

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA**  
**Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali**



*Corso di laurea in Scienze e Tecnologie per l'Ambiente ed il  
Territorio*

**TESI DI LAUREA SPECIALISTICA**

**Prove di fertirrigazione con percolato da  
discarica pretrattato con un sistema di  
bio-stabilizzazione aerobico**

***Candidato:***  
Eva Micheli

***Relatore:***  
Prof. Alessandro Saviozzi

***Relatore:***  
Dott.ssa Grazia Masciandaro

Anno accademico 2005-2006

***“Dai diamanti non nasce niente  
dal letame nascono i fior”***

*(Fabrizio de André, “Via del campo”)*

# ***INDICE***

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>6</b>
<b>1 IL PERCOLATO DA DISCARICA.....</b>	<b>10</b>
1.1 Formazione e composizione del percolato .....	12
1.2 Trattamento del percolato .....	15
1.2.1 Metodi biologici .....	16
1.2.2 Metodi chimico-fisici .....	17
<b>2 LE PROPRIETA' NUTRITIVE DEL PERCOLATO .</b>	<b>20</b>
2.1 Il percolato e la fertirrigazione .....	21
2.2 Vantaggi della fertirrigazione .....	24
<b>3 NORMATIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>4 INQUADRAMENTO DEL LAVORO DI TESI.....</b>	<b>28</b>
4.1 Scopo della tesi.....	29
4.2 Obiettivi.....	29

<b>4.3</b>	<b>Studio preliminare sugli scarti di raffinazione del compost.....</b>	<b>29</b>
<b>4.4</b>	<b>Procedura sperimentale .....</b>	<b>33</b>
4.4.1	Schema di lavoro .....	33
4.4.2	Caratteristiche del percolato utilizzato.....	38
4.4.3	Caratteristiche del terreno utilizzato .....	39
4.4.4	Scelta della specie vegetale.....	40
<b>5</b>	<b>METODOLOGIE ANALITICHE.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1</b>	<b>Strumentazione impiegata.....</b>	<b>43</b>
5.1.1	Strumentazione di base .....	43
5.1.2	Strumentazione specialistica.....	44
<b>5.2</b>	<b>Preparazione del campione.....</b>	<b>45</b>
5.2.1	Preparazione degli estratti acquosi a 37°C .....	45
5.2.2	Preparazione degli estratti acquosi a 60°C .....	46
5.2.3	Preparazione degli estratti in pirofosfato alcalino .....	46
5.2.4	Preparazione degli estratti in pirofosfato neutro.....	46
<b>5.3</b>	<b>Metodologie chimiche.....</b>	<b>48</b>
5.3.1	pH .....	48
5.3.2	Conducibilità elettrica .....	48
5.3.3	Ammoniaca .....	48
5.3.4	Azoto totale .....	48
5.3.5	Carbonio Totale .....	48
5.3.6	Carbonio idrosolubile .....	49
5.3.7	Carbonio estraibile totale .....	49
5.3.8	Acidi fulvici .....	50
5.3.9	Acidi umici.....	50
5.3.10	Fosforo totale .....	50
5.3.11	Fosforo assimilabile .....	51
5.3.12	Anioni .....	52

<b>5.4</b>	<b>Metodologie biochimiche .....</b>	<b>52</b>
5.4.1	Deidrogenasi .....	52
5.4.2	$\beta$ -glucosidasi totale ed extracellulare .....	53
5.4.3	Fosfatasi totale ed extracellulare .....	54
5.4.4	Ureasi totale ed extracellulare.....	55
5.4.5	Proteasi totale ed extracellulare.....	56
<b>5.5</b>	<b>Analisi statistica.....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>59</b>
<b>6.1</b>	<b>Effetti sulle proprietà chimiche del terreno .....</b>	<b>60</b>
6.1.1	pH .....	60
6.1.2	Conducibilità elettrica .....	61
6.1.3	Azoto totale .....	62
6.1.4	Azoto ammoniacale.....	63
6.1.5	Fosforo totale .....	64
6.1.6	Carbonio totale.....	65
6.1.7	Rapporto C/N .....	66
6.1.8	Parametri relativi al processo di umificazione .....	68
6.1.9	Parametri di controllo dei processi microbiologici .....	72
6.1.10	Anioni.....	74
<b>6.2</b>	<b>Effetti sulla biomassa vegetale .....</b>	<b>78</b>
<b>6.3</b>	<b>Effetti sulle proprietà biochimiche del terreno .....</b>	<b>79</b>
7.3.1	Deidrogenasi .....	80
7.3.2	$\beta$ -glucosidasi .....	81
7.3.3	Ureasi.....	82
7.3.4	Proteasi .....	83
7.3.5	Fosfatasi.....	84
7.3.6	Ureasi extracellulare.....	85
7.3.7	proteasi extracellulare .....	86
7.3.8	$\beta$ -glucosidasi e fosfatasi extracellulare .....	86

<b>6.4</b>	<b>Analisi delle Componenti Principali .....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>90</b>
	<b>APPENDICE .....</b>	<b>92</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>99</b>
	<b>RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>106</b>

## ABSTRACT

Il lavoro che segue ha lo scopo di verificare il possibile utilizzo in fertirrigazione del percolato proveniente da discarica per scarti di raffinazione del compost, precedentemente stabilizzato attraverso un sistema biologico-aerobico; tale percolato può infatti essere considerato una miscela liquida da poter utilizzare come fertilizzante organo-minerale, dato il suo contenuto di substrato carbonioso e di elementi nutritivi (azoto e fosforo).

Il lavoro ha previsto l'allestimento di sistemi suolo-pianta (*Agrostis Stolonifera*) in microcosmo di laboratorio. Le prove, condotte in triplo, sono state fertirrigate con acqua potabile per controllo, percolato non stabilizzato proveniente da bioreattori contenenti scarti di raffinazione del compost e con percolato della stessa provenienza ma stabilizzato con diverse linee di trattamento al fine d'individuare il processo di depurazione migliore. Al termine della sperimentazione di un mese, per valutare la validità dell'apporto delle varie miscele liquide impiegate e per studiare gli effetti agronomici, chimico-nutrizionali e biochimici sul terreno, è stato valutato il peso della biomassa vegetale e sono state eseguite analisi di tipo chimico e di tipo biochimico sul terreno fertirrigato.

## **INTRODUZIONE**



L'aumento della popolazione mondiale, unitamente allo sviluppo della ricchezza e della produttività della nostra società, comporta un maggiore impatto sulle risorse naturali, poiché la domanda di beni di consumo cresce vertiginosamente mentre di pari passo il ciclo di vita dei beni stessi si abbrevia determinando in tal modo un aumento dei rifiuti.

La produzione dei rifiuti in Italia, come in tutto il resto del mondo, costituisce un grave problema in quanto anche una politica orientata al riutilizzo, reimpiego e riciclaggio (concetto introdotto dal Decreto Ronchi e ripreso dal D.Lgs. 152/06) non elimina il problema dello smaltimento, poiché tutti i prodotti alla fine del loro ciclo di vita devono essere conferiti in discarica.

Infatti, anche i metodi alternativi di smaltimento, come il compostaggio e la termovalorizzazione, non risolvono tale problema poiché entrambi i sistemi creano residui che dovranno essere stoccati in discarica.

Le discariche pertanto, pur nell'ottica di una gestione integrata dei rifiuti, sono destinate ad essere utilizzate ancora a lungo.

La discarica può essere considerata un vero e proprio reattore biologico all'interno del quale si verificano reazioni tali da produrre una miscela gassosa (il biogas, costituito dal 55% in metano e dal 45% in biossido di carbonio) ed una miscela liquida (il percolato, costituito da un elevato carico di elementi che possono essere considerati nutrienti quali azoto e fosforo, ma anche da sali, idrocarburi e metalli pesanti).

Per quanto riguarda la gestione di una discarica, il problema principale consiste nel mettere in atto appropriati lavori di copertura e di impermeabilizzazione per impedire fughe di gas in atmosfera e nel sottosuolo e di percolato in falda. Quindi, per evitare dispersioni nel sottosuolo (con relativo rischio di esplosioni) e in atmosfera, il biogas viene raccolto mediante un'apposita rete di captazione costituita da una serie di pozzi verticali che, per permetterne la cattura, vengono

tenuti in leggera depressione. Da tali pozzi si dipartono a raggiera delle tubazioni fessurate, disposte orizzontalmente in modo da raggiungere tutto il corpo della discarica. Il biogas così raccolto non viene immesso tal quale in atmosfera data l'alta percentuale di CH<sub>4</sub> (gas ad elevato potere serra) ma, dato il suo elevato potere calorifero, viene inviato ad un impianto di cogenerazione o ad una torcia di combustione.

Il percolato viene invece raccolto attraverso un sistema di drenaggio molto permeabile, disposto sopra la base impermeabile della discarica, in cui sono inseriti condotti diretti verso un pozzo di raccolta. Da qui, con una pompa, viene convogliato in una vasca di decantazione e quindi inviato per il trattamento ad un impianto di depurazione, che può essere interno od esterno al corpo discarica.

Negli ultimi anni si è sviluppato l'interesse verso la realizzazione di impianti di stabilizzazione del percolato *in situ*. La stabilizzazione *in situ* comporta l'annullamento dei rischi dovuti al trasporto e la possibilità, ad esempio, di riuso del percolato trattato all'interno dell'impianto di stoccaggio. Ciò consente di:

- fertirrigare la vegetazione sovrastante la discarica dato il contenuto di elementi nutritivi (azoto e fosforo) presenti nel percolato;
- ridurre le emissioni di CH<sub>4</sub> dal suolo in quanto la buona crescita delle piante promuove un ambiente idoneo allo sviluppo delle popolazioni microbiche che ossidano il metano (Maurice et al., 1998);

Inoltre il percolato stabilizzato può essere utilizzato per la fertirrigazione di colture di salice destinate alla produzione di energia da biomassa ([www.leachate.co.uk](http://www.leachate.co.uk); Maurice et al., 1998).

Questi possibili impieghi determinano da un lato l'eliminazione del "problema" percolato e, dall'altro, un risparmio di risorsa idrica che può così essere utilizzata per altri scopi.

L'acqua infatti è stata considerata fino alla fine dello scorso millennio una risorsa inesauribile, ma gli elevati consumi, dovuti all'aumento della domanda connessa alla crescita della popolazione mondiale, incidono negativamente sulla capacità di ricarica del sistema. A ciò si deve aggiungere che il patrimonio

di risorsa idrica si va giorno per giorno assottigliando sia per i mutamenti climatici, in termini di diminuzione delle precipitazioni piovose e aumento annuale della temperatura, che per la generale inefficienza del sistema di trasporto e di utilizzo di tale risorsa.

Al fine di poter riutilizzare il percolato stabilizzato in fertirrigazione è opportuno conoscere:

- i meccanismi di formazione del percolato;
- le caratteristiche del percolato;
- la migliore tecnologia di stabilizzazione;
- gli effetti che può avere sulla componente vegetale;
- gli effetti chimico-nutrizionali, biochimici e agronomici sul terreno.

Il percolato studiato nella presente tesi possiede concentrazioni d'inquinanti inferiori a quelle che normalmente si riscontrano nel percolato derivante da discarica RSU, in quanto proveniente dallo stoccaggio degli scarti di raffinazione del compost, i quali sono costituiti da una moderata presenza di materiale organico degradabile (20-30%).

# **1 IL PERCOLATO DA DISCARICA**

Ad oggi le moderne discariche sono progettate in modo da minimizzare gli impatti sull'ambiente circostante, tuttavia la produzione di percolato rimane un'inevitabile conseguenza dell'esistenza di tale deposito di rifiuti.

Il D.Lgs. n. 36/2003, relativo alla gestione delle discariche, fornisce (art. 2 lettera m) la più recente definizione di percolato, quale

*“liquido che si origina prevalentemente dall'infiltrazione di acque nella massa dei rifiuti o dalla decomposizione degli stessi”.*

Tale miscela liquida infatti si origina per mezzo delle reazioni chimiche, fisiche e biologiche, che s'instaurano all'interno del corpo discarica in funzione della composizione dei rifiuti e del regime idrico della discarica stessa.

Le caratteristiche quantitative del percolato sono quindi determinate da fattori esterni quali l'apporto idrico (meteorico, superficiale e sotterraneo), da fattori interni come l'umidità iniziale (del suolo e dei rifiuti), la biodegradazione dei rifiuti e da fattori progettuali come l'impermeabilizzazione e la copertura finale; mentre le caratteristiche qualitative scaturiscono dalla composizione dei rifiuti, ovvero dalla componente organica biodegradabile e dal contenuto di ione ammonio e di metalli (Alibardi, 2004–2005).

Per limitare i fattori esterni che concorrono alla formazione del percolato e quindi prevenire potenziali impatti sull'ambiente circostante, è necessario impermeabilizzare il corpo discarica.

I fattori che portano alla formazione del percolato possono essere quindi schematizzati come in Figura 1.1.

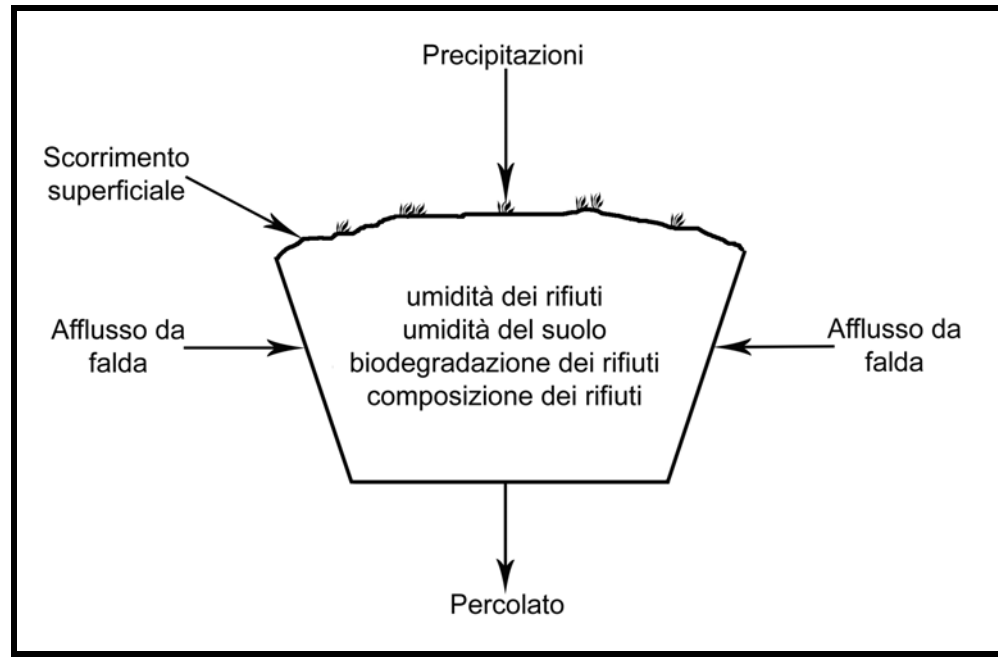


Figura 1.1: Schema dei fattori che concorrono alla produzione di percolato.

## 1.1 Formazione e composizione del percolato

Il trasferimento di massa dai rifiuti al percolato può dipendere da tre tipi di meccanismi:

- Idrolisi e Degradazione Biologica;
- Lisciviazione di Materia;
- Solubilizzazione di Sali.

La composizione dei rifiuti e le reazioni biologiche e chimico-fisiche che s'innescano nel corpo discarica fanno sì che le caratteristiche qualitative e quantitative del percolato varino fortemente nel tempo.

Le reazioni che avvengono nel corpo discarica sono di tipo aerobico ed anaerobico. In particolare il processo anaerobico è costituito da due fasi:

- fase acida (a sua volta suddivisa in fase acetogenica e fase acidogenica);
- fase metanigena.

Di seguito si descrivono i vari step del processo di degradazione dei rifiuti che portano alla produzione di percolato.

***Degradazione aerobica:***

In questa fase i carboidrati sono convertiti a CO<sub>2</sub> ed acqua, in particolare la cellulosa viene degradata a glucosio e a sua volta a CO<sub>2</sub> ed acqua, i grassi sono idrolizzati ad acidi grassi e glicerolo e le proteine vengono degradate ad amminoacidi e successivamente a CO<sub>2</sub>, acqua, nitrati e solfati.

Durante questa fase non vi è sostanziale produzione di percolato in quanto la sua durata, essendo funzione diretta della disponibilità di ossigeno, è breve.

Lo sviluppo di CO<sub>2</sub>, unitamente al consumo di O<sub>2</sub>, comporta un aumento della pressione parziale della CO<sub>2</sub> stessa, che ha come conseguenza l'abbassamento del pH della fase acquosa.

***Degradazione anaerobica: fase acidogenica***

Dopo che tutto l'ossigeno intrappolato nei vuoti interstiziali viene consumato, prende avvio la fase di degradazione anaerobica ad opera di batteri anaerobici.

Nella fase iniziale di degradazione anaerobica, vi è la formazione fermentativa di acidi grassi volatili e la produzione di CO<sub>2</sub>, con conseguente diminuzione del pH. Si hanno elevate concentrazioni di ioni inorganici (Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>) per la lisciviazione di materiale facilmente solubile. Inoltre si verifica la riduzione dei solfati a solfuri metallici di ferro, manganese o altri metalli pesanti, solubilizzati nel corso della fermentazione acida.

Le caratteristiche del percolato in questa fase sono (Irene M. C. Lo, 1996):

- alti valori di BOD<sub>5</sub> (>10.000 mg/l);
- alti rapporti BOD<sub>5</sub>/COD (>0,7);
- pH in campo acido (5–6);
- NH<sub>3</sub> (500–1000 mg/l) derivante dall'idrolisi e dalla fermentazione dei composti proteici;
- odore sgradevole.

### ***Degradazione anaerobica: fase acetogenica***

Nel corso di questa fase si ha la formazione di acidi volatili a catena corta e basso peso molecolare ad opera di batteri fermentativi anaerobi obbligati e facoltativi. Questi prodotti vengono ulteriormente degradati per mezzo dei batteri acetogenici ad acido acetico che costituisce il principale substrato dei batteri metanigeni.

Si ha produzione di metano, diminuzione di idrogeno e anidride carbonica e aumento del pH.

L'aumento del pH, porta ad una diminuzione della solubilità dei metalli e del calcio. L'ammoniaca viene lisciviata poiché non viene convertita in ambiente anaerobico.

Il percolato durante questa fase presenta:

- valori di BOD<sub>5</sub> inferiori alla fase acidogenica;
- rapporto BOD<sub>5</sub>/COD inferiore rispetto alla fase acidogenica (0,5–0,3);
- aumento del pH.

### ***Degradazione anaerobica: fase metanigena***

Nella fase metanigena si ha una lenta crescita dei batteri metanigeni, poiché sono sensibili a determinati fattori ambientali come la temperatura, il pH e il potenziale redox. I batteri metanigeni possono essere divisi in idrogenofili, i quali trasformano l'idrogeno e l'anidride carbonica in metano, e in acetofili, i quali convertono l'acido acetico in metano e biossido di carbonio; gli acetofili sono responsabili della produzione del 70% di metano.

Le caratteristiche del percolato sono:

- pH attorno alla neutralità;
- basse concentrazioni di acidi volatili e di solidi disciolti che si traduce in bassi valori di BOD<sub>5</sub> e bassi valori di BOD<sub>5</sub>/COD (<0,2);
- continuo rilascio di ammoniaca a causa delle condizioni anaerobiche.

In Tabella 1.1 come esempio si riportano le caratteristiche del percolato nelle due principali fasi di degradazione anaerobica.



Parametri (mg/l)	FASE ACIDA		FASE METANIGENA	
	<i>intervallo</i>	<i>media</i>	<i>intervallo</i>	<i>media</i>
pH	4,5–7	6	7,5–9	8
COD	6000–60000	22000	500–4500	3000
BOD <sub>5</sub>	4000–40000	13000	20–550	180
TOC	1500–25000	7000	200–5000	1300
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	30–3000	750	30–3000	750
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	0–25	0,5	0–25	0,5
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	0,1–50	3	0,1–50	0,1
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	70–1750	500	10–420	80
Cl <sup>-</sup>	100–5000	2100	100–5000	2.100
Na <sup>+</sup>	50–4000	1350	50–4000	1350
K <sup>+</sup>	10–2500	1100	10–2500	1100
Mg <sup>2+</sup>	50–1150	470	40–350	180
Ca <sup>2+</sup>	10–2500	1200	20–600	60
P tot	0,1–30	6	0,1–30	6
Cr	0,03–1,6	0,3	0,03–1,6	0,3
Fe	20–2100	780	3–280	15
Ni	0,02–2,05	0,2	0,02–2,05	0,2
Cu	0,004–1,4	0,08	0,004–1,4	0,08
Zn	0,1–120	5	0,03–4	0,6
As	0,005–1,6	0,16	0,005–1,6	0,16
Cd	0,0005–0,14	0,006	0,0005–0,14	0,006

Tabella 1.1: Confronto tra valori che tipicamente si riscontrano nelle fasi acida e metanigena del processo di formazione del percolato (Ehrig, 1990).

## 1.2 Trattamento del percolato

Il percolato prodotto in discarica tende a raccogliersi in sacche tra i diversi livelli di rifiuti stoccati e, in assenza di ulteriori interventi, a fuoriuscire dagli argini o a accumularsi sul fondo. Come già detto nell'introduzione, per ovviare a questo problema le discariche sono dotate di un sistema di drenaggio e di raccolta del percolato. I condotti di raccolta sono inseriti in uno strato drenante molto permeabile, disposto sopra la base impermeabile e diretti verso un pozzo di raccolta. Dal pozzetto di raccolta, il percolato viene prelevato mediante una

pompa e convogliato in una vasca di decantazione, dalla quale viene inviato per il trattamento ad un impianto di depurazione, che può essere interno od esterno alla discarica.

Le tecnologie di trattamento possono essere classificate in:

- metodi biologici;
- metodi chimico-fisici.

I processi di trattamento attualmente utilizzati spesso richiedono tecniche combinate o a più stadi (Wiszniewski et al., 2006).

### **1.2.1 Metodi biologici**

Questi metodi consistono nel mantenere l'ambiente favorevole per la crescita dei microrganismi coinvolti nei processi di degradazione.

Tali microrganismi convertono in gas, o assimilano nel tessuto cellulare, la sostanza organica disciolta e gli elementi inorganici così come l'azoto, il fosforo, il potassio, lo zolfo, il calcio e il magnesio.

Molti processi di trattamento biologico sono mediati da popolazioni biologiche miste atte a rimuovere specifici inquinanti. Di seguito si descrivono alcuni metodi biologici in uso.

#### ***Rotating Biological Contactors***

Questo è un esempio di filtro biologico (attached growth). E' costituito da dischi di plastica circolari montati centralmente su un asse orizzontale. Questi dischi, sommersi per il 40% in una vasca contenente percolato, vengono ruotati lentamente da un dispositivo meccanico o ad aria compressa. I microrganismi dall'acqua di rifiuto aderiscono ai dischi di plastica e, entro 1-4 settimane dall'avvio, formano un biofilm di 1-2 mm di spessore. Quando il disco ruota fuori dall'acqua, il biofilm si trova esposto all'aria e viene ossigenato mantenendo così le condizioni aerobiche necessarie per la degradazione aerobica ad opera dei microrganismi.



processo è pari al 10–25% per percolato di nuova formazione e pari al 50–60% per percolato maturo.

Idrossido di sodio e calce vengono utilizzati per precipitare i metalli pesanti e per controllare il pH durante il processo di coagulazione con i sali di ferro e di alluminio.

### ***Adsorption***

L'adsorbente più usato è il carbone attivo granulare o polverizzato. Questo metodo consente la rimozione del 50–60% sia di COD che di ammoniaca.

Inoltre consente la rimozione di metalli pesanti, PCB, etc.

Altri materiali, come l'illite, la zeolite, la kaolinite e la vermiculite, possono essere usati come adsorbenti in quanto danno risultati simili al carbone attivo.

### ***Membrane Process***

Questo sistema consiste nel separare due soluzioni aventi differenti concentrazioni per mezzo di una membrana semipermeabile. Sulla soluzione a maggior concentrazione viene esercitata una pressione tale da forzare il flusso d'acqua nella direzione della soluzione meno inquinata. Le moderne membrane hanno un'efficienza di rimozione dei contaminanti organici ed inorganici pari al 98–99%. Uno dei maggiori svantaggi di questo processo è rappresentato dall'occlusione dei pori della membrana dovuta al deposito di sostanze organiche, inorganiche e microbiologiche, inconveniente che può essere ovviato attraverso un sistema di pre-filtrazione e coagulazione.

