

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

Corso di laurea magistrale in Analisi
e Gestione dell'Ambiente

Sviluppo di nuovi inibitori dell'enzima ureasi e loro valutazione
ai fini dell'utilizzo in agricoltura

Tesi di laurea in
Metodi Ecologici per l'Analisi e la Gestione dell'Ambiente

Relatore
Prof. Andrea Pasteris

Presentata da
Giulia Lucenti

Correlatore
Prof.ssa Chiara Samorì
Dott.ssa Elena Guidi

Sessione Unica
Anno accademico 2020/21

Sommario

1	Introduzione.....	4
1.1	L'enzima ureasi.....	4
1.2	Gli inibitori dell'ureasi.....	6
1.3	Trasformazioni dell'azoto nel terreno.....	8
1.4	L'ammoniaca come inquinante.....	10
1.5	Problema e soluzioni differenti per attenuare la perdita di ammoniaca.....	11
1.6	La pirolisi come metodo di riuso delle biomasse residuali.....	15
1.7	I principi dell'economia circolare.....	18
2.	Obiettivi.....	22
3	Materiali e metodi.....	23
3.1	Preparazione e caratterizzazione dei prodotti di pirolisi.....	23
3.1.1	Biomasse utilizzate.....	23
3.1.2	Pirolisi.....	23
3.1.3	Frazionamento.....	25
3.1.4	Caratterizzazione chimica dei prodotti di pirolisi.....	27
3.2	Misura dell'attività ureasica.....	29
3.2.1	Misura dell'attività ureasica: metodo basato sull'accumulo di ammonio nel suolo.....	29
3.2.2	Misura dell'attività ureasica: metodo basato sull'ammoniaca rilasciata in aria.....	33
3.3	Saggi di tossicità.....	36
3.3.1	Preparazione suolo artificiale.....	36
3.3.2	Lombrichi.....	38
3.3.2.1	Organismi utilizzati per saggi.....	39
3.3.2.2	Preparazione dei trattamenti.....	40
3.3.2.3	Esposizione dei lombrichi ai suoli trattati e valutazione degli effetti.....	42
3.3.2.4	disegno sperimentale.....	45
3.3.3	Avena.....	48
3.3.3.1	Organismi utilizzati per i saggi.....	48
3.3.3.2	Preparazione dei trattamenti.....	48
3.3.3.3	Disegno sperimentale.....	50
3.3.4	Crescione.....	53
3.3.4.1	Organismi utilizzati per il saggio.....	53
3.3.4.2	Procedura del saggio.....	53

3.3.5 Respirazione batterica.....	55
3.3.5.1 Procedura del saggio.....	56
3.4 Analisi dati.....	58
4. Risultati.....	59
4.1 Bilanci pirolisi.....	59
4.2 Composizione chimica e analisi dei prodotti di pirolisi.....	60
4.3 Misura dell'attività ureasica.....	62
4.3.1 Misura dell'attività ureasica basata sull'accumulo di ammonio nel suolo: frazioni solubili in acqua.....	62
4.3.2 Misura dell'attività ureasica basata sull'accumulo di ammonio nel suolo: lignine pirolitiche con supporto di biochar.....	64
4.3.3 Misura dell'attività ureasica basata sull' ammoniaca rilasciata in aria.....	66
4.4 Saggi di tossicità.....	67
4.4.1 Lombrichi.....	67
4.4.1.1 Tossicità delle lignine pirolitiche e delle frazioni solubili in acqua.....	67
4.4.1.2 Tossicità delle lignine pirolitiche con supporto di biochar.....	75
4.4.2 Avena.....	82
4.4.3 Crescione.....	93
4.5 Respirazione batterica.....	97
5. Discussione.....	98
6. Conclusioni.....	104
Bibliografia.....	106

1 Introduzione

1.1 L'enzima ureasi

L'urea è un composto chimico di formula $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ e massa molare 60,06 g/mol; allo stato puro e in condizioni standard, è un solido cristallino incolore; si tratta della diammide dell'acido carbonico (Fig. 1.1).

In tutti i tetrapodi, con l'eccezione degli uccelli e di alcuni rettili, è la sostanza tramite la quale vengono eliminati dall'organismo i prodotti azotati del metabolismo.

L'urea è anche un fertilizzante azotato, molto utilizzato per il suo alto titolo in azoto, l'80% dell'urea prodotta è destinata a questo scopo. Molti batteri presenti nel terreno infatti possiedono un enzima chiamato ureasi appartenente alla classe delle idrolasi, in grado di idrolizzare l'urea in ammoniaca e anidride carbonica, rendendo in questo modo l'azoto disponibile per le piante, tramite la reazione chimica rappresentata in figura 1.2 (Zerner, 1991).

