DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE AGRARIE E DELTERRITORIO

EFFETTO DI DIVERSE LAVORAZIONI DEL TERRENO SULLA DEGRADAZIONE DI TELI PACCIAMANTI BIODEGRADABILI

Effect of different soil tillage on the degradation of soil-biodegradable mulching films

TESI SPERIMENTALE

Studente:
SEBASTIANO SERAFINI

Relatore:
PROF. MARCO TODERI

Correlatore:
DOTT. MATTEO FRANCIONI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

Dedico questo lavoro a tutte le persone che mi hanno sostenuto in questi anni e che mi hanno incoraggiato a dare sempre il massimo.
Un ringraziamento speciale va alla mia famiglia.

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE 5

ELENCO DELLE FIGURE 6

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI 8

CAPITOLO 1 INTRODUZIONE 9

1.1 La pacciamatura del terreno 9

1.2 Teli pacciamanti biodegradabili 12

1.2.1 *Teli pacciamanti biodegradabili bio-based e non bio-based* 15

1.2.2 *Ambiente di Biodegradazione* 17

1.2.3 *La degradazione abiotica dei teli pacciamanti (weathering)* 18

1.2.4 *La degradazione biotica dei teli pacciamanti* 20

1.3 Metodi di analisi per la stima della biodegradazione 23

1.3.1 *Metodi diretti* 26

1.3.2 *Metodi indiretti* 30

1.4 Obiettivo e scopo della tesi 32

CAPITOLO 2 MATERIALI E METODI 35

2.1 Area di studio e caratteristiche del suolo 35

2.2 Gestione della prova sperimentale 36

2.2.1 *Teli pacciamanti* 36

2.2.2 *Disegno sperimentale e trattamenti* 37

2.2.3 *Metodologia per la stima della biodegradazione* 40

2.2.4 *Dati metereologici* 44

CAPITOLO 3 RISULTATI 46

3.1 Andamento della degradazione e significatività dei fattori 46

CAPITOLO 4 DISCUSSIONE 54

4.1 Degradazione abiotica dei teli pacciamanti 54

4.2 Degradazione biotica dei teli pacciamanti a seguito delle lavorazioni 55

4.3 Prospettive future 59

CONCLUSIONI 62

BIBLIOGRAFIA 63

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1-1: Alcuni esempi di specifiche standard per determinare la biodegradabilità di materiali e prodotti nel suolo (Briassoulis & Degli Innocenti, 2017). 24

Tabella 2-1: Localizzazione delle stazioni metereologiche dell'ASSAM e della Protezione Civile della Regione Marche impiegate nella presente indagine. 44

Tabella 3-1: Valori della media dell'area percentuale residua in relazione alle tipologie di telo (PAR, "Pardini"; EIF, "Eiffel"), di lavorazione (Aratura; aratura+erpicatura "Arat.+Erpic.") e di tempo di prelievo (da novembre 2020 a settembre 2021, T1-T5, intervalli di ~2 mesi). 48

Tabella 3-2: Massa percentuale residua in relazione alle tipologie di telo (PAR, "Pardini"; EIF, "Eiffel"), di lavorazione (Aratura; aratura+erpicatura "Arat.+Erpic.") e di tempo di prelievo (da novembre 2020 a settembre 2021, T1-T5, intervalli di ~2 mesi)..... 50

Tabella 3-3: Analisi ANOVA a misure ripetute per lavorazione del terreno, tipo di telo e data di campionamento. La stessa analisi è stata applicata per i dati ottenuti con entrambi i metodi di stima utilizzati ("perdita di massa" e "perdita di superficie") durante il periodo di studio. 51

Tabella 3-4: ANOVA entro le date di campionamento per la lavorazione del terreno e i teli pacciamanti e le date di campionamento (da novembre 2020 a settembre 2021, T1-T5, intervalli di circa 2 mesi), applicata separatamente per i dati ottenuti con entrambi i metodi di stima utilizzati ("perdita di massa" e "perdita di superficie") durante il periodo di studio. Le lettere diverse indicano differenze significative (P = 0,05, test di Tukey)..... 52

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1: Struttura molecolare del polietilene tereftalato; formula chimica $(C_{10}H_8O_4)_n$. Fonte: Omnexus.specialmchem.com 11

Figura 1-2: Strutture chimiche di polimeri sintetici e naturali utilizzati nei teli di pacciamatura biodegradabili commerciali (Sander, 2019)..... 14

Figura 1-3: Schema rappresentativo dei diversi ambienti di degradazione..... 17

Figura 1-4: Fasi principali della biodegradazione(a); Fasi di sviluppo di CO_2, H_2O e CH_4, indicazione dell'attività dei microrganismi (b). Metodi per testare l'andamento della biodegradazione (c). (Kjeldsen, et al., 2019). 18

Figura 1-5: Tre step fondamentali del processo di biodegradazione dei polimeri nei suoli (Sander, 2019). 21

Figura 1-6: Test di mineralizzazione dei polimeri nei suoli in cui viene monitorata nel tempo la formazione di CO_2 (a). Curve di mineralizzazione per tre combinazioni polimero-suolo che determinano diverse mineralizzazioni (b). (Sander, 2019). 27

Figura 2-1: Campo dell'azienda agricola "Società Agricola Fratelli Ercoli" sulla quale sono stati applicati i teli poi usati per la prova sperimentale (foto del 18-01-2021). 36

Figura 2-2: Dettaglio di parcelle e sub-parcelle della prova. (foto del 13-07-2021). 37

Figura 2-3: Esempi di meshbag dopo estrazione: a) dettaglio del cordoncino che ha unito le meshbag dei cinque tempi di prelievo di ogni tipologia di telo di ogni sub-parcella, per facilitare la loro individuazione nel terreno. b) dettaglio del campione del telo pacciamante all'interno della meshbag; in giallo si nota anche l'etichetta con le indicazioni sul campione. 39

Figura 2-4: Area sperimentale prima (a) e dopo (b) un'operazione di scerbatura. ... 40

Figura 2-5: Fasi di estrazione delle meshbag dal suolo: a) Scavo; b) Rimozione meshbag; c) Copertura scavo. 41

Figura 2-6: a) Attrezzatura e fasi di pulizia del campione: b) Rimozione dei residui di terreno con pennelli; c) Stesura del campione nei fogli laminati; d) Esempio di un campione residuo dentro la meshbag al T3. 42

Figura 2-7: Temperature medie mensili e pluriennali (2019-2021) dell'aria e precipitazioni nell'area di studio durante il periodo sperimentale (fonte: Regione Marche, Servizio Protezione Civile; ASSAM). “Mulch film weathering” si riferisce al periodo in cui i teli di pacciamatura sono stati deposti insieme alla coltura; “Mulch film burial” si riferisce al periodo in cui i teli di pacciamatura sono stati incorporati nel terreno. 45

Figura 3-1: Andamento della perdita di area (%) per la lavorazione del terreno (aratura, linee tratteggiate; aratura+erpicatura, linee piene), tipo di telo (PAR, “Pardini”; EIF, "Eiffel") e date di campionamento (intervallo di circa 2 mesi). I dati mostrano le medie ±l’errore standard. 49

Figura 3-2: Aspetto di ciascun campione di telo dopo la scansione con ImageJ per lavorazione del terreno (aratura; aratura+erpicatura), tipo di telo (PAR, “Pardini”; EIF, “Eiffel”) e data di campionamento (da novembre 2020 a settembre 2021, T1-T5, intervalli di ~2 mesi)..... 49

Figura 3-3: Perdita di massa (%) per la lavorazione del terreno (aratura, linee tratteggiate; aratura+erpicatura, linee piene), tipo di telo (PAR, “Pardini”; EIF, "Eiffel") e date di campionamento (intervallo di circa 2 mesi). I dati mostrano le medie ±l’errore standard. 50

Figura 3-4: Dettaglio dell’aspetto delle sub-parcelle sottoposte ad aratura e aratura+erpicatura nel tempo. 53

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

CO_2	Anidride carbonica
UNI	Ente nazionale italiano di unificazione
UV	Ultravioletto
PLA	Acido polilattico
PBAT	Poli(butilene adipato-co-tereftalato)
PBSA	Poli(butilene succinato-co-adipato)
PBS	Poli(butilene succinato)
PHA	Poliidrossialcanoati
ISO	International Organization for Standardization
CUE	Efficienza di utilizzo del carbonio
CEN	Comitato Europeo di Normazione
ASTM	American Society for Testing and Materials
SEM	Microscopia Elettronica a Scansione
GPC	Cromatografia a permeazione di gel
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
PAR	Telo pacciamante “Pardini”
EIF	Telo pacciamante “Eiffel”
USDA	Dipartimento dell'agricoltura degli Stati Uniti d'America
ASSAM	Agenzia Servizi Settore Agroalimentare delle Marche

Capitolo 1
INTRODUZIONE

1.1 **La pacciamatura del terreno**

La pratica della pacciamatura come copertura del terreno con vari materiali per prevenire la crescita delle erbe infestanti è molto antica. Sin dai tempi passati (2500-3000 anni prima di Cristo), diverse popolazioni tra cui egizi, etruschi, persiani, romani hanno adottato la tecnica della pacciamatura andando solo a simulare i sedimenti di foglie e detriti legnosi sul suolo, osservando e sfruttando la loro capacità di impedire la crescita delle erbe infestanti per l'effetto combinato del blocco della radiazione solare e l'azione biochimica della decomposizione dei materiali organici (Mormile, et al., 2017).

La pacciamatura con sostanza organica era già utilizzata nell'agricoltura antica, ma insieme ad essa è da evidenziare anche l'esistenza di una lunga storia di pacciamatura litica (realizzata con la pietra). Più di mille anni fa, sia nel Vecchio che nel Nuovo Mondo, gli agricoltori usavano materiali litici (e.g. pietre, ghiaia, ciottoli, cenere vulcanica, cenere e altri materiali litici) per pacciamare i loro campi di terraferma per evitare la siccità e migliorare la resa dei raccolti (Ray & Biswasi, 2016). La firma indelebile lasciata dalla pacciamatura litica può essere vista nelle società antiche e moderne nelle regioni aride di tutto il mondo (Ortiz-Cano. et al., 2020).

La tecnica della pacciamatura a pietra è stata sviluppata in modo importante, tanto da raggiungere un grado di perfezione e di intensità unico al mondo, dalla società dei Rapanui, la popolazione autoctona dell'Isola di Pasqua (Bork, et al., 2004). Prima della rivoluzione agronomica apportata dall'uso dei teli plastici, la tecnica della pacciamatura si è evoluta negli anni con l'utilizzo di nuovi materiali come le cortecce d'albero, il cartone, la ghiaia, i lapilli, la iuta, i gusci di cacao, le fibre naturali (principalmente cocco e canapa) e i rifiuti organici, che potessero migliorare in qualche modo gli effetti agronomici positivi già riscontrati con i materiali più primitivi (Mormile, et al., 2017).

Quando nel 1948 il Prof. E.M. Emmert costruì, per la prima volta al mondo, una serra ricoperta di teli di plastica (teli di acetato di cellulosa), forse non immaginava che stesse iniziando una vera rivoluzione nel mondo dell'agricoltura; il suo obiettivo era realizzare una

nuova serra costruita con materiali innovativi ed economici. I risultati sperimentali sono stati così allettanti da estendere l'uso del telo plastico anche per la pacciamatura. Successivamente, il Prof. Emmert è passato a un telo in polietilene più efficiente e da allora, la cosiddetta plastica si è estesa e ha portato molti e importanti benefici all'agricoltura moderna (Malinconico, 2017).

I teli di pacciamatura in plastica hanno guadagnato in breve tempo molta attenzione da parte del mondo agricolo per gli svariati benefici che sono in grado di apportare: modificano la temperatura dell'aria e del suolo, la radiazione solare che raggiunge le superfici del suolo, la velocità di evaporazione dell'acqua dal suolo e lo scambio di gas tra suolo e aria e inoltre sono anche facili da posizionare sul terreno con l'ausilio di alcune macchine speciali, riuscendo a coprire decine di ettari in poco tempo (Martín-Closas, et al., 2017).

Tutti questi cambiamenti nell'ambiente di coltivazione portano a una serie di conseguenze agronomiche. L'aumento della temperatura del suolo accelera lo sviluppo delle colture, un aumento della temperatura dell'aria circostante la coltura intensifica la crescita della parte aerea, aumenta la superficie fogliare e la produzione; la limitazione della luce che raggiunge il suolo impedisce alle erbe infestanti di crescere e diminuisce la loro capacità di competere con la coltura per la radiazione solare; la stabilizzazione del contenuto idrico del suolo previene lo stress idrico nelle piante e fornisce un ambiente più favorevole per l'assunzione di acqua e nutrienti da parte delle radici; infine si può riscontrare una stimolazione della fotosintesi per la maggior concentrazione verso la coltura, della CO_2 rilasciata dalla respirazione del terreno al di sotto del telo (Martín-Closas, et al., 2017).

Fino a pochi anni fa lo spessore medio di un telo di pacciamatura era di 50–70 µm; oggi, grazie alle tecniche di co-estrusione, gli spessori sono largamente ridotti (20-30 µm), pur mantenendo buone proprietà meccaniche (Mormile, et al., 2017). Nonostante il telo di colore nero sia uno dei più utilizzati dagli agricoltori, in realtà le tipologie di telo sono svariate e adattabili alle varie esigenze: si possono trovare teli colorati (bianchi, verdi o gialli) e foto-selettivi, alcuni dei quali come quelli foto-riflettenti riescono a garantire numerosi vantaggi che si sommano a quelli dei più tradizionali teli neri, come per esempio un risparmio idrico accentuato (Mormile, et al., 2015).

La realizzazione dei teli pacciamanti avviene tramite un processo detto di "estrusione", ovvero un processo continuo in cui la plastica fusa viene spinta attraverso uno stampo che la modella. Successivamente questa viene raffreddata e tagliata in sezioni o arrotolata; grazie a questo processo è possibile realizzare porzioni di qualsiasi lunghezza. Oggi le moderne linee di produzione utilizzano una tecnica detta di "co-estrusione" la quale differisce dalla

“estrusione” per via dell’utilizzo di più estrusori che alimentano un unico stampo (Mormile, et al., 2017).

Un telo plastico utilizzato per l'agricoltura è caratterizzato da tre proprietà principali: i) meccanica, ii) ottica e iii) termica e saranno i produttori a definire le proprietà in base alla funzione che il telo dovrà svolgere, considerando le necessità degli utenti. Tutti i teli sono sottoposti poi ad un controllo qualità da parte delle varie aziende produttrici per garantire sia le caratteristiche della materia prima che del prodotto in uscita. Al termine del percorso del controllo qualità, i prodotti, una volta superati tutti i test, sono garantiti e certificati secondo la normativa europea di riferimento UNI EN 13206 (2020) con l’obiettivo principale di classificare i teli di copertura termoplastici pacciamanti e non, utilizzati in agricoltura e orticoltura, in base alla loro durata prevista. Tra le proprietà da prendere in considerazione per la scelta di un telo plastico pacciamante non può essere escluso il rispetto per l’ambiente, secondo il quale il materiale una volta cessato il suo funzionamento, dovrebbe essere raccolto e riciclato, senza arrecare danno all'ambiente (Mormile, et al., 2017).

La tipologia di telo pacciamante in plastica più utilizzato al mondo è quello a base di polietilene (Figura 1-1), il quale non è biodegradabile (Narayan, 2017). Difatti, il polietilene può essere soggetto a frammentazione e di conseguenza porzioni di materiale plastico possono raggiungere diversi habitat (tra cui oceano e/o sistemi agricoli) provocando danni ingenti agli ecosistemi (Narayan, 2017).

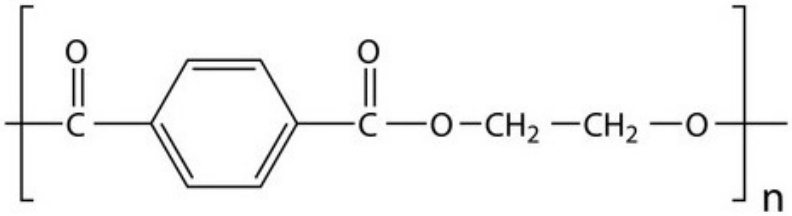

Figura 1-1: Struttura molecolare del polietilene tereftalato; formula chimica $(C_{10}H_8O_4)_n$. Fonte: Omnexus.specialmchem.com

Infatti, mentre i residui macroscopici delle plastiche in polietilene sono un problema ambientale facilmente percepibile dall’opinione pubblica in quanto visibili ad occhio nudo, le microplastiche derivanti da polimeri non biodegradabili sono meno percepibili. Difatti, le microplastiche potrebbero creare un futuro rischio per l'ambiente e la salute stessa dell’uomo (Kjeldsen, et al., 2019). Studi recenti hanno infatti mostrato come l’accumulo di residui di telo pacciamante in polietilene nei terreni agricoli può ridurre la produttività delle diverse colture

bloccando le infiltrazioni d'acqua, impedendo lo scambio di gas, limitando la crescita delle radici e alterando l'attività microbica nel suolo stesso (Liu, et al., 2014; Qian, et al., 2018).

La pratica della bruciatura dei teli plastici in polietilene nei campi non è un'opzione sostenibile poiché genera un grave inquinamento ambientale atmosferico. Per questo motivo la combustione di pellicole di plastica è una pratica già severamente vietata in molti paesi o in fase di eliminazione; allo stesso tempo lo smaltimento di tali materiali in discarica è sia costoso, sia un'alternativa poco praticabile dal punto di vista di sostenibilità ambientale considerato anche il fatto che i materiali plastici impiegano dai 100 ai 400 anni per degradarsi nell'ambiente. L'unica alternativa in linea con la sostenibilità ambientale per lo smaltimento dei teli non biodegradabili riguarda il riciclaggio meccanico, il quale è preceduto dalla raccolta e dalla pulizia degli stessi per la realizzazione del medesimo prodotto o di altri. Esistono infatti alcune aziende che offrono questo servizio che però necessitano di avere rifiuti altamente omogenei per il riciclo ottimale dei prodotti (Guerrini, et al., 2017).

La recente introduzione di plastiche progettate per essere biodegradabili nei diversi ambienti (e.g., suolo o compost) offrono una soluzione di fine vita ecologicamente sostenibile per i teli di pacciamatura in plastica e/o i prodotti in plastica normalmente utilizzati in agricoltura. Inoltre, un'ulteriore innovazione in questo ambito è la realizzazione di prodotti biodegradabili che utilizzano carbonio a base biologica al posto del carbonio fossile. Questa opzione potrebbe offrire una "Carbon footprint" dei diversi prodotti notevolmente ridotta, potenziare l'economia agraria rurale e ridurre anche la dipendenza dalle risorse fossili (Narayan, 2017).

1.2 **Teli pacciamanti biodegradabili**

I teli biodegradabili per l'agricoltura all'inizio sono stati sviluppati principalmente per l'applicazione della pacciamatura, che rimane ancora quella più significativa.

Le innovazioni negli anni '80 e nei primi anni '90 portano all'introduzione di polimeri e plastiche biodegradabili. L'esplorazione agronomica di questi teli biodegradabili è iniziata alla fine degli anni '90, con le prime prove sul campo riportate da Weber (Weber, 1998), Nagata et al. (Nagata et al., 1998) e Manera et al. (Manera et al., 1999), rispettivamente in Germania, Giappone e Italia.

La posa di un telo plastico su un terreno avviene pre o post semina o prima del trapianto, ed ha lo scopo di modificare positivamente il bilancio energetico e di massa del sistema colturale. La tecnologia della pacciamatura è stata sviluppata con materiali che vengono convertiti in teli, che vengono posati sul terreno lungo file che possono coprire

parzialmente il campo (35-70%) o eccezionalmente tutta l'area. I teli biodegradabili sono in genere più sottili come spessore (12-20 μm) rispetto a quelli tradizionali (15-40 μm) e sono distribuiti in rotoli larghi 0,8-1,8 m a seconda delle esigenze degli agricoltori. L'operazione di posa meccanica è un aspetto fondamentale per la pacciamatura. In molti casi questo viene anche perforato per i trapianti ed in contemporanea può anche essere integrato un sistema di irrigazione posizionato al di sotto del telo stesso (Martín-Closas, et al., 2017). Il processo di trapianto può anche essere eseguito nella stessa operazione di posa facendo in questo modo ridurre i costi di esercizio e lo stress di compattazione applicato al terreno. Gli effetti positivi derivanti dalla pacciamatura possono essere evidenti durante tutto il ciclo colturale per colture che si sviluppano lentamente e coprono solo parzialmente i teli (e.g. cipolla). Al contrario, gli stessi effetti sono attesi solo precocemente quando le colture si sviluppano rapidamente e riescono a coprire totalmente i teli in tempi brevi (e.g. zucca) (Martín-Closas, et al., 2017). Una volta terminata la sua funzione in campo il telo può essere interrato nel suolo con lavorazioni agronomiche di vario tipo e intensità, in modo da far innescare poi il processo di biodegradazione.

Oggi la creazione di teli plastici biodegradabili si basa principalmente sull'utilizzo di poliesteri e polimeri naturali (Figura 1-2), ovvero polimeri che sono intrinsecamente biodegradabili nel suolo: ciò implica che la biodegradazione inizi immediatamente dopo il loro interramento ed il conseguente coinvolgimento attivo dei microrganismi (Briassoulis & Degli Innocenti, 2017; Sander, 2019). I polimeri sintetici maggiormente utilizzati nella manifattura dei teli plastici biodegradabili includono i poliesteri alifatici poli(butilene succinato), poli(butilene succinato-co-adipato) (PBSA), poli(ε-caprolattone) e acido polilattico, nonché il copoliestere aromatico−alifatico poli(butilene adipato-co-tereftalato) (PBAT). I polimeri naturali includono amido, cellulosa e poliidrossialcanoati (PHA). La maggior parte dei teli per pacciamatura biodegradabili sono miscele di due o più dei polimeri elencati.

