

Le opportunità di impiego dei tannini di castagno a livello agronomico. Interazioni con azoto, fosforo e ferro

INTRODUZIONE

I tannini naturali di origine vegetale, estratti da Castagno (*Castanea sativa* Mill.), sono l'oggetto della presente comunicazione. Il quadro di riferimento è quello agronomico e, in particolare, lo studio sperimentale di tali prodotti a livello delle interazioni con alcune delle principali colture agrarie. Il tutto in rapporto a pratiche agronomiche che riguardano, essenzialmente, la nutrizione vegetale e il loro possibile effetto biostimolante.

Secondo Bate-Smith e Swain (2003), i tannini sono «sostanze fenoliche solubili in acqua, con un peso molecolare compreso tra 500 e 3.000, e che, oltre alla normale reattività dei fenoli, posseggono la capacità di precipitare alcaloidi (solfato di cinconina), gelatina e altre proteine».

Tra le varie categorie di tannini, quelli presenti nel Castagno, in base alla classificazione strutturale proposta da Freudenberg (ibid.), sono del tipo "idrolizzabile" per cui, se trattati con acidi o basi o enzimi idrolitici (tannasi), danno luogo a zuccheri e acidi fenolici. I tannini idrolizzabili, commercialmente definiti anche acido tannico, sono una miscela di gallotannini, la cui composizione varia a seconda del materiale usato per l'estrazione e che, per blanda idrolisi, sia per via chimica che enzimatica, danno prevalentemente glucosio e acido gallico.

La proprietà tipica dei tannini vegetali, che li contraddistingue dalle altre sostanze polifenoliche, è la loro capacità di combinarsi con proteine e altri polimeri naturali, quali pectine e cellulosa. Da ciò deriva anche la loro attività inibitoria nei confronti di molti enzimi (Hagerman, 2002). Peraltro, Benoit et

* Università di Pisa

al. (1968) hanno verificato che «il principale effetto dei tannini sullo sviluppo microbico non è quello di determinare tossicità, perché la decomposizione di composti a basso peso molecolare come amminoacidi e zuccheri (associati ai tannini nel prodotto grezzo, cioè non purificato), non è influenzata in modo apprezzabile dai tannini».

Grazie alla presenza della frazione di non-tannini e alla struttura chimica dei tannini, i prodotti in oggetto formano facilmente complessi con numerosi ioni polivalenti, e in particolare con il ferro (South e Miller, 1998; Rao e Gianfreda, 2000). Questa caratteristica assume un interesse non trascurabile in campo agronomico, tanto che Huang J. L. et al. (1999) hanno impiegato il tannino di *Larix spp.* per preparare complessi solubili con ferro, manganese e zinco. Tali complessi sono stati studiati come fertilizzanti micronutritivi per melo e *Ginkgo spp.*, ottenendo risultati di evidente interesse applicativo.

I primi studi di laboratorio sull'effetto inibente dei tannini purificati, sia di castagno che di mimosa, a carico della nitrificazione di solfato ammonico aggiunto a un terreno agrario, sono di Basaraba (1964). Le ricerche in oggetto, hanno dimostrato che entrambi ritardano la nitrificazione del 20-30% già a concentrazioni dello 0,5-1,0% di tannino nelle prime due settimane dall'applicazione e che l'effetto si protrae per 12 settimane. Circa le cause dell'effetto osservato, l'A. rileva che la riduzione del tasso di nitrificazione «non significa necessariamente che i tannini siano tossici per i batteri nitrificanti di per sé». In proposito, cita White (1956), che, in precedenza, aveva ipotizzato come l'effetto fosse legato alla capacità dei tannini di combinarsi chimicamente con gli enzimi extracellulari dei microrganismi. Basaraba suggerisce anche che la riduzione di azoto ammoniacale libero nel suolo, dopo l'aggiunta di tannini, sia legata alla sua immobilizzazione da parte di microrganismi eterotrofi che attaccano sostanze ricche di carbonio (zuccheri, acidi, ecc.), normalmente presenti nei tannini commerciali.