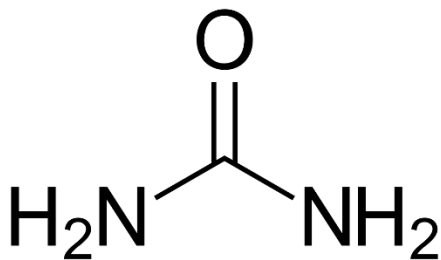


Fig. 1.1. Formula di struttura dell'urea

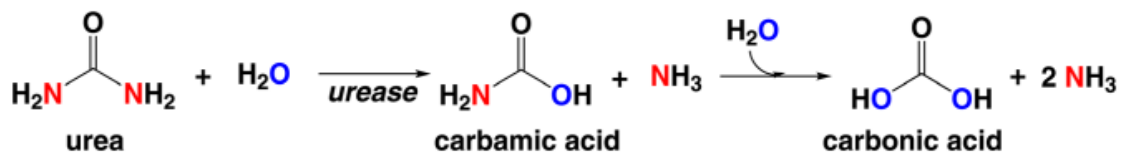


Fig. 1.2. Reazione di idrolisi totale dell'urea catalizzata dall'ureasi. L'ureasi catalizza l'idrolisi dell'urea in acido carbammico e NH_3 . Fonte: Svane et al. (2020)

L'ureasi è stato il primo enzima per cui è stata dimostrata la natura proteica. Nel 1946 James Sumner vinse il premio Nobel per la chimica per aver dimostrato che gli enzimi sono cristallizzabili e sono proteine.

La struttura delle ureasi batteriche è composta da tre subunità distinte, una grande e due più piccole, le quali formano trimeri (Krajewska, 2009). Una struttura particolare di ureasi è stata ritrovata in *Helicobacter pylori* (Fig. 1.3), dove si combinano invece due subunità alfa e beta che formano un complesso dodecamerico supramolecolare per un totale di dodici siti attivi. Questa organizzazione superiore conferisce stabilità all'enzima, che, in questo organismo, ha l'importante funzione di produrre ammoniaca per neutralizzare l'effetto degli acidi gastrici. L'ureasi ha in questi microbi un'azione citolitica nei confronti delle cellule gastriche e un ruolo infiammatorio (Ha et al, 2001).

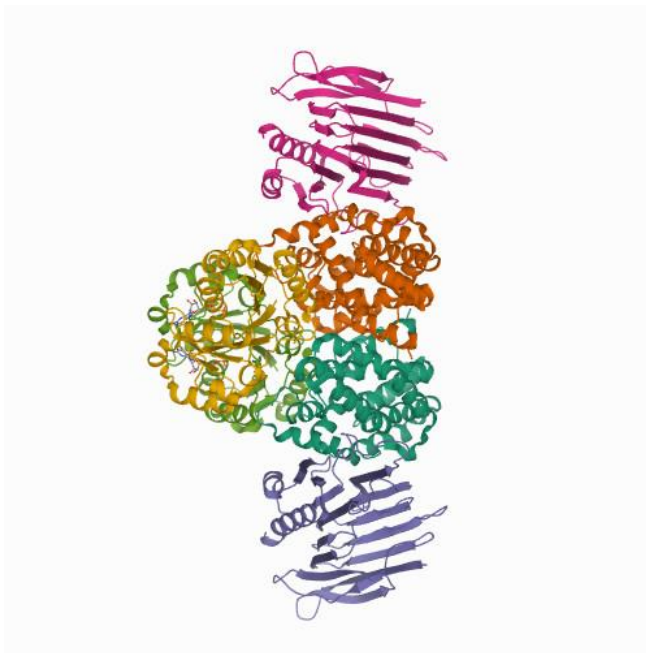


Fig.1.3. Struttura tridimensionale dell'ureasi in *Helicobacter pylori* fonte: Protein Data Bank

Oltre il 45% dell'azoto utilizzato in agricoltura è distribuito sotto forma di urea che, di conseguenza, rappresenta il concime azotato più diffuso nel mondo. Esistono tuttavia alcuni problemi legati all'impiego dell'urea in agricoltura, problemi che si concretizzano in una bassa efficienza delle concimazioni e nell'insorgenza di fenomeni di fitotossicità. Gran parte dei problemi sono determinati dall'elevata velocità con cui questo concime è idrolizzato nel suolo. L'urea, infatti, è rapidamente trasformata dalle ureasi del suolo che, attraverso l'idrolisi dei legami C-N presenti nella molecola, trasformano l'azoto ureico, non utilizzabile dalle piante, in azoto ammoniacale. Uno dei mezzi suggeriti per migliorare l'efficienza delle concimazioni a base ureica è quello d'utilizzare prodotti capaci di modulare, la trasformazione di questo concime nel terreno. In questa categoria di prodotti rientrano gli inibitori dell'ureasi.

