'effetto netto delle stesse si traduce rispettivamente in una diminuzione o un aumento delle performance della pianta, quali ad esempio la produzione di biomassa e la sopravvivenza.

Interazioni positive tipiche nella rizosfera sono le simbiosi radice-microrganismi, come associazioni con rizobatteri promotori della crescita della pianta (PGPR) e funghi micorrizici.
Queste, infatti, hanno mostrato di apportare effetti benefici sulle piante, quali la soppressione di malattie (Haas e Défago, 2005;Mendes et al., 2011;Weller et al., 2002), l'incremento della disponibilità di nutrienti (Lugtenberg et al., 2002;Morrissey et al.,2004) e l'aumento della resistenza a stress abiotici (Selvakumar et al., 2012;Zolla et al., 2013) e biotici (Badri et al., 2013b;Zamioudis e Pieterse 2012), ciascuno dei quali conduce ad un aumento della produttività della pianta (Berg 2009).
A loro volta le radici forniscono ai microorganismi, attraverso gli essudati, molecole usate come substrati e segnali (Bais et al., 2006), utilizzati dalle piante come mezzo di comunicazione con i microrganismi del suolo, regolando la colonizzazione delle radici.
Le relazioni simbiotiche come le micorrize sono governate da un uguale scambio di nutrienti e benefici per ogni membro. Per esempio, nella *Medicago trucantula* Gaertn. è stato osservato che quando veniva fornita al partner simbionte una maggiore quantità di carbonio, questo forniva a sua volta alla pianta una maggiore quantità di fosforo (Kiers et al., 2011).

La rizosfera quindi svolge un ruolo fondamentale nel ciclo dei nutrienti, nella regolazione della coesistenza tra piante vicine e nel controllo delle diverse specie; pertanto alterazioni nelle interazioni che in essa si stabiliscono possono avere significative ripercussioni sulla composizione della comunità delle piante e sulle funzioni dell'ecosistema.

Cambiamenti climatici

Il grande squilibrio tra il rilascio di carbonio nell'atmosfera e l'assorbimento di carbonio da parte di altri comparti ha portato ad un continuo aumento di CO2 in atmosfera, equivalente ad un tasso di 8,3 [7,6-9,0] GtC^{12}/anno mediamente nel periodo 2002-2011(IPCC, 2013).

E' noto che la concentrazione di CO_2 ed altri gas, come metano (CH_4) e ossido di azoto (N_2O), è correlata positivamente con la temperatura del pianeta. Essi, infatti, assorbono in maniera selettiva le radiazioni provenienti dall'esterno dell'atmosfera, irraggiandole nuovamente sia all'esterno che all'interno della stessa (Macías e Camps Arbestain, 2010). Elevati livelli di questi gas interferiscono con questo equilibrio, perturbando il sistema climatico.

Il progressivo riscaldamento derivante da tali cambiamenti, sembra essere la causa delle alterazioni del ciclo dell'acqua, con la diminuzione delle coperture nevose nell'emisfero settentrionale, la diminuzione dei ghiacciai artici, l'aumento del livello medio dei mari e una maggiore evapo-traspirazione, soprattutto a carico delle zone secche e aride, con significative alterazioni nella frequenza e consistenza delle precipitazioni. Infatti, si è osservato un netto aumento delle precipitazioni nell'Europa settentrionale, nel nord e nel sud America orientali, nell'Asia centrale e settentrionale ed un incremento della siccità nel Mediterraneo, nel Sahel, nell'Africa meridionale e in alcune aree dell'Asia meridionale (IPCC, 2007), con periodi siccitosi più lunghi e intensi rispetto al passato, che possono portare a fenomeni di desertificazione (Gambarelli et al., 2007).

Secondo un report dell'Agenzia Europea dell'Ambiente pubblicato recentemente (Febbraio 2017), a causa dei cambiamenti climatici, in molte regioni europee si è riscontrato un innalzamento del livello del mare e un aumento di eventi meteorologici più estremi, come per esempio ondate di calore, inondazioni, siccità e tempeste più intense.

E' accettato, a seguito di numerosi studi, che i cambiamenti climatici possono interferire nelle interazioni fra specie, alterando a cascata la biodiversità e la funzione degli ecosistemi terrestri (Walther et al., 2002, Gottfried et al., 2012, Langley e Hungate 2014).

Infatti gli impatti dei cambiamenti climatici sugli ecosistemi diventano sempre più evidenti a livello macoscopico; molte specie animali e vegetali, infatti, stanno subendo variazioni del loro ciclo di vita, con processi di migrazioni verso nord e verso altitudini più elevate, e una maggiore diffusione di diverse specie invasive (EEA, 2017).

Infatti, per quanto riguarda le piante, sono in atto variazioni degli areali geografici di distribuzione, già da tempo previste, (Thuiller, 2007), dovute ad una selezione delle specie a favore di quelle più tolleranti alle attuali condizioni ambientali, che si manifestano con l'invasione delle specie esotiche e la promozione di specie autoctone più competitive.

Inoltre l'aumento delle temperature dovuto all'effetto serra sembra, influire sui cicli vegetativi, determinando una tendenza ad un anticipo temporale delle fasi fenologiche, sul processo fotosintetico (Taiz e Zeiger, 2009). Da ciò potrebbe dipendere una diversa sensibilità delle piante alle fitopatie, oltre che dal fatto che un aumento delle concentrazioni atmosferiche di ozono induce un cambiamento nella struttura superficiale delle foglie, rendendole in maggiore misura penetrabili dai patogeni (Garret et al., 2006).

Data l'importanza delle interazioni che avvengono nella rizosfera nel definire le proprietà dell'ecosistema, capire come le interazioni microbo-microbo e microbo-pianta rispondano al cambiamento climatico è una priorità della ricerca, che farà luce su importanti funzioni dell'ecosistema, come ad esempio lo stoccaggio del carbonio e la produzione primaria netta (Ostle et al., 2009, Berg et al., 2010, Fischer et al., 2014).

Infatti i suoli e la biomassa vegetale ritengono il carbonio 2,5 volte in più rispetto all'atmosfera (Singh et al., 2010), proprietà che costituisce un fattore di mitigazione dell'aumento di CO_2 in atmosfera.

Tuttavia pochi sono gli studi focalizzati sugli effetti dell'innalzamento termico sulla rizosfera e, quelli ad oggi esistenti, considerano solo gli effetti sulla componente microbica del suolo (Schimel et al., 2007, de Vries et al., 2012). In aggiunta i risultati ottenuti da studi in laboratorio e in campo sulla risposta delle comunità del suolo al riscaldamento spesso si contraddicono l'un l'altro (von Lützow e Kögel-Knabner 2009).

Infatti mentre la decomposizione della materia organica, la respirazione del suolo e la crescita della biomassa microbica generalmente aumentano con la temperatura, tali risposte a riscaldamenti sperimentali sono spesso di breve durata negli studi in campo (Bradford et al., 2008). Gli effetti transitori del riscaldamento sulle comunità del suolo è stato ipotizzato siano dovuti al fatto che substrati caratterizzati da carbonio labile vengono impoveriti dall'aumentata attività microbica e che queste, possono rispondere alle alterazioni delle condizioni preesistenti adattandosi ovvero mutando composizione o abbondanza (Allison e Martiny 2008, Bradford 2013).

Inoltre anche i tempi di risposta variano da uno studio all'altro: è stato osservato che riscaldamenti sperimentali possono produrre effetti immediati sulla composizione delle comunità microbiche e modificare l'abbondanza di batteri gram-positivi e gram-negativi (Zogg et al., 1997); in altri studi gli effetti del riscaldamento all'interno delle comunità microbiche sono stati osservati dopo diversi anni (Rinnan et al., 2007, 2013).

I cambiamenti delle temperature sono spesso accoppiati con cambiamenti di umidità del suolo, che possono spiegare alcuni risultati inconsistenti sulla risposta delle comunità microbiche ai cambiamenti climatici. Mentre le comunità batteriche possono rispondere rapidamente a variazioni di umidità, le comunità fungine, caratterizzate da una crescita più lenta, ritardano nella loro risposta (Bell et al., 2008, Cregger et al., 2012, Cregger et al., 2014). Inoltre la siccità amplifica la diversa sensibilità di funghi e batteri alla temperatura (Briones et al., 2014). Anche con piccole variazioni di disponibilità di acqua, la comunità fungina può variare da un membro dominante all'altro , mentre quelle batteriche restano costanti.

Questi risultati contrastanti hanno fornito prove e meccanismi di acclimatazione termica dibattuti (Bradford et al., 2008, Hartley et al., 2009, Bradford 2013).

Chiaramente gli effetti diretti della temperatura sulla fisiologia microbica sono complessi e probabilmente mediati da processi di adattamento, evoluzione e interazione.

A maggior ragione gli effetti del riscaldamento climatico sulla rizosfera, di cui le comunità microbiche costituiscono solo una delle componenti sono ancora più complessi e meno conosciuti.

Ai problemi di carattere ambientale, indotti dai cambiamenti climatici, nei normali valori di temperatura e disponibilità d'acqua, sono spesso associati problemi di carattere socio economico, quali povertà assoluta, mancanza di diritti umani e guerre civili che sfociano nel fenomeno della migrazione epocale di intere popolazioni, cui oggi assistiamo.

Tali scenari, derivanti dai cambiamenti climatici in atto, la cui natura antropogenica è stata ampiamente riconosciuta dalla comunità scientifica internazionale, hanno portato l'attenzione sull'urgenza di adottare strategie di mitigazione tese non solo a ridurre le emissioni di CO_2 in atmosfera, mediante l'utilizzo di fonti di energia pulita, ma anche ad abbattere le concentrazioni di tale gas ad effetto serra. Infatti secondo Hans Bruyninckx direttore esecutivo dell'AEA ***"I cambiamenti climatici continueranno per molti decenni a venire. La portata dei futuri cambiamenti climatici e il loro relativo impatto dipenderà dall'efficacia***

dell'attuazione degli accordi globali per ridurre le emissioni di gas a effetto serra. Altrettanto importante sarà la predisposizione delle giuste strategie e politiche di adattamento per ridurre i rischi derivanti dagli eventi climatici estremi attuali e previsti".

In tale contesto si inserisce l'interesse, crescente della comunità scientifica relativamente alla produzione e utilizzo di biochar, un ammendante ottenuto dalla pirolisi di materiale organico, che in combinazione con il suo immagazzinamento nel suolo, è stato suggerito come una importante misura di mitigazione dei cambiamenti climatici.

La convenzione internazionale contro la desertificazione, "United Nations Convention to Combat Desertification" (UNCCD), infatti, mettendo in evidenza i numerosi vantaggi del biochar, ne incentiva l'utilizzo nelle nuove politiche per far fronte al cambiamento climatico dal 2012 in avanti (post Kyoto). Nel definire gli obiettivi per il periodo post-2012, la "United Nations Framework Convention on Climate Change" (UNFCCC) ha accolto l'inserimento del biochar nella sezione "Enhanced Action on Mitigation" (giugno 2009, Bonn, Germania) come nuova tecnologia per la mitigazione climatica.

Il processo di produzione del biochar, infatti, prevede la trasformazione e la riconversione dei sottoprodotti/residui agricoli e forestali evitando la loro combustione (che produce grosse quantità di CO2) o il loro abbandono in superficie.

Inoltre, la produzione di energia dalla trasformazione della biomassa e l'interramento del biochar prodotto consente di ottenere un bilancio negativo del carbonio immesso in atmosfera poiché in grado di fissare il carbonio nel suolo riducendo la concentrazione di anidride carbonica nell'atmosfera (Sohi, 2009).

Anche se numerose sono le potenzialità di applicazione riportate nella letteratura scientifica, quello dell'agricoltura resta il settore che potrebbe maggiormente beneficiare dell'utilizzo del biochar.

In Italia, per esempio, attraverso l'emanazione del Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 22/6/2015, concernente "Aggiornamento degli allegati 2, 6 e 7 al decreto legislativo n. 75 del 29 aprile 2010 «Riordino e revisione della disciplina in materia di fertilizzanti, a norma dell'articolo 13 della legge 7 luglio 2009, n. 88»" è stato recentemente ammesso a norma di Legge l'utilizzo del biochar in agricoltura come ammendante. Nello specifico tale ammissione è stata sancita attraverso la modifica degli

allegati 2 e 7 del Decreto Legislativo sopra citato, richiesta dall'Associazione Italiana Biochar (ICHAR), che ha curato la redazione della classificazione dei biochar.

Il biochar

Secondo la definizione dell'International Biochar Initiative (IBI) il biochar è comunemente conosciuto come il prodotto che si ottiene attraverso il processo di pirolisi di materie prime organiche, applicato al terreno come ammendante per sfruttarne le potenzialità in ambito agricolo o ambientale (Lehman e Joseph, 2015).

Altri due prodotti derivanti da tale processo sono il *syngas* e il *bio-oil*, che possono essere usati nelle tecnologie verdi come fonti energetiche rinnovabili. I rendimenti di questi tre componenti dipendono dalla temperatura a cui avviene la pirolisi, dal tempo in cui avviene il processo e dal tipo di materie prime utilizzate.

Durante la pirolisi si innescano reazioni di scissione e polimerizzazione che portano alla formazione di una struttura carboniosa aromatica termicamente stabile (Spokas et al., 2012 a) e altamente recalcitrante alla degradazione microbica, che comporta il rilascio in atmosfera del carbonio fissato fotosinteticamente dalle piante (Kuhlbusch et al., 1996).

La carbonificazione di biomasse e l'interramento nei suoli agricoli del biochar, dunque, potrebbe rappresentare una nuova tecnica per gestire i residui vegetali, alternativa alla combustione, all'abbandono in superficie o all'interramento dei residui secchi e anche al compostaggio, da cui si originano in termini relativamente brevi grosse quantità di CO_2.

Il biochar, dunque, assume un ulteriore valore aggiunto rispetto a quello ora descritto, se si considera come un diverso utilizzo dei sottoprodotti delle attività agricole, sia di origine animale che vegetale, al fine di ottenere una risorsa primaria da reimmettere nel ciclo produttivo, sotto forma di ammendante naturale.

Infatti molti studi hanno messo in evidenza da tempo le potenzialità del biochar come ammendante (Glaser et al., 2001 e Marris, 2006).

La gran parte di essi si riferisce a terreni poco fertili, come quelli umidi tropicali, dove uno dei maggiori problemi per l'agricoltura sostenibile, in tali luoghi, è rappresentato dalla scarsa ritenzione dei minerali e dalla rapida decomposizione della materia organica (Zech et al., 1990), a causa delle elevate temperature e delle abbondanti precipitazioni.

Il tempo medio di residenza della sostanza organica in suoli indisturbati della foresta pluviale venezuelana è stato calcolato essere inferiore a due anni (Tiessen et al.,1994). Frequenti ritrovamenti, avvenuti in zone limitate, di carbone e di sostanze umiche altamente aromatiche, sono indizio di combustioni incomplete di materiale organici, dovute a pratiche antropiche finalizzate a rendere tali terreni più fertili e, quindi, coltivabili.

Tali suoli, definiti "Terra Preta" (Terra Nera), contengono non solo quantità di azoto, fosforo, potassio e calcio più elevate, ma anche di carbonio organico stabile, superiore di circa 70 volte rispetto ai terreni circostanti, nonostante mineralogia e tessitura siano le stesse. Ciò determina in questi suoli una crescita delle piante quasi doppia rispetto a quella dei terreni poveri circostanti (Winsley, 2007).

Crescente è il numero di studi che dimostrano gli effetti positivi del biochar, non solo in termini di miglioramento della fertilità dei suoli (Baronti et al., 2010; Vaccari et al., 2011), permettendo di ridurre l'utilizzo di fertilizzanti di circa il 10%, ma anche di stimolazione della crescita delle piante (Lehmann et al., 2003; Rondon et al.,2007; Vaccari et al., 2011) e di miglioramento delle caratteristiche chimico- fisiche e biologiche dei suoli, quali:

- abbassamento dell'acidità (Cheng et al., 2008);
- aumento della capacità di ritenzione idrica con conseguente mitigazione della desertificazione (Basso et al., 2013);
- aumento di Ca, Mg, P e K disponibili nel terreno (Lehmann et al.,2003);
- aumento della massa e respirazione microbica del suolo (Yamato et al., 2006);
- maggior estensione delle micorrize (Warnock et al., 2007);
- maggiore capacità di scambio di cationi (Brodowski et al., 2005);
- diminuzione della lisciviazione degli elementi nutritivi, in particolar modo per l'azoto (Lehmann et al., 2006, Laird et al.,2010).

In sostanza, a fronte di un aumento delle rese agricole, l'impiego del biochar sembra comportare un apporto netto di nutrienti, una minore lisciviazione e il miglioramento della fertilità biologica, consentendo un minor impiego di concimi minerali, minor impatto sull'ambiente e un inferiore consumo di risorse e di energia.

Inoltre un altro effetto del biochar, dovuto alla struttura porosa ad elevata estensione superficiale ed al carattere fortemente idrofobico della sua struttura molecolare, è quello di trattenere contaminanti tossici di varia natura (Farrell e Jones, 2009; Lehmann, 2006), metalli pesanti(Beesley et al., 2010) e contaminanti di origine organica, la cui presenza è dovuta all'utilizzo di fitofarmaci (Zheng et al., 2010; Verheijen et al., 2010) e allo spandimento di concimi prodotti da deiezioni animali, contenenti ormoni steroidei ed antibiotici (Sarmah et al., 2010).

Altre sostanze che il biochar è in grado di adsorbire e tattenere sono inquinanti persistenti e cancerogeni, quali i PCB (Koelmans, 2005), proteggendo quindi gli organismi dalla bioaccumulazione (Koelmans,2009). Verheijen et al., (2010) sostengono che il desorbimento degli inquinanti dai sedimenti risulta rallentato anche da piccole quantità di biochar a causa della notevole capacità adsorbente e della ridotta velocità di diffusione.

Considerando quindi i notevoli problemi ambientali legati all'inquinamento delle acque superficiali e di falda, dovuti alla migrazione degli inquinanti presenti nel suolo, per effetto rispettivamente dei fenomeni di dilavamento ed infiltrazione, il biochar assume un ulteriore valore aggiunto, in quanto apre interessanti prospettive per il suo utilizzo anche negli interventi di ripristino ambientale, quali ad esempio la bonifica di suoli contaminati da metalli pesanti (Houben et al., 2013).

A fronte delle numerose evidenze scientifiche sui benefici del biochar, la grande variabilità delle sue caratteristiche fisico-chimiche, dovute alle diverse materie prime di partenza e alle condizioni di pirolisi, ne rendono a volte poco prevedibili gli effetti (Elad et al., 2011). A tale proposito non mancano dati riportati nella letteratura scientifica che mostrano anche effetti negativi del biochar, (Jones et al., 2008; Hossain et al., 2007; Painter, 2001).

Per esempio in uno studio condotto dalla JRC European Commsion (Verheijen et al., 2010) viene fatto il punto della situazione dell'attuale stato di conoscenza del biochar ed elencati alcuni aspetti che pongono l'attenzione sui rischi associati all'utilizzo del biochar nei suoli agricoli.

Il principale rischio è rappresentato dalla contaminazione da IPA e diossine, prodotte nel processo di pirolisi a temperature elevate (Ledesma et al., 2002) o da metalli pesanti (Painter, 2001) eventualmente presenti nelle biomasse che costituiscono le materie prime del processo.

Inoltre l'accumulo di contaminanti nel suolo in determinate condizioni ambientali, quali l'idrologia e le condizioni pedo-climatiche, potrebbe comportare un maggiore rischio in termini di migrazione degli stessi, dal suolo alle acque di falda e superficiali, con danni alla macrofauna.

Un ulteriore limite da tener presente è la quantità massima di impiego oltre la quale potrebbero verificarsi alterazioni delle proprietà fisiche del suolo, come areazione e ritenzione idrica, tali da compromettere la microfauna (lombrichi) e la biodisponibilità degli elementi nutritivi, per effetto di possibili fenomeni di dilavamento.

Altro rischio legato allo spandimento del biochar su suolo è rappresentato dall'alterazione dell'albedo e dal suo conseguente riscaldamento.

Infatti Briggs et al., (2005), Ognuntunde et al.,(2008), Genesio et al., (2012) hanno misurato variazioni di colore del terreno trattato con biochar, rispetto al terreno non trattato.

L'albedo della superficie del suolo è ormai considerata avere un ruolo importante nei cambiamenti climatici (Levis et al., 2004). Il fatto che il biochar possa contribuire ad un ulteriore riscaldamento terrestre è accettato, tuttavia se questo possa condurre a effetti di magnitudine rilevante è molto meno certo.

Meyer et al (2012) hanno calcolato, sulla base di misurazioni empiriche di albedo, di dati disponibili in letteratura sui suoli coltivabili ammendati con biochar, sullo sviluppo annuale della copertura vegetale e sull'umidità superficiale, una riduzione di albedo media annuale di 0,05 applicando 30-32 t ha^{-1} di biochar. Inoltre l'impatto della produzione e applicazione al suolo del biochar sul ciclo del carbonio e sull' albedo del suolo è stato integrato nel bilancio di gas serra (GHG), mediante il calcolo dei fattori di caratterizzazione del potenziale di riscaldamento globale (GWP). L'analisi ha evidenziato una riduzione della prestazione complessiva di mitigazione del clima pari al 13-22%, a causa del cambiamento di albedo, rispetto ad un'analisi che non tiene conto di tale effetto.

L'entità della riduzione di albedo, tuttavia, è da considerare in relazione a diversi fattori, quali il dosaggio di biochar e la tipologia di copertura del suolo. In un lavoro di Usowicz et al (2016) sono stati confrontati i risultati ottenuti da applicazioni di quantità diverse di biochar su due tipologie di copertura del suolo, quali il foraggio, dove è stato incorporato alla profondità di 0-15 cm, e l' erba, dove il biochar è stato sparso sulla superficie.

I risultati ottenuti da questo lavoro hanno evidenziato in entrambi i casi una diminuzione di albedo all'aumentare del dosaggio di biochar. Tale effetto inoltre è risultato considerevolmente superiore sul terreno ricoperto di erba, rispetto a quello ricoperto con foraggio.

L'eterogeneità degli effetti del biochar dipende dalle sue caratteristiche chimico fisiche, le quali, a loro volta, dipendono in principal modo dalla composizione delle materie prime e dalle condizioni di processo.

Per quanto riguarda le materie prime, quelle che maggiormente influenzano le caratteristiche chimico-fisiche del biochar sono:

- percentuale e composizione delle sostanze inorganiche: la silice, infatti ha la capacità di intrappolare maggiori quantità di C durante la pirolisi, limitandone la perdita (Raveendran, 1995; Nik-Azar et al, 1997);
- densità reale e apparente e, quindi, la porosità e la distribuzione dimensionale dei pori;
- dimensioni delle particelle (media e distribuzione): le particelle più piccole diminuiscono la resa in carbonio(Zanzi et al., 2002);
- contenuto di umidità: rende più difficili i trasferimenti di energia all'interno della biomassa, modificandone le condizioni di pirolisi (Moghtaderi, 2006).

I biochar possono essere prodotti usando differenti condizioni di processo, che possono, in alcuni casi, subire aggiustamenti, ma che comunque sono vincolate dalla tipologia di tecnologia utilizzata ("fast" o "slow" pirolisi, a bassa o alta temperatura, gassificazione).

In base agli studi riportati in letteratura (Di Blasi, 1996; Antal e Grønli, 2003, Demirbas, 2004; Moghtaderi, 2006) è stato accertato che le condizioni principali di processo che maggiormente influiscono sulle caratteristiche finali del biochar sono:

- velocità di riscaldamento delle materie prime;
- temperatura finale e tempo di mantenimento della stessa;
- meccanismo di trasferimento di calore e della massa all'interno del reattore;
- quantità di aria e vapore aggiunti al forno e la temperatura del biochar al momento di tale aggiunta (vapore e aria possono variare le proprietà e la struttura della superficie del biochar e possono anche causare la gassificazione se la temperatura è sufficientemente elevata).

L'elevato numero di combinazioni tra caratteristiche delle materie prime e condizioni di processo rendono molto difficile prevedere le proprietà del biochar ottenuto. E' tuttavia possibile prevedere a grandi linee che a temperature elevate (superiori a 550 °C) si ha una perdita di sostanze facilmente decomponibili, di sostanze volatili e di elementi, quali H, O, N, S; di conseguenza altri nutrienti presenti nel biochar, quali C, Ca, Mg, Na e K, risultano maggiormente concentrati (Kim et al., 2012; Kinney et al., 2012) ed il valore di pH superiore.
Tra i 180 e i 350 °C, grande attenzione deve essere prestata alla formazione di composti tossici per le piante, come aldeidi e fenoli (Bridgwater e Boocock, 2006).
Mediante la slow pirolisi, inoltre, si ottengono biochar con contenuto in N, P, Ca e Mg disponibili, area superficiale e CEC superiori a quelli ottenuti con fast pirolisi. Ciò è imputabile, secondo alcuni studi (Boateng et al, 2007; Hilber et al, 2012), alla trasformazione chimico fisica incompleta durante la fast pirolisi o alla disgregazione della struttura scheletrica di carbonio dovuta al passaggio dei gas che si generano durante il processo a diverse velocità, che dipendono da una combinazione tra temperatura, velocità di rampa e tempo di residenza.

Proprietà del biochar ed effetti sul suolo

Il biochar si può considerare composto da una frazione costituita da carbonio organico labile, da minerali e da una parte predominante, costituita da sostanza organica altamente recalcitrante alla degradazione.
Lehmann e Joseph (2009) descrivono la struttura del biochar come essenzialmente amorfa con zone a struttura cristallina, con gruppi policiclici aromatici circondati da gruppi funzionali e composti minerali.
Questi ultimi sono presenti sotto forma di ceneri, incluse nel biochar. Essi comprendono macro e micronutrienti, che rivestono un ruolo importante nella formazione della struttura del biochar, nella misura in cui essi sono incorporati nella stessa. Ad esempio l'azoto può sostituire uno o due atomi di carbonio nella struttura aromatica (Leinweber et al., 2007), con effetti a tutt'oggi sconosciuti sul comportamento del biochar nel suolo.
Le proprietà fisico-chimiche come anticipato nei paragrafi precedenti sono strettamente correlate alla materia prima da cui il biochar viene ricavato. Inoltre, e' stato ampiamente provato che alcune proprietà del biochar sono correlate ad effetti rilevanti sulle funzioni del suolo.

- ***La porosità, la distribuzione dimensionale dei pori e l'area superficiale dei pori.***

La porosità del biochar costituisce la misura degli spazi vuoti all'interno della sua massa. I pori si distinguono in grosso modo in macropori (>75 μm), mesopori (30 μm – 75 μm) e micropori (5 μm – 30 μm), a seconda delle dimensioni del loro diametro (rispettivamente maggiori o minori di 8 μm). Dimensioni e distribuzione superficiale dei pori sono inversamente correlate tra loro, in quanto al diminuire dell'una aumenta l'altra e viceversa. Tali proprietà sono fortemente influenzate dalla tipologia di materie prime utilizzate e dalle temperature di pirolisi (Downie et al., 2009).

Lo sviluppo di micropori nel biochar, legato ad un aumento di ordine strutturale, è favorito da elevate temperature e tempi di residenza. Per esempio, Lua et al., (2004) hanno osservato, su biochar ottenuto da gusci di pistacchio, che l'aumento di temperatura da 250 °C a 500 °C favorisce l'aumento dei micropori, dovuto all'aumento dell'evoluzione delle sostanze volatili.

Per successivi aumenti oltre 800 °C si è osservata una riduzione dell'estensione superficiale del biochar, attribuita alla parziale fusione della struttura del biochar. Similmente la velocità di riscaldamento e la pressione durante il processo influenzano il trasferimento di massa delle sostanze volatili, prodotte ad un dato intervallo di temperatura e pertanto sono considerati parametri chiave nel determinare la distribuzione delle dimensioni porali (Antal e Grønli, 2003).

Un altro fattore importante nel determinare la microporosità di un biochar è la composizione della materia prima. Per esempio nel caso dell'utilizzo di matrici organiche vegetali, il contenuto di lignina (Cetin et al., 2004; Lua et al., 2004; Pastor-Villegas et al., 2006; Gonzaléz et al., 2009), sembra essere il fattore prevalente che determina la velocità di decomposizione termica e quindi lo sviluppo dei pori (Gonzaléz et al., 2009).

Alcuni dati mostrano che biochar ottenuti, in condizioni di fast pirolisi, da potature di alberi di mandorle sono caratterizzati da un maggiore contenuto di macropori a causa della bassa velocità di decomposizione della lignina nello stadio iniziale della pirolisi. Partendo dai gusci delle mandorle, invece, si è ottenuto alle stesse condizioni un biochar con contenuto maggiore di micropori (Gonzaléz et al., 2009).

Per quanto riguarda l'area superficiale, comunque correlata alla porosità, Jeong et al., (2002) hanno mostrato che, in condizioni di slow pirolisi, questa è superiore nel biochar prodotto da legno duro rispetto a quello prodotto da legno dolce.

Inoltre Borchard et al (2012, b) hanno evidenziato che l'area superficiale può essere modificata attraverso processi cosiddetti di "attivazione" che agiscono secondo meccanismi diversi, a seconda della sostanza utilizzata a tale scopo: ad esempio il vapore agisce attraverso la rimozione dei componenti volatili; NaOH e H3PO4, invece, sono più frequentemente utilizzati per favorire la formazione di cavità nella struttura scheletrica di carbonio.

Queste proprietà rivestono un ruolo fondamentale nelle interazioni del biochar con il suolo. Per esempio una elevata porosità aumenta il contenuto d'acqua immagazzinato, mentre la grandezza dei pori ne determina la mobilità e la disponibilità per le piante, come ampiamente illustrato dalla letteratura scientifica (Brady e Weil, 2002).

Ma la porosità è importante anche per i microrganismi del suolo e per la fauna (es. lombrichi), perché ne determina la possibilità di esplorazione degli spazi circostanti, per l'acquisizione delle risorse, dei nutrienti e dell'energia (Ogawa, 1999; Warnock et al., 2007) ed al tempo stesso fornisce loro un rifugio dai predatori. L'area superficiale è molto importante per le interazioni con i nutrienti, quali le reazioni di adsorbimento ionico (Liang et. al., 2006; Lehman et al, 2003).

Pertanto maggiore è l'estensione superficiale, maggiore sarà la reattività del biochar con il terreno, anche se la natura delle superfici gioca un ruolo ugualmente importante. E' comunque necessario perseguire un giusto compromesso tra l'estensione superficiale da una parte, e la porosità e la distribuzione dei pori dall'altra, in modo tale da assicurare una giusta ritenzione dei nutrienti, garantita da una maggiore estensione superficiale, ed adeguati quantitativi di acqua, in misura commisurata con le dimensioni dei pori.

A contatto del biochar con il suolo, l'estensione superficiale ed il volume dei pori può variare; per esempio può diminuire a causa delle ostruzioni dovute a interazioni di adsorbimento con le sostanze organiche (Pignatello et al., 2006) e minerali (Joseph et al., 2010) in esso presenti, oppure può aumentare a causa della mineralizzazione delle sostanze volatili, che bloccavano precedentemente i pori.

- ***La conduttività elettrica e il pH.***

Considerata la grande eterogeneità delle sue proprietà, i valori di pH del biochar sono relativamente omogenei, in quanto possono variare da neutri a basici. Chan e Xu (2009) hanno passato in rassegna valori di pH riferiti a diverse tipologie di biochar, ottenuti da un'ampia varietà di materie prime, ed hanno trovato un valore medio di pH pari a 8.1, in un intervallo totale che oscilla tra 6.2 e 9.6 unità pH.

Il valore più basso sembra caratterizzare biochar ottenuti da biomasse legnose, quali i rifiuti verdi e la corteccia degli alberi; il valore più elevato si osserva nei biochar derivanti dalla pirolisi di biomasse erbacee e da lettiere avicole, in quanto sicuramente più ricche in ceneri e, quindi, in sali minerali in grado di impartire al biochar una reazione basica.

Oltre che alla tipologia di materia prima utilizzata nel processo di pirolisi, è stato osservato che il pH del biochar è correlato positivamente alla temperatura di tale processo (Ippolito et al., 2012), probabilmente a causa dell'aumento di concentrazione degli elementi inorganici, già presenti nella materia prima originale (Novak et al., 2009).

Il pH (o reazione) del biochar fresco può aumentare inizialmente a causa degli elettroni π che sono basi di Lewis (Contescu et al., 1998) e in seguito diminuire a causa della formazione di gruppi funzionali acidi, presenti sulla superficie del biochar (Cheng et al., 2006; Cheng e Lehmann 2009). Tuttavia, l'effetto dei sali basici contenuti nel biochar può essere superiore alla diminuzione dovuta all'ossidazione della superficie anche dopo tempi lunghi (Nguyen e Lehmann, 2009).

Il pH del biochar svolge un ruolo chiave nelle sue interazioni con il suolo, soprattutto nel miglioramento di suoli acidi (Lehman et al., 2003), generalmente poveri di sostanze nutrienti che, in tali condizioni, si trovano sotto forma di sali insolubili di ferro e alluminio (come il fosforo) o che vengono scarsamente ritenuti (come le basi scambiabili), a causa di una ridotta capacità di scambio cationico.

Tale incremento di pH costituisce sicuramente un effetto positivo anche per le piante. Tuttavia in suoli naturalmente basici l'utilizzo di biochar a pH elevati potrebbe indurre effetti indesiderati (Verheijen et al., 2010).

Infatti , essendo ricchi di elettroliti, tra cui anche sostanze nutritive, se applicati a dosi troppo elevate, potrebbero creare problemi a quelle colture che sono sensibili ad aumenti di concentrazioni saline.

Pertanto la conducibilità è un'ulteriore proprietà del biochar di cui è assolutamente necessario tener conto nella sua applicazione in agricoltura, soprattutto nelle colture sensibili allo stress salino e caratterizzate da un breve ciclo vegetativo.
Ciò dipende dal fatto che l'aumento della conducibilità dovuto all'apporto di sali da parte del biochar è sicuramente un effetto a breve termine, destinato a migliorare nel tempo, grazie ai fenomeni di diluizione e di dilavamento, dovuti alle precipitazioni piovose (Lehman, et al., 2011).
Ciò implica che biochar con pH elevati possono fornire maggiori benefici a suoli arabili che necessitano di alcalinizzazione se vengono applicati più frequentemente a dosaggi inferiori (Verheijen et al., 2010).

- ***La Capacità di Scambio Cationico CSC***

Similarmente a quella del suolo, la CSC del biochar rappresenta la sua capacità di adsorbire o attirare elettrostaticamente i cationi.
Tale proprietà diminuisce nel biochar all'aumentare della temperatura di pirolisi (Lin et al., 2012b; Rajkovich et al., 2012), a causa della rimozione dei gruppi funzionali organici (Gaskin et al, 2008; Cantrell e Martin, 2012), presenti nella lignina e nella cellulosa.
E' stato osservato che la CSC aumenta man mano che il biochar invecchia (Cheng et al., 2008), a causa dell'ossidazione dei gruppi funzionali superficiali, contenenti ossigeno (Cheng et al., 2006), a gruppi carbossilici acidi, in grado di attirare ioni positivi.
Tali cationi sono costituiti, nel terreno, dalle basi di scambio (Ca, Mg, K, NH4+), che sono anche i principali nutrienti delle piante. Pertanto l'adsorbimento di tali nutrienti sulla superficie del biochar, ne previene la dispersione attraverso fenomeni di dilavamento, una volta introdotto nell'ambiente. E' chiaro, quindi, che una elevata capacità di scambio cationico del biochar è sicuramente un connotato positivo di qualità.
E' noto che le interazioni tra le superfici del biochar e delle particelle di suolo, la sostanza organica disciolta, i gas, i microrganismi e l'acqua sono funzione della carica superficiale totale e della concentrazione dei gruppi funzionali. Cheng et al., (2006) hanno studiato l'effetto delle condizioni climatiche sull'ossidazione del biochar in sistemi naturali.
La CSC del biochar risultò correlata alla temperatura media e l'entità dell'ossidazione del biochar era correlata alla sua estensione superficiale esterna, sette volte superiore rispetto a

quella interna (Cheng et al., 2008). Le differenti proprietà di carica di biochar diversi dipendono molto più dal tempo di invecchiamento (Liang et al., 2006; Cheng et al., 2008) che dalla temperatura di produzione (Lehman et al., 2007).
Infatti le condizioni del suolo controllano le proprietà di carica in misura molto maggiore rispetto alle proprietà di un biochar fresco.
Non è ancora chiaro, tuttavia a tutt'oggi, come la CSC del biochar possa cambiare, nel momento in cui esso si disintegra nel suolo per effetto delle condizioni meteoclimatiche e della lavorazione del terreno.

- ***Densità apparente***

La densità apparente è la misura della massa contenuta in un determinato volume del biochar, volume che comprende anche gli spazi vuoti, dovuti alla porosità stessa del biochar. Pertanto, essendo queste proprietà strettamente correlate tra loro esse sono influenzate allo stesso modo dai parametri di processo e dalla tipologia di materie prime utilizzate.
Più è bassa la densità apparente del biochar, maggiore sarà il suo effetto di miglioramento sul terreno, in termini di penetrabilità, drenaggio e aerazione, essenziali per una buona crescita delle piante (Brady e Weil, 2002).

- ***Contenuto di carbonio labile***

La maggiore differenza tra il biochar e le altre sostanze organiche aromatiche presenti nel suolo, come la lignina (Schmidt e Noak, 2000), è il più elevato contenuto di strutture aromatiche fuse. La natura di tali strutture è la principale causa di stabilità del biochar (Nguyen et al., 2010).
Tale stabilità si traduce nel fatto che i microorganismi non possono utilizzare il C come fonte di energia o l'azoto o altre forme di nutrimento.
Tuttavia, a seconda del tipo di biochar, esiste una frazione labile (Lehman et al., 2009), che si definisce come la frazione del carbonio totale degradata a CO2 attraverso processi di mineralizzazione biotica o abiotica in un periodo di tempo breve. La dinamica di tale processo si articola tipicamente in due fasi: una fase rapida iniziale, seguita da una fase lenta.
La prima fase avviene entro un periodo di tempo che può variare da alcune settimane a pochi mesi a temperature ambientali comprese tra i 20°C e i 30 °C.

Tale frazione labile può coesistere nel biochar in diverse forme, quali:

- Carbonati solubili in acqua: quelli presenti sulla superficie o ad essa connessi attraverso pori o spaccature si solubilizzano immediatamente, mentre quelli che si trovano all'interno della matrice del biochar si solubilizzano solo quando questa comincia a sgretolarsi.
- Molecole organiche facilmente solubili in acqua, quali i carboidrati non pirolizzati, o facilmente degradati dai microrganismi oppure forme di carbonio alifatiche, quali olii più facilmente soggetti a degradazione, rispetto alle strutture aromatiche fuse.
- Carbonio che è parte della struttura amorfa o microcristallina che, pur essendo stabile viene mineralizzata sulle particelle superficiali.

La stabilità del carbonio presente nel biochar è notevolmente influenzata dalla temperatura di pirolisi. In generale, ad alte temperature (> 500 °C) le sostanze volatili sono completamente rimosse dalla struttura carboniosa, che risulta, quindi, più stabile. Viceversa il biochar ottenuto a temperature inferiori è più ricco di sostanze volatili, quindi meno stabili e più facilmente degradabili.

Anche le materie prime legnose contengono una maggiore quantità di carbonio stabile (lignina) rispetto a quella erbacee.

La stabilità del carbonio organico rappresenta un connotato positivo del biochar, dal momento che, tale proprietà conferisce allo stesso un carattere recalcitrante, rispondente alle esigenze di sequestro del carbonio (Lehman, 2007),

L'esigenza di una bassa biodegradabilità del biochar, ai fini del sequestro del carbonio e delle riduzioni di emissioni di CO2 in atmosfera, ha indotto organizzazioni internazionali quali l'IBI (2012), e la stessa normativa nazionale (modifica del 22/6/2015 dell'allegato 2 al D. Lgs. 75/2010) a stabilire un limite massimo al rapporto H:Corg , pari a 0.7, valore al quale è assicurata una maggiore presenza di atomi di C legati tra loro da doppi legami e, quindi, una maggiore stabilità strutturale.

Stime della frazione di carbonio del biochar stabile per 100 anni (BC+100) sono state fornite dal protocollo IBI in funzione dei loro corrispondenti rapporti H/Corg, ottenuti ad un livello di confidenza del 95%. Ad esempio ai biochar con rapporto H/Corg compreso tra 0.4 e 0.7 si attribuisce conservativamente un valore BC+100 pari al 50%, mentre a quelli con rapporto

H/Corg<0.4 il valore di BC+100 attribuito è pari al 70%; ciò al fine di distinguere tra carbonio organico stabile e altamente stabile, rispettivamente.
Tuttavia il valore di stoccaggio del carbonio non dipende unicamente dal valore assegnato dal BC+100 ma anche dal valore di Corg.
Infatti il valore di stoccaggio del carbonio è ottenuto dalla seguente equazione:

$$sBC_{+100} = BC_{+100} * C_{org.}$$

IBI propone un sistema di classificazione del biochar basato su cinque differenti intervalli di valori assunti dal parametro sBC+100 che può variare tra <300gkg-1 (classe 1) e ≥ 600gkg-1(classe 5).
I biochar ottenuti, invece, a basse temperature, che presentano una struttura carboniosa meno condensata, sono caratterizzati da una maggiore reattività nel suolo.
Considerato che tali tipi di biochar presentano anche un maggiore contenuto di nutrienti come N e C, un contemporaneo incremento di entrambi gli elementi contribuisce ad una maggiore fertilità del suolo (Steinbeiss et al., 2009) e ad un aumento della biomassa microbica e radicale (Lehman, 2011).
Pertanto, nel valutare le caratteristiche di qualità che un biochar dovrebbe possedere, bisognerebbe perseguire il giusto compromesso tra le esigenze di fertilizzazione e di sequestro del carbonio.

Interazioni suolo-biochar

E' noto che (Kuzyakov et al., 2009) il numero e le tipologie di interazioni suolo-biochar quali ad esempio l' adsorbimento – desorbimento, precipitazioni – dissoluzioni, reazioni redox dipendono, oltre che dalle materie prime e dalle condizioni di processo, anche dalla sua distribuzione granulometrica, dal sistema di trattamento, dalle proprietà del suolo e dalle condizioni pedoclimatiche.
Le prime reazioni a cui è soggetto il biochar, ancor prima di essere applicato al suolo, sono note con il termine "ageing" o "invecchiamento", dovute all'esposizione all'aria e quindi a fenomeni di ossidazione degli anelli di C ad alta densità di elettroni π (Contescu et al., 1998) e ai radicali liberi (Montes-Morán et al., 2004).

Anche le procedure di trattamento influenzano le reazioni di decomposizione del biochar, in quanto la distruzione degli aggregati aumenta l'esposizione della materia organica agli attacchi microbici (Kuzyakov et al., 2009). Inoltre, il processo di invecchiamento continua anche dopo l'applicazione del biochar al terreno.

Subito dopo il trattamento del suolo con biochar si nota un incremento di emissioni di CO2, nelle prime due settimane, che diminuiscono esponenzialmente nel tempo (Singh e Cowie 2008; Hilscher et al., 2009; Kuzyakov et al., 2009). Tali evidenze confermano la teoria secondo la quale il biochar, pur contenendo una frazione labile all'interno della sua struttura, destinata ad essere consumata in breve termine, persiste nel terreno per periodi di tempo sicuramente superiori a quelli delle biomasse da cui hanno origine.

Le reazioni principali che hanno luogo tra biochar e terreno sono:

- Reazioni di dissoluzione e precipitazione
- Reazioni di ossidoriduzione
- Reazioni delle cariche acide e basiche superficiali.
- Adsorbimento di composti organici sulle superfici del biochar

La natura e la velocità di tali reazioni dipendono, oltre che dal biochar, anche dalle condizioni pedoclimatiche, essendo controllate dal contenuto d'acqua e dalla temperatura.

- ***Reazioni di dissoluzione e precipitazione***

Le prime reazioni che avvengono nel suolo trattato con biochar sono quelle di dissoluzione e lisciviazione dei sali e dei composti organici solubili presenti nel biochar, specialmente se subito dopo l'applicazione si verifica un evento di pioggia (Shinogi et al., 2003; Major et al., 2009b).

La dissoluzione iniziale dei sali solubili (carbonati ed ossidi di K e Na) può produrre incrementi di pH nella pellicola d'acqua che riveste le particelle di biochar; eccessi di tali sali potrebbero causare perdite nella struttura del suolo e una diminuzione di basi di scambio (Brady e Weil, 2002).

Tuttavia i fenomeni di lisciviazione possono avere anche un effetto opposto, ossia far diminuire il pH a causa della perdita di tali sali (Yao et al, 2010). Tali effetti dipendono dall'intensità di lisciviazione e dalla capacità tampone del suolo.

Le conseguenze immediate dovute alla dissoluzione dei sali contenuti nel biochar possono essere:

- immediata fertilizzazione in base alla dose, tipologia di elemento e velocità del rilascio;
- mobilizzazione dei nutrienti con effetti ambientali dannosi, come il fenomeno dell'eutrofizzazione dei corpi idrici superficiali;
- rilascio di metalli pesanti, dannosi per la salute umana e delle piante, che possono derivare da rifiuti legnosi; nel tempo, anche alcuni composti organici presenti nel biochar possono essere rilasciati in soluzione, come ad esempio biopolimeri o addirittura molecole con strutture condensate ad anello, come quelle trovate nell'acqua porale di terreni contenenti carbone, formatosi a causa di un incendio boschivo, a distanza di oltre cento anni (Hockaday, 2006; Hockaday et al., 2007).

Tali evidenze creano alcune perplessità nell'utilizzo del biochar nel suolo, proprio per il rischio ad esso associato di dissoluzione, anche in tempi non brevi, delle sostanze tossiche eventualmente in esso contenute o adsorbite sulla superficie nel corso degli anni .La precipitazione di composti inorganici può essere importante, specialmente in suoli soggetti a cicli di inumidimento ed essiccazione e poco soggetti a lisciviazione.
Quando il suolo si essicca, l'attività ionica della soluzione aumenta fino a raggiungere il punto di saturazione, formando nuovi precipitati. Il biochar favorisce tali processi, oltre che per l'apporto di elettroliti, anche per la struttura porosa (Downie et al., 2009) dove, a causa di una lenta percolazione, si creano siti preferenziali di accumulo di sali precipitati.
Infatti, nei suoli acidi trattati con biochar uno strato di ossidi e/o idrossidi di ferro e alluminio può depositarsi su parte del biochar; invece nei suoli calcarei, a pH superiori, le superfici e i pori sono occupati quasi del tutto da carbonati.

- ***Reazioni di ossidoriduzione***

La biomassa convertita in biochar è ancora termodinamicamente instabile sotto le condizioni ossidative cui è sottoposta nella parte superficiale del suolo (Macías 2004; Macías e Camps Arbestain 2010), sebbene sia evidente che esso rimane nel suolo come materiale meta-stabile con un tempo di residenza superiore alla biomassa originale da cui è prodotto.
Nonostante l'elevata stabilità del carbonio aromatico del biochar, esso ha un'elevata attività ossido riduttiva con funzioni principalmente riduttive delle specie chimiche presenti nel

terreno, in principal modo dell'ossigeno, essendo questo l'elemento elettron-attrattore maggiormente presente nel suolo.

L'ossidazione del biochar inizia attraverso reazioni abiotiche, potenziate dalle proprietà elettron-donatrici delle aree con elevata densità di elettroni π (Contescu et al., 1998), cui segue la formazione di gruppi funzionali contenenti ossigeno sulla superficie del biochar, alcune delle quali di natura acida.

Come visto precedentemente, tali gruppi funzionali contribuiscono ad aumentare la superficie di scambio del terreno, e più precisamente, la capacità di scambio cationico che, a sua volta, riveste un importante ruolo di controllo, sulla capacità tampone del terreno e sulla disponibilità di elementi nutritivi per le piante, preservandoli da fenomeni di precipitazione (a pH etremi) e di lisciviazione.

E', inoltre, la stessa presenza di specie radicaliche nel biochar ad aumentare la reattività all'ossidazione.

- ***Reazioni delle cariche acide e basiche superficiali.***

Le superfici del biochar inizialmente possono avere proprietà acide o basiche (Cheng et al, 2008; Amonette e Joseph 2009), che influenzano la bagnabilità delle particelle di biochar e la ritenzione superficiale degli ioni attraverso reazioni elettrostatiche (Boehm 2001).

Tuttavia di solito i siti acidi e basici coesistono e, una volta incorporato nel suolo, la concentrazione di quelli basici diminuisce a causa dei processi ossidativi, dovuti all'esposizione agli agenti atmosferici (Cheng et al., 2008; Cheng e Lehmann 2009).

I gruppi funzionali che si formano sono carbossili, lattoni, fenoli (con proprietà acide), strutture carboniliche e o-chinoniche e legami tipo etereo con l'ossigeno (con proprietà basiche).

I primi conferiscono alle particelle del biochar la capacità di scambio cationica pH dipendente (Boehm 2001) che, come abbiamo visto, influenza la disponibilità dei nutrienti del suolo per le piante.