### ***Chemical oxidation, AOP processes***

L'ossidazione chimica viene utilizzata per trattare acque reflue che contengono composti organici solubili, sostanze non biodegradabili e /o tossiche.

L'utilizzo di ossidanti come cloro, ozono, permanganato di potassio consentono una rimozione del COD del percolato da discarica pari al 20–50%.

I principali processi si basano sulla reazione diretta dell'ozono con i contaminanti o attraverso la formazione di radicali idrossili. Il radicale idrossile è

un ossidante non specifico in grado di ossidare un gran numero di molecole recalcitranti.

L'advanced oxidation processes (AOP) sono stati proposti negli ultimi anni come metodi alternativi per la mineralizzazione dei composti organici recalcitranti presenti nel percolato.

Questi processi includono:

- ozonizzazione a pH > 8,5;
- $O_3 + H_2O_2$ ;
- $O_3 + UV$ ;
- $H_2O_2 + UV$ ;
- $O_3 + H_2O_2 + UV$ ;

## **2 LE PROPRIETA' NUTRITIVE DEL PERCOLATO**

## 2.1 Il percolato e la fertirrigazione

Il percolato da discarica è una miscela liquida complessa ed eterogenea che non contiene soltanto composti inquinanti, ma anche molti elementi necessari per il naturale sviluppo delle piante, quali:

- acqua;
- azoto, fosforo, potassio, calcio, magnesio e zolfo (macronutrienti);
- ferro, rame e zinco (micronutrienti). Il ferro, in particolare, è necessario in quantità intermedie fra quelle dei macro e dei microelementi (Mauseth, 2000).

Pertanto, tale miscela liquida, grazie al suo contenuto di sostanze nutritive in grado di supportare il metabolismo microbico e la crescita vegetale, se opportunamente stabilizzata, può essere utilizzata in fertirrigazione, dove per fertirrigazione si intende proprio l'abbinamento di fertilizzanti all'acqua di irrigazione per soddisfare le esigenze vitali delle piante.

Ovviamente occorre tener in considerazione l'elevato contenuto di sali e la possibile presenza di microinquinanti organici ed inorganici, per cui l'uso di tale acqua di rifiuto deve essere limitato e localizzato in zone utili affinché i nutrienti vengano assorbiti dai vegetali e gli elementi tossici neutralizzati dal terreno (Masciandaro et al., 1995–96).

A tal proposito sono stati svolti studi (Hernandez et al., 1998) per capire la risposta del suolo e di quattro specie erbacee (*Trifolium Glomeratum L.*, *Trifolium Tomentosum L.*, *Hordeum Marium L.*, *Bromus Hordaceus L.*) all'irrigazione con percolato (percolato A e percolato B derivanti da discarica RSU e percolato C proveniente da discarica di rifiuti sanitari) le cui caratteristiche sono riportate in Tabella 2.1. Questi studi mostrano un aumento della crescita delle piante probabilmente legata ad un aumento di disponibilità di nutrienti come  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , P disponibile,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (Tabella 2.1).

Parametri	Percolato A	Percolato B	Percolato C
pH	8,3	8,0	9,1
Conducibilità ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	4480	16060	29960
COD (mg/l)	120	176	1140
$\text{Cl}^-$ (mg/l)	983	1928	4402
$\text{SO}_4^{2-}$ (mg/l)	315	8924	149
$\text{NO}_3^-$ (mg/l)	10	82	64
$\text{PO}_4^{2-}$ (mg/l)	0	0	0
$\text{Ca}^{2+}$ (mg/l)	215	780	39
$\text{Mg}^{2+}$ (mg/l)	60	2040	755
$\text{K}^+$ (mg/l)	82	70	2350
$\text{Na}^+$ (mg/l)	530	2075	3825
$\text{NH}_4^+$ (mg/l)	168	99,4	3100
Fe (mg/l)	< 0,00	0,10	3,20
Cu (mg/l)	< 0,00	< 0,00	< 0,00
Zn (mg/l)	0,08	0,10	0,22
B (mg/l)	0,93	1,96	6,25
Mn (mg/l)	5,30	1,50	2,10

Tabella 2.1: Analisi chimiche dei diversi tipi di percolato (Hernandez et al., 1998).

Parametri	Suolo trattato con acqua deionizzata	Suolo trattato con percolato A	Suolo trattato con percolato B	Suolo trattato con percolato C
pH	7,7 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,1	7,5 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,1
Conducibilità ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	1882,5 $\pm$ 151,6	6225,0 $\pm$ 311,9	12500,0 $\pm$ 294,4	251125,0 $\pm$ 976,15
Sostanza organica (%)	5,1 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,1	4,7 $\pm$ 0,1
N totale (%)	0,17 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,06
$\text{NH}_4^+$ (mg/100g)	1,1 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,1	10,6 $\pm$ 1,6
P disponibile (mg/100g)	17 $\pm$ 0,5	17,5 $\pm$ 0,3	19,4 $\pm$ 0,8	20,6 $\pm$ 0,5
$\text{Cl}^-$ (mg/100g)	24,0 $\pm$ 3,1	94,5 $\pm$ 8,4	175,5 $\pm$ 3,2	341,8 $\pm$ 42,5
$\text{SO}_4^{2-}$ (mg/100g)	18,0 $\pm$ 1,5	30,8 $\pm$ 1,3	423,0 $\pm$ 13,9	16,8 $\pm$ 0,8
$\text{NO}_3^-$ (mg/100g)	29,0 $\pm$ 6,3	91,3 $\pm$ 6,3	60,0 $\pm$ 5,6	556,5 $\pm$ 74,4
$\text{Ca}^{2+}$ (mg/100g)	541,3 $\pm$ 4,3	552,5 $\pm$ 4,3	582,5 $\pm$ 4,8	562,5 $\pm$ 11,3
$\text{Mg}^{2+}$ (mg/100g)	94,6 $\pm$ 1,1	90,0 $\pm$ 3,8	213,0 $\pm$ 2,4	126,8 $\pm$ 2,8
$\text{K}^+$ (mg/100g)	49,5 $\pm$ 1,9	57,0 $\pm$ 1,6	53,0 $\pm$ 0,4	233,8 $\pm$ 9,7
$\text{Na}^+$ (mg/100g)	11,5 $\pm$ 1,3	52,5 $\pm$ 1,4	182,5 $\pm$ 3,2	275,0 $\pm$ 16,6

Figura 2.1: Analisi chimiche del suolo trattato con acqua deionizzata e tre tipi diversi di percolato (Hernandez et al., 1998).



Inoltre tali studi evidenziano come l'irrigazione con percolato può essere un metodo per trattare e per purificare tale miscela liquida.

Il percolato, come già riportato nell'introduzione, può quindi essere utilizzato per fertirrigare:

- colture di salice destinate alla produzione di energia da biomassa con conseguente risparmio di energia non rinnovabile ([www.leachate.co.uk](http://www.leachate.co.uk); Maurice et al., 1998);
- la vegetazione sovrastante il terreno di copertura della discarica.

La possibilità di irrigare la vegetazione presente sul corpo discarica consente, oltre l'apporto nutritivo necessario per la crescita della stessa, anche la possibilità di ridurre l'emissioni di metano diffuse dal suolo, in quanto la buona crescita delle piante determina un ambiente favorevole per lo sviluppo di popolazioni microbiche deputate all'ossidazione del metano (Maurice et al., 1998).

Inoltre, l'irrigazione con percolato, dato il suo pH alcalino, può diminuire l'acidità di un suolo migliorando di conseguenza la qualità del suolo stesso e la disponibilità di fosforo per le piante (Jones 2005).

L'utilizzo di questa miscela liquida nella pratica irrigua può quindi costituire una strategia promettente dal punto vista ecologico ed agronomico in quanto:

- permette di recuperare i nutrienti minerali contenuti nel percolato;
- favorisce il risparmio della risorsa idrica, che può essere quindi destinata ad uso umano;
- assicura al terreno un apporto di elementi nutritivi;
- abbatte gli onerosi costi di depurazione "terziaria" (abbattimento di azoto e fosforo) ;
- consente inoltre di eliminare i costi dei fertilizzanti chimici.

## **2.2 Vantaggi della fertirrigazione**

I vantaggi della fertirrigazione riguardano gli aspetti relativi sia alla distribuzione dei fertilizzanti che alla nutrizione delle piante.

La fertirrigazione, infatti, è in grado di apportare un quantitativo di elementi nutritivi in modo uniforme e continuo, grazie all'acqua che per infiltrazione raggiunge le radici.

Ciò consente di apportare gli elementi di volta in volta più necessari alla pianta, a seconda del suo stadio vegetativo, nei quantitativi più prossimi alle sue reali esigenze, senza perdite di prodotto per mancato utilizzo che andrebbero a contaminare la falda acquifera (Bracco, 2005).

### **3 NORMATIVA**

La legge che attualmente disciplina il risparmio idrico ed il riutilizzo delle acque reflue è il **D. Lgs. 3 aprile 2006, n.152**, *“Norme in materia ambientale”*, che stabilisce i criteri per il riutilizzo delle acque reflue domestiche, urbane ed industriali, regolamentando le destinazioni d’uso e i requisiti di qualità per favorire il risparmio idrico e la tutela qualitativa e quantitativa delle risorse idriche.

Il **D.M. 2 maggio 2006** recante *“Norme tecniche per il riutilizzo delle acque reflue, ai sensi dell’articolo 99, comma 1, del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152”*, definisce (art. 3) le destinazioni d’uso ammissibili per il recupero delle acque reflue e stabilisce (art. 4) che le acque reflue recuperate destinate al riutilizzo irriguo devono possedere all’uscita dell’impianto di recupero requisiti di qualità chimico–fisici e microbiologici almeno pari a quelli riportati nell’allegato (Tabella 3.1).

Inoltre stabilisce che le regioni hanno il compito di definire per ogni zona del proprio territorio i parametri per i quali è obbligatorio effettuare il controllo ed il monitoraggio fissando i limiti dei medesimi nel rispetto del presente decreto.

Il percolato utilizzato nella sperimentazione presenta valori di COD, azoto totale e fosforo totale (Tabella 4.2) superiori ai limiti imposti dalla legge (Tabella 3.1), in quanto si è voluto studiare la risposta del terreno e della pianta ad un carico maggiore di tale elementi, in funzione di un suo possibile riutilizzo in discarica per fertirrigare la vegetazione sovrastante il corpo discarica stesso.

Parametri	Valore limite
pH	6–9,5
Conducibilità elettrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	3000
COD ( $\text{mgO}_2/\text{l}$ )	100
Fosforo totale ( $\text{mg}/\text{l}$ )	2
Azoto totale ( $\text{mg}/\text{l}$ )	15
Azoto ammoniacale ( $\text{mgNH}_4/\text{l}$ )	2
Co ( $\text{mg}/\text{l}$ )	0,05
Cr totale ( $\text{mg}/\text{l}$ )	0,1
Cu ( $\text{mg}/\text{l}$ )	1
Fe ( $\text{mg}/\text{l}$ )	2
Hg ( $\text{mg}/\text{l}$ )	0,001
Mn ( $\text{mg}/\text{l}$ )	0,2
Ni ( $\text{mg}/\text{l}$ )	0,2
Pb ( $\text{mg}/\text{l}$ )	0,1
Zn ( $\text{mg}/\text{l}$ )	0,5

Tabella 3.1: Valori limite (D.M. 2 maggio 2006) dei principali parametri analizzati nel percolato stabilizzato impiegato per la sperimentazione di fertirrigazione.

## **4 INQUADRAMENTO DEL LAVORO DI TESI**

#### **4.1 Scopo della tesi**

Con il presente lavoro ci si propone di studiare le proprietà nutritive del percolato da discarica, precedentemente trattato con un sistema biologico-aerobico, al fine di poterlo considerare come una potenziale risorsa e non come un'acqua di rifiuto. Perciò sono state eseguite delle prove di fertirrigazione in microcosmo di laboratorio costituito da un sistema suolo-pianta per studiare gli effetti chimico-nutrizionali, biochimici e agronomici del terreno e gli effetti sulla biomassa vegetale.

#### **4.2 Obiettivi**

Gli obiettivi di questo lavoro di tesi sono stati:

- valutare la risposta del terreno dopo trattamento con percolato precedentemente stabilizzato;
- valutare la risposta agronomica dopo fertirrigazione con percolato precedentemente stabilizzato.

#### **4.3 Studio preliminare sugli scarti di raffinazione del compost**

Presso i laboratori di ricerca dell'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi (ISE) del CNR–area di ricerca di Pisa, è stato condotto uno studio per prevedere il comportamento degli scarti di raffinazione del compost in discarica, fissarne gli aspetti quali–quantitativi da conferire e individuare gli accorgimenti geotecnici e tecnologici per limitare le emissioni in atmosfera e nel suolo.

Gli scarti di raffinazione del compost (SRC) sono residui derivanti dalla separazione (vagliatura) della frazione organica da quella inorganica presente nel rifiuto indifferenziato. Gli SRC hanno una composizione eterogenea comprendente legno, vetro, plastiche, carta, stoffe, etc. e bassa presenza di sostanza organica degradabile (20-30%). Le caratteristiche di tali scarti fanno sì che non possano essere collocati né fra i materiali inerti, né fra i composti organici composatabili e né fra i materiali idonei per un recupero energetico. Attualmente gli scarti di raffinazione del compost possono essere conferiti in discarica per rifiuti speciali dove le reazioni aerobiche ed anaerobiche che avvengono all'interno del corpo discarica stesso, possono degradare anche le strutture più recalcitranti come i materiali ligno-cellulosici, le plastiche, le stoffe colorate, i materiali metallici, etc.

Per capire il comportamento di questa tipologia di rifiuto, sono state simulate sezioni di discarica in quattro bioreattori (altezza: 200 cm; diametro interno: 15 cm), due dei quali allestiti con scarti di raffinazione derivanti da una prima vagliatura (SRC1) e gli altri due con scarti di raffinazione derivanti da una seconda vagliatura (SRC2). Lo spessore degli scarti di raffinazione è stato intervallato da strati di terreno (Figura 4.1):

- 10 cm (1Kg) di suolo ferroso e non calcareo (strato inferiore) biologicamente attivo e poroso capace di abbattere il flusso di biogas (30-40%);
- 10 cm (1kg) di suolo argilloso calcareo (strato superiore);

Inoltre due dei quattro bioreattori contenenti rispettivamente SRC1 e SRC2 sono stati compattati.

In tutte le colonne è stato simulato un evento di pioggia artificiale che ha permesso:

- migliore compattazione del materiale;
- formazione di percolato in tempi brevi considerando che la scarsa presenza di una frazione fermentescibile, tipica degli scarti di raffinazione del compost, non permetteva la produzione di lisciviato nei tempi previsti di due-tre mesi.



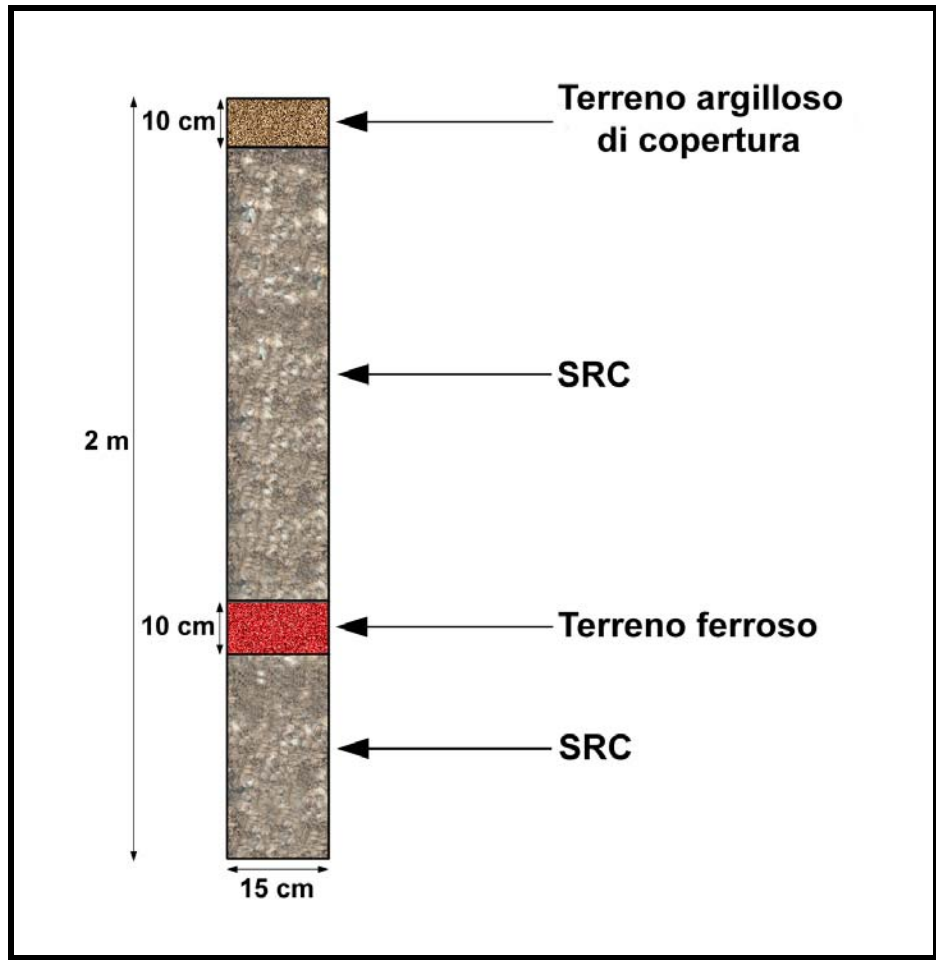


Figura 4.1: sezione di un bioreattore.

Di ciascuna colonna è stato analizzato il biogas ed il percolato prodotti.

I risultati delle analisi del percolato sono riportati in Tabella 4.1.

Il percolato prodotto, data la sua composizione chimica può essere collocato fra i materiali organo–minerali potenzialmente degradabili.

La presenza di elementi nutritivi (azoto e fosforo), soprattutto dopo 6 mesi (Tabella 4.1), permettono di considerare il percolato una miscela liquida da poter utilizzare come fertilizzante organo–minerale, visto anche il suo contenuto di substrato carbonioso.

Parametri	Percolato prodotto dalle colonne allestite con SCR1		Percolato prodotto dalle colonne allestite con SCR2	
	Dopo 1 mese	Dopo 6 mesi	Dopo 1 mese	Dopo 6 mesi
pH	6,50	8,36	6,10	8,36
NH <sub>3</sub> (mg/l)	644	2080	559	1645
Conducibilità elett. (mS/cm)	33,2	30,0	24,6	23,0
TOC (mg/l)	1815	3759	5542	3024
COD	14780	10023	12900	8070
Fosforo totale (mg/l)	n.r.	50	n.r.	50

Tabella 4.1: Caratteristiche del percolato prodotto dalle quattro colonne durante la maturazione degli scarti di raffinazione del compost derivanti dalla prima vagliatura e degli scarti di raffinazione del compost derivanti dalla seconda vagliatura.

## 4.4 Procedura sperimentale

### 4.4.1 Schema di lavoro

La sperimentazione è stata svolta presso i laboratori di ricerca dell'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi (ISE) del CNR–area di ricerca di Pisa, nel periodo compreso tra febbraio e settembre 2006.

Il programma di lavoro è stato suddiviso nelle seguenti due fasi:

1. stabilizzazione del percolato mediante un sistema biologico-aerobico, oggetto della tesi di Bianchi A. (2006) dal titolo “Studio di un processo di stabilizzazione del percolato da discarica: aspetti chimici, chimico-fisici e biologici”;
2. prove di fertirrigazione in microcosmo di laboratorio costituito da un sistema suolo-pianta.

### ***Stabilizzazione del percolato***

Il percolato utilizzato per le prove di fertirrigazione è stato ottenuto simulando eventi di pioggia artificiale sui quattro bioreattori allestiti per lo studio della bio–stabilità degli scarti di raffinazione del compost (Paragrafo 4.3). Il percolato è stato lasciato all'interno dei bioreattori in contatto con il rifiuto per un mese in modo da favorire la lisciviazione di carbonio, sostanze minerali, fosforo e metalli.

Il percolato così prodotto è stato prelevato, analizzato e stabilizzato. La stabilizzazione è stata effettuata mediante tre linee di trattamento:

- vasca di aerazione;
- filtro suolo-sabbioso;
- filtro suolo-pianta (costituito da suolo-sabbioso piantumato con *Phragmites Australis*);

Nello specifico il percolato proveniente dai bioreattori contenenti SRC1 e SRC2 compattati è stato inviato ad una vasca di aerazione, della capacità di 25 l, dove è stato sottoposto ad un'insufflazione forzata di aria alla portata di 0,1 Nm<sup>3</sup>/h per una media di 8 ore giornaliere, per un totale di 60 giorni. Tale percolato è

stato prelevato ed analizzato dopo 40 e 60 giorni d'insufflazione d'aria per poi essere utilizzato in fertirrigazione.

Mentre il percolato derivante dai bioreattori contenenti SRC1 e SRC2 non compattati (diluito 1:8 in modo da ottenere un COD pari a 500 mg/l) è stato inviato in parte al filtro suolo-sabbioso ed in parte al filtro suolo-pianta per subire un processo di depurazione. La *Phragmites Australis* è stata scelta poiché molto utilizzata nel campo della fitodepurazione (Kadlec, 1995). Il percolato in uscita, dopo essere stato in contatto con i filtri per 48 ore, è stato raccolto ed analizzato per poi essere utilizzato anch'esso in fertirrigazione.

### **Prove di fertirrigazione**

Per l'esperimento di fertirrigazione sono stati allestiti in laboratorio dei sistemi suolo-pianta (Figura 4.2) costituiti da vasi di dimensione 8,5 x 7,8 x 7,8 cm, riempiti con 250 g di terreno agricolo di S. Giuliano Terme e seminati con 0,3 g di *Agrostis Stolonifera*.



Figura 4.2: Allestimento della sperimentazione.

Le prove, condotte in triplo, sono state fertirrigate con:

- acqua potabile (Controllo);
- percolato proveniente dai bioreattori contenenti SRC1 e SRC2 compattati (percolato non stabilizzato) diluito 1:8 per avere un COD pari a 500 mg/l ( $T_0$ );
- percolato all'uscita del filtro suolo-sabbioso ( $T_{FS}$ );
- percolato all'uscita del filtro suolo-pianta ( $T_{FP}$ );
- percolato proveniente dalla vasca di aerazione dopo 40 giorni d'insufflazione d'aria diluito 1:20 per avere un COD pari a 500 mg/l ( $T_{40}$ );
- percolato proveniente dalla vasca di aerazione dopo 60 giorni d'insufflazione d'aria diluito 1:14 per avere un COD pari a 500 mg/l ( $T_{60}$ );

Tali vasi sono stati fertirrigati con una siringa una volta a settimana (Figura 4.3) con 52 ml di percolato (acqua potabile per il controllo) per portare la capacità di ritenzione idrica del suolo al 60%, per un periodo totale di un mese.

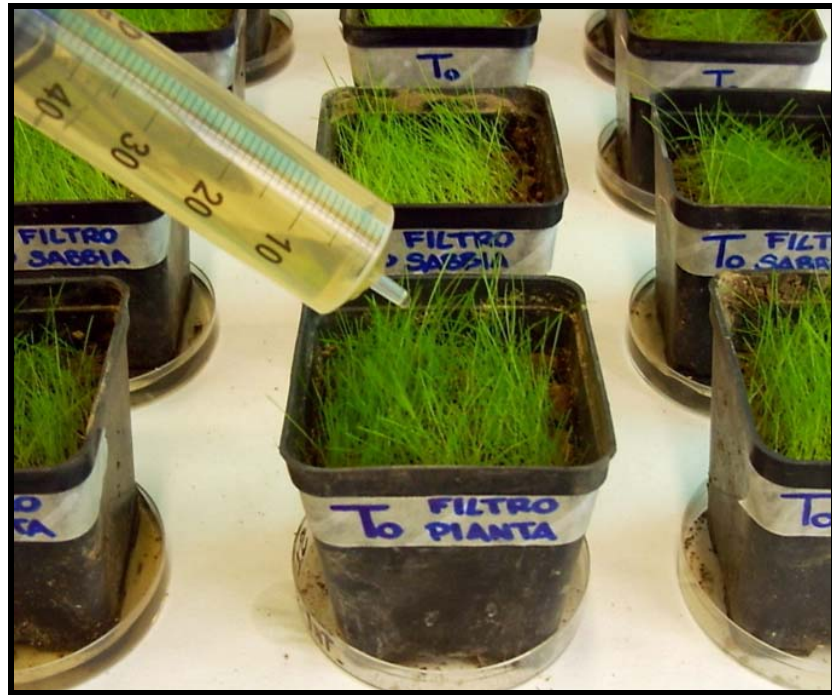


Figura 4.3: Trattamento di fertirrigazione a goccia.