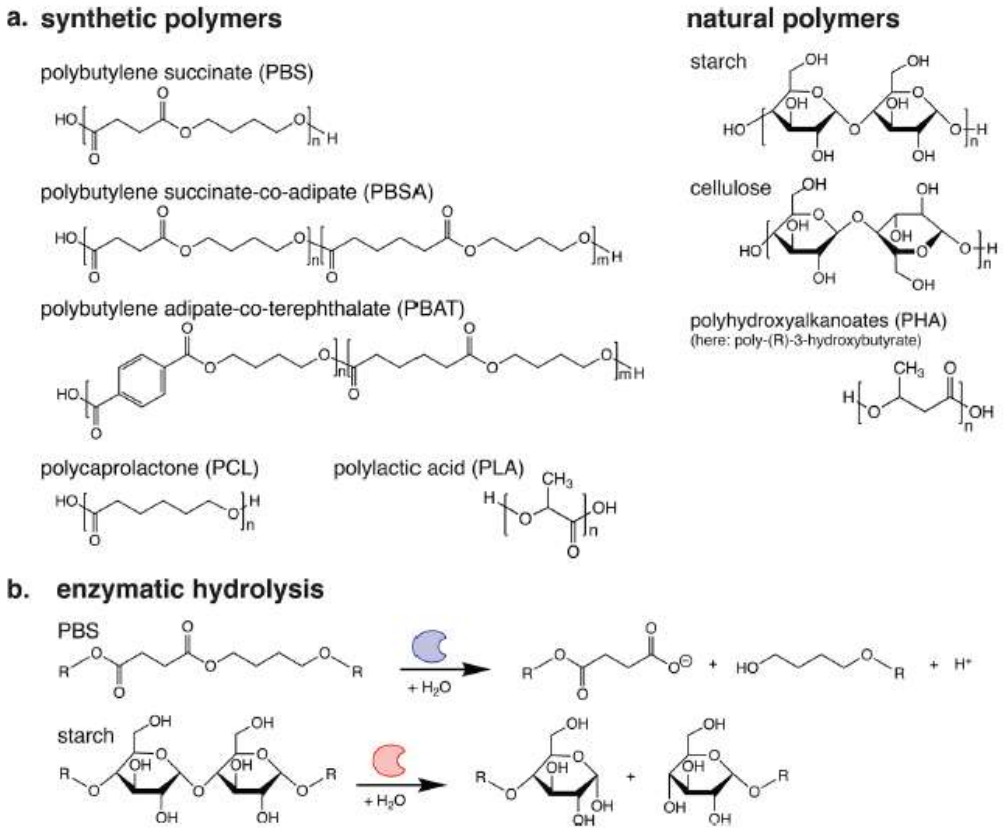

Figura 1-2: Strutture chimiche di polimeri sintetici e naturali utilizzati nei teli di pacciamatura biodegradabili commerciali (Sander, 2019).

Una caratteristica chimica comune tra i polimeri elencati è che le loro catene principali contengono gruppi funzionali che sono idrolizzabili enzimaticamente (cioè un legame glicosidico nei legami di amido e esteri in tutti gli altri polimeri) (Sander, 2019). Si può dedurre quindi che il gruppo funzionale (o catena laterale) del singolo monomero è il principale contributore alle differenze nelle proprietà chimiche e meccaniche della plastica, poiché alcuni gruppi e legami chimici sono più facilmente degradati dagli agenti biologici (Kjeldsen, et al., 2019). L'alterazione della composizione monomerica dei poliesteri consente la regolazione della degradabilità e delle caratteristiche prestazionali della plastica per una sua particolare applicazione (Sander, 2019).

La struttura molecolare ed in particolare la disponibilità del carbonio trasportabile nelle cellule microbiche per essere successivamente utilizzato come fonte energetica, guidano l'assimilazione microbica di materiali a base di carbonio come appunto le plastiche biodegradabili e/o i polimeri di cui sono composte. È importante sottolineare che la biodegradabilità di un polimero dipende dalle sue proprietà fisico-chimiche e non dall'origine del suo carbonio. Ovvero, sia polimeri di origine fossile che materiali provenienti da fonti

rinnovabili possono essere biodegradabili in un determinato ambiente. Al contempo una plastica totalmente a base di polimeri provenienti da fonti rinnovabili potrebbe non essere biodegradabile in alcun ambiente (Narayan, 2017; Sander, 2019). Indicare il tempo necessario per completare la biodegradazione o, più specificamente, il tempo necessario per la completa assimilazione microbica della plastica nell'ambiente di smaltimento selezionato è un requisito fondamentale nell'ambito delle plastiche biodegradabili (Narayan, 2017).

Le materie plastiche sono generalmente progettate per la resistenza e la resilienza (i.e., devono garantire all'agricolture buone performance in campo), caratteristiche che vanno in conflitto diretto con la loro capacità di degradarsi sia per mezzo di fattori abiotici che biotici.

1.2.1 *Teli pacciamanti biodegradabili bio-based e non bio-based*

La biodegradabilità è un'opzione di "end of product life" che consente di sfruttare l'attività metabolica dei microrganismi presenti nell'ambiente di smaltimento selezionato. La completa biodegradabilità di un prodotto consente uno smaltimento ecologicamente sostenibile che sfrutta la catena alimentare microbica in modo tempestivo, sicuro ed efficace. Tale processo si basa sui microrganismi naturalmente presenti nell'ambiente di smaltimento che assimilano e utilizzano i substrati di carbonio come fonte energetica per i loro processi vitali (Sander, 2019). Semplificando, è possibile affermare che i materiali biodegradabili possono essere convertiti in biomassa, anidride carbonica (CO_2), acqua (H_2O) e, se in condizioni di anaerobiosi totale o parziale, metano (CH_4) come nel caso di stoccaggio in discariche (Kjeldsen, et al., 2019). I teli pacciamanti in materiale biodegradabile offrono un'alternativa sostenibile in quanto possono essere smaltiti in appositi ambienti e/o condizioni per i quali sono stati progettati. Tali ambienti e condizioni comprendono il compostaggio, la loro digestione anaerobica insieme a rifiuti agricoli e altri rifiuti organici ed infine la loro incorporazione nel terreno stesso. Il presente lavoro di tesi si focalizzerà in questo ultimo ambiente le cui caratteristiche saranno analizzate in dettaglio in seguito (paragrafo 1.2.4). In generale, l'utilizzo di un telo completamente biodegradabile nel suolo permette un risparmio sia economico (e.g., trasporto, pulizia) che di ore-lavoro (i.e., non è necessario rimuoverlo fisicamente). Sfortunatamente sono presenti molte incomprensioni riguardo la definizione di prodotti "biodegradabili" a prescindere dall'ambiente di biodegradazione per il quale sono progettati. Tali incomprensioni non riguardano solo il mercato ma entrano in pieno anche nell'ambito della ricerca, aspetto che sarà approfondito in seguito nel paragrafo 1.3.

Una delle innovazioni nell'ambito della sostenibilità ambientale dei teli pacciamanti biodegradabili, è la realizzazione di plastiche "bio-based" le quali sono prodotte a partire da

carbonio organico di origine rinnovabile e proveniente dal mondo agricolo e/o dal regno vegetale, animale, dei microrganismi o anche a partire da materiali marini che vivono in un ambiente naturale ed in equilibrio con l'atmosfera. Va però sottolineato come la questione delle plastiche "bio-based" non tenga conto del valore attribuito all'origine del carbonio a base biologica (i.e., bio-based *vs*. non-rinnovabili) nel computo della fine del loro ciclo di vita. In altre parole, la domanda: "*cosa accade al prodotto dopo l'uso, quando viene immesso nell'ambiente di smaltimento*?" resta pienamente aperta nel caso delle plastiche "bio-based". Come già accennato, malgrado il loro potenziale teorico, le plastiche "bio-based" non sono necessariamente biodegradabili (e/o compostabili) mentre non tutte le plastiche biodegradabili (o compostabili) sono automaticamente "bio-based" in quanto possono anche essere ottenute da fonti fossili (Narayan, 2017). Quindi, come già accennato in precedenza, la biodegradabilità di un polimero dipende dalle sue proprietà fisico-chimiche (e non dalla fonte di provenienza del suo carbonio) ma è una caratteristica del polimero che è specifica di un dato ambiente ricevente (e.g., terreni agricoli per i teli di pacciamatura) (Sander, 2019).

La sostituzione del carbonio fossile con carbonio a base biologica nelle materie plastiche e nei prodotti industriali in generale offre l'ulteriore beneficio di rimuovere il carbonio presente nell'ambiente come CO_2 e incorporarlo in una molecola polimerica tramite la fotosintesi di biomassa vegetale in tempi brevi da uno (e.g., colture agricole, alghe) a dieci anni (e.g., boschi e alberi a rotazione breve) in armonia con il ciclo biologico del carbonio dei diversi ecosistemi. Ciò consentirebbe una transizione verso un modello di "economia circolare" attualmente sostenuto e adottato da molte nazioni e dalle principali organizzazioni industriali e proprietari di marchi (Narayan, 2017).

I vantaggi agronomici già accennati in precedenza per i teli in polietilene (paragrafo 1.1) sono riscontrabili anche per i teli biodegradabili e si traducono in un più facile controllo delle infestanti e quindi una riduzione nell'utilizzo degli erbicidi, in un aumento della resa del raccolto per una più efficiente conservazione dell'acqua, ma anche per una riduzione delle malattie delle piante e una miglior protezione dei prodotti alimentari (Narayan, 2017). A tutti questi vantaggi si andrebbe ad aggiungere quello del superamento della problematica dello smaltimento, aspetto di cui l'agricoltore potrebbe non doversene più curare poiché questi tipi di teli hanno la capacità di biodegradarsi nei diversi ambienti per i quali sono stati progettati (e.g., ambiente di compostaggio o suolo) (Narayan, 2017).

1.2.2 *Ambiente di Biodegradazione*

Poiché la biodegradabilità dei teli pacciamanti biodegradabili (o più in generale dei polimeri che li compongono), sfrutta i microrganismi presenti in un determinato ambiente di smaltimento, è necessario identificare chiaramente l'ambiente di smaltimento quando si valuta o si segnala la biodegradabilità di un prodotto. Soprattutto perché la biodegradabilità di un determinato polimero è una caratteristica specifica per un dato ambiente ricevente. Questo è un aspetto cruciale poiché i differenti ambienti di smaltimento hanno un potenziale di biodegradazione estremamente diversificato. Ad esempio, se si parla di biodegradabilità in ambiente di compostaggio (e quindi si fa riferimento a materiali in "plastica compostabile") si fa riferimento ad un ambiente molto diverso da un ambiente di suolo agricolo. Quando si trattano i diversi ambienti è altresì importante far riferimento alla biodegradabilità dei materiali in condizioni di anaerobiosi totale o parziale come nel caso di digestori anaerobici, di ambiente di discarica, o ambiente marino (Figura 1-3) (Narayan, 2017).

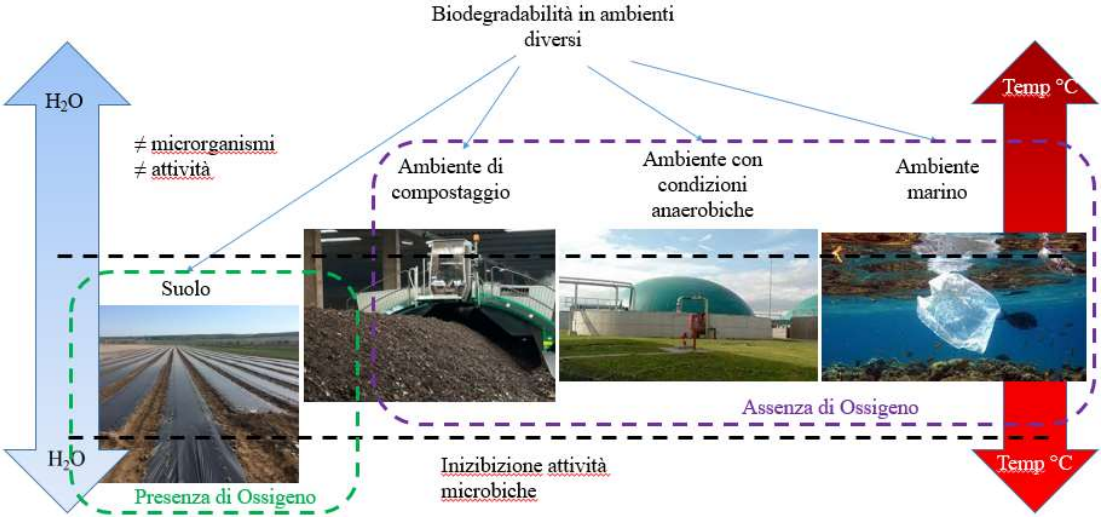

Figura 1-3: Schema rappresentativo dei diversi ambienti di degradazione.

In ambienti controllati, come i digestori anaerobici, i processi sono gestiti e controllati e quindi la standardizzazione dei tempi coinvolti nella biodegradazione può essere raggiunta e ampiamente utilizzata al fine di replicare esperimenti. Per ovvie ragioni, non è possibile raggiungere lo stesso livello di controllo e standardizzazione degli ambienti controllati in ambienti naturali, i quali invece appaiono molto più complessi. Infatti, molti fattori contribuiscono a caratterizzare l'ambiente naturale in cui i materiali possono degradarsi e biodegradarsi. Esempi lampanti sono la presenza di acqua dolce o salata, il sito di discarica e la posizione all'interno di essa, il terreno profondo o il terreno superficiale (Kjeldsen, et al., 2019).

Analizzando più nel dettaglio il suolo come ambiente di degradazione, è possibile sottolineare come la biodegradabilità dei polimeri che compongono i teli, varia notevolmente tra i diversi tipi di quest'ultimo, dimostrando così l'importanza delle caratteristiche specifiche del suolo nella biodegradazione dei polimeri (Hoshino, et al., 2001; Andrady, 1994; Francioni, et al., 2021).

1.2.3 *La degradazione abiotica dei teli pacciamanti (weathering)*

Durante le prime fasi del ciclo colturale pacciamato, il mantenimento delle proprietà meccaniche dei teli è cruciale in quanto questi devono resistere agli effetti del vento, alla foratura o pressione della superficie del suolo e di alcune erbe infestanti, e all'impatto delle precipitazioni. Al contrario, nel momento in cui la coltura ha coperto il telo pacciamante, il mantenimento delle proprietà meccaniche del telo perde gradualmente di importanza (Martín-Closas, et al., 2017). Il deterioramento abiotico o "weathering" viene collocato all'interno della prima delle tre fasi di degradazione che possono essere individuate nella vita di un telo pacciamante: i) deterioramento abiotico e deterioramento biotico, ii) bioframmentazione e iii) assimilazione microbica e mineralizzazione (Figura 1-4) (Kjeldsen, et al., 2019).

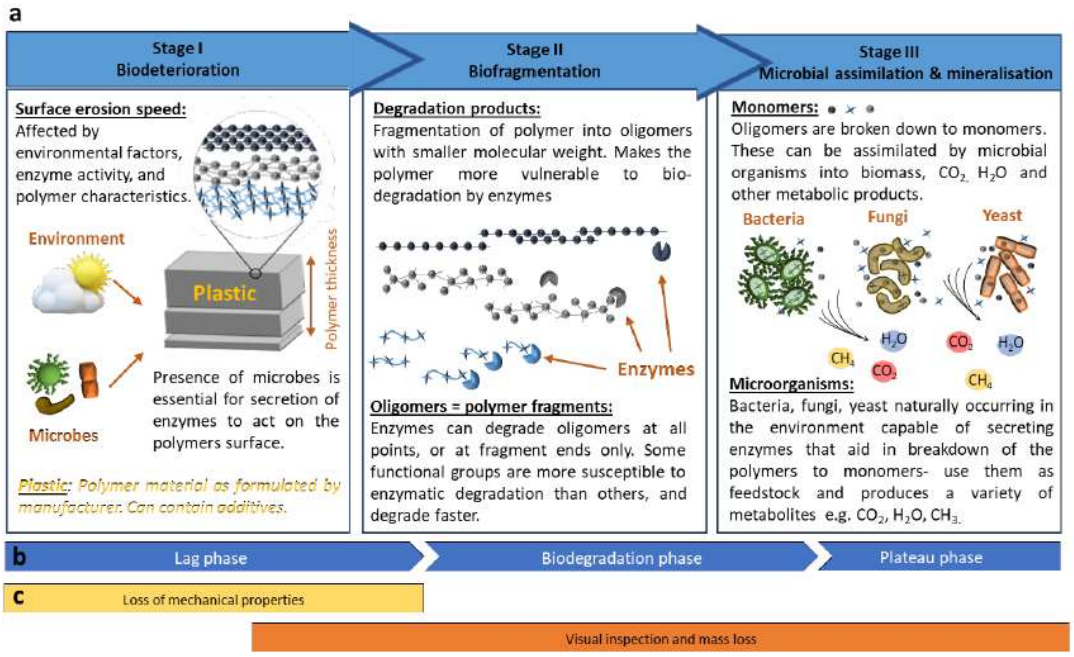

Figura 1-4: Fasi principali della biodegradazione(a); Fasi di sviluppo di CO_2, H_2O e CH_4, indicazione dell'attività dei microrganismi (b). Metodi per testare l'andamento della biodegradazione (c). (Kjeldsen, et al., 2019).

I vari prefissi “oxo”, “idro”, “chemio”, “foto” posti davanti all’aggettivo “degradabile” descrivono meccanismi di degradazione abiotici che possono andare ad alterare le proprietà fisico e chimiche del materiale che costituisce il telo di pacciamatura. Nessuno di questi è da intendersi equiparabile al suffisso “bio” che invece denota appunto la “biodegradabilità” di un prodotto. Mentre i teli pacciamanti in polietilene sono relativamente poco influenzati dagli agenti atmosferici e garantiscono la copertura del suolo mediamente soddisfacente, per quelli biodegradabili, tali agenti (e.g., radiazioni UV, temperatura, pioggia e umidità, vento e attività animale o vegetale) da soli o in combinazione, possono più facilmente innescare la degradazione dello stesso, causare rotture e diminuirne l'elasticità. Tutto ciò va a condizionare il periodo di copertura del terreno (Martín-Closas, et al., 2017). Per determinare il grado di degradazione del telo pacciamante in campo sono stati utilizzati una serie di metodi, basati sulla stima qualitativa delle lacerazioni, sulla resistenza del materiale alle sollecitazioni e, più frequentemente, sulla stima qualitativa della copertura del suolo pacciamante (Martin-Closas & Pelacho, 2004). Ad esempio, in uno studio sulla degradazione del telo pacciamante in un campo di pomodori da industria effettuato analizzando il comportamento di teli biodegradabili di plastiche differenti e confrontate con un telo in polietilene e condotto in cinque località e tre stagioni di raccolto in condizioni di clima mediterraneo, è stato riscontrato come i fattori ambientali che innescano la degradazione (i.e., radiazione solare, pioggia, vento, copertura delle colture) siano stati identificati come fattori di degradazione secondari. Nello stesso studio è emerso come il materiale stesso di composizione del telo fosse il fattore principale di degradazione (Martín-Closas, et al., 2016). I diversi fattori ambientali che concorrono alla degradazione dei teli dipendono dalla posizione geografica e dalla stagione dell’anno. Di conseguenza studi che analizzano le alterazioni che il telo pacciamante subisce, devono essere determinate considerando diversi fattori tra cui anche quelli ambientali, ma anche di gestione da parte dell’agricoltore. Difatti, il livello di degradazione abiotica del telo pacciamante può presentare ampie differenze quando questo viene utilizzato in combinazione con diverse pratiche e tecniche agronomiche che modificano l'ambiente di applicazione (e.g., l'intervallo di tempo tra la pacciamatura e il trapianto e la bagnatura del telo mediante irrigazione) (Martín-Closas, et al., 2017).

Un parametro particolarmente influente per la biodegradabilità è il livello di fotodegradazione che si verifica prima, durante o anche dopo la biodegradazione a seconda del luogo: la luce UV rompe i legami chimici all'interno dei polimeri che compongono il telo, consentendo così una biodegradazione più rapida per l’aumento dell'area superficiale su cui

possono agire gli enzimi. Le materie plastiche sepolte nel suolo non sono esposte alla luce UV e quindi possono richiedere più tempo per biodegradarsi (Kjeldsen, et al., 2019).

La pioggia è un fattore importante della degradazione abiotica perché lava via i componenti del materiale e deposita gas disciolti come anidride carbonica, ossigeno e sostanze inquinanti (e.g., piogge acide). Fattore cruciale per la degradazione dei teli è la reazione di idrolisi, fenomeno strettamente correlato al tempo e alla concentrazione dell'acqua. Difatti, l'aumento della presenza di acqua nell'ambiente di applicazione dei teli, può influenzare il loro meccanismo di degradazione (Wypych e Faulkner, 1999). Un altro fattore che condiziona il quantitativo di acqua a contatto con il telo pacciamante è l'umidità relativa dell'aria. Infatti, l'eccessiva condensazione è un fattore che va a sommarsi al quantitativo di piogge influenzando così il meccanismo di degradazione dei teli. Inoltre, l'umidità relativa ambientale oltre a partecipare alla degradazione di alcuni componenti dei materiali, partecipa insieme alla pioggia, alla deposizione di inquinanti (i.e., ossidi di carbonio, ozono, ossidi di zolfo e azoto, radicali, particelle di polvere) che possono diventare agenti degradanti più aggressivi.