Tuttavia, studi recenti sui cambiamenti strutturali che avvengono nelle particelle di biochar, basati sulla spettroscopia a raggi X, un anno dopo la loro applicazione al suolo, hanno mostrato un elevato aumento dei gruppi carbonilici e, in misura minore, dei gruppi carbossilici Cheng et al (2008).

Il minor incremento dei gruppi carbossilici, che pur svolgono un ruolo chiave nella ritenzione dei nutrienti, rispetto ai gruppi carbonilici, può essere attribuito alla minore stabilità dei primi. Una volta in soluzione, questi gruppi possono essere in parte decarbossilati attraverso reazioni di idrolisi (Yan et al., 1996).

Mentre la natura ed il comportamento dei gruppi carbossilici acidi è, ad oggi, ben compresa, effetti dei gruppi carbonilici basici (Contescu et al., 1998; Montes-Morán et al., 2004) sul terreno circostante sono ancora poco conosciuti e costituiscono aspetti ancora molto controversi (Leon y Leon et al., 1992).

Ovviamente, il decremento dei gruppi acidi in favore dei gruppi carbonilici basici è un aspetto del fenomeno di "aging" del biochar, che ha inizio una volta che viene incorporato nel terreno; tale processo potrebbe riflettersi, a lungo termine, in modo negativo anche sulla capacità di scambio cationico del terreno.

- ***Adsorbimento di composti organici sulle superfici del biochar***

Una volta che il biochar è stato aggiunto al suolo, esso può adsorbire molecole organiche (Pignatello et al., 2006), compreso erbicidi e pesticidi (Smernik 2009; Spokase Reicosky 2009).

I meccanismi coinvolti sono numerosi, ad es. legami idrogeno, legami a ponte con cationi, legami covalenti e interazioni idrofobiche; esistono, inoltre, meccanismi che coinvolgono interazioni tra sistemi π di composti organici del biochar e siti di adsorbimento inorganici oppure organici(Keiluweite Kleber 2009), presenti sulla superficie del suolo.

Le proprietà adsorbenti del biochar si attenuano col passare del tempo poiché, con l'aumento di molecole organiche e inorganiche adsorbite sulla superficie, lo spazio disponibile per altre reazioni di adsorbimento diminuisce (Pignatello et al., 2006).

L'adsorbimento di molecole organiche naturali e le reazioni di ossidazione che avvengono nel biochar a contatto con il suolo, sono quelle che maggiormente contribuiscono al fenomeno di "aging" del biochar (Uchimiya et al., 2010 a).

E' stato visto che la presenza di diversi metalli ad elevate concentrazioni nel suolo, possono mascherare la reale capacità assorbente del biochar rispetto alle sostante organiche naturali, attraverso l'alterazione delle proprietà di carica superficiale e della struttura porosa, dovuta

alla formazione di complessi di tali metalli con la superficie carica del biochar (Chen et al.,1997).

E' quindi possibile che nel tempo le superfici di minerali presenti nel suolo, possano ricoprire le superfici reattive del biochar, diminuendone la capacità di adsorbimento nei confronti di molecole organiche, come pesticidi e altre sostanze dannose per la salute della macrofauna e dell'ambiente; questa eventualità, poco auspicabile, avrebbe un effetto opposto a quello osservato negli studi a breve temine, dove tali sostanze sono risultate essere ritenute dal biochar, che ne limita la migrazione dal suolo alle acque.

- ***Effetti del biochar sulla componente microbica***

Anche se le relazioni tra le proprietà chimico- fisiche del biochar e i loro effetti sulla componente biotica e abiotica del suolo sono poco conosciute, numerose sono le evidenze riportate nella letteratura scientifica sulle alterazioni della composizione e dell'abbondanza delle comunità microbiche in seguito al trattamento con biochar (Pietikäinen et al., 2000; Yin et al.,2000; Kim et al., 2007; O'Neill et al., 2009; Liang et al., 2010; Grossman et al., 2010; Jin, 2010). Le alterazioni del ciclo dei nutrienti (Steiner et al., 2008b) o della struttura del suolo (Rillige Mummey, 2006), già viste precedentemente, possono avere a loro volta impatti sulla crescita delle piante (Warnock et al., 2007).

E' stato ipotizzato che gli effetti del biochar sulla componente microbica della rizosfera dipendono da diversi meccanismi, e tali effetti possono determinare alterazioni sia in termini quantitativi (biomassa) che qualitativi (composizione).

In alcuni studi (Stemmer et al, 2007; Mellendorf et al., 2010), è stato osservato che il biochar applicato al suolo, agendo come fonte diretta di carbonio disponibile per i microorganismi, può incrementarne la biomassa, in misura correlata all'accessibilità e alla quantità di energia necessaria per la scissione dei legami chimici (Kögel-Knabner et al.,2008).

Il biochar può determinare un aumento della biomassa microbica anche attraverso meccanismi indiretti, ad esempio provocando un aumento della porosità, dell'idrodinamica del suolo, della diffusione di gas e alterando la resistenza meccanica.

Tali effetti potrebbero migliorare le caratteristiche del suolo e fornire ai microorganismi un habitat adatto ad essere colonizzato (Lehman, 2011). Infatti, Ogawa (1994), riporta incrementi

di biomassa microbica a partire dall'interno dei pori del biochar per svilupparsi poi esternamente ad essi nel suolo.

Il pori del biochar potrebbero, svolgere un ruolo di protezione della componente microbica del suolo dall'attacco di erbivori, competitori e, avendo un'elevata capacità di ritenzione idrica, da eventuali condizioni di disidratazione del suolo, creando quindi condizioni positive che ne favoriscono un aumento in biomassa (Ogawa, 1994; Ezawa et al., 2002; Saitoe Marumoto, 2002; Thiese Rillig, 2009), come risulta evidente dalla figura 1).

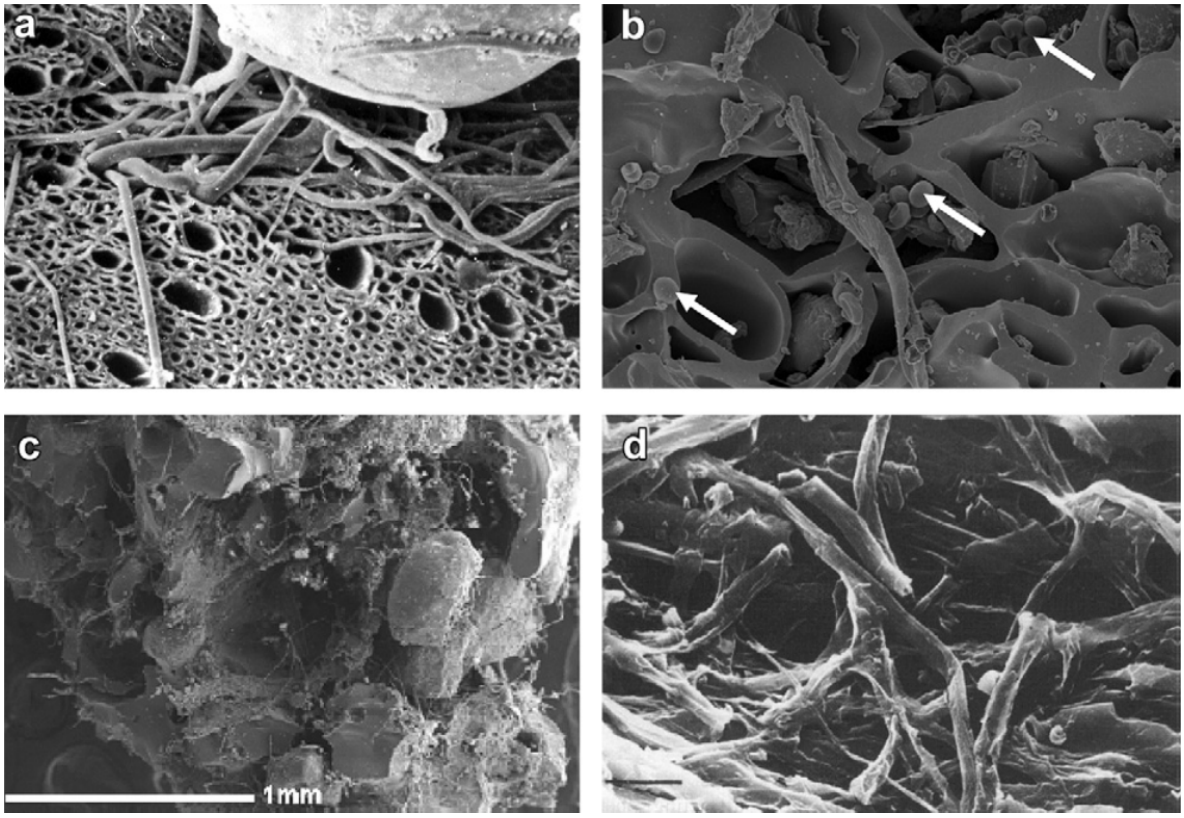


Figura 1 da Lehman et al., 2011- Crescita di microrganismi nei pori del biochar

Ovviamente, come descritto nei paragrafi precedenti, l'intensità di tali effetti dipende dalla matrice organica e dalle condizioni di pirolisi, fattori che insieme determinano la formazione di marco e micro particelle nel biochar (Downie et al., 2009).

Oltre ad incrementi di biomassa microbica, sono stati evidenziati anche incrementi in termini di composizione delle comunità microbiche (Thies e Rilling, 2009). Tuttavia abbondanza e composizione microbica non sempre si correlano tra loro e con il biochar nello stesso modo.

In alcuni casi (Anders et al., 2013; O' Neil et al., 2009; Anderson et al., 2011) sono state osservate variazioni significative delle comunità microbiche ma non di biomassa, in altri sono stati ottenuti risultati esattamente opposti.

Anche l'attività metabolica non è necessariamente correlata con la biomassa; per esempio Liang et al.,(2010) hanno osservato che, nonostante la maggiore crescita di biomassa nei suoli ricchi in carbone, l'attività metabolica era inferiore, a causa della presenza di una frazione di microrganismi meno attivi nel suolo ammendato, rispetto a quello senza biochar.

Ciò non costituisce necessariamente un connotato negativo, in quanto anche un utilizzo più efficiente dei nutrienti può manifestarsi con una ridotta attività metabolica.

Tali variazioni sono nella maggior parte dei casi attribuibili, secondo gli autori, agli effetti del biochar sulle caratteristiche fisico-chimiche del suolo.

Per esempio, Eiland et al., (2001) hanno riportato che variazioni della composizione delle comunità microbiche del suolo erano dovute all'incremento, indotto dal biochar, del rapporto C/N. Gli autori ipotizzano infatti che l'incremento di questo rapporto, favorisce la crescita di miceti, limitando l'abbondanza batterica.

Altre ricerche attribuiscono invece alle variazioni di pH (Fierer e Jackson, 2006) e al potenziale ossidoriduttivo (Cayuela et al., 2013) un ruolo chiave per quanto riguarda gli effetti del biochar sulla composizione microbica. Infatti quando l'ossigeno è consumato all'interno dei pori del suolo, il potenziale redox diminuisce e i batteri aerobi facoltativi possono utilizzare vie di respirazione anaerobiche, i cui prodotti metabolici, quali ad esempio ammoniaca, acido solfidrico e metano, possono risultare tossici per le piante.

Tuttavia l'aggiunta di biochar potrebbe causare una maggiore aerazione dei micro pori a causa della sua struttura porosa, favorendo la diminuzione di micrositi anaerobici per unità di volume di suolo e quindi permettere il reinsediamento delle specie aerobiche.

Sulla base di quanto riportato in letteratura sembra emergere che variazioni della composizione delle comunità microbiche possono essere dovute ad un ampio intervallo di interazioni mediate dal biochar, come ad esempio variazioni di segnali microbici (Masiello et al., 2013), variazioni del ciclo dell'azoto (Harter et al., 2014) e decremento dell'abbondanza di miceti rispetto ai batteri, che potrebbero competere per l' utilizzo di substrati di biochar per la crescita (Gomez et al., 2014).

- ***Radici e micorrize***

Quale importante componente della rizosfera e prima interfaccia con il suolo, anche le radici e i simbionti ad essi associati possono subire alterazioni in seguito a trattamenti con biochar.

Da quanto emerge dalla maggior parte degli studi presenti in letteratura il biochar risulta promuovere la crescita delle radici (Breazeale, 1906; Nutman, 1952).

Esse, infatti, possono penetrare più facilmente nel suolo, a causa della sua aumentata porosità, in seguito all'aggiunta di biochar (Lehmann et al., 2003; Joseph et al., 2010).

Lo studio di Makoto et al., (2010) ha mostrato, nello strato di carbone formatosi da un incendio boschivo da rami di larice, betulla, e germogli di bambù nano, oltre all'aumento di biomassa, anche un incremento del numero di radici.

Allo stesso modo Noguera et al., (2010) hanno osservato una crescita della lunghezza delle radici di piante di riso, dopo l'aggiunta del biochar.

Nella maggior parte di questi studi la ragione di tale effetto è attribuita alle migliorate condizioni del suolo indotte dal biochar, quali la maggiore disponibilità di nutrienti e di acqua.

Studi microscopici, cromatografici e spettroscopici suggeriscono i diversi meccanismi di interazione che possono innescarsi tra biochar, microorganismi e radici, una volta che queste componenti vengono a contatto.

Per esempio, Reibe et al., (2015) hanno osservato che gli effetti di diverse tipologie di biochar sulla morfologia delle radici del grano sono attribuibili al rilascio di nutrienti nel suolo. Lehman et al., (2011) propongono invece due differenti meccanismi attraverso i quali il biochar può influenzare la crescita delle radici: come fonte diretta di sostanze nutrienti, oppure indirettamente modificando la disponibilità delle stesse.

Da un recente studio condotto da Prendergast-Miller et al (2013) su piante di orzo (Hordeum vulgare L.) è emerso che il biochar controlla l'assorbimento dei nutrienti secondo entrambi i meccanismi.

E' stato dimostrato che il biochar è in grado di adsorbire sostanze organiche di origine naturale (MacKenzie e DeLuca 2006; Pignatello et al., 2006; Chenge Lehmann 2009) e antropogenica (Smernik 2009; Spokase Reicosky 2009) e di diminuirne l'attività.

Questo è il caso delle sostanze fenoliche prodotte nei processi di degradazione di piante ericacee, responsabili di danneggiamenti all'elongazione delle radici e dell'interferenza con il metabolismo dell' IAA, una auxina importante (Marschner, 1999).

Pertanto il biochar potrebbe influenzare positivamente la crescita delle radici, esercitando una funzione protettiva delle stesse da possibili danneggiamenti dovute a sostanze naturali o antropogeniche.

Il biochar può avere un effetto importante sulla crescita di radici e microorganismi ad essi associati, anche attraverso un'ampia gamma di molecole organiche presenti nella sua frazione volatile, capaci di innescare la germinazione, come ad esempio la butenolide (Dixon, 1998), di supportare l'assorbimento dei nutrienti, come gli auxofurani (Riedlinger et al., 2006), di promuovere la crescita di micorrize (Amonette Joseph, 2009) come i sesquiterpeni (Bridgwater e Boocock 2006).

Il biochar e i minerali ad esso associati possono inoltre adsorbire i composti organici rilasciati dalle radici in crescita sia ad alto che a basso peso molecolare, come essudati, mucillagini e lisati cellulari.

Questa aumentata disponibilità di carbonio favorisce lo sviluppo di simbiosi tra radici e funghi, note come micorrize arbuscolari (AMF),che costituiscono un altro importante elemento della rizosfera per l'assorbimento dei nutrienti da parte delle radici e, quindi, per la crescita delle piante (Harrison e van Buuren, 1995; Read e Smith, 1997; Avio e Giovannetti, 2002).

E' infatti noto che da tali associazioni simbiotiche tra i funghi del suolo e le radici scaturiscono mutui benefici: i funghi colonizzano le radici ricevendo dalle stesse composti del carbonio che essi non sono capaci di sintetizzare, mentre le piante ricevono nutrienti minerali, assorbiti e traslocati dall'estesissima rete ifale extraradicale che, partendo dalla radice micorrizata esplora il terreno circostante.

Pertanto, la presenza di micorrize arbuscolari (AMF) assume un ruolo molto importante nei terreni marginali, dove l'assorbimento dei nutrienti da parte delle piante potrebbe essere un fattore critico per la loro crescita (Bücking et al., 2014).

Warnock riassume, nella review del 2007, 4 meccanismi principali, attraverso i quali il biochar esercita il suo effetto positivo o negativo sulle micorrize.

In ordine decrescente di evidenze sperimentali a loro sostegno, tali meccanismi sono: a) alterazione delle proprietà chimico fisiche del suolo; b) effetti indiretti sulle micorrize attraverso effetti su altri microbi del suolo; c) interferenza nei segnali pianta fungo; d) protezione della fauna dagli erbivori.

Tryon (1948), Matsubara et al., (2002), DeLuca et al., (2006), e Gundale e DeLuca (2006) hanno dimostrato che l'effetto del biochar sulle AMF si esplica soprattutto attraverso la modifica della disponibilità dei nutrienti, con un aumento della velocità di colonizzazione dell'apparato radicale.

Attraverso i meccanismi sopra esposti il biochar può influire anche negativamente sulle AMF, ad esempio diminuendo la disponibilità di nutrienti nel suolo (Wallsted et al., 2002). Questo effetto negativo può verificarsi nei casi in cui il biochar provochi un aumento del rapprto C/N con una conseguente immobilizzazione di azoto.

E' tuttavia da sottolineare che tali meccanismi di azione non si escludono a vicenda ma possono coesistere e contribuire al risultato finale, anche con effetti opposti.

A causa della propensione del biochar ad andare incontro ad un gran numero di interazioni biogeochimiche nel terreno è giusto aspettarsi che le sue proprietà possano modificarsi nel tempo.

Infatti, come visto nel dettaglio delle singole possibili interazioni suolo-biochar, gli effetti da esse derivanti nel tempo possono mutare da positivi a negativi, quali ad esempio il rilascio di sostanze organiche aromatiche (dissoluzione), l'occupazione dei pori del biochar da parte di sali (precipitazione), la copertura della superficie di scambio del biochar con superfici metalliche (complessazione), il decremento di gruppi carbossilici acidi a favore di gruppi carbonilici basici, con diminuzione della CSC (decarbossilazione).

Ovviamente tali modifiche è difficile pensare che non possano coinvolgere anche le piante, la micro e macrofauna presenti nel suolo.

Tutto ciò spinge ad approfondire e concentrare le ricerche sugli effetti a lungo termine del biochar sul suolo, le piante e la rizosfera, che permettano di individuare possibili rischi futuri per l'ambiente e di adottare le strategie atte a prevenire il loro verificarsi.

Obiettivi

Per quanto finora esposto nell'introduzione, prevedere quale possano essere gli effetti del biochar, a seguito della sua applicazione nel suolo, può essere davvero complicato, data la natura eterogenea delle sue superfici e componenti e la complessità dei composti organici e inorganici disciolti nella fase liquida che circonda la solida (Hammes and Schmidt 2009). A

questo occorre aggiungere la variabilità dei suoli, che rappresenta un ulteriore livello di complessità nella possibilità di applicazione del biochar come ammendate e di previsione a priori, dei suoi effetti.

A tale riguardo, crescente è l'attenzione della ricerca scientifica sulle potenzialità del biochar e numerosi gli studi sul suo utilizzo per migliorare le rese di colture di interesse agro-alimentari. Tuttavia ad oggi risultano ancora molto scarse e frammentarie le conoscenze sugli effetti del biochar sulla rizosfera che costituisce un complesso sistema di interazioni dinamiche e che rappresenta di fatto la prima interfaccia "suolo-pianta".

In tale contesto si inserisce il lavoro di questa tesi di dottorato, che si pone l'obiettivo di contribuire all'approfondimento delle conoscenze sull'utilizzo del biochar analizzando i suoi effetti sulle componenti biotiche e abiotiche della "rizosfera" di tre colture (vite, foraggio e olivo) in campo e tre (lattuga, pomodoro e pioppo) in serra.

Nello specifico, i suoli delle colture in campo e in serra sono stati ammendati con lo stesso tipo di biochar e successivamente caratterizzati mediante indagini chimico-fisiche, microbiologiche e biologiche (radici), al fine di poter avere una comprensione complessiva degli effetti del biochar su il sistema rizosfera di diverse specie vegetali e in diverse condizioni pedoambientali.

Bibliografia

Allison, S. D., Martiny, J.B.H., 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 105*:* 11512–11519.

Amonette, J.E., Joseph, S., 2009. Physical properties of biochar. In 'Biochar for environmental management. Science and technology. (Eds J Lehmann, S Joseph) pp. 33–53. Earthscan: London.

Anders, E.,Watzinger, A., Rempt, F., Kitzler, B., Wimmer, B., Zehetner, F., Stahr, K., Zechmeister-Boltenstern, S., Soja, G., 2013. Biochar affects the structure rather than the total biomass of microbial communities in temperate soils. Agric. Food Sci 22, 404–423.

Anderson, C.R., Condron, L.M., Clough, T.J., Fiers, M., Stewart, A., Hill, R.A., 2011. Biochar induced soil microbial community change: implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus. Pedobiologia 54, 309–320.

Antal, M.J., Grønli, M., 2003. Ind. Eng. Chem. Res. 42, 1619-1640.

Badri, D.V., e Vivanco, J.M. 2009. Regulation e function of root exudates. Plant Cell Environment 32 (6): 666–681.

Badri, D.V., Zolla, G., Bakker, M.G., Manter, D.K., Vivanco, J.M. 2013b. Potential impact of soil microbiomes on the leaf metabolome and on herbivore feeding behavior. New Phytologist, 198 (1): 264–273.

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annual Review of Plant Biology, 57 (1): 233–266.

Baronti, S., Alberti, G., Delle Vedove, G., Di Gennaro, F., Fellet, G.,Genesio, L., Miglietta, F., Peressotti, A., Vaccari, F.P., 2010 The biochar option to improve plant yields: first results from some field and pot experiments in Italy. Italian Journal of Agronomy 5, 3–11.

Basso, A. S., Miguez, F. E., Laird, D. A., Horton, R., Westgate, M. 2013. Assessing potential of biochar for increasing water-holding capacity of sandy soils, Glob. Change Biol. Bioenerg. 5, 132–143.

Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Gomez-Eyles, J.L., 2010. Effects of biochar and greenwaste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. Environmental Pollution, 158: 2282–2287.

Bell, C., McIntyre, N., Cox, S., Tissue, D., Zak, J., 2008. Soil microbial responses to temporal variations of moisture and temperature in a Chihuahuan Desert grassland. Microbial Ecology 56,153–167.

Berg, G. 2009. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Applied Microbiology and Biotechnology, 84 (1): 11–18.

Berg, M.P., Kiers, E.T., Driessen, G., Van Der Heijden, M., Kooi, B.W., Kuenen, F., Liefting, M., Verhoef, H.A., Ellers, J., 2010. Adapt or disperse: understanding species persistence in a changing world. Global Change Biology 16*:* 587–598.

Boateng, A.A., Daugaard, D.E., Goldberg, N.M., Hicks, K. B., 2007. Bench-scale fluidized-bed pyrolysis of switchgrass for bio-oil production. Ind. Eng. Chem. Res.46(7), 1891-1897.

Boehm, H.P., 2001. Carbon surface chemistry. In Graphite and precursors.(Eds. P Delhaes) pp. 141–178. (CRC: Amsterdam).

Borchard, N., Wolf, A., Laabs, V., Aeckersberg, R., Scherer, H.W., Moeller, A., Amelung, W., 2012b. Physical activation of biochar and its meaning for soil fertility and nutrient leaching – a greenhouse experiment, Soil Use and Management, vol 28, pp177–184.

Bradford, M.A., 2013. Thermal adaptation of decomposer communities in warming soils. Frontiers in Microbiolo*gy*, 4, 333

Bradford, M.A., Davies, C.A., Frey, S.D., Maddox, T.R., Melillo, J.M., Mohan, J.E., Reynolds, J.F., Treseder, K.K., Wallenstein, M.D.. 2008. Thermal adaptation of soil microbial respiration to elevated temperature. Ecology Letters 11*:* 1316–1327.

Brady, N., Weil, R., 2002. The Nature and Properties of Soils, 13th Edition. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey, p 960.

Breazeale, J.F., 1906. Effect of certain solids upon the growth of seedlings in water cultures. Botanical Gazette 41, 54-63.

Bridgwater, A, Boocock, D.G.B., 2006. Science in thermal and chemical biomass conversion. CPL Press: Newbury, UK.

Briggs, C.M., Breiner, J., Graham, R.C., 2005. Contributions of Pinus Ponderosa Charcoal to Soil Chemical and Physical Properties. The ASA-CSSA-SSSA International Annual Meetings (November 6-10, 2005), Salt Lake City, U.S.A.

Briones, M.J.I., McNamara, N.P., Poskitt, J., Crow, S.E., Ostle, N.J.. 2014. Interactive biotic and abiotic regulators of soil carbon cycling: evidence from controlled climate experiments on peatland and boreal soils. Global Change Biology 20*:* 2971–2982.

Brodowski, S., Amelung, W., Haumaier, L., Abetz, C., Zech, W., 2005. Morphological and chemicalproperties of black carbon in physical soil fractions as revealed by scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy. Geoderma 128: 116-129.

Bücking, H., Liepold, E., Ambilwade, P., 2014. The role of the mycorrhizal symbiosis in nutrient uptake of plants and the regulatory mechanisms underlying these transport processes, in: Dahl, N.K., Sahu, S.C., (Eds), Plant Science. Intech, Janeza Trdine, p 107.

Cantrell, K. B., Martin II, J. H., 2012. Stochastic state-space temperature regulation of biochar production. Part II: Application to manure processing via pyrolysis, Journal of the Science of Food and Agriculture, vol 92, pp490–495

Cetin, E., Moghtaderi, B., Gupta, R., Wall, T.F., 2004. Influence of pyrolysis conditions on the structure and gasification reactivity of biomass chars. Fuel 83: 2139-2150.

Chaparro, J.M., Badri, D.V., Bakker, M.G., Sugiyama, A., Manter, D.K., Vivanco, J.M., 2013a. Root exudation of phytochemicals in Arabidopsis follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. PloS ONE, 8 (2): e55731.

Chan, K.Y., Xu, Z., 2009. Biochar: Nutrient properties and their enrichment. pp.67-84. In J. Lehma, S. Joseph (eds.) Biochar for environmental management: Science and technology. Earthscan, London.

Chen, R.J., 1997. Livestock – biogas – fruit system in South China. Ecol. Eng 8, 19 – 29.

Cheng, C.H., Lehmann, J., 2009. Ageing of black carbon along a temperature gradient. Chemosphere 75, 1021–1027. doi:10.1016/j.chemosphere. 2009.01.045.

Cheng, C.H., Lehmann, J., Engelhard, M.H., 2008. Natural oxidation of blackcarbon in soils: changes in molecular form and surface charge along aclimosequence. Geochimica et Cosmochimica Acta 72, 1598–1610. doi:10.1016/j.gca.2008.01.010.

Cheng, C.H., Lehmann, J, Thies, J.E., Burton, S.D., Engelhard, M.H., 2006. Oxidation of black carbon by biotic and abiotic processes. Organic Geochemistry, 37, pp. 1477–1488.

Cheng C.H., Lehmann, J., Engelhard, M.H. (2008) Natural oxidation of black carbon in soils: changes in molecular form and surface charge along a climosequence. Geochimica et Cosmochimica Acta 72, 1598–1610.doi:10.1016/j.gca.2008.01.010

Cheng, C.H., Lehmann, J., 2009. Ageing of black carbon along a temperature gradient.Chemosphere 75, 1021–1027. doi: 10.1016/j.chemosphere. 2009.01.045

Cheng, C.H., Lehmann, J., Thies, J.E., Burton, S.D., Engelhard, M.H., 2006. Oxidation of black carbon by biotic and abiotic processes.Organic Geochemistry 37, 1477–1488. doi:10.1016/j.orggeochem.2006.06.022

Contescu, A., Vass, M., Contescu, C., Putyera, K., Schwarz, J.A. 1998. Acid buffering capacity of basic carbons revealed by their continuous pK distribution. Carbon 36 (3), 247–258. doi:10.1016/S0008-6223(97) 00168-1.

Coronado, C., Zuanazzi, J., Sallaud, C., Quirion, J.C., Esnault, R., Husson, H.P., Kondorosi, A., Ratet, P. 1995. Alfalfa root flavonoid production is nitrogen regulated. Plant Physiology, 108 (2): 533–542.

Cregger, M.A., Sanders, N. J., Dunn, R. R., Classen, A. T.. 2014. Microbial communities respond to experimental warming, but site matters. PeerJ 2014.

Cregger, M.A., Schadt, C.W., McDowell, N.G., Pockman, W.T., Classen, A.T., 2012. Response of the soil microbial community to changes in precipitation in a semiarid ecosystem. Applied and Environmental Microbiology 78, 8587–8594.

Davidson, I.A., Robson, M.J. 1986. Effect of contrasting patterns of nitrate application on the nitrate uptake, N2-fixation, nodulation and growth of white clover. Annals of Botny, 57 (3): 331–338.

DeLuca, T.H., MacKenzie, M.D., Gundale, M.J., Holben, W.E., 2006. Wildfire-produced charcoal directly influences nitrogen cycling in ponderosa pine forests. Soil Science Society of America Journal 70, 448-453.

Demirbas A. 2004. Effects of temperature and particle size on bio-char yield from pyrolysis of agricultural residues. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 72(2), 243-248.

de Vries, F.T., Liiri, M.E., Bjornlund, L., Bowker, M.A., Christensen, S., Setala, H.M., Bardgett, R.D., 2012. Land use alters the resistance and resilience of soil food webs to drought. Nature Climate Change 2*:* 276–280.

Di Blasi, C., 1996. Heat, momentum and mass transport through a shrinking biomass particle exposed to thermal radiation. Chemical Engineering Science, 51: 1121–1132.

Dixon, K., 1998. Smoke germination of Australian plants. RIRDC Report 98/108, KPW-1A. RIRDC, Canberra, ACT

Downie, A., Crosky, A., Munroe, P., 2009. Physical properties of biochar. pp. 13-32. In J. Lehmann S. Joseph (eds.) Biochar for environmental management: Science and technology. Earthscan, London.

Eiland, F., Klamer, M. Lind, A.M., Leth, M., Bååth, E., 2001. Influenc of initial C/N ratio on chemical and microbial composition during long term composting of straw. Microbial Ecology41: 272−280.

EEA-European Environment Agency, Report No 1/2017. Climate change, impacts and vulnerability in Europe 2016. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2017 ISBN 978-92-9213-835-6 ISSN 1977-8449 doi:10.2800/534806

Ezawa, T., Yamamoto, K., Yoshida, S., 2002. Enhancement of the effectiveness of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi by inorganic soil amendments. Soil Science and Plant Nutrition 48, 897-900.

Farrell, M., Jones, D.L., 2009. Critical evaluation of municipal solid waste composting and potential compost markets. Bioresource Technology 100 (19), 4301-4310

Fierer, N., Jackson, R.B., 2006.1 The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 626–631.

Fischer, D.G., Chapman, S.K., Classen, A.T., Gehring, C.A., Grady, K.C., Schweitzer, J.A., Whitham, T.G., 2014. Marschner Review: Plant genetic effects on soils under climate change. Plant and Soil 37, 19–91.

Gambarelli, G., Giupponi, C., Goria, A., 2007. La desertificazione, i costi dell'inazione e la valutazione delle opzioni di adattamento al cambiamento climatico, Report prepared for the APAT Workshop on "Le variazioni climatiche e i processi di desertificazione: verso piani di monitoraggio e strategie di riduzione della vulnerabilità e di adattamento", Alghero, 21-22 giugno 2007

Garrett, K.A., Dendy, S.P., Frank, E.E., Rouse, M.N., Travers, S.E., 2006. *Climate Change Effects on Plant Disease: Genomes to Ecosystems*. Annual Review of Phytopathology, **44**: 489-509

Gaskin, J., Speir, R., Harris, K., Das, K., Dewey Lee, R., Morris, L. & Fisher, D.S. 2010. Effect of peanut hull and pine chip biochar on soil nutrients, corn nutrient status, and yield. Agronomy Journal 102: 623–633.

Glaser, B., Haumaier, L., Guggenberger, G., Zech, W., 2001. The 'Terra Preta' phenomenon: a model for sustainable agriculture in the humid tropics. Naturwissenschaften 88: 37-41.

Gomez, J.D, Denef, K, Stewart, C.E., Zheng, J., Cotrufo, M.F., 2014. Biochar addition rate influences soil microbial abundance and activity in temperate soils. European Journal of Soil Science 65, pp. 28–39.

González, J. F., Román, S., Encinar, J.M., Martinéz, G., 2009. Pyrolysis of various biomass residues and char utilization for the production of activated carbons. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 85, 134-141.

Gottfried, M., Pauli, H., Futschik, A., Akhalkatsi, M., Barančok, P., Alonso, J.L.B., Coldea, G., Dick, J., Erschbamer, B., Kazakis, G., 2012. Continent-wide response of mountain vegetation to climate change. Nature Climate Change 2, 111–115.

Grossman, J.M., O'Neill, B.E., Tsai, S.M., Liang, B., Neves, E., Lehmann, J., Thies, J.E., 2010. Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy. Microbial Ecology 60, 192-205.

Gundale, M.J., DeLuca, T.H., 2006. Temperature and source material influence ecological attributes of Ponderosa pine and Douglas-fir charcoal. Forest Ecology and Management 231, 86-93.

Haas, D., Défago, G. 2005.Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology. 3 (4), 307–319.

Hammes, K., Schmidt, M.W.I., 2009. Changes of biochar in soil. In Biochar for environmental management. Science and technology (Eds J Lehmann,S Joseph), 169–178. (Earthscan: London).

Harrison, M.J., van Buuren, M.L., 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus Glomus versiforme. Nature 378, 626–629.

Hartley, I.P., Hopkins, D.W., Garnett, M.H., Sommerkorn, M., Wookey, P.A., 2009. No evidence for compensatory thermal adaptation of soil microbial respiration in the study of Bradford et al., (2008). Ecology Letters 12, E12–E14.

Hilber, I., Blum, F., Leifeld, J., Schmidt, H.P., Bucheli, T.D., 2012. Quantitative Determination of PAHs in Biochar: A Prerequisite To Ensure Its Quality and Safe Application. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60(12), 3042–3050. doi:10.1021/jf205278v.

Hilscher, A., Heister, K., Siewert, C., Knicker, H., 2009. Mineralisation and structural changes during the initial phase of microbial degradation of pyrogenic plant residues in soil. Org. Geochem. 40, 332–342.

Hockaday, W., Grannas, A.M., Kim, S., Hatcher, P.G. 2007. The transformation and mobility of charcoal in afire-impacted watershed. Geochimica et Cosmochimica Acta 71, 3432–3445. doi:10.1016/j.gca.2007.02.023.

Hockaday, W.C., 2006. The organic geochemistry of charcoal black carbon in the soils of the University of Michigan Biological Station. PhD Thesis, Ohio State University, Columbus, OH.

Hossain, M.K., Strezov, V., Nelson, P., 2007. Evaluation of agricultural char from sewage sludge. Proceedings International Agrichar Iniative, Terrigal, Australia.

Houben, D., Evrard, L., Sonnet, P., 2013a. Mobility, bioavailability and pH-dependent leaching of cadmium, zinc and lead in a contaminated soil amended with biochar, Chemosphere 92, 1450–1457.

IPPC. 2007. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.Mitigation of climate change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

International Biochar Initiative, 2012. Guidelines for biochar that is used in soil, version 1.1 pubblished May 2012.

Ippolito, J.A., Liard, D.A., Busscher, W.J., 2012. Environmental benefits of biochar. Journal of Environmental Quality, 41: 967-972.

Jones, C.M., Stres, B., Rosenquist, M., Hallin, S., 2008. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. Molecular Biology and Evolution 25, 1955–1966.

Jin, H., 2010. Characterization of microbial life colonizing biochar and biochar-amended soils. PhD Dissertation, Cornell University, Ithaca, NY.

Joseph, S.D., Camps-Arbestain, M., Lin, Y., Munroe, P., Chia, C.H., Hook, J., van Zweiten, L., Kimber, S., Cowie, A., Singh, B.P., Lehmann, J., Foidl, N., Smernik, R.J., Amonette, J.E., 2010. An investigation into the reactions of biochars in soil. Soil Research 48, 501-515.

Keiluweit, M., Kleber, M., 2009. Molecular-level interactions in soils and sediments: the role of aromatic p-systems. Environmental Science &Technology 43(10), 3421–3429. doi: 10.1021/es8033044.

Kiers, E.T., Duhamel, M., Beesetty, Y., Mensah, J.A., Franken, O., Verbruggen, E., Fellbaum, C.R., Kowalchuk, G.A., Hart, M.M., Bago, A., Palmer, T.M., West, S.A., Vandenkoornhuyse, P., Jansa, J., Bücking, H., 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. Science 333 (6044), 880–882.

Kim, S.S., Ly, H.V., Choi, G.H., Kim, J., Woo, H.C., 2012. Pyrolysis characteristics and kinetics of the alga Saccharina japonica. Bioresource Technology 123, 445-451.

Kim, J.S., Sparovek, S., Longo, R.M., De Melo, W.J., Crowley, D., 2007. Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. Soil Biology and Biochemistry 39, 648-690.

Kinney, T.J., Masiello, C.A., Dugan, B., Hockaday, W.C., Dean, M.R., Zygourakis, K., Barnes, R.T., 2012. Hydrologic properties of biochars produced at different temperatures. Biomass Bioenergy 41, 34-43.

Koelmans, A.A., Meulman, B., Meijer, T., Jonker, M.T.O., 2009. Attenuation of polychlorinated biphenyl sorption to charcoal by humic acids. Environmental Science and Technology 43, 736–742.

Kögel-Knabner, I., Guggenberger, G., Kleber, M., Kandeler, E., Kalbitz, K., Scheus, Eusterhues K, Leinweber, P., 2008. Organo-mineral associations in temperate soils: integrating biology, mineralogy, and organic matter chemistry. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 171(1), 61–82. doi:10.1002/jpln.200700048.

Koelmans, A.A., Jonker, M.T.O., Cornelissen, G., Bucheli, T.D., Van Noort, P.C.M., Gustafsson Ö., 2005: Black carbon: The reverse of its dark side, Chemosphere 63 (2006), 365–377.

Kuhlbusch, T.A.J., Andreae, M.O., Cachier, H., Goldammer, J.G., Acaux, J.P., Shea, R.C., Crutzen P.J., 1996. Black carbon formation by avanna fires: measurements and implications for the global carbon cycle. Journal of Geophysical Research 101, 23651–23665.

Kuzyakov, Y., Subbotina, I., Chen, H., Bogomolova, I., Xu, X., 2009. Black carbon decomposition and incorporation into microbial biomass estimated by 14C labeling. Soil Biology and Biochemistry 41, 210-219.

Laird, D.A., Fleming, P.D., Wang, B., Horton, R., Karlen, D.L., 2010. Biochar impact on nutrient leaching from a Midwestern agricultural soil. Geoderma, 158:436–442. doi: 10.1016/j.geoderma.2010.05.012.

Langley, J., A., Hungate, B.A., 2014. Plant community feedbacks and long-term ecosystem responses to multi-factored global change. AoB Plants 6*:* 12.

Lehmann, J., Joseph, S. (Eds.), 2015. Biochar for environmental management, Science, technology and implementation. Second edition. Routledge, New York.

Lehmann, J., Rillig, M.C., Thies, J., Masiello, C.A., Hockaday, W.C., Crowley, D., 2011. Biochar effects on soil biota – A review. Soil Biology and Biochemistry, 43(9), 1812-1836.

Lehmann, J., Joseph, S. (Eds.), 2009. Biochar for environmental management, Science and technology. Earthscan London.

Lehmann, J., Czimczik, C., Laird, D., Sohi, S., 2009. Stability of biochar in soil, in: Biochar for environmental management: Science and technology, Chapter 11. Lehman J. and Joseph. S., (Eds). London: Earthscan.

Lehmann, J., 2007. Bioenergy in the black. Frontiers in Ecology and Environment 5, 381-387.

Lehmann, J., Gaunt, J., Rondon, M., 2006. Biochar sequestration in terrestrial ecosystems e a review. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change 11, 403-427.

Lehmann, J., da Silva Jr., J.P., Steiner, C., Nehls, T., Zech, W., Glaser, B., 2003. Nutrientavailability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. Plant and Soil 249, 343-357.

Leinweber, P., Kruse, J., Walley, F.L., Gillespie, A., Eckardt, K.-U., Blyth, R., Regier, T., 2007. Nitrogen K-edge XANES - an overview of reference compounds used to identify unknown organic nitrogen in environmental samples. Journal of Synchrotron Radiation 14, 500 -511.

Leon y Leon, C.A., Solar, J.M., Calemma, V., Radovic, L.R., 1992. Evidence for the protonation of basal plane sites on carbon. Carbon 30 (5), 797–811. doi:10.1016/0008-6223(92)90164-R.

Levis, S., Bonan, G.B. and Bonfils, C., 2004. Soil feedback drives the mid-Holocene North African monsoon northward in fully coupled CCSM2 simulations with a dynamic vegetation model. Climate Dynamics 23(7-8), 791-802.

Liang, B.Q., Lehmann, J., Sohi, S.P., Thies, J.E., O'Neill, B., Trujillo, L., Gaunt, J., Solomon, D., Grossman, J., Neves, E.G., Luizao, F.J., 2010. Black carbon affects the cycling of nonblack carbon in soil. Organic Geochemistry. 41, 206-213.

Liang, B., Lehmann, J., Solomon, D., Kinyangi, J., Grossman, J., O'Neill, B., Skjemstad, J.O., Thies, J., Luizao, F.J., Petersen, J., Neves, E.G., 2006. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. Soil Science Society of America Journal 70, 1719–1730.

Lin, Y., Munroe, P., Joseph, S., Kimber, S., and Zwieten, L., 2012. Nanoscale organo-mineral reactions of biochars in ferrosol: An investigation using microscopy, Plant Soil 357(1-2), 369-380.

Lua, A.C., Yang, T., Guo, J., 2004. Effects of pyrolysis conditions on the properties of activated carbons prepared from pistachio-nut shells. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 72, 279-287.

Lugtenberg, B., Chin-A-Woeng, T., Bloemberg, G. 2002. Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. Antonie van Leeuwenhoek, 81(1): 373–383.

Macías, F, Camps Arbestain, M., 2010. Soil carbon sequestration in a global environment.Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change. doi:10.1007/s11027-010-9231-4.

Macías, F., 2004. Sumideros de carbon para el forzamiento climatic antropoceno: una vision de alternativas de actuacion desde la ciencia del suelo. Edafologia1,7–25.

Mac Kenzie, M.D., DeLuca, T.H. 2006. Charcoal and shrubs modify soil processes in ponderosa pine forests of western Montana. Plant and Soil 287, 257–266. doi:10.1007/s11104-006-9074-7.

Major, J., Steiner, C., Downie, A., Lehmann, J., 2009b. Biochar effects on nutrient leaching. In Biochar for environmental management. Science and technology (Eds J Lehmann, S Joseph) pp. 271–288.(Earthscan: London).

Makoto, K., Tamai, Y., Kim, Y.S., Koike, T., 2010. Buried charcoal layer and ectomycorrhizae cooperatively promote the growth of Larix gmelinii seedlings. Plant and Soil 327, 143-152.

Marris, E. 2006. Black is the new green. Nature 442, 624-626.

Marschner, B., 1999. Mineral nutrition of higher plants. 2nd edn (Academic Press: London).

Masiello, C.A., Chen, Y., Gao, X., Liu, S., Cheng, H., Bennett, M.R., Rudgers, J.A., Wagner, D.S., Zygourakis, K., Silberg, J.J., 2013. Biochar and Microbial Signaling: Production Conditions Determine Effects on Microbial Communication. Environmental Science and Technology.

Matsubara, Y –I., Hasegawa, N., Fukui, H., 2002. Incidence of Fusarium root rot in asparagus seedlings infected with arbuscular mycorrhizal fungus as affected by several soil amendments. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 71, 370-37.

Mellendorf, M., Soja, G., Gerzabek, M.H., Watzinger, A., 2010. Soil microbial community dynamics and phenanthrene degradation as affected by rape oil application. Applied Soil Ecology 46, 329−334.

Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J.H., Piceno, Y.M., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Bakker, P.A., Raaijmakers, J.M., 2011. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. Science, 332(6033), 1097–1100.

Moghtaderi, B., 2006. The State-of-the-art in Pyrolysis Modelling of Lignocellulosic Solid Fuels. Fire and Materials 30, 1-34.

Montes-Morán, M.A., Suárez, D., Menéndez, J.A., Fuente, E., 2004. On the nature of basic sites on carbon surfaces: an overview. Carbon 42, 1219–1225.

Morgan, J.A.W., Bending, G.D., White, P.J., 2005. Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 56 (417), 1729–1739.

Morrissey, J.P., Dow, J.M., Mark, G.L., and O'Gara, F. 2004. Are microbes at the root of a solution to world food production? EMBO Reports 5 (10): 922–926.

Nguyen, B.T., Lehmann, J., Hockaday, W.C., Joseph, S., Masiello, C.A., 2010. Temperature sensitivity of black carbon decomposition and oxidation. Environmental Science and Technology 44 (9), 3324-3331.

Narasimhan, K., Basheer, C., Bajic, V.B., and Swarup, S. 2003. Enhancement of Plant–microbe interactions using a rhizosphere metabolomics-driven approach and its application in the removal of polychlorinated biphenyls. Plant Physiology, 132(1): 146–153.

Nguyen, B., Lehmann, J., 2009. Black carbon decomposition under varying water regimes. Organic Geochemistry 40, 846–853. doi:10.1016/j.orggeochem.2009.05.004.

Nik-Azar, M., Hajaligol, M.R., Sohrabi, M., Dabir, B., 1997. Mineral matter effects in rapid pyrolysis of beech wood. Fuel Processing Technology 51, 7–17.

Noguera, D., Rondon, M., Laossi, K.-R., Hoyos, V., Lavelle, P., de Carvalho, M.H.C., Barot, S., 2010. Contrasted effect of biochar and earthworms on rice growth and resource allocation in different soils. Soil Biology and Biocheistry 42, 1017-1027.

Novak, J.M., Busscher, W.J., Laird, D.L., Ahmedna, M., Watts, D.W., Niandou, M.A.S, 2009. Impact of biochar amendment on fertility of a southeastern coastal plain soil. Soil Science 174, 105-112.

Nutman, P.S., 1952. Host factors influencing infection and nodule development in leguminous plants. Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences 139, 176-185.

Ogawa, M., 1999. Utilization of symbiotic microorganisms and charcoal in tropical agriculture and forestry and CO2 fixation. Soil Microorganisms 53(2): 73-79.

Ogawa, M., 1994. Symbiosis of people and nature in the tropics. Farming Japan 28, 10–34.

Oguntunde, P.G., Abiodun, B.J., Ajayi, A.E., Van De Giesen, N., 2008. Effects of charcoal production on soil physical properties in Ghana. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 171(4), 591-596.

O'Neill, B., Grossman, J., Tsai, M.T., Gomes, J.E., Lehmann, J., Peterson, J., Neves, E., Thies, J.E., 2009. Bacterial community composition in Brazilian Anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. Microbial Ecology 58, 23-35.

Ostle, N. J., Smith, P., Fisher, R., Woodward, F.I Gisher, J.B., Smith, J.U., Galbraith, D., Levy, P., Meir, P., McNamara, n.P., Bardgett, R.D., 2009. Integrating plant–soil interactions into global carbon cycle models. Journal of Ecology 97: 851–863.

Pastor-Villegas, J., Pastor-Valle, J.P., Meneses Rodriguez, J.M., García García, M., 2006. Study of commercial wood charcoals for the preparation of carbon adsorbents. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 76: 103-108.

Pietikäinen, J., Kiikkila, O., Fritze, H., 2000. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus. Oikos 89, 231-242.

Pignatello, J.J., Kwon, S., Lu, Y., 2006. Effect of Natural Organic Substances on the Surface and Adsorptive properties of Environmental Black Carbon (Char): Attenuation of Surface Activity by Humic and Fulvic Acids. Environmental Science and Technolology 40, 7757-7763.

Prendergast-Miller, M.T., Duvall, M., Sohi, S.P., 2013. Biochar-root interactions are mediated by biochar nutrient content and biochar impacts on soil nutrient availability. European Journal of Soil Science 65, 173-185.

Raveendran, K., Ganesh, A., Khilar, K.C., 1995, Influence of mineral matter on biomass pyrolysis characteristics. Fuel 74, 1812-1822

Read, D.J., Smith, S.E., 1997. Mycorrhiza Symbiosis. 2nd Edition, Academic Press, London, p. 605.

Reibe, K., Götz, K.-P., Roß, C.-L, Döring, T.F., Ellmer, F., Ruess, L., 2015. Impact of quality and quantity of biochar and hydrochar on soil Collembola and growth of spring wheat.Soil Biology and Biochemistry 83, 84–87.

Riedlinger, J., Schrey, S., Tarkka, M., Hampp, R., Kapur, M., Fiedler, H. 2006. Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, isproduced by the mycorrhiza helper bacterium Streptomyces strain AcH505. Applied and Environmental Microbiology 72 (5), 3550–3557. doi:10.1128/AEM.72.5.3550-3557.2006.