Inoltre le piante sono state fatte crescere a 25°C (condizioni di laboratorio) e sono state esposte a luce naturale.

Lo schema sperimentale viene riassunto in Figura 4.4.

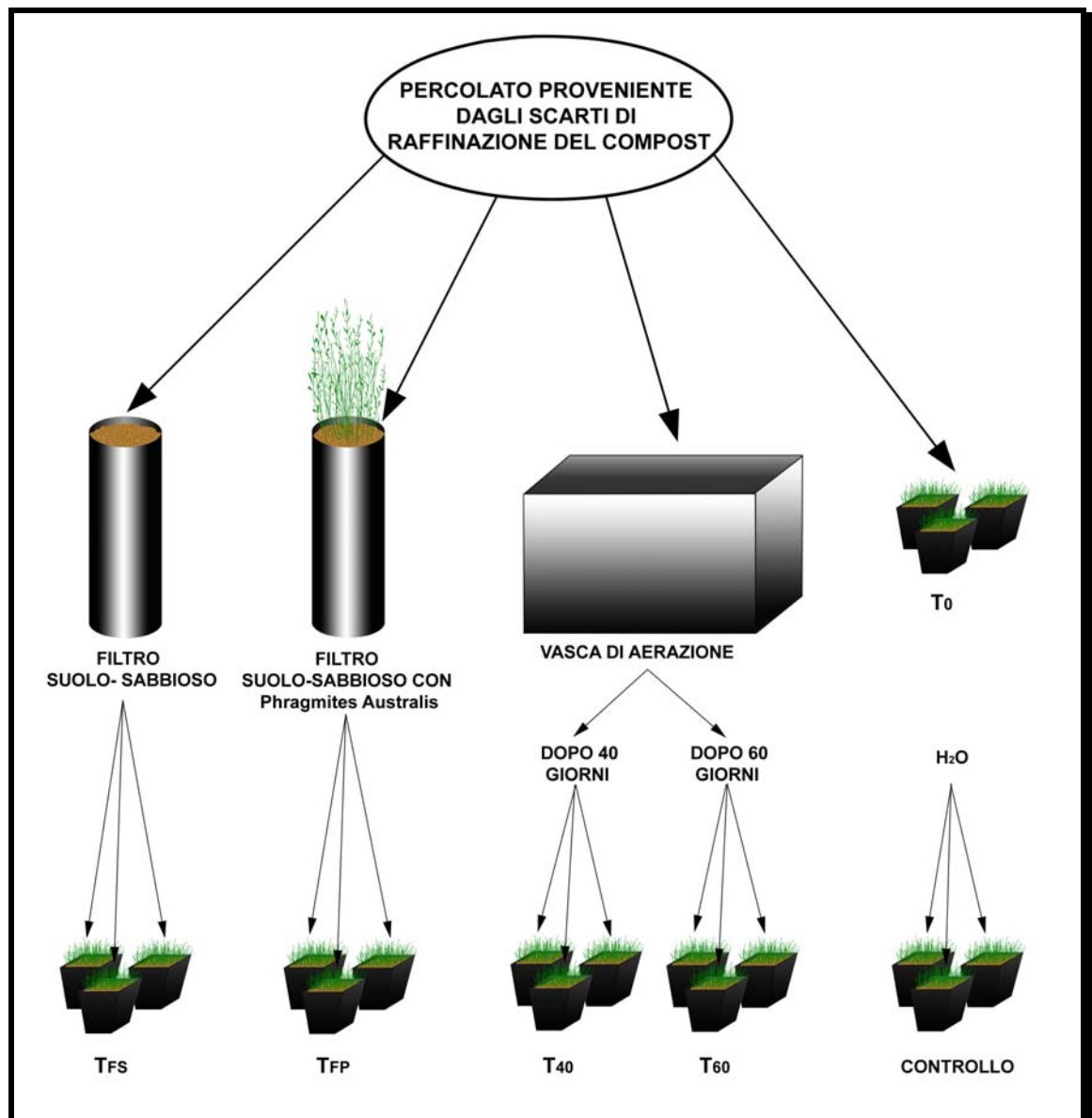


Figura 4.4: Schema sperimentale; legenda: **T<sub>0</sub>**: fertirrigazione con percolato non trattato; **T<sub>FS</sub>**: fertirrigazione con percolato trattato attraverso il filtro suolo-sabbioso; **T<sub>FP</sub>**: fertirrigazione con percolato trattato attraverso il filtro suolo-sabbioso piantumato con *Phragmites Australis*; **T<sub>40</sub>**: fertirrigazione con percolato dopo 40 giorni di aerazione; **T<sub>60</sub>**: fertirrigazione con percolato dopo 60 giorni di aerazione; **Controllo**: irrigazione con acqua potabile.

Alla fine del trattamento (Figura 4.5):

- le piante sono state raccolte dopodiché ne è stato determinato il peso fresco ed il peso secco dopo essiccamento in stufa a 60°C;
- il terreno è stato campionato, essiccato in laboratorio (50% in umidità), setacciato a 2 mm e trasferito in appositi contenitori per poi essere analizzato.



*Figura 4.5: Esperimento al suo culmine.*

#### 4.4.2 Caratteristiche del percolato utilizzato

Le principali caratteristiche dei cinque tipi di percolato utilizzati per le prove di fertirrigazione sono riassunte in (Tabella 4.2).

Parametri	T <sub>0</sub> (1:8)	T <sub>FS</sub>	T <sub>FP</sub>	T <sub>40</sub> (1:20)	T <sub>60</sub> (1:14)
T (°C)	24,0	29,2	24,8	23,5	24,0
pH	7,59	8,71	8,55	9,81	9,80
EC (mS/cm)	1,51	2,00	2,29	1,03	1,23
COD (mg O <sub>2</sub> /l)	518	163	343	537	563
C totale (µg/ml)	194	61,3	128	202	211
NH <sub>3</sub> (µg/ml)	93,6	0,221	0,190	0,441	0,093
N totale (µg/ml)	42,2	37,5	26,3	22,5	30,7
P totale (µg/ml)	4,6	5,8	6,1	4,06	7,44
Indice di germinazione	76,5	85,2	98,6	79,2	123
Ca (µg/ml)	23,12	-	-	15,9	-
Co (µg/ml)	< l.r.	-	-	< l.r.	-
Cr (µg/ml)	< l.r.	-	-	< l.r.	-
Cu (µg/ml)	0,125	-	-	0,10	-
Fe (µg/ml)	0,875	-	-	0,75	-
K (µg/ml)	220	-	-	81,5	-
Mg (µg/ml)	41,9	-	-	14,2	-
Mn (µg/ml)	< l.r.	-	-	0,05	-
Na (mg/l)	203,4	-	-	105	-
Ni (µg/ml)	< l.r.	-	-	< l.r.	-
Pb (µg/ml)	< l.r.	-	-	< l.r.	-
S (µg/ml)	26,7	-	-	12,1	-
Sr (µg/ml)	0,125	-	-	0,05	-
Ti (µg/ml)	0,012	-	-	0,01	-
Zn (µg/ml)	0,375	-	-	0,3	-
Hg (µg/ml)	0,008	-	-	0,003	-

Tabella 4.2: Principali caratteristiche del percolato utilizzato in fertirrigazione; T<sub>0</sub>: percolato non trattato; T<sub>FS</sub>: percolato trattato attraverso il filtro suolo-sabbioso; T<sub>FP</sub>: percolato trattato attraverso il filtro suolo-sabbioso piantumato con *Phragmites Australis*; T<sub>40</sub>: percolato dopo 40 giorni di aerazione; T<sub>60</sub>: percolato dopo 60 giorni di aerazione.

I metalli pesanti in questo tipo di percolato non costituiscono particolare elemento di attenzione, ad eccezione del mercurio, in quanto presenti in



concentrazioni estremamente basse (Bianchi, 2006). Interessante invece è la presenza di micro e macroelementi (N totale, P totale, Ca, K, Fe, P, Sr, Mg).

I valori nel loro insieme suggeriscono una possibile utilizzazione del percolato in agricoltura (Bianchi, 2006).

#### 4.4.3 Caratteristiche del terreno utilizzato

Il terreno utilizzato per le prove di fertirrigazione che, come detto, è stato prelevato da un appezzamento agricolo nei pressi di San Giuliano Terme (Pisa), presenta le caratteristiche riportate in (Tabella 4.3).

Parametri	San Giuliano Terme
Sabbia (%)	55,65
Limo (%)	33,5
Argilla (%)	10,85
pH	7,68
Conducibilità elettrica (mS/cm)	0,11
NH <sub>3</sub> (µg/ml)	0,513
C totale (µg/g <sub>ss</sub> )	20500
N totale (µg/g <sub>ss</sub> )	1047
C/N	19,6
Carbonio estraibile totale (µg/g <sub>ss</sub> )	792
Carbonio fulvico (µg/g <sub>ss</sub> )	622
Carbonio umico (µg/g <sub>ss</sub> )	170
Carbonio fulvico/Carbonio umico	3,66
Carbonio idrosolubile (µg/g <sub>ss</sub> )	3,82
Deidrogenasi (mgINTF/g*h)	3,04
β-Glucosidasi totale (µgPNF/g <sub>ss</sub> *h)	239
Ureasi totale (µgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /g <sub>ss</sub> *h)	32,6
Proteasi totale (µgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /g <sub>ss</sub> *h)	36,3
Fosfatasi totale (µgPNF/g <sub>ss</sub> *h)	555
β-glucosidasi extracellulare (µgPNF/g <sub>ss</sub> *h)	19,5
Ureasi extracellulare (µgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /g <sub>ss</sub> *h)	6,84
Proteasi extracellulare (µgNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /g <sub>ss</sub> *h)	14,1
Fosfatasi extracellulare (µgPNF/g <sub>ss</sub> *h)	11,0

Tabella 4.3: Caratteristiche del terreno utilizzato per la sperimentazione.

#### **4.4.4 Scelta della specie vegetale**

La specie erbacea utilizzata per l'esperimento è stata l'*Agrostis Stolonifera*, poiché presenta una tolleranza alla salinità medio alta (6,5–10 mS/cm).

## **5 METODOLOGIE ANALITICHE**

Nell'ambito della presente tesi sono state eseguite analisi chimiche e biochimiche.

Le analisi chimiche comprendono:

- pH;
- conducibilità elettrica;
- ammoniaca;
- azoto totale;
- carbonio totale;
- carbonio idrosolubile;
- carbonio estraibile totale;
- acidi umici;
- acidi fulvici;
- fosforo totale;
- fosforo assimilabile;
- anioni.

Le analisi biochimiche includono:

- deidrogenasi;
- $\beta$ -glucosidasi (totale ed extracellulare);
- proteasi (totale ed extracellulare);
- ureasi (totale ed extracellulare);
- fosfatasi (totale ed extracellulare).

Le analisi chimiche sono state condotte sul terreno tal quale, sugli estratti acquosi e sugli estratti in pirofosfato alcalino, mentre le analisi biochimiche sono state effettuate sul terreno tal quale e sull'estratto in pirofosfato neutro.

## 5.1 Strumentazione impiegata

### 5.1.1 Strumentazione di base

#### ***Elettrodo a vetro per la determinazione del pH***

Le misure di pH sono state eseguite tramite un Titroprocessor 672 della Methron (Switzerland), con scala di 0,01 unità, dotato di un elettrodo a vetro combinato Methron AG CH-9100 Herisau. Prima delle misure l'apparecchio è stato tarato con due soluzioni tampone rispettivamente a pH 4 e 7.

#### ***Elettrodo ion-selettivo per la determinazione dell'ammoniaca***

Le letture della concentrazione dello ione ammonio sono state effettuate mediante l'elettrodo selettivo per  $\text{NH}_3$ , Orion mod. 9512, collegato ad un potenziometro (microprocessor ionalyzer - 901 ORION RES., Cambridge, Mass., USA).

Tale elettrodo permette di misurare, in maniera semplice ed accurata, la concentrazione dello ione ammonio disciolto in una soluzione acquosa. Si tratta di un elettrodo combinato, costituito da un elettrodo di riferimento e uno di misura. L'elettrodo è caratterizzato dalla presenza, sulla sua estremità inferiore, di una membrana idrofobica, permeabile all' $\text{NH}_3$  gassosa. L'aggiunta alla soluzione campione di pochi ml di NaOH 10 M (quanto basta per portare il pH a valori basici), consente la liberazione di  $\text{NH}_3$  allo stato di gas che, diffondendo attraverso la membrana, nella soluzione di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  presente all'interno dell'elettrodo, determina una variazione di forza elettromotrice registrata dal potenziometro. La concentrazione dell'azoto ammoniacale viene stimata comparando la forza elettromotrice della soluzione in esame con quella di soluzioni standard a concentrazione nota nel range 0,2-10  $\mu\text{g/ml}$ .

#### ***Conducimetro***

Conducimetro tascabile modello comnet 2 (Hanna Instruments Italia).

### ***Cella dialisi***

AMICON modello 202, dotata di membrane da ultrafiltrazione con taglio molecolare di 10000 Dalton.

### ***Spettrofotometro***

Le misure spettrofotometriche UV-Vis sono state eseguite con uno spettrofotometro monoraggio mod. lambda 11 (Perkin Elmer, Germania) equipaggiato con una lampada a deuterio del voltaggio di 230V. Tutte le letture sono state eseguite nel campo del visibile impiegando celle in PMMA e celle di quarzo.

## **5.1.2 Strumentazione specialistica**

### ***Cromatografo ionico***

La determinazione degli anioni è stata eseguita con un cromatografo ionico, serie 2000 i Dionex (DIONEX, Sunnyvale CA, USA), equipaggiato con un rivelatore a conducibilità. La separazione degli anioni è stata effettuata mediante una colonna AS4A-SC (4×250 mm) dotata di precolonna (4×50mm). Per la soppressione della conducibilità del fondo è stato impiegato un soppressore a membrana mod. AMMS-II (DIONEX). Come eluente è stata impiegata una miscela di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,8 mM) / NaHCO<sub>3</sub> (1,7 mM), mentre come rigenerante una soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 mN. L'eluizione è stata condotta al flusso di 1ml/min.

### ***Analizzatore elementare di azoto***

La determinazione dell'azoto totale è stata eseguita con un analizzatore elementare FP-528 PROTEIN/NITROGEN DETRMINATOR (Leco).

Il metodo si basa sulla completa ed istantanea ossidazione del campione per "flash combustion" (900°C) con conseguente conversione di tutte le sostanze organiche ed inorganiche in ossidi di azoto (NO<sub>x</sub>), che vengono raccolte ed infine ridotte ad azoto molecolare (N<sub>2</sub>). Tra i prodotti della combustione sono

presenti anche CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O che vengono catturati grazie alla presenza di due trappole specifiche. Tale apparecchio è stato calibrato con EDTA con concentrazioni di azoto pari a 9,57%. La quantità dell'azoto è stata rilevata da una cella a conducibilità termica.

### ***Analizzatore elementare di carbonio***

La misura del carbonio totale è stata eseguita utilizzando un analizzatore elementare, RC-412 MULTIPHASE CARBON (Leco). Il metodo è fondato sulla completa ed istantanea ossidazione del campione per "flash combustion" con conseguente conversione di tutte le sostanze organiche ed inorganiche (ad eccezione di qualche carburo simile a SiC) in CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O

Il campione è stato introdotto all'interno di una fornace impostata per passare da una temperatura di 300°C a 950°C. Con l'aumentare della temperatura si ha la combustione delle diverse forme del carbonio; per la parte organica il range di temperatura di ossidazione volatilizzazione è compreso fra i 300°C e i 650°C, mentre per la frazione inorganica tra i 650°C e i 950°C. La CO<sub>2</sub> prodotta viene trasportata tramite un flusso di ossigeno fino ad una cella IR, dove attraverso un sistema di spettrometria infrarossa lo strumento è in grado di determinare l'identità e la quantità delle molecole residenti all'interno della cella. L'apparecchio è stato calibrato con EDTA con concentrazioni di carbonio pari a 40,9%.

## **5.2 Preparazione del campione**

### **5.2.1 Preparazione degli estratti acquosi a 37°C**

Il campione e acqua deionizzata in rapporto 1:10 peso/volume sono stati posti in tubi di plastica da centrifuga e messi in agitazione in bagno termostatico (tipo Doubnoff) per un'ora a temperatura ambiente. Dopodiché gli estratti sono stati centrifugati per 15 minuti a 9000 rpm e filtrati con carta ultrarapida.

Su tali estratti sono state condotte le analisi del pH, della conducibilità elettrica e dell'ammoniaca.

### **5.2.2 Preparazione degli estratti acquosi a 60°C**

Il campione e acqua deionizzata in rapporto 1:10 peso/volume sono stati posti in tubi di plastica da centrifugati e messi in agitazione in bagno termostatico (tipo Doubnoff) per un'ora a 60°C. Dopodiché gli estratti sono stati centrifugati per 15 minuti a 9000 rpm, filtrati con carta ultrarapida e conservati in frigorifero a 4°C.

Tali estratti sono stati utilizzati per la determinazione del carbonio idrosolubile.

### **5.2.3 Preparazione degli estratti in pirofosfato alcalino**

Il campione e soluzione estraente di pirofosfato di sodio (0,1M, pH 11) in rapporto 1:10 peso/volume sono stati posti in tubi di plastica da centrifuga e messi in agitazione in bagno termostatico (tipo Doubnoff) a 60°C per 4 ore.

Gli estratti così preparati sono stati centrifugati a 9000 rpm per 15 minuti, filtrati su membrana batteriologica Millipore 0,45 µm e conservati in frigorifero a 4°C.

Il pirofosfato di sodio è in grado di provocare la completa dissociazione acida dei gruppi funzionali acidi delle sostanze umiche e di disperderle mediante l'azione deflocculante del sodio, di sottrarre all'equilibrio cationi bivalenti e trivalenti, distruggendo, a mezzo dell'azione chelante del pirofosfato, i ponti cationici con i costituenti minerali.

Sui seguenti estratti sono stati determinati il carbonio estraibile totale, umico e fulvico.

### **5.2.4 Preparazione degli estratti in pirofosfato neutro**

L'estratto è stato ottenuto mettendo campione e soluzione estraente di pirofosfato di sodio (0,1M, pH 7) in rapporto 1:10 peso/volume. Successivamente i tubi sono stati posti in agitazione in bagno termostatico (tipo Doubnoff) a 37°C per 24 ore. Terminata l'incubazione gli estratti sono stati



centrifugati a 9000 rpm per 15 minuti ed il sopranatante è stato filtrato su membrana batteriologica Millipore 0,45  $\mu\text{m}$ .

Al fine di eliminare i sali presenti nel campione (come il pirofosfato di sodio) che andrebbero ad influire negativamente sulla misura delle attività enzimatiche, tali estratti sono stati dializzati mediante l'impiego di una cella da ultrafiltrazione fornita di una membrana del taglio molecolare da 10000 Da. La cella da ultrafiltrazione è dotata di un sistema di agitazione costituito da una barretta magnetica collegata ad un'asta girevole e sospesa ad 1 mm circa sopra la membrana di esercizio in modo da non danneggiare la stessa. Con l'agitazione si impedisce la formazione di un gradiente di concentrazione del materiale in esame sopra la membrana, che potrebbe causare precipitati ed occlusione dei micropori. Tutto il processo di ultrafiltrazione viene eseguito sotto la pressione di un gas inerte quale azoto.

Prima di essere ultrafiltrato l'estratto necessita di una diluizione con acqua bidistillata fino ad ottenere un valore di conducibilità elettrica pari a 0,5 mS/cm.

Questo passaggio risulta necessario per diminuire la forza ionica ed impedire la formazione di molecole a forma sferocolloidale che nonostante un peso molecolare superiore a 10000 Dalton riuscirebbero a passare attraverso la membrana (Ceccanti B. et al., 1989).

## **5.3 Metodologie chimiche**

### **5.3.1 pH**

Le misure di pH sono state eseguite sugli estratti acquosi dei campioni.

### **5.3.2 Conducibilità elettrica**

La conducibilità elettrica è stata determinata sugli estratti acquosi dei campioni ed espressa in mS/cm.

### **5.3.3 Ammoniaca**

L'azoto ammoniacale è stato misurato su 10 ml di estratto acquoso dei campioni di terreno, mantenuti costantemente in agitazione tramite un agitatore magnetico, mediante l'elettrodo selettivo per l'ammoniaca.

La concentrazione dell'azoto ammoniacale è stata stimata comparando la forza elettromotrice della soluzione in esame con quella di soluzioni standard a concentrazione nota nel range 0,5-10 µg/ml.

I valori di ammoniaca sono stati espressi in µg/g<sub>SS</sub>.

### **5.3.4 Azoto totale**

L'azoto è stato determinato su 60-80 mg di campione di terreno setacciato molto fine, utilizzando un analizzatore elementare FP-528 PROTEIN/NITROGEN DETRMINATOR (Leco). La quantità dell'azoto è stata espressa in µg/g<sub>SS</sub>.

### **5.3.5 Carbonio Totale**

La determinazione del carbonio totale (frazione organica e frazione inorganica) è stata effettuata su 50-100 mg di terreno setacciato molto fine, attraverso

l'utilizzo di un analizzatore elementare, RC-412 MULTIPHASE CARBON (Leco). Il quantitativo di carbonio è stato espresso in  $\mu\text{g/g}_{\text{ss}}$ .

### 5.3.6 Carbonio idrosolubile

Il carbonio idrosolubile è stato determinato su 2 ml estratto acquoso a  $60^{\circ}\text{C}$  dei campioni di terreno a cui è stato aggiunto 1 ml di  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  2N e 2 ml di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrato.

Le prove, dopo essere state agitate mediante un agitatore meccanico, sono state riscaldate a  $150^{\circ}\text{C}$  per 2 ore. Una volta raffreddate tali soluzioni sono state lette allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 590 nm contro un bianco ottenuto nelle stesse condizioni sperimentali delle prove, ma in assenza di campione. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni, espresse in  $\mu\text{gC/g}_{\text{ss}}$ , riferite ad una retta standard ricavata da concentrazioni note di carbonio (come glucosio) trattato nelle stesse condizioni.

### 5.3.7 Carbonio estraibile totale

Il carbonio estraibile totale è stato determinato su 2 ml di estratto in pirofosfato alcalino dei campioni di terreno a cui è stato aggiunto 1 ml di  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  2N e 2 ml di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrato. Le sostanze umiche presenti in tali estratti vengono ossidate con potassio bicromato in presenza d'acido solforico; Il  $\text{Cr}^{3+}$  (di colore verde) ottenuto dalla riduzione del  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  viene determinato per via spettrofotometrica (Sims and Haby, 1971).

Le prove, dopo essere state agitate mediante un agitatore meccanico, sono state riscaldate a  $150^{\circ}\text{C}$  per 2 ore. Una volta raffreddate tali soluzioni sono state lette allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 590 nm contro un bianco ottenuto nelle stesse condizioni sperimentali delle prove ma in assenza di campione. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni, espresse in  $\mu\text{gC/g}_{\text{ss}}$ , riferite ad una retta standard ricavata da concentrazioni note di carbonio (come glucosio) trattato nelle stesse condizioni.

### 5.3.8 Acidi fulvici

La determinazione degli acidi fulvici è stata condotta sull'estratto in pirofosfato alcalino trattato con  $H_2SO_4$  concentrato fino al raggiungimento di pH pari a 2, valore al quale gli acidi umici precipitano mentre gli acidi fulvici rimangono in soluzione.

L'analisi è stata condotta su 2 ml di estratto a cui è stato aggiunto 1ml di  $K_2Cr_2O_7$  2N + 2 ml di  $H_2SO_4$  concentrato. Le prove, dopo essere state agitate mediante un agitatore meccanico, sono state riscaldate a  $150^\circ C$  per 2 ore. Una volta raffreddate tali soluzioni sono state lette allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 590 nm contro un bianco ottenuto nelle stesse condizioni sperimentali delle prove ma in assenza di campione. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni, espresse in  $\mu gC/gss$ , riferite ad una retta standard ricavata da concentrazioni note di carbonio (come glucosio) trattato nelle stesse condizioni.

### 5.3.9 Acidi umici

La determinazione degli acidi umici è stata effettuata per differenza tra il valore di carbonio estraibile totale e il valore di acidi fulvici. I valori sono stati espressi in  $\mu gC/gss$ .

### 5.3.10 Fosforo totale

La determinazione di questo elemento si basa sulla trasformazione di tutti i composti del fosforo, organici e inorganici, a ortofosfati mediante mineralizzazione con acidi concentrati.

Tutta la vetreria impiegata per l'analisi, compresa quella usata per preparare le soluzioni, è stata accuratamente lavata con  $HCl$  1:10 o  $HNO_3$  1:5 e successivamente sciacquata con acqua deionizzata.