La fertilizzazione azotata ha un ruolo strategico per il buon esito quali-quantitativo delle produzioni agricole. Purtroppo, non tutto l'azoto somministrato in un sistema agricolo viene trattenuto dal suolo o assorbito dalle piante, ma frazioni cospicue vengono perse. L'azoto che può essere perso da un sistema colturale varia in funzione di molti parametri relativi al suolo, al clima e alla gestione agricola. L'azoto può disperdersi nell'ambiente attraverso diverse vie, tra cui la volatilizzazione dell'ammoniaca, la denitrificazione e successiva emissione di N sotto forma di ossidi e la lisciviazione, che può causare l'eutrofizzazione delle acque superficiali. È stato inoltre riconosciuto, come l'utilizzo di acqua con un elevato contenuto di azoto, soprattutto nitrico, possa favorire l'insorgenza di numerose patologie umane. Se le condizioni del suolo non favoriscono la successiva trasformazione dell'ammoniaca in ione ammonio, l'ammoniaca viene rapidamente persa per volatilizzazione. Tra i principali fattori che determinano tale perdita, il pH del suolo è uno tra i più importanti. In particolare, a pH elevati, sopra 7,5, la perdita può essere notevole. Inoltre, anche la ventosità e la temperatura elevata aumentano il potenziale di volatilizzazione mentre l'interramento del fertilizzante, le precipitazioni e l'irrigazione dopo la distribuzione lo riducono. In media, le perdite di ammoniaca dai suoli si attestano al 14% dell'azoto fornito coi fertilizzanti, con maggiori perdite nei paesi a clima caldo. È inoltre stato osservato che tali perdite possono arrivare anche al 60% dell'azoto somministrato (Balsari e Gioelli, 2002.).

La riduzione delle perdite di azoto ha dunque assunto un interesse notevole per ridurre sia i costi della fertilizzazione, sia gli effetti diretti e indiretti della perdita dell'N sull'ambiente e sulla salute umana. Per questo è importante far avvenire un cambiamento di rotta e intraprendere un percorso basato sull'economia circolare. La quale favorisce in primis l'ambiente, andando a riutilizzare scarti di lavorazione derivati dalle industrie e in secondo luogo favorisce anche l'economia riutilizzando gli scarti come materia prima, molti costi vengono abbattuti e i rifiuti generati da gestire risultano notevolmente diminuiti sia in termini di volume e di costi.

1.2 Gli inibitori dell'ureasi

Il sito attivo dell'ureasi è costruito con due ioni nichel coordinati da sei residui di istidina e lisina (Benini et al., 1999). Durante la reazione il sito attivo è chiuso da un'ansa mobile che contiene cisteina. Il substrato, urea legato da ioni nichel e una rete di legami idrogeno, viene attaccato anche dai due ioni nichel.

Gli inibitori dell'ureasi possono essere suddivisi in (Rego et al,2018; Kafarsk e Talma, 2018):

- composti che coordinano gli ioni nichel
- strutture che legano la cisteina.

Gli acidi idrossiammici, fosfodiammidati, fosfonati, fosfinati e alcuni eterocicli rappresentano il primo gruppo di inibitori menzionato, mentre i composti insaturi, i derivati dell'arseleno, i chinoni e gli ioni di metalli pesanti sono membri del secondo gruppo. L'idrolisi dell'urea catalizzata dall'ureasi avviene ad una velocità 10^{15} volte superiore alla reazione non catalizzata. Si cercano quindi attivamente inibitori dell'ureasi efficienti che possano ovviare alla perdita di NH_3 . Mazzei et. al (2017) hanno descritto una caratterizzazione molecolare dell'interazione tra ureasi da *Sporosarcina pasteurii* e *Canavalia ensiformis* (jack bean) con catecolo, un polifenolo modello. Il ruolo del catecolo è quello di inibire irreversibilmente entrambe le molecole usate, tramite un processo multi-step a base di radicali, esso è stato scelto dallo studio citato, e utilizzato anche all'interno del presente lavoro di tesi, perché considerato uno degli inibitori dell'ureasi più efficace. Uno spazio sufficiente attorno a questa molecola nel sito attivo dell'enzima dà la possibilità di introdurre frammenti che dovrebbero aumentare il legame specifico alla proteina. Più in generale lo scopo degli inibitori dell'ureasi è quello di occupare il sito di attivazione dell'enzima, impedendo quindi ad un'altra molecola di urea di venire trasformata in ammoniaca. (Pagoni et al., 2009). Altri studi hanno valutato altri inibitori dell'ureasi sempre affini al catecolo, come i derivati ammidici ed esteri di acido 3,4-diidrossifenilacetico, acido caffeico, acido ferulico e acido gallico. (Pagoni et al., 2019).

Un ulteriore inibitore dell'ureasi molto conosciuto e utilizzato in campo agricolo è N(nbutil)tiofosforicotriammide classificato come Agrotain meglio conosciuto come NBPT, negli Stati Uniti a partire dalla metà degli anni '90. L' NBPT blocca fortemente tre siti attivi dell'enzima ureasi, formando un legame di natura tridentata, con due centri di nichel e un ossigeno dal ponte di carbammato che collega entrambi i metalli, riducendo la probabilità che l'urea raggiunga l'atomo di nichel. Lo studio di H. Cantarella et al del 2018, evidenzia che l'NBPT ha un effetto inibitorio molto potente, il picco di ammoniaca rilasciata in atmosfera risulta essere ritardato al settimo giorno rispetto al trattamento con la sola urea, dove vediamo il picco dopo appena 72 h. Il picco è inoltre diminuito in termini di percentuale di NH_3 volatilizzata infatti, le perdite di NH_3 sono stimate al 18%-37% con urea non trattata con inibitore, mentre tramite l'uso dell'NBPT diminuiscono e risultano essere dal 3- 5 %.