Rillig, M.C., Mummey, D.L., 2006. Mycorrhizas and soil structure. New Phytologist 171, 41-53.

Rondon, M., Lehmann, J., Ramirez, J., Hurtado, M., 2007. Biological nitrogen fixation by common beans (Phaseolus vulgarisL.) increases with bio-char additions. Biol Fert Soils 43, 699–708.

Saito, M., Marumoto, T., 2002. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi: the status quo in Japan and the future prospects. Plant Soil 244, 273-279.

Sarmah, A., Srinivasan, P., Smernik, R., Manley-Harris, M., Antal, M., Downie, A., van Zwieten, L., 2010. Retention capacity of biochar-amended New Zealand dairy farm soil for an estrogenic steroid hormone and its primary metabolite. Australian Journal of Soil Research 48, 648–658.

Schimel, J., Balser, T. C., Wallenstein, M., 2007. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. Ecology 88, 1386–1394.

Selvakumar, G., Panneerselvam, P., Ganeshamurthy, A.N. 2012. Bacterial mediated alleviation of abiotic stress in crops. In Bacteria in agrobiology: stress management. Edited by D.K. Maheshwari. Springer Berlin Heidelberg. pp. 205–224.

Shinogi, Y., Yoshida, H., Koizumi, T., Yamaoka, M., Saito, T., 2003. Basic characteristics of low-temperature carbon products from waste sludge. Advances in Environmental Research 7(3), 661–665. doi:10.1016/S1093-0191(02)00040-0.

Singh, H.B., Anderson, B.E., Brune, W.H., Cai, C., Cohen, R.C., Crawford, J.H., Cubison, M.J., Czech, E.P., Emmons, L., Fuelberg, H.E., Huey, G., Jacob, D.J., Jimenez, J.L., Kaduwela, A., Kondo, Y., Mao, J., Olson, J.R., Sachse, G.W., Vay, S.A., Weinheimer, A., Wennberg, P.O., Wisthaler, A., the ARCTAS Science Team, 2010. Pollution influences on atmospheric composition and chemistry at high northern latitudes: boreal and California forest fire emissions. Atmospheric Environment 44, 4553–4564.

Singh, B.P., Cowie, A.L. 2008. A novel approach, using ^{13}C natural abundance, for measuring decomposition of biochars in soil. In Carbon and Nutrient Management in Agriculture, Fertilizer and Lime Research Centre Workshop Proceedings. (Eds LD Currie, LJ Yates) pp. 549. (Massey University: Palmerston North, New Zealand)

Smernik, R., 2009. Biochar and sorption of organic compounds. In: Biochar for environmental management. Science and technology. (Eds J Lehmann, S Joseph) pp. 289–296. (Earthscan: London)

Sohi, S., Lopez-Capel, E., Krull, E., Bol, R., 2009. Biochar, climate change and soil: A review to guide future research. CSIRO Land and Water Science Report 05/09

Spokas, A., Cantrell, K.B., Novak, J.M., Archer, D.W., Ippolito, J.A., Collins, H.P., Boateng, A.A., Lima, I.M., Lamb, M.C., McAloon, A.J., Lentz, R.D., Nichols, K.A., 2012a. Biochar: A

Synthesis of Its Agronomic Impact beyond Carbon Sequestration. Journal of Environmental Quality, 41, 973-989.

Spokas, K., Reicosky, D., 2009. Impacts of sixteen different biochars on soil greenhouse gas production. Annals of Environmental Science 3, 179–193.

Steiner, C., Glaser, B., Teixeira, W.G., Lehmann, J., Blum, W.E.H., Zech, W., 2008b. Nitrogen retention and plant uptake on a highly weathered central Amazonian Ferralsol amended with compost and charcoal. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 171, 893-899.

Stemmer, M., Watzinger, A., Blochberger, K., Haberauer, G., Gerzabek, M,. 2007. Linking dynamics of soil microbial phospholipid fatty acids to carbon mineralization in a ^{13}C natural abundance experiment: Impact of heavy metals and acid rain. Soil Biology and Biochemistry 39, 3177−3186.

Rajkovich, S., Enders, A., Hanley, K., Hyland, C., Zimmermann, A.R. & Lehmann, J., 2012. Corn growth and nitrogen nutrition after additions of biochars with varying properties to a temperate soil. Biology and Fertility of Soils 48, 271–284.

Rinnan, R., Michelsen, A., Baath, E., 2013. Fungi benefit from two decades of increased nutrient availability in tundra heath soil. PLoS One 8*:* 10.

Rinnan, R., Michelsen, A., Baath, E., Jonasson, S., 2007. Fifteen years of climate change manipulations alter soil microbial communities in a subarctic heath ecosystem. Global Change Biology 13, 28–39.

Steinbeiss, S., Gleixner, G., Antonietti, M., 2009. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. Soil Biology and Biochemistry 41(6), 1301-1310.

Thies, J.E., Rillig, M., 2009. Characteristics of biochar: biological properties. In: Lehmann J, Joseph S (Eds.), Biochar for Environmental Management: Science and Technology. Earthscan, London, pp. 85-105.

Thuiller, W., 2007. Biodiversity: Climate change and the ecologist. Nature 448, 550-552.

Taiz, F., Zeiger, E., 2009. *Fisiologia vegetale*, Piccin, Padova.

Tiessen, H., Cuevas, E., Chacon, P., 1994: The role of soil organic matter in susteining soil fertility, Nature 371.

Tryon, E.H. 1948. Effect of charcoal on certain physical, chemical, and biological properties of forest soils. Ecological Monograph 18, 81–115.

Uchimiya M, Lima IM, Klasson KT, Wartelle LH (2010a) Contaminant immobilization and nutrient release by biochar soil amendment: roles of natural organic matter. Chemosphere 80(8), 935–940.

Uren, N.C. 2000. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil–plant interface. Edited by Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. Marcel Dekker, Inc., New York, 19–40.

Vaccari, F.P., Baronti, S., Lugato, E., Genesio, L., Castaldi, S., Fornasier, F., Miglietta, F., 2011. Biochar as a strategy to sequester carbon and increase yield in durum wheat. European Journal of Agronomy 34, 231-238.

Van der Putten, W.H., Bardgett, R.D., Bever, J.D., Bezemer, T.M.,, Casper, B.B., Fukami, T., Kardol, P., Kliromonos, J.N., Kulmatiski, A., Schweitzer, J.A., Suding, K.N., Van de Voorde, T.F.J., Wardle, D.A., 2013. Plant–soil feedbacks: the past, the present and future challenges. Journal of Ecology 101, 265–276.

Verheijen, F., Jeffery, S., Bastos, A.C., Van der Velde, M., Diafas, I., 2010. Biochar Application to Soils: A Critical Scientific Review of Effects of Soil Properties, Processes and Functions. JRC Scientific and Technical Reports, EUR 24099 – EN, Italy.

Viketoft, M., Palmborg, C., Sohlenius, B., Huss-Danell, K., Bengtsson, J., 2005. Plant species effects on soil nematode communities in experimental grasslands. Applied Soil Ecology 30, 0-103.

von Lützow, M., Kögel-Knabner, I., 2009. Temperature sensitivity of soil organic matter decomposition: What do we know? Biology and Fertility of Soils 46, 1–15.

Wallstedt, A., Coughlan, A., Munson, A.D., Nilsson, M.C., Margolis, H.A., 2002. Mechanisms of interaction between Kalmia angustifolia cover and Picea mariana seedlings. Canadian Journal For Research 32, 2022–2031.

Walther, G.R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T.J.C., Fromentin, J.M., Hoegh-Guldberg, O., Bairlein, F., 2002. Ecological responses to recent climate change. Nature 416, 389–395.

Warnock, D.D., Lehmann, J., Kuyper T.W., Rillig, M.C., 2007. Mycorrhizal responses to biochar in soil concepts and mechanisms. Plant and Soil 300, 9-20.

Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.M., Thomashow, L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 40(1), 309–348.

Winsley, P., 2007. Biochar and bioenergy production for climate change mitigation. New Zealand Sci. Review 64, 5-10.

Yamato, M., Okimori, Y., Wibowo, I.F., Anshori, S., Ogawa, M, 2006. Effects of the application of charred bark of Acacia mangium on the yield of maize, cowpea and peanut, and

soil chemical properties in South Sumatra, Indonesia. Soil Science and Plant Nutrition 52, 489-495.

Yan, F., Schubert, S., Mengel, K., 1996. Soil pH increase due to biological decarboxylation of organic anions. Soil Biology & Biochemistry 28, 617–624.doi:10.1016/0038-0717(95)00180-8.

Yao, F.X., Camps Arbestain, M, Virgel, S, Blanco, F., Arostegui, J., Maciá-Agulló, J.A., Macías, F., 2010. Simulated geochemical weathering of a mineral ash-rich biochar in a modi fied Soxhlet reactor. Chemosphere 80, 724–732. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.05.026.

Yin, B., Crowley, D., Sparovek, G., De Melo, W.J., Borneman, J., 2000. Bacterial functional redundancy along a soil reclamation gradient. Applied and Environmental Microbiology 66, 4361 - 4365.

Zahran, H.H. 1999. Rhizobium–legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63 (4), 968–989.

Zamioudis, C., Pieterse, C.M.J. 2012. Modulation of host immunity by beneficialmicrobes. Molecular Plant–MicrobeInteract.25 (2), 139–150.

Zhang, J., Subramanian, S., Stacey, G., Yu, O. 2009. Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of Medicago truncatula by Sinorhizobium meliloti. Plant Journal, 57 (1), 171–183.

Zanzi, R., Sjöström, K., Björnbom, E., 2002. Rapid pyrolysis of agricultural residues at high temperature. Biomass and Bioenergy 23, 357–366.

Zech, W., Haumaier, L., Hempfling, R., 1990. Ecological aspects of soil organic matter in tropical land use. In: McCarthy P, Clapp CE, Malcolm RL, Bloom PR (eds): Humic substances in soil and crop sciences: selected readings. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, Wis., 187–202.

Zheng, W., Guo, M., Chow, T., Bennett, D. N., Rajagopalan, N., 2010. Sorption properties of greenwaste biochar from two trizaine pesticides. Journal of Hazardous Materials 181, 121-126.

Zogg, G.P., Zak, D.R., Ringelberg, D.B.,. MacDonald, N.W., Pregitzer, K.S., White, D.C., 1997. Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. Soil Science Society of America Journal 61, 475–481.

Zolla, G., Badri, D.V., Bakker, M.G., Manter, D.K., and Vivanco, J.M. 2013. Soilmicrobiomes vary in their ability to confer drought tolerance to Arabidopsis. Applied Soil Ecology, 68: 1–9.

CAPITOLO 2 - SPERIMENTAZIONE IN CAMPO

2.1 Materiali e metodi

Le prove sperimentali in campo sono state condotte su tre diverse colture, in ciascuna delle quali sono state fisicamente delimitate unità di campionamento (di seguito denominate parcelle), trattate e di controllo, destinate allo studio degli effetti del biochar sulla rizosfera.

Al fine di assicurare la rappresentatività statistica dei campionamenti, le parcelle sono state disposte, all'interno del campo, in maniera randomizzata, mentre la loro numerosità è stata fissata in base alle dimensioni del campo e all'eterogeneità del suolo, come di seguito riportato (Figura 2):

- Vigneto (8 parcelle, di cui 4 trattate con biochar e 4 di controllo);
- Uliveto (12 parcelle, di cui 6 trattate e 6 di controllo);
- Foraggiera (8 parcelle, di cui 4 trattate e 4 di controllo).

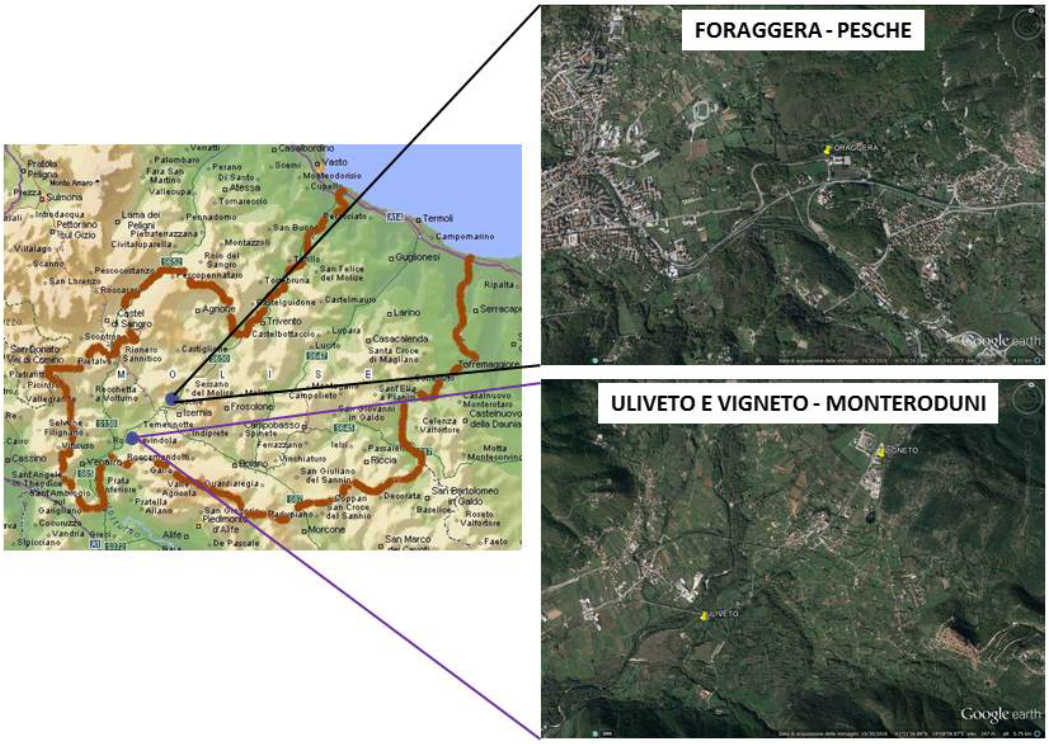


Figura 2: Ubicazione dei siti sperimentali

Durante il periodo di studio, da Maggio 2014 a Maggio 2015, la poggia totale è stata 1310 mm, con una temperatura media di 14 °C.

Tali dati, forniti dalla Regione Molise, sono stati acquisiti dalla stazione meteorologica di Fornelli (Is), Comune più prossimo a quelli in cui sono situati i campi in questione.

Lo studio degli effetti del biochar su queste tre tipologie di suolo ha previsto la determinazione dei seguenti parametri su suolo ammendato e non con biochar:

1) pH;
2) conducibilità;
3) umidità;
5) carbonio organico;
6) capacità di scambio cationico;
8) contenuto di azoto e fosforo totale;
9) fosforo assimilabile;
11) alcalinità (per campioni di suolo a pH>7);
15) distribuzione granulometrica;
16) conta batterica e fungina;
17) saggi enzimatici API ZYM.

Biochar utilizzato e modalità di applicazione al suolo

Il biochar utilizzato in questo studio è stato prodotto da Romagna Carbone s. n. c. a partire da residui di potature di frutteti attraverso un processo di pirolisi lenta, con un tempo medio di residenza di 3 h a 500 °C, in un forno di 2.2 m di diametro, contenente circa 2 t di materia prima.

Al fine di ottenere un'applicazione omogenea nel suolo, il biochar è stato sgretolato in pezzi più piccoli, passato per setaccio a 2 mm e sparso a mano (Major, 2010a), alla dose di 10 t ha-1 (Van Zwieten et al., 2008; Brandstaka et al., 2010; Ndor et al., 2015).

Per evitare perdite di biochar a causa del vento e dell'erosione, subito dopo lo spargimento, il biochar è stato inumidito per mezzo di uno spruzzatore di verderame (Karer et al., 2013) e incorporato al terreno per mezzo di un fresatore a mano a bassa velocità di rotazione, a 10 cm di profondità (Karer et al., 2013).

Tale operazione di fresatura è stata condotta parimenti anche nelle parcelle di controllo, in modo tale da rendere le condizioni di partenza il più possibile simili tra loro.

Il biochar è stato caratterizzato determinando oltre ai parametri previsti per il suolo anche il rapporto H:C, che ne determina la stabilità del carbonio.

Caratterizzazione chimico fisica del del biochar

Le misure di pH sono state effettuate mediante potenziometria (pHmetro Eutech Instruments pH 700, 2013, secondo gli IBI Standards (2014).

La conduttività elettrica è stata ottenuta mediante misurazione diretta in estratti suolo:acqua 1:20 (peso volume -1), in accordo con gli IBI Standards (2014).

La capacità di scambio cationico (CSC) è stata determinata secondo Mehlich (1938), mediante saturazione dei siti di scambio con BaCl2, scambio ionico con una quantità nota di Mg2+ e titolazione di Mg2+ non scambiata con EDTA.

La determinazione dell'umidità è stata condotta mediante il metodo di Black (1965), come differenza in peso prima e dopo passaggio in stufa a 105 °C per il tempo necessario a raggiungere un peso costante.

Per determinare la stabilità del carbonio organico nel biochar, possono essere usati diversi parametri.

Calvelo Pereira et al., (2011) hanno usato la frazione termolabile e l'efficienza di ossidazione con KMnO4 e K2Cr2O7, mentre Enders et al., (2012) hanno utilizzato in combinazione la materia volatile e il rapporto mlare H:C, corretto per la frazione inorganica.

In questo studio si è preso come riferimento gli IBI Standards (2014), che pongono come criterio di stabilità del carbonio il rapporto molare H:C, fissando un valore massimo pari a 0.7 per definire la classe di qualità del biochar.

L'azoto totale (Ntot), il carbonio totale (Ctot), il carbonio organico (Corg) e l'Idrogeno (H) sono stati determinati mediante la combustione a secco (Dumas, 1831), per mezzo di un analizzatore elementare CHN (Carlo Erba Instruments, Mod. 1500, serie 2).

Per il Corg la combustione è stata effettuata dopo la rimozione completa del carbonio inorganico con acido cloridrico.

L'azoto disponibile è stato determinato mediante il metodo di Kjeldahl modificato, usando, prima della digestione, la lega di Devarda (Liao, 1981) come agente riducente per convertire l'azoto nitrico e nitroso in azoto ammoniacale.

Il fosforo totale (Ptot) è stato determinato mediante spettrofotometria (UV-1601 Shimadzu), in accordo con il metodo di Bowman(1988).

Il fosforo disponibile (Pdisp) è stato estratto mediante una soluzione di NaHCO3 a pH 8.5 e valutato spettrofotometricamente in accordo con il metodo di Olsen (1954).

La determinazione dell'alcalinità, effettuata anche per i campioni con pH > 7, è stata condotta per titrimetria secondo il metodo di Higginson e Rayment (1992).

La distribuzione granulometrica (di qui in poi chiamata tessitura) è stata eseguita mediante una modifica del metodo di Bouyoucos (1962), in accordo con il metodo di Beretta et al., (2014), su campioni preliminarmente setacciati a 2mm.

La frazione < 2mm è stata trattata con H2O2 e setacciata a secco a 200 μm, 50 μm e 20 μm.

La frazione inferiore a 20 μm è stata determinata mediante misurazione della densità, effettuata per mezzo di un idrometro, su una dispersione ottenuta dalla frazione stessa di suolo con una soluzione di sodio esametafosfato.

Inoltre, la frazione superiore a 2 mm, dopo essere stata pesata, è stata trattata con una soluzione di sodio esametafosfato per distruggere gli aggregati e, successivamente, passata per setaccio a umido, seccata all'aria a peso costante e pesata. La frazione di macroaggregati è stata calcolata come differenza in peso prima e dopo tale trattamento (Kemper Koch, 1966).

Allestimento sperimentazione sul suolo del vigneto

La sperimentazione sul suolo della vigna è stata condotta in un campo sito nel comune di Monteroduni (Is) (41_32019.800N 14_09034.900E; 270 m s.l.m.), (vedi figura 3).



Figura 3: Immagine dell'area di studio relativa al vigneto

Il campo, non irriguo, è sottoposto annualmente a operazioni di fresatura superficiale (10 cm di profondità), nel mese di Aprile.

Le piante, di varietà Montepulciano di 15 anni di età, sono disposte in 24 filari orientati a nord-ovest e distanziati di 2.5 m l'uno dall'altro; all'interno di ciascun filare, esse sono disposte ad una distanza di 80 cm.

Le 8 parcelle, di 4 m2 ciascuna, sono state delimitate nell'area compresa tra il 2°e 6° filare e tra la 4a e 33a pianta, come riportato nel seguente schema (figura 4).

Il tipo di campionamento effettuato è, secondo la definizione fornita dal D.M. 1999 "Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo", di tipo sistematico, pur non coprendo l'intera superficie a disposizione; ciò al fine di esaminare una parte della superficie il più possibile omogenea, esulando la caratterizzazione accurata del sito dall'obiettivo principale della sperimentazione, di valutare cioè le variazioni dei parametri indagati, a seguito dell'aggiunta del biochar.

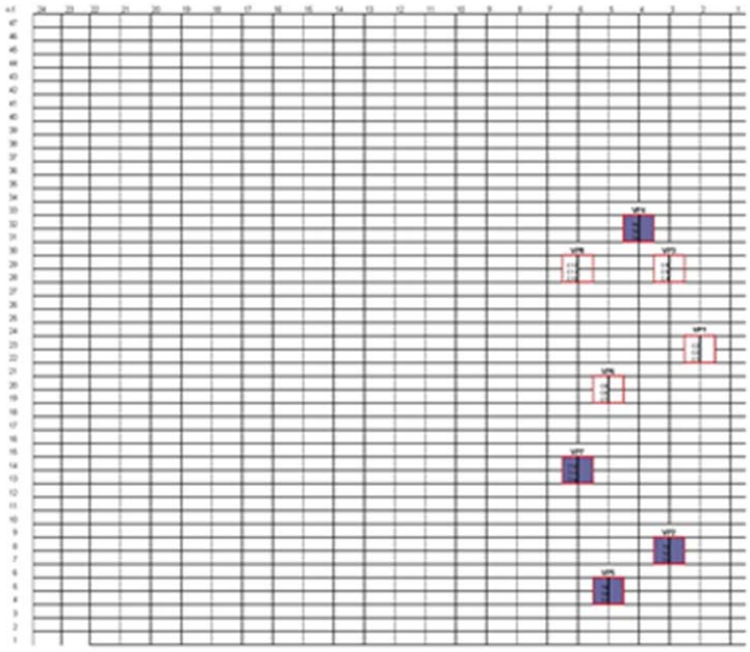


Figura 4: Disposizione delle parcelle all'interno dell'area di studio. Le parcelle colorate in grigio sono state trattate con biochar.

Esse comprendono ciascuna 3 piante e sono disposte nella zona interfila. All'inizio di Maggio 2014, il biochar è stato applicato a mano alla dose di 10 t ha^{-1} (Van Zwieten et al., 2008; Brandstaka et al., 2010; Ndor et al., 2015), tra le piante e all'interno di tutta la parcella (figura 5).

Le modalità di campionamento finalizzato alle diverse indagini condotte in questo studio, sono descritte nell'articolo di Amendola et al., 2017 allegato alla presente tesi.

Per maggiore chiarezza, tuttavia, se ne riporta un breve sunto, rimandando al citato articolo per ulteriori dettagli.

Per la caratterizzazione chimico fisica del suolo sono state seguite le indicazioni riportate nel D.M. 1999, concernente l'approvazione dei metodi ufficiali di analisi chimica del suolo. I punti e relative epoche di campionamento, sono schematizzati nella figura 6.



Figura 5: Immagine di una parcella della vigna trattata con biochar

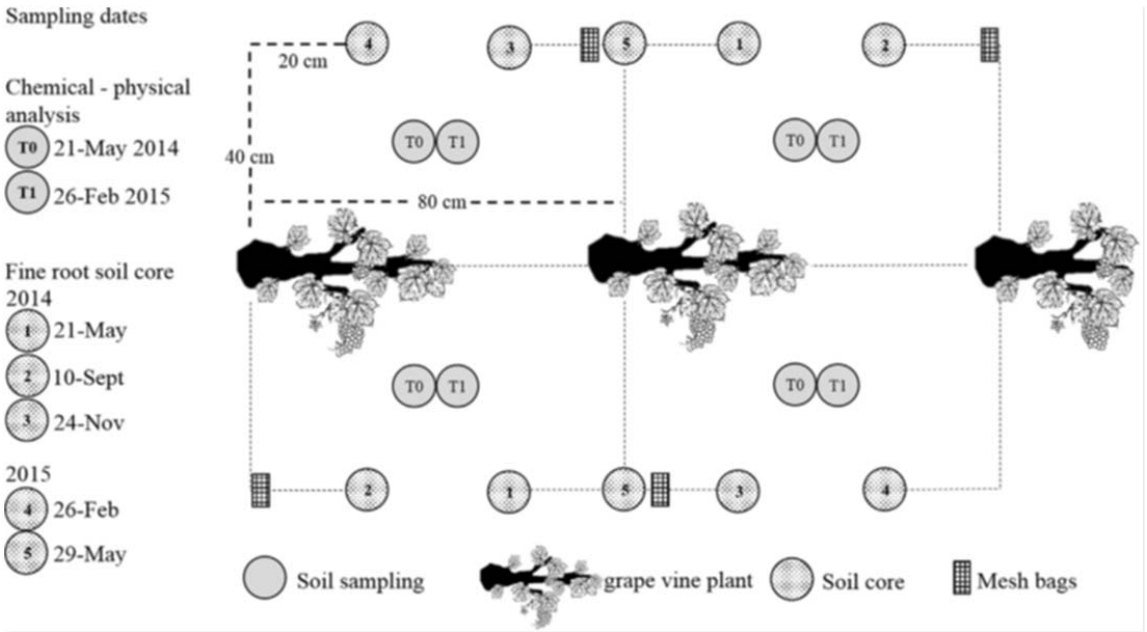


Figura 6: Schema riepilogativo dei punti di campionamento stabiliti all'interno di ciascuna parcella e delle relative date, in funzione delle diverse destinazioni analitiche.

A ciascuna epoca di campionamento (T0, Maggio 2014 e T1, Febbraio 2015), rispettivamente prima e dopo il trattamento con biochar, dopo aver rimosso lo strato vegetale superficiale, sono stati raccolti all'interno di ciascuna parcella quattro campioni, a distanza di 40 cm dalle piante, riuniti in un unico campione globale e trasportati in laboratorio, dove sono stati posti a seccare all'aria fino a peso costante; essi sono stati quindi passati per setaccio a 2 mm e conservati a temperatura ambiente in un contenitore chiuso ermeticamente fino al momento delle analisi.

Il campionamento finalizzato alle indagini microbiologiche, non trattate nel citato articolo, è stato effettuato contestualmente a quello condotto per le indagini chimico fisiche, prelevando da ciascun campione globale un'aliquota di campione che è stata posta in un sacchetto di plastica, trasportata e conservata in laboratorio alla temperatura di 4 °C, fino al momento delle analisi.Poiché sul terreno del vigneto si è deciso di approfondire lo studio sulla rizosfera, sono stati determinati crescita e turnover del sistema radicale, crescita delle micorrize (AMF) analisi microbiologica con tecnica PCR-DGGE.

Essendo tali aspetti direttamente connessi tra loro, al contenuto idrico e di nutrienti disponibili, su tale terreno è stata determinata anche la quantità di acqua e di azoto disponibile (AWC).

Per le analisi delle micorrize arbuscolari (AMF) sono stati preparati sacchetti in nylon di 40 μm di luce e 25 cc di capacità (Wallander et al., 2001; Lovelock et al., 2004).

Il suolo è stato prelevato (Giugno 2014) dalle parcelle trattate e di controllo, seccato all'aria, passato per setaccio ad 1 mm, per eliminare il materiale vegetale e radici fini, sterilizzato in autoclave e riposto nei sacchetti (vedi figura 7).

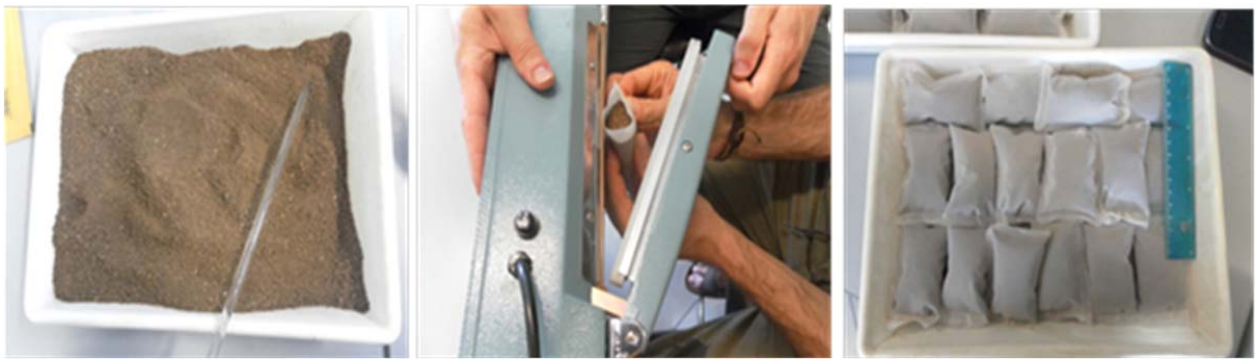


Figura 7: Sacchetti preparati per l'analisi degli effetti del biochar sulle micorrize secondo il metodo riportato da Wallander, 2001.



Figura 8: Immagine relativa al campionamento, finalizzato alla determinazione della produzione e turn over radicale.

All'interno di ogni plot, nel mese di Giugno 2014, sono stati posizionati 4 sacchetti (vedi figura 5) e recuperati dopo un anno per essere analizzati.

Per lo studio delle radici fini (con diametro inferiore a 2 mm) è stato utilizzato il metodo di Persson e Vogt, (1991) che prevede il carotaggio del terreno durante il periodo di crescita.

A tale scopo sono state effettuate 5 campagne di campionamento (Maggio, Settembre e Novembre 2014, Febbraio e Maggio 2015), prelevando in ciascuna data 4 carote da 4 cm di diametro per parcella a 4 profondità da 0 cm a 40 cm, utilizzando un carotatore portatile a motore (vedi figura 8). I campioni sono stati riposti all'interno di sacchetti di plastica, trasportati in laboratorio e conservati a 4°C, fino al momento delle analisi.

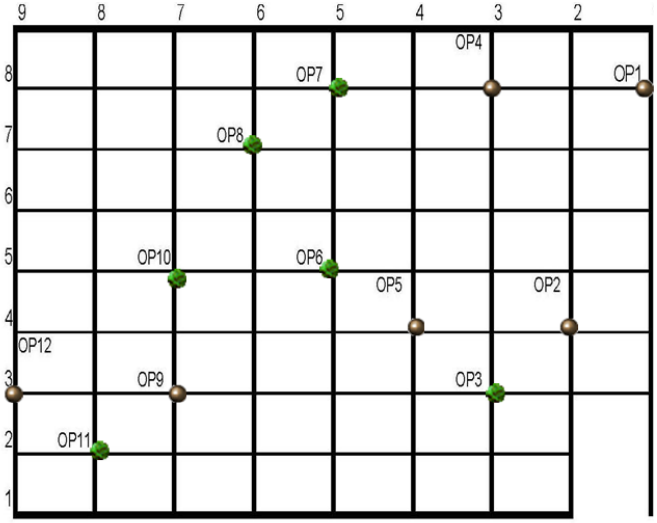
Allestimento sperimentazione sul suolo dell'oliveto

L'area sottoposta a studio è situata nel Comune di Monteroduni (IS), all'interno di un uliveto, (41°30'51.4"N 14°08'20.4"E; 270 m s.l.m.), composto da 9 file contenenti ciascuna 8 piante, ad eccezione della prima che ne contiene 6, poste a distanza di circa 8m l'una dall'altra (figura 9).



Figura 9: immagine dell'area di studio relativa all'oliveto

All'interno di tale area, sono state individuate 12 piante, in maniera casuale tra la 1a e la 9a fila, come indicato nello schema di seguito riportato in figura 10.



Legenda: Parcelle di controllo; Parcella trattata con biochar.

Figura 10: Area di studio relativa all'oliveto. Le parcelle sono identificate con la sigla OPn, dove OP sta per parcella olivo ed n è un numero progressivo secondo ordine crescente di fila e di pianta. Le intersezioni tra le linee orizzontali e verticali indicano le piante presenti nel campo.

Il campo non è irriguo ed è sottoposto annualmente a operazioni di erpicature primaverili, effettuate regolarmente nel mese di Aprile, allo scopo di incorporare il letame, utilizzato come concime.

Essendo tale tipo di suolo caratterizzato da un'elevata disomogeneità vegetativa, in tale area di studio si è deciso di effettuare unicamente indagini chimico-fisiche e microbiologiche; pertanto i campionamenti sono stati effettuati prelevando i 4 campioni elementari all'interno del settore circolare di raggio compreso tra 2,25 m e 1,75 m dal tronco della pianta (vedi figura 9).
Per le indagini microbiologiche il campionamento è stato effettuato come descritto nel paragrafo relativo al vigneto.

Subito dopo il primo campionamento (21 Maggio 2014) si è proceduto al trattamento delle parcelle mediante somministrazioni da 10 t/ha di biochar effettivi (vedi figura 11).



Figura 11: immagine relativa al trattamento con biochar di una parcella dell'oliveto

Il secondo campionamento è stato effettuato nel Febbraio 2015.

Allestimento sperimentazione sul suolo della foraggera

L'area sottoposta a studio è situata nel Comune di Pesche (IS), (41°36'25.1"N 14°15'50.6"E; 732 m s.l.m.) (vedi figura 12).

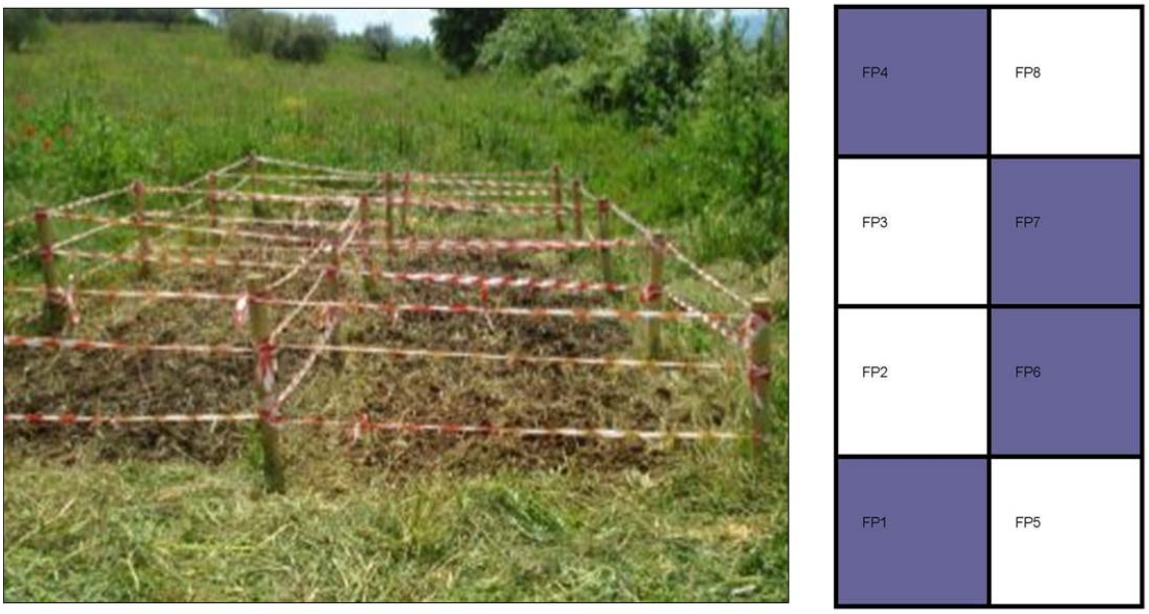


Figura 12: Immagine e schema dell'area di studio relativa alla foraggiera. Le parcelle sono identificate con la sigla da FP1a FP8, dove FP sta per parcella di foraggio ed n è un numero progressivo. Le aree evidenziate in grigio sono quelle trattate con biochar.

L'area individuata è adibita a pascolo permanente, pertanto non è sottoposta a trattamenti agricoli.

All'interno di tale area sono state fisicamente delimitate 8 parcelle di 4 m2 ciascuna, di cui 4 destinate al trattamento con biochar, alla dose di 10 t/ha, e 4 di controllo.

Preliminarmente al primo campionamento, la vegetazione presente all'interno dell'area delimitata per la sperimentazione è stata rimossa per mezzo di un tagliaerba.

In questa area di studio, così come per l'uliveto sono stati studiati gli effetti del biochar unicamente sulle caratteristiche chimico fisiche e microbiologiche del suolo.

Pertanto, all'interno di ciascuna parcella sono stati prelevati 4 campioni elementari, successivamente riuniti ed omogeneizzati, formando un unico campione globale, dal quale è stata prelevata un'aliquota destinata alle analisi microbiologiche.

Caratterizzazione chimico fisica del suolo

I metodi utilizzati per la determinazione di CSC, Ptot e Pdisp, Ntot, alcalinità (solo per campioni a pH>7) e la distribuzione granulometrica sono quelli già descritti per il biochar.

Di seguito si riportano immagini relative ad alcune fasi analitiche di tali determinazioni (figure 13 e 14)



Figura: 13. Fasi dell'analisi per la determinazione del fosforo totale. A sinistra: mineralizzazione e filtrazione del campione; a destra: neutralizzazione e aggiunta del reagente solfomolibdico.



Fig. 14 Frazioni di suolo a diversa granulometria

Il pH è stato determinato per via potenziometrica secondo il metodo di Conyers e Davey (1988).

La conduttività elettrica è stata misurata secondo il metodo di Rhoades (1996). Il carbonio organico è stato analizzato con il metodo di Black e Walkley (1934), basato sull'ossidazione incompleta del carbonio e la successiva titolazione mediante sale di Mohr (figura 15).



Figura 15: Fasi dell'analisi per la determinazione del contenuto di carbonio organico. A sinistra: ossidazione mediante aggiunta di bicromato di potassio; a destra: titolazione con soluzione di ferro ammonio solfato.

Per quanto riguarda le determinazioni aggiuntive effettuate sul terreno della vigna, le differenti forme di azoto minerale disponibile sono state determinate mediante elettrodi iono selettivi (Greenberg et al., 1985).

Il contenuto di acqua disponibile (AWC) è stato misurato, su campioni prelevati a 5-10 cm e 15-20 cm di profondità.

I campioni appartenenti allo stesso trattamento e alla stessa profondità sono stati riuniti ed omogeneizzati, ottenendo un totale di 8 campioni (2 per ciascun trattamento, a ciascuna profondità).

I valori di AWC, sono stati calcolati come differenza tra contenuto d'acqua misurato alla capacità di campo (pressione pari a -0.33 MPa) e al punto di appassimento (-15 MPa), moltiplicata per il valore della densità apparente, misurata gravimetricamente.

Caratterizzazione microbiologica del suolo

Il terreno è stato caratterizzato dal punto di vista microbiologico attraverso la determinazione dell'abbondanza microbica e dell'attività enzimatica.

Mediante la prima è stata determinata, tramite la tecnica della conta su piastra, la concentrazione in massa di batteri, funghi e sporigeni.

Attraverso l'attività enzimatica, determinata mediante saggio enzimatico API ZYM si è cercato di individuare eventuali variazioni della composizione della comunità microbica.

Sul terreno della vigna tale aspetto è stato ulteriormente approfondito mediante la tecnica PCR_DGGE.

Per quanto riguarda la conta su piastra dei batteri aerobi, l'analisi è stata condotta mediante incubazione del campione, portato precedentemente in sospensione e successivamente inoculato su piastre contenenti agar standard ((Difco Bekton Dikson, Milano, Italy), a 55 °C per 48 h; gli eumiceti sono stati analizzati su piastre contenenti agar malto (Difco) con aggiunta di rosa bengala (33 mg l-1) e tetraciclina (100 ml l-1), incubate a 28 °C per 72 h; i batteri aerobici sporigeni sono stati analizzati dopo trattamento del campione per 10 min a 80 °C, successivamente sospeso e inoculato su piastre di nutrient agar (Difco), incubate a 28 °C for 24-48 h, secondo il metodo descritto da Alfano et al., (2011).

Le analisi, basate sulle letture delle UFC, sono state effettuate in triplicato. Tutti i risultati sono espressi come log UFC/g di peso secco, determinato dopo aver posto il campione in stufa a 105 °C per 48 h.

L'attività enzimatica dei substrati è stata determinata usando il sistema API ZYM™ (bioMérieux Italia, Rome, Italy), un test semi quali-quantitativo che consente lo studio rapido e simultaneo di 19 enzimi. Pur non fornendo un dosaggio preciso, questo metodo permette di verificare incrementi e decrementi del numero di enzimi.

Il test è costituito da una serie di pozzetti, contenenti ognuno un particolare substrato, che in presenza di un enzima specifico darà una reazione cromatica, di intensità proporzionale alla quantità di enzima presente.

Questa tecnica prevede la sospensione di 1 g di campione in 9 ml di soluzione fisiologica sterile, contenente tensioattivo Tween 80 (0.2%), per favorire la liberazione dei microrganismi. Ciascuna galleria viene inoculata con 100 µl di sospensione; dopo incubazione a 37 °C per 24 h, i pozzetti sono stati attivati con 30 µl di Reattivo ZYM A e di ZYM B (bioMérieux), ottenendo lo sviluppo del colore dopo 5 min; a ciascun pozzetto è assegnato un valore nell'intervallo da 0 a 5, dove 0 corrisponde ad una reazione negativa, mentre 5 corrisponde al massimo dell'intensità del colore; alle colorazioni intermedie il valore è stato attribuito confrontando il colore con l'apposita scala cromatica di interpretazione del test, riportata sulle istruzioni fornite dal produttore.

I campioni sono stati analizzati in triplicato e sono stati utilizzati i valori medi. I risultati sono stati espressi come attività enzimatica relativa/g di peso secco di substrato, tenendo conto del fattore di diluizione.

Lo studio sulla composizione delle comunità microbiche nel suolo del vigneto è stato approfondito mediante la tecnica PCR-DGGE, che separa e analizza i frammenti di DNA che differiscono nella sequenza nucleotidica. Il DNA totale è stato estratto dai campioni di suolo con il kit commerciale "Power Soil DNA Isolation kit" (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA) e mediante un approccio di Nested PCR è stato amplificato un frammento del gene codificante l'RNA ribosomale 16S, comprensivo delle regioni ipervariabili V3-V4-V5.

La tecnica DGGE consiste in una separazione elettroforetica dei prodotti della PCR in un gel di poliacrilammide, contenente un gradiente di denaturanti chimici (urea e formammide). Nel momento in cui le molecole di DNA incontrano l'appropriato gradiente di denaturante, avviene una parziale denaturazione del doppio filamento, che conduce ad un cambiamento della struttura del DNA e ad una ridotta velocità di migrazione delle molecole.

Quando questo metodo si usa per determinare il profilo microbico, dopo amplificazione del gene target, la miscela complessa di molecole di DNA può essere differenziata. Le bande visibili nel gel della DGGE rappresentano le compomenti del microbiota. Con questo metodo

è possibile non solo delineare il profilo delle popolazioni microbiche, ma anche seguire le loro dinamiche nel tempo (Cocolin et al., 2013).

L'analisi cluster dei profili dei modelli DGGE è stata condotta utilizzando software FPQuest, versione 5.1(BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). La similarità dei profili è stata calcolata in base al coefficiente di Dice con l'algoritmo UPGMA.

Determinazione delle micorrize

Come indicatore quantitativo delle micorrize è stata determinata la glomalina, una proteina specifica costituente della membrana cellulare dei funghi (Upadhyaya e Wright, 1996; Lovelock et al., 2004).

Seguendo la procedura descritta da Upadhyaya e Wright (1996), è stata estratta la glomalina totale mediante cicli di estrazione con sodio citrato a pH 8 a 121 °C per 90 minuti.

Il supernatante di ciascun ciclo è stato riunito in un unico pool e il contenuto di proteina è stato determinato mediante spettrofotometria (UV-1601 Shimadzu), in accordo con il metodo di Bradford, che utilizza la siero albumina bovina come standard.

Analisi dell'apparato radicale

Ciascun campione di suolo è stato posto in un sacchetto di nylon di 300 μm di luce, all'interno di un cilindro di plastica con maglie di 6 mm, e lavato a macchina. Le radici fini ottenute sono state analizzate al microscopio e divise da quelle estranee alle piante di vite.

Queste ultime, in base al colore, tessitura e forma(Persson e Vogt, 1991), sono state suddivise in vive (FRB) e morte (FRN); quindi i frammenti di radice con diametro approssimativo di 0.5 cm sono stati scansionati a 400 dpi di risoluzione.

Successivamente le immagini sono state analizzate per mezzo del sofware WinRhizo Pro V. 2007d, per mezzo del quale è stata misurata la lunghezza (vedi figura 16).

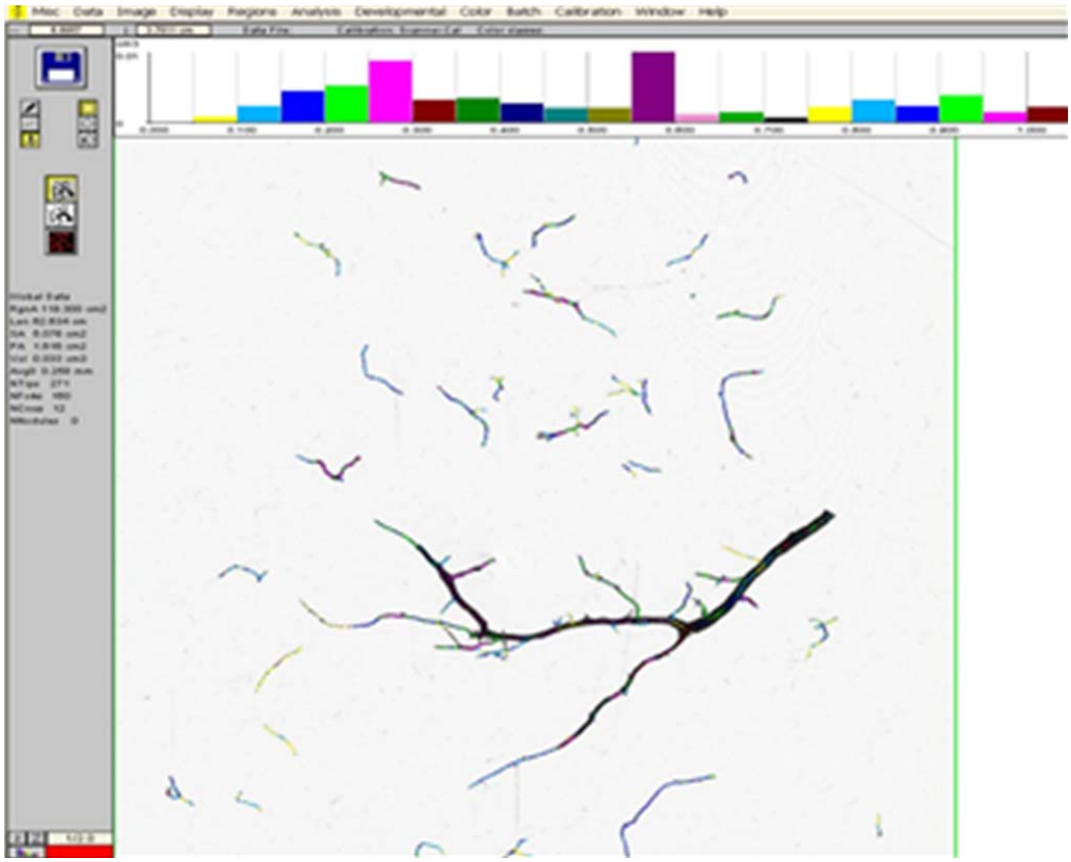


Figura 16: Immagine delle radici fini acquisita mediante WinRhizo Pro V. 2007d.

Quindi si è proceduto alla loro pesata dopo averle seccate in stufa a 60 °C. La produzione annuale delle radici fini è stata calcolata per mezzo della procedura del massimo e minimo che calcola, in caso di modello stagionale multimodale, solo le differenze significative tra minimo e massimo di massa secca sia viva che morta.

La velocità di turnover delle radici fini sono state calcolate dividendo la produzione radicale annuale per il massimo della biomassa.

Quindi sono state calcolate, in relazione alle radici fini, le seguenti caratteristiche: biomassa di radici fini vive (FRB) e morte (FRN), lunghezza delle radici fini vive (FRL) e morte (nFRL), densità di massa secca (FRMD) e densità di lunghezza (FRLD) alle differenti profondità del suolo, produzione di biomassa e velocità del turnover.

Analisi statistica

Per valutare le differenze significative tra le proprietà chimico fisiche e microbiologiche delle parcelle ammendate con biochar e di quelle di controllo, le analisi sono state effettuate in replicato (n=4). I dati ottenuti son stati analizzati mediante T-test a due code ad un livello di significatività del 95 % ($p < 0.05$).

Per l'analisi delle micorrize sono state effettuate 12 repliche per campione (4 per ciascuna di tre parcelle trattate e di 3 di controllo).