Per ogni campione è stato pesato 0,5g di terreno secco in tubi da idrolisi da 50ml e sono stati aggiunti 5ml di  $HNO_3$ . Successivamente i tubi sono stati riscaldati ad una temperatura di  $140^\circ C$  per 2 ore ed una volta raffreddati è stato aggiunto 1 ml di acido perclorico. Dopodiché i campioni sono stati sottoposti ad

una seconda digestione a 180°C per circa 2 ore e ½ . Infine, una volta raffreddati, i campioni sono stati portati a volume (50 ml) con acqua bidistillata, agitati e lasciati decantare. Quindi è stato prelevato 1 ml di soluzione tal quale a cui è stata aggiunta una goccia della soluzione di p-nitrofenolo (0,25%) e goccia a goccia, NaOH 5M sufficiente a far virare al giallo il colore dell'indicatore.

Successivamente è stato aggiunto 1 ml di reattivo specifico per il fosforo<sup>1</sup> ed è stato portato ad un volume finale di 10 ml con acqua bidistillata. Dopo 10 minuti è stata effettuata la lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 720 nm contro un bianco che conteneva tutti i reagenti escluso il campione.

Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni, espresse in µg di P/gss , mediante una retta ottenuta con concentrazioni note di fosforo, trattato nello stesso modo dei campioni.

### 5.3.11 Fosforo assimilabile

Il metodo consiste nell'estrarre in una soluzione di acetato di ammonio e acido dietilentriamminopentacetico (DTPA) il fosforo assimilabile, inteso come la frazione di fosforo più disponibile per le piante.

A tal proposito è stato pesato 1g di terreno a cui sono stati aggiunti 10 ml di soluzione estraente. I campioni sono stati tenuti in agitazione per 2h a temperatura ambiente, dopodiché sono stati centrifugati a 3500 rpm e il surnatante è stato trasferito in provette di plastica da 10ml.

Di questo estratto ne è stato prelevato 1ml a cui è stata aggiunta una goccia della soluzione di p-nitrofenolo e, goccia a goccia, una quantità della soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5M fino a scomparsa del colore giallo dell'indicatore.

---

<sup>1</sup>Preparazione del reattivo:

Si aggiungono 1,5 g d'acido ascorbico a 100 ml della soluzione C.

Soluzione C: si mescolano le soluzioni A e B e vi si aggiungono 10 ml di potassio antimonio tartrato allo 0,5%, poi il tutto si porta a un volume di 100 ml con acqua distillata.

Soluzione A: 12,5 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 40 ml di H<sub>2</sub>O.

Soluzione B: 1 g di molibdato di ammonio in 30 ml di H<sub>2</sub>O e riscaldamento a 60°C.

Successivamente è stato aggiunto 1 ml di reattivo specifico per il fosforo ed è stato portato ad un volume finale di 10 ml con acqua bidistillata.

Dopo 10 minuti è stata effettuata la lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 720 nm contro un bianco che conteneva tutti i reagenti escluso il campione.

### **5.3.12 Anioni**

Gli anioni idrosolubili (cloruri, nitriti, nitrati, fosfati e solfati) sono stati determinati sugli estratti acquosi a 37°C dei campioni mediante cromatografia ionica. Le misure sono state espresse in  $\mu\text{g/g}_{\text{ss}}$ .

## **5.4 Metodologie biochimiche**

Le attività enzimatiche sono state determinate sui terreni tal quali e sugli estratti in pirofosfato neutro mediante prove effettuate in triplo. Parallelamente alle prove, sono stati eseguiti dei controlli in cui il campione è stato incubato nelle stesse condizioni ma in assenza di substrato allo scopo di determinare un'eventuale presenza nel campione del prodotto di reazione che prescindendo dall'aggiunta del substrato e di correggere, in tal caso, le misure. Nei saggi colorimetrici è stata ottenuta un'ulteriore correzione delle misure per azzerare lo strumento mediante un bianco con substrato per permettere la valutazione dell'eventuale idrolisi di quest'ultimo durante il periodo di incubazione previsto dal saggio enzimatico.

### **5.4.1 Deidrogenasi**

Le deidrogenasi rappresentano un criterio generale per determinare l'attività della biomassa microbica di un terreno o di altri materiali biologici naturali. Le deidrogenasi sono enzimi intracellulari, appartenenti al gruppo delle ossidoreduttasi che catalizzano l'ossidazione di composti organici. Il substrato della reazione è costituito quindi dalla sostanza organica, mentre il cofattore sintetico utilizzato per la misura dell'attività deidrogenasica è costituito dall'INT

(*p-Iodio-Nitro-Tetrazolium-chloride*) che per riduzione forma un prodotto colorato (INTF) (*p-Iodo-Nitro-Tetrazolium-Formazano*) determinabile per via spettrofotometrica. Quest'attività enzimatica è stata determinata secondo il metodo messo a punto da Masciandaro, 2000.

Per ogni campione sono stati pesati 0,5g di terreno a cui sono stati aggiunti 0,2ml di substrato INT (allo 0,4% in H<sub>2</sub>O bidistillata) e 0,1ml d'acqua bidistillata (per portare il terreno al 60% della capacità di campo). Parallelamente, per ogni campione, sono stati preparati i controlli aggiungendo a 0,5g di terreno, 0,3ml d'acqua bidistillata.

Prove e controlli sono stati lasciati riposare per 20 ore al buio.

Il prodotto della reazione di ossido-riduzione, l'INTF, essendo insolubile in acqua, è stato estratto mediante aggiunta di 5ml di una soluzione composta da tetracloroetilene e acetone (1:1,5). Le prove ed i controlli sono stati agitati meccanicamente per circa 1 minuto e centrifugati a 3500 rpm per 10 minuti. Dopo la centrifugazione si è proceduto alla lettura spettrofotometrica della soluzione colorata alla lunghezza d'onda di 490nm contro un bianco contenente la soluzione estraente.

Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono trasformate in concentrazioni, espresse in  $\mu\text{gINTF/g}_{\text{SS}}\cdot\text{h}$ , mediante una retta standard ottenuta con concentrazioni note d'INTF.

#### **5.4.2 $\beta$ -glucosidasi totale ed extracellulare**

La  $\beta$ -glucosidasi è un enzima che indica il ciclo del carbonio, in quanto catalizza l'idrolisi del cellobiosio (dimero derivante dalla degradazione della cellulosa) a glucosio. La determinazione dell'attività di quest'enzima si basa sul metodo di Masciandaro et al., 1994. Tale metodo consiste nella determinazione per via colorimetrica del rilascio del para-nitrofenolo (PNF), dopo l'incubazione dei campioni con 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranoside (PNG).

La determinazione della  *$\beta$ -glucosidasi totale* è stata eseguita su 0,5g di terreno a cui è stato aggiunto 2ml di tampone maleato (0,1M pH 6,5) e 0,5ml di substrato (0,05 M). Parallelamente sono stati preparati i controlli aggiungendo a

0,5g di terreno 2ml di tampone maleato ed il bianco aggiungendo 2ml di tampone maleato a 0,5ml di substrato.

La determinazione della  *$\beta$ -glucosidasi extracellulare* è stata eseguita su 0,5ml di estratto in pirofosfato neutro a cui è stato aggiunto 2ml di tampone maleato e 0,5ml di substrato PNG. I controlli sono stati preparati aggiungendo a 0,5ml di pirofosfato neutro 2ml di tampone maleato ed il bianco è stato preparato aggiungendo 2ml di tampone maleato e 0,5ml di substrato a 0,5ml di H<sub>2</sub>O bidistillata.

In entrambi i tipi di analisi, prove, controlli e bianco, sono stati sistemati nel bagno termostatico per 2 ore a 37°C sotto agitazione. Una volta terminato il periodo d'incubazione, anche nei controlli è stato aggiunto 0,5 ml di substrato e il tutto (prove, controlli e bianco) è stato posto a raffreddare a 4°C per 10 minuti per bloccare la reazione. Successivamente alle prove, ai controlli e al bianco sono stati aggiunti 0,5ml CaCl<sub>2</sub> 0,5M per far precipitare i colloidali e 2ml di NaOH 0,5M per salificare il prodotto conferendogli un colore giallo. Dopodiché si è portato a volume finale di 10 ml con acqua bidistillata si è centrifugato per 10 minuti a 3500 rpm e il surnatante ottenuto è stato letto allo spettrofotometro, utilizzando il bianco per azzerare lo spettrofotometro, ad una lunghezza d'onda di 398 nm. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni, espresse in  $\mu\text{gPNF/g}_{\text{SS}}\cdot\text{h}$ , mediante una retta standard, ottenuta con concentrazioni note di PNF.

#### **5.4.3 Fosfatasi totale ed extracellulare**

La fosfatasi è un enzima implicato nel ciclo del fosforo in quanto catalizza l'idrolisi degli esteri fosforici a fosfato. Il metodo è basato sulla determinazione per via colorimetrica del rilascio del para-nitrofenolo (PNF), dopo l'incubazione dei campioni con 4-Nitrophenil Phosphate di-sodium hexahydrate (PNP) per 1 ora e 30 minuti a 37°C (Nannipieri et al., 1980).

La determinazione della *fosfatasi totale* è stata eseguita su 0,5g di terreno a cui sono stati aggiunti 2ml di tampone maleato (0,1M pH 6,5) e 0,5ml di substrato PNP (0,115 M). Parallelamente sono stati preparati i controlli aggiungendo a



0,5g di terreno 2ml di tampone maleato ed il bianco aggiungendo 2ml di tampone maleato a 0,5ml di substrato PNP.

La determinazione della *fosfatasi extracellulare* è stata eseguita su 0,5ml di estratto in pirofosfato neutro a cui sono stati aggiunti 2ml di tampone maleato e 0,5ml di substrato. I controlli sono stati preparati aggiungendo a 0,5ml di pirofosfato neutro 2ml di tampone maleato ed il bianco è stato preparato aggiungendo 2ml di tampone maleato e 0,5ml di substrato a 0,5ml di H<sub>2</sub>O bidistillata.

In entrambi i tipi di analisi, prove, controlli e bianco, sono stati sistemati nel bagno termostatico per 1 ora e 30 minuti a 37°C sotto agitazione. Una volta terminato il periodo d'incubazione, anche nei controlli è stato aggiunto 0,5 ml di substrato e il tutto (prove, controlli e bianco) sono stati posti a raffreddare a 4°C per 10 minuti per bloccare la reazione. Successivamente alle prove, ai controlli e al bianco è stato aggiunto 0,5ml CaCl<sub>2</sub> 0,5M e 2ml di NaOH 0,5M. Dopodiché si è portato a volume finale di 10 ml con acqua bidistillata si è centrifugato per 10 minuti a 3500 rpm e il surnatante ottenuto è stato letto allo spettrofotometro, utilizzando il bianco, ad una lunghezza d'onda di 398 nm. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni, espresse in µgPNF/g<sub>SS</sub>·h, mediante una retta standard, ottenuta con concentrazioni note di PNF.

#### 5.4.4 Ureasi totale ed extracellulare

L'ureasi è un enzima che catalizza l'idrolisi dell'urea, un intermedio del ciclo dell'azoto, in ammoniaca ed anidride carbonica. La misura dell'attività ureasica è basata sulla determinazione dell'ammoniaca quale prodotto dell'idrolisi enzimatica dell'urea (Nannipieri et al., 1980).

La determinazione dell'*ureasi totale* è stata eseguita su 0,5g di terreno a cui è stato aggiunto 2ml di tampone fosfato (0,1M pH 7) e 0,5ml di substrato urea 6,4%. Parallelamente sono stati preparati i controlli aggiungendo a 0,5g di terreno 2ml di tampone fosfato.

La determinazione dell'*ureasi extracellulare* è stata eseguita su 0,5ml di estratto in pirofosfato neutro a cui è stato aggiunto 2ml di tampone fosfato e 0,5ml di substrato. I controlli sono stati preparati aggiungendo a 0,5ml di pirofosfato neutro 2ml di tampone fosfato.

In entrambe le analisi, prove e controlli sono stati incubati nel bagno termostatico per 1 ora e 30 minuti a 37°C sotto agitazione e in seguito sono stati portati ad un volume di 10 ml con acqua bidistillata. L'ammoniaca prodotta è stata determinata con l'elettrodo specifico per l'ammoniaca NH<sub>3</sub> ORION. I risultati sono stati espressi come  $\mu\text{gNH}_4^+/\text{g}_{\text{SS}}\cdot\text{h}$

#### 5.4.5 Proteasi totale ed extracellulare

La proteasi è un enzima legato al ciclo dell'azoto che catalizza l'idrolisi di proteine in oligopeptidi e dipeptidi liberando ammoniaca. La stima dell'attività proteasica si basa quindi sulla determinazione dell'ammoniaca, quale prodotto dell'idrolisi enzimatica, con substrato BAA (N- $\alpha$ -benzoil-L-argininamide) (Nannipieri et al., 1980).

La determinazione della *proteasi totale* è stata eseguita su 0,5g di terreno a cui sono stati aggiunti 2ml di tampone fosfato (0,1M pH 7) e 0,5ml di substrato BAA 0,03 M. Parallelamente sono stati preparati i controlli aggiungendo a 0,5g di terreno 2ml di tampone fosfato.

La determinazione della *proteasi extracellulare* è stata eseguita su 0,5ml di estratto in pirofosfato neutro a cui sono stati aggiunti 2ml di tampone fosfato e 0,5ml di substrato. I controlli sono stati preparati aggiungendo a 0,5ml di pirofosfato neutro 2ml di tampone fosfato.

In entrambe le analisi, prove e controlli sono stati incubati nel bagno termostatico per 1 ora e 30 minuti a 37°C sotto agitazione e in seguito sono stati portati ad un volume di 10 ml con acqua bidistillata. L'ammoniaca prodotta è stata determinata con l'elettrodo specifico. I risultati sono stati espressi come  $\mu\text{gNH}_4^+/\text{g}_{\text{SS}}\cdot\text{h}$ .

## 5.5 Analisi statistica

I risultati ottenuti rappresentano la media di tre repliche per ciascun trattamento. Per valutare l'effetto del trattamento, tali risultati, espressi in riferimento al suolo secco, sono stati sottoposti all'Analisi della Varianza (ANOVA) con un livello di significatività inferiore al 5% ( $p < 0,05$ ). Lo scopo dell'analisi della varianza è la verifica della presenza di differenze significative tra medie confrontando varianze. In questo modo è possibile confrontare la varianza dovuta alla variabilità tra-gruppi (o trattamenti) con quella dovuta alla variabilità entro-gruppi. Sotto l'ipotesi nulla (che non ci siano differenze in media tra gruppi o trattamenti nella popolazione), la varianza stimata tramite la variabilità entro-gruppi dovrebbe essere all'incirca uguale alla varianza stimata tramite la variabilità tra-gruppi (trattamenti). Dopo aver ottenuto un test  $F$  statisticamente significativo dall'ANOVA, si esegue un test per sapere quali medie contribuiscono all'effetto; cioè, quali gruppi sono particolarmente differenti tra loro.

Inoltre, i risultati sono stati elaborati mediante l'Analisi delle Componenti Principali (PCA). La PCA consiste nel trasformare, attraverso complessi calcoli matriciali, le variabili originali in nuove variabili ottenute come loro combinazione lineari, dette appunto componenti principali (PC). Ogni componente principale contiene una parte essenziale dell'informazione, cioè contribuisce alla varianza totale dell'insieme di dati. Questo permette di ridurre la dimensionalità dei dati e nel caso in cui si scelga un numero di componenti principali minori o uguale a 3 di avere una visualizzazione dei risultati statistici in uno spazio bi o tridimensionale. In particolar modo, dall'applicazione di questa tecnica statistica si ottiene:

- La tabella dei loadings (visualizzabile anche in forma grafica): consente di analizzare il peso di ciascuna variabile iniziale nelle diverse componenti principali. Variabili con un valore prossimo allo 0 non risultano rilevanti per tale componente considerata; variabili che si collocano agli estremi ( $\pm 1$ ) di una componente sono invece variabili molto importanti per quella componente.

- Il grafico degli scores è una rappresentazione dei campioni nello spazio delle prime 2-3 componenti principali che consente di analizzare il comportamento degli oggetti nelle diverse componenti e la loro similarità. E' così possibile notare raggruppamenti di oggetti simili (clusters), la presenza di oggetti isolati (outliers), il manifestarsi di particolari distribuzioni.

E' stata infine costruita una matrice di correlazione di Pearson considerando tutti i parametri determinati. La correlazione di Pearson è una misura di relazione tra due variabili e determina fino a che livello le due variabili risultano tra loro "proporzionali". Proporzionale significa relazionate linearmente; cioè la correlazione è elevata se la relazione può essere "riassunta" da una linea retta (inclinata positivamente o negativamente). Questa linea è chiamata retta di regressione o retta ai minimi quadrati, perché è determinata in modo tale che la somma delle distanze al quadrato di tutti i punti da corrispondenti punti della retta sia la minore possibile. I coefficienti di correlazione possono assumere valori compresi tra -1.00 e +1.00. Il valore di -1.00 rappresenta una perfetta correlazione negativa, un valore di +1.00 rappresenta una perfetta correlazione positiva mentre un valore di 0.00 rappresenta una mancanza di correlazione. Sono stati considerati significativi tutti i coefficienti di correlazione aventi un  $p < 0,05$ .

## **6 RISULTATI E DISCUSSIONE**

## 6.1 Effetti sulle proprietà chimiche del terreno

### 6.1.1 pH

Il pH del terreno è un parametro chimico-fisico importante in quanto influenza:

- l'accrescimento delle piante;
- la disponibilità dei nutrienti;
- il tipo e il numero dei microrganismi presenti nel terreno.

Il pH nelle cinque prove di fertirrigazione con percolato stabilizzato ( $T_0$ : percolato tal quale;  $T_{FS}$ : percolato trattato su filtro suolo-sabbioso;  $T_{FP}$ : percolato trattato su filtro suolo-pianta;  $T_{40}$ - $T_{60}$ : percolato aerato rispettivamente per 40 e 60 giorni) varia da 7,64 e 8,75 (Figura 6.1) rientrando in un intervallo di valori tale da non provocare fenomeni di fitotossicità alle radici delle piante (Masoni et al, 1999).

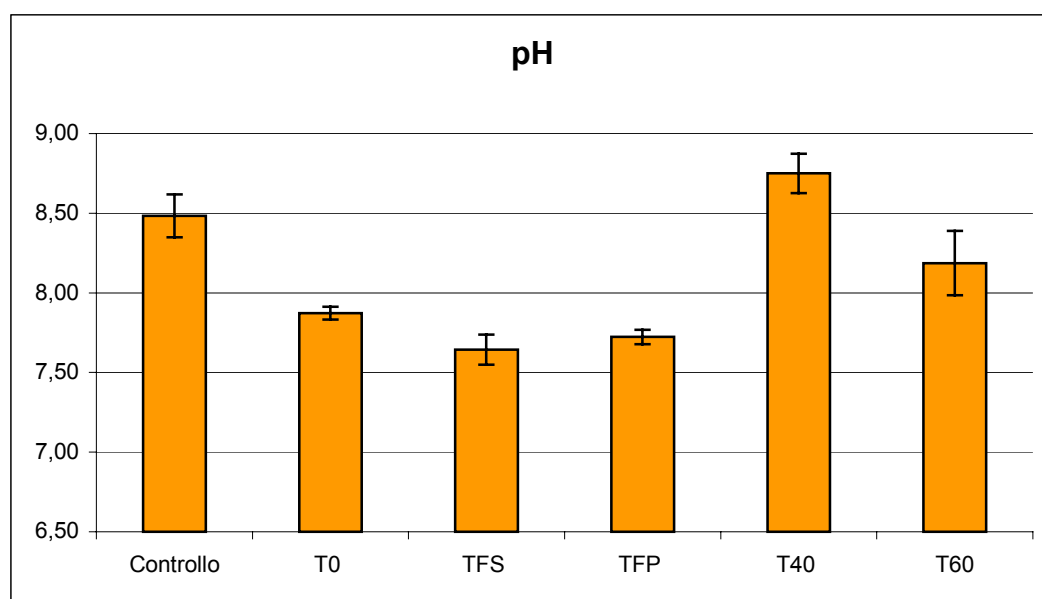


Figura 6.1: Valori medi di pH del terreno dopo fertirrigazione.

### 6.1.2 Conducibilità elettrica

La misura della conducibilità elettrica fornisce una stima dei sali solubili presenti nel terreno. La salinità di un terreno provoca problemi a livello fisiologico in quanto aumenta la pressione osmotica della soluzione circolante, causa problemi di fitotossicità ed effetti negativi sulla chimica e sulla fisica del suolo.

I valori di conducibilità, misurati nei terreni dopo la sperimentazione, risultano rispetto al controllo, più bassi del 50% nelle prove di fertirrigazione con  $T_{FS}$  e con  $T_{FP}$ ; mentre risultano più alti nelle prove di fertirrigazione con  $T_{40}$  e  $T_{60}$  rispettivamente del 40 e del 70% (Figura 6.2).

Questo andamento può essere ricondotto alla diversa natura dei sali contenuti nei cinque tipi di percolato stabilizzato impiegati.

Probabilmente i sali presenti nel percolato  $T_{FS}$  e  $T_{FP}$ , di natura colloidale, vengono adsorbiti dal terreno, mentre i sali contenuti nel percolato  $T_{40}$  e  $T_{60}$  vanno ad aggiungersi alla naturale salinità del terreno determinando comunque valori di conducibilità sotto la soglia di criticità (Masciandaro et al, 2002; Garcia et al., 1996).

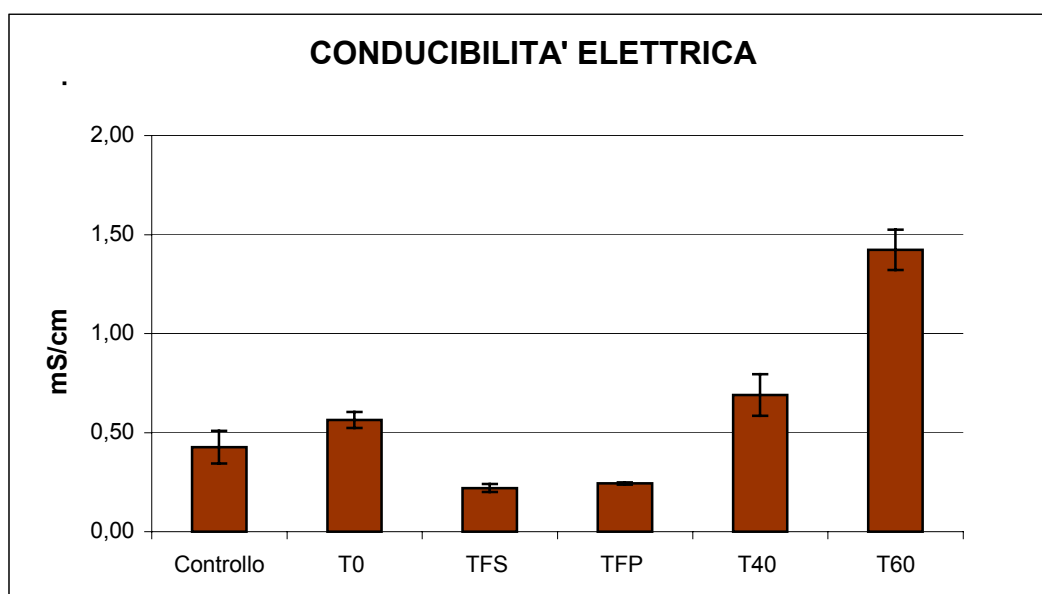


Figura 6.2: Valori medi di conducibilità elettrica del terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### 6.1.3 Azoto totale

L'azoto rappresenta il macroelemento più importante per la crescita delle piante. Infatti una buona disponibilità di azoto per tutto il ciclo biologico, fa sì che la pianta sviluppi al massimo l'apparato vegetativo; mentre una deficienza di azoto provoca un accrescimento stentato e una scarsa produzione di clorofilla. L'azoto nel terreno è contenuto nei composti umici colloidali, nei residui organici indecomposti e nella biomassa microbica; è presente per lo più in forma organica (90–98%) che deve essere trasformata in inorganica per essere assunta dalla pianta. Le piante infatti assorbono azoto principalmente in forma nitrica, ma in alcuni casi è possibile anche l'assorbimento della forma ammoniacale.

I dati sperimentali mostrano (Figura 6.3) che il contenuto di azoto totale, dopo la fertirrigazione, risulta significativamente più alto ( $p < 0,05$ ) nei terreni irrigati con T<sub>40</sub> e T<sub>60</sub> probabilmente perché in tali prove si verifica un processo d'immobilizzazione della sostanza organica (Figura 6.4).