Anche il vento va ad aggiungersi ai fattori di degradazione abiotica poiché può essere la causa di stress meccanici che portano a un'alterazione più rapida dei materiali (Wypych e Faulkner, 1999). Va però sottolineato come la nuova generazione di teli biodegradabili sia più resistente al deterioramento ambientale rispetto ai materiali inizialmente disponibili (Martín-Closas, et al., 2017).

1.2.4 *La degradazione biotica dei teli pacciamanti*

La biologia di base ha ormai dimostrato che i microrganismi utilizzano i substrati di carbonio come nutrimento per i loro processi vitali. Gli stessi substrati di carbonio, tra i quali si comprende qualsiasi plastica biodegradabile, devono essere poi trasportati nella cellula microbica. Tale trasporto è governato da diversi fattori, tra cui peso molecolare, struttura, gruppi funzionali, equilibrio idrofilo-idrofobico e altri fattori. All'interno della cellula, il carbonio viene ossidato biologicamente a CO_2 ($P_{polimero} + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O + C_{biomassa}$) o in condizioni anaerobiche viene prodotto in aggiunta o in alternativa del metano (biogas), liberando energia che viene sfruttata dai microrganismi per i loro processi vitali (Narayan, 2017). Oltre all'ossigeno, altri fattori ambientali vanno ad influenzare sia la frammentazione che il tasso di degradazione microbica dei teli, tra questi si identificano il pH, la temperatura, il contenuto di umidità, e tutti gli altri fattori che possono influenzare la vita e lo sviluppo dei microrganismi nell'ambiente di degradazione (Kjeldsen, et al., 2019).

Si riconoscono tre fasi fondamentali (Figura 1-5) alla base della biodegradazione del telo di pacciamatura nei suoli, che si verificano insieme e sono fortemente interconnesse: la colonizzazione delle superfici polimeriche da parte dei microrganismi del suolo (fase 1), la depolimerizzazione enzimatica del polimero da parte delle idrolasi extracellulari secrete dai microrganismi colonizzatori (fase 2), e l'utilizzazione microbica dei prodotti di idrolisi oligomerica e monomerica che vengono rilasciati dal polimero (fase 3) (Sander, 2019).

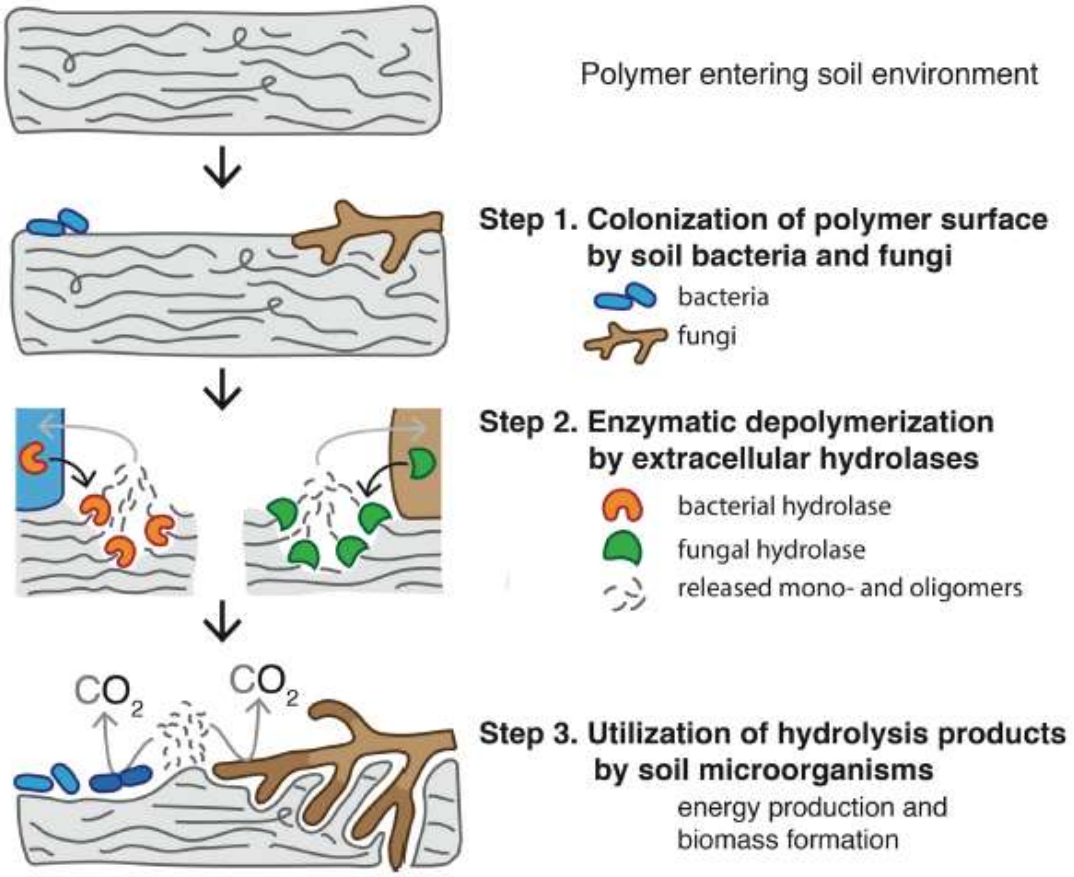

Figura 1-5: Tre step fondamentali del processo di biodegradazione dei polimeri nei suoli (Sander, 2019).

Il primo step nella biodegradazione è la colonizzazione della superficie del polimero da parte dei microrganismi degradatori del suolo che secernono depolimerasi extracellulari; per questa fase del processo, i fattori che facilitano la colonizzazione sono tutti quelli che vanno ad aumentare l'area di contatto totale tra i degradatori microbici e il substrato da attaccare (Sander, 2019). Sia i funghi che gli organismi unicellulari colonizzano le superfici dei polimeri biodegradabili nei suoli; numerosi studi hanno caratterizzato le comunità microbiche che si formano sulle superfici dei polimeri biodegradabili durante l'incubazione del suolo (Koitabashi, et al., 2012; Muroi, et al., 2016; Moore-Kucera, et al., 2014; Mergaert,

et al., 1993). Da tali studi è emerso che malgrado si possa individuare una colonizzazione e una proliferazione preferenziali da parte di funghi specifici che degradano i polimeri, come riscontrato per esempio da Muroi et al. (2016), la presenza di polimeri biodegradabili nei suoli ha avuto solo piccoli effetti sulla composizione della comunità batterica e sull'abbondanza nei suoli agricoli (Sander, 2019). È da sottolineare come le proprietà del suolo abbiano effetti sulle dinamiche di colonizzazione dei polimeri da parte dei microrganismi: tra le diverse proprietà spicca la disponibilità di nutrienti nel suolo poiché i colonizzatori devono acquisire azoto (N) dal terreno circostante per la crescita, visto che questo elemento non è presente all'interno dei polimeri dei teli pacciamanti (Sander, 2019). Rispetto ai batteri, i funghi possono essere meno suscettibili alle limitazioni di N per due aspetti: in primo luogo, i funghi hanno rapporti C:N di biomassa più elevati (circa 15) rispetto ai batteri (circa 5), il che implica che i funghi richiedono quantità relativamente inferiori di N per la crescita (Hodge et al., 2000); in secondo luogo i funghi possono sfruttare la corrente citoplasmatica nella loro rete ifale per dirigere N da microambienti ricchi di nutrienti nei suoli alle cellule situate sulla superficie del polimero. Un altro aspetto che va a facilitare la colonizzazione da parte dei funghi è la loro capacità di utilizzare la crescita diretta delle ife per colonizzare le superfici del telo: le ife possono crescere attraverso gli spazi d'aria tra le particelle del suolo e la superficie del telo, quindi i funghi non richiedono il contatto diretto del suolo con i teli polimerici per iniziare la colonizzazione. Al contrario, i batteri unicellulari probabilmente colonizzano la superficie del polimero principalmente dai punti di contatto suolo-polimero e attraverso la divisione cellulare (Sander, 2019), tuttavia è concepibile che i batteri mobili utilizzino la rete ifale sulla superficie polimerica per la colonizzazione (espressa nel concetto di "fungal highway"). Da queste considerazioni si può ipotizzare che i funghi del suolo superino i batteri unicellulari nella colonizzazione del telo (Sander, 2019).

Dopo l'iniziale colonizzazione si giunge alla seconda fase del processo identificata nella depolimerizzazione enzimatica dei polimeri: mono- e oligomeri a basso peso molecolare e microbiologicamente assimilabili vengono rilasciati a seguito della rottura dei legami idrolizzabili nella struttura polimerica ad opera delle depolimerasi che i colonizzatori microbici secernono. L'idrolisi abiotica di questi legami che formano i polimeri è tipicamente molto più lenta dell'idrolisi enzimatica nelle condizioni di temperatura e pH prevalenti nei terreni (Lucas, et al., 2008). La seconda fase del processo di degradazione dei polimeri nei terreni è comunemente considerata una fase limitante in quanto i microrganismi tendono ad utilizzare molto più rapidamente oligo- e monomeri già presenti o aggiunti al terreno da fonti esterne, rispetto ai polimeri dei teli pacciamanti i quali richiedono energia prima di essere

utilizzati (Zumstein, et al., 2018). Infatti, la maggior parte degli organismi naturali mostra una preferenza per le fonti di carbonio più facilmente degradabili presenti nel suolo prima di iniziare ad utilizzare polimeri dei materiali plastici per sopravvivere o svolgere le loro funzioni (Kjeldsen, et al., 2019). Tra le diverse proprietà del polimero che controllano la sua idrolizzabilità enzimatica, il suo grado di cristallinità è probabilmente la più importante. Difatti, è proprio nelle fasi amorfe dei poliesteri semicristallini utilizzati per la realizzazione dei teli pacciamanti biodegradabili che viene favorita la rottura idrolitica dei legami esteri da parte delle esterasi (Sander, 2019). Ad oggi pochi sono stati gli studi che hanno tentato di collegare la biodegradazione dei poliesteri alle attività di esterasi del suolo stesso, aspetto che sarebbe importante approfondire per prevedere la biodegradabilità dei teli di pacciamatura biodegradabili, i quali sono basati su poliesteri (Sander, 2019). I teli per pacciamatura biodegradabili in genere contengono diversi polimeri miscelati tra loro in proporzioni differenti (e.g., PLA, PBAT, PBS), quindi la depolimerizzazione enzimatica di queste miscele può richiedere più di un'idrolasi e probabilmente mostra dinamiche più complesse rispetto a quelle dei singoli poliesteri (Šerá, et al., 2016).

L'ultimo passaggio nella biodegradazione del telo di pacciamatura è l'assimilazione microbica e l'utilizzo di monomeri e oligomeri derivanti dai polimeri tramite idrolisi enzimatica (fase 3). La misura in cui i microrganismi incorporano carbonio nella loro biomassa è descritta dall'efficienza di utilizzo del carbonio (CUE), che corrisponde al rapporto tra carbonio utilizzato per la crescita e la somma di carbonio utilizzato per la crescita e la respirazione (Sander, 2019). La conversine del carbonio presente nei vari polimeri che compongono i teli biodegradabili in CO_2 è ad oggi l'approccio più diretto per valutarne i tassi di biodegradazione (Andrady, 1994). Infatti, il monitoraggio della evoluzione della CO_2 è il principio base sui quali si fondando gli standard internazionali (ISO 17556, ASTM D5988, NF U52-001, UNI 11462 e EN 17033), che verranno approfonditi al paragrafo 1.3.1.1.
Al contrario dei metodi diretti, quelli indiretti, come ad esempio il monitoraggio della perdita di massa del polimero, la valutazione visiva della disintegrazione fisica del polimero, ecc. non dimostrano l'utilizzo microbico dei polimeri (Sander, 2019), tuttavia hanno degli altri vantaggi (Francioni et al., 2021) che saranno approfonditi in seguito al paragrafo 1.3.2.

1.3 **Metodi di analisi per la stima della biodegradazione**

Per garantire un'applicazione ecologicamente sostenibile dei teli di pacciamatura biodegradabili, è necessario che la loro "end-of-life" nei suoli sia ben studiata e compresa a livello meccanicistico in modo da dimostrare la loro completa biodegradabilità nell'ambiente

di utilizzo. Ad oggi nella stragrande maggioranza dei casi la biodegradabilità intrinseca di una plastica si valuta monitorando il processo di biodegradazione in condizioni di laboratorio e più precisamente in test di incubazione dove si misura la CO_2 evoluta dai processi di mineralizzatone. Da questi test si può misurare il livello di biodegradabilità di un prodotto il quale può essere totale, parziale o nullo per un ambiente specifico, in determinate condizioni (Degli Innocenti, 2003). Il livello di biodegradazione raggiunto da una plastica incubata in un suolo può essere misurato mediante una metodologia standardizzata in laboratorio, mentre la biodegradabilità di una plastica è invece definita dalle cosiddette "specifiche standard" (Briassoulis & Degli Innocenti, 2017). Va sottolineato che i metodi standard per la valutazione della biodegradazione, non fissano un livello di superamento, poiché sono solo strumenti per misurare una caratteristica (cioè la biodegradazione) in condizioni controllate, al contrario, le "specifiche standard" stabiliscono livelli e criteri di superamento che possono essere utilizzati per definire una plastica come "biodegradabile" nel suolo sulla base dei risultati dei test ottenuti applicando metodi specifici. Esistono solo poche specifiche standard e schemi di certificazione che definiscono la biodegradabilità dei materiali e dei prodotti plastici nel suolo (vedi Tabella 1-1).

Tabella 1-1: Alcuni esempi di specifiche standard per determinare la biodegradabilità di materiali e prodotti nel suolo (Briassoulis & Degli Innocenti, 2017).

Organizzazione Francese di Normalizzazione (AFNOR)	
NF U52-001 Febbraio 2005	Materiali biodegradabili per l'uso in agricoltura e orticoltura—prodotti per pacciamatura—requisiti e metodi standard di valutazione della biodegradazione
Organizzazione Italiana di Normalizzazione (UNI)	
UNI 11462:2012	Materie plastiche biodegradabili nel suolo—tipi, requisiti e metodi standard di valutazione della biodegradazione
UNI 11495:2013	Materiali termoplastici biodegradabili per l'uso in agricoltura e orticoltura Film per pacciamatura—requisiti e metodi standard di valutazione della biodegradazione

La biodegradazione di un telo biodegradabile (o dei diversi polimeri che lo compongono) viene valutata nella stragrande maggioranza dei casi in specifiche condizioni di laboratorio poiché queste modalità consentono di raccogliere dati scientificamente affidabili e replicabili.

La standardizzazione delle condizioni di laboratorio in genere si basa su un attento monitoraggio della temperatura, dell'umidità e di altri fattori, controllando così il tasso di biodegradazione dei materiali testati. Tuttavia, è lecito sospettare che i tassi di biodegradazione osservati nelle reali condizioni del suolo, possano deviare significativamente dai risultati che si ottengono in laboratorio. Questo aspetto può generare dubbi sulla trasferibilità dei risultati ottenuti per un determinato prodotto in tipi diversi di suolo (Briassoulis & Degli Innocenti, 2017).

I metodi per quantificare o stimare la degradazione dei teli pacciamanti biodegradabili (o dei polimeri che li compongono) possono variare significativamente tra i diversi studi rendendo problematico il confronto dei risultati ottenuti (Francioni et al., 2021).

Nel luglio 2018 è stata emessa una nuova norma UE che specifica i metodi standard e i criteri di biodegradabilità per i teli di pacciamatura biodegradabili (EN 17033, 2018); tali standard contrastano la commercializzazione dei teli di pacciamatura etichettati come biodegradabili senza prove scientifiche a sostegno di questa affermazione.

L'ambiente di pieno campo comprende una varietà di ecosistemi che coprono una gamma di condizioni abiotiche e biotiche. Queste influiscono ampiamente sulla degradazione e biodegradazione dei diversi prodotti utilizzati in agricoltura e certificati come biodegradabili (e.g., teli pacciamanti, ma anche tubi da micro-irrigazione e/o vasi da trapianti). È quindi fondamentale che la valutazione della biodegradazione dei teli pacciamanti, faccia sempre riferimento ad un ambiente specifico ed alle sue condizioni climatiche ed ambientali (Francioni, et al., 2021). Le variazioni in ambienti naturali devono essere prese in considerazione non solo durante il processo di test e certificazione, ma dovrebbero anche essere chiaramente indicate sull'etichetta di ciascun prodotto per garantire il corretto smaltimento. Definire l'ambiente specifico in cui un prodotto definito come biodegradabile viene utilizzato e smaltito (e cioè il suo effettivo ambiente di biodegradazione) è quindi fondamentale per evitare o ridurre al minimo l'inquinamento da plastica. Appare altresì necessario evitare affermazioni ingiustificate come certificazioni di biodegradabilità basate esclusivamente sulla sperimentazione di determinate forme di polimeri biodegradabili in condizioni controllate (SAPEA, 2020).

Un test condotto in condizioni di laboratorio presenta il grande vantaggio di essere un ambiente molto più controllato per quanto riguarda i maggiori driver di biodegradazione (e.g., temperatura e umidità del suolo) rispetto alle condizioni reali come, ad esempio, quelle di pieno campo per i teli biodegradabili. I materiali plastici che si suppone essere biodegradabili possono mostrare buone qualità di degradazione all'interno dell'ambiente di laboratorio, ma

non riuscire poi a degradarsi adeguatamente a causa della mancanza di microrganismi appropriati o del cambiamento delle condizioni nel sito di degradazione finale in un ambiente naturale.

L'insieme delle metodologie utilizzate nell'analisi e stima della biodegradazione può essere suddiviso in due categorie: metodi diretti e metodi indiretti. Le osservazioni sperimentali che non sono direttamente correlate alla conversione microbica, del carbonio della plastica (si veda paragrafo 1.3.1), come la scomparsa visiva del telo, la sua perdita di massa, una sua diminuzione della resistenza alla trazione, l'accorciamento della lunghezza media della catena polimerica o la crescita microbica, sono stati criticati e definiti inadatti a valutare la biodegradazione della plastica stessa (Zumstein, et al., 2019). Malgrado ciò, alcune di questi metodi sperimentali sono comunque utilizzati per altri scopi e presentano alcuni vantaggi che saranno illustrati in seguito nel paragrafo 1.3.2.

1.3.1 *Metodi diretti*

Come è stato già accennato in precedenza, la misura della conversine del carbonio presente nei vari polimeri che compongono i teli biodegradabili in CO_2 è ad oggi l'approccio diretto più utilizzato per valutarne i tassi di biodegradazione (Andrady, 1994). Il tasso di biodegradazione è solitamente determinato misurando la quantità di CO_2 (o CO_2 e CH_4 in condizioni di anaerobiosi totale o parziale) o la quantità di carbonio del polimero ($C_{polimero}$) che è scomparso nel tempo. La quantità totale teorica di CO_2 può essere determinata dall'input noto di carbonio che compone il polimero stesso (Kjeldsen, et al., 2019): il tutto può essere quantificato direttamente ad esempio mediante analisi respirometriche della CO_2 formata (Kijchavengkul, et al., 2006), oppure tramite altre metodologie come ad esempio la conduttimetria (e.g., Thompson et al., 2019) e la gascromatografia (e.g., Šerá et al., 2016). Le tecniche per la misurazione delle emissioni di CO_2 del suolo normalmente utilizzate in condizioni di campo aperto, come gli analizzatori di gas portatili a infrarossi (e.g., Francioni et al., 2019) non sono presumibilmente adatte perché con ogni probabilità non sono in grado di rilevare e separare la respirazione eterotrofica del suolo e la CO_2 derivante dalla biodegradazione dai teli pacciamanti, che quasi certamente risulterebbe in una quantità non rilevabile dai sensori ad infrarossi (Francioni, et al., 2021). I dati respirometrici sono in genere tracciati come quantità cumulativa di CO_2 formata, corretta per la formazione di CO_2 in incubazioni di controllo prive di materiali plastici e/o polimeri (i.e., esclusivamente suolo), ed espressa in percentuale del carbonio polimerico aggiunto al suolo rispetto al tempo di incubazione (Sander, 2019). In ogni caso, a prescindere dalla metodologia, è necessaria una discussione rigorosa dei dati ottenuti nel contesto di specifiche condizioni di incubazione (i.e.,

periodo di incubazione, temperatura, umidità relativa) e le proprietà chiave specifiche del polimero (Zumstein, et al., 2019). Le curve di mineralizzazione risultanti sono il fondamento degli standard di biodegradazione che stabiliscono la conversione di una quantità specificata di carbonio polimerico in CO_2 in un tempo di incubazione definito (Eubeler, et al., 2009). Tali curve di mineralizzazione forniscono informazioni sia sui tassi che sull'entità della conversione del polimero in CO_2 (Figura 1-6) (Sander, 2019). Ulteriori difficoltà nell'interpretazione delle curve di mineralizzazione sorgono perché la frazione non mineralizzata che rimane nei suoli rimane tipicamente non caratterizzata; la stessa frazione può essere presente sia come polimero residuo, che associata a biomassa microbica del suolo e sarebbe molto importante riuscire a sviluppare metodi analitici che consentano di quantificala (Figura 1-6) (Sander, 2019).