Poiché i risultati relativi alle radici non seguivano una distribuzione normale, è stata applicata una statistica non parametrica. Pertanto è stato utilizzato il test di comparazione multipla di Kruskal-Wallis, per confrontare i valori di massa, lungezza e diametro delle radici fini vive nelle diverse date di campionamento. Successivamente è stata effettuata una comparazione a coppie tra le date di campionamento, utilizzato il test di Mann-Whitney.

Esso è stato utilizzato anche per effettuare confronti tra parcelle trattate con biochar e di controllo per date di campionamento e per valori medi annuali.

Il livello di significatività applicato è del 95 %. Per tale analisi è stato utilizzato il software statistico SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

2.2 Risultati relativi alla caratterizzazione del biochar

Il biochar utilizzato rispetta i requisiti dell'European Biochar Certificate (EBC, 2012) e dell'IBI (IBI Standards, 2014) per quanto riguarda il carbonio totale (Ctot) e il carbonio organico (Corg), rispettivamente. Il rapporto molare H:C, prossimo a 0.7, assicura una buona stabilità del Corg. Il valore di conducibilità è superiore rispetto a quelli tipici di un suolo ad elevato contenuto di sali.

Tuttavia il fosforo e l'azoto disponibile rappresenta il 17,7 % e lo 0.3% del fosforo e dell'azoto totale, rispettivamente. Le particelle di dimensioni superiori a 2 mm ammontano all'11.9% della massa totale; quelle inferiori a 2 mm sono così distribuite: il 16.1 % tra 2 mm e 200 µm, il 10.1 % tra 200 µm e 50 µm, il 52.7 % tra 50 µm e 20 µm, il 17.4 % tra 20 µm e 2 µm, e il 3.7 % inferiore a 2 µm. Vedi tabella 1.

PARAMETRO	UNITÀ	VALORE
pH	-	9.7±0.1
CE	dS m^{-1}	7.5±0.4
CSC	cmol kg-1	21.3±0.3
Umidità	g kg^{-1}	62.4±1.2
N_{tot}	g kg^{-1}	9.1±0.2
N_{av}	mg kg^{-1}	30±0.4
P_{tot}	mg kg^{-1}	1221.9±21.3
P_{av}	mg kg^{-1}	217± 3.0
C_{tot}	g kg^{-1}	778.1±0.1
C_{org}	g kg^{-1}	705.6±0.1
H	g kg^{-1}	45.3±0.2
H/C_{org}		0,76
Alkalinity	% $CaCO_3$	18.2±0.6
Texture:		
ø < 2 µm	%	3.7±0.7
2 < ø < 20 µm	%	17.4±1.3
20 < ø < 50 µm	%	52.7±4.1
50 < ø < 200 µm	%	10.1±0.1
200 µm < ø < 2mm	%	16.1±1.3
ø > 2 mm	%	11.9±1.0

Tabella 1: Caratteristiche chimico fisiche del biochar. Ciascun valore rappresenta il valore medio (n=8) ± E.S.

2.3 Risultati relativi allo studio sul suolo della vigna e relativa discussione

In questo studio, effettuato sul suolo di una vigna coltivata con piante Montepulciano, si è voluto studiare gli effetti del biochar, applicato ad un dosaggio di 10 t/ha, sulle caratteristiche chimico fisiche del suolo e della rizosfera, in particolar modo sulle radici, sulle micorrize arbuscolari, sulla biomassa microbica e relativa attività enzimatica.

Inoltre, rispetto alle altre sperimentazioni effettuate in campo, nella sperimentazione sul vigneto sono stati approfonditi alcuni aspetti relativi alle proprietà chimico-fisiche, quali il contenuto di acqua e di azoto disponibile; per quanto riguarda lo studio sull'apparato radicale, oltre alla biomassa, sono stati studiati la lunghezza e il diametro delle radici e la loro variazione stagionale; infine sono stati calcolati la produzione annua ed il turnover delle radici fine; lo studio sull'effetto del biochar sulla composizione microbica ha previsto, oltre alla conta batterica e al saggio enzimatico API ZYM, anche analisi qualitative con la tecnica PCR e DGGE.

I risultati ottenuti nell'ambito di questa sperimentazione, relativamente agli effetti del biochar sulla componente fisico-chimica del suolo, sulle radici e sulle micorrize sono riportati e discussi nell'articolo di seguito riportato ed allegato alla presente tesi:

Amendola, C., Montagnoli A., Terzaghi, M., Trupiano, D., Oliva, F., Baronti, S., Miglietta, F., Chiatante, D., Scippa, G.S., 2017. Short-term effects of biochar on grapevine fine root dynamics and arbuscular mycorrhizae production. Agriculture, Ecosystems and Environment 239, 236–245.

I risultati delle analisi microbiologiche sono riportati e discussi nei paragrafi che seguono.

Agriculture, Ecosystems and Environment 239 (2017) 236–245

Contents lists available at ScienceDirect

Agriculture, Ecosystems and Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/agee

Short-term effects of biochar on grapevine fine root dynamics and arbuscular mycorrhizae production

C. Amendola[a], A. Montagnoli[b,*], M. Terzaghi[b], D. Trupiano[a], F. Oliva[a], S. Baronti[c], F. Miglietta[c,d,e], D. Chiatante[b], G.S. Scippa[a]

[a] University of Molise, Pesche, Italy
[b] University of Insubria, Varese, Italy
[c] Institute of Biometeorology, National Research Council (IBIMET-CNR), Firenze, Italy
[d] Foxlab Joint CNR-FEM Initiative, Via E. Mach 1, 38010 San Michele all'Adige, Trento, Italy
[e] Ecole Polytechnique de Lausanne, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 July 2016
Received in revised form 18 January 2017
Accepted 19 January 2017
Available online xxx

Keywords:
Biochar
Vitis vinifera L.
Fine root dynamics
Fine root diameter
Arbuscular mycorrhiza

ABSTRACT

Application of biochar to the soil is globally recognised as a means to improve soil structure and fertility, increase carbon sequestration, enhance crop production and mitigate climate change. However, although the fine root system is fundamental for plant growth, crop productivity, carbon and nutrient cycling, little is known about the effect of biochar on plant fine roots. This study, conducted in a Montepulciano (*Vitis vinifera* L.) vineyard, was aimed at investigating the impact of biochar application (at the rate of 10 t ha $^{-1}$) on soil chemical and physical properties, fine root dynamics and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) production during a one-year sampling period. To this aim, seasonal variation of fine root mass, length and diameter was measured by the sequential coring technique, whereas fine root annual production was calculated by minimum-maximum procedure and turnover rate of live roots by maximum standing biomass. For AMF annual production, in-growth mesh bags were used to measure glomalin as quantitative indicator of mycorrhizae presence. Results showed that biochar significantly increased organic carbon (20.7%), available ammonium (84.4%), and available water content of the soil (11.8%), while it also promoted the formation of the large fraction of macro aggregates (ø > 2 mm; 3.1% control; 5.5% treated). Cation exchange capacity, pH, total nitrogen content, and total and available phosphorus content remained unaffected. Immediately after biochar soil amendment, while fine root length remained unchanged, a significant increase in fine root biomass was measured resulting in a higher mean annual biomass (8.56 g m $^{-2}$ control; 13.34 g m $^{-2}$ treated), annual production (8.71 g m $^{-2}$ control; 12.7 g m $^{-2}$ treated) and lifespan (as evidenced by a lower turnover rate; 1.02 yr $^{-1}$ control; 0.95 yr $^{-1}$ treated). Moreover, the increase of fine root biomass resulted to be associated with radial growth since mean fine root diameter was significantly higher in biochar-treated plants (0.56 mm) than in control plants (0.46 mm). Biochar had no significant effect on the annual production of AMF. The results of the present study show that the improvements of soil chemical and physical features due to biochar application have an immediate effect on fine root dynamics and morphology. Furthermore, the increase of fine root biomass is mainly due to radial growth and occurs during the water shortage period, supporting fruit setting and ripening in grapevine plants.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Biochar, a charcoal produced by controlled pyrolysis, has been widely recognised for its potential use to improve soil fertility, sequester carbon (C), mitigate climate change (Lehmann et al., 2006; Lehmann, 2007; Laird, 2008; Sohi et al., 2010) and enhance phytostabilisation of contaminated soils (Brennan et al., 2014; Lomaglio et al., 2016). Indeed, the positive effects of biochar on agricultural productivity have been attributed to: i) the reduction of soil acidity (Yuan et al., 2011; Pereira et al., 2015); ii) the improvement of cation-exchange capacity (CEC) and nutrient availability; iii) the dissolution of organic carbon in low-pH acidic soils (Mukherjee and Zimmerman, 2013); iv) the increase of water

* Corresponding author at: Department of Biotechnology and Life Sciences, University of Insubria, Via Dunant 3, 21100 Varese, Italy.
E-mail address: antonio.montagnoli@uninsubria.it (A. Montagnoli).

http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2017.01.025
0167-8809/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

retention capacity (Downie, 2011; Baronti et al., 2014); and v) the availability of plant water content (Tammeorg et al., 2014). Despite the growing amount of data reported in the literature on the positive effects of biochar on agricultural productivity, plant responses to biochar soil amendments have largely focused on above-ground biomass and crop yields. Biochar has been reported to increase rooting during germination (Vookova and Kormutak, 2001), and to enhance root biomass (Lehmann et al., 2003; Joseph et al., 2010; Makoto et al., 2010) and length (Noguera et al., 2010). However, in most of these cases the analysis of root response to biochar amendment was limited to biomass measurements (Lehmann et al., 2003; Noguera et al., 2010; Prendergast-Miller et al., 2011) and, therefore, the mechanisms controlling root–biochar interactions still remain poorly understood (Lehmann et al., 2011). Roots have important functions in plants, including nutrient and water uptake, anchorage, and mechanical support, and are the first organs to be affected by biochar (Prendergast-Miller et al., 2013). Furthermore, within the plant root system, fine roots are the principal structures involved in water and nutrient acquisition (Mainero et al., 2009; Montagnoli et al., 2012a,b, 2014; McCormack et al., 2015; Terzaghi et al., 2016). Fine root lifespan has important implications for individual plant growth, crop productivity, plant-environment interactions, and belowground carbon (C) and nutrient cycling (Godbold et al., 2003; Montagnoli et al., 2010; Di Iorio et al., 2013; Madhu and Hatfield 2013a,b; Terzaghi et al., 2013; McCormack and Guo, 2014). Indeed, Jackson et al. (1997) estimated that as much as 33% of global annual net primary productivity in terrestrial ecosystems is devoted to fine root production, and the growth and maintenance of fine roots may use up to 50% of the daily-produced photosynthate in crop plants (Lambers, 1987).

It has been proposed that biochar may affect root growth and plant performance through two mechanisms: i) as a direct nutrient source and ii) by enhancing nutrient availability (Lehmann et al., 2011). In a recent investigation, Prendergast-Miller et al. (2013) showed that biochar controls plant root nutrient acquisition in rhizobox-grown spring barley (*Hordeum vulgare* L.), both directly as a nutrient source and indirectly by altering soil nutrient content. Similarly, again in a rhizobox experiment, Reibe et al. (2015) found that nutrients released from different kinds of biochar might affect root morphology of spring wheat. Furthermore, different types of chars had different effects on root and shoot growth and soil changes, depending on the feedstock, the production process and the amount of biochar applied (Bhattacharjya et al., 2015).

Through its effect on nutrient cycles (Steiner et al., 2008) or soil structure (Mummey and Rillig, 2006), biochar has also been shown to create a habitat for beneficial soil microorganisms (Rillig and Thies, 2009), which in turn may improve plant growth (Warnock et al., 2007). However, the effects of biochar on soil biota abundance and composition may differ for different groups of microorganisms (reviewed in Lehmann et al., 2011). Living in symbiosis with plant roots, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) develop an extensive extraradical hyphal network, which plays an important role in plant nutrient uptake (Harrison and van Buuren, 1995; Read and Smith, 1997; Avio and Giovannetti, 2002 promoting plant growth (Schwartz et al., 2006; Compant et al., 2010). In fact, AMF provide their host plants with mineral nutrients receiving photosynthetically-derived carbohydrates in return (Read and Smith, 2008). Thus, the presence of AMF is particularly important in marginal soils, where their contribution to nutrient uptake may be more critical to the plant (Bücking et al., 2014). Glomalin is a wall protein of the AMF mycelium with concentrations in the soil generally ranging from 2 to 14 mg g^{-1} (Pikul et al., 2002) and, therefore, commonly used as a quantitative indicator (Upadhyaya and Wright, 1996; Lovelock et al., 2004). The presence of biochar in the soil seems to have a general positive effect on mycorrhizal fungi (reviewed in Warnock et al., 2007), although negative results have also been reported (Birk et al., 2010; Warnock et al., 2010).

Due to the economic importance of grapevine, over the last years much attention has been paid to the effect of biochar on amended groves. Recent studies revealed that the positive effects of biochar on grape yield and quality are mainly due to: i) the attenuation of water stress (Baronti et al., 2014; Genesio et al., 2015); ii) the improvement of soil chemical and biological fertility and nutrient supply to plants (Glaser et al., 2002; Sohi et al., 2010; Vaccari et al., 2011; Schulz et al., 2013); iii) the enhancement of plant growth and yield (Lehmann and Rondon, 2005; Chan et al., 2007; Major et al., 2010b); and iv) the reduction of greenhouse gas emissions through C sequestration (Van Zwieten et al., 2010; Ippolito et al., 2012; Zhang et al., 2012). Once again, in these studies, the effects of biochar were investigated mainly in terms of changes in soil physical and chemical characteristics, plant yield and biomass production. Indeed, to our knowledge, the influence of biochar on fine root lifespan and on the mutualistic interaction between grapevine roots and AMF (Groot-Obbink and Possingham, 1971; Deal et al., 1972; Menge et al., 1983; Nappi et al., 1985) has not been investigated yet. Studying the impact of biochar on fine root dynamics of perennials plants such as grapevine is fundamental for understanding plant-soil interactions and their consequences for plant growth. Given the above-mentioned effects that biochar can have on soil nutrient and water availability, we hypothesised that changes in resource supply play an immediate role in root dynamics and AMF colonization, thereby further affecting crop production and yield. To test this hypothesis, after assessing the effects of biochar on soil physical-chemical properties, fine root dynamics and AMF production in a vineyard were investigated in a short-term (one-year) time course experiment. The identification of possible relationships between any alterations of soil physical-chemical properties, fine root dynamics and AMF production may further contribute to elucidating the mechanisms of biochar actions.

2. Material and methods

2.1. Experimental site and set up

The field experiment was carried out in a vineyard of the *Valerio Vini* estate (41°32′19.8″N 14°09′34.9″E; 270 m a.s.l.) in the municipality of Monteroduni (Molise, Central Italy). The vineyard (Montepulciano wine grape variety) consists of 24 north-west oriented plant rows (2.5 m spacing), each containing 15-year-old plants (80 cm spacing), not irrigated. During the study period, from May 2014 to May 2015, total rainfall was approximately 1310 mm with an average air temperature of 14 °C (data from the Fornelli (IS) weather station, supplied by the Regione Molise). Soil-milling operations (20 cm depth) were carried out at the beginning of April 2014 as usual management practice. At the beginning of May 2014, biochar was applied at a rate of 10 t ha^{-1} (Van Zwieten et al., 2008; Brandstaka et al., 2010; Ndor et al., 2015). In order to obtain a homogeneous soil application, the biochar was crushed into smaller particles, sieved at 2 mm size and homogeneously broadcasted by hand (Major, 2010a), between plants and within the whole plot area (4 m^2). To avoid biochar loss by wind or water erosion, immediately after spreading biochar on the soil surface, moisture was applied with a Verdigris sprayer (Karer et al., 2013) and biochar was incorporated into the soil with a hand-powered rotary hoe at low rotation speed (10 cm depth; Karer et al., 2013). Finally, another inter-row soil milling was carried out one year later (April 2015), before the last sampling point. Measurements were carried out in eight plots (four control and four biochar-treated) of 4 m^2 in size, each including three plants displaced on the same row (Fig. 1).

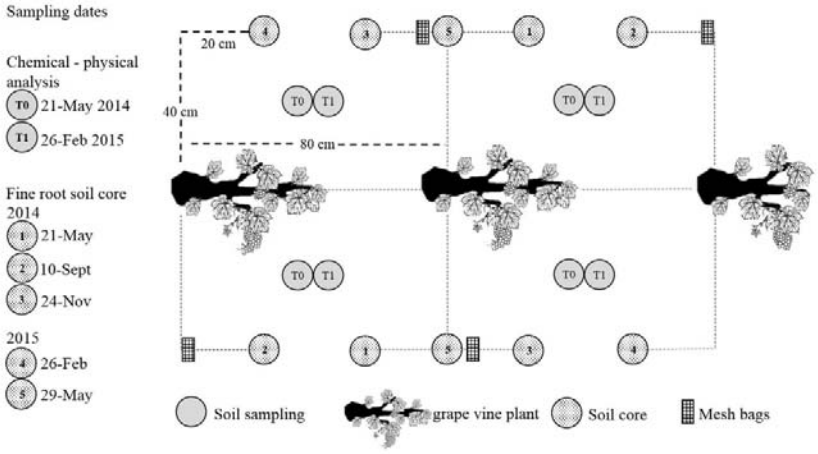


Fig. 1. Sampling scheme for chemical-physical analysis (T0), fine-root soil coring (1) and mesh bags indicating sampling dates.

2.2. Biochar characterization

Biochar used in this study was produced by *Romagna Carbone s. n.c.* (Italy) from orchard pruning biomass through a slow pyrolysis process with an average residence time of 3 h at 500 °C in a kiln of 2.2 m in diameter and holding around 2 ton of feedstock. pH measurements were carried out by potentiometry (pH meter Eutech Instruments pH 700, 2013) according to IBI standards (2014). The electrical conductivity (EC) value was obtained by direct instrumental determination in 1:20 soil:water (w/v) extracts, according to IBI standards (2014). Cation exchange capacity (CEC) was assessed according to Mehlich (1938) using $BaCl_2$. Moisture content was calculated according to the Black method (1965) as the difference in sample weight before and after oven drying at 105 °C to constant weight.

Several parameters can be used to assess carbon stability in biochar. Calvelo Pereira et al. (2011) used the thermo-labile fraction and the oxidation efficiency with potassium permanganate and potassium dichromate, while Enders et al. (2012) used a combination of volatile matter and H:C ratios corrected for inorganic C. In the present work, we referred to IBI standards (2014), which define carbon stability as the molar ratio of hydrogen to organic carbon (maximum 0.7).

Total nitrogen (N_{tot}), total carbon (C_{tot}), organic carbon (C_{org}) and hydrogen (H) contents were determined by dry combustion (Dumas, 1831) using a CHN elemental analyser (Carlo Erba Instruments, Mod 1500, series 2). In the case of C_{org}, combustion was carried out after the complete removal of inorganic C with acid. Available nitrogen (N_{av}) was determined by a modified Kjeldahl procedure using Devarda's alloy (Liao, 1981) as reducing agent to convert $(NO_3)^-$ and $(NO_2)^-$ into $(NH_4)^+$ and subsequent Kjeldahl digestion. Total phosphorus (P_{tot}) was detected by spectrophotometry (UV-1601 Shimadzu) according to the test method described by Bowman (1988). Available phosphorus (P_{av}) was extracted by a $NaHCO_3$ solution at pH 8.5 and evaluated by spectrophotometry according to the Olsen test method (1954). Alkalinity of samples with a pH value greater than 7.0 was determined by titrimetry according to the Higginson and Rayment method (1992). Particle size distribution (hereafter also named soil texture) was quantified by hydrometer analysis through a modification of the Bouyoucos method (1962) (according to Beretta et al., 2014), on samples previously dry-sieved at 2 mm. The fraction <2 mm was treated with H_2O_2 and wet sieved at 200 μm, 50 μm and 20 μm. Measurements of density were carried out by a hydrometer on samples smaller than 20 μm previously dispersed with sodium hexametaphosphate solution. Moreover, in order to quantify the large fraction of macro aggregates, particles that did not pass through the 2 mm sieve were treated with sodium hexametaphosphate solution to disrupt aggregates and, subsequently, the difference in weight before and after wet sieving at 2 mm was measured (Kemper and Koch, 1966).

2.3. Soil characterization

To assess soil chemical-physical properties and the effects of biochar on these characteristics, four soil samples for each plot were collected at two time points (T0, May 2014 and T1, February 2015) (see details in Fig. 1), i.e. before and after treatment with biochar, respectively. Sampling points were located at approximately 40 cm distance from the plants, thus, reasonably far enough to be considered bulk soil even though a few weed roots were found. Soil samples, once freed from roots, were mixed together in one bulk sample, air dried until constant weight, passed through a 2 mm sieve and stored at room temperature in a closed container until analysis.

Methods for the characterization of moisture, CEC, P_{tot} and P_{av}, N_{tot}, alkalinity (only for soil samples with pH > 7.0) and particle size distribution were as described in the previous paragraph. The pH was determined by potentiometry (pH meter Eutech Instruments pH 700, 2013) according to Conyers and Davey (1988). EC was measured by direct instrumental determination according to Rhoades (1996). The different forms of available mineral nitrogen were determined by ion selective electrodes (Greenberg et al., 1985) on soil samples dissolved in deionized water. Organic carbon (C_{org}) was assessed according to the Black and Walkley (1934) test method based on carbon incomplete oxidation. Available water content (AWC) was measured for soil samples collected in February 2015, within each plot, at 5 and 15 cm soil depth. Samples belonging to the same treatment and soil depth were mixed and homogenized for a total of 8 samples (2 for each treatment at each soil depth). Soil water retention curves were obtained according to the method described in Cresswell et al.

(2008). Values of AWC ($m^3 m^{-3}$) were calculated as the difference between water content measured at field capacity (pressure −0.33 MPa) and at wilting point (−15 MPa) multiplied by the gravimetrically determined bulk density.

2.4. Mycorrhiza measurements

For arbuscular-mycorrhizal fungi (AMF) analysis, in-growth nylon mesh bags were prepared (Wallander et al., 2001; Lovelock et al., 2004) with 40 μm pore size and 25 cc capacity. Soil was collected from biochar-treated and control plots, air dried, sieved (<1 mm) to eliminate plant material and fine roots, sterilized by autoclaving and filled into mesh bags. Within each plot four mesh bags were placed in the ground at 20 cm depth on 10 June 2014 and harvested on 30 June 2015 (according to the sampling scheme reported in Fig. 1). Due to its AM fungus specificity, glomalin was used as a quantitative indicator of mycorrhizae presence (Upadhyaya and Wright, 1996; Lovelock et al., 2004). Glomalin is composed of two fractions, which differ in the ease of extraction: easily extractable glomalin (EEG) and total glomalin (TG), which requires more drastic extraction conditions. Because the distinction between these two fractions is beyond the scope of this study, we proceeded directly to the quantification of TG. Following the procedure described by Upadhyaya and Wright (1996), the extraction was carried out in 50 mM sodium citrate, pH 8.0 at 121 °C with five extraction cycles of 90 min each. The supernatant of each extraction cycle was collected in a single pool and the protein content was determined by spectrophotometric reading (UV-1601 Shimadzu) according to the Bradford method using bovine serum albumin as a standard.

2.5. Fine root measurements

The soil core sampling method (Persson and Vogt, 1991) was used to quantify fine root mass (<2 mm in diameter) during the 2014–2015 growing season. Within each of the 8 plots (4 control and 4 biochar-treated) at each sampling date, two soil cores (4 cm diameter, 40 cm deep) were collected using a motor-driven portable core sampler (adapted from Alley and Ponder, 1997) (Fig. 1). To investigate the kinetics of biomass and necromass, soil samples were collected on five dates between 21 May 2014 and 29 May 2015. Samples were stored in plastic bags at 4 °C until further processed. Each soil sample was placed in a nylon bag (300-μm mesh), contained in a plastic cylinder (6-mm mesh), and washed automatically using a washing machine (adapted from Benjamin and Nielsen, 2004). Fine roots were examined under the microscope and divided into two groups: grapevine and other species. Fine roots from grapevine were classified *live* [hereafter termed fine root biomass (FRB)] or *dead* [hereafter termed fine root necromass (FRN)] depending on their colour, texture and shape (Persson and Vogt, 1991). After selection, grapevine root fragments were first roughly grouped by calliper method in half-millimetre-diameter classes and scanned at a resolution of 400 dpi with a calibrated flatbed scanner coupled to a lighting system for image acquisition (Epson Expression 10000 XL). Successively, images were analysed by WinRhizo Pro V. 2007d (Regent Instruments Inc. Quebec). After fine root length (FRL) measurement, grapevine live and dead fine root samples were oven-dried separately and weighed. Annual fine root production was estimated using the minimum–maximum method procedure. This method calculates, and sums in case of a multimodal seasonal pattern, only significant differences between seasonal minimum and maximum fine root dry mass (live mass plus necromass) (Edwards and Harris, 1977; Mc Claugherty et al., 1982; Hertel and Leuschner, 2002). Fine root turnover rates of FRB were calculated as annual root production divided by maximum standing biomass (Gill and Jackson, 2000; Godbold et al., 2003). The following fine root traits were determined: (1) mean live dry mass (FRB – $g m^{-2}$) and dead dry mass (FRN – $g m^{-2}$); (2) mean live length (FRL – $m m^{-2}$) and dead length (nFRL – $m–m^{-2}$); (3) dry mass density (FRMD – $mg cm^{-3}$) and length density (FRLD – cm^{-3}) at different soil depths; (4) seasonal pattern of the above mentioned traits; and (5) annual production and turnover rate of live mass.

FRB = Fine root biomass (live; $g m^{-2}$)
FRN = Fine root necromass (dead; $g m^{-2}$)
FRL = Fine root length (live; $cm m^{-2}$)
nFRL = Fine root length of necromass (dead; $cm m^{-2}$)
FRP = Fine root annual production ($g m^{-2}$)
FRTR = Fine root turnover rate (yr^{-1})

2.6. Statistical analysis

To evaluate significant differences between soil chemical-physical properties of biochar-treated and control plots, a randomized design with four replicates (one at each of four plots) was set up. Data obtained were analysed with a two-tailed T-test with a significance level of 95% ($p < 0.05$). The same applies to glomalin data for which 12 replicates (four at each of the three treated and control plots) were carried out. The root data did not meet a normal distribution, neither when square-root or log-transformed. Therefore, non-parametric statistics were applied. The Kruskal-Wallis multiple-comparison test was used to compare root biomass, root length and live root diameter measurements among sampling dates. The Mann-Whitney *U* test was applied as post hoc test for pairwise comparison among sampling dates. It was also applied to compare control and biochar-treated plots for sampling dates and for mean annual values. Analyses of non-parametric methods were applied at a 95% significance level. Statistical analysis was carried out using statistical software package SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Biochar characteristics

The biochar tested was found to meet European Biochar Certificate (EBC, 2012) and IBI-Standard (2014) requirements with regard to C_{tot} and C_{org} content, respectively. Its C:H value, close to 0.7, ensures a good stability to the organic carbon. The conductivity value showed that the biochar used has a higher salt content than soil. Moreover, available phosphorus and nitrogen represented 17.7% and 0.3% of total phosphorus and nitrogen, respectively (Table 1). Particles larger than 2 mm accounted for 11.9% of the total mass. Particles smaller than 2 mm were distributed as follows: 16.1% between 2 mm and 200 μm, 10.1% between 200 μm and 50 μm, 52.7% between 50 μm and 20 μm, 17.4% between 20 μm and 2 μm and 3.7% smaller than 2 μm (Table 1).

3.2. Soil characteristics

The soil samples analysed had the typical characteristics of a non-saline soil, with a clay texture as obtained by the USDA texture calculator[1], neutral pH (USDA, 2005) and insufficient organic carbon content in relation to clay content (Soltner, 1988). Both total nitrogen and ammonium-nitrogen concentration values were characteristic of a medium soil (Horneck et al., 2011; Giardini, 2002). No interpretation was given to the nitrate value, due to its high variability, influenced by seasonal meteorological conditions

[1] http://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/survey/?cid=nrcs142p2_0541.

Table 1
Biochar chemical-physical characteristics. Each value represents the mean ($n = 8$) ± 1 SE.

parameter	Unit	value
pH	–	9.7 ± 0.1
EC	dS m^{-1}	7.5 ± 0.4
CEC	cmol kg^{-1}	21.3 ± 0.3
Moisture	g kg^{-1}	62.4 ± 1.2
N_{tot}	g kg^{-1}	9.1 ± 0.2
N_{av}	mg kg^{-1}	30 ± 0.4
P_{tot}	mg kg^{-1}	1221.9 ± 21.3
P_{av}	mg kg^{-1}	217 ± 3.0
C_{tot}	g kg^{-1}	778.1 ± 0.1
C_{org}	g kg^{-1}	705.6 ± 0.1
H	g kg^{-1}	45.3 ± 0.2
H/C_{org}		0,76
Alkalinity	% $CaCO_3$	18.2 ± 0.6
Particle size distribution:		
ø < 2 μm	%	3.7 ± 0.7
2 < ø < 20 μm	%	17.4 ± 1.3
20 < ø < 50 μm	%	52.7 ± 4.1
50 < ø < 200 μm	%	10.1 ± 0.1
200 μm < ø < 2 mm	%	16.1 ± 1.3
ø > 2 mm	%	11.9 ± 1.0

and fertilization practices (Table 2). Available phosphorus, considered in relation to the cation exchange capacity, was below the threshold of sufficiency (see Control column in Table 2). Results obtained from the analysis of biochar-treated soil revealed that pH value, CEC, total nitrogen, available nitrogen in the nitrate form $(NO_3)^-$-N, total phosphorus and available phosphorus remained unaffected. Differently, C_{org} content and available nitrogen in the ammonium form, $(NH_4)^+$-N, significantly increased (20.7%, $p < 0.05$ and 84.4% $p < 0.05$, respectively) in treated plots when compared to untreated control plots (see Biochar column in Table 2).

In both treated and control plots, AWC did not show significant differences between the two soil depths (0–10 cm and 10–20 cm) (Fig. 2). However, when the AWC values of amended and control plots were compared (Fig. 2), a significant difference was detected (11%; $p < 0.05$) independently of the soil depth. Finally, a significant increase (77.4%; $p < 0.05$) in the particle size fraction greater than 2 mm was observed in treated plots compared to the control (Table 2).

Table 2
Chemical-physical analysis performed on soil samples of control and biochar-treated plots at T1. Each value represents the mean ($n = 8$) ± 1 SE. Means in bold are significantly different ($p < 0.05$).

Parameter	Unit	Control	Biochar
pH	pH	7.0 ± 0.04	7.1 ± 0.1
EC	ds m^{-1}	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2
Moisture	g kg^{-1}	42.4 ± 4.4	39.3 ± 0.6
Ashes	%	90.1 ± 0.5	90.0 ± 0.3
N_{tot}	g kg^{-1}	1.1 ± 0.03	1.2 ± 0.2
N_{av} $(NH_4)^+$-N	mg kg^{-1}	**9.0 ± 0.6**	**16.6 ± 0.8**
N_{av} $(NO_3)^-$-N	mg kg^{-1}	7.3 ± 0.3	7.5 ± 0.2
P_{tot}	mg kg^{-1}	212.6 ± 11.0	233.5 ± 6.5
P_{av}	mg kg^{-1}	<12	<12
C_{org}	g kg^{-1}	**11.6 ± 0.3**	**14.0 ± 0.6**
CEC	cmol kg^{-1}	16.6 ± 0.2	16.5 ± 0.3
Alkalinity	% $CaCO_3$		7.9 ± 0.7
Particle size distribution:			
ø < 2 μm	%	48.1 ± 0.7	47.4 ± 0.5
2 μm < ø < 20 μm	%	16.3 ± 1.0	16.3 ± 1.4
20 μm < ø < 50 μm	%	22.5 ± 1.3	21.7 ± 1.9
50 μm < ø < 200 μm	%	5.8 ± 0.4	6.8 ± 0.1
200 μm < ø < 2 mm	%	7.3 ± 0.7	7.8 ± 0.3
ø > 2 mm	%	**3.1 ± 0.3**	**5.5 ± 0.2**

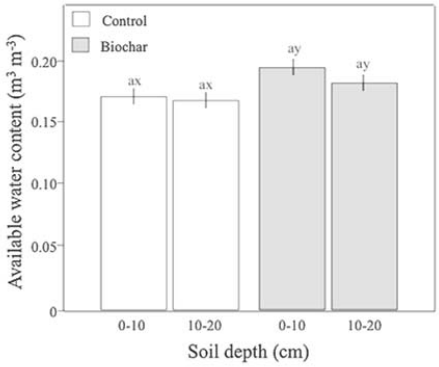


Fig. 2. Available Water Content (AWC) (open box □) and biochar-treated (filled box ▭) plots at two soil depths (0–10 and 10–20 cm). Soil moisture data are means ($n = 8$) ± 1 SE. Letters *a* and *b* indicate significant differences ($p < 0.05$) between the two soil depths within control and treatment. Letters *x* and *y* indicate significant differences ($p < 0.05$) between control and treatment within the soil depth.

3.3. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and fine root characterisation

Total extractable glomalin (TG) analysis showed that, over a time period of one year, no significant difference in the amount of AMF was found between biochar-treated and control plots (Fig. 3), which showed values of 0.9 and 1.0 mg g^{-1}, respectively.

Fine root biomass (FRB) of treated plots showed an increase 112 days after biochar application (10 September 2014; Fig. 4a). At the same sampling point, fine roots of control plots showed an opposite trend with a slight decrease in FRB. At the third sampling point (24 November 2014), FRB showed a slight increase in both control and treated plots (Fig. 4a). Afterwards, FRB of control plots continued to increase (26 February 2015), while fine roots of treated plots showed a slight but not significant decrease (Fig. 4a). At the last sampling point (29 May 2015), right after the milling operation, FRB significantly decreased in both control and treated grapevine plots (Fig. 4a). Fine root necromass (FRN) showed the highest values at the first and last sampling points, right after the milling operations. Throughout the sampling period from September 2014 to February 2015, FRN remained very low compared to FRB and did not show any significant differences between control

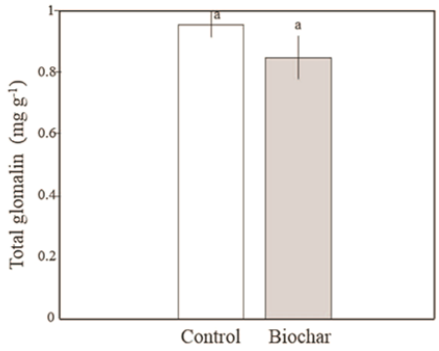


Fig. 3. Mean values of total glomalin (TG; mg g^{-1}) in control (open box □) and biochar-treated (filled box ▭) plots. Each value represents the mean ($n = 8$) ± 1 SE. Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

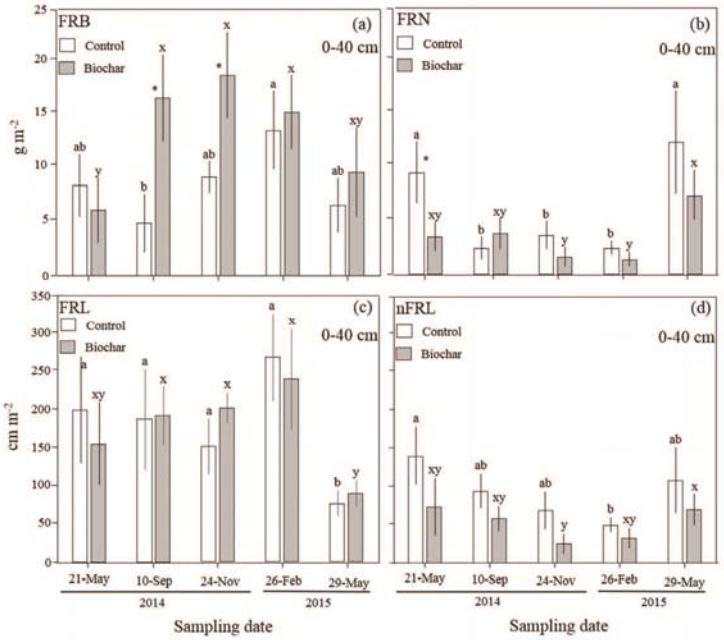


Fig. 4. Seasonal variation of live (FRB; a) and dead (FRN; b) fine root mass (g m^{-2}), and live (FRL; c) and dead (nFRL; d) fine root length (m m^{-2}) in control (open box □) and biochar-treated (filled box ▩) plots. Data refer to each sampling date represented as mean ($n = 8$) ± 1 SE. Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) between sampling points within the same treatment: letters *a* and *b* for control plots, letters *x* and *y* for treated plots. Asterisks (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) between control and treated plots at the same sampling point.

and treated plots (Fig. 4b). Unlike FRB, the value of fine root length (FRL) did not show any significant differences throughout the experiment or between control and treated plots (Fig. 4c). Fine root length of necromass (nFRL) values, as in the case of FRN, were highest at the first and last sampling points, right after the milling operations (Fig. 4d). At the sampling points between September 2014 to February 2015, nFRL remained very low while FRL showed the highest values (Fig. 4d). Mean diameter of the control fine root population (Fig. 5) showed similar values, ranging between 0.40 and 0.50 mm, throughout the whole experiment. In the case of treated plots, mean fine root diameter was significantly higher at both the 10 September and 24 November 2014 sampling points (Fig. 5).

Mean annual fine root biomass (FRB; Table 3) in treated plots (13.34 g m^{-2}) was significantly higher ($p = 0.049$) than in control plots (8.56 g m^{-2}), whereas mean annual fine root length (FRL; Table 3) did not show significant differences ($p = 0.676$). FRD was significantly higher ($p = 0.037$) in treated plants (0.56 mm) than in control plants (0.46 mm). Similarly, fine root annual production (FRP) in treated plots (12.7 g m^{-2}) resulted higher than those measured in control plots (8.71 g m^{-2}). Finally, fine root lifespan resulted almost one year for control plots (1.02 yr^{-1}) and slightly longer for treated plots (0.95 yr^{-1}).

4. Discussion

An increasing amount of literature has reported studies focused on the effects of biochar amendment on physical and chemical

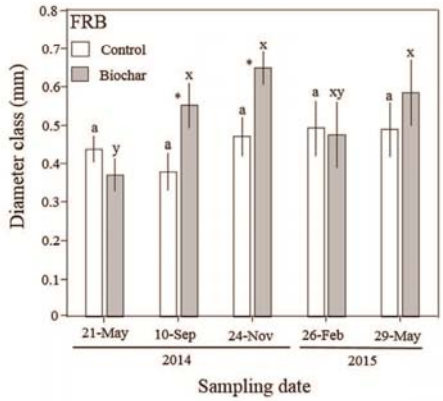


Fig. 5. Seasonal variation of mean diameter size (mm) for fine root biomass in control (open box □) and biochar-treated (filled box ▩) plots. Each value represents the mean ($n = 8$) ± 1 SE. Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) between sampling points within the same treatment: letters *a* and *b* for control plots, letters *x* and *y* for treated plots. Asterisks (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) between control and biochar-treated plots at the same sampling point.

Table 3
Annual mean fine root traits, irrespective of diameter class (d < 0.2 mm).

Parameter	Unit	Control	Biochar	p
FRB	$g\,m^{-2}$	8.56 ± 1.46	13.34 ± 2.35	0.049
FRL	$cm\,m^{-2}$	177 ± 28	176 ± 25	0.676
FRD	mm	0.46 ± 0.02	0.56 ± 0.03	**0.037**
FRP	$g\,m^{-2}$	8.71	12.70	
FRTR	yr^{-1}	1.02	0.95	

Values are the mean (n = 40) ± SE.
FRB (fine root standing biomass), FRL (fine root length), FRD (fine root diameter), FRP (fine root annual production), FRTR (fine root turnover rate). Boldface P values are significant at a probability level of $P < 0.05$ (Mann-Whitney U test).

properties of various soils (reviewed by Ding et al., 2016). All these studies show that the effects of biochar depend on the physical-chemical properties of biochar itself and on the characteristics of the soil to which it is applied. The vineyard soil of the experimental plots in the present study was characterised by neutral pH, clay texture, and low C_{org}, C_{av} and P_{tot}. Our results show that amendment of this soil with an alkaline biochar (pH 9.2), characterised by total nitrogen and CEC values much higher than those of excessive endowed (5 g kg^{-1}) and high-value (>20 cmol kg^{-1}) agricultural soils, respectively (Giardini, 2002), had no effect on pH value, CEC, and total nitrogen and phosphorus content (both total and available). The lack of a biochar effect on the pH of vineyard soil may be attributed to the soil buffering capacity that counteracts pH change and is in line with data reported in the literature showing that biochar amendment caused a significant increase in pH of acidic soil while not altering the pH of neutral or alkaline soil (Atkinson et al., 2010; Biederman and Harpole, 2013; Macdonald et al., 2014). However, biochar significantly increased AWC, C_{org} and the particle size fraction greater than 2 mm in amended soil. The total porosity of biochar may retain water in small pores, thereby increasing AWC (Asai et al., 2009; Baronti et al., 2014). In addition, biochar influences soil aggregation due to its interaction with soil organic matter, minerals and micro-organisms (Verheijen et al., 2010). Furthermore, it is well established that plant roots, through different mechanisms, contribute to improving soil aggregation (Ola et al., 2015 and references therein). Several authors suggested that the increase in soil organic matter content might lead to improved soil aggregation (Kong et al., 2005; Domingo-Olivé et al., 2016; Ma et al., 2016) and in turn higher soil water retention (Verheijen et al., 2010; Abel et al., 2013). Thus, in biochar-amended soil the marked increase in organic carbon content and in fine root biomass reported in the present work may contribute to the higher fraction of macro aggregates (larger than 2 mm) and be responsible for the improvement of AWC as well as macro and micro pore formation. Previous work, conducted in a vineyard in central Italy, reported similar soil–water relation results after biochar application (Baronti et al., 2014).

In the present study, biochar did not affect phosphorus availability, whose value remained under the limit of detection both in amended and untreated soil. The low value of available phosphorus with respect to CEC measured can be attributed to soil adsorption phenomena and, therefore, a negative effect of biochar on nutrient availability as reported in previous experiments on calcareous soil (Chintala et al., 2014) may be excluded. Indeed, on the contrary, nitrogen availability was affected by biochar amendment as evidenced by an increase in the ammonium form, $(NH_4)^+$-N. This increment might be due to biochar's potential to adsorb ammonium through its high carbon content and, therefore, negative charge (Takaya et al., 2016). In addition, while the value of total N remained unchanged, the biochar-induced increase in carbon content leads to a 10% increase in C/N ratio. Despite this increase, the C/N ratio remained within the optimal range for a balance between decomposition and humification processes (Tan, 2005).

Plant nutrient availability is a key factor in the establishment of arbuscular mycorrhizal interactions in grape roots (Trouvelot et al., 2015). In both biochar-amended and untreated soil, glomalin values where lower than those reported in the literature (Wright et al., 1996; Wright and Upadhyaya 1998; Pikul et al., 2002), indicating that no or little symbiosis occurred (Nicolas and Miller, 2003; Lovelock et al., 2004; Nichols and Write, 2004; Rilling 2004; Saidi et al., 2014), which may be attributed to the low level of phosphorus. Indeed, in the AM symbiosis, phosphate is transferred from fungus to plant that constitutes a signal for the transfer of photosynthate from plant to fungus (Harrison et al., 2002). Fitter (2006) suggested that the interruption of that signal, due to the failure of phosphorus transfer from fungus to plant, leads to the end of such symbiosis. An additional factor that may have contributed to the lack of symbiosis is probably related to the soil-milling operation as reported by Nichols and Wright, 2004. Indeed, similarly to what was previously found by these authors, the soil-milling operations during our study, performed as standard agronomic practice, may have damaged the mycorrhizal network, which explains the low values of glomalin observed.

Biochar-induced changes in grapevine fine root characteristics are evident soon after the soil amendment. In fact, after almost four months, FRB had significantly increased in biochar-amended plants. Furthermore, this increase occurred during the summer season (May–September), coinciding with the phase of fruit set and ripening, and remained unchanged until the end of February (dormancy period). According to Bates et al. (2002) and Comas et al. (2005), grapevine fine roots mainly grow during the postharvest period, as was observed in the present study in untreated grapevine plants. These findings highlight that biochar changes the grapevine fine roots seasonal pattern, stimulating fine root growth when plants are most in need of water and nutrient supply. On the other hand, the general FRB decrease observed at the end of the experiment may be attributed to the soil-milling operations.

The increase in fine root biomass (FRB) in biochar-treated plants seems to be determined by the stimulation of radial growth (root diameter FRD) rather than elongation (FRL). The morphological plasticity of roots has been reported in previous studies, especially for the fine root fraction (Bjork et al., 2007; Makita et al., 2011). In a recent work on turkey oak, Montagnoli et al. (2012a) showed that root plasticity is a plant mechanism to overcome drought periods by enhancing soil exploitation for water and nutrients. Indeed, in trees subject to natural water shortage, carbon is invested in lengthening rather than in enlarging fine roots. Recent investigations by Baronti et al. (2014) on grapevine under drought conditions showed a reduction in plant water stress and an increase in photosynthetic activity and soil water content, after two seasons of biochar treatment. However, despite these improvements, the quality of grape production remained unaffected. In the light of this knowledge, we may assert that grapevine plants, when growing in biochar-amended soil characterised by a higher soil water content, optimize the investment of carbon by increasing the mean diameter rather than the length of very fine roots. In a milestone meta-analysis, Gill and Jackson (2000) found that fine root turnover rate decreases with increasing diameter class. In fact, in biochar-treated plants we found a lower turnover rate compared to control plants. Along with these direct and indirect effects, our results draw attention to the biochar-induced improvement of carbon sequestration through the extension of fine root life span. To evaluate the multiple impacts of biochar on plants, soil, and ecosystem services, many authors recommend future studies focused on the comparison of biochar effects in

short- and long-term field experiments (Jones et al., 2012; Zhang et al., 2014).

5. Conclusion

In conclusion, the results presented here highlight that biochar, by improving soil characteristics in terms of water availability, organic carbon and available nitrogen, has an immediate effect on fine root seasonal pattern and lifespan. Furthermore, these effects seem to occur when the plant needs to optimize water and nutrient uptake, i.e. during fruit set and ripening. Our findings stress the need to take into consideration the phenology of perennial plants when studying the effects of biochar.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Molise region (PSR Molise 2007/2013 – Misura 124) through the ProSEEAA project (CUP: D95F14000030007) and in part by grants from the MIUR (PRIN 2008 n. 223), the University of Insubria (FAR) and the EC FP7 Project ZEPHYR-308313. We are grateful to Dr. Rosaria Santamaria for helping with fine root analysis. The authors acknowledge the Centro Funzionale del Servizio per la Protezione Civile of the Molise region for providing weather data.