Il principio attivo dell'NBPT risulta essere efficace anche a basse concentrazioni (0.01%), è stabile durante l'immagazzinamento e inoltre si diffonde nel suolo alla stessa velocità dell'urea. Gli effetti dell'NBPT sulle perdite di ammoniaca dai suoli sono stati documentati dalla comunità scientifica (Singh et al. 2013), ad esempio hanno evidenziato come l'uso di fertilizzanti additivati con NPTB abbia consentito di ridurre le perdite di ammoniaca del 42%.

Appare dunque possibile affermare che l'impiego dell'inibitore dell'ureasi NBPT rappresenta una soluzione tecnica efficace per ridurre le perdite di azoto per volatilizzazione dell'ammoniaca con risvolti positivi sia per le colture, e quindi economici, sia per l'ambiente, nell'ottica dell'applicazione di agrotecniche eco-sostenibili. (Badagliacca et al., 2015).

1.3 Trasformazioni dell'azoto nel terreno

Le caratteristiche chimiche dell'azoto e dei suoi composti, la loro possibilità di fornire energia a numerose specie di microrganismi, le elevate quantità necessarie per l'accrescimento delle piante, le diverse forme chimiche presenti nel terreno e le sue interazioni con il ciclo della sostanza organica, fanno sì che le trasformazioni e il movimento dell'azoto e dei suoi composti all'interno del terreno agricolo risultino particolarmente complessi. Si deve innanzitutto sottolineare che in un terreno agricolo parte dell'azoto in esso contenuto, lascerà, per lisciviazione e volatilizzazione, inevitabilmente e senza alcuna possibilità di ritorno il terreno stesso. Ciò provoca, in qualsiasi terreno coltivato, una progressiva riduzione del contenuto di azoto che, se non contrastata in qualche modo, porterebbe alla sua completa perdita di fertilità e capacità produttiva.

D'altra parte, le precipitazioni atmosferiche e l'attività dei microrganismi azotofissatori provocano il passaggio di una certa quantità di azoto dall'atmosfera al terreno, causando così un suo arricchimento di azoto che, almeno in parte, compensa le perdite. (Brenna e Riparbelli, 2007).

Negli agroecosistemi la concimazione azotata ha il compito di assicurare che le piante coltivate trovino nel terreno una quantità di azoto utilizzabile sufficiente per il loro accrescimento in ogni momento del loro ciclo colturale e al contempo di ridurre le perdite in modo da non impoverire né arricchire il terreno. La predisposizione di piani di concimazione accurati, che è condizione indispensabile per raggiungere questi obiettivi, deve tener conto

dell'insieme delle trasformazioni dell'azoto nel terreno che alla fine determinano la reale disponibilità di azoto utilizzabile dalle colture in ogni momento del loro ciclo colturale.

I processi fisici, chimici e biologici che interessano l'azoto in un agroecosistema (Fig.1.4) possono essere raggruppati in:

1) Processi di arricchimento del terreno, e cioè quei processi che aumentano il contenuto di azoto del terreno apportandone nuove quantità dall'esterno del sistema. Appartengono a questo gruppo:

- la fissazione atmosferica;
- la fissazione biologica;
- la concimazione azotata, sia minerale sia organica

2) Trasformazioni interne al terreno, le trasformazioni che modificano la forma fisica, chimica e biologica dei composti dell'azoto presenti nel terreno senza però modificarne la quantità totale.

Appartengono a questo gruppo:

- la mineralizzazione dell'azoto contenuto nella sostanza organica ad azoto ammoniacale;
- la nitrificazione dell'ammonio a nitrato;
- la immobilizzazione dei nitrati nella sostanza organica del terreno in via di umificazione;
- l'assorbimento dell'azoto in quella parte delle piante coltivate che l'agricoltore non può o decide di non asportare dal terreno (radici, paglie, ecc.)

3) Processi di impoverimento del terreno, e cioè quei processi che portano a una diminuzione del contenuto di azoto del terreno facendo sì che una parte di questo esca dal sistema sfuggendo alla possibilità di assorbimento delle colture.