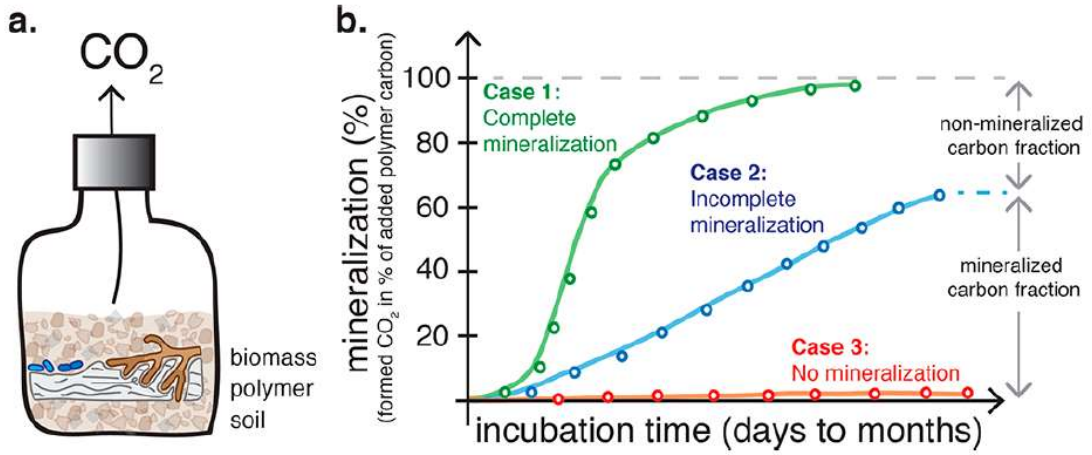

Figura 1-6: Test di mineralizzazione dei polimeri nei suoli in cui viene monitorata nel tempo la formazione di CO_2 (a). Curve di mineralizzazione per tre combinazioni polimero-suolo che determinano diverse mineralizzazioni (b). (Sander, 2019).

I sistemi di incubazione attualmente impiegati con metodologie che misurano l'evoluzione della CO_2 hanno due principali limitazioni che compromettono studi meccanicistici dettagliati sull'utilizzo dei polimeri: i) consentono solo la misurazione della mineralizzazione dei polimeri, ma non la chiusura dei bilanci di massa sul carbonio polimerico aggiunto ai terreni (Urstadt, et al., 1995) e ii) non offrono informazioni sull'incorporazione del carbonio derivato da polimeri nella biomassa microbica del suolo. Queste limitazioni potrebbero essere superate attraverso il ricorso a due diverse metodologie in combinazione che saranno approfondite più avanti (paragrafo 4.3): l'estrazione con solvente (e.g. Soxhlet e l'estrazione con solvente accelerata) e l'utilizzo di polimeri marcati con isotopi di carbonio.

1.3.1.1 Standard internazionali

L'interesse per lo sviluppo di plastiche biodegradabili da utilizzare in sicurezza nelle applicazioni agricole ha conseguentemente portato allo sviluppo di un intenso lavoro a livello di standardizzazione, la quale gioca un ruolo cruciale nella valutazione della loro biodegradabilità. Infatti, la biodegradabilità dei prodotti non è una caratteristica che può essere rilevata direttamente dai consumatori che devono fare affidamento sulle affermazioni dei produttori. I principali standard internazionali per la biodegradazione delle materie plastiche nel suolo (ISO 17556, ASTM D5988, NF U52-001, UNI 11462 e EN 17033) definiscono dei metodi per determinare il tasso di biodegradazione in condizioni normalizzate. Le metodologie standard sono progettate per determinare la biodegradabilità intrinseca della plastica nel suolo in condizioni controllate ottimali che potrebbero non essere necessariamente rappresentative di condizioni ambientali specifiche ma garantiscono la ripetibilità (Briassoulis & Degli Innocenti, 2017).

I protocolli inseriti nei metodi standard teoricamente ricreano le condizioni di ottimale biodegradazione dei polimeri testati, i quali si traducono in un processo di biodegradazione controllato ottimale. Questo garantisce la ripetibilità delle condizioni sperimentali e quindi il confronto tra i risultati ottenuti. Tuttavia, come già accennato nel paragrafo 1.3, tali risultati potrebbero non essere rappresentativi dei tassi di biodegradazione effettivi degli stessi materiali testati in condizioni di pieno campo come, ad esempio, nel caso dei teli pacciamanti biodegradabili (Briassoulis & Degli Innocenti, 2017). L'importante lavoro di standardizzazione svolto negli ultimi 15 anni nel settore delle bioplastiche e degli imballaggi biodegradabili e compostabili è un esempio del ruolo svolto dalla standardizzazione nella società e a sostegno dell'innovazione (Briassoulis & Degli Innocenti, 2017). La standardizzazione è, secondo l'International Organization for Standardization (ISO), "*l'attività di stabilire, rispetto a problemi attuali o potenziali, disposizioni di uso comune e ripetuto, finalizzate al raggiungimento del grado ottimale di ordine in un dato contesto*" (EN 45020, 2007).

Il primo dei principali test standard è ISO 17556:2012, il quale è utilizzato per determinare la biodegradabilità aerobica finale dei materiali plastici nel suolo misurando la richiesta di ossigeno in un respirometro chiuso o la quantità di CO_2 evoluta (ISO 17556, 2012). I materiali che possono essere testati includono polimeri naturali e/o sintetici, copolimeri o loro miscele, materiali plastici contenenti additivi e polimeri idrosolubili. Il metodo non è applicabile a materiali che inibiscono l'attività dei microrganismi presenti nel suolo ed è

concepito per ottenere un grado ottimale di biodegradazione regolando l'umidità del terreno di prova (ISO 17556, 2012). Il test standard dell'American Society for Testing and Materials (ASTM) (ASTM D 5988-12) è applicabile a tutti i materiali plastici che non sono inibitori dei batteri e dei funghi presenti nel suolo (ASTM D 5988, 2012). Questo metodo di prova valuta il grado di biodegradazione aerobica della plastica misurando l'anidride carbonica evoluta in funzione del tempo in cui la plastica è esposta al suolo. Il tasso di biodegradazione dei materiali plastici, inclusi gli additivi di formulazione, è misurato rispetto a quello di un materiale di riferimento positivo in ambiente aerobico, consentendo così una stima del grado di biodegradabilità e del tempo di biodegradazione in condizioni aerobiche del suolo. Questa norma fornisce un chiarimento significativo in merito alla specifica di biodegradabilità: i risultati del metodo di prova ASTM D 5988-12 (ma applicabile a qualsiasi metodo di prova) sono riportati come percentuale di CO_2 netta sviluppata sia per il test che per i campioni di riferimento al completamento del test e non può essere utilizzato per indicazioni "biodegradabili" non qualificate e non può essere estrapolato oltre la durata effettiva del test (ASTM D 5988, 2012).

La specifica standard francese NF U52-001 (2005) determina la biodegradabilità dei teli agricoli nel suolo e include nell'allegato F un metodo di prova di laboratorio per la biodegradazione del suolo (NF U52-001, 2005). La norma italiana UNI 11462:2012 definisce i requisiti di biodegradabilità ed ecotossicità cui devono attenersi i polimeri e le materie plastiche che vengono utilizzati per preparare manufatti maggiormente applicati nel settore agricolo e che al termine del loro utilizzo vengono lasciati nel suolo e in questo ambiente sono completamente biodegradati senza lasciare residui tossici. Un metodo di prova per la biodegradazione del suolo è descritto nell'allegato A (UNI 11462, 2012).

L'EN 17033 (2018), analogamente al nuovo standard ISO 23517 (2021), pubblicato recentemente, affronta specificamente la stima della biodegradazione dei teli di pacciamatura per l'uso in agricoltura e orticoltura, compresa la valutazione della loro ecotossicità e il controllo dei costituenti (Francioni, et al., 2021).

Materie plastiche certificate come "biodegradabili nel suolo" sono già disponibili sul mercato europeo ed internazionale. Tuttavia, le specifiche standard a livello europeo o internazionale sono state solo recentemente introdotte. Il riferimento non deve necessariamente essere uno standard europeo o internazionale, ma ciò sarebbe chiaramente auspicabile in un'economia globalizzata (Briassoulis & Degli Innocenti, 2017). È evidente che la commercializzazione della plastica dichiarata degradabile nel suolo (sia essa biodegradabile, fotodegradabile o un'altra caratterizzazione di degradazione) senza un quadro

di prova adeguato non è una situazione auspicabile perché può essere la premessa per affermazioni fuorvianti ai consumatori e a tutti stakeholder che non possono tradurre il termine "degradabile" in informazioni sensate e univoche (Briassoulis & Degli Innocenti, 2017). Un materiale biodegradabile dovrebbe essere etichettato da organismi di certificazione riconosciuti come biodegradabile in una condizione specifica del mezzo (European Bioplastics, 2013), in conformità con i metodi standard pertinenti e le specifiche nominate in precedenza (paragrafo 1.3).

Nella maggior parte dei casi, i numerosi metodi standard e i requisiti specifici utilizzati nella valutazione della biodegradazione e della sicurezza ambientale dei prodotti testati, includono il 90% di biodegradazione (assoluta o relativa a un materiale di riferimento) del prodotto/materiale completo (o per ogni costituente organico presente in più dell'1% del materiale) entro un periodo massimo di 2 anni misurato seguendo quanto riportato nei vari ISO 17556, ISO 11266 o ASTM D5988. La proporzione totale di costituenti organici, non testati sulla biodegradazione, non può superare il 5%. La certificazione include la valutazione dell'ecotossicità, ma non è necessaria alcuna valutazione di questa per i costituenti che rappresentano meno dello 0,1% del peso a secco del materiale o del prodotto, a condizione che la percentuale totale di questi costituenti non superi lo 0,5% del peso a secco di questo materiale o prodotto (Briassoulis & Degli Innocenti, 2017). Nonostante tutto ciò, sono stati compiuti progressi a livello del Comitato Europeo di Normazione (CEN) riuscendo finalmente a sviluppare la EN 17033 del 2018 (EN 17033, 2018), che fornisce le specifiche per i teli per pacciamatura agricola biodegradabili nel suolo (Zumstein, et al., 2019).

1.3.2 *Metodi indiretti*

Oltre agli standard nazionali e internazionali, altri studi hanno utilizzato altre metodologie per stimare la biodegradazione delle plastiche nel suolo. Questi metodi includono principalmente l'analisi visiva, la misura della perdita di massa, la spettroscopia e la misura della crescita della biomassa. Va necessariamente sottolineato che quando si utilizzano metodi indiretti per la stima della biodegradazione, è necessario abbinarli a misurazioni di CO_2 (metodi diretti) o utilizzare materiali la cui biodegradabilità nell'ambiente del suolo è già stata testata con metodi diretti (Francioni, et al., 2021).

1.3.2.1 Analisi visive

I metodi di analisi visiva sono utilizzati come "proxy" per valutare la biodegradazione delle materie plastiche. L'analisi visiva può prendere in considerazione vari criteri, tra cui l'erosione

fisica (ad es. crepe, forature, tunnel), la frammentazione, la superficie residua o i segni di colonizzazione microbica. L'analisi visiva ha il vantaggio di mostrare un chiaro percorso temporale e potrebbe essere adatta per la stima dell'area residua nel tempo. Se adeguatamente progettata, l'analisi visiva potrebbe essere facilmente abbinata alla perdita di massa del telo o all'analisi dell'evoluzione della CO_2 (Francioni, et al., 2021). La stima dell'area di telo rimanente dopo un certo periodo è stata utilizzata anche in condizioni di campo aperto assegnando visivamente valori scalati al grado di deterioramento del telo plastico durante la stagione di coltivazione (Miles, et al., 2012). Un'ulteriore metodologia ampiamente applicata è la microscopia elettronica a scansione (SEM) la quale permette di acquisire un'immagine della superficie dell'oggetto utilizzando un fascio di elettroni e mettere in evidenza la presenza di ife fungine e/o la superficie alterata. Sebbene la stima visiva non dia la prova definitiva della biodegradazione del polimero, questo metodo può essere un valido aiuto nella stima dei tassi di biodegradazione e potrebbe fungere da "controllo" da associare a prove in campo aperto che utilizzano l'area rimanente visiva o in esperimenti di incubazione che utilizzano polimeri in polvere. Infatti, anche se la forma o la superficie del polimero cambia, ciò non è sufficiente per dimostrarne la biodegradabilità. La conferma della mineralizzazione del polimero da parte dei microrganismi è necessaria come prova della sua biodegradazione finale (Francioni, et al., 2021).

1.3.2.2 Analisi Gravimetrica

L'analisi gravimetrica è uno dei metodi più utilizzati probabilmente perché tra i più "immediati e facili" nella quantificazione delle variazioni dei teli plastici nel tempo. Questo metodo consisteva generalmente nel lavaggio dei campioni in acqua distillata o "MilliQ", nell'essiccazione a massa costante e nella pesatura finale. Questa tecnica ha il vantaggio di poter essere eseguita sia in condizioni di campo aperto (e.g., Wang et al., 2015) che in condizioni di laboratorio (e.g., Barragán et al., 2016) ma non vi è alcuna garanzia che tutti i frammenti (soprattutto frammenti non visibili ad occhio nudo) saranno inclusi nell'analisi perché possono essere persi durante il processo di pulizia del campione (Francioni, et al., 2021).

La cromatografia a permeazione di gel (GPC) è una tecnica analitica che separa le macromolecole disciolte per dimensione in base alla loro eluizione da colonne riempite con un gel poroso. Utilizzando GPC, è possibile caratterizzare diverse molecole inclusi polimeri naturali o sintetici. Le informazioni generate sugli spostamenti nella distribuzione del peso

molecolare del polimero verso masse più piccole sono generalmente considerate un indicatore indiretto di biodegradazione (Mosnáčková et al., 2017; Ruggero et al., 2019).

Ad ogni modo, il tentativo di misurare esattamente la biodegradazione dei teli plastici utilizzando solo la misurazione della perdita di massa non è accettabile da un punto di vista scientifico perché porterebbe probabilmente a conclusioni incomplete, errate o addirittura dannose (Zumstein et al., 2019).

1.3.2.3 Spettroscopia

La spettroscopia è un'ulteriore metodologia per valutare la biodegradazione dei polimeri, sebbene è spesso utilizzata in combinazione con altre tecniche come respirometri (evoluzione della CO_2) e analisi visiva; questo metodo rileva i cambiamenti nello spettro del polimero dopo la degradazione abiotica o biotica del polimero stesso Sono disponibili diversi tipi di analisi spettroscopica, ma uno dei più utilizzati è la Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) (Francioni, et al., 2021).

1.3.2.4 Crescita della biomassa microbica

La misura della crescita della biomassa microbica è un metodo applicabile solo quando la plastica è l'unica fonte di carbonio in ambienti altamente controllati (Kjeldsen, et al., 2019).
Questo metodo consiste nella quantificazione dell'aumento della biomassa microbica estraibile dai terreni nel corso delle incubazioni del polimero, ma ha come limite il fatto che essendo il CUE (trattato al paragrafo 1.2.4) specifico per specie e substrato come dimostrato anche da Mayberry, et al. (1967) e fortemente dipendente dalle condizioni di incubazione, inclusa la disponibilità di nutrienti, la conversione del carbonio polimerico in biomassa microbica non può essere stimata con precisione (Sander, 2019).

1.4 **Obiettivo e scopo della tesi**

Un aspetto chiave da sottolineare è il fatto che i metodi standard esistenti per determinare la biodegradazione dei materiali, nonostante siano facilmente riproducibili, potrebbero sottostimare significativamente il tempo richiesto per raggiungere la loro biodegradazione completa in ecosistemi naturali. In parte questo è dovuto al fatto che gli stessi test impongano condizioni controllate, molto distanti dalle dinamiche di un sistema aperto come quello di pieno campo (Kjeldsen, et al., 2019). Pertanto la biodegradabilità dei materiali dovrebbe essere testata sia in condizioni controllate e misurabili, sia in un ambiente naturale ma influenzato da

pratiche agronomiche come nel caso dei teli pacciamanti (Kjeldsen, et al., 2019). È bene sottolineare nuovamente come gli agenti ambientali (e.g., radiazioni UV, temperatura, pioggia e umidità, vento e attività animale o vegetale) possano influenzare fortemente il tasso di biodegradabilità di un telo pacciamante biodegradabile, sia per azione diretta (degradazione abiotica, paragrafo 1.2.3), che per l'influenza che hanno sui microrganismi presenti nell'ambiente di degradazione: il pH, la temperatura, il contenuto di umidità, e altri fattori sono determinanti sulla flora microbica di un terreno (Martín-Closas, et al., 2017; Kjeldsen, et al., 2019). Agli effetti degli agenti ambientali si sommano poi quelli derivanti dalle pratiche agronomiche (e.g., irrigazione, lavorazioni del terreno, letamazioni o concimazioni), e quelli derivati dall'interazione con la coltura in atto (Martín-Closas, et al., 2016) ad oggi probabilmente ancora non studiati con sufficiente attenzione (Francioni et al., 2021).

Ad oggi, la maggior parte della letteratura scientifica che si occupa di teli di pacciamatura biodegradabili dal suolo (o dei polimeri che li compongono) si concentra soprattutto sui processi produttivi e sulle proprietà meccaniche dei prodotti, lasciando l'ambiente del suolo come fattore di secondario aspetto. Inoltre, sono rari, se non del tutto assenti, gli studi che hanno indagato gli effetti di diverse pratiche di gestione agricola sui teli di pacciamatura biodegradabili del suolo (Francioni et al., 2021), ciò è dovuto anche alle oggettive difficoltà che si presentano nella misurazione della biodegradazione. In questo scenario appare necessario approfondire gli aspetti di biodegradazione dei teli in plastica già utilizzati da anni in diversi sistemi colturali. Tali analisi devono essere condotte anche in condizioni di pieno campo considerando anche l'effetto delle diverse tecniche agronomiche applicate pre- e post-interramento dei teli certificati come biodegradabili nel suolo.

Nel contribuire a colmare tale gap di conoscenza scientifica, sono stati analizzati i tassi di degradazione di due teli pacciamanti disponibili in commercio e certificati come "biodegradabili nel suolo". L'analisi è stata condotta attraverso l'utilizzo di metodi indiretti ed in particolare tramite indicatori di analisi visiva e gravimetrica. Tali metodi indiretti, nonostante non siano in grado di dimostrare scientificamente la biodegradazione dei polimeri che compongono i teli (Sander, 2019), sono sati utilizzati come indicatori di potenziale biodegradazione e scelti perché in grado di fornire indicazioni in prospettiva di future analisi.

I sistemi colturali orticoli dell'Italia centrale sono prevalentemente localizzati in aree pianeggianti delle valli fluviali, e sono caratterizzati da suoli con significative quantità di argilla (ASSAM, 2005). In tali sistemi colturali, e in base alla rotazione colturale adottata dalle aziende, può essere necessario l'affinamento del terreno prima dell'inverno, per consentire la semina di un cereale invernale (es. grano duro) o per una preparazione anticipata del terreno

per una coltura primaverile (es. zucchino). In questo secondo caso, l'affinamento del terreno effettuato a fine estate fa sì che le azioni delle piogge e dei cicli gelo-disgelo determinino condizioni del terreno ottimali per la semina delle colture orticole primaverili. In alternativa, se nella rotazione colturale delle aziende agricole è prevista una coltura primaverile non orticola (es. mais), l'affinamento del suolo non è necessario per cui la gestione del suolo si limita ad una aratura normalmente effettuata a fine estate (Bianchini, et al., 2022).

In questo contesto di produzione è ipotizzabile che un affinamento del terreno tramite una aratura seguita da un'erpicatura effettuate a fine estete possano creare condizioni più favorevoli per la biodegradazione dei teli di pacciamatura rispetto alla sola aratura. È inoltre ipotizzabile che diversi teli disponibili in commercio e certificati come "biodegradabili nel suolo" mostrino tassi di biodegradazione diversi anche nelle stesse condizioni del suolo nel caso in cui abbiano diversa composizione chimica.

Il presente lavoro di tesi ha due obiettivi: i) valutare gli effetti dell'affinamento del suolo (aratura+erpicatura) sui tassi di biodegradazione di due diversi teli commerciali per pacciamatura certificati come "biodegradabili nel suolo" e ii) comparare i tassi di biodegradazione di due diversi teli commerciali dopo il loro interramento in un sistema di orticoltura tradizionale nel centro Italia.

Capitolo 2
MATERIALI E METODI

2.1 **Area di studio e caratteristiche del suolo**

Lo studio è stato condotto in un terreno di un'azienda agricola privata denominata "Società Agricola Fratelli Ercoli" (Figura 2-1) e situata a Morrovale (MC), nelle Marche, Italia (43°17'12.55"N, 13°36'40.03"E), ad un'altitudine di 64 m s.l.m. Il suolo presenta una tessitura franco-argillosa (43,1% di sabbia, 23,0% di limo e 33,9 % argilla) e rientra tra i tipici terreni agricoli della medio-bassa valle del fiume Chienti. Secondo la tassonomia USDA, è classificabile come Inceptisol, Typic Haploxerept, fine, misto, termico (ASSAM 2005, Soil Survey Staff, 2014), Le sue caratteristiche principali erano le seguenti: pH 7,33; capacità di scambio cationico, 5,2 meq/100 g; sostanza organica, 22,9 g/kg; C biologico, 13,28 g/kg; rapporto C/N, 17,7; N totale, 0,75 g/kg; P disponibile, 52,3 mg/kg; K intercambiabile, 137 mg/kg; Na disponibile, 118 mg/kg; Ca intercambiabile, 690 mg/kg; Mg intercambiabile, 108 mg/kg; $CaCO_3$ totale, 37 g/kg; e $CaCO_3$ attivo, 14 g/kg.