References

Abel, S., Peters, A., Trinks, S., Schonsky, H., Facklam, M., Wessolek, G., 2013. Impact of biochar and hydrochar addition on water retention and water repellency of sandy soil. Geoderma 202, 183–191.
Alley, D.E., Ponder, F., 1997. Soil Sampler for Rocky Soils Research Note NC-371. USDA Forest Service, North Central Forest Experiment Station St. Paul, MN.
Asai, H., Samson, B.K., Stephan, H.M., Songyikhangsuthor, K., Homma, K., Kiyono, Y., Inoue, Y., Shiraiwa, T., Horie, T., 2009. Biochar amendment techniques for upland rice production in Northern Laos: 1. Soil physical properties, leaf SPAD and grain yield. Field Crop Res. 111, 81–84.
Atkinson, C.J., Fitzgerald, J.D., Hipps, N.A., 2010. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. Plant Soil 337, 1–18.
Avio, L., Giovannetti, M., 2002. Biotechnology of arbuscular mycorrhizas. Mycorrhizas. In: Khachatourians, G.G., Arora, D.K. (Eds.), Applied Mycology and Biotechnology, Vol. 2 Agriculture and Food Production. Elsevier, Amsterdam, pp. 275–310.
Bücking, H., Liepold, E., Ambilwade, P., 2014. The role of the mycorrhizal symbiosis in nutrient uptake of plants and the regulatory mechanisms underlying these transport processes. In: Dahl, N.K., Sahu, S.C. (Eds.), Plant Science. Intech, Janeza Trdine p 107.
Baronti, S., Vaccari, F.P., Miglietta, F., Calzolari, C., Lugato, E., Orlandini, S., Pini, R., Zulian, C., Genesio, L., 2014. Impact of biochar application on plant water relations in *Vitis vinifera* (L.). Eur. J. Agron. 53, 38–44.
Bates, T.R., Dunst, R.M., Joy, P., 2002. Seasonal dry matter, starch and nutrient distribution in concord grapevine roots. Hortic. Sci. 37 (2), 313–316.
Benjamin, J.G., Nielsen, D.C., 2004. A method to separate plant roots from soil and analyze root surface area. Plant Soil 267, 225–234.
Beretta, N., Silbermann, A.V., Paladino, L., Torres, D., Bassahun, D., Musselli, R., Lamohte, A.G., 2014. Soil texture analyses using a hydrometer modification of the Bouyoucos method. Cien. Inv. Agr. 41, 263–271.
Bhattacharjya, S., Chandra, R., Pareek, N., Kiran, R.P., 2015. Raverkar biochar and crop residue application to soil: effect on soil biochemical properties, nutrient availability and yield of rice (*Oryza sativa* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). Arch. Agron. Soil Sci. 61 (8), 1095–1108.
Biederman, L.A., Harpole, W.S., 2013. Biochar and its effects on plant productivity and nutrient cycling: a meta-analysis. GCB Bioenergy 5, 202–214.
Birk, J.J., Teixeira, W.G., Neves, E.G., Glaser, B., 2010. Origin of nutrients in Amazonian Anthrosols as assessed from 5β-stanols. Sixth World Archaeological Congress, Dublin pp.145.
Bjork, R.G., Majdi, M., Klemedtsson, L., Jonsson, L.L., Molau, U., 2007. Long-term warming effects on root morphology, root mass distribution, and microbial activity in two dry tundra plant communities in northern Sweden. New Phytol. 176, 862–873.
Black, I.A., Walkley, A., 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Sci. 37, 29–37.
Black, C.A., 1965. Methods of Soil Analysis: Part I Physical and Mineralogical Properties. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.
Bouyoucos, G.J., 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. Agron. J. 54, 464–465.
Bowman, R.A., 1988. A rapid method to determine total phosphorus in soils. Soil Sci Soc. Am. J. 52, 1301–1304.
Brandstaka, T., Helenius, J., Hovi, J., Simojoki, A., Soinne, H., 2010. Biochar filter: use of biochar in agriculture as soil conditioner. Report for BSAS Commitment, University of Helsinki, Helsinki Finland, pp. 1–22.
Brennan, A., Moreno Jimenez, E., Puschenreiter, M., Alburquerque, J.A., Switzer, C., 2014. Effects of biochar amendment on root traits and contaminant availability of maize plants in a copper and arsenic impacted soil. Plant Soil 379, 351–360.
Calvelo Pereira, R., Kaal, J., Camps Arbestain, M., Pardo Lorenzo, R., Aitkenhead, W., Hedley, M., Macías, F., Hindmarsh, J., Maciá-Agulló, J.A., 2011. Contribution to characterization of biochar to estimate the labile fraction of carbon. Org. Geochem. 42, 1331–1342.
Chan, K.Y., Van Zwieten, L., Meszaros, I., Downie, A., Joseph, S., 2007. Agronomic values of greenwaste biochar as a soil amendment. Aust. J. Soil Res. 45, 629–634.
Chintala, R., Schumacher, T.E., McDonald, L.M., Clay, D.E., Malo, D.D., Papiernik, S.K., Clay, S.A., Julson, J.L., 2014. Phosphorus sorption and availability from biochars and soil/biochar mixtures. Clean Soil Air Water 42, 626–634.
Comas, L.H., Anderson, L.J., Dunst, R.M., Lakso, A.N., Eissenstat, D.M., 2005. Canopy and environmental control of root dynamics in a long-term study of Concord grape. New Phytol. 167, 829–840.
Compant, S., Clément, S., Sessitsch, A., 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biol. Biochem. 42, 669–678.
Conyers, M.K., Davey, B.G., 1988. Observations on some routine methods for soil pH determination. Soil Sci. 145, 29–36.
Cresswell, H.P., Green, T.W., McKenzie, N.J., 2008. The adequacy of pressure plate apparatus for determining soil water retention. Soil Sci. Soc. Am. J. 72, 41–49.
Deal, D.R., Boothroyd, C.W., Mai, W.F., 1972. Replanting of vineyards and its relationship to vesicular-arbuscular mycorrhiza. Phytopathology 62, 172–175.
Di Iorio, A., Montagnoli, A., Terzaghi, M., Scippa, G.S., Chiatante, D., 2013. Effect of tree density on root distribution in *Fagus sylvatica* stands: a semi-automatic digitising device approach to trench wall method. Trees 27, 1503–1513.
Ding, Y., Liu, Y., Li, Z., Tan, X., Huang, X., Zeng, G., Zhou, L., Zheng, B., 2016. Biochar to improve soil fertility. A review. Agron. Sustain. Dev. 36, 1–18.
Domingo-Olivé, F., Bosch-Serra, À.D., Yagüe, M.R., Poch, R.M., Boixadera, J., 2016. Long term application of dairy cattle manure and pig slurry to winter cereals improves soil quality. Nutr. Cycl. Agroecosyst. 104, 39–51.
Downie, A., 2011. Biochar Production and Use: Environmental Risks and Rewards PhD Thesis, School of Materials Sciences and Engineering. The University of New South Wales, Sydney.
Dumas, J.B.A., 1831. Procédés de l'analyse organique. Ann. Chim. Phys. 247, 198–213.
EBC, 2012. European Biochar Certificate – Guidelines for a Sustainable Production of Biochar. . http://www.european-biochar.org/biochar/media/doc/ebc-guidelines.pdf.
Edwards, N.T., Harris, W.F., 1977. Carbon cycling in a mixed deciduous forest floor. Ecology 58, 431–437.
Enders, A., Hanley, K., Whitman, T., Joseph, S., Lehmann, J., 2012. Characterization of biochars to evaluate recalcitrance and agronomic performance. Bioresour. Technol. 114, 644–653.
Fitter, A.H., 2006. What is the link between carbon and phosphorus fluxes in arbuscular mycorrhizas? A null hypothesis for symbiotic function. New Phytol. 172 (1), 3–6.
Genesio, L., Miglietta, F., Baronti, S., Vaccari, F.P., 2015. Biochar increases vineyard productivity without affecting grape quality: results from a four years field experiment in Tuscany. Agric. Ecosyst. Environ. 201, 20–25.
Giardini, L., 2002. Agronomia Generale, Ambientale E Aziendale, patron ed. Bologna.
Gill, R., Jackson, R.B., 2000. Global patterns of root turnover for terrestrial ecosystems. New Phytol. 147, 13–31.
Glaser, B., Lehmann, J., Zech, W., 2002. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal—a review. Biol. Fertil. Soils 35, 219–230.
Godbold, D.L., Fritz, H.W., Jentschke, G., Meesenburg, H., Rademacher, P., 2003. Root turnover and root necromass accumulation of Norway spruce (*Picea abies*) are affected by soil acidity. Tree Physiol. 23, 915–921.
Greenberg, A.E., Trussell, R.R., Clesceri, L.S., 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 16th ed. Amer. Public Health Assn., Washington, D.C.
Groot-Obbink, J., Possingham, J.V., 1971. Endotrophic mycorrhiza and the nutrition of grape vines. Vitis 10, 120–130.
Harrison, M.J., van Buuren, M.L., 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus Glomus versiforme. Nature 378, 626–629.
Harrison, M.J., Dewbre, G.R., Liu, J., 2002. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Cell 14, 2413–2429.
Hertel, D., Leuschner, Ch., 2002. A comparison of four different fine root production estimates with ecosystem carbon balance data in a Fagus-Quercus mixed forest. Plant Soil 239, 237–251.
Higginson, F.R., Rayment, G.E., 1992. Australian Laboratory Handbook of Soil and Water, Chemical Methods, Reed International Books. Australia/Inkata Press, Port Melbourne.
Horneck, D.A., Sullivan, D.M., Owen, J.S., Hart, J.M., 2011. In: Extension Service (Ed.), Soil Test Interpretation Guide. EC 1478. Oregon State University.
IBI, 2014. Standardized Product Definition and Product Testing Guidelines for Biochar That Is Used in Soil. Ibi-STD-2.0. .
Ippolito, J.A., Liard, D.A., Busscher, W.J., 2012. Environmental benefits of biochar. J. Environ. Qual. 41, 967–972.

Jackson, R.B., Mooney, H.A., Schulze, E.D., 1997. A global budget for fine root biomass, surface area, and nutrient contents. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 7362–7366.

Jones, D.L., Rousk, J., Jones, E., DeLuca, T.H., Murphy, D.V., 2012. Biochar-mediated changes in soil quality and plant growth in a three year field trial. Soil Biol. Biochemistry 45, 113–124.

Joseph, S.D., Camps-Arbestain, M., Lin, Y., Munroe, P., Chia, C.H., Hook, J., et al., 2010. An investigation into the reactions of biochar in soil. Aust. J. Soil Res. 48, 501–515.

Karer, J., Wimmer, B., Zehetner, F., Kloss, S., Soja, G., 2013. Biochar application to temperate soils: effects to nutrient uptake and crop yield under field conditions. Agric. Food Sci. 22, 390–403.

Kemper, W.D., Koch, E.J., 1966. Aggregate Stability of Soils from Western USA and Canada USDA Technical Bulletin No.1355. US Government Printing Office, Washington, DC.

Kong, A.Y.Y., Six, J., Bryant, D.C., Denison, R.F., van Kessel, C., 2005. The relationship between carbon input, aggregation, and soil organic carbon stabilization in sustainable cropping systems. Soil Biol. Biochem. 69, 1078–1085.

Laird, D.A., 2008. The charcoal vision: a win-win-win scenario for simultaneously producing bioenergy, permanently sequestering carbon, while improving soil and water quality. Agron. J. 100, 178–181.

Lambers, H., 1987. Growth, respiration, exudation, and symbiotic associations; the fate of carbon translocated to the roots. In: Gregory, P.J., Lake, J.V., Rose, D.A. (Eds.), Root Development and Function. Cambridge University Press, Cambridge, England, pp. 125–145.

Lehmann, J., Rondon, M., et al., 2005. Biochar soil management on highly weathered soils in the humid tropics. In: Uphoff, N. (Ed.), Biological Approaches to Sustainable Soil Systems. CRC Press, Taylor and Francis Group, Florida, pp. 517–530.

Lehmann, J., Da Silva Jr., J.P., Steiner, C., Nehls, T., Zech, W., Glaser, B., 2003. Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. Plant Soil 249, 343–357.

Lehmann, J., Gaunt, J., Rondon, M., 2006. Biochar sequestration in terrestrial ecosystems: a review. Mitig. Adapt. Strategy Global Change 11, 403–427.

Lehmann, J., Rillig, M.C., Thies, J., Masiello, C.A., Hockaday, W.C., Crowley, D., 2011. Biochar effects on soil biota – a review. Soil Biol. Biochem. 43, 1812–1836.

Lehmann, J., 2007. A handful of carbon. Nature 447, 143–144.

Liao, C.F.H., 1981. Devarda's alloy method for total nitrogen determination. Soil Sci. Soc. Am. J. 45 (5), 852–855.

Lomaglio, T., Hattab-Hambli, N., Bret, A., Miard, F., Trupiano, D., Scippa, G.S., Motelica-Heino, M., Bourgerie, S., Morabito, D., 2016. Effect of biochar amendments on the mobility and (bio) availability of As, Sb and Pb in a contaminated mine technosol. Gexplo (in press).

Lovelock, C.E., Wright, S.F., Nichols, K.A., 2004. Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal groth: an example from a tropical rain forest soil. Soil Biol. Biochem. 36, 1009–1012.

Ma, N., Zhang, L., Zhang, Y., Yang, L., Yu, C., Yin, G., et al., 2016. Biochar improves soil aggregate stability and water availability in a mollisol after three years of field application. PLoS One 11 (5), e0154091. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0154091.

Macdonald, L.M., Farrell, M., Van Zwieten, L., Krull, E.S., 2014. Plant growth responses to biochar addition: an Australian soils perspective. Biol. Fertil. Soils 50 (7), 1035–1045.

Madhu, M., Hatfield, J.L., 2013a. Dynamics of plant root growth under increased atmospheric carbon dioxide. Agron. J. 105 (3), 657–669.

Madhu, M., Hatfield, J.L., 2013b. Dynamics of plant root growth under increased atmospheric carbon dioxide. Agron. J. 105, 657–669.

Mainero, R., Kazda, M., Häberle, K.H., Nikolova, P.S., Matyssek, R., 2009. Fine root dynamics of mature European beech (*Fagus sylvatica* L.) as influenced by elevated ozone concentrations. Environ. Pollut. 157, 2638–2644.

Major, J., Rondon, M., Molina, D., Riha, S.J., Lehmann, J., 2010b. Maize yield and nutrition during four years after biochar application to a Colombian savanna Oxisol. Plant Soil 333, 117–128.

Major, J., 2010a. Guidelines on practical aspects of biochar application to field soil in various soil management systems. Int. Biochar Initiative 1–23.

Makita, N., Hirano, Y., Mizoguchi, T., Kominami, Y., Dannoura, M., Ishii, H., Finer, L., Kanazawa, Y., 2011. Very fine roots respond to soil depth: biomass allocation, morphology, and physiology in a broad-leaved temperate forest. Ecol. Res. 26, 95–104.

Makoto, K., Tamai, Y., Kim, Y.S., Koike, T., 2010. Buried charcoal layer and ectomycorrhizae cooperatively promote the growth of *Larix gmelinii* seedlings. Plant Soil 327 (143), 152.

Mc Claugherty, C.A., Aber, J.D., Melillo, J.M., 1982. The role of fine roots in the organic matter and nitrogen budgets of two forested ecosystems. Ecology 63, 1481–1490.

McCormack, M.L., Guo, D., 2014. Impacts of environmental factors on fine root lifespan. Front. Plant Sci. 5, 205.

McCormack, L., Dickie, I.A., Eissenstat, D.M., et al., 2015. Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. New Phytol. 207, 505–518.

Mehlich, A., 1938. Use of triethanolamine acetate-barium hydroxide buffer for the determination of some base exchange properties and lime requirement of soil. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 29, 374–378.

Menge, J.A., Raski, D.J., Lider, L.A., Johnson, E.L.V., Jones, N.O., Kissler, J.J., Hemstreet, C.L., 1983. Interactions between mycorrhizal fungi, soil fumigation, and growth of grapes in California. Am. J. Enol. Vitic. 34, 117–121.

Montagnoli, A., Di Iorio, A., Ceriani, R., Scippa, G.S., Chiatante, D., 2010. Root seasonal pattern spatial distribution, and C:N ratio of matgrass pasture (*Nardus stricta* L.) in the Lombardy Prealps. Plant Biosyst. 144, 463–470.

Montagnoli, A., Terzaghi, M., Di Iorio, A., Scippa, G.S., Chiatante, D., 2012a. Fine-root morphological and growth traits in a Turkey-oak stand in relation to seasonal changes in soil moisture in the Southern Apennines, Italy. Ecol. Res. 27, 1015–1025.

Montagnoli, A., Terzaghi, M., Di Iorio, A., Scippa, G.S., Chiatante, D., 2012b. Fine-root seasonal pattern: production and turnover rate of European beech (*Fagus sylvatica* L.) stands in Italy Prealps: possible implications of coppice conversion to high forest. Plant Biosyst. 146, 1012–1022.

Montagnoli, A., Di Iorio, A., Terzaghi, M., Trupiano, D., Scippa, G.S., Chiatante, D., 2014. Influence of soil temperature and water content on fine-root seasonal growth of European beech natural forest in Southern Alps, Italy. Eur. J. For. Res. 133, 957–968 (-12).

Mukherjee, A., Zimmerman, A.R., 2013. Organic carbon and nutrient release from a range of laboratory-produced biochars and biochar–soil mixtures. Geoderma 193, 122–130.

Mummey, D.L., Rillig, M.C., 2006. Mycorrhizas and soil structure. New Phytol. 171, 41–53.

Nappi, P., Jodice, R., Luzzati, A., Corino, L., 1985. Grapevine root system and VA mycorrhizae in some soils of Piedmont (Italy). Plant Soil 85, 205–210.

Ndor, E., Dauda, S., Azagaku, E., 2015. Response of maize varieties (*Zea mays*) to biochar amended soil in Lafia, Nigeria. Am. J. Exp. Agric. 5 (6), 525–531.

Nichols, K.A., Wright, S.F., 2004. Contributions of fungi to soil organic matter in agroecosystems. In: Magdoff, F., Weil, R.R. (Eds.), Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture. CRC Press, Florida, pp. 179–198.

Noguera, D., Rondon, M., Laossi, K.R., Hoyos, V., Lavelle, P., de Carvalho, M.H.C., Barot, S., 2010. Contrasted effect of biochar and earthworms on rice growth and resource allocation in different soils. Soil Biol. Biochem. 42, 1017–1027.

Ola, A., Dodd, I.C., Quinton, J.N., 2015. Can we manipulate root system architecture to control soil erosion? Soil 1, 603–612.

Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S., Dean, L.A., 1954. Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate. USDA Circular 939. U.S. Gov. Print. Office, Washington, D.C.

Pereira, R.C., Kaal, J., Arbestain, M.C., Lorenzo, R.P., Aitkenhead, W., Hedley, M., Macía-Agulló, J.A., 2015. Biochar alters nitrogen transformations but has minimal effects on nitrous oxide emissions in an organically managed lettuce mesocosm. Biol. Fertil. Soils 51, 573–582.

Persson, H., Vogt, K.A., 1991. Measuring growth and development of roots. In: Lassoie, J.P., Hinckley, T.M. (Eds.), Techniques and Approaches in Forest Tree Ecophysiology. CRC press Inc., Boca Raton, Fl., pp. 477–501.

Pikul, J.L., Wright, S.F., Jawson, L., Ellsbury, M.M., 2002. Soil Carbon and Glomalin Concentration Under Tillage Management in Eastern South Dakota. Soil/water research South Dakota State University Progress Report.

Prendergast-Miller, M.T., Duvall, M., Sohi, S.P., 2011. Localisation of nitrate in the rhizosphere of biochar-amended soils. Soil Biol. Biochem. 43, 2243–2246.

Prendergast-Miller, M.T., Duvall, M., Sohi, S.P., 2013. Biochar-root interactions are mediated by biochar nutrient content and biochar impacts on soil nutrient availability. Eur. J. Soil Sci. 65, 173–185.

Read, D.J., Smith, S.E., 1997. Mycorrhizal Symbiosis, 2nd ed. Academic Press, London.

Read, D.J., Smith, S.E., 2008. Mycorrhizal Symbiosis, 3rd ed. Academic Press, Amsterdam.

Reibe, K., Roß, C.L., Ellmer, F., 2015. Hydro-/Biochar application to sandy soils: impact on yield components and nutrients of spring wheat in pots. Arch. Agron. Soil Sci. 61 (8), 1055–1060.

Rhoades, J.D., 1996. Salinity: electrical conductivity and total dissolved solids. In: Sparks, D.L. (Ed.), Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical Methods. ASA and SSSA Book Series n.5, Madison, WI, pp. 417–435.

Rillig, M., Thies, J., 2009. Characteristics of biochar: biological properties. In: Lehmann, J., Joseph, S. (Eds.), Biochar for Environmental Management: Science and Technology. Earthscan, London, UK, pp. 85–106.

Rilling, M.C., 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. Can. J. Soil Sci. 84, 355–363.

Saidi, E.A., Lenin, I., Husin, E.F., Rasyidin, A., 2014. Potential selection of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) indigenous ultisols through the production of glomalin. J. Trop. Soils 19, 181–189.

Schulz, H., Dunst, G., Glaser, B., 2013. Positive effects of composted biochar on plant growth and soil fertility. Agron. Sustain. Dev. 33, 817–827.

Schwartz, M.W., Hoeksema, J.D., Gehring, C.A., Johnson, N.C., Klironomos, J.N., Abbott, L.K., Pringle, A., 2006. The promise and the potential consequences of the global transport of mycorrhizal fungal inoculum. Ecol. Lett. 9, 501–515.

Soltner, D., 1988. Le bases de la production vegetale, In: Angers (Ed.), Sciences et Techniques Agricoles. 16éme edition Sainte Gemmes Sur Loire, pp. 464.

Sohi, S.P., Krull, E., Lopez-Capel, E., Bol, R., 2010. A review of biochar and its use and function in soil. Adv. Agron. 105, 47–82.

Steiner, C., Glaser, B., Teixeira, W.G., Lehmann, J., Blum, W.E.H., Zech, W., 2008. Nitrogen retention and plant uptake on a highly weathered central Amazonian Ferralsol amended with compost and charcoal. J. Plant Nutr. Soil Sci. 171, 893–899.

Takaya, C.A., Fletcher, L.A., Singh, S., Anyikude, K.U., Ross, A.B., 2016. Phosphate and ammonium sorption capacity of biochar and hydrochar from different wastes. Chemosphere 145, 518–527.

Tammeorg, P., Simojoki, A., Mäkelä, P., Stoddard, F.L., Alakukku, L., Helenius, J., 2014. Biochar application to a fertile sandy clay loam in boreal conditions: effects on

soil properties and yield formation of wheat, turnip rape and faba bean. Plant Soil 374, 89–107.
Tan, K.H., 2005. Humic Matter in Soil and the Environment: Principle and Controversies. Marcell Dekker, Inc., New York Basel, pp. 90–91.
Terzaghi, M., Montagnoli, A., Di Iorio, A., Scippa, G.S., Chiatante, D., 2013. Fine-root carbon and nitrogen concentration of European beech (*Fagus sylvatica* L.) in Italy Prealps: possible implications of coppice conversion to high forest. Front. Plant Sci. 2013 (4), 192.
Terzaghi, M., Di Iorio, A., Montagnoli, A., Baesso, B., Scippa, G.S., Chiatante, D., 2016. Forest canopy reduction stimulates xylem production and lowers carbon concentration in fine roots of European beech. For. Ecol. Manage. 379, 81–90.
Trouvelot, S., Bonneau, L., Redecker, D., van Tuinen, D., Adrian, M., Wipf, D., 2015. Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: a review. Agron. Sustain. Dev. 35, 1449–1467.
USDA, 2005. USDA (United States Department of Agriculture). Natural Resources Conservation Service. National Soil Survey Handbook.
Upadhyaya, A., Wright, S.F., 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Sci. 161, 575–586.
Vaccari, F.P., Baronti, S., Lugato, E., Genesio, L., Castaldi, S., Fornasier, F., Miglietta, F., 2011. Biochar as a strategy to sequester carbon and increase yield in durum wheat. Eur. J. Agron. 34, 231–238.
Van Zwieten, L., Meszaros, I., Downie, A., Chan, Y.K., Joseph, S., 2008. Soil Health: can the cane industry use a bit of 'Black Magic'? Austral. Canegrower 17, 10–11.
Van Zwieten, L., Kimber, S., Morris, S., Chan, K.Y., Downie, A., Rust, J., Joseph, S., Cowie, A., 2010. Effects of biochar from slow pyrolysis of paper mill waste on agronomic performance and soil fertility. Plant Soil 327, 235–246.
Verheijen, F.G.A., Jeffery, S., Bastos, A.C., van der Velde, M., Diafas, I., 2010. Biochar Application to Soils: a Critical Scientific Review on Effects on Soil Properties, Processes and Functions. Joint Research Center (JRC), Scientific and Technical Report. Luxemberg, Office for the Official Publications of the European Communities.
Vookova, B., Kormutak, A., 2001. Effect of sucrose concentration, charcoal, and indole-3-butyric acid on germination of *Abies numidica* somatic embryos. Biol. Plant. 44, 181–184.
Wallander, H., Nilsson, L.O., Hagerberg, D., Bååth, E., 2001. Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. New Phytol. 151, 753–760.
Warnock, D.D., Lehmann, J., Kuyper, T.W., Rillig, M.C., 2007. Mycorrhizal responses to biochar in soil e concepts and mechanisms. Plant Soil 300, 9–20.
Warnock, D.D., Daniel, L., Mummey, D.D., Mebride, B.J., Major, J., Lehmann, J., Rillig, M.C., 2010. Influences of non-herbaceous biochar on arbuscular mycorrhizal fungal abundances in roots and soils: results from growth-chamber and field experiments. Appl. Soil Ecol. 46, 450–456.
Wright, S.F., Franke-Snyder, M., Morton, J.B., Upadhyaya, A., 1996. Time course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. Plant Soil 181, 193–203.
Yuan, J., Xu, R., Zhang, H., 2011. The forms of alkalis in the biochar produced from crop residues at different temperatures. Biores. Technol. 102, 3488–3497.
Zhang, A., Bian, R., Pan, G.X., Cui, L.Q., Hussain, Q., Li, L.Q., Zheng, J.W., Zheng, J.F., Zhang, X.H., Han, X.J., Yu, X.Y., 2012. Effects of biochar amendment on soil quality: crop yield and greenhouse gas emission in a Chinese rice paddy: a field study of 2 consecutive rice growing cycles. Field Crop Res. 127, 153–160.
Zhang, J., Lu, F., Luo, C., Shao, L., He, P., 2014. Humification characterization of biochar and its potential as a composting amendment. J. Environ. Sci. 26, 390–397.

Effetto del biochar sui batteri e le comunità microbiche della vigna

Dall'analisi dei dati ottenuti mediante l'utilizzo di saggi colturali in piastra (conte batteriche totali, funginee e sporigene) si osserva un trend di distribuzione microbica simile dei diversi microorganismi, nelle parcelle di controllo e in quelle trattate con biochar. A distanza di 9 mesi dal trattamento, nel suolo ammendato con biochar si osserva un aumento significativo del' abbondanza di batteri mentre funghi e sporigeni restano inalterati rispetto al suolo di controllo (Figura 17).

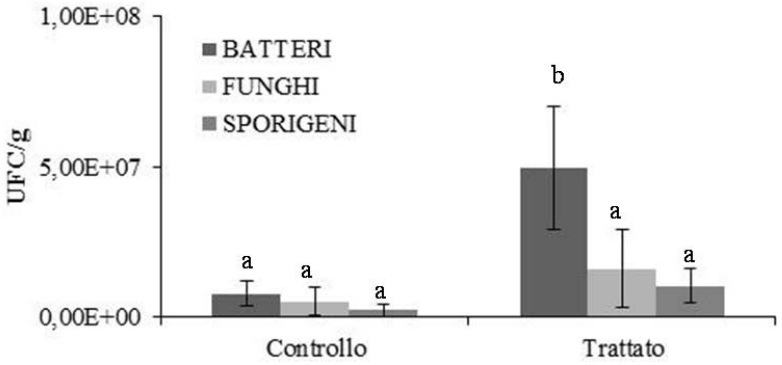


Figura 17: Conta microbica totale, conta sporigeni e conta funginea. determinati su terreno di controllo e terreno trattato con biochar della vigna. I risultati sn espressi come media (n=4) ± E.S.. A lettere diverse crrispondono valori diversi (p<0.05).

Per valutare se queste alterazioni si riflettano anche sulla composizione delle comunità microbiche è stato utilizzato il test enzimatico API-ZYM.

I risultati ottenuti, riportati nella figura 18, sembrano indicare che l'aumento di biomassa microbica non corrisponda ad un'alterazione delle comunità come indicato dal numero di enzimi rilevati.

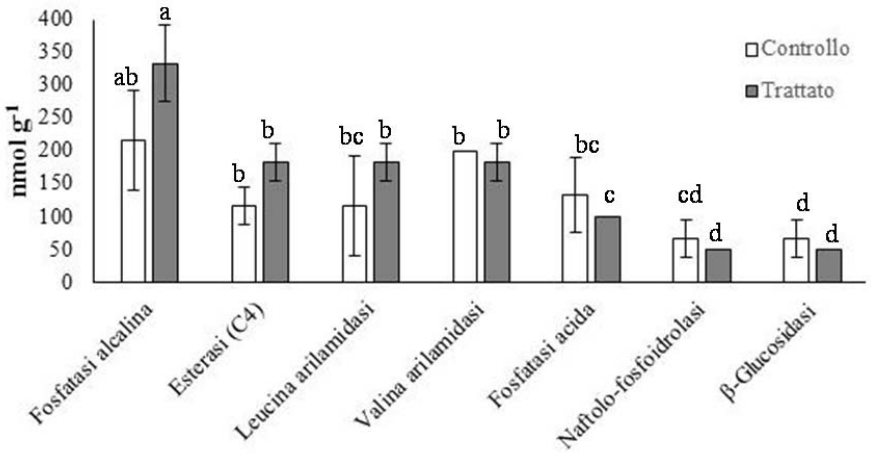


Figura 18: Saggio API-ZYM effettuato sul suolo della vite nelle parcelle di controllo e nelle parcelle ammendate con biochar. Le barre di errore rappresentano la D.S.(n=4). A lettere diverse corrispondono valori diversi.

Infatti da un punto di vista qualitativo, il saggio enzimatico API-ZYM evidenzia che tra terreno trattato e terreno di controllo non vi sono variazioni dell'attività enzimatica, dal momento che dei 19 enzimi testati, gli stessi sette hanno dato risultato positivo sia sul terreno di controllo che su quello trattato. Inoltre, il test mostra che tra le parcelle trattate e di controllo non vi sono variazioni significative, neanche dal punto di vista quantitativo, in corrispondenza dei diversi enzimi che hanno dato reazione positiva.

Ciò potrebbe far pensare che il biochar, pur promuovendo, in termini quantitativi, la crescita in biomassa, in realtà non sortisce alcun effetto, nei 9 mesi intercorsi tra trattamento e campionamento, sulla composizione della comunità microbica.

Per verificare se l'aggiunta del biochar nel suolo modifica qualitativamente la composizione delle comunità microbiche è stata eseguita un'analisi qualitativa, effettuata mediante la tecnica PCR-DGGE, che separa e analizza i frammenti di DNA che differiscono nella sequenza nucleotidica.

I dati ottenuti (Figura 19) evidenziano un campione outlier e due complessi principali, all'interno dei quali i campioni si raggruppano due a due per similarità.

Tuttavia, in tali raggruppamenti si dispongono indifferentemente sia i campioni ammendati che quelli di controllo.

Pertanto, laddove esistono delle differenze, sembra che le stesse possano dipendere, più che dal trattamento con biochar, da effetti sito specifici.

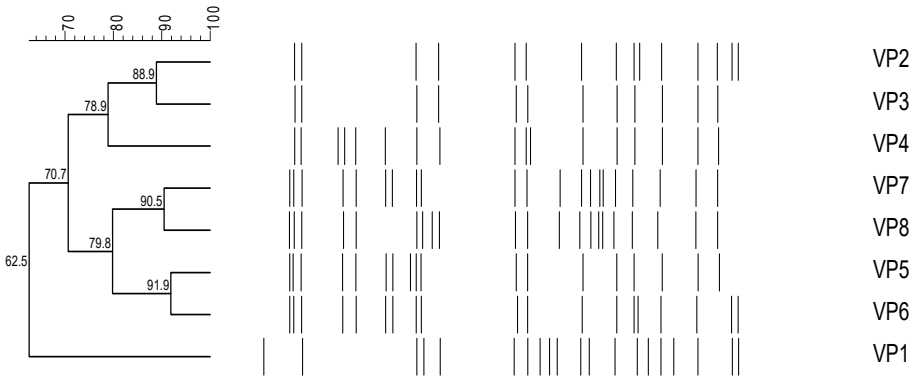


Figura 19: Analisi cluster dei profili delle comunità di Bacteria eseguita con il software FPQuest (algoritmo UPGMA; coefficiente di similarità di Dice).

In realtà da studi presenti in letteratura emerge che il biochar può avere effetti alquanto differenti su composizione e abbondanza microbica.

Laddove si è riscontrato un aumento di biomassa microbica a seguito dell'aggiunta di biochar, gli autori concordano nell' attribuire tale effetto all'aumento di C disponibile, al quale i microrganismi reagiscono aumentando la loro biomassa (Watzinger et al., 2013; Mašek et al., 2011; Lehman et al., 2011).

Steinbeiss et al., (2009) e Kolb et al., (2009) rafforzano maggiormente tale ipotesi affermando che questo effetto è tanto più evidente, quanto più è povero il terreno a cui il biochar viene applicato, condizione che trova pieno riscontro nei risultati ottenuti in questo lavoro.

Concludendo, dalla valutazione complessiva dei dati ottenuti in questo studio, emergono elementi importanti sugli effetti a breve termine del biochar, sia sul suolo che sulla rizosfera.

Innanzitutto, in accordo con quanto emerso in altri studi presenti nella letteratura scientifica su piante della vite e relativo terreno di crescita, essi confermano la capacità del biochar di indurre nel suolo un incremento di contenuto d'acqua disponibile per le piante.

Si è osservato, infatti, che tale effetto si accompagna ad un maggiore potenziale idrico fogliare, (Baronti et al., 2014) ed una maggiore produttività (Genesio et al., 2015) durante i periodi secchi, rispetto alle piante cresciute nel terreno non trattato.

L'incremento di acqua disponibile è strettamente collegato a quello del carbonio organico, dal momento che essendo questo uno dei principali fattori leganti delle particelle di suolo, ne promuove la formazione di macroaggregati.

Ciò contribuisce ad unasua maggiore stabilità e resistenza nei confronti dei fenomeni erosivi, dovuti alle condizioni meteoclimatiche (Kong et al., 2005; Domingo-Olivé et al., 2016; Ma et al., 2016), ma soprattutto favorisce la formazione di macro e micropori (Verheijen et al, 2010; Abel et al., 2013), all'interno dei quali l'acqua viene ritenuta maggiormente, come abbiamo osservato, e rilasciata alle piante nei periodi secchi (Baronti, 2014).

Inoltre l'aumento dell'azoto minerale in forma ammoniacale, non seguito da un aumento dell'azoto totale, suggerisce che il biochar agisca, piuttosto che attraverso un apporto diretto di tale nutriente, incrementando la disponibilità dello stesso (Lehman, 2011).Alla maggiore disponibilità d'acqua e azoto potrebbe essere attribuita, nel terreno trattato con biochar, l'aumento di biomassa microbica (Lochhead e Chase, 1943; Taylor, 1951) e la maggiore produzione di radici fini, in termini di biomassa e diametro, riscontrato nel campionamento di Settembre, immediatamente successivo al trattamento, in accordo con quanto osservato da Olmo et al., (2016) sulle radici fini di piante di grano.

Considerando che la fase vegetativa di produzione di radici nuove inizia a fine Settembre, sembra che il biochar abbia avuto come effetto a breve termine anche l'anticipazione di tale fase.

L''aumento di produzione di biomassa media annua delle radici è un ulteriore elemento che contribuisce a spiegare l'aumento dei macroaggregati, esercitando anch'esso un effetto legante sulle particelle di suolo, mediante il rilascio di sostanze organiche, quali essudati.

Il basso valore di micorrize riscontrato in questa sperimentazione ed il mancato effetto del biochar su tale parametro possono essere attribuiti al basso valore di fosforo disponibile, che gioca un ruolo chiave nella simbiosi tra radice e fungo (Fitter, 2006), oltre alle operazioni di fresatura eseguite all'interno della vigna, come consueta pratica agronomica (Nichols e Wright, 2004).

Considerando il suolo come un sistema complesso, le cui componenti biotiche e abiotiche sono strettamente correlate e in equilibrio tra loro, appare evidente che gli effetti indotti dal biochar su una di esse, si ripercuotono su tutte le altre, innescando un meccanismo che si autoalimenta.

Infatti l'aumento di carbonio organico, di acqua e azoto disponibile inducono un aumento della biomassa e del turnover radicale; queste ultime contribuiscono anch'esse a fornire, sotto forma di carbonio organico, l'energia necessaria per il metabolismo e per la crescita della massa microbica (Lehman, 2011).

Come risultato, una maggiore abbondanza microbica può fornire, attraverso i meccanismi di degradazione ossidativa, maggiore disponibilità di nutrienti minerali utili, per la crescita delle piante (Norton e Firestone, 1996).

Da quanto emerso, appare opportuno sottolineare che, nonostante gli effetti positivi sulle piante di vite siano stati osservati solo dopo alcuni cicli vegetativi (Genesio et al.,et al., 2015; Schmidt et al., 2014), in questo studio a breve termine, è stato possibile riscontrare gli elementi che, in via preliminare, creano le condizioni favorevoli al loro verificarsi.

2.4 Risultati relativi allo studio sul suolo dell' oliveto e relativa discussione

Per quanto riguarda la sperimentazione sull'oliveto sono state eseguite le analisi finalizzate alla caratterizzazione chimico fisica e microbiologica del suolo.

Data la variabilità vegetativa e i relativi problemi di interferenza, in questo lavoro di tesi si è deciso di non effettuare lo studio delle radici.

Effetto del bichar sulle caratteristiche chimico fisiche del suolo dell'oliveto

Irisultati relativi alla caratterizzazione chimico fisica del terreno dell'oliveto sono riportati nella tabella 2.

PARAMETRO	UNITÀ	CONTROLLO	BIOCHAR
pH	pH	6.8±0.03	6.8±0.05
CE	ds m^{-1}	0.5±0.09	0.6±0.11
Umidità	g kg^{-1}	36.0±0.32	36.1±1.16
N_{tot}	g kg^{-1}	1.7±0.86	3.0±0.05
P_{tot}	mg kg^{-1}	309.5±16.17	317.8±9.57
P_{disp}	mg kg^{-1}	<12	<12
C_{org}	g kg^{-1}	**31.0±2.1**	**40.6±0.6**
CSC	cmol kg^{-1}	**17.7±0.17**	**18.3±0.17**
Tessitura:			
ø < 2 μm	%	46.3±1.1	45.5±1.5
2 μm < ø < 20 μm	%	13.3±0.92	15.4±0.86
20 μm < ø < 50 μm	%	27.5±1.89	25.8±1.58
50 μm < ø < 200 μm	%	6.9±0.11	6.7±0.08
200 μm < ø < 2 mm	%	6.0±0.14	6.6±0.34
ø > 2 mm	%	0.0 ±0.00	0.0±0.00

Tabella 2: Analisi chimico fisiche eseguite su campioni di suolo di parcelle trattate e di controllo. Ciascun valore rappresenta la media (n=4) ± ES. I risultati in grassetto sono tra loro significativamente differenti (p<0.05).

Il terreno in questione è classificabile, secondo diversi schemi interpretativi, come un suolo subacido (Giardini, 2002) o neutro (USDA, 2005), per quanto riguarda il valore di pH.

Esso si presenta, inoltre, leggermente salino (USDA, 2005), con contenuto di carbonio organico soddisfacente, in relazione al contenuto in argilla (Soltner, 1988). La classe granulometrica, definita mediante il calcolatore USDA

(https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/survey/tools/?cid=nrcs142p2_054167), è risultata argillosa.

In accordo con il valore di carbonio organico, il contenuto di azoto totale è caratteristico di un suolo medio (Bruce e Rayment, 1982).

Il valore del fosforo disponibile è risultato inferiore al limite di quantificazione, a fronte di un contenuto di fosforo totale non trascurabile.

L'elevato contenuto di carbonio organico e di argille, che caratterizza questo terreno, giustifica anche il risultato ottenuto in corrispondenza della capacità di scambio cationico, che può essere considerata, secondo diverse interpretazioni, media (Metson, 1961) o elevata (McKenzie et al, 2004; Nicholas, 2004).

Infatti i maggiori fattori che si correlano positivamente con tale parametro sono alcune tipologie di argilla (quali caolinite, illite e smectite), i colloidi (ossidi e idrossidi di ferro e alluminio) e le sostanze organiche (McKenzie et al., 2004).

Essa fornisce al terreno la capacità tampone alle variazioni di pH ed è il principale elemento che controlla la stabilità della struttura del terreno e la disponibilità dei nutrienti.

Pertanto, in linea generale, il terreno in questione, ad eccezione della scarsa disponibilità di fosforo, mostra caratteristiche chimico fisiche tipiche di un terreno ricco dal punto di vista agronomico.

Dato il valore del pH, che esclude la possibilità di formazione di fosfati di calcio insolubili, tale carenza è probabilmente da attribuire a fenomeni di adsormimento anionico, dovuti alla formazione di complessi stabili con cationi presenti sulla superficie di scambio, o di adsorbimento specifico, grazie al quale gli anioni fosfato, entrando a far parte direttamente della struttura cristallina delle argille, ne rimangono definitivamente intrappolati.

Inoltre studi recenti (Bortoluzzi et al., 2015; Fink et al., 2016b), spiegano gli effetti degli ossidi e idrossidi di ferro sul fosforo, consistenti nella rapida formazione di complessi stabili tra ioni ortofosforici e i gruppi funzionali degli ossidi di ferro.

Tale ipotesi è resa verosimile dalla consistente presenza di ferro nel terreno in questione, risultata evidente, oltre che dal pH leggermente acido e dalla tipica colorazione rossastra, anche dal punto di vista visivo, durante le procedure analitiche.

Dall'analisi del terreno trattato con biochar, si osservano incrementi significativi, rispetto al terreno di controllo, in corrispondenza del contenuto di carbonio organico (31.0%) e della capacità di scambio cationico (3.4 %), mentre tutti gli altri parametri restano invariati.

Tale risultato è giustificato dalla presenza di carbonio organico nel biochar che, come precedentemente esposto, costituisce un fattore chiave per la capacità di scambio cationico nel terreno; tuttavia oltre all'apporto diretto del biochar di sostanze organiche, il suo effetto si esplica nel tempo, grazie a meccanismi secondari, consistenti nella formazione di gruppi carbossilici acidi, dovuta all'azione ossidativa dell'aria e dei batteri, con un effetto amplificato e prolungato nel tempo (Glaser et al., 2002).

Effetto del biochar sulle comunità microbiche del suolo dell'oliveto

Per quanto riguarda le analisi microbiologiche condotte su tale terreno, i risultati sono riportati in figura 20.

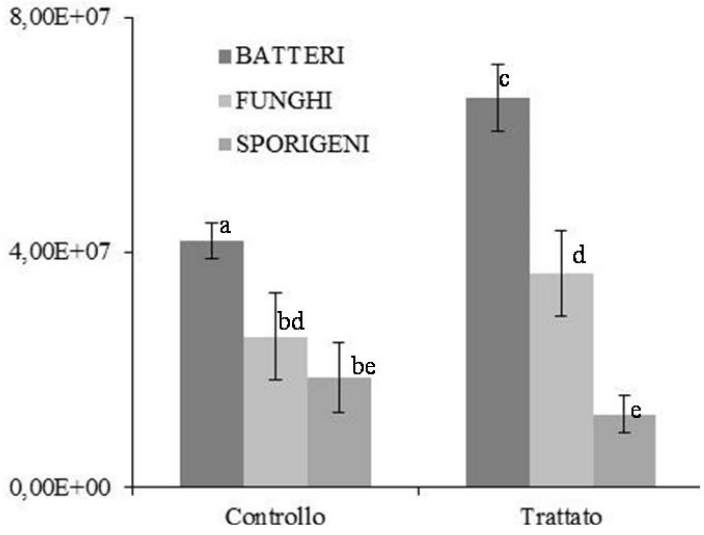


Figura 20: Conta microbica totale, conta sporigeni e conta funginea. determinati su terreno di controllo e terreno trattato con biochar dell'oliveto. I valori sono riportati come media (n=6) ± E.S. A lettere diverse corrispondono valori diversi (p<0.05).

Dalla figura 20 è possibile notare un andamento molto simile dei microrganismi nel terreno ammendato con biochar e nel terreno di controllo.

Si osserva, inoltre, nelle parcelle trattate, una presenza superiore di biomassa microbica per quanto riguarda i batteri, rispetto alle parcelle di controllo; per quanto riguarda funghi e sporigeni, i valori sono tra loro confrontabili. Questi dati sono in accordo con altri studi scientifici presenti in letteratura (Pietikäinen et al., 2000; Steiner et al., 2004).

Dai risultati ottenuti dall'analisi enzimatica API-ZYM (Figura 21), si osserva un aumento, dal punto di vista quantitativo, dell'attività enzimatica in corrispondenza del solo enzima Leucina-arilamidasi, nel terreno trattato con biochar, legato maggiormente all'attività batterica, piuttosto che funginea, dove prevale l'attività proteinasica.

In particolare, esso deriva soprattutto dall'attività di batteri epifiti (Müller et al., 2004) che, nelle foglie di olivo, posseggono attività di difesa da batteri patogeni, quali Pseudomonas syringae pv, causa della "rogna" dell'olivo, attraverso la produzione di auxina (Lavermicocca et al., 1987).

Si potrebbe ipotizzare che lo sviluppo nel suolo di tali batteri, che normalmente vivono sulla superficie delle piante, sia dovuta a residui vegetali, quali ad esempio le foglie, presenti sulla superficie del suolo.

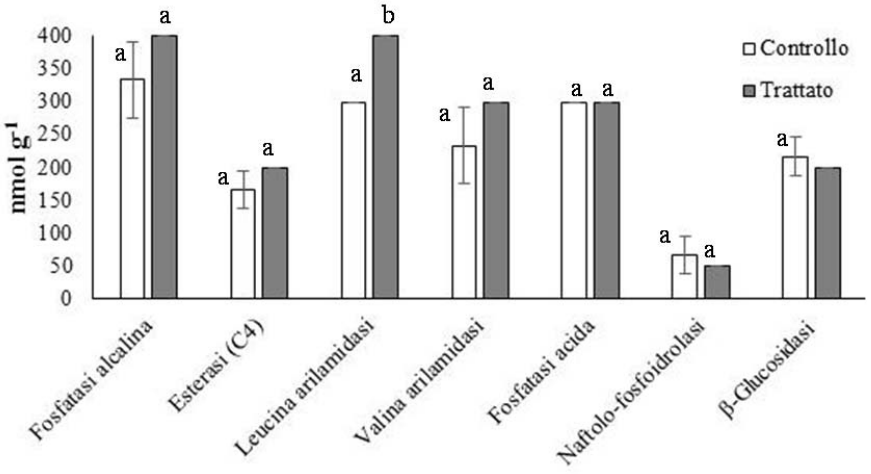


Figura 21: Saggio API-ZYM effettuato sul suolo della vite nelle parcelle di controllo e nelle parcelle ammendate con biochar dell'oliveto. Le barre di errore rappresentano la D.S.(n=6). A lettere diverse corrispondono valori diversi.

Dal punto di vista qualitativo, il saggio enzimatico API-ZYM evidenzia che non vi sono variazioni dell'attività enzimatica a seguito del trattamento con biochar, dal momento che hanno dato risultato positivo gli stessi enzimi, sia sul terreno di controllo che su quello trattato. Tale risultato suggerisce l'ipotesi che il biochar promuova, in questo tipo di terreno e alle specifiche condizioni sperimentali, la crescita in biomassa microbica, solo in termini quantitativi, avvantaggiando i batteri non sporigeni, rispetto ai miceti ed agli sporigeni che, come abbiamo, visto potrebbero svolgere una funzione di protezione da batteri fitopatogeni.
Concludendo, considerando complessivamente i dati chimico fisici e microbiologici , si può affermare che il biochar, inducendo nel suolo un incremento della capacità di scambio cationico attraverso un apporto di carbonio organico, rende maggiormente disponibili, oltre al carbonio, anche le sostanze nutrienti, determinando l'instaurarsi delle condizioni favorevoli alla proliferazione microbica (Lehman et al., 2011).
Inoltre, l'entità di tale incremento incontra pienamente quanto affermato da Steibass et al., (2009) e Kolb et al., (2009), secondo i quali questo effetto del biochar sull'abbondanza microbica è amplificato dalla scarsa disponibilità di carbonio organico nel terreno di partenza; infatti si osserva anche in questo suolo, già ricco di carbonio organico prima del trattamento con biochar, un incremento di abbondanza microbica inferiore a quello misurato nel suolo della vigna, povero di sostanze organiche.
Pertanto, come già osservato nel caso studio della vigna, appare ancora una volta evidente una stretta correlazione tra gli effetti del biochar sulle componenti biotiche e abiotiche del suolo.

2.5 Risultati relativi allo studio sulla foraggera e relativa discussione

Come per l'oliveto, la sperimentazione sulla foraggera ha previsto l'attuazione di attività analitiche volte alla caratterizzazione chimico fisica e microbiologica del suolo.

Effetto del biochar sulle caratteristiche chimico fisiche del suolo della foraggera

I risultati relativi alla caratterizzazione chimico fisica del terreno di controllo e di quello ammendato con biochar, relativi allo studio su tale suolo, sono riportati nella tabella 3.

PARAMETRO	UNITÀ	CONTROLLO	BIOCHAR
pH	pH	7.1 ±0.00	7.2 ±0.07
CE	ds m^{-1}	1.0 ±0.09	1.0 ±0.08
Umidità	g kg^{-1}	54.4 ±1.94	54.7 ±2.61
N_{tot}	g kg^{-1}	2.2 ±0.05	2.2 ±0.05
P_{tot}	mg kg^{-1}	647.8 ±20.49	685.5 ±23.61
P_{disp}	mg kg^{-1}	<12	<12
C_{org}	g kg^{-1}	28.4±1.24	30.3±1.98
CSC	cmol kg^{-1}	20.9±0.04	21.2±0.24
Tessitura:			
ø < 2 µm	%	**43.7**±0.9	**38.2**±0.5
2 µm < ø < 20 µm	%	13.0±0.8	13.0±0.7
20 µm < ø < 50 µm	%	22.6±1.3	26.3±1.3
50 µm < ø < 200 µm	%	6.6±0.2	6.6±0.2
200 µm < ø < 2 mm	%	**14.0**±0.4	**15.9**±0.4
ø > 2 mm	%	18.8±1.09	22.4±2.38

Tabella 3: Analisi chimico fisiche eseguite su campioni di suolo di parcelle trattate e di controllo. Ciascun valore rappresenta la media (n=4) ± ES. I risultati in grassetto sono tra loro significativamente differenti (p<0.05).

In base ai risultati sopra riportati, il terreno, classificabile come argilloso secondo il sistema USDA, presenta caratteristiche neutre (USDA, 2005), conducibilità tipica di un terreno moderatamente salino (USDA, 2005) ed un contenuto in fosforo assimilabile anch'esso inferiore al limite di quantificazione, a fronte di un valore non trascurabile di fosforo totale.