Fanno parte di questo gruppo:

- la produzione utile;
- la denitrificazione
- la volatilizzazione;
- la lisciviazione. (A. Masoni, L. Ercoli, 2010)

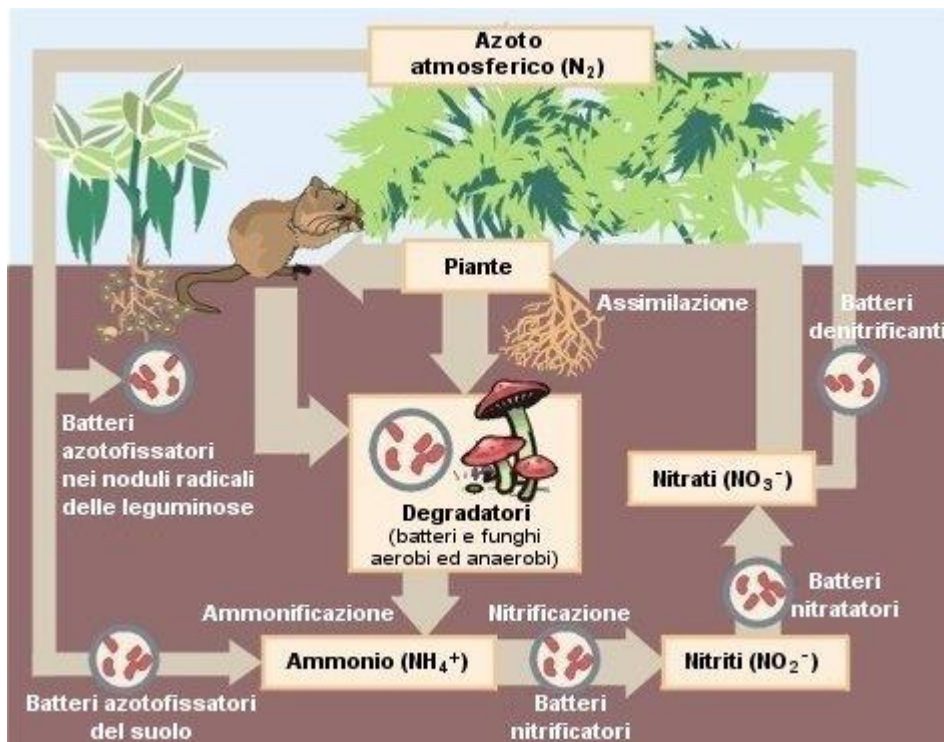


Fig. 1.4. Ciclo semplificato dell'azoto fonte: A. Masoni, L. Ercoli, 2010.

1.4 L'ammoniaca come inquinante

Le attività agricole contribuiscono all'inquinamento atmosferico rappresentando la principale sorgente di emissioni di ammoniaca, inquinante responsabile dei fenomeni di acidificazione ed eutrofizzazione e coinvolto nella formazione di polveri sottili in quanto precursore del particolato secondario. Le emissioni di ammoniaca causate dall'uso di fertilizzanti azotati rappresentano una componente non trascurabile, anche se assai spesso poco nota, delle emissioni complessive. È soprattutto l'uso di urea che fornisce un contributo rilevante alle emissioni di ammoniaca. A livello nazionale viene redatta, con periodicità annuale, la stima di emissioni di ammoniaca. Tale compito, affidato ad ISPRA, riveste un'importanza notevole in relazione al monitoraggio dell'applicazione dei protocolli nazionali e internazionali di riduzione delle emissioni. Ammoniaca, SO_x e NO_x , sono infatti alla base del Protocollo di Göteborg stipulato nel 1999 nell'ambito della Convenzione di Ginevra sull'inquinamento atmosferico transfrontaliero a lunga distanza del 1979 e della Direttiva NEC 2001/81/CE (National Emission Ceiling). Oltre ad una stima annuale, vengono inoltre svolte stime e valutazioni delle emissioni future con e senza sistemi di abbattimento in relazione al raggiungimento degli obiettivi nazionali ed internazionali di riduzione (Violetto et al., 2008; Valli et al., 2007; Brink et al. 2001).

La chimica dell' NH_3 è abbastanza complessa (Seinfeld e Pandis, 1998). La complessità è connessa al fatto che i prodotti formati dalle reazioni dell' NH_3 , tra cui i principali il solfato di ammonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ed il nitrato di ammonio, NH_4NO_3 , esistono in atmosfera in forma condensata o di particolato, la presenza di queste due sostanze in atmosfera dipende dalle quantità di ammoniaca e di precursori acidi presenti. Il nitrato e il solfato d'ammonio oltre ad essere costituenti del particolato fine, possono contribuire significativamente alla diminuzione di visibilità e produzione di nebbie.

L'ammoniaca è presente nell'aria (concentrazione nell'aria urbana: $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$), soprattutto nelle aree circostanti ad allevamenti intensivi di animali, aree di spandimento fanghi e nei suoli oggetto di colture. È irritante per le vie respiratorie, per gli occhi e il contatto può causare ulcerazioni. L'alta tossicità dell'ammoniaca è da ricercare nel fatto che, disciolta nel sangue, innalza il pH ematico aumentando l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno tanto da renderla incapace di rilasciarlo ai tessuti. Inoltre può formare emboli gassosi (Sutton et al., 2011; Liu et al., 2011).