In uno studio a carattere agro-ambientale, incentrato sui tannini di pioppo, Fierer et al. (2001) osservano che il meccanismo d'inibizione della nitrificazione non è al momento chiaro, anche se documentate ricerche hanno dimostrato che i tannini sono in grado di ridurre l'attività microbica attraverso un effetto d'inibizione diretta (Scalbert, 1991; Field e Lettiga, 1992), formazione di complessi con gli enzimi extracellulari (Benoit e Starkey, 1968; Scalbert, 1991) e con i substrati proteici (Swain, 1979; Bradley et al., 2000). Le conclusioni a cui giungono sono che i tannini di piccole dimensioni (tetrameri e molecole più piccole) hanno un forte effetto biologico diretto in quanto agiscono più spesso come substrati o, in qualche caso, come tossine. Le frazioni di maggior peso molecolare, per contro, hanno principalmente

effetti biochimici, potendo complessare i substrati presenti nel suolo. Tutte le frazioni, comunque, influenzano la disponibilità di azoto.

Per quanto attiene all'attività anti-ureasica, Gianfreda et al. (1995) hanno trovato che il cosiddetto "acido tannico" (gallotannini) inibisce fortemente l'attività ureasica (la costante d'inibizione è $K_i = 0,040$ mM). Alla concentrazione di 0,1 mM l'attività ureasica, nelle prove di cui viene dato conto, si riduce del 72,4%. La dipendenza dei parametri cinetici (V_{\max} e K_m) dalla concentrazione di "acido tannico" suggerisce la presenza di un meccanismo puro d'inibizione non competitiva. Si formano complessi solubili e non solubili tannato-ureasi sia aumentando i tempi di contatto che il rapporto "acido tannico"/ureasi. Il meccanismo è legato alla formazione di legami reversibili e irreversibili col substrato, che si realizzano immediatamente dopo il contatto. La successiva polimerizzazione ossidativa dei tannini, evidenziata dal loro imbrunimento, aumenta ulteriormente il grado di complessazione, rendendo le molecole enzimatiche sempre meno accessibili.

SINTESI DELL'ATTIVITÀ SVOLTA PRESSO IL DAGA-UNIVERSITÀ DI PISA

In riferimento a quanto sopra, l'attività agronomica svolta dal 2001 sui tannini di castagno di Nuova Rivart, estratti in acqua e concentrati con tecnologie a membrana, ha riguardato tutta una serie di effetti che tali prodotti sono in grado di espletare.

A livello di laboratorio, in camera di crescita, lo studio si è inizialmente orientato all'individuazione della prima dose utile in grado di dar luogo a significativi effetti su semi di *Triticum vulgare* L. e *Avena sativa* L. allevati in capsule Petri su carta bibula. Rispetto al testimone, già a 2,5 - 5 ppm di tannini le plantule hanno fatto segnare un differente tasso di sviluppo. In particolare ha colpito il marcato stimolo rizogeno a livello di capillizio radicale, cui ha corrisposto un epicotile più verde e sviluppato.

Passando al terreno, stante il pH acido del prodotto, è stato impostato uno specifico studio volto alla correzione di terreni alcalini, in riferimento alla banda prossima alla fila di semina/trapianto. Gran parte di questa attività si è svolta su tabacco Virginia Bright, coltura che notoriamente si avvantaggia di condizioni di terreno sabbioso e sub-acido. In parallelo, sempre su tabacco, si è studiato l'impiego dell'azadirachtina, quale agente nematocida-nematostatico. Tale insetticida, di origine naturale, estrinseca e mantiene la sua efficacia purché veicolato in acqua con pH compresi tra 6 e 6,5. Le prove hanno interessato, nel tempo, vari ambienti del nord e centro Italia e hanno riguardato