Le concentrazioni di azoto rilevate nei terreni dopo la sperimentazione comunque risultano comprese tra 1300 e 2000  $\mu\text{g/g}_{\text{SS}}$  permettendo di classificare il terreno come "ben dotato" (Masoni et al., 1999).

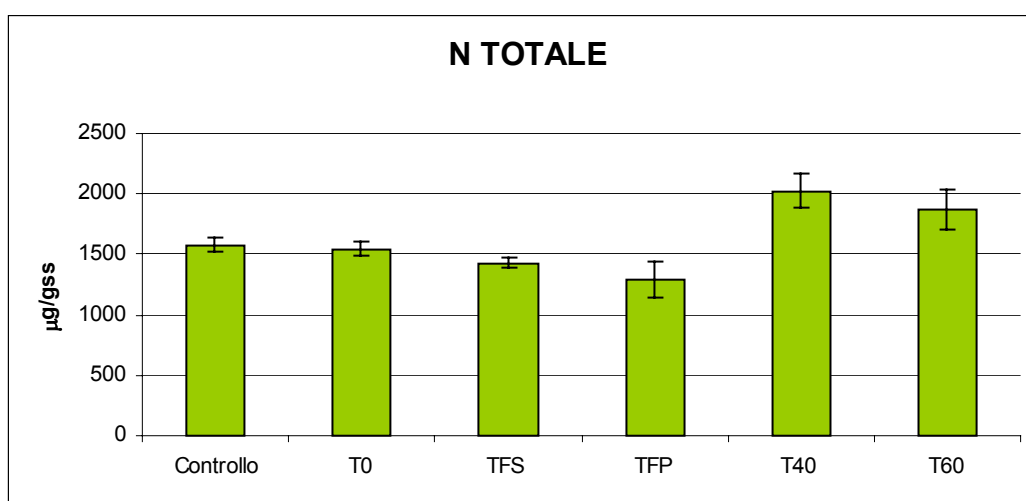


Figura 6.3: Valori medi di azoto totale del terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.



### 6.1.4 Azoto ammoniacale

L'azoto ammoniacale deriva dalla mineralizzazione, o ammonificazione, microbica dell'azoto organico. Si riporta che la mineralizzazione dell'azoto dipende dal rapporto carbonio azoto: se il terreno ha un basso rapporto C/N, l'azoto risulta in eccesso e viene liberato come azoto ammoniacale (Schulten et al, 1998). L'azoto ammoniacale è solubile in acqua, ma può essere adsorbito sul complesso di scambio e immobilizzato nei colloidali argillosi che lo rendono lentamente disponibile per le piante.

I valori di azoto ammoniacale risultano (Figura 6.4) pari al controllo nei terreni fertirrigati con T<sub>0</sub>, T<sub>FS</sub> e T<sub>FP</sub>, mentre i terreni trattati con T<sub>40</sub> e T<sub>60</sub> presentano valori di ammoniaca superiori (45–60%) al controllo molto probabilmente a causa di un processo di mineralizzazione dell'azoto organico a NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Ciò significa che l'azoto apportato con il percolato, derivante dal trattamento d'insufflazione forzata di aria, è di natura polimerica in accordo con i bassi valori di carbonio fulvico (Figura 6.9) riscontrati nel terreno. Ammoniaca e carbonio fulvico presentano infatti correlazione negativa ( $p < 0,05$ ).

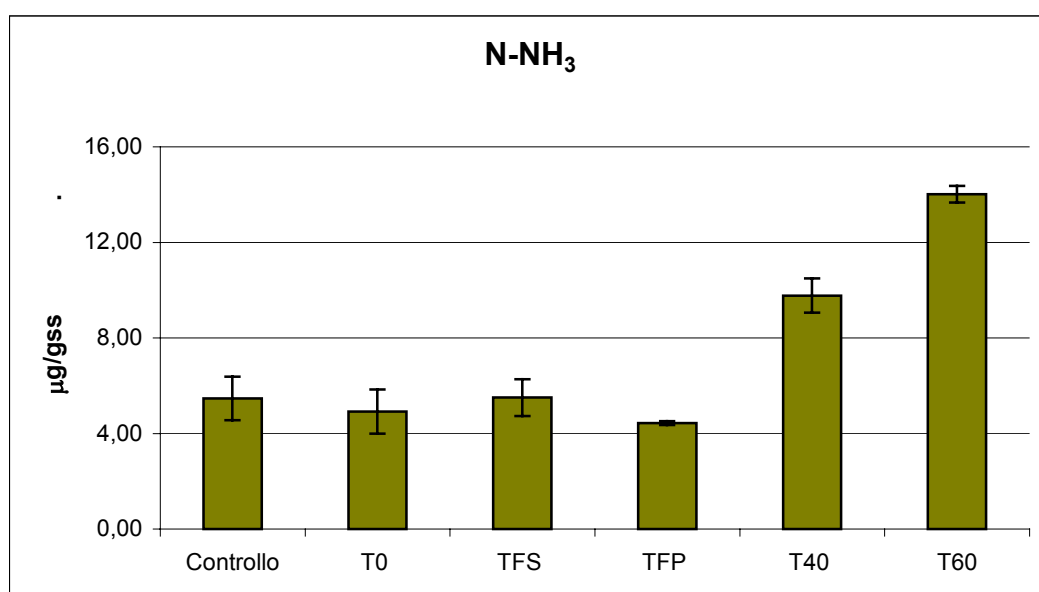


Figura 6.4: Valori medi di azoto ammoniacale del terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### 6.1.5 Fosforo totale

Il fosforo è un elemento nutritivo di cui la pianta non necessita in grande quantità; è comunque un elemento essenziale per le reazioni di sintesi e una sua carenza determina piante esili con crescita stentata.

Nella soluzione circolante del terreno, tale elemento è presente quasi esclusivamente come ortofosfato ed in minor quantità anche in forma organica.

Il contenuto di fosforo totale dopo le prove di fertirrigazione (Figura 6.5) mostra valori che non si discostano significativamente dal controllo, ciò perché le quantità di tale elemento apportate con il percolato sono molto basse (Tabella 4.2).

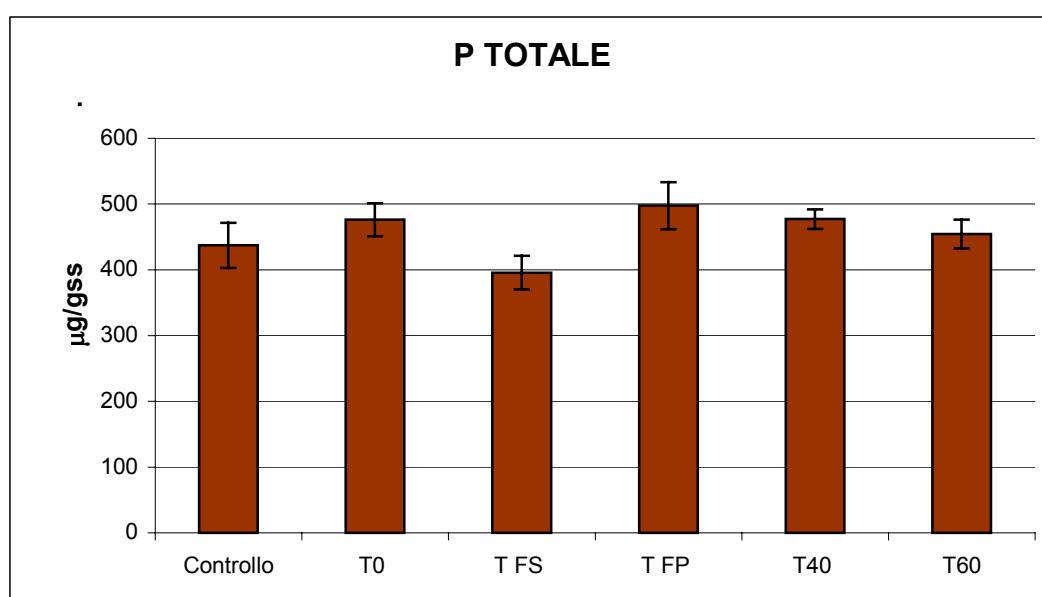


Figura 6.5: Valori medi di fosforo totale del terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### 6.1.6 Carbonio totale

Il carbonio presente nei terreni dopo fertirrigazione è prevalentemente di natura organica, in quanto l'analisi eseguita con l'analizzatore di carbonio (RC-412 MULTIPHASE CARBON) non ha rilevato presenza di carbonio di tipo inorganico.

I dati sperimentali (Figura 6.6) mostrano un aumento di carbonio totale rispetto al controllo del 15–20% in tutti i terreni trattati ( $p < 0,05$ ) dovuto all'apporto di tale elemento con il percolato (Tabella 4.2). Inoltre non si osservano differenze significative fra i vari trattamenti, in quanto la concentrazione di carbonio totale nei diversi tipi di percolato risulta tendenzialmente simile (Tabella 4.2) ad esclusione dei percolati  $T_{FS}$  e  $T_{FP}$ .

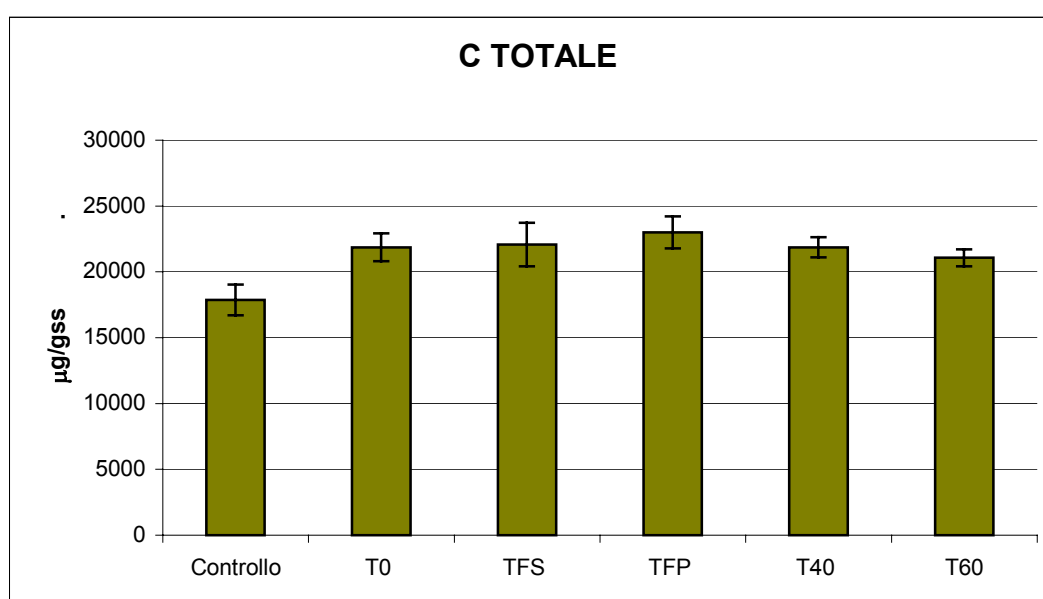


Figura 6.6: Valori medi di carbonio totale del terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### 6.1.7 Rapporto C/N

Il rapporto C/N costituisce un parametro importante per capire il grado di mineralizzazione della sostanza organica e di disponibilità di azoto per la nutrizione delle piante. I microrganismi del terreno hanno bisogno sia di sostanza organica contenente carbonio, da cui traggono energia, che di azoto per formare le proteine che costituiranno il loro organismo. Bassi valori di tale rapporto indicano minore quantitativo di carbonio rispetto all'azoto che rimane quindi a disposizione delle piante; mentre alti valori significano, al contrario, più carbonio che azoto, ciò comporta un eccesso di sostanza organica da degradare, per cui i microrganismi consumano l'azoto presente nel terreno determinando la "fame d'azoto" per le piante.

Il rapporto C/N dei terreni agricoli oscilla mediamente tra 10 e 20, ma in alcuni terreni, si hanno anche valori esterni a questo intervallo. I valori riscontrati nelle prove (Figura 6.7) cadono in questo range: le prove trattate con percolato stabilizzato in aerobiosi ( $T_{40}$  e  $T_{60}$ ) mostrano un rapporto C/N pari a quello del controllo (C/N=10), mentre i trattamenti con percolato non trattato ( $T_0$ ) e con quello trattato con filtro suolo-sabbioso ( $T_{FS}$ ) e filtro suolo-pianta ( $T_{FP}$ ) presentano valori più alti (20–40%).

Questo andamento può essere ricondotto alla differente concentrazione di azoto totale (Figura 6.3) nei terreni che hanno subito i diversi trattamenti, in quanto il contenuto di carbonio totale (Figura 6.6) dopo la fertirrigazione risulta pressoché costante nelle varie prove.

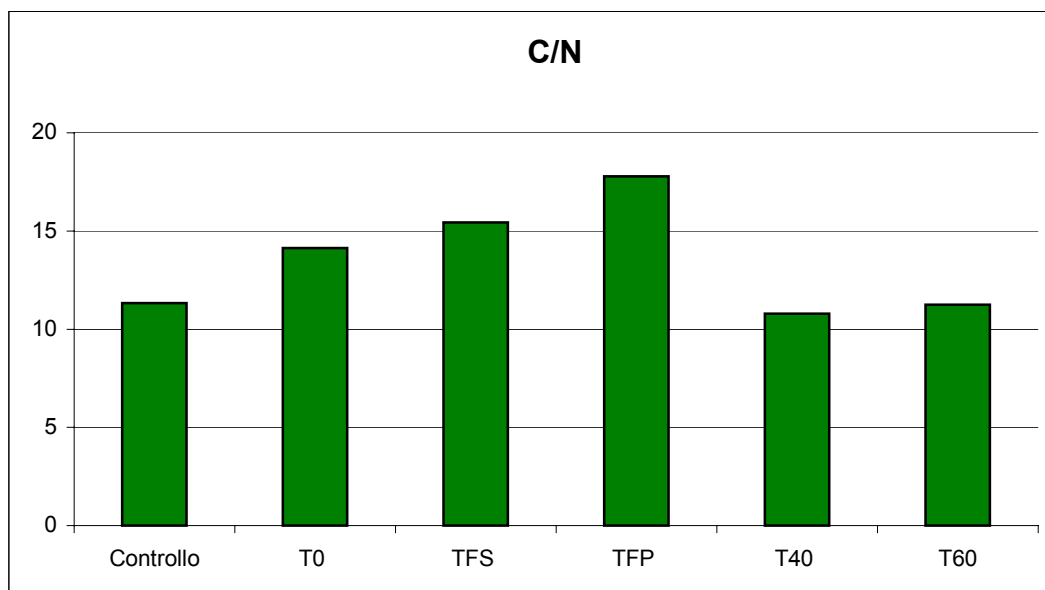


Figura 6.7: Valori di C/N del terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### **6.1.8 Parametri relativi al processo di umificazione**

Il processo di decomposizione del materiale organico che avviene nel terreno porta alla formazione di una sostanza semi-stabile di colore scuro chiamata humus (Masoni et al. 1999).

Le sostanze umiche sono ampiamente conosciute come composti organici polimerici complessi, principalmente costituiti da polifenoli, proteine, enzimi, lipidi e polisaccaridi. La loro funzione riguarda la disponibilità dei nutrienti, l'immobilizzazione dei contaminanti tossici nel terreno (Masciandaro et al., 1998) e la stabilizzazione degli enzimi liberi (extracellulari) attraverso complessi umo-enzimatici che proteggono tali enzimi dall'attacco microbico e dagli stress chimico-fisici (Nannipieri et al., 1996).

#### ***Carbonio estraibile totale***

Il carbonio estraibile totale rappresenta la sostanza umica costituita nello specifico da acidi umici e acidi fulvici; ovvero da un nucleo stabile (acidi umici), di carattere aromatico, refrattario a denaturazioni chimico fisiche e da una struttura labile (acidi fulvici) che costituisce un fronte reattivo in grado di controllare l'accumulo e lo scambio di nutrienti e sensibile a sollecitazioni esterne (Ceccanti et al., 1997).

Gli acidi fulvici costituiscono la frazione della sostanza umica solubile sotto qualsiasi condizione di pH, mentre gli acidi umici costituiscono la frazione della sostanza umica che precipita a  $\text{pH} < 2$ .

I dati sperimentali mostrano (Figura 6.8) un contenuto di carbonio estraibile totale prossimo a quello del controllo per tutti i trattamenti eccetto che per il  $T_{40}$  e per il  $T_{60}$  dove si osserva una diminuzione rispettivamente del 30% ( $p < 0,05$ ) e del 10%.

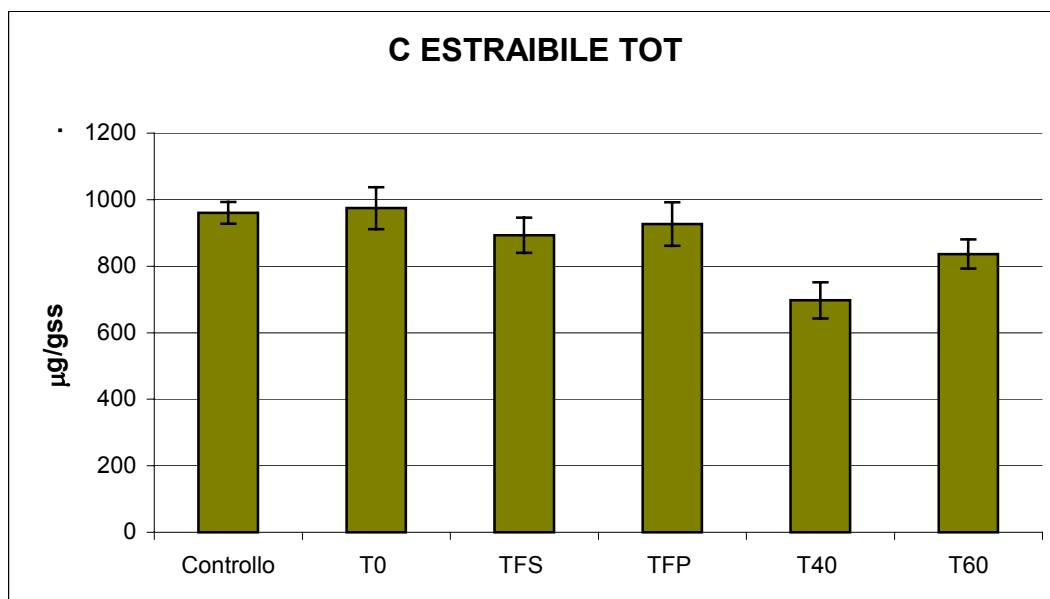


Figura 6.8: Valori medi di carbonio estraibile totale del terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### **Acidi fulvici (C-AF) e acidi umici (C-AU)**

I valori relativi agli acidi fulvici (Figura 6.9) ci indicano la presenza maggiore (15–30%) di tale frazione nei terreni che hanno subito irrigazione con T<sub>0</sub>, T<sub>FS</sub> e T<sub>FP</sub>, mettendo in evidenza la presenza di materiale più labile a cui corrisponde un minor quantitativo di acidi umici (Figura 6.10).

La concentrazione più bassa di acidi fulvici in T<sub>40</sub> e T<sub>60</sub> indica probabilmente che il trattamento di aerazione del percolato ha degradato la parte labile della sostanza organica determinando quindi una minor presenza di carbonio fulvico nel terreno.

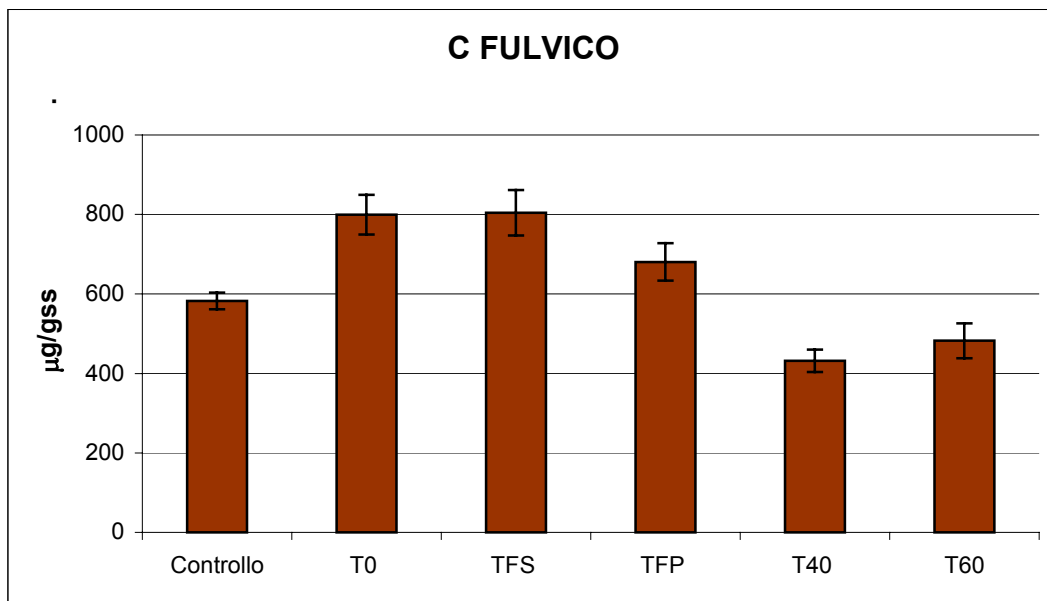


Figura 6.9: Valori medi di carbonio fulvico del terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

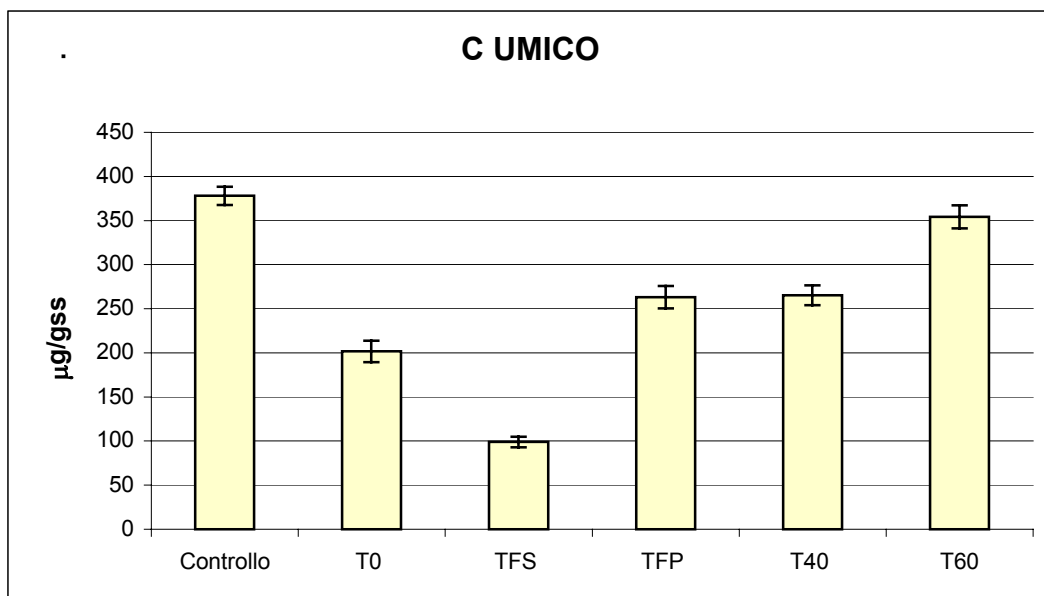


Figura 6.10: Valori medi di carbonio umico del terreno dopo fertirrigazione.



**Rapporto C–AF/C–AU**

I valori di tale rapporto risultano (Figura 6.11) più alti del controllo del 60% e dell'80% rispettivamente nei terreni irrigati con  $T_0$  e  $T_{FS}$ , indicando quindi la presenza di materiale meno stabile nei terreni trattati con questo tipo di percolato.