Un ulteriore problema derivante dal contributo dell'urea, e in generale dai fertilizzanti azotati, per quanto riguarda le emissioni di gas serra, oltre alla produzione di ammoniaca, è l'idrolisi dell'urea dove si produce anidride carbonica che è di per sé uno dei principali gas serra, che contribuisce al 63% dell'effetto serra. Tali gas presenti nell'atmosfera terrestre catturano le radiazioni infrarosse impedendogli di ritornare nello spazio causando così un aumento delle temperature del nostro pianeta. Inoltre l'ammoniaca andando incontro a nitrificazione e denitrificazione produce N_2O , gas serra molto più potente della CO_2 ed inoltre è in grado di ridurre l'ozono stratosferico attraverso reazioni fotolitiche, una delle cause principali del buco dell'ozono.

1.5 Problema e soluzioni differenti per attenuare la perdita di ammoniaca

Il contributo che l'uso di fertilizzanti, e più in generale, le fonti agricole, apportano all'inquinamento atmosferico è a tutt'oggi sostanzialmente trascurato, e ciò è testimoniato dalla assenza, al contrario delle fonti energetiche, di una consistente normativa ambientale per quanto riguarda le emissioni in atmosfera di origine agricola. Di fatto, le uniche norme esistenti circa l'agricoltura sono quelle introdotte per ridurre le emissioni di ammoniaca, e più

precisamente il D. Lgs. n. 171 del 2004 di attuazione della direttiva NEC (*National Emission ceilings*), che fissa per l'ammoniaca il limite nazionale di emissione di 419 kt annue da raggiungere entro il 2010. Il protocollo di Göteborg, cui la Comunità Europea ha aderito con la decisione 2003/507/CE, prevede infatti al 2010 per l'Italia un tetto alle emissioni di NH₃ di 419 kt annue, identico a quello fissato dalla Direttiva NEC. Di fatto questi obiettivi preposti dalla direttiva sono stati raggiunti dall'Italia. Dal 17 luglio 2018 tramite D.lgs. n. 81/2018, infatti è subentrata un'ulteriore direttiva NEC che abroga quella precedente del 2004 e ha come obiettivi:

- Ridurre il complesso delle emissioni nazionali annue di origine antropica di SO₂, NO_x, NH₃ e particolato fine (PM_{2,5}) per rispettare specifici livelli entro il 2020 e il 2030;
- Attivare il monitoraggio e la comunicazione delle emissioni dei suddetti inquinanti e di altre sostanze per cui non sono previsti obblighi di riduzione delle emissioni;
- Ottenere, attraverso un sistema di monitoraggio, dati relativi agli impatti dell'inquinamento atmosferico sugli ecosistemi.

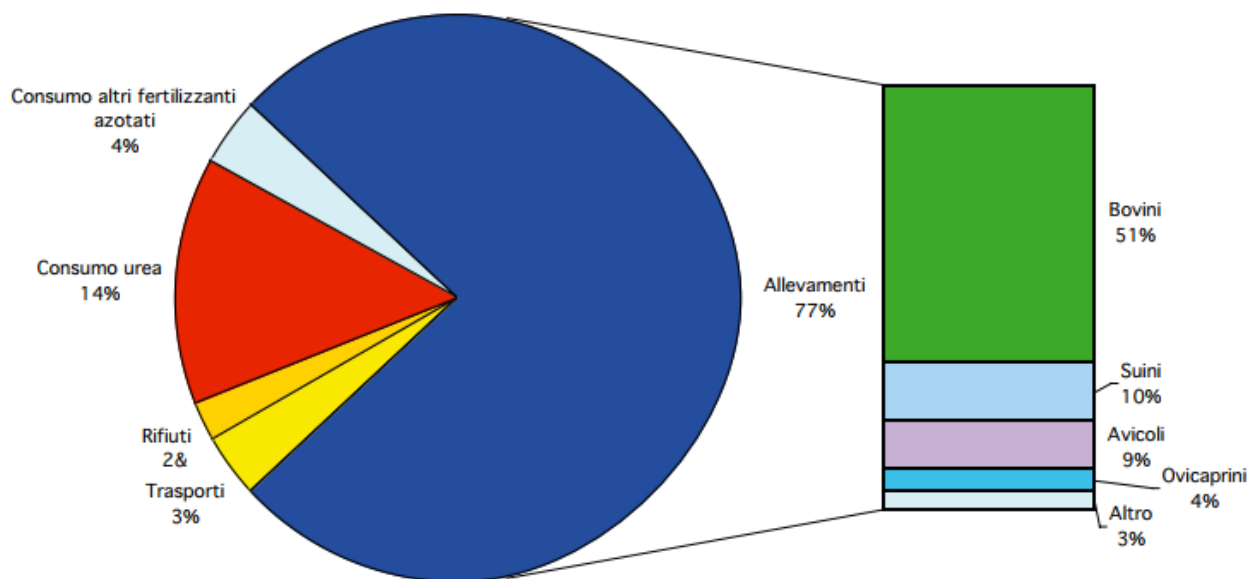


Fig. 1.5. Emissioni di ammoniaca in atmosfera in Italia relative all'anno 2000, divise per settore Fonte: Colonna et al., 2008.