L'azienda agricola dove è stata condotta la sperimentazione è prevalentemente incentrata sulla produzione di ortaggi (es. zucchine, lattuga, finocchio), che vengono alternati a colture da rinnovo (principalmente cereali da granella, come mais e frumento). L'azienda ha distribuito letame bovino (~30 t ha^{-1} y^{-1}) da almeno 15 anni e da 5 anni utilizza teli per pacciamatura biodegradabili per migliorare la termoregolazione, prevenire la crescita di erbe infestanti e ottenere un prodotto pulito che sia destinato alla grande distribuzione. Il sito di studio si trova nella variante oceanica-subcontinentale temperata bioclimatica o "temperata calda, estate secca, estate fresca", secondo la classificazione climatica di Koppen (Kottek et al., 2006).

Figura 2-1: Campo dell'azienda agricola "Società Agricola Fratelli Ercoli" sulla quale sono stati applicati i teli poi usati per la prova sperimentale (foto del 18-01-2021).

2.2 **Gestione della prova sperimentale**

In questo paragrafo sono stati prima presentati i teli oggetto della sperimentazione e successivamente tutte le operazioni attuate. Nel complesso sono stati descritti prima gli aspetti organizzativi di campo, per poi entrare in dettaglio con le metodologie di laboratorio. La prova in sé può considerarsi iniziata il 5 luglio 2020 dal momento dell'applicazione dei teli in campo per l'utilizzo aziendale, e terminata il giorno dell'ultimo prelievo dei campioni di telo dal suolo avvenuta il 29 settembre 2021.

2.2.1 *Teli pacciamanti*

I teli pacciamanti presi in considerazione nella prova sperimentale sono disponibili in commercio con i seguenti nomi commerciali "Telo Biologico per Pacciamatura di Mater-bi" (PAR; Manifatture Roberto Pardini & Figli, Lucca, Italia) e "Telo Multibio Nero" (EIF; Eiffel Spa, Parma, Italia); il primo dei due secondo le dichiarazioni dei fornitori è basato su Mater-bi (Novamont), mentre il secondo su Ecovio (BASF) ed entrambi sono stati certificati come "biodegradabili nell'ambiente del suolo" dai produttori stessi. I due teli (PAR ed EIF) sono stati utilizzati prima dell'inizio della prova sperimentale in sé, durante la stagione 2020 di

produzione di zucchino (*Cucurbita pepo* L. cultivar "Opera"). Il 5 luglio 2020 i teli in esame sono stati messi in posa prima della semina della coltura, avvenuta a mano nello stesso giorno.

2.2.2 *Disegno sperimentale e trattamenti*

La degradazione dei teli a seguito della loro incorporazione nel suolo studiata in questa prova è stata confrontata per due diversi regimi di lavorazione: aratura fino a 0,35 m di profondità (aratura); e la stessa aratura seguita da erpicatura (due volte) a 0,15 m (aratura+erpicatura).
Il disegno sperimentale (Figura 2-2) adottato è uno split-plot con il regime di lavorazione come tesi di I ordine (aratura ed aratura+erpicatura, parcelle principali) e tipologia di telo come tesi di II ordine (PAR ed EIF, sub-parcelle). All'interno di ogni sub-parcella sono state interrate 10 meshbag corrispondenti alle due tipologie di teli, replicato per 5 tempi di campionamento (T1-T5). Pertanto, il numero totale di meshbag interrate è stato di 100 (2 lavorazioni × 5 repliche × 2 tipi di teli di pacciamatura × 5 date di campionamento distruttive).

Figura 2-2: Dettaglio di parcelle e sub-parcelle della prova. (foto del 13-07-2021)

2.2.2.1 Operazioni preliminari in campo

Di seguito sono illustrate le operazioni necessarie per l'effettiva realizzazione del disegno sperimentale: l'operazione di campionamento, di lavorazione del terreno e di interramento dei campioni nel suolo.

I teli di pacciamatura sono stati campionati il 2 ottobre 2020, un mese prima che le zucchine fossero rimosse al termine del loro ciclo. Ciascun telo ha subito la stessa alterazione degli agenti atmosferici (i.e., "weathering") prima di essere campionato e, in base ai dati meteorologici forniti, ha ricevuto una temperatura cumulativa di 2239 ° C e una precipitazione cumulativa di 113 mm. I campioni di telo di pacciamatura sono stati raccolti utilizzando un cutter circolare di 9 cm di diametro, portati immediatamente in laboratorio, puliti delicatamente in acqua pura ed essiccati all'aria per circa 1 settimana. Successivamente, i campioni sono stati inseriti all'interno di meshbag (larghezza 12×12 cm; spessore 1 mm) (Figura 2-3), ritenute sufficienti per la penetrazione dei microrganismi dopo la loro incorporazione nel terreno; ogni meshbag è stata caratterizzata da un'etichetta (Figura 2-3, b) che identificasse il tipo di lavorazione (aratura o aratuta+erpicatura), il tipo di telo (PAR o EIF) e il tempo di prelievo (T1-T5).

Le operazioni di lavorazione del terreno sono avvenute in due momenti successivi secondo le disponibilità aziendali: l'aratura è stata eseguita il 7 novembre 2020, su tutto il campo sperimentale, mentre l'erpicatura è stata eseguita il 15 novembre 2020, in una porzione della prova comprendente cinque parcelle (superficie pari alla metà del campo di sperimentazione).

L'interramento di tutte le meshbag è avvenuto il 19 novembre 2020, a 0,20 m di profondità, in modo che fossero disposte orizzontalmente e distanziate di 0,1 m l'una dall'altra. Le meshbag all'interno di ogni sub-parcella sono state legate tra loro tramite un cordoncino per facilitarne l'estrazione e l'individuazione (Figura 2-3, a).

Figura 2-3: Esempi di meshbag dopo estrazione: a) dettaglio del cordoncino che ha unito le meshbag dei cinque tempi di prelievo di ogni tipologia di telo di ogni sub-parcella, per facilitare la loro individuazione nel terreno. b) dettaglio del campione del telo pacciamante all'interno della meshbag; in giallo si nota anche l'etichetta con le indicazioni sul campione.

2.2.2.2 Operazioni accessorie

Per evitare interferenze significative da parte degli apparati radicali delle erbe infestanti che si sviluppavano ai bordi dell'appezzamento e che periodicamente tendevano ad invadere le parcelle della sperimentazione, sono state effettuate delle scerbature manuali (Figura 2-4) con attrezzature adeguate in modo da alterare il meno possibile il profilo del terreno al di sopra delle meshbag sotterrate. In totale le scerbature nel periodo della prova sono state sei (1 aprile, 22 aprile, 25 maggio, 13 luglio, 30 luglio, 9 settembre) distribuite in base alle necessità riscontrate dopo apposito sopralluogo in campo.

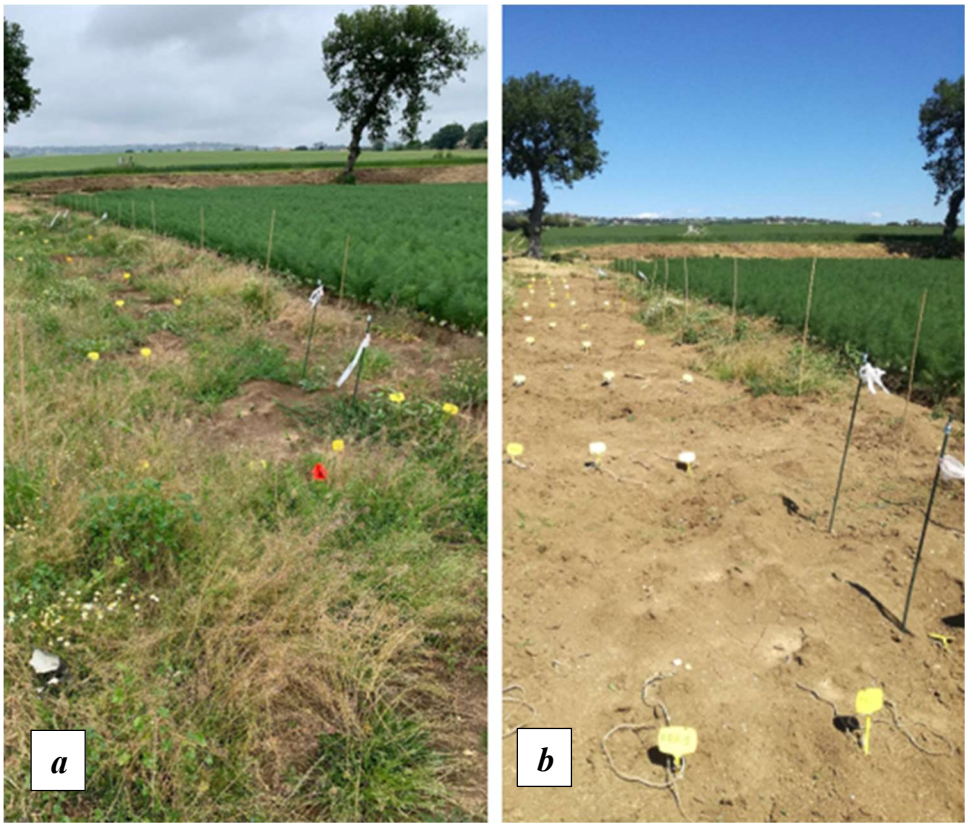

Figura 2-4: Area sperimentale prima (a) e dopo (b) un'operazione di scerbatura.

2.2.3 *Metodologia per la stima della biodegradazione*

La stima della biodegradazione è avvenuta in seguito all'analisi dei campioni prelevati secondo gli intervalli di tempo prestabiliti e attuando metodologie descritte nei paragrafi successivi. Le meshbag sono state prelevate a intervalli di circa 2 mesi, dal 18 gennaio 2021 (T1) al 29 settembre 2021 (T5).

I tassi di biodegradazione dei due teli di pacciamatura testati sono stati valutati in base alla loro "perdita di peso" e "perdita di superficie", che non sono equivalenti alla loro effettiva biodegradazione, ma possono essere considerati indicatori indiretti di biodegradazione (Rudnik e Briassoulis, 2011; Sintim et al., 2020; Griffin-LaHue et al., 2022). Sia la perdita di peso che quella di superficie sono adatte per prove in campo aperto quando la biodegradabilità dei teli di pacciamatura è già stata dimostrata in laboratorio, seguendo gli standard internazionali (Francioni et al., 2021), cosa avvenuta in questo caso secondo le dichiarazioni delle aziende produttrici dei teli in questione.

2.2.3.1 Modalità di prelievo in campo

Le meshbag sono state estratte delicatamente dal terreno evitando eventuali danni nel momento della separazione dagli aggregati del suolo. Gli attrezzi principali utilizzati in questa operazione sono state palette da giardino e utensili a punta che permettessero di agevolare l'apertura di gallerie in prossimità della posizione stimata di ogni singola meshbag da prelevare. La posizione in cui iniziare ogni scavo è stata individuata dalla presenza del cordoncino che univa le meshbag in ogni sub-parcella (Figura 2-5, a).

Ogni meshbag dopo l'estrazione (Figura 2-5, b) è stata manipolata esclusivamente con l'utilizzo di guanti in lattice e inserita in porzioni di carta d'alluminio segnata esternamente con la sigla del campione corrispondente per un sicuro trasferimento in laboratorio.

Avvenuto il prelievo, lo scavo di estrazione è stato poi richiuso con lo stesso terreno rimosso in precedenza (Figura 2-5, c), in modo da non interferire sulla degradazione dei campioni da analizzare nel tempo successivo.

Figura 2-5: Fasi di estrazione delle meshbag dal suolo: a) Scavo; b) Rimozione meshbag; c) Copertura scavo.

2.2.3.2 Pulizia dei campioni in laboratorio

La fase di pulizia è quella che segue l'operazione di prelievo delle meshbag dal campo, viene eseguita in laboratorio e serve per predisporre i campioni che saranno poi sottoposti alle metodologie di stima della biodegradazione. Ogni meshbag ripulita dagli eventuali residui di terreno è stata accuratamente aperta con l'utilizzo di forbici e, mediante delle pinzette chirurgiche, è stata successivamente prelevata la porzione di telo rimanente la quale è stata poi deposta all'interno di contenitori di alluminio (Figura 2-6, a). In seguito, si è proceduto aggiungendo al contenitore acqua distillata e con l'aiuto di pennelli sono stati rimossi tutti i

residui di terreno da ambo i lati (Figura 2-6, b); in questa operazione spesso si è rivelato utile l'utilizzo di più contenitori in modo da trasferire il campione in una soluzione di acqua distillata pulita rispetto alla precedente. Va sottolineato come questa operazione richieda molta più attenzione quando eseguita sui campioni prelevati nei tempi più avanzati della sperimentazione (e.g. T3-T5) (Figura 2-6, d), ovvero quando gli agenti di degradazione sono intervenuti lasciando sempre meno residui di telo biodegradabile all'interno della meshbag. In queste situazioni è stato necessario recuperare ogni singolo frammento di telo rimasto dal momento dell'apertura della meshbag e quindi è stato opportuno andare ad individuare anche i residui che erano rimasti all'interno del contenitore di alluminio prima di procedere con la pulizia del campione successivo. Ogni residuo del telo dopo la pulizia è stato posizionato all'interno di fogli laminati di dimensioni 148×210 mm rispettando come area la dimensione originaria che i dischi di telo avevano al momento del campionamento visto al paragrafo 2.2.2.1 (Figura 2-6, c); infine i fogli laminati sono stati messi ad asciugare all'aria per una settimana.

Figura 2-6: Attrezzatura (a) e fasi di pulizia del campione: b) Rimozione dei residui di terreno con pennelli; c) Stesura del campione nei fogli laminati; d) Esempio di un campione residuo dentro la meshbag al T3.

2.2.3.3 Misura della superficie del telo residuo

La misura della superficie del telo residuo è avvenuta scansionando i campioni del telo residuo posti all'interno dei fogli laminati con uno scanner di immagini (XP-322; Epson) utilizzando le seguenti impostazioni: risoluzione, 300 dpi; correzione gamma, default 2.2. Le immagini ottenute sono state salvate come file .jpg RGB con un formato 210×297 mm. Successivamente, ogni immagine è stata elaborata utilizzando il software ImageJ (Schneider et al. 2012) seguendo il metodo descritto da Cowan et al. (2013), con lievi modifiche per adattare l'area di selezione alla forma rotonda dei campioni di telo di pacciamatura. Le immagini scansionate sono state prima trasformate solo in pixel in bianco e nero (comando: "Rendi binario"), quindi la "perdita di superficie" (espressa come proporzione [%] dell'area rimanente) è stata calcolata automaticamente dal programma tramite "Analizza particelle" (parametri: "Size: 0-Infinity"; "Cularity: 0.00-1.00").

2.2.3.4 Misura della massa del telo residuo

Una volta asciugati nei fogli laminati, i campioni sono stati pesati con una bilancia elettronica (1 µg di precisione; BCA 200; Orma). La massa residua è stata espressa come percentuale (%) ed è stata calcolata secondo l'equazione posta di seguito:

$$\%\ massa\ residua = \left(1 - \frac{massa\ iniziale - massa\ finale}{massa\ iniziale}\right) \times 100$$

2.2.3.5 Analisi statistica

I coefficienti di correlazione di Pearson sono stati determinati per esplorare le relazioni tra le stime di "perdita di peso" e "perdita di superficie". Entrambe le stime sono state poi sottoposte ad analisi della varianza per misure ripetute (RM-ANOVA) utilizzando la "mixed model procedure" in SPSS 25.0 (SPSS Inc., IBM, Chicago, IL, USA). Nella RM-ANOVA sono stati considerati i seguenti fattori: "tempo" (data di campionamento, fattore "within"), "lavorazione" (aratrura *vs*. aratura+erpicatura, "between factor"), tipo di telo (PAR *vs.* EIF, "between factor") e loro interazioni, durante l'intero periodo di studio. Una successiva ANOVA a due vie è stata eseguita per ciascuna delle date di campionamento per rilevare le differenze tra i tipi di telo di pacciamatura, la lavorazione del terreno e le loro eventuali interazioni. La trasformazione dei dati è stata effettuata seguendo la procedura di Box-Cox per soddisfare gli assunti di normalità ed omoschedasticità dei test parametrici. La normalità, omoschedasticità ed ove richiesto la sfericità dei dati sono state valutate rispettivamente tramite ispezioni di istogrammi, test di Levane e test di Mauchly.

2.2.4 *Dati metereologici*

I dati metereologici riguardanti temperatura media, precipitazione, dal 1 gennaio 1999 al 29 settembre 2021 nell'area di sperimentazione sono stati ottenuti dall'Agenzia Servizi Settore Agroalimentare delle Marche (ASSAM). La stazione metereologica ASSAM più vicina alla zona di sperimentazione e dalla quale sono stati reperiti i dati è quella di Montecosaro scalo-s.s. 485 Vocabolo Trovarelli 1° (ST12) (Tabella 2-1). Le temperature e precipitazioni del periodo di sperimentazione sono state reperite anche dalla stazione metereologica di Villa San Filippo (RT-3055; RT-3057) della protezione civile della Regione Marche perché più vicina all'area di interesse. I dati degli anni precedenti al 2021 sono stati confrontati con lo storico della zona per evidenziare eventuali discostamenti significativi rispetto alle medie del periodo interessato.

Tabella 2-1: Localizzazione delle stazioni metereologiche dell'ASSAM e della Protezione Civile della Regione Marche impiegate nella presente indagine.

Nome stazione	Longitudine	Latitudine	Altitudine
Montecosaro scalo	13°37'	43°16'	45,0 m s.l.m.
Villa San Filippo	13°35'	43°15'	57.7 m s.l.m.

2.2.4.1 Confronto dei dati metereologici del periodo di sperimentazione con lo storico (1999-2021)

L'andamento meteorologico della durata della sperimentazione (Figura 2-7) comprende il periodo di "weathering" in cui i teli sono stati utilizzati in campo (5 luglio 2020-2 ottobre 2020) e il periodo di interramento delle meshbag nel suolo (19 novembre 2020-29 settembre 2021). Durante il periodo di "weathering" (mesi di luglio, agosto e settembre 2020) i mesi di agosto e settembre hanno presentato temperature medie al di sopra di quelle dello storico 1999-2021 di più di 2 °C, a differenza del mese di luglio che pur mostrando una temperatura superiore non ha raggiunto il livello degli altri due mesi (+ ~1 °C). Tutti e tre i mesi (luglio, agosto e settembre) hanno presentato un deficit in mm di pioggia rispetto allo storico, poco evidente per i mesi di luglio e agosto (~1 mm e ~8 mm), al contrario di settembre che ha registrato 23 mm di precipitazioni in meno. La stagione invernale ha mostrato temperature medie mensili superiori all'andamento del periodo 1999-2021 per tutti i mesi ad eccezione di marzo. I mesi di novembre 2020 e gennaio 2021 hanno presentato un surplus meno evidente degli altri (1,2 °C e 0,8 °C), mentre sono emersi discostamenti più significativi per i restanti mesi di dicembre (+2,2 °C) e febbraio (+3,2 °C). Anche le precipitazioni hanno evidenziato

una variabilità rispetto alle medie del periodo di riferimento; dei mesi precedenti a parte gennaio e febbraio che si discostano di 10 mm in positivo e di ~19 mm in negativo, differenze molto maggiori si riscontrano per gli altri 3 mesi: novembre (-34 mm), dicembre (+33 mm) e marzo (-45 mm circa, corrispondente a -55%). Il periodo primaverile 2021 (mesi di aprile, maggio e giugno) in media si è discostato di +1,3°C per la media di temperatura col periodo di riferimento, presentando nel complesso una temperatura inferiore di 0,5 °C nel mese di aprile e superiore di 1,4 °C e 2,9 °C nei mesi di maggio e giugno. Un'ampia differenza è stata riscontrata invece per quanto riguarda le precipitazioni: nello stesso periodo sono precipitati 74 mm di pioggia in meno nell'anno 2021, di cui 44 solo nel mese di maggio (- ~63%), più in linea invece il mese di giugno (-7 mm). I restanti mesi della sperimentazione (luglio, agosto e settembre) hanno mostrato tutti una temperatura media superiore al periodo di riferimento che in media si aggira a +2,3 °C; anche in questo intervallo come già riscontrato in precedenza, le precipitazioni sono state inferiori di una quantità significativa rispetto alla media del periodo 1999-2021, ben 76 mm di pioggia in meno (- ~46%), con il mese di settembre che da solo ha mostrato una riduzione di 52 mm.

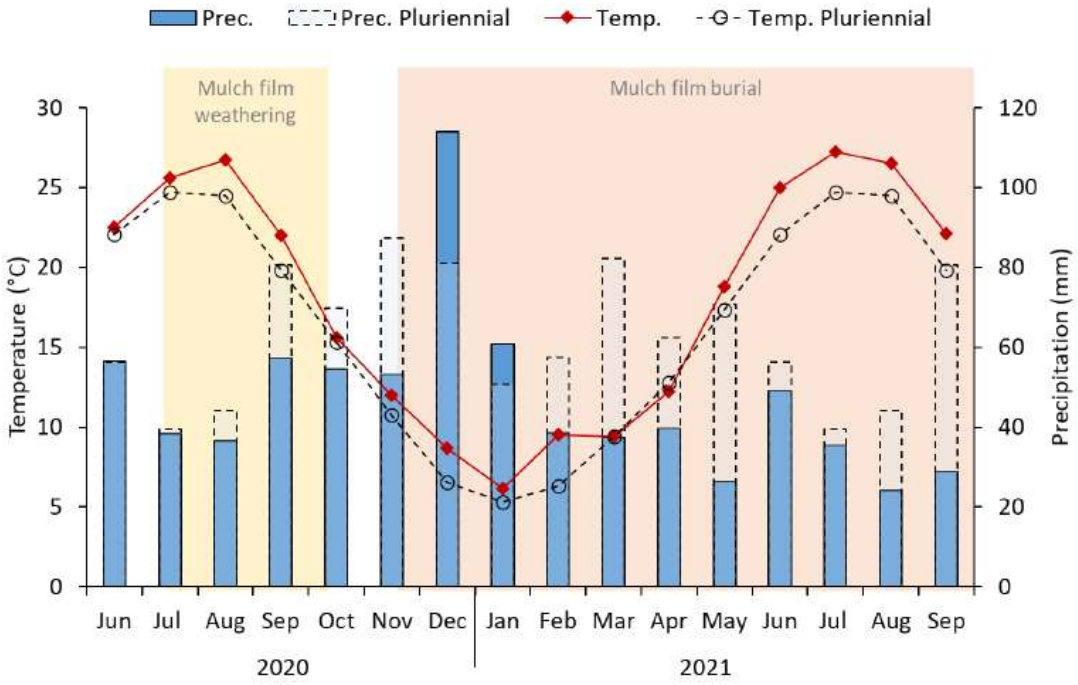

Figura 2-7: Temperature medie mensili e pluriennali (2019-2021) dell'aria e precipitazioni nell'area di studio durante il periodo sperimentale (fonte: Regione Marche, Servizio Protezione Civile; ASSAM). "Mulch film weathering" si riferisce al periodo in cui i teli di pacciamatura sono stati deposti insieme alla coltura; "Mulch film burial" si riferisce al periodo in cui i teli di pacciamatura sono stati incorporati nel terreno.