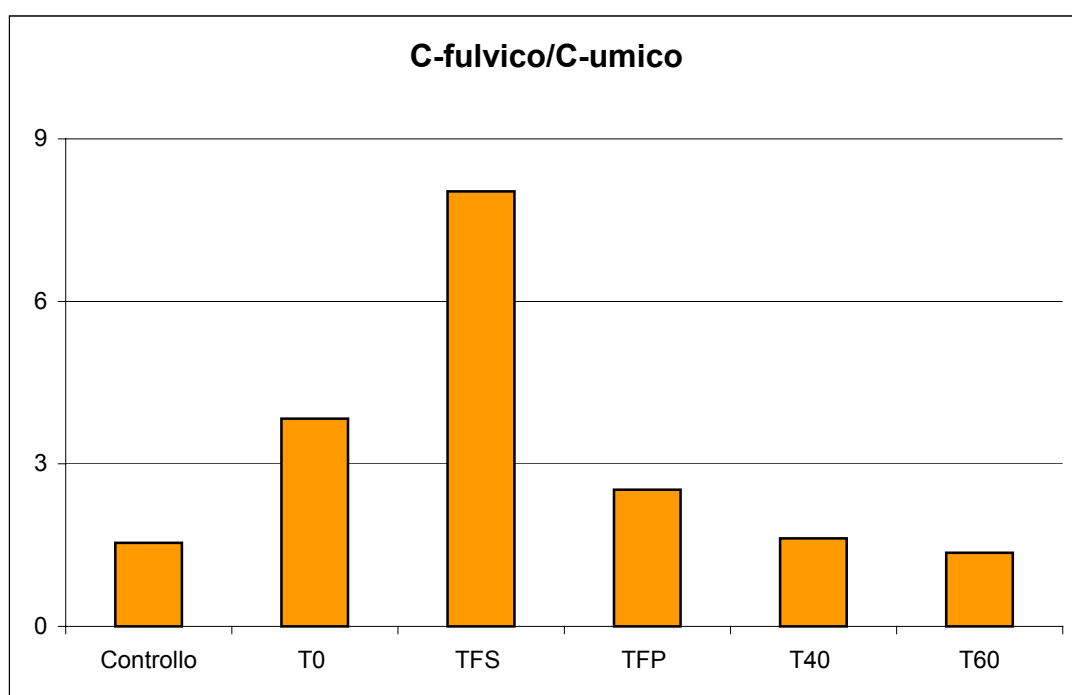


Figura 6.11: Valori del C–AF/C–AU del terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### 6.1.9 Parametri di controllo dei processi microbiologici

#### **Carbonio idrosolubile**

Il carbonio idrosolubile rappresenta la frazione di carbonio prontamente disponibile per i microrganismi.

I dati sperimentali mostrano (Figura 6.12) che tale elemento è più disponibile nei terreni fertirrigati con  $T_{FS}$  e con  $T_{FP}$ , in quanto risulta superiore al controllo rispettivamente del 40–50% indicando il  $T_{FP}$  come trattamento che apporta la maggior quantità di carbonio idrosolubile, come già riscontrato per l'andamento degli acidi fulvici (Figura 6.9).

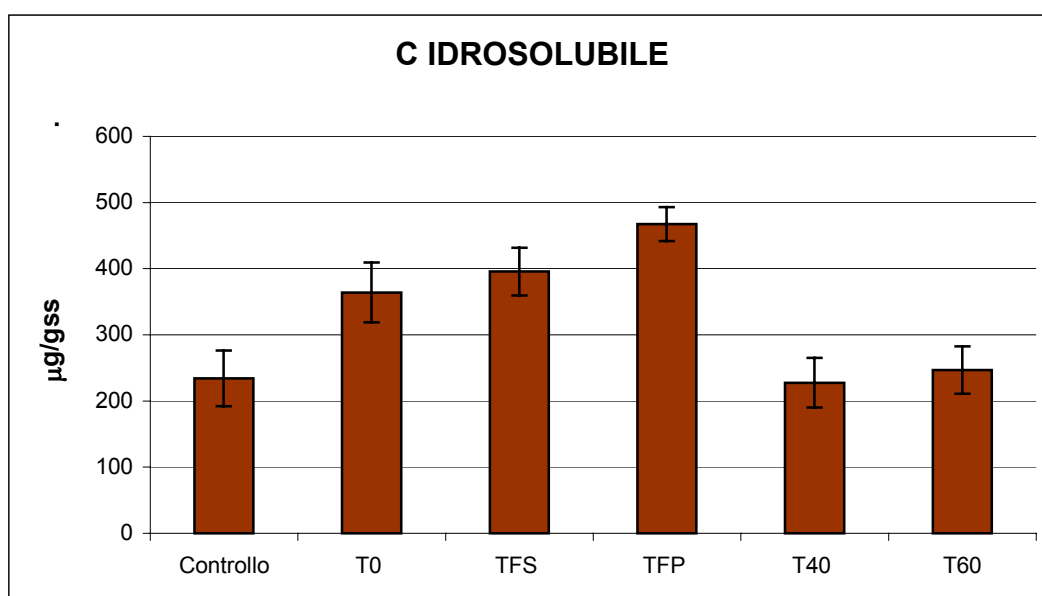


Figura 6.12: Valori medi di carbonio idrosolubile del terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### **Fosforo assimilabile**

Il fosforo assimilabile costituisce la frazione di fosforo più prontamente disponibile per le piante.

I dati sperimentali mostrano (Figura 6.13) che i trattamenti con  $T_0$ ,  $T_{FS}$  e  $T_{FP}$  forniscono un adeguato apporto di fosforo assimilabile, in quanto i valori risultano significativamente superiori al controllo ( $p < 0,05$ ). In particolare il contenuto di tale elemento nel terreno trattato con  $T_{FP}$  risulta essere doppio rispetto al contenuto del controllo.

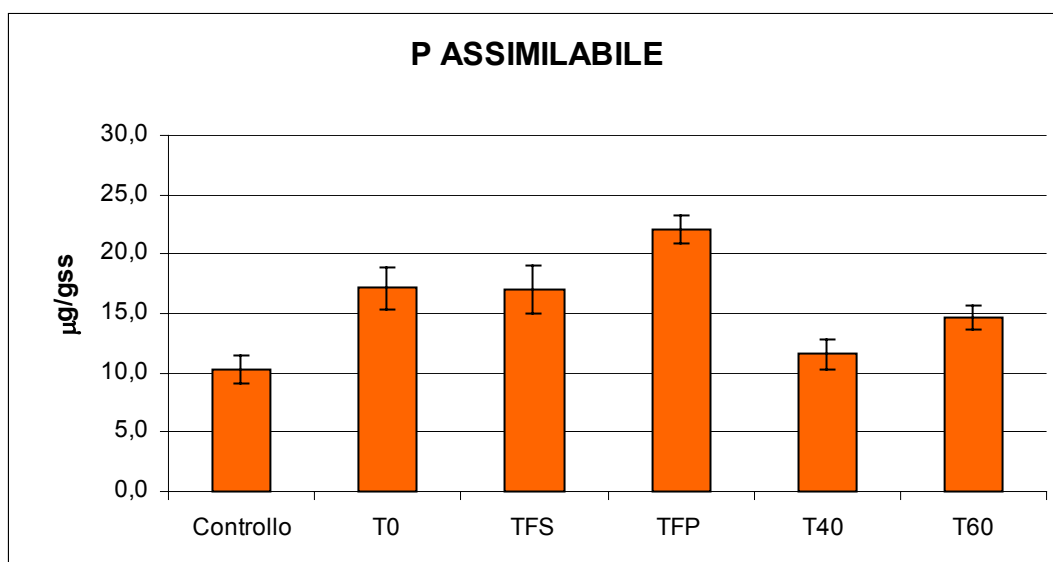


Figura 6.13: Valori medi di fosforo assimilabile del terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### 6.1.10 Anioni

#### **Nitrati**

I nitrati costituiscono la forma di azoto maggiormente assorbita dalle piante perché più facilmente disponibile rispetto all'azoto ammoniacale che rimane invece per lo più adsorbito al complesso di scambio.

I dati sperimentali (Figura 6.14) mostrano un contenuto maggiore di nitrati nella fertirrigazione con  $T_{FS}$  (50% in più rispetto al controllo) e con  $T_{FP}$  che hanno favorito il processo di nitrificazione del terreno.

L'andamento della concentrazione di nitrati nelle varie prove di fertirrigazione risulta uguale a quello del carbonio idrosolubile (Figura 6.12) e del fosforo assimilabile (Figura 6.13). I tre parametri risultano infatti correlati positivamente ( $p < 0,05$ ).

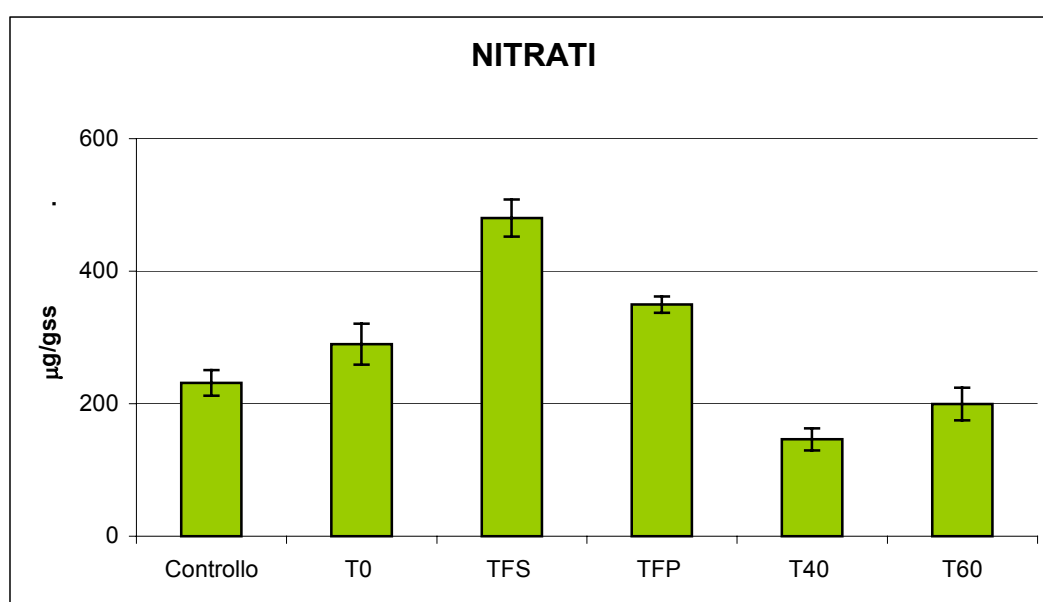


Figura 6.14: Valori medi di nitrati del terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### Solfati

Se da un lato i solfati insieme ai cloruri, contribuiscono alla salinità del terreno, dall'altro i solfati costituiscono una forma disponibile di zolfo (microelemento fertilizzante).

Tutti i trattamenti (Figura 6.15), ad eccezione del T<sub>0</sub>, mostrano un contenuto di solfati superiore del 70% rispetto al controllo.

La buona disponibilità di zolfo per le piante è messa in evidenza dalla correlazione positiva tra i solfati e la biomassa vegetale ( $p < 0,05$ ).

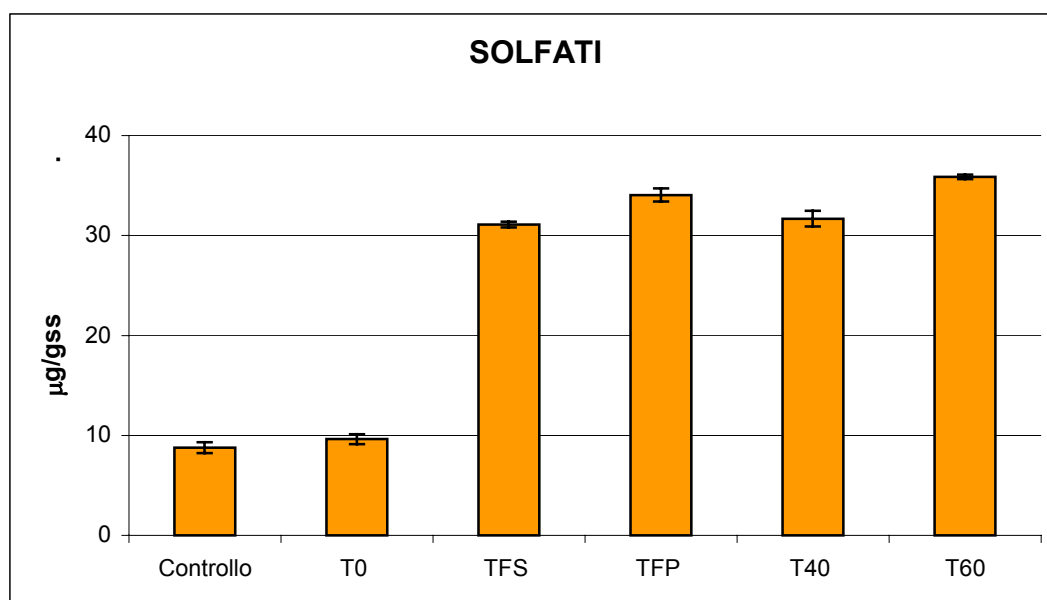


Figura 6.15: Valori medi di solfati del terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### Cloruri

I cloruri mostrano (Figura 6.16) per lo più lo stesso andamento dei solfati ad eccezione del trattamento con T<sub>0</sub>. Ciò è confermato dalla loro correlazione positiva ( $p < 0,05$ ).

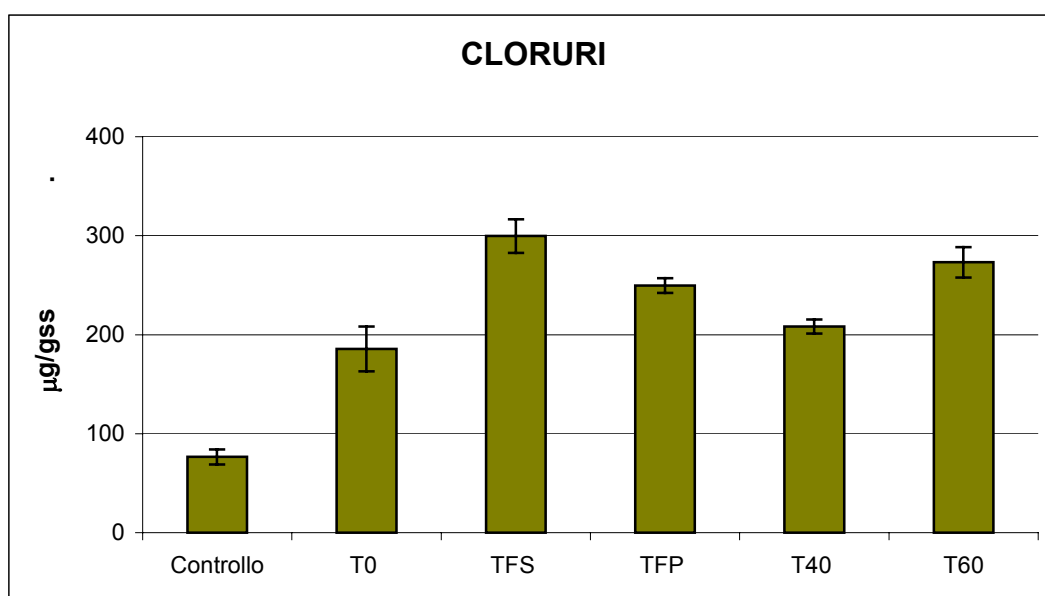


Figura 6.16: Valori medi di cloruri del terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo** (acqua potabile); **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato passato su filtro suolo sabbioso; **TFP**: percolato passato su filtro suolo-sabbioso-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### Fosfati

L'andamento della concentrazione dei fosfati (Figura 6.17) risulta confrontabile con quello del fosforo assimilabile (Figura 6.13); infatti entrambi costituiscono la forma di fosforo disponibile per le piante.

La fertirrigazione con T<sub>FS</sub>, T<sub>40</sub> e T<sub>60</sub> presenta i valori più bassi supponendo che tali trattamenti favoriscono probabilmente processi di leggera mobilizzazione e solubilizzazione del fosforo.

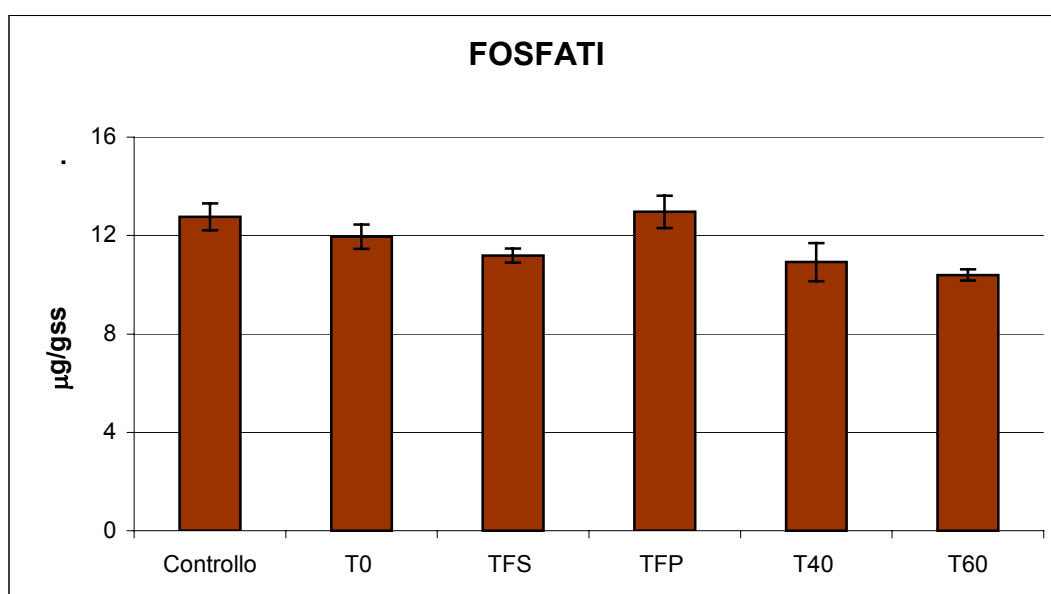


Figura 6.17: Valori medi di fosfati del terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

## 6.2 Effetti sulla biomassa vegetale

Il tasso di crescita delle piante fornisce come ovvio un'indicazione sulla qualità del percolato in quanto, essendo le piante sensibili alle modificazioni delle condizioni ambientali del suolo, possono essere usate come indicatori degli effetti esercitati dall'irrigazione con tale miscela liquida.

I dati relativi alla biomassa (Figura 6.18) mostrano come le prove di fertirrigazione con  $T_{FS}$   $T_{FP}$  producano più biomassa rispetto agli altri trattamenti. Ciò è da ricollegarsi ai bassi valori di salinità del terreno (Figura 6.2) sottoposto a questi due trattamenti. L'elevato contenuto di sali infatti, può causare effetti negativi sulle funzioni metaboliche e fisiologiche che si traducono in danno e morte delle piante. Inoltre lo stress da salinità può aumentare o diminuire la respirazione cellulare soprattutto a livello radicale (Gros et al., 2003).

Inoltre il maggior sviluppo di biomassa nei trattamenti con  $T_{FS}$   $T_{FP}$  è probabilmente dovuto sia all'attivazione dei processi metabolici che al miglior contenuto di nutrienti disponibili (N, P, C) riscontrati nei terreni trattati con queste due tipologie di percolato.

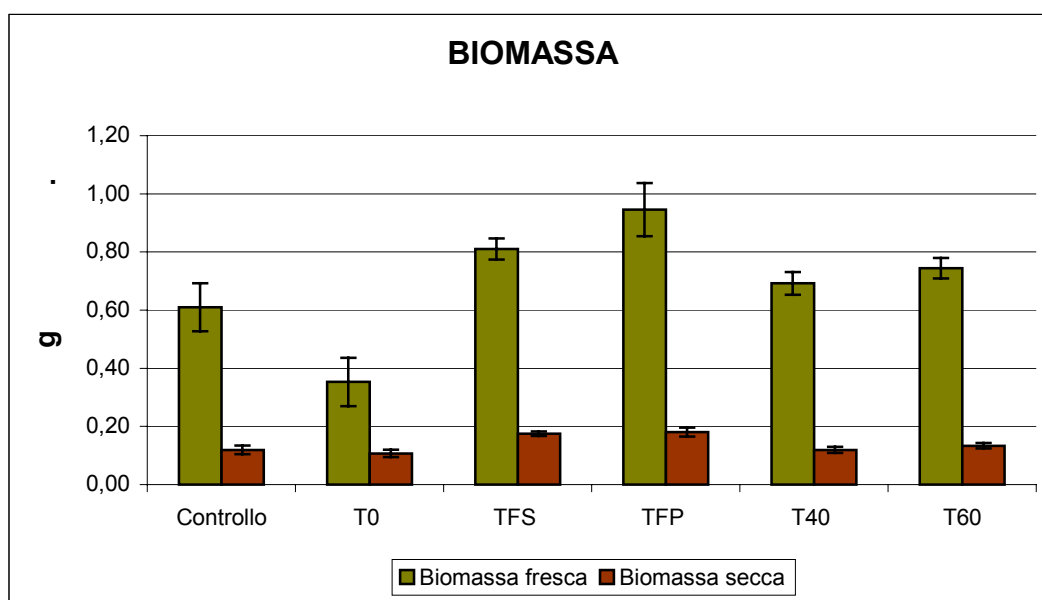


Figura 6.18: Valori medi di biomassa vegetale dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.



### 6.3 Effetti sulle proprietà biochimiche del terreno

La qualità di un suolo è definita come la “capacità di un suolo di accettare conservare e riciclare acqua, nutrienti ed energia” (Masciandaro e Ceccanti, 1999) e dipende sia dalla sua naturale composizione che dall’impatto che l’uomo esercita su di esso.

Per avere informazioni sulla qualità di un suolo risulta utile studiare l’attività enzimatica presente nel suolo stesso, in quanto tali enzimi sono responsabili della decomposizione della sostanza organica, dei processi di fissazione dell’azoto e di nitrificazione/denitrificazione e della degradazione delle sostanze inquinanti. Inoltre l’attività enzimatica è collegata alle caratteristiche fisico-chimiche del suolo, alla struttura della comunità microbica, alla presenza di vegetazione e alle condizioni di stress a cui può essere sottoposto il suolo (Caldwell, 2004).

Gli enzimi presenti nel terreno si dividono in:

- enzimi interni alla cellula;
- enzimi extracellulari.

Gli enzimi presenti all’interno delle cellule sono responsabili delle reazioni energetiche; mentre gli enzimi extracellulari sono deputati alla degradazione dei polimeri di dimensioni molecolari elevate (cellulosa, lignina, pectina, etc.).

Gli enzimi extracellulari possono essere:

- presenti nella fase acquosa del terreno, prodotti durante il ciclo vitale della cellula microbica o rilasciati dopo la morte della cellula stessa;
- immobilizzati dalle molecole umiche o dalla argille presenti nel terreno.

Gli enzimi che possono essere usati come biomarcatori dell’evoluzione dell’ecosistema suolo sono le idrolasi e le ossidoreduttasi in quanto hanno substrati specifici e danno rapide risposte ai fattori ambientali, alla gestione del suolo, alle pratiche agronomiche, etc. (Nannipieri et al., 1990).

### 7.3.1 Deidrogenasi

Le deidrogenasi sono enzimi intracellulari appartenenti al gruppo delle ossidoreduttasi che catalizzano l'ossidazione di composti organici con conseguente rimozione di due atomi di idrogeno (Nannipieri et al., 1990) che vengono trasferiti alla molecola  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ . La determinazione dell'attività di tali enzimi fornisce un metodo generale per quantificare l'attività microbica del suolo.

Le deidrogenasi risultano correlate positivamente ( $p < 0,05$ ) con il fosforo totale ciò significa che si ha un effetto stimolante da parte di questo elemento.

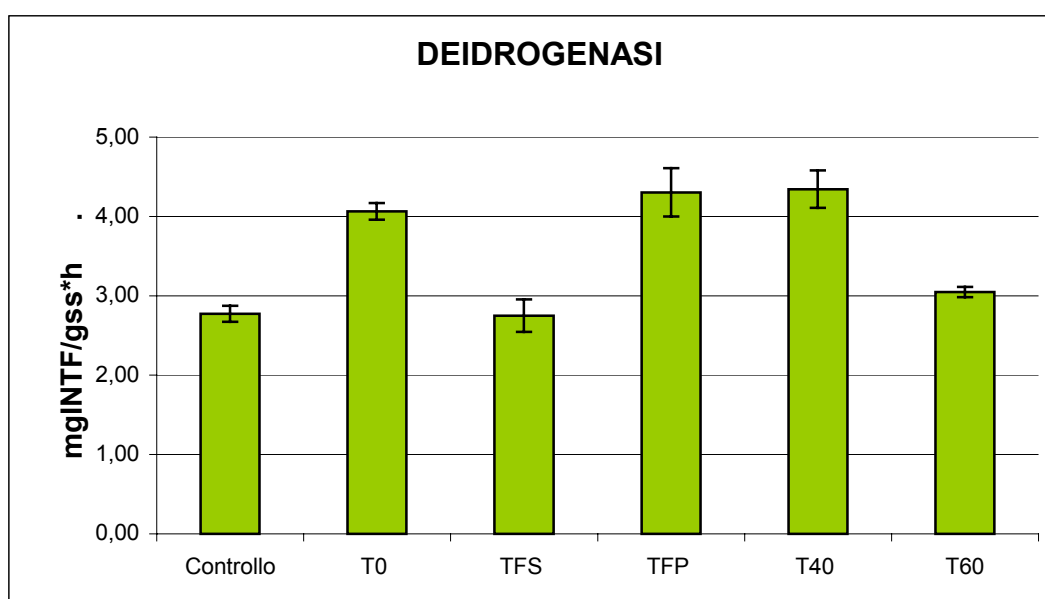


Figura 6.19: Valori medi di deidrogenasi nel terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### 7.3.2 $\beta$ -glucosidasi

La  $\beta$ -glucosidasi è un enzima legato al ciclo del carbonio. Tale enzima interviene nel processo finale di degradazione della cellulosa ovvero catalizza l'idrolisi del cellobiosio (dimero derivante dalla degradazione della cellulosa) a glucosio. L'attività di questo enzima dovrebbe quindi essere correlata al contenuto di sostanza organica del suolo.