la simultanea applicazione, in microirrigazione, di questo prodotto e tannino di castagno, allo scopo di mantenere il pH dell'acqua sui valori in precedenza indicati. Rispetto ai testimoni, senza correzione del pH o con acqua corretta con acido citrico, l'effetto è risultato significativamente migliore, nel senso che le piante trattate con tannino hanno fatto segnare sempre un superiore tasso iniziale di crescita, indipendentemente dalla presenza o meno di nematodi (*Meloidogyne spp.*). Durante le analisi nematologiche sugli apparati radicali è stato verificato che il capillizio risultava molto più sviluppato in corrispondenza dell'uso del tannino nell'acqua irrigua e che il trattamento dava luogo a un controllo migliore dell'avversità, rispetto all'azadirachtina da sola o veicolata in acqua corretta con acido citrico. Concentrandoci sull'aspetto fisiologico e nutritivo, è stato possibile determinare, in cicli di prove successive, che la maggiore crescita iniziale delle piante è risultata associata a un maggior *recovery* di P2O5 da parte della pianta, sulle cui cause agiscono probabilmente sia l'aspetto fisiologico dello stimolo alla crescita iniziale dell'apparato radicale che l'effetto del tannino sull'aumento dell'assimilabilità del fosforo nel suolo conseguente all'acidificazione (effetto, quest'ultimo, dimostrato in modo indipendente in laboratorio, in assenza di pianta, formulando tannino e roccia fosfatica tenera).

Un altro aspetto considerato nelle ricerche è stato quello del rilascio dell'azoto. In prove di laboratorio, svolte secondo la metodica modificata Stanford e Smith (Magni et al., 2008), abbiamo verificato che l'azoto ureico, già in presenza di basse concentrazioni di tannino (1%) dà luogo a una curva di rilascio comparabile ai classici "Nitrogen Slow Release Fertilizers", tipo metilenurea. In numerose prove sperimentali di campo, sia su grano che mais, i risultati conseguiti hanno dimostrato che l'effetto consente, a parità di resa quali-quantitativa, una riduzione del totale di azoto applicato alla coltura di circa il 25% sulla base del minore dilavamento della forma nitrica e della maggiore efficienza complessiva dell'azoto contenuto nel fertilizzante che, nei suoli subalcalini o alcalini, subisce ridotte perdite per volatilizzazione. Al riguardo si deve considerare che tali perdite possono raggiungere valori elevati, anche dell'ordine del 15-30% dell'azoto ammoniacale o ureico quando le applicazioni hanno luogo in superficie, senza il successivo interrimento (caso dei cereali a ciclo autunno-vernino). Tutto questo ha un importante significato a livello del *recovery* di N da parte della pianta, con vantaggi evidenti a livello economico e ambientale.

A livello specialistico il tannino è stato anche impiegato per formulare un concime complessato con ferro. Questo prodotto, in una serie di ricerche condotte prevalentemente su colture arboree da frutto (pero, actinidia, vite,

ecc.) con chiari sintomi di clorosi ferrica, ha dimostrato un'ottima efficienza in applicazioni attuate in microirrigazione, tanto da far regredire rapidamente la sintomatologia. In proposito, sono allo studio altre combinazioni con magnesio e microelementi nonché formulazioni applicabili per via fogliare.

L'attività sperimentale sin qui condotta ha permesso il conseguimento di quattro patent UE con estensione negli USA e in Giappone.

RIASSUNTO

Dopo un esame della bibliografia relativa agli effetti dei tannini a carico del ciclo dell'azoto e alla disponibilità di ferro nel suolo, vengono presentati i principali risultati delle ricerche svolte presso il DAGA-Univ. Pisa, che hanno portato negli anni al deposito di 4 brevetti (l'ultimo del 2012), alla formulazione di nuovi concimi con azoto a lenta cessione e ferro complessato con tannini di castagno, nonché di correttivi in grado di interagire positivamente con la crescita e lo stato di sanità delle colture.