Capitolo 3
RISULTATI

3.1 **Andamento della degradazione e significatività dei fattori**

Entrambi i metodi indiretti utilizzati nella stima della degradazione, ovvero quello di "perdita di massa" e "perdita di superficie", hanno mostrato correlazioni significative e positive per ciascuno dei teli di pacciamatura testati, per ciascun regime di lavorazione del terreno e per le singole date di campionamento (Tabella 3-3).

L'andamento della degradazione dei due teli (PAR e EIF) per i due regimi di lavorazioni (aratura e aratura+erpicatura) hanno mostrato andamenti simili per entrambi gli indicatori utilizzati (Figure 3-1 e 3-3). In particolare, entrambi i teli hanno mostrato un tasso di degradazione inizialmente basso, a prescindere dal tipo di lavorazione, ma si sono riscontrati tassi più elevati in primavera (da marzo a maggio), soprattutto per l'aratura+erpicatura. Successivamente, i tassi di degradazione hanno subito un rallentamento apprezzabile nella tarda estate (da luglio a settembre) (Figure 3-1 e 3-3). Nel complesso è emersa un'interazione significativa tra i fattori lavorazione del terreno (aratura e aratura+erpicatura) e data di campionamento (T1-T5) per entrambi gli indicatori ($P<0,01$). Anche le due lavorazioni hanno mostrato differenze che sono risultate significative per entrambi gli indicatori ($P<0,01$) ed in particolare la doppia lavorazione (aratura+erpicatura) ha mostrato una degradazione complessiva maggiore (Tabella 3-3), che è apprezzabile anche dalle foto dei campioni scansionati (Figura 3-2). Nel complesso della sperimentazione è risultata significativa anche la differenza fra i due teli per entrambi gli indicatori ($P<0,01$) (Tabella 3-3) con PAR che ha mostrato tassi di degradazione mediamente superiori rispetto ad EIF (Figura 3-1, 3-3). Un'interazione tra tipologia di telo e data di campionamento è emersa sia per l'indicatore di "perdita di massa" ($P= 0,05$) che per l'indicatore "perdita di superficie" ($P= 0,05$) (Tabella 3-3).

Al primo prelievo (T1, 18 gennaio 2021), avvenuta 60 giorni dopo l'interramento (T0, 19 novembre 2020) non è emersa alcuna interazione tra la lavorazione e il tipo di telo. Tuttavia, è emersa una significatività tra le lavorazioni per l'indicatore "perdita di massa" ($P= 0,05$) con la doppia lavorazione che ha mostrato tassi di degradazione più elevati con una differenza in

entrambi i teli che è stata maggiore di un punto percentuale rispetto alla singola aratura (Tabella 3-2). La differenza di degradazione tra i due teli è stata significativa per entrambi gli indicatori (P<0,01) che infatti hanno visto la superficie e massa residua di PAR scendere al di sotto del 95% in tutte le lavorazioni al contrario di EIF.

Il secondo prelievo (T2, 25 marzo 2021, a 126 giorni dal T0) non ha evidenziato alcuna differenza significativa tra i fattori analizzati (Tabella 3-4). Tuttavia, il telo PAR ha mostrato tassi di degradazione più elevati rispetto ad EIF e questo è emerso per entrambi gli indicatori. In particolare, EIF si è sempre mantenuto sopra l'80% di massa e superficie residua, mentre PAR si è avvicinato al 70% di area e massa residua (Tabelle 3-1 e 3-2), arrivando al 66% di superficie residua considerando l'effetto della doppia lavorazione. La differenza tra le due lavorazioni risulta più accentuata a vantaggio dell'aratura+erpicatura per l'indicatore della superficie residua, malgrado questo non abbia raggiunto differenze significative (Tabella 3-1).

Il terzo prelievo (T3, 25 maggio 2021, a 187 giorni dal T0) ha messo ancora in evidenza come la doppia lavorazione sia in grado di agevolare la degradazione. Dei due metodi di stima utilizzati, solo quello della superficie residua ha mostrato una differenza significativa tra le due lavorazioni (P<0,01) (Tabella 3-4), con l'aratura+erpicatura che ha raggiunto il 21,3% e il 12% di area residua rispettivamente per EIF e per PAR (Tabella 3-1). I valori di massa residua dei campioni estratti appaiono ancora stabilmente fissati su percentuali maggiori del 40% (Tabella 3-2). Il telo PAR mostra ancora una degradazione più avanzata di EIF, ad eccezione della massa residua con la doppia lavorazione, unico valore in cui EIF ha superato PAR in tutta la sperimentazione (40,17 % contro il 51,47%) (Tabelle 3-1 e 3-2).

Nella quarta data di prelievo (T4, 26 luglio, a 249 giorni dal T0) è emersa per la prima volta un'interazione significativa tra lavorazione e telo, ma solo per l'indicatore di "perdita di superficie" (P=0.02); rimane ancora elevato il valore di probabilità per l'indicatore di "perdita di massa" (P=0.09) (Tabella 3-4). In compenso l'indicatore "perdita di massa" ha restituito differenze significative tra le singole lavorazioni (P<0,01) e tra i due singoli teli (P<0,01) (Tabella 3-4). Per tutti gli indicatori considerati, la doppia lavorazione ha fatto giungere la superficie residua al di sotto del 10 % (Tabella 3-1) e la massa residua al 13,8 % in EIF e al 7,03 % in PAR (Tabella 3-2). Il telo PAR ha avuto una degradazione più avanzata in tutti gli indicatori e in tutte le lavorazioni con differenze più accentuate nelle parcelle arate che hanno mostrato un divario riguardo ad EIF di 26,5 e 23,5 punti percentuali rispettivamente per superficie e massa residua (Tabelle 3-1 e 3-2).

L'ultimo prelievo (T5, 29 settembre, a 314 giorni dal T0), con rimozione degli ultimi campioni di telo dal suolo, ha mostrato per la seconda volta un'interazione significativa tra

lavorazione e telo (P<0,05), questa volta per entrambi gli indicatori considerati (Tabella 3-4). Il telo PAR ha mostrato per entrambi gli indicatori tassi di degradazione decisamente superiori ad EIF (Tabella 3-1 e 3-2). I livelli più bassi di telo residuo sono stati raggiunti con la doppia lavorazione in PAR, attestandosi attorno allo 0,5% di superficie residua (Tabella 3-1) e il 3,12 % di massa residua (Tabella 3-2). In EIF sono risultate molto più marcate le differenze di lavorazione: 34% contro il 5,9% di superficie residua (Tabella 3-1) e 40,08% contro l'8,3% di massa residua (Tabella 3-2) in favore dell'aratura+erpicatura che evidenzia una maggiore efficacia nel favorire la degradazione dei teli analizzati.

Tabella 3-1: Valori della media dell'area percentuale residua in relazione alle tipologie di telo (PAR, "Pardini"; EIF, "Eiffel"), di lavorazione (Aratura; aratura+erpicatura "Arat.+Erpic.") e di tempo di prelievo (da novembre 2020 a settembre 2021, T1-T5, intervalli di ~2 mesi).

		Media % Area residua			
		EIF		PAR	
Data	Giorni da T0	Aratura	Arat.+Erpic.	Aratura	Arat.+Erpic.
T0 (19 nov)	0	100	100	100	100
T1 (18 gen)	60	97,6	97,4	94,6	93,5
T2 (25 mar)	126	89,3	82,7	75,9	66,9
T3 (25 mag)	187	58,8	21,3	47,5	12,0
T4 (26 lug)	249	48,1	7,4	21,6	3,8
T5 (29 set)	314	34,0	5,9	4,4	0,5

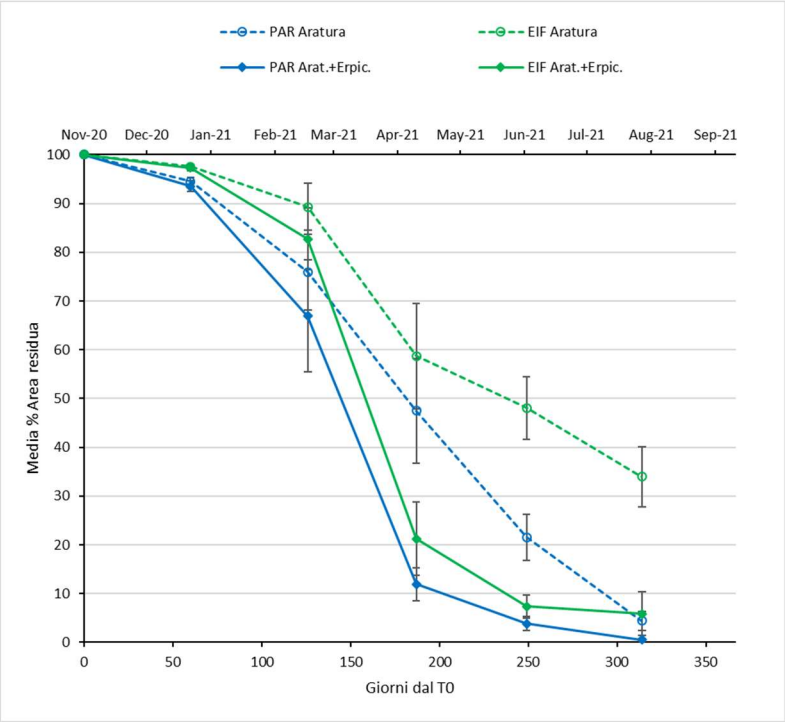

Figura 3-1: Andamento della perdita di area (%) per la lavorazione del terreno (aratura, linee tratteggiate; aratura+erpicatura, linee piene), tipo di telo (PAR, "Pardini"; EIF, "Eiffel") e date di campionamento (intervallo di circa 2 mesi). I dati mostrano le medie ±l'errore standard.

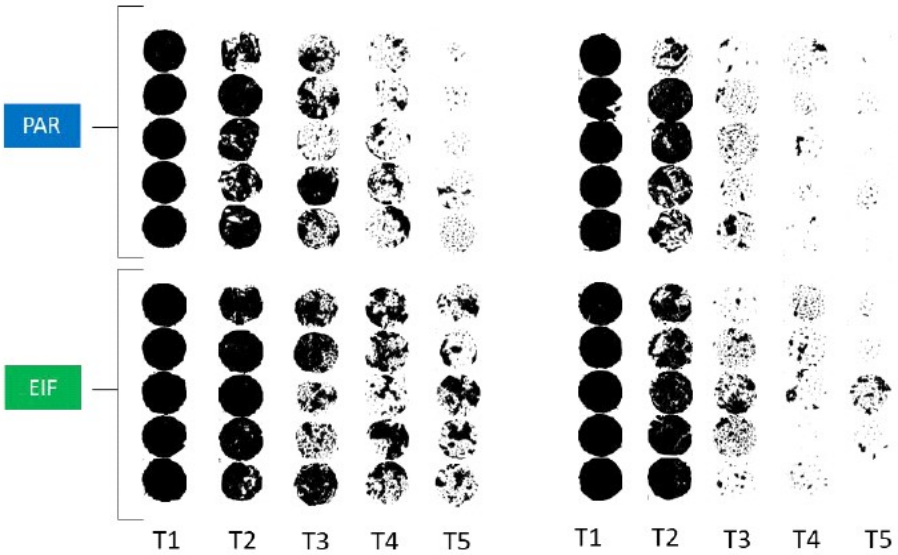

Figura 3-2: Aspetto di ciascun campione di telo dopo la scansione con ImageJ per lavorazione del terreno (aratura; aratura+erpicatura), tipo di telo (PAR, "Pardini"; EIF, "Eiffel") e data di campionamento (da novembre 2020 a settembre 2021, T1-T5, intervalli di ~2 mesi).

Tabella 3-2: Massa percentuale residua in relazione alle tipologie di telo (PAR, "Pardini"; EIF, "Eiffel"), di lavorazione (Aratura; aratura+erpicatura "Arat.+Erpic.") e di tempo di prelievo (da novembre 2020 a settembre 2021, T1-T5, intervalli di ~2 mesi).

		Media % Massa residua			
		EIF		PAR	
Data	Giorni da T0	Aratura	Arat.+Erpic.	Aratura	Arat.+Erpic.
T0 (19 nov)	0	100	100	100	100
T1 (18 gen)	60	97,47	95,95	93,84	92,80
T2 (25 mar)	126	82,20	82,85	74,09	71,69
T3 (25 mag)	187	63,86	40,17	55,39	51,47
T4 (26 lug)	249	54,11	13,80	30,61	7,03
T5 (29 set)	314	40,08	8,30	11,24	3,12

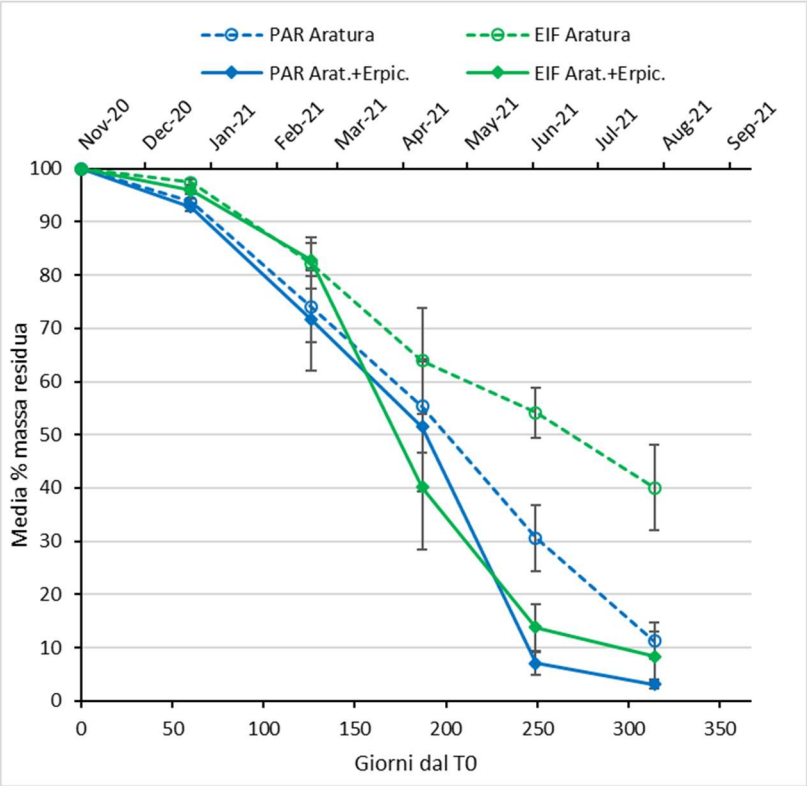

Figura 3-3: Perdita di massa (%) per la lavorazione del terreno (aratura, linee tratteggiate; aratura+erpicatura, linee piene), tipo di telo (PAR, "Pardini"; EIF, "Eiffel") e date di campionamento (intervallo di circa 2 mesi). I dati mostrano le medie ±l'errore standard.

Tabella 3-3: Analisi ANOVA a misure ripetute per lavorazione del terreno, tipo di telo e data di campionamento. La stessa analisi è stata applicata per i dati ottenuti con entrambi i metodi di stima utilizzati ("perdita di massa" e "perdita di superficie") durante il periodo di studio.

Variabile	**Fonte di variazione**	**gl**	**F**	**P**	**Valore medio ± errore standard**	
					Aratura	**Aratura+erpicat**
Perdita di Massa (% rimanente)	Lavorazione	1	32,13	0,00	60,29 ± 4,16	46,72 ± 5,41
	Telo	1	12,44	0,00		
	Data di campionamento	4	201,18	0,00		
	Lavorazione x Telo	1	1,17	0,30		
	Lavoraz. x Data campi.	4	10,92	0,00		
	Telo x Data campion.	4	2,56	0,05		
	Telo x Lav. x Data camp.	4	1,48	0,22		
Perdita di Superficie (% rimanente)	Lavorazione	1	32,45	0,00	57,17 ± 4,71	39,14 ± 5,72
	Telo	1	12,84	0,00		
	Data di campionamento	4	202,94	0,00		
	Lavorazione x Telo	1	1,21	0,29		
	Lavoraz. x Data campi.	4	10,75	0,00		
	Telo x Data campion.	4	2,49	0,05		
	Telo x Lav. x Data camp.	4	1,48	0,22		

Tabella 3-4: ANOVA entro le date di campionamento per la lavorazione del terreno e i teli pacciamanti e le date di campionamento (da novembre 2020 a settembre 2021, T1-T5, intervalli di circa 2 mesi), applicata separatamente per i dati ottenuti con entrambi i metodi di stima utilizzati ("perdita di massa" e "perdita di superficie") durante il periodo di studio. La significatività è stata considerata per valori di probabilità (P) inferiori a 0,05 (test di Tukey).

Variab.	**Fonte di variaz.**	**Data di cam.**	**gl**	**F**	**P**	**Aratura**	**Aratura + Erpicat.**	**PAR**	**EIF**
Perdita di massa (% riman.)	Lavor. × Telo	T1	1	0,16	0,70				
		T2	1	0,05	0,82				
		T3	1	0,84	0,37				
		T4	1	3,33	0,09				
		T5	1	5,56	0,03				
	Lavor.	T1	1	4,33	0,05	95,65±0,68	94,38±0,72		
		T2	1	0,02	0,90	78,14±4,15	77,27±5,13		
		T3	1	1,65	0,22	59,63±6,44	45,82±8,18		
		T4	1	48,53	0,00	42,36±5,35	10,41±2,58		
		T5	1	15,81	0,00	25,66±6,36	5,71±2,41		
	Telo	T1	1	30,48	0,00			93,32±0,47	96,71±0,46
		T2	1	2,16	0,16			72,89±5,57	82,53±2,71
		T3	1	0,02	0,90			53,43±7,13	52,01±8,25
		T4	1	10,89	0,00			18,82±5,00	33,96±7,37
		T5	1	11,49	0,00			7,18±2,14	24,19±6,90
Perdita di superf. (% riman.)	Lavor. × Telo	T1	1	0,28	0,61				
		T2	1	0,02	0,88				
		T3	1	0,01	0,91				
		T4	1	7,37	0,02				
		T5	1	9,55	0,01				
	Lavor.	T1	1	0,65	0,43	96,07±0,66	95,44±0,87		
		T2	1	0,94	0,35	82,61±4,83	74,85±6,72		
		T3	1	17,78	0,00	53,13±7,43	16,60±4,18		
		T4	1	47,88	0,00	34,85±5,81	5,59±1,40		
		T5	1	16,64	0,00	19,20±5,79	3,19±2,29		
	Telo	T1	1	19,59	0,00			94,04±0,64	97,47±0,39
		T2	1	3,33	0,09			71,44±6,70	86,01±3,90

T3	1	1,41	0,25	29,71±7,95	40,02±8,81
T4	1	12,62	0,00	12,71±3,77	27,73±7,52
T5	1	19,81	0,00	2,46±1,12	19,93±5,90

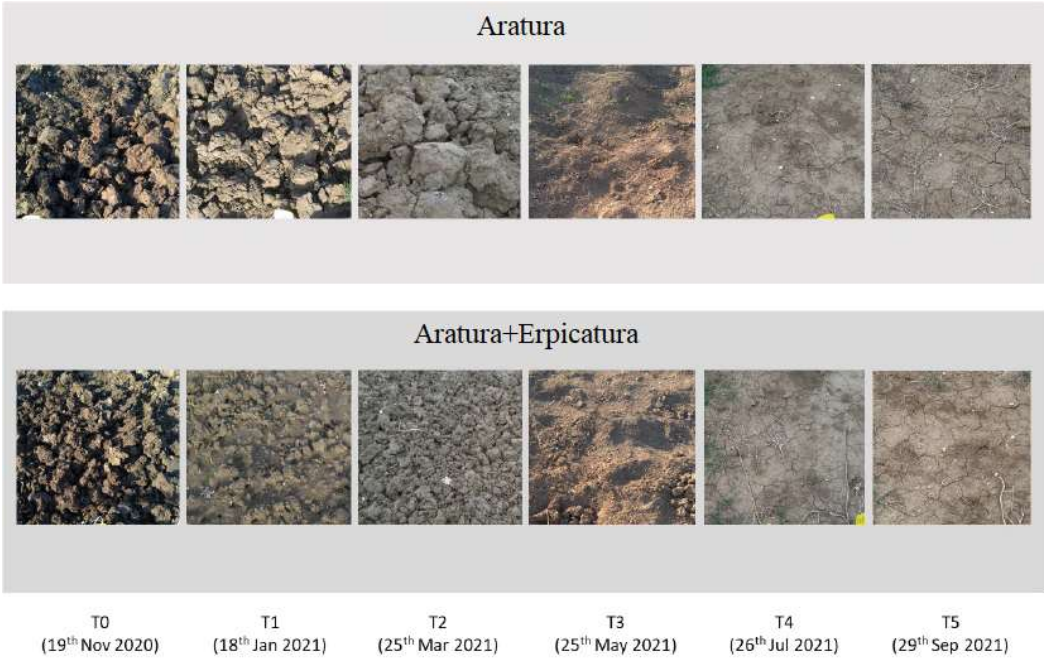

Figura 3-4: Dettaglio dell'aspetto delle sub-parcelle sottoposte ad aratura e aratura+erpicatura nel tempo.