Risulta infatti correlata positivamente con il carbonio idrosolubile e con il carbonio totale ( $p < 0,05$ ) ed inoltre i risultati derivanti dall'ANOVA mettono in evidenza che soltanto il trattamento con percolato derivante dal filtro suolo-pianta ( $T_{FP}$ ) risulta significativamente più alto del controllo ( $p < 0,05$ ), indicando quindi un buono stimolo del processo metabolico legato al ciclo del carbonio da parte di questo trattamento.

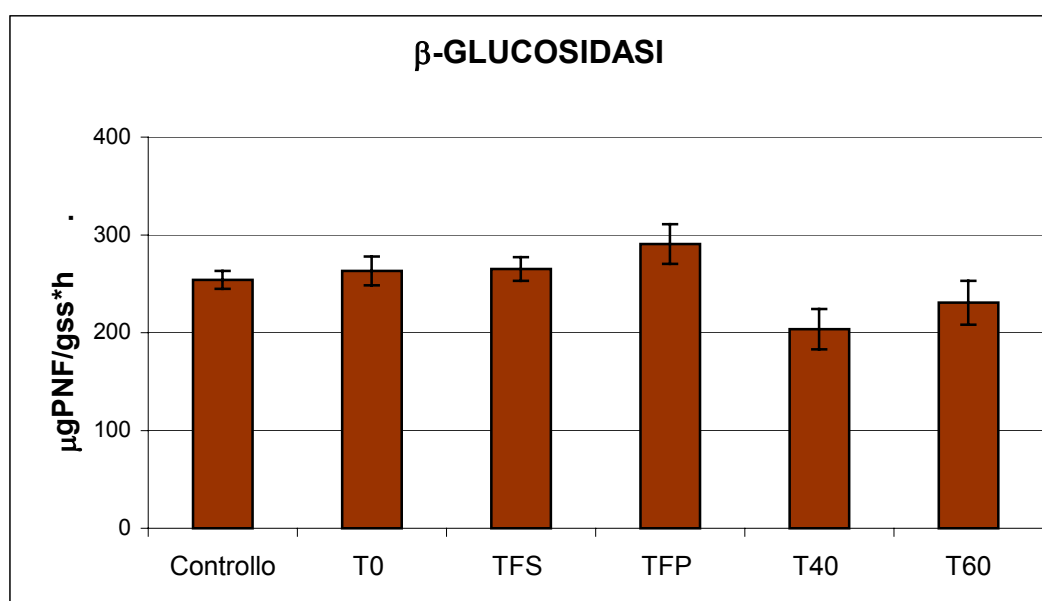


Figura 6.20: Valori medi di  $\beta$ -glucosidasi nel terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### 7.3.3 Ureasi

L'ureasi è un enzima che catalizza l'idrolisi dell'urea, un intermedio del ciclo dell'azoto, in ammoniaca ed anidride carbonica.

I valori (Figura 6.21) risultano più bassi rispetto al controllo ( $p < 0,05$ ), inoltre l'andamento di tale attività mostra valori più bassi in corrispondenza delle concentrazioni più alte di ammoniaca (Figura 6.4). L'azoto ammoniacale infatti, essendo il prodotto della reazione catalizzata dall'ureasi, potrebbe costituire un inibitore della sintesi e/o della attività di questo enzima.

La correlazione tra ureasi ed ammoniaca risulta positiva ( $0,05 < p < 1,5$ ).

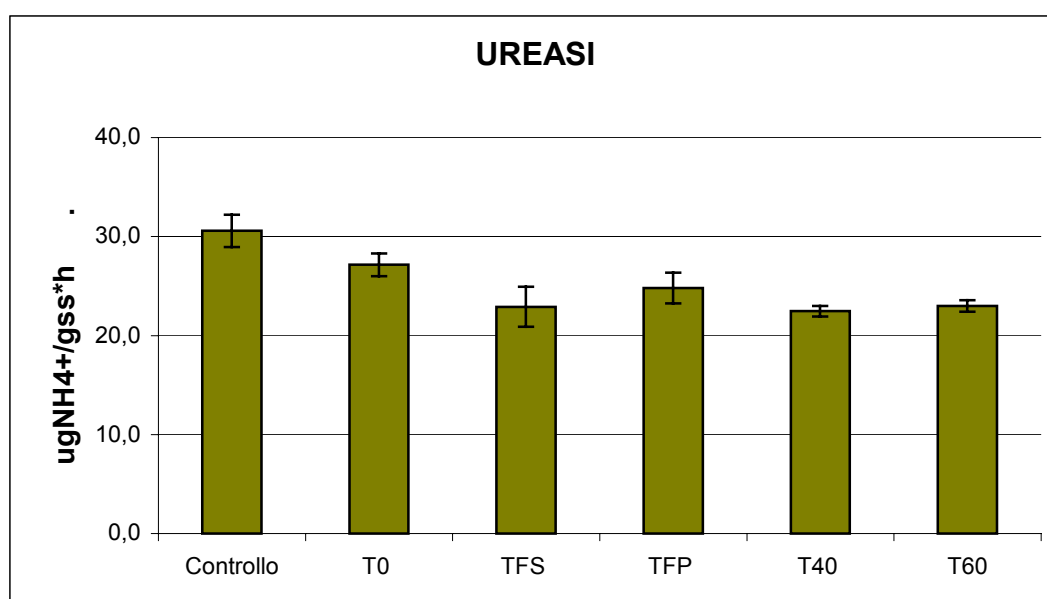


Figura 6.21: Valori medi di ureasi nel terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### 7.3.4 Proteasi

L'attività proteasica del suolo è responsabile della degradazione dell'azoto contenuto nelle proteine a peptidi e ad aminoacidi. Tali enzimi rivestono un ruolo importante nel ciclo dell'azoto in quanto trasformano l'azoto proteico in azoto ammoniacale che viene trattenuto dalle particelle del terreno per poi essere assorbito dalle radici delle piante per contatto diretto o dopo essere stato trasformato a nitrato.

I valori (Figura 6.22) risultano tutti, ad esclusione del trattamento con T<sub>0</sub> più bassi rispetto al controllo ( $p < 0,05$ ). Molto probabilmente anche in questo caso si è verificata un'inibizione da prodotto.

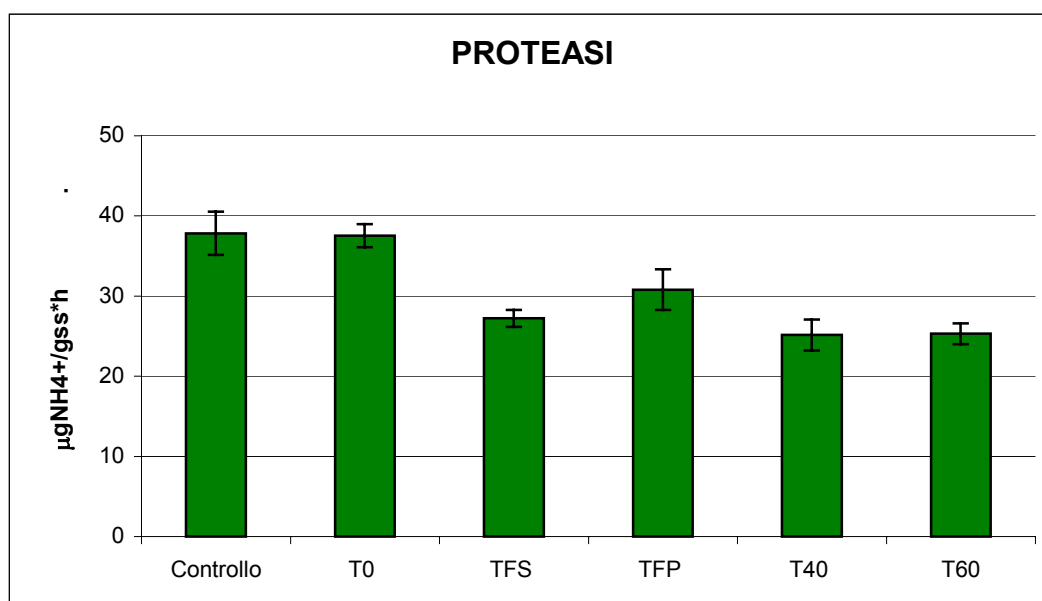


Figura 6.22: Valori medi di proteasi nel terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### 7.3.5 Fosfatasi

Le piante possono assumere alcune forme di fosforo organico dal suolo, comunque la maggior parte di fosforo organico deve prima subire un'idrolisi enzimatica a fosforo inorganico per poter essere assorbito dalle piante (Pant, 2000).

Le fosfatasi comprendono un gruppo di enzimi che catalizzano l'idrolisi sia di esteri che di anidridi dell'acido ortofosforico a fosfato. L'attività fosfatasica consiste nell'idrolisi del fosfato in forma organica o legato alle argille a fosforo minerale rendendolo disponibile per le piante.

Anche la fosfatasi (Figura 6.23) in tutti i trattamenti risulta più bassa rispetto al controllo. Questo andamento può essere spiegato dalla correlazione negativa ( $p < 0,05$ ) fra questo parametro e i fosfati, in quanto l'attività della fosfatasi può essere inibita dal prodotto di reazione (Nannipieri et al., 1990).

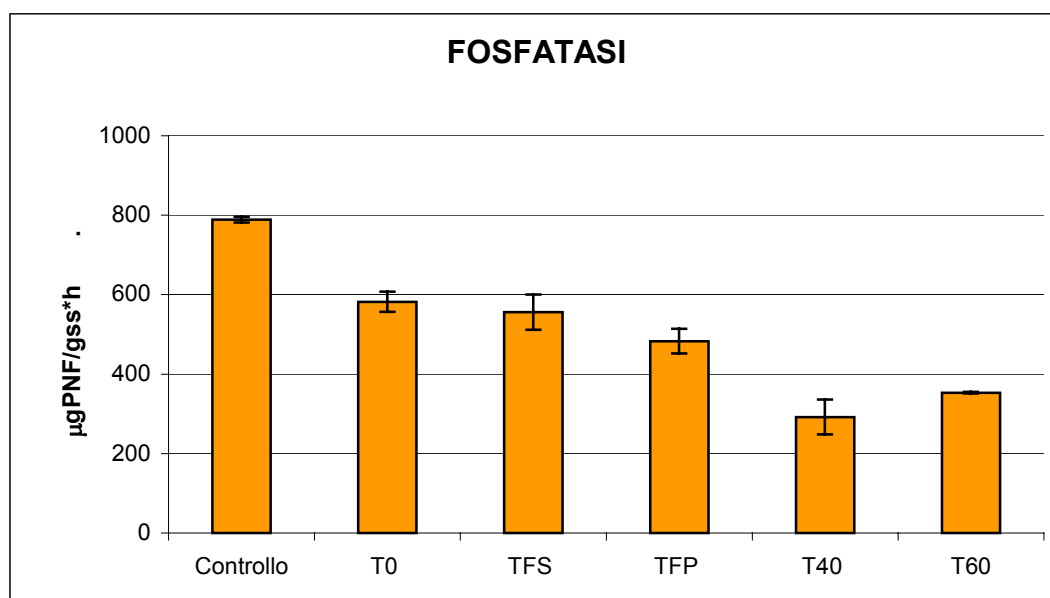


Figura 6.23: Valori medi di fosfatasi nel terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### 7.3.6 Ureasi extracellulare

I valori di ureasi extracellulare (Figura 6.24) dopo trattamento risultano più alti del controllo ( $p < 0,05$ ).

La correlazione positiva ( $p < 0,05$ ) con l'ureasi totale suggerisce che questo enzima è prevalentemente di natura microbica visto che non esiste alcuna relazione con la sostanza umica stabile.

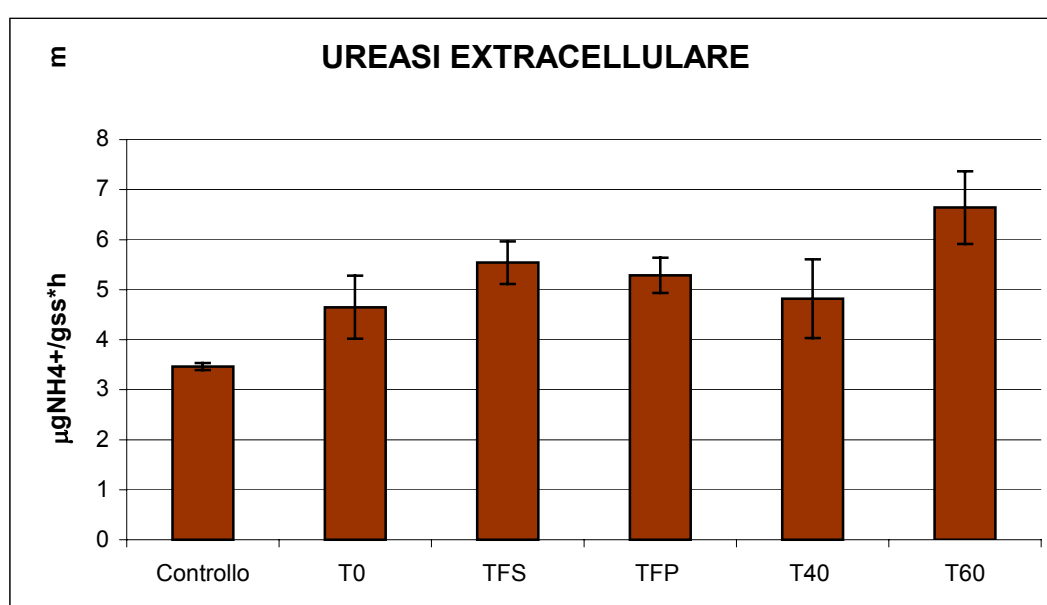


Figura 6.24: Valori medi di ureasi extracellulare nel terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### 7.3.7 proteasi extracellulare

L'andamento di questa attività (Figura 6.25) segue tendenzialmente quello del carbonio umico (Figura 6.10) dimostrando la formazione del complesso umo-enzimatico come suggerisce anche la correlazione positiva tra proteasi extracellulare e carbonio umico ( $0,5 < p < 1,5$ ).

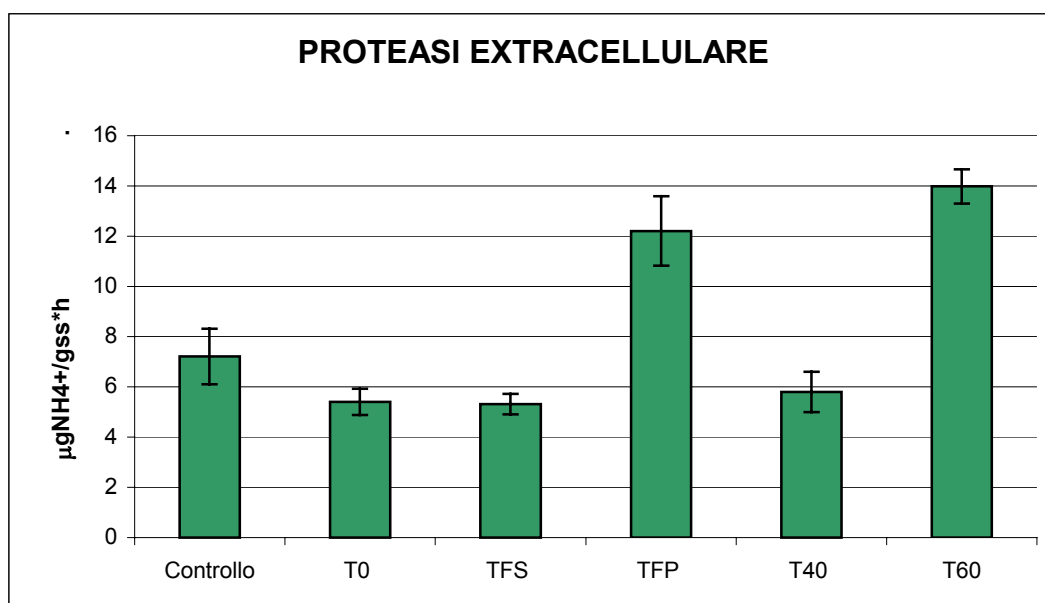


Figura 6.25: Valori di proteasi extracellulare nel terreno dopo fertirrigazione con: **Controllo**: acqua potabile; **T0**: percolato tal quale; **TFS**: percolato trattato su filtro suolo-sabbioso; **TFP**: percolato trattato su filtro suolo-pianta; **T40-T60**: percolato aerato per 40 e 60 giorni.

### 7.3.8 β-glucosidasi e fosfatasi extracellulare

L'attività degli enzimi extracellulari β-glucosidasi e fosfatasi non è stata rilevata dall'analisi, molto probabilmente ciò è dovuto a fenomeni di inibizione o ad un problema analitico d'interferenza del percolato con i prodotti delle attività enzimatiche (ad esempio il para-nitro-fenolo).



## 6.4 Analisi delle Componenti Principali

Con l'Analisi delle Componenti Principali sono state isolate le prime tre componenti che spiegano l'80% della varianza totale del set di dati (Tabella 6.1) e contengono l'informazione relativa alle caratteristiche chimiche e metaboliche dei terreni trattati con i diversi tipi di percolato stabilizzato.

Variabile	Fattore 1	Fattore 2	Fattore 3
PH	<b>-0,707</b>	-0,456	0,372
EC (conducibilità elettrica)	<b>-0,766</b>	0,187	0,345
NH <sub>3</sub>	<b>-0,884</b>	0,317	0,209
FW (biomassa fresca)	0,118	<b>0,701</b>	0,000
DW (biomassa secca)	0,485	<b>0,689</b>	-0,281
Nitrati	<b>0,666</b>	0,281	-0,672
Solfati	-0,284	<b>0,911</b>	-0,034
Cloruri	-0,163	<b>0,949</b>	0,084
Fosfati	<b>0,839</b>	-0,349	0,339
Deidrogenasi	-0,0658	0,169	0,558
β-glucosidasi	<b>0,955</b>	0,126	-0,052
Fosfatasi	0,570	<b>-0,716</b>	-0,153
Ureasi	-0,504	0,218	0,315
Proteasi	-0,134	<b>-0,879</b>	-0,230
Ureasi extracellulare	-0,306	<b>0,865</b>	-0,099
Proteasi extracellulare	-0,047	0,574	0,602
P totale	0,043	0,065	<b>0,911</b>
P assimilabile	<b>0,699</b>	0,675	0,012
C estraibile tot	<b>0,777</b>	-0,332	-0,018
C Fulvico	<b>0,768</b>	-0,022	-0,527
C Umico	-0,325	-0,29	<b>0,788</b>
CF/CU	0,348	0,173	<b>-0,916</b>
C idrosolubile	<b>0,842</b>	0,484	-0,181
C tot	0,201	<b>0,809</b>	-0,123
N tot	<b>-0,956</b>	-0,078	0,179
C/N	<b>0,862</b>	0,478	-0,148
Var. Sp.	<b>9,31</b>	<b>7,50</b>	<b>4,49</b>
Prp. Tot.	<b>0,36</b>	<b>0,29</b>	<b>0,17</b>

Tabella 6.1: Tabella dei loadings.

Al fine di correlare tra loro i vari parametri ed i trattamenti nonché di posizionarli nello spazio, il grafico degli *scores* (rappresentazione dei campioni) è stato sovrapposto a quello dei *loadings* (rappresentazione del peso di ciascuna variabile) (Figura 6.26).

Dall'Analisi delle Componenti Principali si evince che tutti i trattamenti sono diversi dal controllo. Inoltre si osserva la netta separazione tra le prove di fertirrigazione con:

- percolato stabilizzato mediante insufflazione d'aria ( $T_{40}$  e  $T_{60}$ );
- percolato depurato mediante filtro suolo-sabbioso e filtro suolo-pianta ( $T_{FS}$  e  $T_{FP}$ );
- percolato non trattato ( $T_0$ ).

Nello specifico i trattamenti con percolato derivante dalla vasca di aerazione ( $T_{40}$  e  $T_{60}$ ) risultano essere collegati all'azoto totale ed ammoniacale lasciando presupporre uno stimolo della mineralizzazione dell'azoto nel terreno da parte di questa tipologia di percolato; i trattamenti con percolato derivante dai filtri ( $T_{FS}$  e  $T_{FP}$ ), invece, risultano correlati con gli elementi prontamente disponibili per i microrganismi e per le piante (P assimilabile, C idrosolubile, nitrati, fosfati) e con la  $\beta$ -glucosidasi, indicando un'attivazione del ciclo del carbonio che trasforma la sostanza organica più o meno labile in substrati disponibili per i microrganismi.

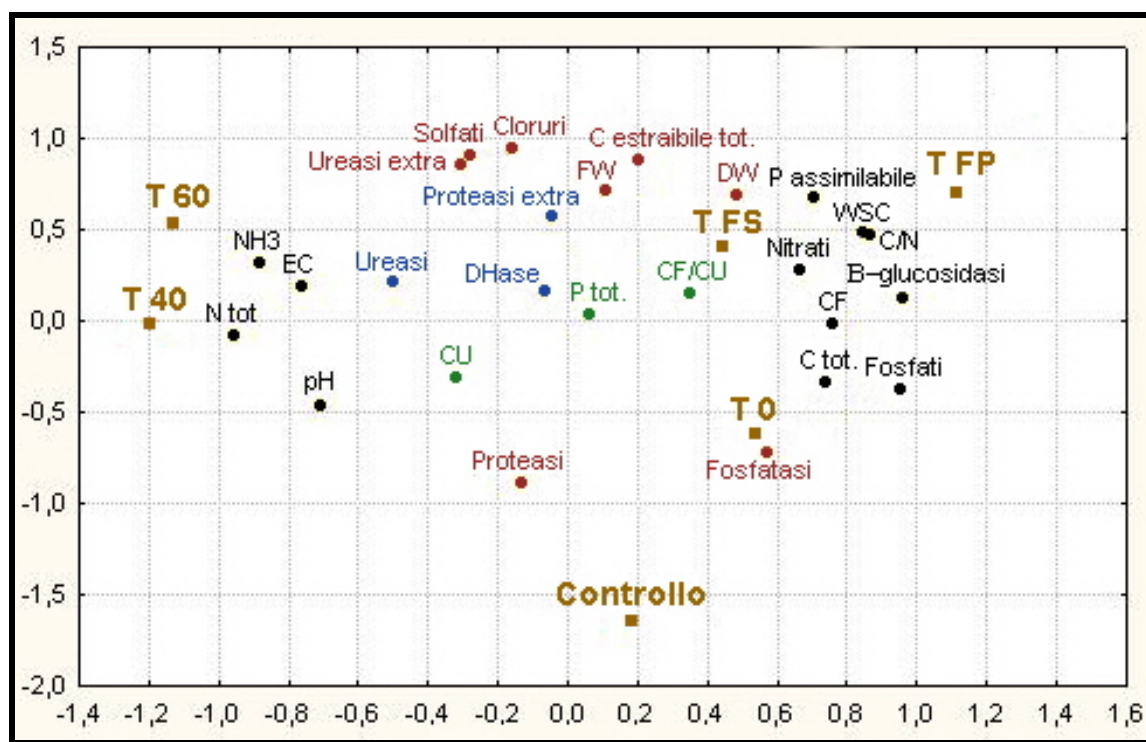


Figura 6.26: Analisi delle Componenti Principali (PCA).

## **7 CONCLUSIONI**

I risultati derivanti dalla sperimentazione mettono in evidenza il possibile utilizzo in fertirrigazione di percolato stabilizzato sia attraverso insufflazione d'aria che attraverso il sistema filtrante suolo-pianta, in quanto è stato osservato un buon sviluppo di biomassa vegetale grazie all'attivazione dei cicli degli elementi principali (carbonio, azoto e fosforo) che favoriscono il rilascio di nutrienti minerali.

Inoltre le diminuzioni delle attività enzimatiche dopo trattamento del terreno con percolato suggeriscono, rispetto al terreno di controllo, l'instaurarsi di un equilibrio tra l'attivazione dei processi metabolici e il rilascio di nutrienti, fenomeno che avviene in modo regolare e tale da non causare problemi d'inquinamento.