In Fig. 1.5 si può osservare come il settore agricolo rappresenta da solo, la quasi totalità delle emissioni di ammoniaca, con un contributo pari al 95% delle emissioni totali, delle quali, il 18% dipendono dall'uso di fertilizzanti azotati. Diventa quindi necessario attuare piani o strategie che permettano di ridurre la volatilizzazione dell'ammoniaca dai suoli. (Fig. 1.6).

Tre sono le ipotesi relative al miglioramento dell'efficienza d'uso o alla sostituzione dei fertilizzanti azotati:

1) L'uso di tecniche innovative di concimazione che possono essere considerate di "fertilizzazione razionale". La fertirrigazione è una tecnica che prevede la distribuzione degli elementi nutritivi tramite le acque di irrigazione. Essa consente risparmi gestionali e dall'altro canto migliora la capacità di soddisfare le esigenze nutritive delle colture seguendo le esigenze fisiologiche della pianta di diminuire le dosi complessive di concime, minimizzarne le perdite in quanto non si distribuiscono eccessi di nutrienti che sono soggetti a fenomeni di lisciviazione o volatilizzazioni.

2) L'uso di prodotti innovativi per la concimazione. Concimi "a lento effetto" o "a lento rilascio" sono dei prodotti formulati per modulare la disponibilità dell'elemento nel tempo. La loro peculiarità è quella di rendere disponibile l'azoto nel tempo evitando o diminuendo, quindi, le perdite a cui le diverse forme azotate possono andare incontro nel suolo o in atmosfera. Teoricamente il concime a lento effetto "ideale" dovrebbe rilasciare l'azoto via via che la pianta richiede azoto. Uno dei metodi che possono essere impiegati per rallentare il rilascio di azoto inorganico è aggiungere all'urea prodotti inibitori dell'attività ureasica come l'NBPT [N-(n-butil)fosfotriammide]. In un esperimento condotto nel 2000 in Italia in diverse condizioni colturali, Nastro et al. (2002.) hanno evidenziato come l'inibitore NBPT possa contribuire a diminuire le perdite per volatilizzazione di valori compresi tra il 42% e il 55%.

3) Fertilizzanti di sintesi. Ovvero la sostituzione dei concimi ammoniacali, e quindi anche dell'urea, con altri fertilizzanti azotati è teoricamente possibile anche al 100%. Razionalmente però la fattibilità della sostituzione dell'urea con altri fertilizzanti di sintesi non può essere svincolata da un confronto con i costi della fertilizzazione alternativa, che sono più consistenti rispetto a quelli che si hanno con l'impiego dell'urea.