Capitolo 4
DISCUSSIONE

4.1 **Degradazione abiotica dei teli pacciamanti**

Quando una coltura è ancora in atto, si prevede che i teli pacciamanti svolgano tutte le funzioni per il quale sono stati progettati ma anche che le azioni dei biodegradatori del suolo siano limitate. Questo perché i teli si trovano prevalentemente al di fuori del suolo, fatta eccezione per una piccola superficie interrata tramite le operazioni. Tuttavia, gli agenti atmosferici (cioè le azioni e le interazioni di fattori ambientali, come i raggi UV, le precipitazioni, il vento) possono modificare significativamente le proprietà fisico-chimiche dei teli di pacciamatura (paragrafo 1.2.3) e influenzare notevolmente la loro biodegradazione a seguito dell'interramento nel suolo (Scarascia-Mugnozza et al., 2006; Miles et al., 2012). In generale, gli agenti atmosferici alterano le proprietà meccaniche dei teli di pacciamatura, rendendoli tendenzialmente più facili da degradare (Wypych e Faulkner, 1999; Hablot et al., 2014; Sintim et al., 2020).

Studi recenti hanno evidenziato come la perdita delle proprietà meccaniche del telo di pacciamatura sia determinata principalmente dalla loro composizione e hanno suggerito che i climi più caldi possono facilitare questo processo (Anunciado et al., 2021). Nel presente studio, tutti e due i teli di pacciamatura (PAR e EIF) sono stati posati quando le temperature medie erano relativamente elevate (> 25 ° C) e superiori alle medie pluriennali (Figura 2-7). Pertanto, è probabile che da luglio 2020 (mese in cui i teli di pacciamatura sono stati posati sul suolo e le zucchine sono state seminate) ad agosto 2020, i raggi UV abbiano modificato in una certa misura le proprietà meccaniche dei teli pacciamanti, con effetti potenzialmente diversi tra quelli basati su Materi-bi (i.e., PAR) e quello basato su Ecovio (i.e., EIF). Da questa assunzione si potrebbe ipotizzare che le differenze significative riscontrate tra i tassi di degradazione dei due teli in campo (Tabella 3-3) possano essere in parte attribuite alla diversa degradazione avvenuta non solo nel suolo, ma anche nella fase di "weathering", ma sono necessari futuri studi per confermare tale ipotesi.

In quest'area di studio, è probabile che il fattore preponderante sulla degradazione abiotica del telo sia stato la radiazione UV, mentre le precipitazioni potrebbero aver giocato un ruolo equiparabile ai raggi UV solo nel mese di settembre in cui il livello delle piogge è aumentato sensibilmente rispetto ai due mesi precedenti (Figura 2-7). L'ultimo aspetto da considerare per quanto riguarda la degradazione dei teli pacciamanti (durante la loro permanenza fuori suolo) è l'influenza che l'habitus e la dimensione delle colture (in questo caso zucchino) possano aver esercitato sull'effetto diretto degli agenti abiotici degradanti. Chiaramente, per le prime fasi di crescita della coltura è ipotizzabile uno scarso livello di protezione da parte della massa fogliare dello zucchino, la quale inizia ad avere uno sviluppo importante solo dopo alcune settimane dalla semina. Al contrario, nelle fasi più avanzate del ciclo colturale ci si può attendere una buona protezione del telo pacciamante dalla radiazione UV, ad opera dell'ampia superficie fogliare e dall'habitus tentacolare delle piante adulte di zucchino come sostenuto anche da altri studi (Hayes et al., 2017).

4.2 **Degradazione biotica dei teli pacciamanti a seguito delle lavorazioni**

In un sistema colturale che prevede l'utilizzo di teli pacciamanti biodegradabili dal suolo, l'aratura ha una duplice funzione: i) preparazione del terreno alla nuova coltura ed ii) interramento dei teli per poi favorire la loro degradazione biotica. Una volta interrato, la biodegradazione del telo di pacciamatura, sarà determinata dall'abbondanza, dalla composizione e dall'attività metabolica delle comunità microbiche del suolo, nonché dalle caratteristiche fisico-chimiche del suolo (Kjeldsen et al., 2019; Anunciado et al., 2021). Le lavorazioni del terreno vanno ad alterare non solo la struttura del suolo, ma con essa anche la sua temperatura (Malhi e O'Sullivan, 1990; Young e Ritz, 2000), umidità (Dick, 1992; Mohammadi et al., 2011; Bienes et al., 2021) e areazione (Young e Ritz, 2000; Malhi e O'Sullivan, 1990). L'alterazione di questi fattori va con ogni probabilità ad influenzare l'attività microbica del suolo responsabile poi dei processi di degradazione biotica dei teli pacciamanti nel suolo (paragrafo 1.2.4).

L'aratura convenzionale (nei sistemi in esame normalmente eseguita a 30-40 cm di profondità), ovvero la prima pratica eseguita per l'interramento dei teli pacciamanti, va a rimescolare gli aggregati del suolo e a diminuire la sua densità apparente. La riduzione della densità del terreno si traduce in un aumento della micro- e macro-porosità del suolo; ne consegue che il suolo avrà una maggiore capacità di trattenere e veicolare l'acqua per tutta la profondità di lavorazione e l'aumento dell'ossigeno al suo interno andrà a promuovere l'attività dei microrganismi. Questo si tradurrà poi in un turnover del carbonio del suolo più

accelerato come dimostrato da diversi autori (Young e Ritz, 2000; Bienes et al., 2021). La dilavabilità di alcuni batteri in seguito alle piogge che si verificano dopo la lavorazione del terreno è un fattore che potrebbe andare a contrastare in modo più o meno accentuato con l'aumento dell'azione dei microrganismi nel suolo dovuto alla presenza delle condizioni più favorevoli; questo a sua volta potrebbe avere ripercussioni sulla velocità di biodegradazione dei teli (Abu-Ashour et al., 1994; Young e Ritz, 2000; Sintim et al., 2020).

Tra i microrganismi, quelli che probabilmente risentono maggiormente di una lavorazione del terreno sono i funghi, i quali possono creare un'estesa rete di ife che si ramificano attraverso il profilo del suolo che viene profondamente intaccata dall'effetto della lavorazione stessa. In questo caso è ipotizzabile che le connessioni tra le ife vengano tranciate e/o danneggiate ed il flusso all'interno del micelio fungino venga di conseguenza interrotto (Young e Ritz, 2000). In contrasto, le colonie batteriche che vivono al centro degli aggregati del suolo possono, a differenza dei funghi, rimanere inizialmente inalterate, fintanto che la zona di suolo in cui risiedono rimane sostanzialmente intatta (Young e Ritz, 2000).

I bassi tassi di degradazione osservati nel presente studio da novembre 2020 a febbraio 2021 per tutti i trattamenti sono stati probabilmente condizionati dalle basse temperature che sono passate dalla media di 12 °C di novembre, al minimo annuale di gennaio (6,2 °C), per risalire poi a febbraio a 9,5 °C. Questo intervallo di tempo è stato contemporaneamente ricco di precipitazioni (114 mm solo a dicembre) che, come è stato sottolineato in precedenza, possono aver favorito il dilavamento di alcuni batteri attraverso le vie preferenziali createsi in seguito alle lavorazioni. Probabilmente un altro aspetto che potrebbe aver inciso è l'alterazione subita dalle popolazioni fungine a seguito delle lavorazioni, considerando che queste avrebbero avuto più facilità rispetto ai batteri nel colonizzare le superfici del telo, grazie alla crescita diretta delle loro ife (paragrafo 1.2.4). La verifica di tali condizioni in studi futuri supporterebbe le ipotesi formulate per il presente studio. La pratica dell'aratura+erpicatura, la quale ha disintegrato le zolle di terreno ed i macro-aggregati, ha modificato le condizioni del suolo dando origine a un substrato più omogeneo e incline a trattenere acqua. Infatti, l'erpicatura effettuata dopo l'aratura potrebbe aver massimizzato la superficie di contatto telo-suolo, caratteristica che potrebbe essere particolarmente rilevante per terreni con quantità significative di argilla, come appunto in terreni simili a quello del presente studio. Tale lavorazione consentirebbe al terreno di mantenere un'umidità sufficiente per capillarità e tensione e favorirebbe lo spostamento dei microrganismi attraverso la soluzione circolante e la loro adesione insieme alle particelle di terreno ai teli di pacciamatura sin dalla prima parte della sperimentazione (Abu-Ashour et al., 1994; Young e Ritz, 2000). Le condizioni del suolo

ottenute tramite doppia lavorazione sono risultate probabilmente più favorevoli ai batteri che, come riportato da Sander (2019), colonizzano la superficie del telo principalmente dai punti di contatto suolo-polimero e attraverso la divisione cellulare (paragrafo 1.2.4). A maggio 2021, le zolle formate dall'aratura sono scomparse in tutti gli appezzamenti (Figura 3-4), questo ha probabilmente favorito l'adesione della superficie dei campioni con gli aggregati di terreno. Tale ipotesi contrasterebbe in parte con i tassi di degradazione osservati, che mostrano ancora la doppia lavorazione avere tassi più elevati rispetto alla sola aratura. D'altro canto, si può supporre che la superficie di contatto tra il telo e il suolo sia comunque aumentata anche nella lavorazione singola pur non raggiungendo i livelli dell'aratura+erpicatura, questo potrebbe spiegare gli elevati tassi di degradazione osservati per tutti i trattamenti (Figura 3-1 e 3-3), poiché è noto che la biodegradazione delle materie plastiche dipende dalla superficie esposta ai microrganismi biodegradanti (Chinaglia et al., 2018). Oltre a questo aspetto va evidenziato come probabilmente le condizioni ambientali ottimali per i microrganismi biodegradanti del suolo siano state osservate a partire dalla primavera, quando le temperature medie mensili in aumento sono passate dai 9,4 °C del mese di marzo, ai 12,3 °C di aprile fino ai 18,8°C di maggio. Quanto osservato è in accordo con Parham et al. (2003), che ha riportato come l'attività microbica e la biomassa (sia batterica che fungina) siano direttamente correlate alle temperature stagionali. Appare altresì ragionevole supporre che anche l'andamento delle precipitazioni durante il periodo di monitoraggio abbiano influenzato in modo positivo i tassi di degradazione. In particolare, due eventi piovosi interessanti nel mese di aprile (6 e 27 aprile), insieme ad altri due giornate piovose importanti nella metà di maggio (14 e 16 maggio) possono aver influenzato la disponibilità idrica nel suolo per i microrganismi. Riprendendo le considerazioni fatte in precedenza si può supporre che nel periodo primaverile, ovvero a diversi mesi dalla lavorazione, l'equilibrio dei microrganismi del suolo e in particolare delle popolazioni fungine si sia ristabilito, andando a sommare la loro azione a quella dei batteri in maniera significativa. Ciò è in linea con l'ipotesi fatta da Sander (Sander, 2019) sul fatto che i funghi del suolo superino i batteri unicellulari nella colonizzazione del telo e come questi siano più efficienti rispetto ai batteri nel degradare i poliesteri che sono i componenti principali dei teli biodegradabili presenti in commercio (Yamamoto-Tamura et al., 2020). Anche per il periodo estivo antecedente al quarto prelievo (T4) le condizioni climatiche sono state favorevoli con temperature medie tipiche del periodo estivo, 25,0 °C per il mese di giugno e 27,2 °C per il mese di luglio, bilanciate dal livello delle precipitazioni. Due giornate di pioggia importanti nella prima decade di giugno (7 e 8 giugno) potrebbero aver ristabilito i livelli idrici del terreno abbassatisi in seguito alle poche precipitazioni della seconda metà di maggio,

mentre l'unico evento piovoso significativo del mese di luglio (17 luglio) con i suoi 29 mm di pioggia precipitati ha ristabilito l'equilibrio idrico del terreno dopo un periodo importante con precipitazioni scarse o assenti. Nel complesso, gli ultimi due mesi del periodo di monitoraggio, (i.e., agosto e settembre) hanno mostrato condizioni climatiche probabilmente favorevoli all'azione dei microrganismi. Questo al netto del deficit in termini di precipitazioni (Figura 2-7) che potrebbe aver causato in parte un rallentamento della biodegradazione (Van Gestel, 1992). A fronte di temperature di 26,5 °C per il mese di agosto e 22,1 °C per il mese di settembre, sono stati registrati appena 24,2 mm e 28,8 mm rispettivamente nel primo e nel secondo mese.

Il suolo della presente sperimentazione è stato per molti anni ammendato con letame bovino (paragrafo 2.1); questa pratica agronomica ha avuto probabilmente un'influenza rilevante sulla biomassa microbica del suolo aumentandone la biomassa e l'attività, oltre che nell'aver caratterizzato le stesse proprietà biologiche del suolo stesso nel loro complesso (Dick, 1992). L'incorporazione di ammendanti organici nel suolo influenza le attività enzimatiche perché il materiale aggiunto può contenere enzimi intra ed extracellulari che inoltre potrebbero essere più stabilizzati per via delle sostanze umiche, rispetto a quelli già presenti nel suolo (Mohammadi et al., 2011). In generale, l'applicazione di letame animale sembra migliorare l'attività e la diversità dei batteri in misura maggiore rispetto ai funghi (Parham et al., 2003; Rayne e Aula, 2020).

I diversi tassi di degradazione mostrati dai due film di pacciamatura testati (Figure 3-2 e 3-4) tra i due tipi di lavorazione del terreno dipendono molto probabilmente dalle loro diverse composizioni chimiche, come già descritto nel paragrafo 1.2. Ciò è in accordo con recenti studi in campo aperto che hanno riportato che diversi film di pacciamatura biodegradabili nel suolo sepolti nello stesso terreno e nelle stesse condizioni hanno mostrato tassi di degradazione diversi (Sintim et al., 2020; Anunciado et al., 2021; Bianchini et al., 2022).

L'utilizzo di indicatori indiretti per la stima della biodegradazione preclude la possibilità di affermare che i teli analizzati si siano stati effettivamente biodegradati dai microrganismi presenti nel suolo. Questo al netto della loro certificazione come prodotti "soil-biodegradable" come già accennato al paragrafo 1.3. Tale limite nel presente studio è da imputare all'impossibilità di misurare la CO_2 evoluta dalla loro biodegradazione in pieno campo (Francioni et al., 2021, Sander et al., 2019). Tuttavia, questo aspetto potrà essere approfondito in future prove di incubazione utilizzando gli stessi teli e lo stesso terreno.

Alcuni studi condotti in pieno campo (e.g., Scarascia-Mugnozza et al., 2006) non hanno mostrato alcuna evidenza di ecotossicità dopo l'incorporazione di film di pacciamatura biodegradabili nel suolo. Tuttavia, ipotizzando l'utilizzo di teli per più colture e relativi cicli colturali, appare verosimile un progressivo accumulo di materiale plastico non completamente biodegradato, immesso nel suolo ciclicamente. Sono quindi necessari studi di lungo termine per confermare l'assenza di ecotossicità e la valutazione dell'effetto delle plastiche biodegradabili nel ciclo del carbonio del suolo. Tali studi dovrebbero essere condotti in diverse condizioni pedo-climatiche visto che la biodegradazione completa dei teli pacciamanti resta l'obiettivo da perseguire in un'ottica di sostenibilità ambientale.

4.3 **Prospettive future**

I vantaggi dell'utilizzo dei metodi indiretti sono già stati affrontati nel paragrafo 1.3.2, ma con essi sono stati anche messi in luce i limiti che hanno: non possono dimostrare direttamente la biodegradabilità dei teli pacciamanti biodegradabili (Sander, 2019). Se lo scopo è testare direttamente la loro biodegradabilità, sono necessari metodi che misurino la completa mineralizzazione del carbonio del materiale testato in CO_2, cosa che può essere fatta solo attraverso l'utilizzo di metodi diretti, come già affermato al paragrafo 1.3.1.

I sistemi di incubazione attualmente impiegati con metodologie che misurano l'evoluzione della CO_2 hanno due principali limitazioni che compromettono studi meccanicistici dettagliati sull'utilizzo dei polimeri: i) consentono solo la misurazione della mineralizzazione dei polimeri ma non la chiusura dei bilanci di massa sul carbonio polimerico aggiunto ai terreni (Urstadt, et al., 1995) e ii) non offrono informazioni sull'incorporazione del carbonio derivato da polimeri nella biomassa microbica del suolo, come già illustrato al paragrafo 1.3.1. Queste limitazioni potrebbero essere superate attraverso metodologie innovative: l'estrazione con solventi (e.g. estrazioni tramite Soxhlet o estrazione con solvente accelerata) e/o l'utilizzo di polimeri marcati con isotopi di carbonio (Sander, 2019). I metodi di estrazione con solvente, come Soxhlet e l'estrazione con solvente accelerata, per recuperare il polimero residuo dai terreni, sono più promettenti per caratterizzare la frazione non mineralizzata di polimeri nei suoli (Siotto, et al., 2013; Rychter, et al., 2006). La quantità di poliesteri estratti potrebbe essere successivamente quantificata mediante cromatografia a permeazione di gel o spettroscopia di risonanza magnetica nucleare. Metodi efficienti di estrazione dei poliesteri dai terreni aiuterebbero l'interpretazione degli studi di incubazione di laboratorio, ma consentirebbero anche di esaminare il poliestere residuo nei terreni di campo a cui sono stati precedentemente applicati film di pacciamatura biodegradabile (Sander, 2019).

La metodologia riguardante l'utilizzo di polimeri marcati con isotopi di carbonio ^{13}C (più praticabile del ^{14}C a causa delle normative e delle misure di sicurezza) invece di polimeri non marcati nelle incubazioni del suolo, offre la possibilità di quantificare in modo più accurato la conversione in CO_2 attraverso l'utilizzo di tecnologie avanzate. L'uso di polimeri marcati con ^{13}C apre anche la possibilità di quantificare la quantità di ^{13}C derivato dal polimero che rimane nei terreni alla fine delle incubazioni. Combinando le quantità quantificate di ^{13}C non mineralizzato rimanenti nei suoli e di ^{13}C mineralizzato, è possibile chiudere il bilancio di massa sul polimero marcato aggiunto. Gli studi di mineralizzazione con polimeri marcati con ^{13}C non possono essere alterati proprio per il fatto che riescono a distinguere l'anidride carbonica marcata da quella che si è formata in seguito alla mineralizzazione della sostanza organica del suolo. Oltre a consentire la determinazione del bilancio di massa, l'utilizzo di polimeri marcati con ^{13}C consentirebbe anche il monitoraggio del carbonio polimerico nella biomassa microbica del suolo (Sander, 2019). La quantificazione del ^{13}C nei biomarcatori batterici e fungini caratteristici fornirebbe preziose informazioni sull'importanza relativa di batteri e funghi nell'utilizzo del carbonio derivato da polimeri (Frostegard, et al., 1996). L'integrazione di tali tecniche con indicatori indiretti per la stima della degradazione del film pacciamante e dell'effetto delle pratiche agronomiche su di essa, potrebbe rappresentare la risposta all'esigenza di sviluppare un protocollo per studi in campo aperto che attualmente manca (Francioni et al., 2021). I progressi analitici descritti sopra che coinvolgono l'incubazione nel suolo di polimeri sia marcati con ^{13}C o meno, consentirebbero studi sistematici sugli effetti delle proprietà dei polimeri e delle caratteristiche del suolo sul CUE (presentato al paragrafo 1.3) dei degradatori microbici dei polimeri. Determinare gli effetti della disponibilità di azoto sui CUE e sui tassi di mineralizzazione e le estensioni è sicuramente una prospettiva interessante che merita approfondimento. È noto che i CUE dei microrganismi del suolo diminuiscono da circa 0,3-0,5 per substrati con basso C:N a valori molto più piccoli per substrati con rapporti C:N elevati (Sinsabaugh, et al., 2013). Poiché i polimeri utilizzati nei film di pacciamatura biodegradabile (visti al paragrafo 1.2) rientrano in quest'ultima categoria, l'aumento della disponibilità di N nei suoli probabilmente aumenta i CUE e la biodegradazione complessiva dei polimeri. Studi futuri potrebbero quindi testare i tassi di biodegradazione di teli interrati in campo, in parcelle con differenti livelli di concimazione azotata e/o di letamazione.