Una precipua attenzione deve essere posta ai trattamenti esclusivamente aerobici che, avendo una maggiore salinità ed un minor contenuto di nutrienti organici e minerali, potrebbero alterare i processi di turn-over della sostanza organica del terreno.

In particolare, il miglior trattamento dal punto di vista agronomico ed ecologico-funzionale del terreno risulta essere quello con percolato depurato attraverso il filtro suolo-pianta. Infatti tale percolato arricchisce il terreno di elementi nutritivi prontamente utilizzabili dalla pianta, quali fosforo assimilabile, nitrati e fosfati; inoltre l'adeguato apporto di carbonio idrosolubile stimola i processi metabolici legati al ciclo del carbonio messi in evidenza dalla buona risposta della  $\beta$ -glucosidasi.

## **Appendice**

Di seguito è riportata la matrice di correlazione dei parametri chimici e biochimici valutati. I valori di correlazione riportati in tabella sono significativi con  $p < 0,05$ .

Variabile	pH	EC conducibilità elettrica	NH <sub>3</sub>	FW biomassa fresca	DW biomassa secca	P tot.
pH	1,00	0,39	0,47	-0,22	-0,67	0,30
EC (conducibilità elettrica)	0,39	1,00	0,93	-0,15	-0,44	0,24
NH <sub>3</sub>	0,47	0,93	1,00	0,10	-0,27	0,10
FW (biomassa fresca)	-0,22	-0,15	0,10	1,00	0,86	-0,14
DW (biomassa secca)	-0,67	-0,44	-0,27	0,86	1,00	-0,34
Nitrati	-0,55	0,16	0,30	0,54	0,64	-0,27
Solfati	-0,88	-0,64	-0,60	0,31	0,74	-0,63
Cloruri	-0,22	-0,69	-0,81	0,02	0,17	0,29
Fosfati	-0,13	0,27	0,50	0,81	0,62	-0,04
Deidrogenasi	0,21	0,18	0,09	-0,29	-0,37	0,84
β-glucosidasi	-0,83	-0,62	-0,74	0,21	0,58	-0,08
Fosfatasi	-0,19	-0,53	-0,68	-0,32	-0,08	-0,31
Ureasi	0,12	-0,29	-0,51	-0,50	-0,41	0,13
Proteasi	-0,08	-0,38	-0,64	-0,64	-0,41	0,14
Ureasi extracellulare	-0,36	0,56	0,62	0,44	0,41	-0,10
Proteasi extracellulare	-0,12	0,53	0,49	0,52	0,31	0,38
P totale	0,30	0,24	0,10	-0,14	-0,34	1,00
P assimilabile	-0,86	-0,33	-0,39	0,39	0,70	0,14
C estraibile totale	-0,60	-0,40	-0,65	-0,26	0,10	-0,10
C fulvico	-0,85	-0,63	-0,75	-0,17	0,35	-0,38
C umico	0,63	0,53	0,44	-0,03	-0,43	0,51
CF/CU	-0,69	-0,52	-0,44	0,09	0,50	-0,78
C idrosolubile	-0,90	-0,61	-0,64	0,34	0,73	-0,04
C totale	-0,53	-0,12	-0,04	0,33	0,50	0,17
N totale	0,81	0,73	0,81	-0,23	-0,62	0,20
C/N	-0,87	-0,64	-0,66	0,41	0,77	-0,04

Variabile	P assimilabile	C idrosolubile	Nitrati	Solfati	Cloruri	Fosfati
pH	-0,86	-0,90	-0,55	-0,88	-0,22	-0,13
EC (conducibilità elettrica)	-0,33	-0,61	0,16	-0,64	-0,69	0,27
NH <sub>3</sub>	-0,39	-0,64	0,30	-0,60	-0,81	0,50
FW (biomassa fresca)	0,39	0,34	0,54	0,31	0,02	0,81
DW (biomassa secca)	0,70	0,73	0,64	0,74	0,17	0,62
Nitrati	0,59	0,46	1,00	0,46	-0,54	0,82
Solfati	0,64	0,80	0,46	1,00	0,23	0,10
Cloruri	0,30	0,45	-0,54	0,23	1,00	-0,50
Fosfati	0,35	0,17	0,82	0,10	-0,50	1,00
Deidrogenasi	0,20	0,04	-0,01	-0,49	0,00	0,04
β-glucosidasi	0,76	0,86	0,08	0,75	0,72	-0,17
Fosfatasi	-0,12	0,12	-0,64	0,34	0,68	-0,79
Ureasi	-0,27	-0,12	-0,88	-0,10	0,72	-0,89
Proteasi	-0,08	0,08	-0,77	0,05	0,71	-0,94
Ureasi extracellulare	0,42	0,18	0,89	0,14	-0,66	0,80
Proteasi extracellulare	0,33	0,07	0,31	-0,19	-0,04	0,52
P totale	0,14	-0,04	-0,27	-0,63	0,29	-0,04
P assimilabile	1,00	0,94	0,59	0,64	0,30	0,35
C estraibile totale	0,37	0,49	-0,30	0,50	0,68	-0,61
C fulvico	0,60	0,77	0,17	0,85	0,38	-0,33
C umico	-0,48	-0,62	-0,56	-0,76	0,13	-0,14
CF/CU	0,37	0,56	0,49	0,89	-0,10	0,06
C idrosolubile	0,94	1,00	0,46	0,80	0,45	0,17
C totale	0,76	0,66	0,79	0,36	-0,20	0,61
N totale	-0,70	-0,85	-0,07	-0,81	-0,72	0,18
C/N	0,93	0,99	0,43	0,80	0,50	0,19



Variabile	C estraibile totale	C fulvico	C umico	CF/CU	C totale	N totale
pH	-0,60	-0,85	0,63	-0,69	-0,53	0,81
EC(conducibilità elettrica)	-0,40	-0,63	0,53	-0,52	-0,12	0,73
NH <sub>3</sub>	-0,65	-0,75	0,44	-0,44	-0,04	0,81
FW (biomassa fresca)	-0,26	-0,17	-0,03	0,09	0,33	-0,23
DW (biomassa secca)	0,10	0,35	-0,43	0,50	0,50	-0,62
Nitrati	-0,30	0,17	-0,56	0,49	0,79	-0,07
Solfati	0,50	0,85	-0,76	0,89	0,36	-0,81
Cloruri	0,68	0,38	0,13	-0,10	-0,20	-0,72
Fosfati	-0,61	-0,33	-0,14	0,06	0,61	0,18
Deidrogenasi	-0,31	-0,21	0,06	-0,45	0,49	0,31
B-glucosidasi	0,83	0,78	-0,30	0,40	0,19	-0,98
Fosfatasi	0,82	0,51	0,06	0,20	-0,64	-0,60
Ureasi	0,71	0,21	0,41	-0,25	-0,73	-0,34
Proteasi	0,80	0,45	0,16	-0,07	-0,51	-0,44
Ureasi extracellulare	-0,32	-0,10	-0,17	0,15	0,58	0,16
Proteasi extracellulare	0,00	-0,37	0,54	-0,48	0,11	-0,01
P totale	-0,10	-0,38	0,51	-0,78	0,17	0,20
P assimilabile	0,37	0,60	-0,48	0,37	0,76	-0,70
C estraibile totale	1,00	0,73	-0,06	0,25	-0,25	-0,80
C fulvico	0,73	1,00	-0,72	0,78	0,28	-0,82
C umico	-0,06	-0,72	1,00	-0,91	-0,63	0,39
CF/CU	0,25	0,78	-0,91	1,00	0,36	-0,50
C idrosolubile	0,49	0,77	-0,62	0,56	0,66	-0,85
C totale	-0,25	0,28	-0,63	0,36	1,00	-0,17
N totale	-0,80	-0,82	0,39	-0,50	-0,17	1,00
C/N	0,49	0,73	-0,57	0,52	0,62	-0,87

Variabile	C/N	Deidro genasi	$\beta$ - glucosi dasi	Fosfatasi	Ureasi	Proteasi
pH	-0,87	0,21	-0,83	-0,19	0,12	-0,08
EC (conducibilità elettrica)	-0,64	0,18	-0,62	-0,53	-0,29	-0,38
NH <sub>3</sub>	-0,66	0,09	-0,74	-0,68	-0,51	-0,64
FW (biomassa fresca)	0,41	-0,29	0,21	-0,32	-0,50	-0,64
DW (biomassa secca)	0,77	-0,37	0,58	-0,08	-0,41	-0,41
Nitrati	0,43	-0,01	0,08	-0,64	-0,88	-0,77
Solfati	0,80	-0,49	0,75	0,34	-0,10	0,05
Cloruri	0,50	0,00	0,72	0,68	0,72	0,71
Fosfati	0,19	0,04	-0,17	-0,79	-0,89	-0,94
Deidrogenasi	0,00	1,00	-0,23	-0,53	-0,18	-0,03
B-glucosidasi	0,87	-0,23	1,00	0,55	0,35	0,45
Fosfatasi	0,14	-0,53	0,55	1,00	0,88	0,85
Ureasi	-0,09	-0,18	0,35	0,88	1,00	0,94
Proteasi	0,08	-0,03	0,45	0,85	0,94	1,00
Ureasi extracellulare	0,15	0,02	-0,09	-0,70	-0,80	-0,75
Proteasi extracellulare	0,10	0,04	0,13	-0,33	-0,20	-0,33
P totale	-0,04	0,84	-0,08	-0,31	0,13	0,14
P assimilabile	0,93	0,20	0,76	-0,12	-0,27	-0,08
C estraibile totale	0,49	-0,31	0,83	0,82	0,71	0,80
C fulvico	0,73	-0,21	0,78	0,51	0,21	0,45
C umico	-0,57	0,06	-0,30	0,06	0,41	0,16
CF/CU	0,52	-0,45	0,40	0,20	-0,25	-0,07
C idrosolubile	0,99	0,04	0,86	0,12	-0,12	0,08
C totale	0,62	0,49	0,19	-0,64	-0,73	-0,51
N totale	-0,87	0,31	-0,98	-0,60	-0,34	-0,44
C/N	1,00	0,00	0,87	0,14	-0,09	0,08

Variabile	Ureasi extracellulare	Proteasi extracellulare
pH	-0,36	-0,12
EC (conducibilità elettrica)	0,56	0,53
NH <sub>3</sub>	0,62	0,49
FW (biomassa fresca)	0,44	0,52
DW (biomassa secca)	0,41	0,31
Nitrati	0,89	0,31
Solfati	0,14	-0,19
Cloruri	-0,66	-0,04
Fosfati	0,80	0,52
Deidrogenasi	0,02	0,04
B-glucosidasi	-0,09	0,13
Fosfatasi	-0,70	-0,33
Ureasi	-0,80	-0,20
Proteasi	-0,75	-0,33
Ureasi extracellulare	1,00	0,60
Proteasi extracellulare	0,60	1,00
P totale	-0,10	0,38
P assimilabile	0,42	0,33
C estraibile totale	-0,32	0,00
C fulvico	-0,10	-0,37
C umico	-0,17	0,54
CF/CU	0,15	-0,48
C idrosolubile	0,18	0,07
C totale	0,58	0,11
N totale	0,16	-0,01
C/N	0,15	0,10

Di seguito è riportata l'Analisi della Varianza (ANOVA) ad una via relativa ai parametri chimici e biochimici. Le differenze sono considerate significative quando  $p < 0,05$ . Sono inoltre riportati i risultati del test a posteriori SNK.

Parametri	Test F	p	SNK
<b>NH<sub>3</sub></b>	74,0	0,00	TFP=Controllo=T0=TFS <T40<T60
<b>N totale</b>	18,3	0,00	TFP=TFS<T0=Controllo<T60=T40
<b>C totale</b>	5,17	0,01	Controllo<T60=T40=T0=TFS=TFP
<b>P assimilabile</b>	12,0	0,00	Controllo=T40=T60<T0=TFS<TFP
<b>P totale</b>	2,31	0,11	TFS=Controllo=T60=T0=T40=TFP
<b>C estraibile totale</b>	8,96	0,00	T40<T60=TFS=TFP=Controllo=T0
<b>C Fulvico</b>	4,69	0,01	T40=T60<Controllo<TFP<T0=TFS
<b>C Umico</b>	2,95	0,06	TFS<T0<TFP=T40<T60=Controllo
<b>C idrosolubile</b>	10,5	0,00	T40=Controllo=T60<T0=TFS<TFP
<b>Biomassa fresca</b>	2,06	0,05	T0<Controllo=T40=T60<TFS=TFP
<b>Biomassa secca</b>	2,19	0,12	T0=T40=Controllo=T60=TFS=TFP
<b>Deidrogenasi</b>	3,65	0,03	TFS=Controllo=T60<T0=TFP=T40
<b>β-glucosidasi</b>	5,61	0,01	T40=T60<Controllo=T0=TFS<TFP
<b>Ureasi</b>	8,41	0,00	T40=TFS=T60=TFP=T0<Controllo
<b>Proteasi</b>	12,3	0,00	T40=T60=TFS=TFP<T0=Controllo
<b>Fosfatasi</b>	66,5	0,00	T40=T60<TFP<TFS=T0<Controllo
<b>Proteasi extracellulare</b>	63,9	0,00	TFS=T0=T40=Controllo<TFP<T60
<b>Ureasi extracellulare</b>	10,3	0,00	Controllo<T0=T40=TFS=TFP<T60
<b>Nitrati</b>	5,74	0,01	T40=T60=Controllo=T0<TFP<TFS
<b>Solfati</b>	86,3	0,00	Controllo=T0<TFS=T40=TFP=T60
<b>Fosfati</b>	2,86	0,06	T60=T40=TFS=T0=Controllo=TFP
<b>Cloruri</b>	4,08	0,02	Controllo<T0=T40<TFP=T60=TFS

## **Bibliografia**

**Alibardi L.**, *Tecnologie di trattamento del percolato*.

<<http://www.image.unipd.it>>, 2004–2005.

**Baroncelli P., Landi S.**, *Nutrizione minerale delle piante e fertilizzanti*.

<[www.clamerinforma.it](http://www.clamerinforma.it)>

**Benedetti A., Gianfreda L. (a cura di) (2004)**. *Metodi di analisi biochimica del suolo*. Franco Angeli editore.

**Bianchi A., (2006)**. “Studio di un processo di stabilizzazione del percolato da discarica: aspetti chimici, chimico-fisici e biologici”, Tesi di laurea non pubblicata, Università degli studi di Pisa.

**Bracco Valeria**, *Concimare quando serve e dove serve*.

<<http://www.torinoscienza.it>>, 2005.

**Caldwell B., A., (2005)**. “Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review”. *Pedobiologia*, 49, pagg. 637–644.

**Ceccanti B., Calcinaì M., Bonmati-Pont M., Ciardi C., Tarsitano R., (1989)**.

“Molecular size distribution of soil humic substance with ionic strength”. *The Science of the Total Environment*, 81/82, pagg. 471–479.

**Ceccanti B., Garcia C., Nogales R., Benitez E., Masciandaro G., (1997)**.

“Attività e ruolo delle sostanze umiche nell’ambiente: aspetti chimico-strutturali e biochimici”. Atti del convegno IHSS, 12–13 dicembre 1996, Udine.

- Ceccanti B., Masciandaro G., Balloi A., (2005).** “*Caratterizzazione degli scarti della raffinazione del compost (SRC) e prove simulative di bio-stabilità per il suo conferimento in discarica*”. Rapporto tecnico.
- Cervelli M., (2005).** “La discarica controllata di Buriano. Studio dell'interazione geochimica tra il percolato e la formazione di contenimento.”, Tesi di laurea non pubblicata, Università degli studi di Pisa.
- Chen C.R., Condon L.M., Davis M.R., Sherlock R.R., (2004).** “Effects of plant species on microbial biomass phosphorus and phosphatase activity in a range of grassland soils”. *Biol Fertil Soils*, 40, pagg. 313–322.
- Ercoli L., Mariotti M., Arduini I., Masoni A., Bonari E., (1999).** *Ecologia Agraria. II. Funzionalità dell'ecosistema*. Azienda regionale D.S.U.–Pisa.
- Ehrig H.J. ,(1989).** “Quality and quantity of sanitary landfill leachate”. *Waste mangement & Reserach*, 1.
- Fuligni P., Rognini P., (2005).** *Manuale di ecologia urbana e sociale*. Milano, Franco Angeli editore.
- Garcia C, Hernandez T., (1996).** “Influence of salinity on the biological and biochemical activity of a calciorthird soil”. *Plant Soil*, 178 (2), pagg.255–263.
- Garcia C., Gil F., Fernandez T., Cepeda C., (2003).** *Tecnicas de analisis de parametros bioquimicos en suelos: medida de actividades enzimaticas y biomasa microbiana*. Ediciones Mundi–Prensa.
- Gros R., Poly F., Monrozier L. J., Faivre P., (2003).** “Plant and soil microbial community responses to solid waste leachates diffusion on grassland. *Plant and soil*, 225, pagg. 445–455.

- Hernandez A. J., Adarve M. J., Gil A., Pastor J., (1998).** "Soil salination from landfill leachate effects on the macronutrient content and plant growth of four grassland species". *Chemosphere*, Vol. 38, No. 7, pagg. 1693–1711.
- Irene M. C. Lo, (1996).** "Characteristic and treatment of leachates from domestic landfills". *Environment International*, Vol. 22, No 4, pagg. 433–442.
- Jones D.L., Williamson K.L., Owen A.G. (2005).** "Phytoremediation of landfill leachate". *Waste Management*, 26, pagg.825–837.
- Kadlec R.H., (1995).** "Overview: Surface flow constructed wetlands", *Wat. Sci. Tech.*, vol. 32, n°3, pag. 1-12.
- Marzialetti Paolo (a cura di).** *La fertirrigazione*.  
<<http://www.cespevi.it/art/fertirr.htm>>, 1999.
- Masciandaro G., Ceccanti B., Garcia C., (1995-96).** "Acque reflue e sostanze umiche in un microsistema suolo-radice". Progetto congiunto CNR/CISC 1995–96 Italia–Spagna.
- Masciandaro G., Ceccanti B., Garcia C., (1996).** "Soil agro–ecological management: fertirrigation and vermicompost treatments". *Bioresource Technology*, 59 (1997), pagg. 199–206.
- Masciandaro G., Ceccanti B., Gallardo-Lancho J.F., (1998).** "Organic matter in cultivated versus set–aside arable soils". *Agriculture Ecosystems and Environment*, 67, pagg. 267–274.
- Masciandaro G., Ceccanti B., (1999).** "Assessing soil quality in different agro–ecosystems through biochemical and chemico–structural properties of humic substance". *Soil & Tillage Research*, 51, pagg. 129–137.



- Masciandaro G., Ceccanti B., Ronchi V., Benedicto S., Howard L. (2002).** “Humic substances to reduce salt effect on plant germination and growth”. *Soil Sci Plant Anal.*, 33(3&4), pagg.365–378.
- Masoni A., Ercoli L., Bonari E., Mariotti M., (1999).** *Ecologia Agraria. I. Struttura dell'ecosistema.* Azienda regionale D.S.U.–Pisa.
- Masotti L., (2002).** *Depurazione delle acque – tecniche ed impianti per il trattamento delle acque di rifiuto.* Bologna, Calderini.
- Maurice C., Ettala M., Lagerkvist A., (1998).** “Effects of leachate irrigation on landfill vegetation and subsequent methane emissions”. *Water, Air and Soil Pollution*, 113, pagg. 203–216.
- Mauseth, (2000).** *Botanica, fondamenti di biologia delle piante.* Bologna, nuova Editoriale Grasso.
- Nannipieri P., Grego S., Ceccanti B., (1990).** *Ecological significance of the biological activity in soil.* Soil Biochem. New York , Marcel Dekker, Vol.6, pagg. 293–355.
- Nannipieri P., Sequi P., Fusi P., (1996).** “Humus and enzyme activity”, in Piccolo A., *Humus substances in terrestrial ecosystem.*
- Pant H.K., Warman P.R., (2003).** “Enzymatic hydrolysis of soil organic phosphorus by immobilized phosphatases”. *Biol Fertil Soil*, 30, pagg.306–311.
- Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P., (2001).** *The Rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil–plant interface.* New York, Marcel Dekker.

**Schulten H. R., Schnitzer M., (1998).** “The chemistry of soil organic nitrogen: a review”. *Biol Fertil Soils*, 26, pagg. 1–15.

**Sequi P. (a cura di), (1989).** *Chimica del suolo*. Bologna. Patron editore.

**Tyrrel, S.F., Leeds-Harrison P.B., Harrison K.,S. (2002).** “Removal of ammoniacal nitrogen from landfill leachate by irrigation onto vegetated tretment planes”. *Water Research*, 36, pagg. 291–299.

**Violante P. (a cura di) (2000).** *Metodi di analisi chimica del suolo*. Franco Angeli editore.

**Wiszniowski J., Robert D.,Surmacz-Gorska J., Miksch K., Weber J. V., (2006).** “Landfill leachate treatment methods: a review”. *Envirom Chem Lett*, 4, pagg. 51–61.

### ***Riferimenti legislativi***

**Decreto Legislativo 5 febbraio 1997, n. 22,** “Attuazione delle direttive 91/156/CEE sui rifiuti, 91/689/CEE sui rifiuti pericolosi e 94/62/CE sugli imballaggi e sui rifiuti d’imballaggio”, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 38 del 15 marzo 1997 – Supplemento Ordinario n. 33.

**Decreto Legislativo 13 gennaio 2003, n. 36,** “Attuazione della direttiva 1999/31/CE relativa alle discariche di rifiuti”, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 59 del 12 marzo 2003 – Supplemento Ordinario n. 40.

**Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152**, "Norme in materia ambientale",  
pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 88 del 14 aprile 2006 –  
Supplemento Ordinario n. 96.

**Decreto Ministeriale 2 maggio 2006**, "Norme tecniche per il riutilizzo delle  
acque reflue, ai sensi dell'articolo 99, comma 1, del decreto legislativo 3  
aprile 2006, n. 152", pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n.108 del 11  
maggio 2006.

***Siti internet consultati***

<[www.leachate.co.uk](http://www.leachate.co.uk)>

<[www.leachate-irrigation.com](http://www.leachate-irrigation.com)>

## Ringraziamenti

*Un sincero ringraziamento alla Dott.ssa Grazia Masciandaro ed al Dott. Brunello Ceccanti per la loro disponibilità, per le cose che mi hanno trasmesso, per avermi guidato nello svolgimento della fasi sperimentali del lavoro e per l'aiuto datomi nella stesura della tesi.*

*Ringrazio il Prof. Alessandro Saviozzi per aver accettato l'incarico di relatore e per l'aiuto datomi nella stesura della tesi.*

*Ringrazio il Dott. Guido Vigna Guidi, responsabile della Sezione di Chimica del Suolo, Istituto per lo studio degli Ecosistemi del CNR di Pisa, per avermi ospitata presso i laboratori di tale centro.*

*Un ringraziamento speciale ai miei genitori senza i quali non avrei mai raggiunto questo importante traguardo: grazie a Lidone, il mio editor di fiducia, per essersi letto tutta la tesi (senza contare quella di primo livello e tutte le relazioni elaborate durante il corso di studi); grazie a mamma per avermi sopportata e spronata!*

*Ringrazio il mio Zio Ingegnere per l'aiuto datomi per sostenere l'esame di fisica II...che fatica...*

*Un ringraziamento ad Annalisa per l'aiuto fornitomi nella fase sperimentale ed a tutte le "bimbe" della stanza 26: Cristina per avermi corretto il capitolo dei metodi (la prof. più severa che io conosca! 😊), Eleonora per l'aiuto datomi con Statistica, Serena per l'analisi del carbonio e dell'azoto totale e Cinzia.*

*Ringrazio le persone con le quali ho condiviso tutti questi anni che mi hanno condotto alle tanto “sudate carte”, in particolare Sara, Linda, Ricca, Alessia, Carlo, Ilaria, Beatrice, Stefano, Roberta, Nanni, Pepi, Claudia, Debbie, Alessio, Guidone, Matteo, Giuliano. Grazie per aver reso questo percorso meno impervio!!*

*Un grazie di cuore ad Agnese che mi ha capita, sostenuta, spronata e sopportata per più di un anno intero! Grazie amica! Senza di te sarebbe stata più dura!*

*Grazie al Davini per aver reso più leggere le giornate al CNR e grazie a Silvia Pajares Moreno per avermi spinto ad imparare lo spagnolo!*

*Infine un ringraziamento speciale a Dario per essermi stato a fianco in qualsiasi momento avendo sempre una parola di conforto e per avermi insegnato più di tanti anni di scuola. Grazie di cuore!*