Il contenuto di carbonio organico in funzione del tenore in argilla è soddisfacente (Soltner, 1988). In concordanza con tale dato, l'azoto è presente in concentrazione tale da classificare il terreno in questione come un terreno medio (Bruce e Rayment, 1982).

La capacità di scambio cationico può essere considerata media, secondo l'interpretazione di Metson (1961) o elevata, secondo l'interpretazione di McKenzie et al (2004) e Nicholas (2004).

Dal confronto tra il terreno trattato con biochar e quello di controllo emerge una riduzione significativa di particelle con diametro inferiore a 2 μm (12.6 %), ed un aumento confrontabile (13.6 %) della frazione di diametro compreso tra 200 μm e 2 mm, che si traduce nella formazione di aggregati di dimensioni maggiori, a carico delle particelle più piccole.
Questo risultato è attribuibile, come spiegato da Glaser et al., (2002) e rappresentato in figura 6, alla formazione di complessi tra biochar e sostanze minerali; tali complessi devono la loro formazione all'interazione tra gruppi carbossilici acidi, che originano dall'ossidazione della superficie delle particelle di biochar esposte all'aria, e le particelle d'argilla circostanti, attraverso l'intermediazione di cationi flocculanti.

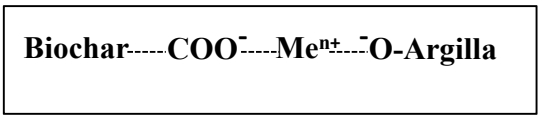


Figura 22: Rappresentazione del meccanismo di formazione di aggregati nel suolo, per effetto del biochar.

Il mancato aumento del carbonio organico, di partenza già elevato, si riflette anche sulla capacità di scambio cationico; essa, infatti, resta inalterata, probabilmente, anche a causa del breve tempo intercorso tra trattamento e caratterizzazione (5 mesi), non sufficiente ad innescare i meccanismi secondari di ossidazione superficiale del biochar, già trattati nel caso dell'oliveto, che conducono allo sviluppo della superficie di scambio.

Effetto del biochar sulle comunità microbiche del suolo della foraggera

Per quanto riguarda le analisi microbiologiche condotte su tale terreno, i risultati relativi alla conta di batteri, funghi e sporigeni sono riportati in figura 23.

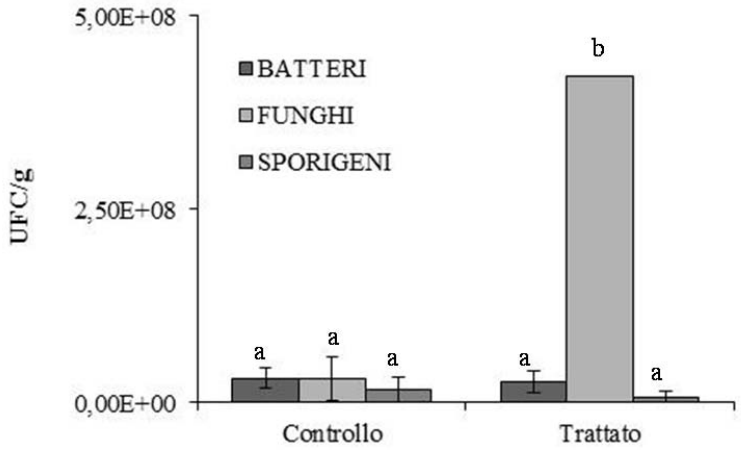


Figura 23: Conta microbica totale, conta sporigeni e conta funginea, determinati su terreno di controllo e terreno trattato con biochar della foraggiera. I valori sono riportati come media (n=4) ± E.S. A lettere diverse corrispondono valori diversi (p<0.05).

Nella figura 24 sono riportati i risultati relativi alla conta di batteri, funghi e sporigeni.
A distanza di cinque mesi dal trattamento, si osserva, nel terreno trattato con biochar, un incremento significativo della biomassa funginea, mentre quella di batteri e sporigeni resta invariata, rispetto al terreno di controllo.

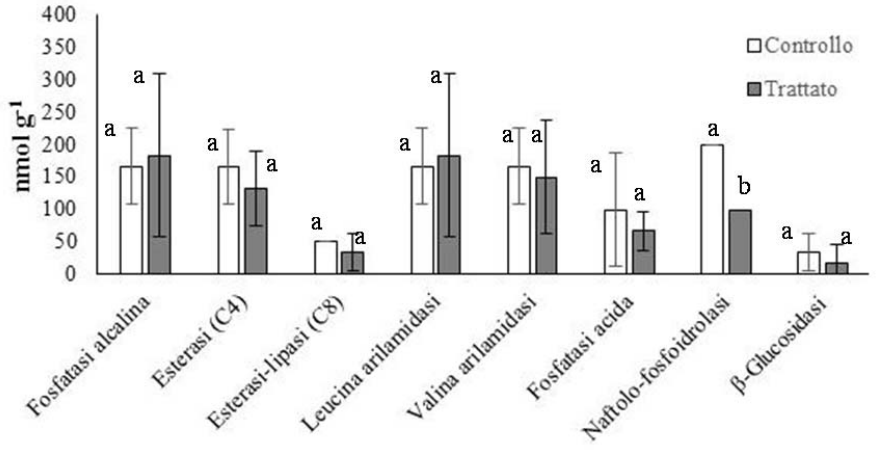


Figura 24: Saggio API-ZYM effettuato sul suolo della vite nelle parcelle di controllo e nelle parcelle ammendate con biochar della foraggiera. Le barre di errore rappresentano la D.S. Le barre di errore rappresentano la D.S.(n=4). A lettere diverse corrispondono valori diversi.

Dai risultati ottenuti dall'analisi enzimatica API-ZYM (Figura 23), l'unica differenza significativa tra le due tesi si osserva, dal punto di vista quantitativo, in corrispondenza del solo enzima Naftolo-fosfoidrolasi, con un decremento dell'attività enzimatica nel terreno trattato con biochar.

Questo risultato sembra contrastare con l'aumento della massa funginea, pertanto potrebbe essere attribuito ad una diminuzione di tale attività enzimatica da parte dei batteri.

Dal punto di vista qualitativo, sia il terreno di controllo che quello trattato sono risultati positivi agli stessi enzimi, pertanto non si riscontrano differenze in termini di composizione della comunità microbica.

L'incremento dei funghi rispetto ai batteri trova supporto da quanto affermato da Lehman et al., (2011), secondo i quali l'aggiunta di biochar conduce ad una crescita preferenziale dei funghi, rispetto ai batteri, per il ruolo chiave da questi svolto nella degradazione della lignina, del glucosio e della cellulosa. Tale effetto è stato riscontrato anche in altri studi che si riferiscono a brevi periodi di incubazione e con motivazioni diverse: elevato contenuto di ceneri del biochar (Paz Ferreiro, 2015), incremento di carbonio disponibile nel terreno (Bougnom et al., 2013) o del rapporto C/N (Eiland et al., 2001).

Nel presente caso studio, dall'analisi dei risultati chimico fisici considerati, è stato possibile osservare, come effetto del biochar, un aumento degli aggregati, a spese della frazione granulometrica di dimensioni inferiori. La variazione della struttura porosa che ne deriva costituisce un altro elemento chiave, insieme all'area superficiale e al contenuto di sostanze minerali, nel determinare i diversi effetti del biochar sia sull'abbondanza che sulla composizione microbica (Lehman, 2011).

Comunque l' aumento di funghi rispetto ai batteri è considerato un effetto positivo del biochar sul suolo (Mäder et al., 2002), apportando notevoli vantaggi per le colture con un miglioramento dell'assorbimento delle sostanze nutrienti, mediato dalle micorrize.

Appendice al capitolo II Quadro riepilogativo dei risultati ottenuti nella sperimentazione in campo

Data la numerosità dei risultati relativi alle analisi chimico fisiche e microbiologiche dei suoli delle tre colture esaminate e discusse in questo capitolo, al fine di agevolarne la lettura, si riporta di seguito un quadro d'insieme degli stessi.

Risultati analisi chimico fisiche

	VIGNA		OLIVETO		FORAGGIO	
	C	T	C	T	C	T
pH						
MEDIA	7,0	7,1	6,8	6,8	7,1	7,2
ES	0,04	0,06	0,03	0,05	0,00	0,07
	a	ad	b	b	c	cd
CONDUCIBILITA'(dS/m)						
MEDIA	0,6	0,6	0,5	0,6	1,0	1,0
ES	0,20	0,16	0,09	0,11	0,09	0,08
	ab	ac	a	a	b	bc
UMIDITÀ (g/kg)						
MEDIA	42,4	39,3	36,0	36,1	54,4	54,7
ES	4,40	0,61	0,32	1,16	1,94	2,61
	ab	a	ab	b	cd	c
AZOTO TOTALE (g/kg)						
MEDIA	1,1	1,2	1,7	3,0	2,2	2,2
ES	0,03	0,07	0,86	0,05	0,05	0,05
	a	b	abcd	c	d	d
FOSFORO TOTALE (mg/Kg)						
MEDIA	212,6	233,5	309,5	317,8	647,8	685,5
ES	11,0	6,47	16,17	9,57	20,49	23,61
	a	a	b	b	c	c
FOSFORO ASSIMILABILE (mg/Kg)						
MEDIA	<12	<12	<12	<12	<12	<12
ES						
CARBONIO ORGANICO (g/Kg)						
MEDIA	11,6	14,0	31,0	40,6	28,4	30,3
ES	0,34	0,59	2,07	0,63	1,24	1,98
	a	b	c	d	e	e
CAPACITA' DI SCAMBIO CATIONICO (cmol/kg)						
MEDIA	16,6	16,5	17,7	18,3	20,9	21,2
ES	0,18	0,32	0,17	0,17	0,04	0,24
	a	a	b	c	d	d

	VIGNA		OLIVETO		FORAGGIO	
	C	T	C	T	C	T
GRANULOMETRIA						
scheletro %						
MEDIA	3,1	5,5	0,0	0,0	18,8	22,4
ES	0,31	0,19	0,00	0,00	1,09	2,38
	a	d	b	b	c	c
argilla %						
MEDIA	48,1%	47,5%	46,3	45,5	43,7%	38,2%
ES	0,7%	0,4%	1,1	1,5	0,9%	0,5%
	a	a	b	b	c	d
limo fine %						
MEDIA	16,3%	16,3%	13,3	15,4	13,0%	13,0%
ES	1,0%	1,5%	0,92	0,86	0,8%	0,7%
	a	a	b	b	c	c
sabbia fine %						
MEDIA	5,8%	6,7%	6,9	6,7	6,6%	6,6%
ES	0,4%	0,1%	0,11	0,08	0,2%	0,2%
	a	a	b	b	a	a
sabbia grossa %						
MEDIA	7,3%	7,9%	6,0	6,6	14,0%	15,9%
ES	0,7%	0,3%	0,14	0,34	0,4%	0,4%
	a	a	b	b	c	d
limo grosso %						
MEDIA	22,6%	21,7%	27,5	25,8	22,6%	26,3%
ES	1,3%	2,0%	1,89	1,58	1,3%	1,3%
	a	a	b	b	a	a

Tabella 4: Risultati relativi alle analisi chimico fisiche eseguite su campioni di suolo di controllo (C) e trattati con biochar (T) del vigneto, oliveto e foraggiera, contenenti valori medi e relativi errori atandard. A lettere diverse corrispondono valori diversi ($p<0.05$).

Risultati relativi alla determinazione di batteri, funghi e sporigeni mediante conta su piastra

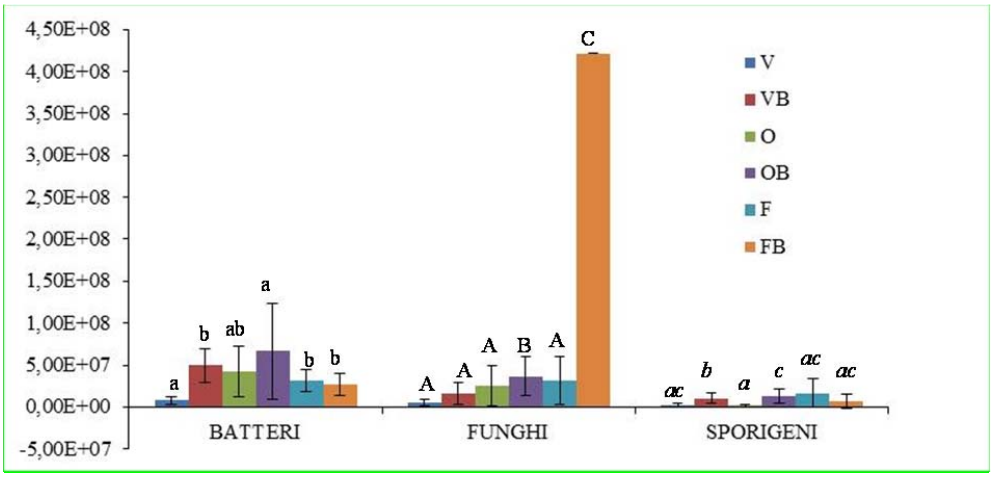


Figura 25:Risultati relativi alla conta su piastra di batteri, funghi e sporigeni eseguita sul suolo di controllo di vigneto, oliveto e foraggera (rispettivamente V, O e F) e relativi trattamenti con biochar (rispettivamente VB, OB e FB). I valori sono riportati come media (n=3) ± DS. I risultati dell'analisi statistica, effettuata tra i diversi trattamenti, per batteri, funghi e sporigeni sono riportatirispettivamente mediante lettere a carattere normale, maiuscolo e corsivo rispettivamente. A lettere diverse corrispondono risultati diversi (p<0.05).

Per quanto riguarda i risultati dell'analisi enzimatica effettuate mediante test API ZYM, dato l'elevato numero di enzimi saggiati, l'assemblamento dei dati relativi ai suoli delle tre colture risulterebbe poco utile ai fini dell'agevolazione della lettura, pertanto si rimanda ai singoli grafici riportati nei paragrafi relativi ai suoli specifici studiati.

Bibliografia

Abel, S., Peters, A., Trinks, S., Schonsky, H., Facklam, M., Wessolek, G., 2013. Impact of biochar and hydrochar addition on water retention and water repellency of sandy soil. Geoderma 202, 183–191.

Baronti, S., Vaccari, F.P., Miglietta, F., Calzolari, C., Lugato, E., Orlandini, S., Pini, R., Zulian, C.,

Genesio, L., 2014. Impact of biochar application on plant water relations in *Vitis vinifera* (L.). Eur. J. Agron. 53, 38–44.

Black, I.A., Walkley, A., 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Sci. 37, 29-37.

Black, C.A,. 1965 Methods of soil analysis: part I physical and mineralogical properties. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.

Bortoluzzi, E.C., Pérez, C.A.S., Ardisson, J.D., Tiecher, T., Caner, L., 2015. Occurrence of iron and aluminum sesquioxides and their implications for the P sorption in subtropical soils. Applied Clay Science, v. 104, p. 196–204.

Bouyoucos, G.J., 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. Agron. J. 54, 464-465.

Bowman, R. A., 1988. A rapid method to determine total phosphorus in soils. Soil Sci Soc. Am. J. 52, 1301-1304.

Brandstaka, T., Helenius, J., Hovi, J., Simojoki, A., Soinne, H., 2010. Biochar filter: use of biochar in agriculture as soil conditioner, in: Report for BSAS Commitment, University of Helsinki, Helsinki, Finland pp. 1-22.

Bruce, R.C., Rayment, G.E., 1982. .Analytical methods and interpretations used by the Agricultural Chemistry Branch for soil and land use surveys. Queensland Department of Primary Industries Bulletin QB 82004.

Calvelo Pereira, R., Kaal, J., Camps Arbestain, M., Pardo Lorenzo, R., Aitkenhead, W., Hedley, M., Macías, F., Hindmarsh, J., Maciá-Agulló, J.A., 2011. Contribution to characterization of biochar to estimate the labile fraction of carbon. Org. Geochem. 42, 1331–1342.

Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., Rantsiou, K., 2013. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. Int. J. Food Microbiol. 167, 29–43

Conyers, M.K., Davey, B.G., 1988. Observations on some routine methods for soil pH determination. Soil Sci. 145, 29 - 36.

Domingo-Olivé, F., Bosch-Serra, À.D., Yagüe, M.R., Poch, R.M., Boixadera, J., 2016. Long term application of dairy cattle manure and pig slurry to winter cereals improves soil quality. Nutr. Cycl. Agroecosyst. 104, 39–51.

Dumas, J.B.A., 1831. Procédés de l'analyse organique. Ann.Chim.Phys. 247, 198-213.

Eiland, F., Klamer, M., Lind, A.M., Leth, M., Bååth, E., 2001. Influence of initial C/N ratio on chemical and microbial composition during long term composting of straw. Microbial Ecology 41: 272−280.

Enders, A., Hanley, K., Whitman, T., Joseph, S., Lehmann, J., 2012. Characterization of biochars to evaluate recalcitrance and agronomic performance. Bioresour. Technol. 114, 644–653.

Greenberg, A.E., Trussell, R.R., Clersceri, L.S., 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 16th ed. Amer. Public Health Assn., Washington, D.C.

Fink, J.R., et al., 2016b. Diffusion and uptake of phosphorus, and root development of corn seedlings, in three contrasting subtropical soils under conventional tillage or no-tillage. Biology and Fertility of Soils, 52, 203-210.

Fitter, A.H., 2006. What is the link between carbon and phosphorus fluxes in arbuscular mycorrhizas? A null hypothesis for symbiotic function. New Phytologist 172(1), 3-6.

Genesio, L., Miglietta, F., Baronti, S., Vaccari, F.P., 2015. Biochar increases vineyard productivity without affecting grape quality: results from a four years field experiment in Tuscany. Agric. Ecosyst. Environ. 201, 20–25.

Giardini, L., 2002. Agronomia generale, ambientale e aziendale. Patron Ed., Bologna.

Glaser, B., Lehmann, J., Zech, W., 2002. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal—a review. Biology and Fertility of Soils 35, 219–230.

Higginson, F.R., Rayment, G.E., 1992. Australian Laboratory Handbook of Soil and Water, Chemical Methods, Reed International Books, Australia/ Inkata Press, Port Melbourne.

IBI, 2014. Standardized Product Definition and Product Testing Guidelines for Biochar That Is Used in Soil. Ibi-STD-2.0.

Karer J., Wimmer B., Zehetner F., Kloss S., Soja G., 2013. Biochar application to temperate soils: effects on nutrient uptake and crop yield under field conditions Agric. Food Sci., 22, 390-403.

Kemper, W.D., Koch, E.J., 1966. Aggregate Stability of Soils from Western USA and Canada USDA Technical Bulletin No.1355. US Government Printing Office, Washington, DC.

Kolb, S.E., Fermanich, K.J., Dornbush, M.E., 2009. Effect of charcoal quantity on microbial biomass and activity in temperate soils. Soil Science Society of America Journal 73, 1173-1181.

Kong, A.Y.Y., Six, J., Bryant, D.C., Denison, R.F., van Kessel, C., 2005. The relationship between carbon input, aggregation, and soil organic carbon stabilization in sustainable cropping systems. Soil Science Society of America Journal69, 1078-1085.

Lavermicocca, P., Surico, G., Varvaro, L., Babelegoto, N.M., 1987. Attività fitormonica, criogena e antimicrobica dei batteri epifiti dell'Olivo e dell'Oleandro. Phytopathologia Mediterranea Vol. 26, No. 2, pp. 65-72

Lehmann, J., Rillig, M.C., Thies, J., Masiello, C.A., Hockaday, W.C., Crowley, D., 2011. Biochar effects on soil biota – A review. Soil Biology & Biochemistry 43, 1812–1836.

Liao, C.F.H., 1981. Devarda's alloy method for total nitrogen determination. Soil Science Society of America Juornal 45 (5), 852-855.

Lochhead, A.G., Chase, F.E., 1943. Qualitative studies of soil microorganisms: Nutritional requirements of the predominant bacterial flora. Soil Science 55,1 85-196.

Lovelock, C.E., Wright, S.F., Nichols, K.A., 2004. Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal groth: an example from a tropical rain forest soil. Soil Biology & Biochemistry 36, 1009-1012.

Ma, N., Zhang, L., Zhang, Y., Yang, L., Yu, C., Yin, G., 2016. Biochar improves soil aggregate stability and water availability in a mollisol after three years of field application. PLoS One 11 (5), e0154091. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal. pone.0154091.

Mäder P, Fliessbach A, Dubois D, Gunst L, Fried P, 2002. Soil fertility and biodiversity in organic farming. Science 296, 1694–1697.

Major, J., Lehmann, J., Rondon, M., Goodale, C., 2010a. Fate of soil applied black carbon: downward migration, leaching and soil respiration. Global Change Biology, 16(4), 1366-1379.

McKenzie, N.J., Jacquier, D.J., Isbell, R.F., Brown, K.L. 2004. Australian Soils and Landscapes An Illustrated Compendium' CSIRO Publishing: Collingwood, Victoria.

Mašek, O., Brownsort, P., Cross, A., Sohi, S., 2011. Influence of production conditions on the yield and environmental stability of biochar. Fuel 103, 151−155.

Mehlich, A., 1938. Use of triethanolamine acetate-barium hydroxide buffer for the determination of some base exchange properties and lime requirement of soil. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 29, 374-378.

Metson, A.J., 1961. Methods of chemical analysis for soil survey samples. New Zealand Department of Scientific and Industrial Research, Soil Bureau Bulletin No.12. In: Hazelton PA, B. W. Murphy BW,ed. Interpreting soil test results: what do all the numbers mean?. 2nd Edition. New South Wales, (NSW).Department of Natural Resources, Collingwood, Australia: CSIRO Publishing.

Müller, C., Stevens, R.J., Laughlin, R.J., 2004. A ^{15}N tracing model to analyse N transformations in old grassland soil. Soil Biol Biochem 36, 619–632.

Ndor, E., Dauda, S., Azagaku, E., 2015. Response of maize varieties (Zea mays) to biochar amended soil in Lafia, Nigeria. Am. J. Exp. Agric. 5(6), 525–531.

Nichols, K.A., Wright, S.F., 2002. Glomalin: Hiding place for a third of the world's stored soil carbon. Agricultural Research Magazine. http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/sep02/soil0902.htm.

Norton, J.M., Firestone, M.K., 1996. N dynamics in the rhizosphere of Pinus ponderosa seedlings. Soil Biol Biochem 28, 351-362.

Olmo, M., Villar, R., Salazar, P., Albuquerque, J.A., 2016. Changes in soil nutrient availability explain biochar's impact on wheat root development. Plant Soil 399, 333-343.

Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S., Dean, L.A., 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. USDA circular 939. U.S. Gov. Print. Office, Washington, D.C.

Persson, H., Vogt, K.A., 1991. Measuring growth and development of roots, in: Lassoie, J.P., Hinckley, T.M. (Eds), Techniques and approaches in forest tree ecophysiology. CRC press Inc., Boca Raton, FL, pp.477-501.

Pietikäinen, J., Kiikkila, O., Fritze, H., 2000. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus. Oikos 89, 231-242.

Rhoades, J.D., 1996. Salinity: Electrical Conductivity and Total Dissolved Solids. In: Sparks, D.L., (Eds.), Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical Methods. ASA and SSSA Book Series n.5, Madison, WI, pp. 417-435.

Schmidt, H.P., Kammann, C., Niggli, C., Evangelou, M.W.H., Mackie, K.A., Abiven, S., 2014. Biochar and biochar-compost as soil amendments to a vineyard soil: Influences on plant growth, nutrient uptake, plant health and grape quality. Agriculture, Ecosystem and Environment 191, 117-123.

Soltner, D., 1988. Le bases de la production vegetale, in: Angers (Eds.), Sciences et Techniques Agricoles 16éme editions, Sainte Gemmes Sur Loire, p 464.

Steinbeiss, S., Gleixner, G., Antonietti, M., 2009. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. Soil Biology and Biochemistry 41(6), 1301-1310.

Steiner, C., Teixeira, W., Zech, W., 2004. Slash and char - an alternative to slash and burn practiced in the Amazon Basin. In: Amazonian Dark Earths (Glaser, B., Woods, W. eds.), pp. 182-193.

Taylor, C.B., 1951. The nutritional requirements of the predominant bacterial flora of soil. Journal of Applied Microbiology 14, 101-111.

Upadhyaya, A., Wright, S.F., 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Science 161, 575–586.

U.S.D.A., 2005. USDA (United States Department of Agriculture). Natural ResourcesConservation Service. National Soil Survey Handbook.

Van Zwieten, L., Meszaros, I., Downie, A., Chan, Y.K., Joseph, S., 2008. Soil Health: Can the cane industry use a bit of 'Black Magic'? Australian Canegrower 17, 10-11.

Verheijen, F., Jeffery, S., Bastos, A.C., Van der Velde, M., Diafas, I., 2010. Biochar Application to Soils: A Critical Scientific Review of Effects of Soil Properties, Processes and Functions. JRC Scientific and Technical Reports, EUR 24099 – EN, Italy.

Wallander, H., Nilsson, L.O., Hagerberg, D., Bååth, E., 2001. Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. New Phytologist 151, 753-760.

Watzinger, A., Feichtmair, S., Kitzler, B., Zehetner, F., Kloss, S., Wimmer, B., Zechmeister-Boltenstern, S., Soja, G. 2013. Soil microbial communities responded to biochar application in temperate soils and slowly metabolized 13C labelled biochar as revealed by 13 C PLFA analyses – results from a short term incubation and pot experiment. European Journal of Soil Science: online Doi: 10.1111/ejss.12100.

CAPITOLO 3 - SPERIMENTAZIONE IN SERRA

3.1 Materiali e metodi

Le prove sperimentali in serra sono state condotte su due colture estive di interesse agroalimentare, quali lattuga (*Lactuca sativa*) e pomodoro (*Lycopersicon esculentum*), ed una arborea di pioppo (clone I-214).

Per ciascuna di esse è stato effettuato uno studio degli effetti del biochar a partire da substrati caratterizzati da un diverso contenuto di nutrienti.

Poiché la letteratura riporta che l'aggiunta di biochar ad un terreno fertilizzato apporta maggiori benefici alle piante in termini di crescita, rispetto alla sua applicazione ad un terreno "povero" (Chan et al., 2007; Asai et al., 2009; Saarnio et al., 2013), nelle prove in vaso è stato scelto di utilizzare come substrato di crescita della piante oltre ad un terreno non fertilizzato anche del terreno ricco e del terreno fertilizzato con compost.

Il terreno di base, usato per la preparazione di tutte le altre tesi, povero dal punto di vista agronomico, è stato prelevato nei pressi dell'Università, nella zona di Fonte Lappone – Pesche (IS) (Lat 41° 37′ 00″ N; Long. 14° 17′ 00″ E; 732 111 m s.l.m.).

Prima dell'invasamento delle piante il terreno è stato lasciato ad asciugare all'aria e successivamente omogeneizzato per facilitare le operazioni di mescolamento, durante la preparazione dei diversi trattamenti; per questa sperimentazione è stato utilizzato lo stesso biochar utilizzato in campo.

La sperimentazione in vaso è stata allestita nel mese di Maggio 2014 ed è terminata al termine del ciclo colturale della lattuga (Luglio 2014) e del pomodoro (Settembre 2014).

Per il pioppo, invece la sperimentazione è stata allestita nel mese di Luglio 2014 ed è terminata a distanza di circa un anno, nel mese di Settembre 2015.

Durante tale periodo, per evitare gli effetti posizionali, è stata cambiata la posizione dei vasi almeno una volta alla settimana. Grazie ad un sistema di irrigazione automatico, tutti i vasi hanno ricevuto uguali dosi d'acqua tutti i giorni, due volte al giorno.

I diversi substrati di crescita sono stati caratterizzati eseguendo su ciascuno di essi le prove elencate al paragrafo 2.1.

Allestimento della sperimentazione su piante di Lactuca sativa

Per l'allestimento di questa sperimentazione sono stati utilizzati due substrati di controllo diversi: il terreno povero, di seguito denominato PS, tal quale e miscelato con compost (PSC).

Entrambi sono stati miscelati con biochar ottenendo rispettivamente PSB e PSCB.

Nel mese di Maggio 2014 piantine di Lattuga (Lactuca sativa L. var. longifolia) di un mese di età, son state trapiantate all'interno di vasi di plastica da 3.5 l, contenenti i seguenti trattameni (tabella 5)

Trattamenti		**Biochar (g/Kg)**	**Compost (g/Kg)**
PS	*Terreno di controllo*	*0*	*0*
PSB	*Terreno - biochar*	*65*	*0*
PSC	*Terreno - compost*	*0*	*40*
PSCB	*Terreno – compost - biochar*	*65*	*40*

Tabella 5: Descrizione dei trattamenti con biochar e compost

La sperimentazione è stata allestita come di seguito riportato (figura 26):

- 20 vasi contenenti terreno di controllo (PS);
- 10 vasi contenenti una miscela di terreno T e biochar (PSB);
- 10 vasi contenenti una miscela di terreno T e compost (PSC);
- 10 vasi contenenti una miscela di terreno PS, biochar e compost (PSCB).



Figura 26: Allestimento prove in vaso delle 4 tesi (PS; PSB; PSC; PSBC)

In questa sperimentazione sono state eseguite determinazioni chimico fisiche microbiologiche e di biomassa radicale.

Allestimento della sperimentazione su piante di Lycopersicon esculentum

Per questo studio sono stati utilizzati due substrati di controllo diversi: il terreno povero, di seguito denominato PT, utilizzato anche nella coltura delle piante di lattuga, ed un terreno torboso ricco, di seguito denominato PTR.

L'allestimento delle prove in vaso è stato effettuato nel mese di Maggio 2014, trapiantando piantine di pomodoro (*Lycopersicon esculentum)* di un mese di età in vasi di plastica da 5 l, contenenti i quattro trattamenti di seguito riportati in tabella 6:

Trattamenti		Biochar (g/Kg)
PT	*Terreno di controllo*	*0*
PTB	*Terreno - biochar*	*65*
PTR	*Terreno ricco*	*0*
PTRB	*Terreno ricco biochar*	*65*

Tabella 6: Descrizione dei trattamenti con biochar.

La sperimentazione è stata allestita come di seguito riportato (figura 27):

- 10 vasi contenenti terreno di controllo (PT);
- 10 vasi contenenti una miscela di terreno T e biochar (PTB);
- 20 vasi contenenti terreno ricco PTR;
- 10 vasi contenenti una miscela di terreno TR e biochar (PTRB).



Figura 27: Allestimento prove in vaso delle 4 tesi (PT; PTB; TR; TRC)

In questa sperimentazione sono state eseguite determinazioni chimico fisiche microbiologiche e di biomassa radicale.

Allestimento della sperimentazione su piante di pioppo

Talee del clone di pioppo I-214 sono state fatte radicare per circa 2 mesi in vasi da 3 L contenenti vermiculite.

In questo studio il terreno povero è stato miscelato a sabbia in rapporto 1:1, ottenendo il terreno T, che è stato utilizzato, oltre che come substrato di controllo, anche per la preparazione di altri tre trattamenti per miscelazione con compost e biochar, come riportato in tabella 7:

Trattamenti		**Biochar (g/Kg)**	**Compost (g/Kg)**
T	*Terreno di controllo*	*0*	*0*
TB	*Terreno - biochar*	*25*	*0*
TC	*Terreno - compost*	*0*	*25*
TCB	*Terreno – compost - biochar*	*25*	*25*

Tabella 7: Descrizione dei trattamenti con biochar.

L'allestimento delle prove in vaso, effettuato nel mese di Luglio 2014, è stato effettuato come è riportato di seguito vedi figura 28:

- 10 vasi da 20 l, contenenti terreno di controllo (T);
- 10 vasi da 20 l, contenenti una miscela di terreno T e biochar (TB);
- 10 vasi da 20 l, contenenti terreno Tmiscelato con compost TC;
- 10 vasi da 20 l, contenenti una miscela di terreno TC e biochar (TCB).

In questa sperimentazione sono state eseguite determinazioni chimico fisiche e di biomassa radicale.



Figura 28: Sistema sperimentale del clone di pioppo I-214.

Le modalità di campionamento finalizzato alle diverse indagini condotte nella sperimentazione in serra, sono descritte nell'articolo di Trupiano et al., 2017 allegato alla presente tesi, cui si rimanda per ulteriori dettagli.

Per le indagini chimico fisiche e microbiologiche, il campionamento è stato effettuato prelevando il terreno e le radici contenuti in tre vasi, scelti in maniera casuale, in corrispondenza dei substrati di controllo e di ciascuno dei trattamenti.

Essendo il substrato di crescita delle piante di pioppo di massa superiore, esso è stato steso su un telo di plastica, omogeneizzato e campionato in più punti in maniera casuale.

Dopo aver prelevato da ciascun campione un'aliquota destinata alle analisi microbiologiche, i diversi suoli sono stati posti a seccare all'aria all'interno di cassette forate, fino a peso costante, e successivamente trattati come descritto al paragrafo 2.1.

Caratterizzazione chimico fisica del suolo

I campioni di suolo sono stati caratterizzati mediante le determinazioni chimico fisiche elencate e descritte nel paragrafo 2.1.

Studio della biomassa radicale

In questa sperimentazione lo studio delle radici ha previsto la sola determinazione della biomassa radicale. A tale scopo le tre piante prelevate per ciascuno dei trattamenti sono state espiantate dal terreno avendo cura di evitarne la rottura delle radici, che sono state ripulite dal terreno per immersione in acqua, poste ad asciugare all'aria e successivamente in stufa a 60 °C per 48 h, al fine di determinarne il peso secco.

Analisi statistica

Per valutare le differenze significative tra le proprietà chimico fisiche e microbiologiche dei suoli e della biomassa radicale delle parcelle ammendate con biochar e di quelle di controllo, le analisi sono state effettuate in replicato (n=3). I dati ottenuti son stati analizzati mediante T-test a due code ad un livello di significatività del 95 % ($p < 0.05$).

3.2 Risultati relativi allo studio sulla lattuga e relativa discussione

I risultati relativi agli effetti del biochar sulle caratteristiche chimico fisiche e microbiologiche del terreno di crescita della Lattuga, sono stati riportati e discussi nell'articolo scientifico:

Trupiano, D., Cocozza, C., Baronti, S., Amendola, C., Vaccari, F.P., Lustrato, G., Di Lonardo, S., Fantasma, F., Tognetti, R., Scippa, G.S., 2017. The effect of biochar and its combination with compost on lettuce (Lactuca sativa L.) growth, soil properties and soil microbial population. International Journal of Agronomy, vol. 2017.

Nello specifico, il contributo di questa tesi nel lavoro sopracitato è stato relativo alle analisi degli effetti del biochar, del compost e della combinazione dei due ammendanti sulle caratteristiche chimico-fisiche del suolo e sulla componente biotica della rizosfera. Lo studio

ha previsto l'utilizzo di due diverse tipologie di suolo, che in base al diverso contenuto di nutrienti sono stati definiti suolo povero (PS) e suolo ricco (PSC).

Entrambi i suoli sono stati miscelati con biochar, ottenendo PSB e PSCB.

Come descritto nel lavoro di seguito riportato le analisi chimico fisiche hanno evidenziato sul primo un aumento di azoto e fosforo totale e di carbonio totale, in seguito all'aggiunta di biochar.

Per quanto riguarda la componente microbica, in PSB è emerso un decremento dell'abbondanza, accompagnato da un incremento significativo delle comunità correlate al ciclo dell'azoto, del fosforo e del carbonio.

In PSC sono state osservate variazioni consistenti di nutrienti, carbonio organico e biomassa microbica rispetto a PS, mentre in seguito all'aggiunta di biochar (PSCB) tali proprietà sono rimaste invariate , rispetto a PSC, sebbene l'attività enzimatica collegata alla mineralizzazione di azoto e fosforo siano risultate diminuite.

La biomassa radicale è risultata superiore nel suolo PSB, piuttosto che sul PS, mentre quella di PSCB è rimasta invariata rispetto a PSC.

Hindawi
International Journal of Agronomy
Volume 2017, Article ID 3158207, 12 pages
https://doi.org/10.1155/2017/3158207

Research Article

The Effects of Biochar and Its Combination with Compost on Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Growth, Soil Properties, and Soil Microbial Activity and Abundance

Dalila Trupiano,[1] Claudia Cocozza,[1] Silvia Baronti,[2] Carla Amendola,[1] Francesco Primo Vaccari,[2] Giuseppe Lustrato,[1] Sara Di Lonardo,[2] Francesca Fantasma,[1] Roberto Tognetti,[1] and Gabriella Stefania Scippa[1]

[1]*Dipartimento di Bioscienze e Territorio, Università degli Studi del Molise, 86090 Pesche, Italy*
[2]*Istituto di Biometeorologia-Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBIMET-CNR), 50145 Firenze, Italy*

Correspondence should be addressed to Dalila Trupiano; dalila.trupiano@unimol.it

Received 16 December 2016; Revised 6 March 2017; Accepted 19 March 2017; Published 5 April 2017

Academic Editor: Ibrokhim Y. Abdurakhmonov

Copyright © 2017 Dalila Trupiano et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Impacts of biochar application in combination with organic fertilizer, such as compost, are not fully understood. In this study, we tested the effects of biochar amendment, compost addition, and their combination on lettuce plants grown in a soil poor in nutrients; soil microbiological, chemical, and physical characteristics were analyzed, together with plant growth and physiology. An initial screening was also done to evaluate the effect of biochar and compost toxicity, using cress plants and earthworms. Results showed that compost amendment had clear and positive effects on plant growth and yield and on soil chemical characteristics. However, we demonstrated that also the biochar alone stimulated lettuce leaves number and total biomass, improving soil total nitrogen and phosphorus contents, as well as total carbon, and enhancing related microbial communities. Nevertheless, combining biochar and compost, no positive synergic and summative effects were observed. Our results thus demonstrate that in a soil poor in nutrients the biochar alone could be effectively used to enhance soil fertility and plant growth and biomass yield. However, we can speculate that the combination of compost and biochar may enhance and sustain soil biophysical and chemical characteristics and improve crop productivity over time.

1. Introduction

Soil fertility degradation, caused by erosion and depletion or imbalance of organic matter/nutrients, is affecting world agricultural productivity [1]. Inorganic fertilizers have played a significant role in increasing crop production since the "green revolution" [2]; however, they are not a sustainable solution for maintenance of crop yields [3]. Long-term overuse of mineral fertilizers may accelerate soil acidification, affecting both the soil biota and biogeochemical processes, thus posing an environmental risk and decreasing crop production [4]. Organic amendments, such as compost and biochar, could therefore be useful tools to sustainably maintain or increase soil organic matter, preserving and improving soil fertility and crop yield.

Biochar is a carbon-rich material obtained from thermochemical conversion (slow, intermediate, and fast pyrolysis or gasification) of biomass in an oxygen-limited environment. It can be produced from a range of feedstock, including forest and agriculture residues, such as straw, nut shells, rice hulls, wood chips/pellets, tree bark, and switch grass [5]. Biochar has been described as a possible tool for soil fertility improvement, potential toxic element adsorption, and climate change mitigation [6–8].

Indeed, several studies have shown that biochar application to soil can (i) improve soil physical and chemical properties [9, 10], (ii) enhance plant nutrient availability and correlated growth and yield [11, 12], (iii) increase microbial population and activities [13–15], and (iv) reduce greenhouse gas emissions through C sequestration [16].

TABLE 1: *Biochar and compost characteristics.* The complete biochar and compost characterization and related methods are detailed in Amendola et al. [31] and Alfano et al. [30], respectively. All concentrations refer to dry matter and represent the means of three replicates ± standard error.

	Biochar	Compost
pH	9.7 ± 0.1	7.5 ± 0.1
Alkalinity (% $CaCO_3$)	18.2 ± 0.7	6.5 ± 0.4
EC (dS/m)	7.5 ± 0.4	4.9 ± 0.3
Moisture (g/kg)	62.4 ± 1.3	3.4 ± 0.9
CEC (cmol/kg)	21.3 ± 0.2	21.0 ± 0.2
P_{tot} (g/kg)	12.2 ± 3.0	5.5 ± 0.6
N_{tot} (g/kg)	9.1 ± 0.2	12.0 ± 4.0
C_{tot} (g/kg)	778.1 ± 0.0	337.2 ± 0.3
C/N	125.5	28.1
Cultivable aerobic bacteria (log CFU/g)	Absent	7.6 ± 0.3
Eumycetes (log CFU/g)	Absent	4.9 ± 0.1
Actinomycetes (log CFU/g)	Absent	5.18 ± 0.2
Coliform bacteria (log CFU/g)	Absent	Absent
E. coli (log CFU/g)	Absent	Absent
Salmonellae spp. (log CFU/g)	Absent	Absent

The beneficial effects of biochar on plant productivity and soil microbial population are related to the improvement of specific surface area, cation exchange capacity, bulk density, pH, water, and nutrients within the soil matrix [17]. Beside the generally positive plant growth responses to biochar amendment, especially in acidic coarse texture soil, negligible or negative effects also occur due to types of feedstock and pyrolysis process, biochar application rate, plant species, and soil characteristics [18, 19]. Furthermore, in most cases, biochar does not provide high amounts of nutrients [20, 21].

Some recent studies have indicated that combined applications of biochar with organic or inorganic fertilizers could lead to enhanced soil physical, chemical, and biological properties, as well as plant growth. In particular, several composted materials represent a sustainable source of available nutrients that could enhance plant growth, ameliorating soil physicochemical characteristics and microbiological properties [22–26]. Liu et al. [26] showed that the combined application of compost and biochar had a positive synergistic effect on soil nutrient contents and water-holding capacity under field conditions. In addition, the combination of biochar with compost has proved to be suitable, allowing the reduction of fertilizer inputs, stabilizing the soil structure, and improving its nutrient content and water retention capacity [27, 28]. Again, these studies underline that compost and biochar combination could enhance compost properties, leading to a higher added value and a much better carbon sequestration potential due to the long-term stability of biochar [24, 25].

However, the literature shows that compost effects, as also reported above for biochar, can differ on soil biophysical-chemical properties and plant growth and yield on the basis of feedstock types, methods of producing, and application [29]. The objectives of this study were thus to determine the effect of biochar application alone, obtained from orchard pruning biomass by slow pyrolysis (550°C), or combined with compost, obtained from olive mill residues, on (i) plant growth, physiology, and yield, (ii) soil chemical characteristics, and (iii) soil microbiological abundance and enzyme activities. For this purpose, a short-term potting experiment was performed, using *Lactuca sativa* L. as reference plants and a soil poor in nutrients as growing substrate, to test the following hypotheses: biochar addition together with compost improves (1) soil chemical and (2) microbiological properties and enhances (3) plant growth and physiology more than compost and biochar alone.

2. Materials and Methods

2.1. Biochar, Compost, and Toxicity Test. The biochar used was a commercial charcoal (provided by Romagna Carbone s.n.c., Italy), obtained from orchard pruning biomass through a slow pyrolysis process at a temperature of 500°C in a transportable ring kiln 2.2 m in diameter that holds around 2 t of feedstock.

An olive waste compost was used, prepared in a specific experimental composting process, following Alfano et al. [30]. Briefly, compost was prepared mixing humid olive husks, from a two-phase extraction plant, with olive leaves (8% w/w); one-year-old, humid, composted husks (25% w/w) were then added to this mixture. Biochar and compost characteristics are summarized in Table 1 and analytical methods are provided in Amendola et al. [31] and Alfano et al. [30].

Biochar and compost phytotoxicity was assessed through the germination index ($GI_{\%}$) of cress plants (*Lepidium sativum* L.) [26]. Three different solutions were used to evaluate the biochar and compost toxicity on seed germination: sterile deionized water as control solution and solutions containing 50% and 75% extract of biochar or compost. Solutions were added to Petri dishes containing 10 sterile seeds of *L. sativum*. Germination percentage and plant root length were recorded after incubation for 42 h at 27°C in the dark (according to Vitullo et al. [32]). Seeds

were scored as germinated if the radicle exceeded the length of the longest seed coat dimension. The seed germination percentage was assessed according to the formula: $GI_{\%} = (G_s L_s)/(G_c L_c) \times 100$, where G_s and L_s are seed germination and root elongation (mm) for the samples and G_c and L_c the corresponding values for controls. The test was repeated in triplicate. The $GI_{\%}$ was obtained by means of $GI_{50\%}$ and $GI_{75\%}$ values. Potential toxicity of biochar was also tested on earthworms (*Lumbricus terrestris* L). For the earthworm avoidance test, equal amounts of unfertilized soil with and without biochar (65 g kg^{-1} of dry soil) were placed in two halves of a pot (50 × 30 cm). Forty earthworms were released between the two substrates. After 48 hours, the pot was examined to determine the soil selected by earthworms [33].

2.2. Experimental Design. One-month-old lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *longifolia*) seedlings (Vivaio Mignogna, Ripamolisana, Molise, Italy) were transplanted into plastic pots (3.5 l) prepared with four different substrates: (i) unfertilized soil (PS); (ii) unfertilized soil plus compost (PSC); (iii) unfertilized soil plus biochar (PSB); and (iv) unfertilized soil plus compost and biochar (PSCB). Plants were then grown until maturity (9 weeks) in a screened greenhouse (University of Molise, Pesche, Italy; Lat 41°37′00″N; Long. 14°17′00″E; 510 m a.s.l.) under a controlled water regime, temperatures ranging between 12 and 25°C, and natural day length corresponding to spring-summer season (May–July). Soil was collected from an uncultivated pasture area, located in Pesche, with a floral composition predominantly of graminoid grasses, not under a rotation system and that includes hedges. This area is mainly used for grazing, but the fodder is harvested mechanically. The preplanting physicochemical properties of the soil are given in Supporting Information (Table S1 in Supplementary Material available online at https://doi.org/10.1155/2017/3158207). Briefly, the soil was moderately subalkaline (0–30 cm) with a clay texture according to United States Department of Agriculture classification [34]; it was characterized by low electrical conductivity (EC), cation exchange capacity (CEC), and nitrogen and carbon content; it is unlikely that this soil already contained charcoal as there had been no tradition of crop residue or other burning on the land. For the experiment, soil was air-dried for 72 h, weighed and finely crushed, and then mixed thoroughly before packing lightly in the pots on top of 100 g of pebbles placed on the base to improve drainage. The weight of each filled pot was 3000 g.

Biochar and compost application rates were set up on the basis of previous lettuce pot and field researches [12, 35–39]. In detail, data reported by Carter et al. [35] showed that 50 and 150 g kg^{-1} rice-husk biochar application rate led to a highly positive effect on lettuce growth in compost fertilized and unfertilized soils, respectively. Based on this finding, in the present study, biochar and compost were supplied at an application rate of 65 g and 50 g per kg of dry soil, respectively. After mixing, the pots were filled in order to ensure the same soil bulk density. There were ten pots (one plant per pot) for each treatment arranged in a complete randomized block design and rotated each day to a different position within the block for the duration of the trial. The pots were fully irrigated to prevent water stress (twice a day, as required) and a suspended shade cover net was used to reduce exposure to sunlight.

2.3. Soil Analyses. Soils were sampled at the end of the experiment and air-dried for 72 h. The moisture content was calculated according to the Black method [40] as the difference in sample weight before and after oven drying to constant weight at 105°C. The pH was measured by potentiometry (pH meter Eutech Instruments) in H_2O and 0.01 M $CaCl_2$ using a 1 : 2.5 soil : extract-volume ratio. Alkalinity of samples with a pH value greater than 7.0 was determined by titrimetry according to the Higginson and Rayment method [41, 42]. Electrical conductivity (EC) was determined by a conductivity meter (Cond 510, XS Instruments) on a 1 : 5 soil : water suspension [41, 42]. Ash content was determined by igniting an oven-dried sample in a muffle furnace at 440 ± 40°C, according to the American Society for Testing and Materials [43]. Cation exchange capacity (CEC) was assessed according Mehlich [44] using the $BaCl_2$. For total nitrogen (N_{tot}) determination a modified Kjeldahl procedure was used with Devarda's alloy pretreatment, important to recover both NO_3^--N and NO_2^--N [45]. Total phosphorus (P_{tot}) was detected by spectrophotometry (UV-1601 Shimadzu) according to the test method described by Bowman [46]. Available phosphorus (P_{av}) was extracted by a $NaHCO_3$ solution at pH 8.5 and evaluated by spectrophotometry according to the Olsen test method [47]. Total carbon (C_{tot}) content was determined using a CHN autoanalyzer (CHN 1500, Carlo Erba) [48].

2.4. Plant Analysis. Plant morphological analyses were performed weekly by measuring the main leaf parameters: number (LN); area (LA); length (LL); width (LW); and perimeter (LP). The Image J 1.41 (https://rsb.info.nih.gov/ij/) software was used for analysis. In addition, at the end of the experiment, leaf and root biomass allocation was determined before (fresh weight, FW) and after (dry weight, DW) two days of drying in an oven at 60°C. The measurements were performed on six plants.

Leaf water potential (ψ) was measured using a pressure chamber (PMS, Instrumentation Co., Corvallis, OR, USA). Leaf gas exchange measurements were performed using a portable gas exchange system (CIRAS-1, PP Systems, Hertz, Hitchin, UK). Leaf gas exchanges and ψ were measured on the fourth fully expanded and sun exposed leaf on a cloud-free day (after 3 months of growth). These measurements were taken on five plants (one leaf per plant) per treatment around midday (between 11.30 a.m. and 1.30 p.m.).