La prontezza della coltura a ricoprire il telo pacciamante, insieme al contatto fisico tra coltura e il telo stesso, è correlata al livello di interazione tra telo e ambiente (e.g., è ipotizzabile che una coltura con un'ampia superficie fogliare protegga maggiormente i teli dagli agenti

atmosferici) (Martín-Closas, et al., 2017). A questo proposito risulterebbe utile integrare il presente studio con una quantificazione dell'alterazione delle proprietà e degradazione del telo durante il periodo di "weathering". Confrontando teli biodegradabili nel suolo diversi per composizione chimica e/o utilizzati su colture differenti (e.g., differente ampiezza della superficie fogliare o habitus), sarebbe possibile testare eventuali alterazioni nella velocità di biodegradazione nel suolo. Questo tipo di analisi potrebbe chiarire se e come differenti livelli di alterazione e di degradazione abiotica ("weathering"), possano effettivamente generare diversi tassi di biodegradazione dei teli dopo essere stati interrati nel suolo. In conclusione, gli step successivi che potrebbero essere compiuti a partire da uno studio come quello presentato in questa tesi sono molti e comprendono qualsiasi pratica agronomica utilizzata per l'incorporazione della plastica nel terreno (e.g., tempi, frequenza o profondità di lavorazione) (Francioni, et al., 2021), ma anche tutte quelle pratiche che vadano ad alterare le condizioni del suolo in maniera rilevante dopo l'interramento del telo stesso e che potrebbero essere confrontate e studiate nelle medesime condizioni pedo-climatiche.

CONCLUSIONI

Nel complesso, i dati del presente studio indicano che l'affinamento del suolo derivante dall'aratura seguita dall'erpicatura accelera la degradazione dei teli pacciamanti testati. Gli effetti dell'affinamento del suolo sono emersi nel breve termine, probabilmente a causa dell'aumento della superficie di contatto suolo-telo pacciamante. Tuttavia, i tassi di degradazione più elevati sono diventati evidenti solo a partire dalla primavera, quando la temperatura e l'umidità del suolo erano probabilmente in condizioni ottimali per i microrganismi biodegradanti del suolo.

I risultati ottenuti mostrano anche che il telo pacciamante a base di Mater-bi (PAR) ha mostrato tassi di degradazione più elevati rispetto all'altro telo per pacciamatura utilizzato (EIF). Ciò potrebbe riflettere il diverso potenziale del suolo studiato per la biodegradazione di uno o più componenti dei teli, sebbene siano necessari studi futuri per verificare questa ipotesi in quanto altri fattori potrebbero aver avuto un ruolo chiave (e.g., spessore del film, alterazione nel periodo di "weathering").

Va necessariamente rimarcato come questo studio abbia utilizzato metodi indiretti per la stima della biodegradazione dei film di pacciamatura e come siano assolutamente necessari studi futuri per confermare se e a quali livelli tali teli si siano effettivamente biodegradati o solamente frammentati.

BIBLIOGRAFIA

Abu-Ashour, J., Joy D. M., Lee H., Whiteley H. R. & Zelin, S., 1994. Transport of Microorganisms through soil. *Water, Air Soil Pollut*., 75, pp. 141–58.

Andrady, A. L., 1994. Assessment of Environmental Biodegradation of Synthetic Polymers. *J. Macromol. Sci., Polym. Rev.,* 34 (1), pp. 25−76.

Anunciado, M. B., Hayes, D. G., Wadsworth, L. C., English, M. E., Schaeffer, S. M., Sintim, H. Y. & Flury, M., 2021. Impact of Agricultural Weathering on Physicochemical Properties of Biodegradable Plastic Mulch Films: Comparison of Two Diverse Climates Over Four Successive Years. *J. Polym. Environ.,* 29, pp. 1–16. Disponibile su: https://doi.org/10.1007/s10924-020-01853-1.

ASSAM, 2005. Suoli e paesaggi delle Marche: programma interregionale Agricoltura e qualità, misura 5, carta dei suoli, scala 1:250.000 (D.G.R. n. 2805 del 18/12/2000 ASSAM. Agenzia Servizi Settore Agroalimentare delle Marche.

ASTM D 5988 (2012). Standard test method for determining aerobic biodegradation in soil of plastic materials. ASTM International, USA.

Barragán, D. H., Pelacho, A. M. & Martin-Closas, L., 2016. Degradation of agricultural biodegradable plastics in the soil under laboratory conditions. *Soil Res*., 54, pp. 216–24.

Bianchini, M., Trozzo, L., D'Ottavio, P., Giustozzi, M., Toderi, M., Ledda, L. & Francioni, M., 2022. Soil refinement accelerates in-field degradation rates of soil-biodegradable mulch films. *Ital. J. Agron. (SUBMITTED)*.

Bienes, R., Marques, M. J., Sastre, B., García-Díaz, A., Esparza, I., Antón, O., Navarrete, L., Hernánz, J. L., Sánchez-Girón, V., Sánchez Del Arco, M. J. & Alarcón R, 2021. Tracking changes on soil structure and organic carbon sequestration after 30 years of different tillage and management practices. *Agronomy,* 11, pp. 291. Disponibile su: https://doi.org/10.3390/agronomy11020291.

Bork, H., Mieth, A. & Tschochner, B., 2004. Nothing but stones? A review of the extent and technical efforts of prehistoric stone mulching on Rapa Nui. *Rapa Nui Journal*, Vol. 18 (1), pp. 10-14.

Briassoulis, D., & Degli Innocenti, F., 2017. Standards for Soil Biodegradable Plastics. In: Malinconico, M., a cura di *Soil degradable bioplastics for a sustainable modern agriculture*, pp. 139-165.

Chinaglia, S., Tosin, M. & Degli-Innocenti, F., 2018. Biodegradation rate of biodegradable plastics at molecular level. *Polym. Degrad. Stab.,* 147, pp. 237–44. Disponibile su: https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2017.12.011.

Degli Innocenti, F., 2003. Biodegradability and compostability—the international norms. In: Chiellini E, Solaro R (eds) a cura di *Biodegradable polymers*. Plastics Kluwer Academic Plenum Publishers, New York, pp. 33–45.

Dick, R. P., 1992. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agric. Ecosyst. Environ*., 40, pp. 25–36.

EN 17033, 2018. Plastics-Biodegradable Mulch Films for Use in Agriculture and Horticulture-Requirements and Test Methods. European Standard, European Committee for Standardization, Brussels, Belgium.

EN 45020, 2007. Standardisation and linked activities—general Vocabulary.

Eubeler, J. P., Zok, S., Bernhard, M. & Knepper, T. P, 2009. Environmental biodegradation of synthetic polymers I. Test methodologies and procedures. TrAC, *Trends Anal. Chem*., 28 (9), pp. 1057−1072.

European Bioplastics. Available at: http://www.europeanbioplastics.org/. Accessed 15 Sep 2013.

Francioni, M., D'Ottavio, P., Lai, R., Trozzo, L., Budimir, K., Foresi, L., Kishimoto-Mo, A.W., Baldoni, N., Allegrezza, M., Tesei, G. & Toderi, M., 2019. Seasonal Soil Respiration Dynamics and Carbon-Stock Variations in Mountain Permanent Grasslands Compared to Arable Lands. *Agriculture,* 9, pp. 165.

Francioni, M., Kishimoto-Mo, A. W., Tsuboi, S. & Takada Hoshino, Y., 2021. Evaluation of the mulch films biodegradation in soil: a methodological review. *Ital. J. Agron. (AOP)*. https://doi.org/10.4081/ija.2021.1936.

Frostegard, A. & Baath, E., 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol. Fertil. Soils*, 22 (1), pp. 59−65.

Griffin-LaHue, D., Ghimire, S., Yu, Y., Scheenstra, E. J., Miles, C. A. & Flury, M., 2022. In-field degradation of soil-biodegradable plastic mulch films in a Mediterranean climate. *Sci Total Environ*., 806, pp. 150-238. Disponibile su: 10.1016/j.scitotenv.2021.150238.

Guerrini, S., Borreani, G. & Voojis, H., 2017. Biodegradable Materials in Agriculture: Case Histories and Perspectives. In: Malinconico, M., a cura di *Soil degradable bioplastics for a sustainable modern agriculture*, pp. 35-63.

Hablot, E., Dharmalingam, S., Hayes, D. G., Wadsworth, L. C., Blazy, C. & Narayan, R., 2014. Effect of Simulated Weathering on Physicochemical Properties and Inherent Biodegradation of PLA/PHA Nonwoven Mulches. *J. Polym. Environ*., 22, pp. 417–29. Disponibile su: 10.1007/s10924-014-0697-0.

Hayes, D. G., Wadsworth, L. C., Sintim, H. Y., Flury, M., English, M., Schaeffer, S. & Saxton, A. M., 2017. Effect of diverse weathering conditions on the physicochemical properties of biodegradable plastic mulches. *Polym. Test*., 62, pp. 454–67. Disponibile su: http://dx.doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.07.027.

Hodge, A., Robinson, D. & Fitter, A., 2000. Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? *Trends Plant Sci.*, 5 (7), pp. 304−308.

Hoshino, A., Sawada, H., Yokota, M., Tsuji, M., Fukuda, K. & Kimura, M., 2001. Influence of weather conditions and soil properties on degradation of biodegradable plastics in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 47 (1), pp. 35−43.

ISO 17556, 2012. Plastics—determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in soil by measuring the oxygen demand in a respirometer or the amount of carbon dioxide evolved. International Organization for Standardization, Switzerland.

ISO 23517, 2021. Plastics - Soil biodegradable materials for mulch films for use in agriculture and horticulture - Requirements and test methods regarding biodegradation, ecotoxicity and control of constituents. International Organization for Standardization, Switzerland.

Kijchavengkul, T., Auras, R., Rubino, M., Ngouajio, M. & Thomas Fernandez, R., 2006. Development of an automatic laboratory-scale respirometric system to measure polymer biodegradability. *Polym. Test.*, 25 (8), pp. 1006−1016.

Kjeldsen, A., Price, M., Lilley, C., Guzniczak, E. & Archer, I., 2019. A Review of Standards for Biodegradable Plastics. A cura di Ind. Biotechnol. Innov. Cent. IBioIC:33.

Koitabashi, M., Noguchi, M. T., Sameshima-Yamashita, Y., Hiradate, S., Suzuki, K., Yoshida, S., Watanabe, T., Shinozaki, Y., Tsushima, S. & Kitamoto, H. K., 2012. Degradation of biodegradable plastic mulch films in soil environment by phylloplane fungi isolated from gramineous plants. *AMB Express*, 2 (1), pp. 40.

Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B. & Rubel, F., 2006. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Meteorol. Zeitschrift,* 15, pp. 259–63. Disponibile su: https://doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130.

Liu, E. K., He, W. Q. & Yan, C. R., 2014. "White revolution" to "white pollution" -agricultural plastic film mulch in China. *Environ. Res. Lett.*, 9 (9), pp. 091001.

Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F. & Nava-Saucedo, J.-E., 2008. Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques. *Chemosphere*, 73 (4), pp. 429−442.

Malhi, S. S. & O'Sullivan, P. A., 1990. Soil temperature, moisture and penetrometer resistance under zero and conventional tillage in central Alberta. *Soil Tillage Res.*, 17, pp. 167–72.

Malinconico, M., 2017. *Soil Degradable Bioplastics for a Sustainable Modern Agriculture* (M. Malinconico, Ed.). Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Manera, C., Margiotta, S. & Picuno, P., 1999. Innovative/biodegradable plastic films for protected cultivation. *Colture Protette,* 28, pp. 59–64.

Martin-Closas, L. & Pelacho, A. M., 2004. Biodegradable mulches as alternative to paper and polyethylene mulches in an organic production system. Articolo presentato al VI Congresso SEAE. Almeria, 27 Sept–2 Oct 2004.

Martín-Closas, L., Costa, J., Cirujeda, A., et al., 2016. Above-soil and in-soil degradation of oxo and bio-degradable mulches: a qualitative approach. *Soil Res,* 54, pp. 225–236.

Martín-Closas, L., Costa, J. & Pelacho, A. M., 2017. Agronomic Effects of Biodegradable Films on Crop and Field Environment. In: Malinconico, M., a cura di *Soil degradable bioplastics for a sustainable modern agriculture*, pp. 67–104.

Mayberry, W. R., Prochazka, G. J. & Payne, W. J., 1967. Growth Yields of Bacteria on Selected Organic Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 15 (6), pp. 1332−1338.

Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., Wouters, A. & Swings, J., 1993. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 (10), pp. 3233−3238.

Miles, C., Wallace, R., Wszelaki, A., Martin, J., Cowan, J., Walters, T. & Inglis, D., 2012. Deterioration of potentially biodegradable alternatives to black plastic mulch in three tomato production regions. *HortScience,* 47, pp. 1270–7. Disponibile su: https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.9.1270.

Mohammadi, K., Heidari, G., Khalesro, S. & Sohrabi, Y., 2011. Soil management, microorganisms and organic matter interactions: A review. *African J. Biotechnol*., 10, pp. 19840–9. Disponibile su: https://doi.org/10.5897/AJBX11.006.

Moore-Kucera, J., Cox, S. B., Peyron, M., Bailes, G., Kinloch, K., Karich, K., Miles, C., Inglis, D. A. & Brodhagen, M., 2014. Native soil fungi associated with compostable plastics in three contrasting agricultural settings. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98 (14), pp. 6467−6485.

Mormile, P., Rippa, M., Bonanomi, G., Scala, F., Yan, C. & Petti, L., 2015. Photo-reflective mulches for saving water in agriculture, world academy of science, engineering and technology. *Agric Biosyst Eng*, 2(5).

Mormile, P., Stahl, N. & Malinconico M., 2017. The World of Plasticulture. In: Malinconico, M., a cura di *Soil degradable bioplastics for a sustainable modern agriculture*. pp. 1-19.

Mosnáčková, K., Danko, M., Šišková, A., Falco, L. M., Janigová, I., Chmela, Š., Vanovčanová, Z., Omaníková, L., Chodák, I. & Mosnáček, J., 2017. Complex study of the physical properties of a poly(lactic acid)/poly(3-hydroxybutyrate) blend and its carbon black composite during various outdoor and laboratory ageing conditions. *RSC Adv.,* 7, pp. 47132–42.

Muroi, F., Tachibana, Y., Kobayashi, Y., Sakurai, T. & Kasuya, K.-I., 2016. Influences of poly(butylene adipate-co-terephthalate) on soil microbiota and plant growth. *Polym. Degrad. Stab*, 129, pp. 338−346.

Nagata, M., Tadeo, B. D., Hiyoshi, K., et al., 1998. Biodegradable film mulching cultivation system for early season culture rice: thermal image analyses of mulch films using thermography (part I). *Bull Fac Agric Miyazaki University,* 45, pp. 143–152.

Narayan, R., 2017. Biodegradable and Biobased Plastics: An Overview. In: Malinconico, M., a cura di *Soil degradable bioplastics for a sustainable modern agriculture*. pp. 23-34.

NF U52-001, 2005. Biodegradable materials for use in agriculture and horticulture-mulching products-requirements and test methods. Association Française de Normalisation.

Ortiz-Cano, H., Hernandez-Herrera, J. A., Hansen, N. C., Petersen, S. L., Searcy , M. T., Mata-Gonzalez, R., Cervantes-Mendívil, T., Villanueva-Morales, A., Park, P. M. & Stewart, J. R., 2020. Pre-Columbian Rock Mulching as a Strategy for Modern Agave Cultivation in Arid Marginal Lands. *Frontiers in Agronomy*. Volume 2, Artic. 10, Sept. 2020.

Parham, J. A., Deng, S. P., Da, H. N., Sun, H. Y. & Raun, W. R., 2003. Long-term cattle manure application in soil. II. Effect on soil microbial populations and community structure. *Biol. Fertil. Soils,* 38, pp. 209–15. Disponibile su: https://doi.org/10.1007/s00374-003-0657-7.

Qian, H., Zhang, M., Liu, G., Lu, T., Qu, Q., Du, B. & Pan, X., 2018. Effects of Soil Residual Plastic Film on Soil Microbial Community Structure and Fertility. *Water, Air, Soil Pollut*., 229 (8), pp. 261.

Ray, M. & Biswasi, S., 2016. Impact of Mulching on Crop Production: A Review. In: *Trends in Biosciences* 9(14), Print: ISSN 0974-8431, pp. 757-767.

Rayne, N. & Aula, L., 2020. Livestock manure and the impacts on soil health: A review. *Soil Syst.,* 4, pp. 1–26. Disponibile su: https://doi.org/10.3390/soilsystems4040064.

Rudnik, E. & Briassoulis, D., 2011. Degradation behaviour of poly(lactic acid) films and fibres in soil under Mediterranean field conditions and laboratory simulations testing. *Ind. Crops Prod*., 33, pp. 648–58. Disponibile su: http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.12.031.

Ruggero, F., Gori, R. & Lubello, C., 2019. Methodologies to assess biodegradation of bioplastics during aerobic composting and anaerobic digestion: A review. *Waste Manag. Res.,* 37, pp. 959–75.

Rychter, P., Biczak, R., Herman, B., Smyłła, A., Kurcok, P., Adamus, G. & Kowalczuk, M., 2006. Environmental degradation of polyester blends containing atactic poly(3-hydroxybutyrate). Biodegradation in soil and ecotoxicological impact. *Biomacromolecules*, 7 (11), pp. 3125−3131.

Sander, M., 2019. Biodegradation of polymeric mulch films in agricultural soils: concepts, knowledge gaps, and future research directions. *Environ. Sci. Technol*., 53, pp. 2304–15.

SAPEA, 2020. Biodegradability of Plastics in the Open Environment (Group of Chief Scientific Advisors, Ed.), Scientific. European Commission Directorate-General for Research and Innovation, Brussels.

Scarascia-Mugnozza, G., Schettini, E., Vox, G., Malinconico, M., Immirzi, B. & Pagliara, S., 2006. Mechanical properties decay and morphological behaviour of biodegradable films for agricultural mulching in real scale experiment. *Polym. Degrad. Stab.*, 91, pp. 2801–8. Disponibile su: https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2006.02.017.

Šerá, J., Stloukal, P., Jančová, P., Verney, V., Pekařová, S. & Koutný, M., 2016. Accelerated Biodegradation of Agriculture Film Based on Aromatic−Aliphatic Copolyester in Soil under Mesophilic Conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 64 (28), pp. 5653−5661.

Sinsabaugh, R. L., Manzoni, S., Moorhead, D. L. & Richter, A., 2013. Carbon use efficiency of microbial communities: stoichiometry, methodology and modelling. Ecology Letters, 16 (7), pp. 930−939.

Sintim, H. Y., Bary, A. I., Hayes, D. G., Wadsworth, L. C., Anunciado, M. B., English, M. E., Bandopadhyay, S., Schaeffer, S. M., DeBruyn, J. M., Miles, C. A., Reganold, J. P. & Flury, M., 2020. In situ degradation of biodegradable plastic mulch films in compost and agricultural soils. *Sci. Total Environ.*, 727, pp. 138668. Disponibile su: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138668.

Siotto, M., Zoia, L., Tosin, M., Degli-Innocenti, F., Orlandi, M. & Mezzanotte, V., 2013. Monitoring biodegradation of poly(butylene sebacate) by Gel Permeation Chromatography, (1)H-NMR and (31)P-NMR techniques. *J. Environ. Manage.*, 116, pp. 27−35.

Smith, D. W., 2014. Soil survey staff: keys to soil taxonomy. 12th ed. Natural Resources Conservation Service, Washington, DC, USA.

Thompson, A. A., Samuelson, M. B., Kadoma, I., Soto-Cantu, E., Drijber, R. & Wortman, S. E., 2019. Degradation Rate of Bio-based Agricultural Mulch is Influenced by Mulch Composition and Biostimulant Application. *J. Polym. Environ.*, 27, pp. 498–509.

UNI 11462, 2012. Plastic materials biodegradable in soil—types, requirements and test methods. Italian Organization for Standardization (UNI).

UNI EN 13206, 2020. Materie plastiche - Film termoplastici di copertura per uso in agricoltura ed orticoltura. UNIPLAST - Ente Italiano di Unificazione nelle Materie Plastiche.

Urstadt, S., Augusta, J., Müller, R. J. & Deckwer, W. D., 1995. Calculation of carbon balances for evaluation of the biodegradability of polymers. *J. Environ. Polym. Degrad.*, 3 (3), pp. 121−131.

Van Gestel, M., 1992. Microbial biomass responses to seasonal change and imposed drying regimes at increasing depths of undisturbed topsoil profiles. *Soil Biol Biochem,* 24, pp. 103–111.

Wang, H., Wei, D., Zheng, A. & Xiao, H., 2015. Soil burial biodegradation of antimicrobial biodegradable PBAT films. *Polym. Degrad. Stab*., 116, pp. 14–22.

Weber, C., 1998. Mulching with biologically degradable plastic. Mulchen mit biologisch

abbaubarer Folie. *KTBL-Arbeitspapier,* 251, pp. 78–83.

Wypych, G. & Faulkner, T., 1999. Basic Parameters in Weathering Studies. *Weather. Plast.*, pp. 1–13.

Yamamoto-Tamura, K., Hoshino, Y. T., Tsuboi, S., Huang, C., Kishimoto-Mo, A. W., Sameshima-Yamashita, Y. & Kitamoto, H., 2020. Fungal community dynamics during degradation of poly(butylene succinate-co-adipate) film in two cultivated soils in Japan. Biosci. *Biotechnol. Biochem*., 84, pp. 1077–87. Disponibile su: https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1713718.

Young, I. M. & Ritz, K., 2000. Tillage, habitat space and function of soil microbes. *Soil Tillage Res*., 53, pp. 201–13. Disponibile su: https://doi.org/10.1016/S0167-1987(99)00106-3.

Zumstein, M. T., Schintlmeister, A., Nelson, T. F., Baumgartner, R., Woebken, D., Wagner, M., Kohler, H.-P. E., McNeill, K. & Sander, M., 2018. Biodegradation of synthetic polymers in soils: Tracking carbon into CO2 and microbial biomass. *Sci. Adv.*, 4 (7), No. eaas9024.

Zumstein, M. T., Narayan, R., Kohler, H. P. E, McNeill, K. & Sander, M., 2019. Dos and Do Nots When Assessing the Biodegradation of Plastics. *Environ. Sci. Technol.,* 53, pp. 9967–9.