ABSTRACT

After a literature survey on the effects of tannins on soil Nitrogen cycle and Iron availability, the main results of the research activity carried out at DAGA-Univ. Pisa are presented. These results led to the filing of 4 patents (the last in 2012), to the formulation of new Nitrogen slow-release fertilizers, and Iron fertilizers with chestnut tannins as complexing agent. Also some correctives were investigated, to improve plant growth and health.

BIBLIOGRAFIA

- BARGIACCHI E., COSTA G., DELLA CROCE C., FOSCHI L., PAMPANA S., MIELE S., RIZZI G. (2004): EP-1464635 24-03-2010, priorità: 06-10-2004.
- BARGIACCHI E., BERTOLA R., COSTA G., DELLA CROCE C., MIELE S., POMPEIANO A., ZAMBELLI P. (2008): EP-06756296.7-1218, priorità 07-10-2005.
- BARGIACCHI E., COSTA G., MIELE S., MAGNI S. (2011): EP 2 345 628, priorità 15-01-10.
- BARGIACCHI E., MIELE S., MILLI G., BERTOLA R. (2012): Paper 51B presented at 45th Tobacco Workers' Conference, Williamsburg VA (USA) 2012, CORESTA.org database.
- BATE-SMITH E. C., SWAIN T. (1962): in Mason and Florkin (eds.), *Comparative Biochemistry*, vol. 3A, Academic press, NY, 705-809.
- BENOIT R.E., STARKEY R.L. (1968): «Soil Sci.», 105, pp. 203-208.
- BRADLEY R.L., TITUS B.D., PRESTON C.P. (2000): «Soil Biol. & Biochem.», 32, pp. 1227-1240.
- FIELD J.A., LETTINGA G. (1992): in Hemingway R. W. Et al. (eds.), *Plant Polyphenols*, Plenum Press, NY, 673-692.

- FIERER N., SCHIMEL J.P., CATES R. G., ZOU J. (2001): «Soil Biol. & Biochem.», 33, pp. 1827-1839.
- GIANFREDI L., DECRISTOFARO A., RAO M.A., VIOLANTE A. (1995): «Soil Sci. Soc. Am. J.», 59, pp. 811-815.
- HAGERMAN A.E. (2002): web publication Miami Univ., Ohio (USA).
- HUANG J. L. SUN D. W., XIAO S.C. (1999): «J. Nanjing Forestry University», 23, 3, pp. 25-28.
- MAGNI S., FOSCHI L., PICCOTINO D., MIELE S. (2008): European Turfgrass Society Congress, Pisa, May 19-20, Atti.
- MIELE S., MILLI G., BARGIACCHI E. (2010): Paper presented at CORESTA Congress 2010, Edinburgh, UK, Sept. 12-16, CORESTA.org database.
- MIELE S., BARGIACCHI E., BERTOLA R. (2011): The 9th New Ag Intern. Conference & Exhibition, Athens (Greece), June 28-30, 2011, New Ag International June-July 2011 issue, 77-78.
- MIELE S., BARGIACCHI E., MILLI G. (2011): 2011 Meetings of the CORESTA Study Groups, Santhiago, Chile, Nov. 6-11, 2011, CORESTA.org database.
- RAO M. A., GIANFREDI L. (2000): «Soil Biol. Biochem.», 32, 1921-1926.
- ROMANI A., MIELE S., BARGIACCHI E., CAMPO M., BUZZINI P. (2011) Paper presented at 102nd AOCS Annual Meeting & Expo, Cincinnati (OH)-USA, 01/05-05-2011, Abstract book page 112.
- SCALBERT A. (1991): «Phytochemistry» 30, 3875-3883.
- SWAIN T. (1979): In: Rosenthal G.A. et al. (eds.) Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites. Academic Press, NY, 657-682.