Chlorophyll content was also measured. For this, chlorophylls *a* (Chl*a*) and *b* (Chl*b*) were extracted from three randomly sampled leaf discs (10 mm) with N,N dimethylformamide (DMF). Extraction was performed for 48 h at 4°C in the dark at a ratio of 1 : 20 (plant material : solvent, w : v) [49]. The extinction coefficients proposed by Inskeep and Bloom [50] were used for the quantification by spectrophotometric analysis. The following formulas were used: $\text{Chl } a = 12.70_{A664.5} - 2.79_{A647}$; $\text{Chl } b = 20.70_{A647} - 4.62_{A664.5}$;

Chl = $17.90_{A647} + 8.08_{A664.5}$, where A is absorbance in 1.00 cm cuvettes and Chl is mg per l. The leaf area Chl content was then calculated (mg cm^{-2}) together with the Chl *a*/Chl *b* ratio by dividing the Chl *a* content by the Chl *b* content.

2.5. Microbiological Analyses. Cellular cultivability was assessed by plate-counting. Cultivable aerobic bacteria in soil samples were analyzed on standard plate count agar (Difco Bekton Dikson, Milan, Italy), at 28 and 55°C for 48 h; actinomycetes on actinomyces agar (Difco), at 28°C and 55°C for 48–72 h; eumycetes on malt agar (Difco) + rose bengal 33 mg l^{-1} and tetracycline 100 ml l^{-1}, at 28°C for 72 h, following the method described by Alfano et al. [30]. Cellular counts were done in triplicate by performing quantitative determinations on the basis of colony forming units (CFU) in agarized media, according to Alfano et al. [30]. All results are expressed as log CFU/g DW, after drying aliquots of the samples at 105°C for 48 h.

Soil enzymatic activities were determined by the API-ZYM system (bio-Mérieux Italia, Rome, Italy). With the API-ZYM system, semiquantitative evaluation of the activities of 19 hydrolytic enzymes [alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase-lipase (C8), lipase (C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, α-chymotrypsin, acid phosphatase, phosphoamidase, α-galactosidase, β-galactosidase, β-glucuronidase, α-glucosidase, β-glucosidase, N-acetyl-β-glucosaminidase, α-mannosidase, and α-fucosidase] was determined [51, 52]. Using a sterile Pasteur pipette, each gallery was inoculated with two drops of 10^{-1} or 10^{-2} suspensions of 20 g of soil in 180 mL of sterile saline solution (0.9% NaCl, w/v). The color that developed in each enzymatic reaction was assigned according to the color chart (range 0–5) supplied with the system, and this, in accordance with reported procedures, provided the conversion evaluation of the hydrolyzed substrates in nanomoles [51]. The samples were analyzed in triplicate and the average data were used. Results were expressed as enzyme relative activity/g of DW of substrate; data were corrected by the dilution factor.

2.6. Statistical Analysis. Analysis of variance (ANOVA) was applied in order to evaluate the effect of each treatment on soil proprieties, chlorophyll, ecophysiology, and microbiological data (one-way ANOVA) and the effect of day, treatments, and their interaction (two-way ANOVA) for plant morphological data. To assess the differences in the measured parameters among treatments, a postmeans comparison was performed using the Fisher least significant difference (LSD) test at the 0.05 significance level. Statistical analysis was conducted with OriginPro version 8.5.1 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

3. Results

3.1. Biochar and Compost Characteristics. Biochar and compost used for the experiment were previously analyzed by Amendola et al. [31] and Alfano et al. [30], respectively. Main biochar and compost characteristics are summarized in Table 1. Briefly, as in the majority of biochar, the pH value was within the range of alkalinity. The C_{tot} and N_{tot} contents of biochar were 77.8% and 0.9%, respectively, according to Class 1 of the Guidelines for Certification of the International Biochar Initiative (IBI, http://www.european-biochar.org/en/ebc-ibi). The compost was mature, showing stable chemical and microbiological characteristics, with the potential to be used as an agricultural substrate or soil conditioner.

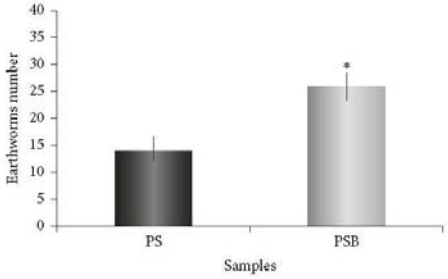


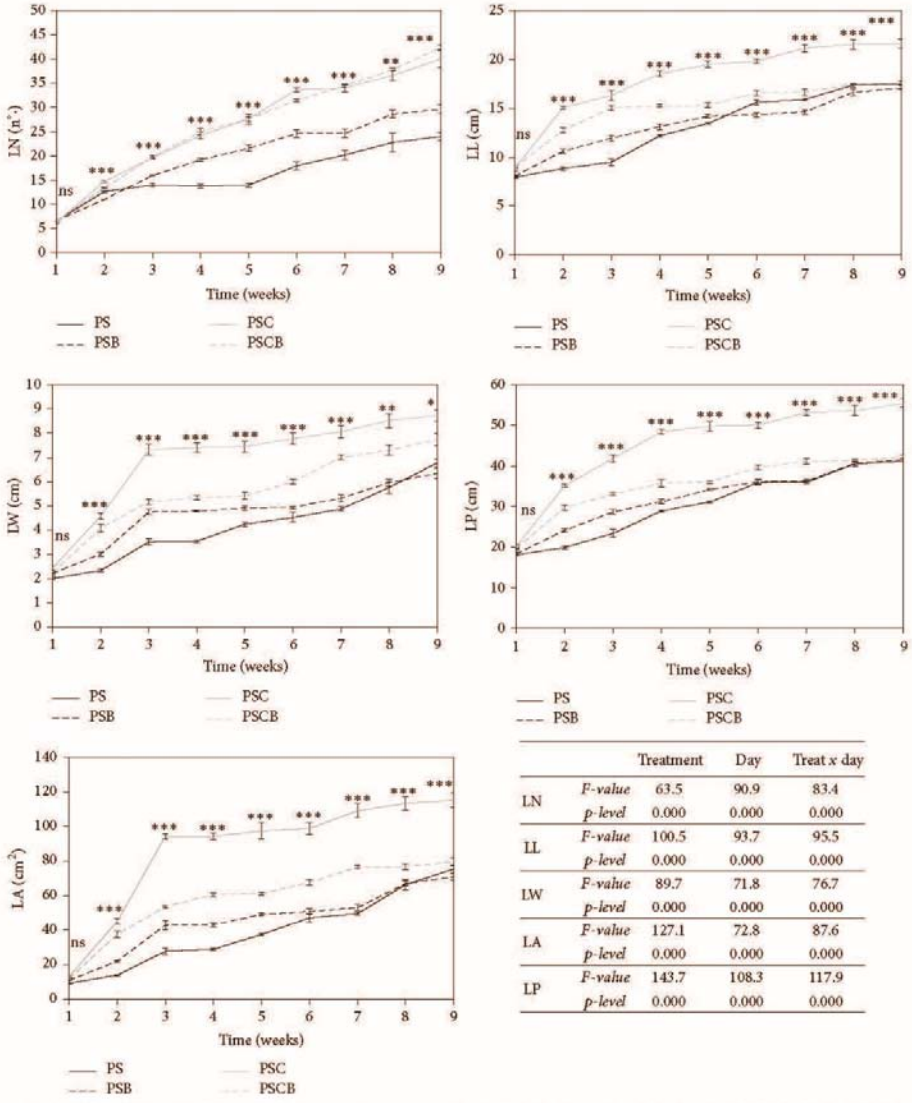
FIGURE 1: *Earthworms avoidance test.* Number of earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) recovered in unfertilized (PS) versus unfertilized plus biochar (PSB) soil compartments after 48 h. Vertical bars represent the standard error of the mean of three replicates of 40 earthworms each. Asterisks indicate significant differences ($p \leq 0.05$).

The results showed that biochar was not toxic for soil biotic communities, *L. sativum* seeds, or earthworms. Indeed, the phytotoxicity test with *Lepidium* showed no effects of biochar and compost on the germination index (82 ± 4 and 95 ± 4%, resp.) compared to the control (water; 100 ± 2%) (data not shown), while the avoidance test showed that *L. terrestris* preferred the biochar-amended soil (Figure 1).

3.2. Soil Characterization. Soil chemical analysis showed that the addition of biochar induced a significant increase of pH values from 6.9 (PS) to 8.0 and from 7.5 (PSC) to 7.7 in PSB and PSCB, respectively. On the contrary, the alkalinity value did not change in PSB and PSCB compared to PS and PSC, respectively (Table 2).

An increase of total N content from 0.8 (PS) to 1.2 was observed in PSB. Conversely, the EC increased about 1.4 and 1.1 fold in PSB and PSCB, respectively, while moisture decreased 0.8-fold in PSCB. Ash content slightly decreased in PSB and PSCB. The P_{tot} was increased about 1.5-fold in PSB, whereas no alteration was observed in PSBC. On the contrary, the P_{av} was 2-fold greater in PSCB than PSC. The C_{tot} content was significantly increased in PSB (5-fold) and PSCB (2-fold) compared to the relative controls (PS and PSC). The CEC value was also slightly increased in PSB and PSCB compared to PS and PSC, respectively. All the above parameters were increased in PSCB compared to PSB, except for pH, moisture, and ash that decreased.

3.3. Plant Growth. Significant differences in growth parameters were recorded between treatments (Figure 2). In detail, lettuce plants showed higher leaf number in PSB than PS



		Treatment	Day	Treat *x* day
LN	*F-value*	63.5	90.9	83.4
	p-level	0.000	0.000	0.000
LL	*F-value*	100.5	93.7	95.5
	p-level	0.000	0.000	0.000
LW	*F-value*	89.7	71.8	76.7
	p-level	0.000	0.000	0.000
LA	*F-value*	127.1	72.8	87.6
	p-level	0.000	0.000	0.000
LP	*F-value*	143.7	108.3	117.9
	p-level	0.000	0.000	0.000

FIGURE 2: *Morphological analysis.* The main leaf parameters were analyzed: LN = leaf number; LL = leaf length; LW = leaf width; LA = leaf area; LP = leaf perimeter. Data represent the mean ($n = 6$) ± standard error. Mean values marked with asterisks are statistically different at $^{***}p \leq 0.0001$, at $^{**}p \leq 0.005$, and at $^{*}p \leq 0.01$. Two-way ANOVA was applied to weigh the effects of day, treatment, and their interactions on plant growth parameters (p and F level values are reported). PS = lettuce plants grown in unfertilized soil; PSB = lettuce plants grown in unfertilized soil plus biochar; PSC = lettuce plants grown in unfertilized soil plus compost; and PSCB = lettuce plants grown in unfertilized soil plus compost and biochar.

TABLE 2: *Soil chemical properties.* Data represent the mean ($n = 4$) ± standard error. Mean values marked with the same letter are not statistically different. One-way ANOVA was applied to weigh the effects of different treatments ($p < 0.05$).

	PS	PSB	PSC	PSCB
pH	6.9 ± 0.2^{d}	8.0 ± 0.0^{a}	7.5 ± 0.0^{c}	7.7 ± 0.0^{b}
Alkalinity (% $CaCO_3$)	7.7 ± 0.4^{a}	5.9 ± 0.5^{a}	6.4 ± 0.3^{a}	7.1 ± 0.4^{a}
EC (dS/m)	0.71 ± 0.0^{c}	1.0 ± 0.0^{b}	1.3 ± 0.1^{b}	1.5 ± 0.0^{a}
Moisture (g/kg)	63.0 ± 1.6^{a}	58.8 ± 0.3^{b}	61.8 ± 0.9^{a}	47.0 ± 2.1^{c}
Ash (%)	93.8 ± 0.2^{a}	90.0 ± 0.5^{b}	90.8 ± 0.7^{b}	86.0 ± 0.3^{c}
N_{tot} (g/kg)	0.8 ± 0.0^{c}	1.2 ± 0.0^{b}	1.9 ± 0.2^{a}	2.2 ± 0.0^{a}
P_{tot} (mg/kg)	199.9 ± 9.9^{c}	376.6 ± 52.3^{b}	455.6 ± 33.3^{ab}	471.0 ± 1.3^{a}
P_{av} (mg/kg)	$<12.0 \pm 0.0^{c}$	$<12.0 \pm 0.0^{c}$	24.9 ± 3.9^{b}	58.3 ± 4.5^{a}
C_{tot} (g/kg)	12.8 ± 0.5^{c}	59.1 ± 0.0^{a}	29.1 ± 0.8^{b}	65.9 ± 2.2^{a}
CEC (cmol/kg)	39.3 ± 0.0^{d}	40.4 ± 0.0^{b}	39.9 ± 0.0^{c}	43.6 ± 0.0^{a}

PS: unfertilized soil.
PSB: unfertilized soil plus biochar.
PSC: compost fertilized soil.
PSCB: compost fertilized soil plus biochar.

while leaf length, width, area, and perimeter were unchanged. Plants grown in PSCB showed lower leaf length, width, area, and perimeter compared to PSC while leaf number was unchanged. Furthermore, all leaf parameters were increased in PSC compared to PS and also in PSCB compared to PSB, although they were almost unchanged at the end of treatment (after 9 weeks).

Total plant dry weight, considering leaf and root biomass, increased in PSB compared to PS; on the contrary, leaf biomass decreased in PSCB and root biomass was unchanged compared to PSC and PSB (Figure 3). Chlorophyll content did not show significant changes between treatments (data not shown).

The leaf water potential was more negative in plants grown in PS than those grown in other substrates, followed by PSB and PSC and PSCB (Figure 4).

Stomatal conductance showed no significant differences between control and treated plants (Figure 5), while transpiration rate was slightly increased in PSCB and unchanged in PSC and PSB compared to PS (Figure 5). Assimilation rate was not altered by treatment with biochar (PSB) and biochar-compost (PSCB). In particular, plants showed the highest assimilation rate and water use efficiency in PSC (Figure 5).

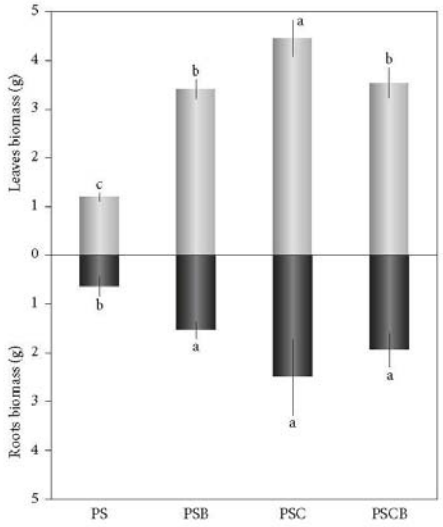


FIGURE 3: *Effects of biochar and/or compost on leaf and root biomass (g of dry tissue weight).* Data represent the mean ($n = 6$) ± standard error. Mean values marked with the same letter are not statistically different. One-way ANOVA was applied to weigh the effects of different treatments ($p \leq 0.05$). PS = lettuce plants grown in unfertilized soil; PSB = lettuce plants grown in unfertilized soil plus biochar; PSC = lettuce plants grown in unfertilized soil plus compost; and PSCB = lettuce plants grown in unfertilized soil plus compost and biochar.

3.4. Cultivable Microorganisms. The analysis of cultivable microorganisms showed that in PSB the cultivable aerobic bacteria, actinomycetes, and eumycetes decreased ($p \leq 0.05$) compared to PS while they were unchanged in PSBC compared to PSC (Table 3). Furthermore, the abundance of cultivable aerobic bacteria and eumycetes was higher in PSC than PS while actinomycetes were unchanged; all cultivable microorganisms increased in PSCB compared to PSB (Table 3).

3.5. Soil Enzyme Activities. Enzymatic profile analysis revealed that all enzymatic activities were increased in PSC compared to PS, except lipase-esterase and esterase that were unchanged. Biochar treatment alone or in combination with compost induced specific enzymatic variations. In detail, in PSB, compared to PS, the activities of alkaline phosphatase, acid phosphatase, chymotrypsin, trypsin, phosphohydrolase, lipase-esterase, and esterase were increased, while lipase was

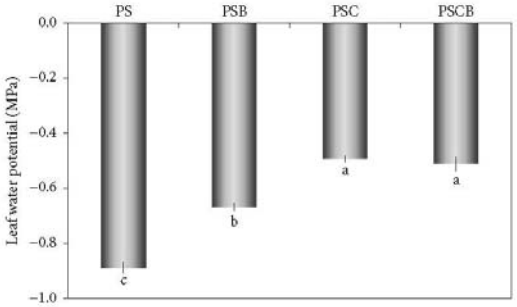


FIGURE 4: *Leaf water potential at midday of plants grown in different substrates.* Values are means ($n = 5$) ± standard error; significant differences between the means (at least $p \leq 0.05$, according to ANOVA) appear with different letters. PS = lettuce plants grown in unfertilized soil; PSB = lettuce plants grown in unfertilized soil plus biochar; PSC = lettuce plants grown in unfertilized soil plus compost; and PSCB = lettuce plants grown in unfertilized soil plus compost and biochar.

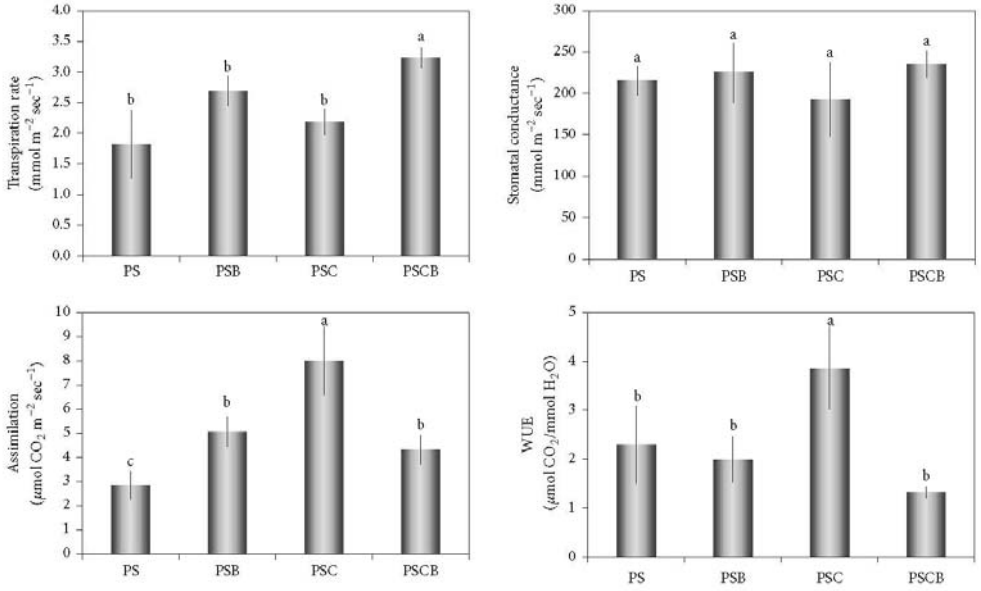


FIGURE 5: *Transpiration rate, stomatal conductance, assimilation, and water use efficiency (WUE) of plants grown in different soils.* Values are means ($n = 5$) ± standard error; significant differences between the means (at least $p \leq 0.05$, according to ANOVA) appear with different letters. PS = lettuce plants grown in unfertilized soil; PSB = lettuce plants grown in unfertilized soil plus biochar; PSC = lettuce plants grown in unfertilized soil plus compost; and PSCB = lettuce plants grown in unfertilized soil plus compost and biochar.

unchanged (Table 4). In PSBC, compared to PSC, alkaline phosphatase, acid phosphatase, lipase-esterase, and esterase strongly increased ($p \leq 0.01$), whereas chymotrypsin and trypsin activities decreased ($p \leq 0.05$) and phosphohydrolase and lipase activities were lost (Table 4). In PSCB, compared to PSB, we recorded that alkaline phosphatase and acid phosphatase increased and trypsin, phosphohydrolase, and esterase decreased, while chymotrypsin, lipase-esterase, and lipase were unchanged ($p \leq 0.05$).

4. Discussion

The study showed that both biochar amendment and compost addition to a soil poor in nutrients induced a positive effect on

TABLE 3: *Soil microbiological characteristics.* Values are expressed as log CFU/g dry weight (DW). Data represent the mean ($n = 3$) ± standard error. Mean values marked with the same letter are not statistically different. One-way ANOVA was applied to weigh the effects of different treatments ($p < 0.05$). PS = unfertilized soil; PSB = unfertilized soil plus biochar; PSC = unfertilized soil plus compost; and PSCB = unfertilized soil plus compost and biochar.

	PS	PSB	PSC	PSCB
Cultivable aerobic bacteria	10.97 ± 0.17^{a}	7.88 ± 0.18^{c}	8.84 ± 0.20^{b}	8.35 ± 0.21^{b}
Actinomycetes	8.67 ± 0.15^{a}	5.2 ± 0.12^{c}	6.4 ± 0.3^{b}	6.1 ± 0.2^{b}
Eumycetes	8.85 ± 0.12^{a}	7.89 ± 0.08^{b}	8.74 ± 10.40^{a}	8.52 ± 0.14^{a}

TABLE 4: *Soil enzymatic activities.* Soil enzymatic activities were determined by the API-ZYM system (bio-Mérieux Italia). Results are expressed as nanomoles/g of dry weight of substrate; the data have been corrected by the dilution factor. PS = unfertilized soil; PSB = unfertilized soil plus biochar; PSC = unfertilized soil plus compost; and PSCB = unfertilized soil plus compost and biochar.

Enzyme	PS	PSB	PSC	PSCB
Alkaline phosphatase	250 ± 25^{c}	500 ± 25^{b}	500 ± 50^{b}	1000 ± 50^{a}
Acid phosphatase	250 ± 25^{c}	500 ± 50^{b}	500 ± 25^{b}	1000 ± 100^{a}
Chymotrypsin	10 ± 5^{c}	250 ± 25^{b}	500 ± 25^{a}	250 ± 25^{b}
Trypsin	10 ± 5^{d}	250 ± 50^{b}	500 ± 50^{a}	100 ± 25^{c}
Phosphohydrolase	10 ± 5^{c}	250 ± 25^{b}	500 ± 50^{a}	10 ± 5^{c}
Lipase-esterase	10 ± 5^{b}	500 ± 50^{a}	10 ± 5^{b}	500 ± 25^{a}
Esterase	10 ± 5^{b}	500 ± 25^{a}	10 ± 5^{b}	10 ± 5^{b}
Lipase	10 ± 5^{b}	10 ± 5^{b}	250 ± 25^{a}	10 ± 5^{b}

lettuce plant growth and physiology and on soil chemical and microbiological characteristics; however, no positive synergic or summative effects exerted by compost and biochar in combination were observed.

In detail, the biochar alone induced a positive lettuce yield response, although transpiration, stomatal conductance, and assimilation rate did not show relevant variations. Positive yield responses to biochar addition have been reported for a wide variety of crops. For example, it is reported that maize yield increased by 98–150% as a result of manure biochar addition [53], lettuce and *Arabidopsis* plant biomass increased by 111% after poplar wood chips biochar addition [54], and wheat grain yield increased by 18% with the use of oil mallee biochar [55].

A possible explanation is that the biochar, increasing the pH, CEC, N_{tot}, C_{tot}, P_{tot}, and water content, could enhance available nutrients for plants and, consequently, biomass accumulation [22, 56]. In fact, the increase in CEC value could be driven by the presence of cation exchange sites on the biochar surface [10, 57], and, as also reported in Vaccari et al. [58], this could contribute to retaining NH_4^+, leading to improved N nutrition in biochar-amended soils [59–61]. This would confirm a direct biochar role in the nutrient supply to plants [20, 62]. The increased pH in biochar treated soil could also be indirectly related to growth stimulation in lettuce. Indeed, Beesley and Dickinson [63] hypothesized that soil alkalization caused by biochar addition might positively influence earthworms, as also observed in our study, with a subsequent positive effect on dissolved organic carbon content. The pH value has also been found to influence the soil microbial population and enzymatic activities; indeed, a high pH might enhance bacteria abundance, whereas it did not change fungi total biomass or dramatically reduce their growth [64, 65]. The activity of alkaline phosphatase, aminopeptidase, and N-acetylglucosaminidase enzymes has also been reported to increase after biochar applications [66, 67]. In accordance with this evidence, our results showed that the biochar alone decreased cultivable microorganisms abundance, while it enhanced the activity of enzymes involved in phosphorus, nitrogen, and carbon cycling (alkaline phosphatase, acid phosphatase, phosphohydrolase, lipase-esterase, esterase, chymotrypsin, and trypsin). These results could indicate that although the bacteria abundance could be reduced by biochar soil alkalization, the microbial communities related to nitrogen, phosphorus, and carbon cycling could be stimulated by biochar-induced increasing of soil P_{tot}, N_{tot}, and C_{tot} availability [68, 69].

Nevertheless, the compost alone amendment showed the best clear and positive effects on plant growth and yield and on soil chemical characteristics. Indeed, according to data reported in the literature [70, 71], in compost amended soil lettuce plants showed the maximum total biomass accumulation, assimilation rate, and water use efficiency, probably due to the high soil nutrients availability (soil C_{tot}, N_{tot}, P_{tot}, and P_{av} content was increased). This high soil nutrient status could also have enhanced the activity of enzymes involved in phosphorus and nitrogen cycling (phosphohydrolase, chymotrypsin, and trypsin), which increased compared to those in the unamended soils; on the other hand, the slight pH increase could be responsible for the decrease of cultivable bacteria.

No synergic or positive effects exerted by compost and biochar combination were observed here compared to the compost alone treatment. Indeed, we showed that lettuce

growth changes were negligible combining compost and biochar amendment, although, as shown above, the amount of compost applied and the nutrients supplied were adequate to produce the highest plant benefits in the compost alone treatment. Furthermore, compared to the addition of compost alone, the compost and biochar combination did not improve soil chemical characteristics, except for an increase in C_{tot} and P_{av} content. These increases could be related to biochar capacity to enhance C accumulation and sequestration and to retain and exchange phosphate ions by its positively charged surface sites [59, 60]. Additionally, in compost and biochar-amended soil, microorganism abundance was unchanged while the activity of enzymes involved in N and P mineralization (chymotrypsin, trypsin, and phosphohydrolase) was reduced or completely lost compared to those in the compost alone treatment.

It is reported that biochar can have significant effects on microbially mediated transformation of nutrients by its surface interaction with substrate and soil microbial enzymes [72, 73] or by inducing soil alkalization [74]. Indeed, we hypothesized that soil microbial abundance and activities were shaped by nutrient availability and pH, which in turn could be balanced by biochar-compost combination. However, the biochar benefits could be amplified over time through surface oxidation and bioactivation with soil microbes and fungi [75, 76]. In addition, given that the beneficial effects of biochar were found to increase more in sandy than in loamy substrates [25], we hypothesized that, in PSCB, the high nutrient status, due to the compost, could have masked biochar effects [77].

In summary, our short-term potting experiment clearly demonstrated that compost addition provided the best solution regarding soil quality and fertility, which were also reflected in best plant growth and biomass yield.

Furthermore, taking into account that the soil used in this study had low nutrient status, suboptimal for plant growth without additions of organic and/or inorganic amendments, these results demonstrate that the application of biochar alone could also be effectively used to enhance soil fertility and plant growth and biomass yield. This may have important implications for sustainable low-input agriculture, with economic and environmental benefits for both marginal and productive cropland.

Nevertheless, unexpectedly, combined application of biochar and compost did not outperform compost amendment in terms of biomass yield and soil fertility. However, it may enhance and sustain soil biophysical and chemical characteristics over time, given that most of compost will disappear through mineralization within 5 years after application whereas most of the biochar will stay in the soil for decades [20, 78].

Further long-term and large-scale field experiments are required to analyze differences over time and in particular to quantify the amount of recalcitrant carbon supplied and sequestered in the soil by both biochar alone and the combination of biochar and compost. Their benefits and effects in terms of improving and sustaining soil fertility, crop productivity, and economic returns to users should be also evaluated over time.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Authors' Contributions

Gabriella Stefania Scippa coordinated the project. Gabriella Stefania Scippa, Dalila Trupiano, Claudia Cocozza, and Roberto Tognetti conceived and designed the experiments. Dalila Trupiano, Carla Amendola, Claudia Cocozza, Francesca Fantasma, Silvia Baronti, Sara Di Lonardo, and Giuseppe Lustrato performed the experiments. Dalila Trupiano, Carla Amendola, Claudia Cocozza, Silvia Baronti, Sara Di Lonardo, and Giuseppe Lustrato analyzed data. Gabriella Stefania Scippa contributed reagents/materials/analysis tools. Dalila Trupiano wrote the manuscript. Claudia Cocozza, Roberto Tognetti, Silvia Baronti, and Francesco Primo Vaccari revised the manuscript. All authors approved the manuscript.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Luisa Andrenelli and Dr. Adriano Baglio (University of Florence), Italian Biochar Association (ICHAR http://www.ichar.org), and Federica Oliva (University of Molise) for their technical support during laboratory measurements. Research was supported by grants from Molise Region (PSR Molise 2007/2013-Misura 124) through the ProSEEAA Project (CUP: D95F14000030007) and it contributes to the EuroCHAR Project (FP7-ENV-2010 ID-265179).

References

[1] J. A. Foley, R. DeFries, G. P. Asner et al., "Global consequences of land use," *Science*, vol. 309, no. 5734, pp. 570–574, 2005.

[2] E. Liu, C. Yan, X. Mei et al., "Long-term effect of chemical fertilizer, straw, and manure on soil chemical and biological properties in northwest China," *Geoderma*, vol. 158, no. 3-4, pp. 173–180, 2010.

[3] B. Vanlauwe, A. Bationo, J. Chianu et al., "Integrated soil fertility management: operational definition and consequences for implementation and dissemination," *Outlook on Agriculture*, vol. 39, no. 1, pp. 17–24, 2010.

[4] J. C. Aciego Pietri and P. C. Brookes, "Relationships between soil pH and microbial properties in a UK arable soil," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 40, no. 7, pp. 1856–1861, 2008.

[5] S. Sohi, E. Lopez-Capel, E. Krull, and R. Bol, "Biochar, climate change and soil: a review to guide future research," CSIRO Land and Water Science Report 05/09, 2009.

[6] C. J. Ennis, A. G. Evans, M. Islam, T. K. Ralebitso-Senior, and E. Senior, "Biochar: carbon sequestration, land remediation, and impacts on soil microbiology," *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, vol. 42, no. 22, pp. 2311–2364, 2012.

[7] S. Malghani, G. Gleixner, and S. E. Trumbore, "Chars produced by slow pyrolysis and hydrothermal carbonization vary in carbon sequestration potential and greenhouse gases emissions," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 62, pp. 137–146, 2013.

[8] C. E. Stewart, J. Zheng, J. Botte, and M. F. Cotrufo, "Co-generated fast pyrolysis biochar mitigates green-house gas emissions and increases carbon sequestration in temperate soils," *GCB Bioenergy*, vol. 5, no. 2, pp. 153–164, 2013.

[9] A. Mukherjee and R. Lal, "Biochar impacts on soil physical properties and greenhouse gas emissions," *Agronomy*, vol. 3, pp. 313–339, 2013.

[10] S. P. Sohi, E. Krull, E. Lopez-Capel, and R. Bol, "A review of biochar and its use and function in soil," *Advances in Agronomy*, vol. 105, no. 1, pp. 47–82, 2010.

[11] L. A. Biederman and W. Stanley Harpole, "Biochar and its effects on plant productivity and nutrient cycling: a meta-analysis," *GCB Bioenergy*, vol. 5, no. 2, pp. 202–214, 2013.

[12] S. Jeffery, F. G. A. Verheijen, M. van der Velde, and A. C. Bastos, "A quantitative review of the effects of biochar application to soils on crop productivity using meta-analysis," *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol. 144, no. 1, pp. 175–187, 2011.

[13] N. M. Jaafar, P. L. Clode, and L. K. Abbott, "Microscopy observations of habitable space in biochar for colonization by fungal hyphae from soil," *Journal of Integrative Agriculture*, vol. 13, no. 3, pp. 483–490, 2014.

[14] R. S. Quilliam, H. C. Glanville, S. C. Wade, and D. L. Jones, "Life in the 'charosphere'—does biochar in agricultural soil provide a significant habitat for microorganisms?" *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 65, pp. 287–293, 2013.

[15] J. Lehmann, M. C. Rillig, J. Thies, C. A. Masiello, W. C. Hockaday, and D. Crowley, "Biochar effects on soil biota—a review," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 43, no. 9, pp. 1812–1836, 2011.

[16] K. Crombie, O. Mašek, A. Cross, and S. Sohi, "Biochar—synergies and trade-offs between soil enhancing properties and C sequestration potential," *GCB Bioenergy*, vol. 7, no. 5, pp. 1161–1175, 2015.

[17] J. Thies and M. C. Rillig, "Characteristics of biochar: biological properties," in *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*, J. Lehmann and S. Josep, Eds., Earthscan, London, UK, 2009.

[18] K. A. Spokas, K. B. Cantrell, J. M. Novak et al., "Biochar: a synthesis of its agronomic impact beyond carbon sequestration," *Journal of Environmental Quality*, vol. 41, no. 4, pp. 973–989, 2012.

[19] R. D. Lentz and J. A. Ippolito, "Biochar and manure affect calcareous soil and corn silage nutrient concentrations and uptake," *Journal of Environmental Quality*, vol. 41, pp. 1033–1043, 2012.

[20] B. Glaser, J. Lehmann, and W. Zech, "Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal—a review," *Biology and Fertility of Soils*, vol. 35, no. 4, pp. 219–230, 2002.

[21] B. Glaser and J. J. Birk, "State of the scientific knowledge on properties and genesis of Anthropogenic Dark Earths in Central Amazonia (*terra preta de índio*)," *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 82, pp. 39–51, 2012.

[22] R. Scotti, G. Bonanomi, R. Scelza, A. Zoina, and M. A. Rao, "Organic amendments as sustainable tool to recovery fertility in intensive agricultural systems," *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 15, no. 2, pp. 333–352, 2015.

[23] K. S. Khan and R. G. Joergensen, "Compost and phosphorus amendments for stimulating microorganisms and growth of ryegrass in a Ferralsol and a Luvisol," *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, vol. 175, no. 1, pp. 108–114, 2012.

[24] D. Fischer and B. Glaser, "Synergisms between compost and biochar for sustainable soil amelioration," in *Management of Organic Waste*, S. Kumar and A. Bharti, Eds., pp. 167–198, InTech, 2012.

[25] H. Schulz and B. Glaser, "Effects of biochar compared to organic and inorganic fertilizers on soil quality and plant growth in a greenhouse experiment," *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, vol. 175, no. 3, pp. 410–422, 2012.

[26] J. Liu, H. Schulz, S. Brandl, H. Miehtke, B. Huwe, and B. Glaser, "Short-term effect of biochar and compost on soil fertility and water status of a Dystric Cambisol in NE Germany under field conditions," *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, vol. 175, no. 5, pp. 698–707, 2012.

[27] G. Agegnehu, M. I. Bird, P. N. Nelson, and A. M. Bass, "The ameliorating effects of biochar and compost on soil quality and plant growth on a Ferralsol," *Soil Research*, vol. 53, no. 1, pp. 1–12, 2015.

[28] H. P. Schmidt, C. Kammann, C. Niggli, M. W. H. Evangelou, K. A. Mackie, and S. Abiven, "Biochar and biochar-compost as soil amendments to a vineyard soil: influences on plant growth, nutrient uptake, plant health and grape quality," *Agriculture, Ecosystems & Environment*, vol. 191, pp. 117–123, 2014.

[29] M. P. Bernal, J. A. Alburquerque, and R. Moral, "Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review," *Bioresource Technology*, vol. 100, no. 22, pp. 5444–5453, 2009.

[30] G. Alfano, G. Lustrato, G. Lima, D. Vitullo, and G. Ranalli, "Characterization of composted olive mill wastes to predict potential plant disease suppressiveness," *Biological Control*, vol. 58, no. 3, pp. 199–207, 2011.

[31] C. Amendola, A. Montagnoli, M. Terzaghi et al., "Short-term effects of biochar on grapevine fine root dynamics and arbuscular mycorrhizae production," *Agriculture, Ecosystems & Environment*, vol. 239, pp. 236–245, 2017.

[32] D. Vitullo, R. Altieri, A. Esposito et al., "Suppressive biomasses and antagonist bacteria for an eco-compatible control of *Verticillium dahliae* on nursery-grown olive plants," *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 10, no. 2, pp. 209–220, 2013.

[33] ISO, "Soil quality—avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour - part 1: test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*)," ISO 17512-1, 2008.

[34] USDA, United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, National Soil Survey Handbook, 2005, http://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/national/home/?cid=nrcs142p2_054241.

[35] S. Carter, S. Shackley, S. Sohi, T. B. Suy, and S. Haefele, "The impact of biochar application on soil properties and plant growth of pot grown lettuce (*Lactuca sativa*) and cabbage (*Brassica chinensis*)," *Agronomy*, vol. 3, no. 2, pp. 404–418, 2013.

[36] H. Sokchea, K. Borin, and T. R. Preston, "Effect of biochar from rice husks (combusted in a downdraft gasifier or a paddy rice dryer) on production of rice fertilized with biodigester effluent or urea," *Livestock Research for Rural Development*, vol. 25, no. 1, 2013.

[37] A. Fabrizio, F. Tambone, and P. Genevini, "Effect of compost application rate on carbon degradation and retention in soils," *Waste Management*, vol. 29, no. 1, pp. 174–179, 2009.

[38] M. Reis, L. Coelho, J. Beltrao, I. Domingos, and M. Moura, "Comparative response of lettuce (*Lactuca sativa*) to inorganic

and organic compost fertilization," in *Recent Advances in Energy, Environment, Economics and Technological Innovation*, pp. 61–68, 2008.

[39] J. Lehmann, J. Gaunt, and M. Rondon, "Bio-char sequestration in terrestrial ecosystems—a review," *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, vol. 11, no. 2, pp. 403–427, 2006.

[40] C. A. Black, *Methods of Soil Analysis: Part I Physical and Mineralogical Properties*, American Society of Agronomy, Madison, Wis, USA, 1965.

[41] F. R. Higginson and G. E. Rayment, *Australian Laboratory Handbook of Soil and Water Chemical Methods*, Inkata Press, 1992.

[42] Y. P. Kalra and Soil & Plant Analysis Council, *Handbook on Reference Methods for Soil Analysis*, Soil & Plant Analysis Council, 1992.

[43] ASTM, "Standard test methods for moisture, ash, and organic matter of peat and other organic soils," ASTM D2974-00, ASTM International, West Conshohocken, Pa, USA, 2000.

[44] A. Mehlich, "Use of triethanolamine acetate-barium hydroxide buffer for the determination of some base exchange properties and lime requirement of soil," *Soil Science Society of America Proceedings*, vol. 29, pp. 374–378, 1938.

[45] C. F. H. Liao, "Devarda's alloy method for total nitrogen determination," *Soil Science Society of America Journal*, vol. 45, no. 5, pp. 852–855, 1981.

[46] R. A. Bowman, "A rapid method to determine total phosphorus in soils," *Soil Science Society of America Journal*, vol. 52, no. 5, pp. 1301–1304, 1988.

[47] S. R. Olsen, C. V. Cole, F. S. Watanabe, and L. A. Dean, *Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate*, Circular 939, USDA, Washington, DC, USA, 1954.

[48] J. B. A. Dumas, "Procedes de l'analyse organique," *Annales de Chimie et de Physique*, vol. 247, pp. 198–213, 1831.

[49] R. Moran and D. Porath, "Chlorophyll determination in intact tissues using N,N-dimethylformamide," *Plant Physiology*, vol. 65, no. 3, pp. 478–479, 1980.

[50] W. P. Inskeep and P. R. Bloom, "Extinction coefficients of chlorophyll a and b in n,n-dimethylformamide and 80% acetone," *Plant Physiology*, vol. 77, no. 2, pp. 483–485, 1985.

[51] C. Viti, A. Mini, G. Ranalli, G. Lustrato, and L. Giovannetti, "Response of microbial communities to different doses of chromate in soil microcosms," *Applied Soil Ecology*, vol. 34, no. 2-3, pp. 125–139, 2006.

[52] S. M. Tiquia, "Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 92, no. 4, pp. 764–775, 2002.

[53] K. C. Uzoma, M. Inoue, H. Andry, H. Fujimaki, A. Zahoor, and E. Nishihara, "Effect of cow manure biochar on maize productivity under sandy soil condition," *Soil Use and Management*, vol. 27, no. 2, pp. 205–212, 2011.

[54] M. Viger, R. D. Hancock, F. Miglietta, and G. Taylor, "More plant growth but less plant defence? First global gene expression data for plants grown in soil amended with biochar," *GCB Bioenergy*, vol. 7, no. 4, pp. 658–672, 2015.

[55] Z. M. Solaiman, P. Blackwell, L. K. Abbott, and P. Storer, "Direct and residual effect of biochar application on mycorrhizal root colonisation, growth and nutrition of wheat," *Australian Journal of Soil Research*, vol. 48, no. 6-7, pp. 546–554, 2010.

[56] M. Ros, M. T. Hernandez, and C. García, "Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 35, no. 3, pp. 463–469, 2003.

[57] D. L. Jones, J. Rousk, G. Edwards-Jones, T. H. DeLuca, and D. V. Murphy, "Biochar-mediated changes in soil quality and plant growth in a three year field trial," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 45, pp. 113–124, 2012.

[58] F. P. Vaccari, A. Maienza, F. Miglietta et al., "Biochar stimulates plant growth but not fruit yield of processing tomato in a fertile soil," *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol. 207, pp. 163–170, 2015.

[59] T. H. De Luca, M. D. MacKenzie, and M. J. Gundale, "Biochar effects on soil nutrient transformations," in *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*, J. Lehmann and S. Joseph, Eds., pp. 251–270, Earthscan Publications, London, UK, 2009.

[60] J. Major, C. Steiner, A. Downie, and J. Lehmann, "Biochar effects on nutrient leaching," in *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*, J. Lehmann and S. Joseph, Eds., pp. 271–287, Earthscan, London, UK, 2009.

[61] C. C. Hollister, J. J. Bisogni, and J. Lehmann, "Ammonium, nitrate, and phosphate sorption to and solute leaching from biochars prepared from corn stover (*Zea mays* L.) and oak wood (*Quercus* spp.)," *Journal of Environmental Quality*, vol. 42, no. 1, pp. 137–144, 2013.

[62] T. J. Clough and L. M. Condron, "Biochar and the nitrogen cycle: introduction," *Journal of Environmental Quality*, vol. 39, no. 4, pp. 1218–1223, 2010.

[63] L. Beesley and N. Dickinson, "Carbon and trace element fluxes in the pore water of an urban soil following greenwaste compost, woody and biochar amendments, inoculated with the earthworm *Lumbricus terrestris*," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 43, no. 1, pp. 188–196, 2011.

[64] J. Prommer, W. Wanek, F. Hofhansl et al., "Biochar decelerates soil organic nitrogen cycling but stimulates soil nitrification in a temperate arable field trial," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, Article ID e86388, 2014.

[65] C. R. Anderson, L. M. Condron, T. J. Clough et al., "Biochar induced soil microbial community change: implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus," *Pedobiologia*, vol. 54, no. 5-6, pp. 309–320, 2011.

[66] J. Rousk, P. C. Brookes, and E. Bååth, "Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, no. 6, pp. 1589–1596, 2009.

[67] J. Rousk, P. C. Brookes, and E. Bååth, "Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 42, no. 6, pp. 926–934, 2010.

[68] V. L. Bailey, S. J. Fansler, J. L. Smith, and H. Bolton Jr., "Reconciling apparent variability in effects of biochar amendment on soil enzyme activities by assay optimization," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 43, no. 2, pp. 296–301, 2011.

[69] H. Jin, *Characterization of microbial life colonizing biochar and biochar amended soils [Ph.D. thesis]*, Cornell University, Ithaca, NY, USA, 2010.

[70] F. Amlinger, S. Peyr, J. Geszti, P. Dreher, W. Karlheinz, and S. Nortcliff, *Beneficial Effects of Compost Application on Fertility and Productivity of Soils*, Federal Ministry for Agricultural and Forestry, Environment and Water Management, Lebensministerium, Vienna, Austria, 2007.

[71] M. Diacono and F. Montemurro, "Long-term effects of organic amendments on soil fertility," *Journal of Sustainable Agriculture*, vol. 2, pp. 761–786, 2011.

[72] V. L. Bailey, S. J. Fansler, J. L. Smith, and H. Bolton, "Reconciling apparent variability in effects of biochar amendment on soil enzyme activities by assay optimization," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 43, no. 2, pp. 296–301, 2011.

[73] C. Lammirato, A. Miltner, and M. Kaestner, "Effects of wood char and activated carbon on the hydrolysis of cellobiose by β-glucosidase from *Aspergillus niger*," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 43, no. 9, pp. 1936–1942, 2011.

[74] Y. Yao, B. Gao, M. Inyang et al., "Biochar derived from anaerobically digested sugar beet tailings: characterization and phosphate removal potential," *Bioresource Technology*, vol. 102, no. 10, pp. 6273–6278, 2011.

[75] H.-J. Xu, X.-H. Wang, H. Li, H.-Y. Yao, J.-Q. Su, and Y.-G. Zhu, "Biochar impacts soil microbial community composition and nitrogen cycling in an acidic soil planted with rape," *Environmental Science and Technology*, vol. 48, no. 16, pp. 9391–9399, 2014.

[76] W.-C. Ding, X.-L. Zeng, Y.-F. Wang, Y. Du, and Q.-X. Zhu, "Characteristics and performances of biofilm carrier prepared from agro-based biochar," *China Environmental Science*, vol. 31, no. 9, pp. 1451–1455, 2011.

[77] B. T. Nguyen, J. Lehmann, W. C. Hockaday, S. Joseph, and C. A. Masiello, "Temperature sensitivity of black carbon decomposition and oxidation," *Environmental Science and Technology*, vol. 44, no. 9, pp. 3324–3331, 2010.

[78] Y. Kuzyakov, I. Subbotina, H. Chen, I. Bogomolova, and X. Xu, "Black carbon decomposition and incorporation into soil microbial biomass estimated by 14C labeling," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 41, no. 2, pp. 210–219, 2009.

3.3 Risultati relativi allo studio sul terreno di crescita del pomodoro e relativa discussione

In tale sperimentazione i due substrati di crescita utilizzati sono un terreno povero (PT) e un terreno torboso (PTR). Entrambi sono stati miscelati con biochar, ottenendo rispettivamente PTB e PTRB.

Per ulteriori dettagli sui dosaggi si rimanda al paragrafo 3.1.

Effetto delbiochar sulle caratteristiche chimico fisiche del terreno di crescita del pomodoro

I risultati delle analisi chimico-fisiche dei diversi suoli utiizzati nella sperimentazione sono riportati nella tabella 8.

PARAMETRI (UNITÀ DI MISURA)	PT	PTB	PTR	PTRB
Grado di reazione (pH)	7.6±0.0(a)	7.6±0.1(a)	4.8±0.23(b)	5.8±0.2(c)
Conducibilità (dS/m)	0.7±0.0(a)	0.8±0.0(b)	9.9±1.2(c)	7.2±0.2(c)
Umidità (g/kg)	48.4±2.0(a)	59.0±0.1(b)	58.4±3.1(ab)	65.9±3.4(b)
Azoto totale (g/kg)	0.8±0.0(a)	1.0±0.1(a)	6.6±0.3(b)	5.8±0.3(b)
Fosforo totale (mg/kg)	434.8±4.3(a)	558.5±4.7(b)	567.8±13.5(c)	610.4±48.6(c)
Fosforo assimilabile (mg/kg)	<12 (a)	<12(a)	43.4±5.3(b)	61.5±8.2(c)
Carbonio organico (g/kg)	9.6±0.2(a)	18.5±0.5(b)	243.4±18.8(c)	301.5±15.8(c)
Capacita' di scambio cationico (cmol/kg)	21.0±0.2(a)	20.7±0.2(a)	38.2±0.5(b)	35.4±1.2(b)
Granulometria:				
ø > 2 mm (%)	19.6±1.1(a)	19.9±0.8(a)	48.5±0.4(b)	64.7±2.3(c)
ø < 2 µm (%)	52.6±1.2(a)	38.4±1.0(b)	3.6±0.4(c)	3.7±1.3(c)
2 µm < ø < 20 µm (%)	13.1±0.4(ab)	9.3±0.9(a)	13.9±0.2(b)	6.2±0.4(c)
20 µm < ø < 50 µm (%)	18.5±0.7(a)	37.1±1.2(b)	31.6±0.4(c)	14.8±1.1(d)
50 µm < ø < 200 µm (%)	5.3±0.1(a)	5.4±0.3(a)	25.2±0.8(b)	23.1±0.7(b)
200 µm < ø < 2 mm (%)	10.4±0.4(a)	9.7±0.4(a)	25.7±0.3(b)	52.3±2.04(c)

PARAMETRI (UNITÀ DI MISURA)	PT	PTB	PTR	PTRB
Alcalinita' ($CaCO_3$ %)	5.2±0.5(a)	7.6±0.2(a)		

Tabella 8: Risultati analisi del suolo delle piante controllo (T)(TR) e trattate con biochar (TB)(TRB). I risultati sono riportati come media dei valori ± ES. I risultati sono espressi come valore medio (n=3 per ciascun tipo di tesi.(p<0,05). A lettere diverse corrispondono valori significativamente diversi (p<0,05).

Sulla base dei dati relativi al contenuto di argilla e sabbia il terreno di crescita PT è stato classificato mediante l'utilizzo del calcolatore del Dipartimento dell'Agricoltura degli USA https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/survey/tools/?cid=nrcs142p2_054167), come argilloso, leggermente alcalino (USDA, 2005) e moderatamente salino (USDA, 2005).
Inoltre il suolo è risultato essere caratterizzato da un contenuto di carbonio organico decisamente scarso, in relazione al contenuto in argilla (Soltner, 1988), un basso valore di azoto totale(Bruce e Rayment, 2016), e livello del fosforo assimilabile inferiore al limite di quantificazione.
Il valore osservato per la capacità di scambio cationico, moderato secondo Metson, (1961) o elevato, secondo McKenzie et al., (2004) e Nicholas (2004), nonostante lo scarso contenuto di carbonio organico, è da attribuire all'elevato contenuto di argilla, i cui gruppi funzionali, a tale valore di pH sono prevalentemente carichi negativamente.
Il trattamento con biochar del suolo povero (PTB) ha determinato, rispetto al suolo di controllo (non trattato PT), un incremento significativo di conducibilità (14.2%), umidità (22.9%), fosforo totale (28.5%), carbonio organico (92.7%), e della frazione granulometrica di diametro compreso fra 20 μm e 50 μm (100%) e, contemporaneamente, un decremento della frazione granulometrica con diamentro inferiore a 2 μm (27.0%). Tutti gli altri parametri sono rimasti invariati.
L'aumento di conducibilità nel suolo trattato (PTB)è probabilmente da attribuire ad un apporto di minerali da parte del biochar, in quantità nettamente superiore a quella presente nel terreno di partenza PT.
Probabilmente, l'instaurarsi di complessi stabili tra i cationi adsorbiti sulla superficie di scambio e anioni, quali i fosfati, è responsabile del mancato aumento del fosforo assimilabile,

a fronte di un incremento significativo di fosforo totale, verosimilmente introdotto sotto forma di sali, dato l'aumento della conducibilità.

Le variazioni legate alla distribuzione granulometrica sono probabilmente da attribuire alla formazione di aggregati, a partire dalle particelle di dimensioni inferiori a 2 µm.

E' noto che le sostanze organiche sono il fattore chiave nella formazione di aggregati, poiché si comportano da sostanze leganti (Tisdall e Oades, 1982; Bronick e Lal, 2005; An et al., 2008).

Pertanto questo risultato è da considerarsi perfettamente in linea con il considerevole aumento del carbonio organico, osservato a seguito del trattamento con biochar.

Il terreno di crescita ricco, PTR, presenta caratteristiche chimico fisiche molto diverse risetto al PT. Esso si presenta come un terreno fortemente acido e salino (USDA, 2005) con tessitura sabbiosa limosa, cosi come classificato dal sistema USDA (https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/survey/tools/?cid=nrcs142p2_054167) e contenuto di carbonio organico elevato (Soltner, 1988).

Il valore di azoto totale è risultato essere molto elevato (Bruce e Rayment, 2016), mentre il valore del fosforo assimilabile tipico di un terreno ricco (Giardini,2002). La capacità di scambio cationico è risultata essere elevata (Metson, 1961; McKenzie et al, 2004; Nicholas, 2004).

Dall'analisi del terreno ricco trattato con biochar (PTRB) si osserva, rispetto al terreno di controllo (non trattato PTR), un incremento significativo dei parametri quali pH (20.8%), fosforo assimilabile (44.2%), frazione granulometrica di diametro superiore a 2mm (33.4%) e compreso tra 200µm e 2mm (103.5%), e un decremento della frazione granulometrica con diametro compreso tra a 2 µm e 20 µm (55.4%).

Tutti gli altri parametri sono rimasti invariati. L'aumento della disponibilità del fosforo nel terreno ricco trattato con biochar è molto probabilmente da attribuire, più che a un apporto diretto del biochar, essendo rimasto inalterato il contenuto di fosforo totale, all'aumento del pH, da esso indotto, e alla conseguente dissoluzione e mobilizzazione di sali di fosforo insolubili.

Infatti, come spiegato da De Luca et al., (2009), attraverso l'incremento del pH, il biochar è responsabile del decremento di ioni Fe3+ e Al3+ liberi, che formano legami poco solubili con ioni fosfato, promuovendone il rilascio nella soluzione circolante e, quindi, la disponibilità per

le piante. Altri studi in letteratura (Van Zwieten et al., 2010a) hanno evidenziato che tale capacità del biochar di incrementare il pH del suolo, si esplica soprattutto in suoli molto acidi. Inoltre, essendo un suolo sabbioso limoso, l'effetto del biochar sul pH si esplica maggiormente che nei suoli argillosi così come riportato da Tryon (1948).

L'incremento di macroaggregati e il corrispondente decremento della frazione granulometrica di diametro compreso tra 2 μm e 20 μm è attribuibile, come spiegato nel paragrafo relativo al terreno della foraggiera, alla formazione di complessi tra biochar e sostanze minerali.

Effetto del biochar sulle comunità microbiche del terreno di crescita delle piante di pomodoro

Dall'analisi dei dati ottenuti mediante l'utilizzo di saggi colturali in piastra (conte batteriche totali, funginee e sporigene) si osserva una distribuzione diversa dei microorganismi considerati, all'interno dei substrati di controllo e dei rispettivi trattamenti: infatti nel substrato di controllo PT, si nota una maggiore distribuzione di batteri totali, sporigeni e miceti rispetto al relativo trattamento con biochar (PTB).

Tale risultato, correlato con l'aumento di carbonio organico sembra contrastare con altri studi (Stemmer et al, 2007; Mellendorf et al., 2010), secondo i quali il biochar, come fonte di carbonio disponibile per i microrganismi, può incrementarne la biomassa.

Tuttavia molti sono i fattori che possono influenzare negativamente la massa microbica, tra i quali l'apporto di sali (Lehman et al., 2011), che risulta compatibile con l'incremento della conducibilità riscontrato.

Questo effetto negativo sulle comunità microbiche potrebbe rappresentare un limite all'utilizzo di biochar ad elevato contenuto salino. Infatti, l'elevato contenuto di sali potrebbe determinare a breve termine l'insorgenza di una condizione di stress salino che potrebbe essere mitigato nel tempo, in seguito fenomeni di diluizione e/o dilavamento per mezzo delle precipitazioni.

Tale ipotesi potrebbe trovare conferma nel fatto che, nello specifico caso, il campionamento del suolo è stato effettuato a soli quattro mesi di distanza dal trattamento.

Contrariamente, nel PTR si nota una colonizzazione preferenziale del terreno trattato con biochar (PTRB) da parte dei batteri totali rispetto al substrato di controllo PTR, mentre restano pressoché invariati gli sporigeni e i miceti. (Figura 29).

Tali risultato è in linea con quello ottenuto in altri studi presenti in letteratura, dove emerge che il biochar, applicato soprattutto su terreni sabbiosi, come quello in questione, crea un effetto di ritenzione idrica attraverso i micropori e la struttura della superficie (Schimel et al., 2007)

Da quanto emerge complessivamente dalle analisi microbiologiche dei diversi suoli, si potrebbe dedurre che la biomassa microbica tenda a colonizzare preferenzialmente, sia in termini di composizione che quantitativi, il terreno povero non trattato e, in seconda battuta il terreno ricco trattato con biochar.

Tale selezione microbica da parte dei terreni ha, probabilmente, come principale causa, il pH, risultato neutro nel terreno povero PT e fortemente acido nel PTR.

Infatti l'effetto mitigante del biochar sul pH osservato in questo lavoro trova conferma in diversi studi, in cui emerge che l'aggiunta di biochar ed il conseguente aumento di pH favoriscono l'incremento dell'abbondanza microbica (Steiner et al., 2004; McCormack , 2013)

Il risultato relativo ai funghi che invece, in seguito all'incremento di pH indotto dal trattamento con biochar, non subiscono variazioni, è in accordo con quanto riportato in uno studio di Rousk et al., (2009). A incrementi ancora più elevati di pH, tali autori hanno addirittura riscontrato una drammatica diminuzione di biomassa funginea.

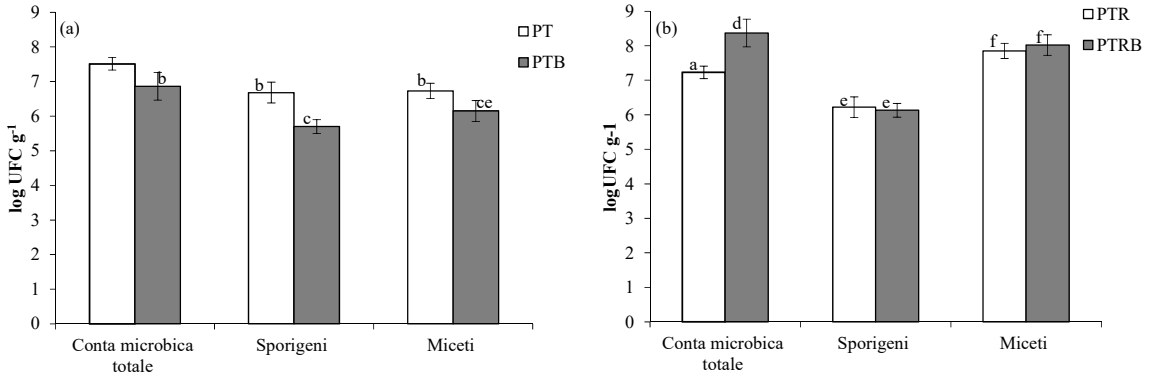


Figura 29: Conta microbica totale, conta sporigeni e conta funginea. determinati sui substrati di crescita delle piante di pomodoro e sui rispettivi trattamenti con biochar, PT e PTB (a) e PTR, PTRB (b). I valori sono rappresentati come media (n=3) ± E.S.. A lettere diverse corrispondono valori diversi ($p<0.05$).

Nella figura 30, sono riportati i dati relativi all'analisi enzimatica API-ZYM.

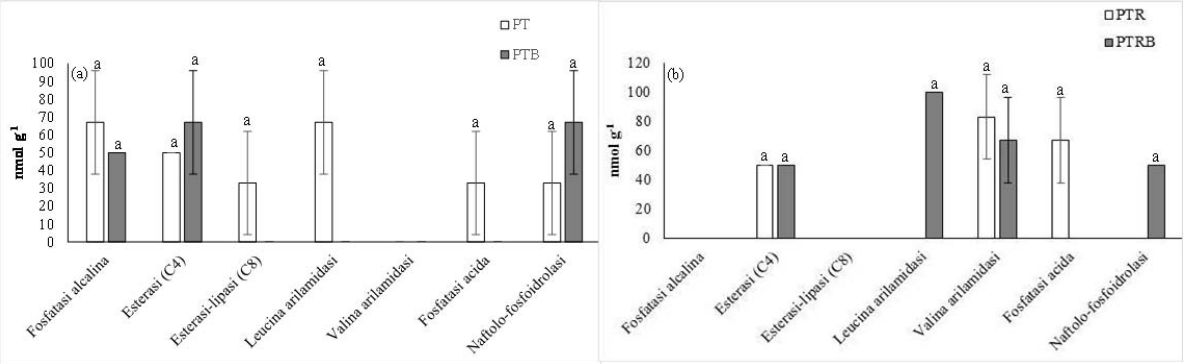


Figura 30: Saggio API-ZYM effettuato sui substrati di crescita PT (a) e PTR(b) delle piante di pomodoro e sui rispettivi trattamenti con biochar(PTB e PTRB). Le barre di errore rappresentano la D.S.(n=6). A lettere diverse corrispondono valori diversi.

In accordo con quanto evidenziato in relazione alla biomassa microbica, dai risultati ottenuti si può notare una differente attività enzimatica sia tra i substrati di controllo PT e PTR che tra substrati di controllo e relativi trattamenti con biochar. Infatti dalla figura 9 (a) si osserva nel substrato PT la presenza di 6 enzimi, contro 3 presenti nel rispettivo trattamento con biochar (PTB), mentre in PTR (figura 9(b)) sono presenti solo 3 enzimi, contro i 4 osservati in PTRB).
In particolare, si osserva che la fosfatasi alcalina compare solo in PT e PTB; l'esterasi lipasi solo in PT, la leucina arilamidasi in PT e PTRB, la fosfatasi acida in PT e PTR, la naftolo-idrolasi in PT, PTB e PTR.
Dal punto di vista qualitativo emerge, quindi, una maggiore attività enzimatica in PT rispetto a PTB, PTR e PTRB e di PTRB rispetto a PTR e PTB.
Pertanto, il trattamento con biochar comporta nel terreno PT una diminuzione dell'attività enzimatica, mentre nel PTR comporta un incremento.
Anche se questo risultato combacia con quanto osservato per la biomassa, una diminuzione dell'attività enzimatica non necessariamente implica una riduzione dell'abbondanza.
Infatti una diminuzione dell'attività metabolica potrebbe essere attribuita ad un miglioramento dell'efficienza di utilizzo del carbonio da parte dei microorganismi, diminuendo la necessità della produzione di enzimi (Lehman et al., 2011).

Dal punto di vista qualitativo, la scomparsa di tre enzimi dal terreno PTB rispetto al PT e la comparsa di un enzima in PTRB rispetto al PTR suggeriscono un decremento della composizione della comunità microbica, nel primo caso, e ad un incremento nel secondo.
Complessivamente, si può affermare che il biochar ha un effetto negativo sul terreno PT sia in termini di abbondanza che di composizione, mentre nel terreno PTR ha un effetto positivo su entrambi gli aspetti.

Effetto del biochar sulla biomassa delle radici

A fine ciclo colturale (dopo 4 mesi dal trattamento) è stata misurata la biomassa radicale delle piante di pomodoro cresciute nei diversi suoli (PT,PTB,PTR,PTRB) e i risultati sono riportati nella figura 31.

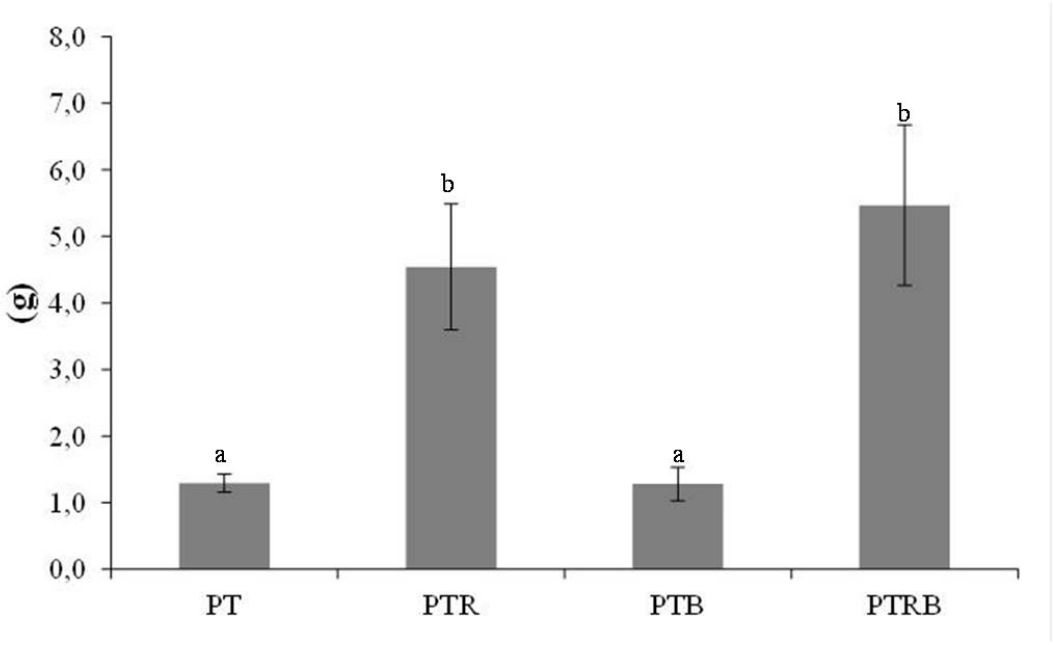


Figura 31: Biomassa delle radici delle piante di pomodoro, misurata nelle quattro tesi (PT, PTR, PTB e PTRB). I risultati sono riportati come valore medio (n=3) ± D.S. A lettere diverse corrispondono valori diversi (p<0.05)

Dalla figura 31 si osserva che la biomassa radicale si sviluppa maggiormente nel substrato PTR e nel suo trattamento con biochar (PTRB), rispetto al substrato PT e PTB. Tra i substrati di controllo e i substrati di crescita rispettivi non si rilevano differenze significative.

Le differenze osservate tra PT e PTR sono probabilmente da attribuire alla maggiore disponibilità di elementi nutritivi, come il fosforo, presente in quantità superiori nei terreni PTR e PTRB.

Generalmente, biochar in grado di migliorare le caratteristiche chimico fisiche del suolo come la disponibilità di nutrienti, il contenuto d'acqua disponibile, il pH e l'aerazione quasi sicuramente incrementano la produzione di radici (Lehman, 2011).

Il mancato aumento della biomassa radicale nel terreno PT è probabilmente da imputare, così come per la biomassa microbica, all'incremento della salinità indotto dal biochar, essendo la pianta di pomodoro moderatamente sensibile allo stress salino.

Il valore soglia di tolleranza allo stress salino calcolato per le piante di pomodoro è pari a 2.5 dSm-1(Grieve et al., 2012).

Tuttavia alcuni autori (Snapp e Shennan, 1992) hanno riportato all'aumentare della salinità decrementi in peso e in lunghezza delle radici, che possono variare dal 40% al 50%, affermando che la salinità del suolo può influenzare l'acquisizione di nutrienti riducendo la crescita delle radici. In uno studio condotto sulla risposta della pianta di pomodoro allo stress salino (Mohammad et al., 1998) a differenti livelli di fosforo, si è osservato, a salinità crescenti, decrementi significativi in peso dei germogli, altezza della pianta e numero di foglie e incrementi del potenziale osmotico delle foglie, a prescindere dalla concentrazione di fosforo.

Sempre nello stesso studio è stato osservato che sia la lunghezza che l'area superficiale delle radici diminuiva all'aumentare della salinità, a tutti i livelli di fosforo. Tuttavia, ad elevate concentrazioni di fosforo il decremento di questi due parametri risultava essere minore, ad indicare un possibile effetto di mitigazione da parte del fosforo sugli effetti della salinità sulle radici.

Ciò potrebbe spiegare il valore elevato della biomassa radicale trovata nel terreno PTR, rispetto al terreno PT, nonostante il valore della conducibilità considerevolmente superiore.

Concludendo, in questo studio sono stati presi in considerazione substrati di crescita completamente diversi tra loro, in termini di pH, conducibilità, nutrienti, carbonio organico, capacità di scambio cationico, granulometria, abbondanza e composizione microbica.

Nel terreno povero (PT) pur essendo migliorate le caratteristiche chimiche dopo il trattamento con biochar, grazie all'aumento di P totale e Corganico, si assiste tuttavia ad una diminuzione di biomassa microbica e ad un mancato aumento di massa radicale.
Il terreno PTR, invece, pur partendo da condizioni iniziali migliori rispetto al PT, presenta una minore abbondanza e composizione microbica, che aumentano, invece, a seguito del trattamento con biochar, mentre la biomassa radicale resta inalterata.
Ciò è in accordo con quanto riportato in letteratura da Haefele et al., 2011; Asai et al., 2009; Steiner et al., 2007 .i quali affermano che l'aggiunta di biochar ad un terreno fertilizzato apporta maggiori benefici alle piante in termini di crescita, rispetto alla sua applicazione ad un terreno "povero".
Tuttavia l'elemento che nel terreno povero (PT) sembra ostacolare la proliferazione microbica e la crescita delle radici, è risultato essere l'apporto salino dovuto al biochar.
In realtà su un altro terreno definibile "povero" dal punto di vista agronomico, quale quello della vigna, gli effetti positivi del biochar sono risultati molto più incoraggianti, rispetto a quelli ottenuti in questo studio.
Ciò che potrebbe costituire una variante tra le due situazioni sono le condizioni di crescita (controllate nel terreno PT e non controllate, nella vigna) e il tempo di incubazione (4 mesi in PT e 9 mesi sul terreno della vigna).
Poiché la salinità è soggetta a diminuire nel tempo per effetto di diluizione e dilavamento, è probabile che nel caso in questione l'effetto negativo del biochar sia attribuibile al breve periodo di incubazione (effetto a breve termine) destinato a migliorare nel tempo.

3.4 Risultati relativi allo studio sul terreno di crescita del pioppo e relativa discussione

La sperimentazione sul pioppo ha utilizzato come substrato di crescita per le piante un terreno povero miscelato con sabbia (T) ed il terreno povero T miscelato con sabbia e compost.
Entrambi sono stati trattati con biochar, ottenendo rispettivamente TB e TBC.

Effetto del biochar sulle caratteristiche chimico fisiche del terreno di crescita del pioppo

I risultati relativi alla caratterizzazione chimico fisica dei due substrati di crescita delle piante di pioppo, T e TC, e dei rispettivi trattamenti con biochar sono riportati nella tabella 8.

PARAMETRI (UNITÀ DI MISURA)	T	TB	TC	TBC
Grado di reazione (pH)	7.4±0.0(a)	7.4±0.0(a)	7.4±0.0(a)	7.4±0.0(a)
Conducibilità (dS/m)	0.2±0.0 (a)	0.2±0.0(a)	0.4±0.0(b)	0.3±0.0(c)
Umidità (g/kg)	1.5±0.1(a)	1.4±0.1(a)	1.1±0.0(b)	1.6±0.2(b)
Azoto totale (g/kg)	0.2±0.0(a)	0.5±0.0(b)	1.6±0.1(c)	2.1±0.0(d)
Fosforo totale (mg/kg)	129.3±5.5(a)	215.0±4.0(b)	301.0±3.6(c)	324.0±7.3(d)
Fosforo assimilabile (mg/kg)	<12	<12	16.9±3.7(a)	18.6±2.5(a)
Carbonio organico (g/kg)	12.3±1.2 (a)	13.4±1.6(a)	23.4±1.6(b)	23.5±0.8 (b)
Capacita' di scambio cationico (cmol/kg)	6.5±0.4(a)	8.6±0.3(b)	9.7±0.2(c)	9.6±0.3(c)
Granulometria:				
ø > 2 mm (%)	8.9±0.4(a)	6.3±0.2(b)	13.5±0.2(c)	9.6±1.0(a)
ø < 2 μm (%)	27.8±0.9(a)	28.7±0.6(a)	28.3±0.6(a)	28.0±0.4(a)
2 μm < ø < 20 μm (%)	6.8±0.5(a)	7.2±0.4(a)	8.7±0.2(a)	9.1±0.8(a)
20 μm < ø < 50 μm (%)	8.9±0.6(a)	9.5±0.4(a)	7.9±1.4(a)	6.7±0.3(a)
50 μm < ø < 200 μm (%)	2.6±0.9(a)	1.9±0.1(a)	1.9±0.2(a)	1.6±0.3(a)
200 μm < ø < 2 mm (%)	53.8±2.3(a)	52.7±1.7(a)	53.2±2.4(a)	54.6±2.4(a)
Alcalinita' ($CaCO_3$ %)	10.0±0.5(a)	10.6±0.6(a)	9.5±0.5(a)	10.8±0.5(a)

Tabella 9: Analisi chimico fisiche eseguite sui substrati di crescita delle piante di pioppo(T e TC) e i rispettivi trattamenti con biochar (TB e TBC). Ciascun valore rappresenta la media (n=3) ± ES. A lettere diverse corrispondono risultati significativamente differenti (p<0.05).

Il terreno di crescita T presenta caratteristiche tipiche di un suolo leggermente alcalino (USDA, 2005) e non salino (USDA, 2005) con tessitura sabbiosa-argillosa-limosa, (https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/survey/tools/?cid=nrcs142p2_054167) e contenuto di carbonio organico molto modesto, in relazione al contenuto in argilla (Soltner, 1988).

Il valore di azoto totale è molto basso (Bruce e Rayment, 2016), mentre il valore del fosforo assimilabile è risultato inferiore al limite di quantificazione.

La capacità di scambio cationico, in coerenza con la tessitura e il contenuto di carbonio organico, può essere considerata, secondo diverse interpretazioni, bassa (Metson, 1961) o moderata (McKenzie et al, 2004; Nicholas, 2004).

Dall'analisi del terreno ammendato con biochar (PTB) si osserva, a distanza di 4 mesi dal trattamento, rispetto al terreno di controllo, un incremento significativo dei parametri azoto totale (150%), fosforo totale (66.3%), capacità di scambio cationico (32.3%) e un decremento della frazione granulometrica con diametro superiore a 2 mm (29.2%). Tutti gli altri parametri sono rimasti invariati.

Il suolo in questione è caratterizzato da una tessitura grossolana che lo rende molto permeabile e pertanto suscettibile di fenomeni di lisciviazione, cui può essere ricondotto il basso valore della conducibilità, anche nel terreno ammendato con biochar.

Inoltre, il considerevole incremento di fosforo totale, non correlato ad un incremento della disponibilità dello stesso, può essere attribuito alla formazione di fosfati di calcio insolubili, trattandosi di un terreno mediamente calcareo.

La scarsa presenza di sostanze organiche, anche nel terreno trattato con biochar, è probabilmente da attribuire alla elevata aerazione, cui tale tipologia di suolo è sottoposta, che ne favorisce l'esaurimento attraverso rapidi processi ossidativi; l'altrettanto rapido rilascio di sostanze nutrienti che ne consegue, tuttavia, potrebbe non costituire un reale beneficio per le piante, dal momento che potrebbe avvenire in tempi non corrispondenti alle esigenze delle stesse.

Anche se questo risultato sembra contrastare con il consistente incremento di azoto totale, è opportuno sottolineare che lo stesso non è tale da modificarne il giudizio interpretativo in relazione al contenuto, che resta, comunque, "molto basso" (Bruce and Rayment, 1982).

Stesso dicasi per la capacità di scambio cationico, il cui incremento non è tale da spostarne positivamente il giudizio interpretativo.

Appare, pertanto, in base a quanto finora argomentato che, sebbene l'aggiunta del biochar abbia mostrato cenni di miglioramento delle caratteristiche chimico fisiche, sarebbero necessari ulteriori approfondimenti in merito al dosaggio dello stesso, al fine di poter evidenziare una sua reale sostenibilità dell'utilizzo del biochar, nel recupero di suoli dello stesso tipo.

Il terreno di crescita TC, ottenuto dal trattamento del terreno T, precedentemente descritto, con compost, mostra caratteristiche chimico fisiche di partenza migliori, dal punto di vista agronomico. Esso infatti si presenta come un suolo leggermente alcalino (USDA, 2005) e moderatamente salino (USDA, 2005), con tessitura sabbiosa-argillosa-limosa (https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/survey/tools/?cid=nrcs142p2_054167) e contenuto di carbonio organico soddisfacente, in relazione al contenuto in argilla (Soltner, 1988).

Il valore di azoto totale è medio (Bruce e Rayment, 2016), mentre il valore del fosforo assimilabile è tipico di un terreno ben dotato (Giardini, 2002).

La capacità di scambio cationico può essere considerata, secondo diverse interpretazioni, bassa (Metson, 1961) o moderata (McKenzie et al, 2004; Nicholas, 2004).

Gli effetti positivi del compost, pertanto, si esplicano sul terreno T in termini di contenuto organico, nutrienti e di capacità di scambio cationico.

Dall'analisi del terreno TC trattato con biochar (TBC) si osserva, rispetto al terreno di controllo, un incremento significativo dei parametri azoto totale (31.3%) e fosforo totale (7.6%), mentre si ha un decremento della conducibilità (25%) e della frazione granulometrica con diametro superiore a 2 mm (28.9%). Tutti gli altri parametri sono rimasti invariati.

Tutte le variazioni registrate, seppur significative dal punto di vista statistico e consistenti, in termini percentuali, tuttavia non sono tali da farne registrare un miglioramento in merito alla classe di giudizio relativa a ciascun parametro.

Appare chiaro, inoltre, che sul terreno T si sono riscontrati maggiori benefici attribuibili al compost piuttosto che al biochar.

Altro aspetto che comunque emerge è che, sul terreno fertilizzato con compost, il biochar, se da una parte non apporta benefici consistenti, alle condizioni sperimentali attuate, non ha apportato effetti negativi.

Pertanto, alla luce dei risultati raggiunti, anche in questo caso sarebbe necessario un ulteriore approfondimento sui dosaggi, che porti a risultati più evidenti sia in positivo che in negativo, tali da poter delineare una reale sostenibilità del biochar come ammendante nel recupero di suoli impoveriti, come quello in questione.

Effetti del biochar sulla biomassa delle radici

Nella figura 30 è riportata la biomassa secca delle radici delle piante di pioppo cresciute nelle quattro tesi sopra descritte.

A distanza di un anno dal trattamento le piante sono state eradicate e i risultati relativi alla biomassa secca delle radici sono riportati nella figura 32.

Trascurando l'elevata variabilità dei risultati relativi a TPB e TPC, è possibile osservare che non vi sono differenze significative tra TP e TPC né tra tali terreni e i rispettivi trattamenti con biochar, confermando ancora una volta che i miglioramenti apportati dal biochar alle condizioni sperimentali specifiche, nonostante siano significativi, non incidono in modo efficace sulla qualità del terreno e sulla pianta.

In un articolo pubblicato da Bruun et al., (2014), sono riportati gli effetti su piante di orzo (Hordeum vulgare cv,) cresciute su un suolo sabbioso, di due differenti tipologie di biochar, ottenuti rispettivamente dalla pirolisi lenta di paglia e legno duro.

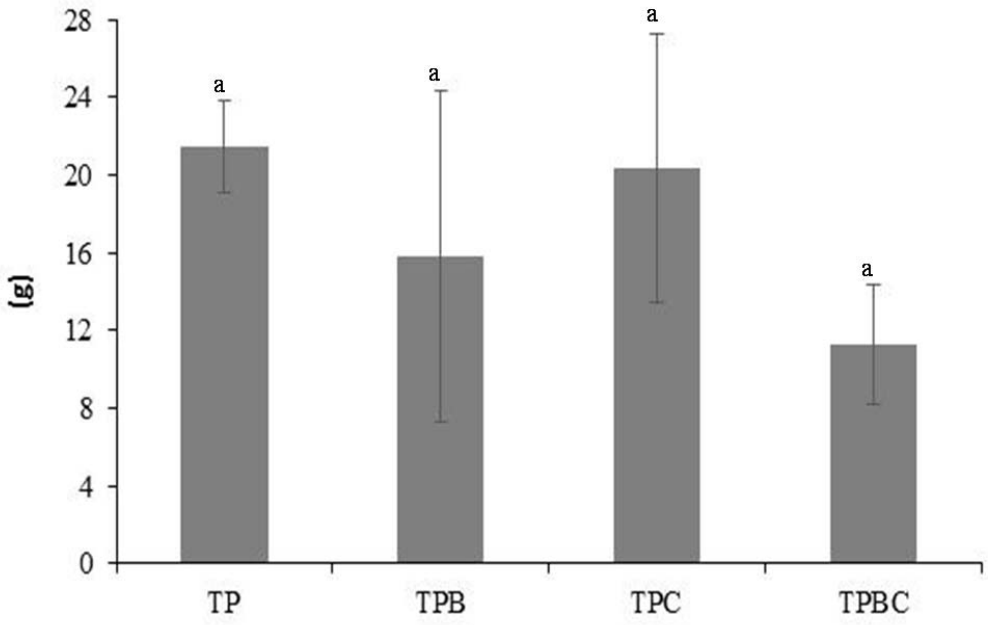


Figura 32: Biomassa delle radici delle piante di pioppo, misurata nelle quattro tesi (PT, PTR, PTB e PTRB). I risultati sono riportati come valore medio (n=3) ± D.S.A lettere diverse corrispondono valori diversi (p<0.05).

Da tale studio è emerso che il primo biochar ha sortito i migliori effetti a concentrazioni minori, sulle caratteristiche del suolo, in termini di capacità di ritenzione idrica, sulla densità media delle radici e sulla resa dei grani.

In questa tipologia di suoli problematici dal punto di vista agronomico, è ancora più evidente la diversità di effetti che il biochar può avere, a seconda delle sue caratteristiche e del dosaggio utilizzato.

Tuttavia l'assenza di risultati negativi incoraggia ad ulteriori approfondimenti.

Appendice al Capitolo III Quadro riepilogativo dei risultati ottenuti nella sperimentazione in serra

Data la numerosità dei risultati relativi alle analisi chimico fisiche e microbiologiche dei suoli delle tre colture esaminate e discusse in questo capitolo, al fine di agevolarne la lettura, si riporta di seguito un quadro d'insieme degli stessi.

	LATTUGA				**POMODORO**				**PIOPPO**			
	LT	LTB	LTC	LTBC	PT	PTB	PTR	PTRB	TP	TPB	TPC	TPBC
						pH						
MEDIA	6,9	8,0	7,5	7,7	7,6	7,6	4,8	5,8	7,4	7,4	7,4	7,4
ES	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,23	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
	a	f	b	g	c	c	d	h	e	e	e	e
						CONDUCIBILITA'(dS/m)						
MEDIA	0,7	1,0	1,3	1,5	0,7	0,8	9,9	7,2	0,2	0,2	0,4	0,3
ES	0,03	0,03	0,13	0,03	0,01	0,01	1,17	0,22	0,01	0,01	0,00	0,03
	a	f	b	b	a	g	c	c	d	d	e	h
						UMIDITÀ (g/kg)						
MEDIA	63,0	58,8	61,8	47,0	48,4	59,0	58,4	65,9	1,5	1,4	1,1	1,6
SE	1,63	0,32	0,90	2,13	1,99	0,10	3,14	3,40	0,07	0,06	0,01	0,18
	a	b	a	e	b	a	ab	a	c	c	d	d
						AZOTO TOTALE (g/kg)						
MEDIA	0,8	1,2	1,9	2,2	0,8	1,0	6,6	5,8	0,2	0,5	1,6	2,1
ES	0,03	0,00	0,20	0,03	0,03	0,06	0,26	0,26	0,01	0,01	0,06	0,01
	a	e	b	b	a	a	c	c	d	f	b	g
						FOSFORO TOTALE (mg/Kg)						
MEDIA	199,9	376,6	455,6	471,0	434,8	558,5	567,8	610,4	129,3	215,0	301,0	324,0
ES	9,90	52,30	33,30	1,30	4,25	4,68	13,46	48,60	5,53	3,97	3,61	7,26
	a	b	b	b	b	f	c	c	d	g	e	h

	LATTUGA				POMODORO				PIOPPO			
	LT	LTB	LTC	LTBC	PT	PTB	PTR	PTRB	TP	TPB	TPC	TPBC
FOSFORO ASSIMILABILE (mg/Kg)												
MEDIA	<12	<12	24,9	58,3	<12	<12	43,4	61,5	<12	<12	16,9	18,6
ES			3,90	4,50			5,32	8,16			3,66	2,47
			a	b			b	c			a	a
	CARBONIO TOTALE (g/Kg)				**CARBONIO ORGANICO (g/Kg)**							
MEDIA	12,8	59,1	29,1	65,9	9,6	18,5	243,4	301,5	12,3	13,4	23,4	23,5
ES	0,50	0,00	0,80	2,20	0,25	0,47	18,84	15,80	1,15	1,56	1,56	0,84
	a	b	c	b	a	b	c	c	d	d	e	e
CAPACITA' DI SCAMBIO CATIONICO (cmol/kg)												
MEDIA	39,3	40,4	39,9	43,6	21,0	20,7	38,2	35,4	6,5	8,6	9,7	9,6
ES	0,00	0,00	0,00	0,00	0,24	0,19	0,47	1,17	0,44	0,32	0,23	0,29
	a	g	b	h	c	c	d	d	e	f	f	f
GRANULOMETRIA												
scheletro %												
MEDIA	13,2	16,3	20,7	13,8	19,6	19,9	48,5	64,7	8,9	6,3	13,5	9,6
ES	0,35	1,16	1,66	0,53	1,11	0,75	0,35	2,33	0,36	0,18	0,18	0,96
	a	a	b	d	ab	b	c	e	f	g	a	f
argilla %												
MEDIA	52,6	48,5	41,9	44,9	52,6	38,4	3,6	3,7	27,8	28,7	28,3	28,0
SE	0,61	0,45	1,30	0,12	1,23	1,04	0,36	1,33	0,89	0,55	0,58	0,36
	a	f	b	b	a	g	c	c	d	d	d	d
limo fine %												
MEDIA	13,9	13,7	12,4	15,3	13,1	9,3	13,9	6,2	6,8	7,2	8,7	9,1
SE	1,0	1,2	0,4	0,8	0,38	0,89	0,22	0,41	0,49	0,41	0,22	0,79
	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b
sabbia fine %												
MEDIA	5,0	5,9	5,3	5,9	5,3	5,4	25,2	23,1	2,6	1,9	1,9	1,6
SE	0,10	0,22	0,13	0,34	0,11	0,32	0,77	0,70	0,91	0,05	0,16	0,29
	a	b	a	a	a	a	b	b	ac	c	c	c
sabbia grossa %												
MEDIA	11,4	12,3	10,9	12,1	10,4	9,7	25,7	52,3	53,8	52,7	53,2	54,6
ES	0,73	0,32	0,60	0,25	0,40	0,37	0,32	2,04	2,28	1,68	2,44	2,41
	a	a	a	a	a	a	b	c	c	c	c	c
limo grosso %												
MEDIA	17,1	19,6	29,6	23,8	18,5	37,1	31,6	14,8	8,9	9,5	7,9	6,7
SE	1,11	1,24	1,42	0,24	0,66	1,17	0,39	1,10	0,55	0,35	1,38	0,33
	a	a	b	e	a	f	b	c	d	d	d	d

	LATTUGA				POMODORO				PIOPPO			
	LT	LTB	LTC	LTBC	PT	PTB	PTR	PTRB	TP	TPB	TPC	TPBC
					ALCALINITA' (CaCO3 %)							
MEDIA	7,7	5,5	6,1	7,6	5,2	7,6			10,0	10,6	9,5	10,8
SE	0,48	0,80	0,52	0,42	0,53	0,24			0,45	0,57	0,47	0,45
	ac	a	ab	a	b	ab			c	c	c	c

Tabella 10: Risultati relativi alle analisi chimico fisiche eseguite su campioni di suolo di controllo di lattuga (LT), lattuga-compost(LTC), pomodoro (PT) e PT miscelato a terreno ricco (PTR), pioppo (TP) e TP miscelato con compost (TPC) e dei rispettivi trattamenti con biochar: (LTB, LTBC, PTB, PTRB, TPB e TPBC), contenenti valori medi e relativi errori standard. A lettere diverse corrispondono valori diversi ($p<0.05$).

Per quanto riguarda i risultati dell'analisi microbiologica, risulterebbe poco pratico e funzionale all'agevolazione della lettura assemblare i dati relativi ai suoli delle tre colture, sia per quanto riguarda la conta su piastra (determinazione di batteri, funghi e sporigeni) che per i test enzimatici API ZYM, dato l'elevato numero di tesi (quattro in tutto, di cui due suoli di controllo e due trattati per ciascuna coltura esaminata) ed il numero enzimi saggiati (19); pertanto si rimanda ai singoli grafici riportati nei paragrafi relativi ai suoli specifici studiati.

Bibliografia

Asai, H., Samson, B.K., Stephan, H.M., Songyikhangsuthor, K., Homma, K., Kiyono, Y., Inoue, Y., Shiraiwa, T., Horie, T., 2009. Biochar amendment techniques for upland rice production in Northern Laos: 1. Soil physical properties, leaf SPAD and grain yield. Field Crop. Res. 111, 81–84.

Bronick, C.J., Lal, R., 2005. Soil structure and management: A review. Geoderma 124, 3–22.

Bruce, R.C., Rayment, G.E., 1982. .Analytical methods and interpretations used by the Agricultural Chemistry Branch for soil and land use surveys. Queensland Department of Primary Industries Bulletin QB 82004.

Bruun, E.W., Petersen, C.T., Hansen, E., Holm, J.K., Hauggaard-Nielsen H.C., 2014. Biochar amendment to coarse sandy subsoil improves root growth and increases water retention . Soil Use and Management,30, 109–118

Chan, K.Y., Zwieten, L.V., Meszaros, I., Downie, A., Joseph, S., 2007. Agronomic values of greenwaste biochar as a soil amendment. Australian J. Soil Res. 45, 629-634.

De Luca, T.H., MacKenzie, M.D., Gundale, M.J., 2009. Biochar effects on soil nutrient transformations. In: Biochar for environmental management.Science and technology. (Eds J Lehmann, S Joseph) pp. 251–270.(Earthscan: London).

Giardini, L., 2002. Agronomia generale, ambientale e aziendale. Patron Ed., Bologna.

Grieve, C.M., Grattan, S.R., Maas, E.V., 2012. Plant salt tolerance. In: W.W. Wallender and K.K. Tanji (eds.) ASCE Manual and Reports on Engineering Practice No. 71 Agricultural Salinity Assessment and Management (2nd Edition). ASCE, Reston, VA. Chapter 13 pp:405-459.

Haefele, S. M., Konboon, Y., Wongboon, W., Amarante, S., Maarifat, A.A., Pfeiffer, E., 2011. Effects and fate of biochar from rice residues in rice-based systems. Field crops research, 121(3), 430-440. doi:10.1016/j.fcr.2011.01.014.

Lehmann, J., Rillig, M.C., Thies, J., Masiello, C.A., Hockaday, W.C., Crowley, D., 2011. Biochar effects on soil biota – A review. Soil Biology & Biochemistry 43, 1812–1836.

McKenzie, N.J., Jacquier, D.J., Isbell, R.F., Brown, K.L. 2004. Australian Soils and Landscapes An Illustrated Compendium' CSIRO Publishing: Collingwood, Victoria.

Metson, A.J., 1961. Methods of chemical analysis for soil survey samples. New Zealand Department of Scientific and Industrial Research, Soil Bureau Bulletin No.12. In: Hazelton PA, B.

Nicholas, P., 2004. Soil, irrigation and nutrition. Grape Production Series No. 2. South Australian Research and Development Institute. Adelaide, South Australia.

McCormack, S.A., Ostle, N., Bardgett, R.D., Hopkins, D.W., Vanbergen, A.J. 2013. Biochar in bioenergy cropping systems: impacts on soil faunal communities and linked ecosystem processes. GCB Bioenergy 5: 81–95.

Mohammad, M., Shibli, R., Ajlouni, M., Nimrib, L.,1998. Tomato Root and Shoot Responses to Salt Stress Under Different levels of Phosphorus Nutrition. Journal of plant nutrition, 21(8), 1667-1680.

Rousk, J., Brookes, P.C., Bååth, E., 2009. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. Applied and Environmental Microbiology 75, 1589-1596.

Saarnio, S., Heimonen, K., Kettunen, R., 2013. Biochar addition indirectly affects N_2O emissions via soil moisture and plant N uptake. Soil Biol. Biochem. 58, 99–106. doi: 10.1016/j.soilbio.2012.10.035.

Schimel, J., Balser, T.C. Wallenstein, M., 2007. Microbial stress - response physiology and its implications for ecosystem function. Ecology 88: 1386−1394.

Soltner, D., 1988. Le bases de la production vegetale, in: Angers (Eds.), Sciences et Techniques Agricoles 16éme editions, Sainte Gemmes Sur Loire, p 464.

Steiner, C., Teixeira, W.G., Lehmann, J., Nehls, T., Macêdo, J.L.V.d, Blum, W.E.H., Zech, W., 2007. Long term effects of manure, charcoal and mineral fertilization on crop production

and fertility on a highly weathered Central Amazonian upland soil. Plant and Soil 291, 275-290.

Steiner, C., Teixeira, W., Zech, W., 2004. Slash and char - an alternative to slash and burn practiced in the Amazon Basin. In: Amazonian Dark Earths (B. Glaser and W. Woods, eds.), pp. 182-193.

Stemmer, M., Watzinger, A., Blochberger, K., Haberauer, G., Gerzabek, M., 2007. Linking dynamics of soil microbial phospholipid fatty acids to carbon mineralization in a ^{13}C natural abundance experiment: Impact of heavy metals and acid rain. Soil Biology & Biochemistry 39, 3177−3186.

Tisdall, J.M., Oades, J.M., 1982: Organic matter and water-stable aggregates in soils. J. Soil Sci., 33: 141–163. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2389.1982.tb01755.

Tryon, E.H. 1948. Effect of charcoal on certain physical, chemical, and biological properties of forest soils. Ecol Monogr 18, 81–115

U.S.D.A., 2005. USDA (United States Department of Agriculture). Natural ResourcesConservation Service. National Soil Survey Handbook.

Van Zwieten, L., Kimber, S., Morris, S., Chan, K.Y., Downie, A., Rust, J., Joseph, S., Cowie, A., 2010. Effects of biochar from slow pyrolysis of paper mill waste on agronomic performance and soil fertility. Plant Soil 327, 235-246.

CONCLUSIONI

Il lavoro di questa tesi di dottorato ha previsto l'utilizzo del biochar come ammendante su suoli con caratteristiche diverse, in presenza di diverse specie di piante allevate in condizioni controllate e in pieno campo. I risultati ottenuti dalle sperimentazioni effettuate hanno confermato la grande variabilità degli effetti che il biochar può avere in relazione alle caratteristiche delle componenti biotiche e abiotiche del suolo. Il contributo innovativo derivante da questo lavoro, alla crescente letteratura scientifica, consiste nell'ampliamento delle conoscenze, ad oggi ancora molto scarse e frammentarie, sugli effetti del biochar sul sistema complesso e dinamico della rizosfera. Infatti ,la maggior parte dei lavori scientifici ad oggi pubblicati sono focalizzati su aspetti specifici relativi agli effetti del biochar sulle rese di colture di interesse agronomico, sulle caratteristiche fisico-chimiche del suolo e sulle componenti microbiologiche, mentre risultano essere sporadiche le pubblicazioni riguardanti la rizosfera nella sua complessità. Data la numerosità delle analisi condotte, si specifica che il lavoro di questa tesi di dottorato ha preso in esame la componte chimico-fisica, microbica e radicale della rizosfera rimandando a indagini future lo studio degli essudati radicali.

I risultati della sperimentazione in campo hanno evidenziato effetti positivi del biochar su diverse proprietà chimico fisiche e microbiologiche in tutti i suoli delle tre colture analizzate.

In particolare, le indagini sulla rizosfera della vite, più approfondite rispetto alle altre colture in campo, foriniscono i dati più innovativi, evidenziando che gli effetti del biochar sulla rizosfera si manifestano in modo significativo anche dopo pochi mesi dal trattamento. Studi precedenti, effettuati soprattutto sulla parte aerea delle piante di vite, infatti, riportano effetti apprezzabili del biochar solo dopo qualche anno dal trattamento del suolo. Gli effetti positivi del biochar, riportati in questo lavoro di tesi, sull'aumento del turnover e della biomassa radicale sembrano essere correlati con una migliore capacità di utilizzo delle acqua da parte della pianta in condizioni di deficit idrico.

La sperimentazione in serra ha previsto l'analisi degli effetti del biochar su tipologie di suoli con caratteristiche chimico-fisiche molto diverse, anche in termini di presenza di nutrienti, utlizzati per la crescita di tre colture differenti. I dati ottenuti confermano l'ampia variabilità degli effetti del biochar sulle caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche, che sono risultati positivi, negativi o neutri, in relazione alla tipologia di suolo e alla diversa specie di

pianta. Per la crescita radicale, in nessuna delle colture analizzate, sono stati rilevati effetti negativi dovuti alla presenza del biochar né nei suoli di per sé carenti né in quelli più ricchi dal punto di vista agronomico, come indicato dai dati di biomassa radicale.

Complessivamente dal lavoro di questa tesi di dottorato emerge che l'utilizzo del biochar in agricoltura deve tener conto di molteplici aspetti, quali le caratteristiche del biochar stesso e del suolo sottoposto a trattamento, delle dosi, dei tempi di permanenza e della tipologia di piante coltivate. Infatti, al variare di uno solo di questi parametri gli esiti derivanti dal trattamento potrebbero cambiare drasticamente, rendendo un biochar efficace in una situazione, dannoso in un'altra e viceversa.

Pertanto un futuro sviluppo di questo lavoro di ricerca potrebbe essere oltre allo studio degli essudati radicali, quello di verificare l'effetto di tali variabili esaminando, oltre al biochar utilizzato, anche altre tipologie di biochar provenienti da differenti biomasse, a differenti dosaggi e per differenti tempi di permanenza.

I risultati che si otterrebbero, unitamente a quelli già presenti in letteratura, rappresentebbero sicuramente un valido supporto per l'implementazione di un modello dinamico di previsione degli effetti del biochar sulla rizosfera, che permetterebbe di ovviare al grosso limite ancora esistente alla sostenibilità dell'utilizzo del biochar come consueta pratica agronomica.