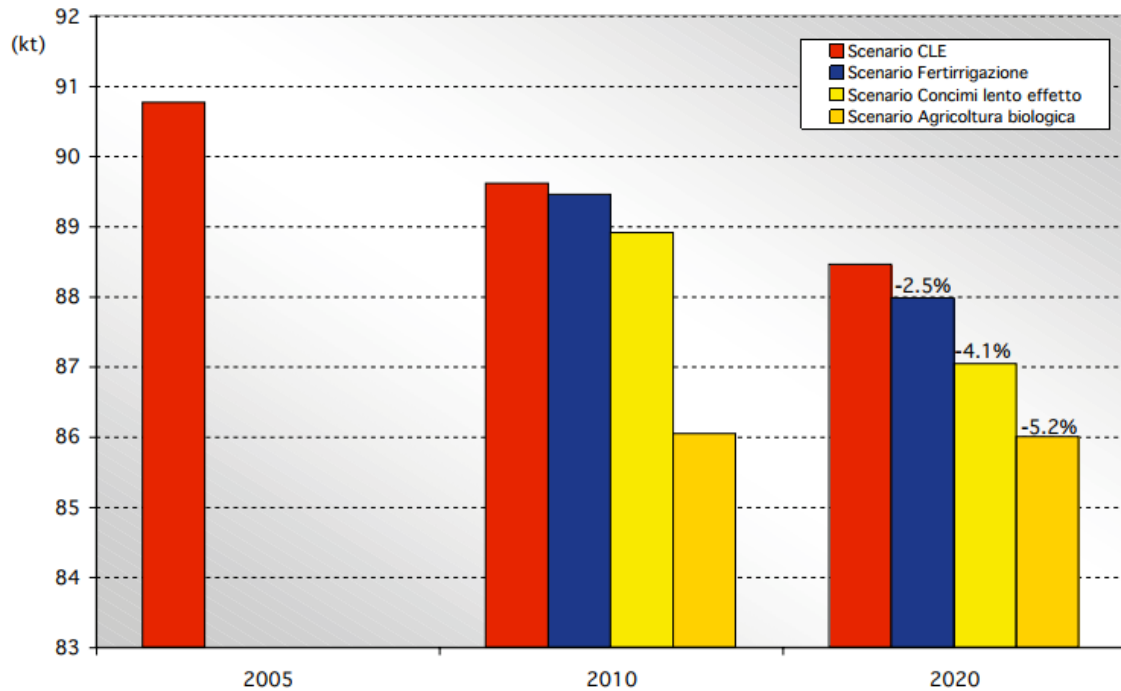


Fig.1.6. Scenari di riduzione delle emissioni annuali di NH₃ in atmosfera derivanti da differenti ipotesi sui fertilizzanti azotati: fertirrigazione, concimi a lento effetto, agricoltura biologica (Fonte: colonna et al. 2008.)

Un metodo inappropriato di applicazione dell'azoto provoca come già accennato notevoli perdite del medesimo, attraverso l'emissione di NH₃, la lisciviazione di nitrati e le emissioni di N₂O che portano quindi a una grave contaminazione ambientale (Wu e Ma, 2015; Li et al., 2020). Studi recenti indicano anche che le emissioni globali di NH₃ dai fertilizzanti chimici azotati sono aumentate drasticamente da 2 a 17 Tg di azoto all'anno tra il 1961 e il 2010 (Xu et al., 2018). Tali livelli elevati di perdite di NH₃ portano a una grave acidificazione del suolo, eutrofizzazione dell'acqua e formazione di aerosol PM 2,5 (Zhang et al., 2020). Un'efficiente tecnica di gestione dei fertilizzanti azotati è quindi urgentemente necessaria per mitigare la volatilizzazione agricola di NH₃ e aumentare le rese.

1.6 La pirolisi come metodo di riuso delle biomasse residuali

L'esaurimento delle riserve di combustibili fossili e l'aumento delle emissioni di gas serra (GHG) hanno portato a spostarsi verso fonti energetiche alternative, rinnovabili e sostenibili. La biomassa è una delle fonti energetiche significative, rinnovabili e sostenibili e la pirolisi è una delle tecnologie più promettenti in grado di convertire la biomassa lignocellulosica in bio-olio (Zadeh, Abdulkhani e Saha, 2020) riutilizzabile, per differenti scopi. Nel caso di questa tesi è stata utilizzata la pirolisi per trasformare le biomasse di partenza in prodotti di pirolisi come: la lignina pirolitica e il bio-olio derivati tre diverse biomasse, allo scopo di valutarne la potenzialità come inibitori dell'ureasi nell'ottica di un possibile utilizzo in campo agricolo.

I residui di biomassa possono essere convertiti in forme di energia più preziose tramite una serie di processi, inclusi processi termici, biologici e meccanici fisici. Mentre l'elaborazione biologica è solitamente molto selettiva e produce un piccolo numero di prodotti discreti in alta resa utilizzando catalizzatori biologici, la conversione termica spesso fornisce prodotti multipli e spesso complessi, in tempi di reazione molto brevi con catalizzatori inorganici spesso utilizzati per migliorare la qualità del prodotto. La pirolisi è un processo di trattamento termico definito anche distillazione secca che consiste nella decomposizione termica non ossidativa, cioè senza apporto di ossigeno dall'esterno, tranne quello già eventualmente presente nella biomassa. Essa è stata applicata per migliaia di anni per la produzione di carbone, ma è solo negli ultimi 30 anni che la pirolisi veloce a temperature moderate di circa 500 °C e tempi di reazione molto brevi fino a 2 secondi è diventata di notevole interesse. Questo perché il processo fornisce direttamente rese elevate di liquidi fino al 75% in peso che possono essere utilizzati direttamente in una notevole varietà di applicazioni (Bridgwater,2012).

La pirolisi veloce per la produzione di liquidi si è sviluppata notevolmente alla fine degli anni '70. Essa è stata a lungo studiata ed è ora considerata una via fattibile e praticabile per la sintesi di combustibili liquidi rinnovabili, prodotti chimici e prodotti derivati. È stato inoltre osservato che i prodotti liquidi offrono vantaggi significativi nello stoccaggio e nel trasporto rispetto a gas e calore. Questi vantaggi hanno portato a prestare maggiore attenzione alla pirolisi veloce, portando a significativi progressi nello sviluppo dei processi legati ad essa.

La pirolisi veloce è un processo ad alta temperatura in cui la materia prima viene rapidamente riscaldata in assenza di aria, vaporizzata e condensata in un liquido marrone scuro che ha un

potere calorifico di circa la metà di quello dell'olio combustibile convenzionale. Sebbene sia correlato ai tradizionali processi di pirolisi utilizzati per produrre carbone, la pirolisi veloce è un processo più avanzato che può essere attentamente controllato per fornire elevate rese di liquido.

Le caratteristiche essenziali di un processo di pirolisi veloce sono:

- velocità di riscaldamento e trasferimento di calore molto elevati che richiedono un'alimentazione di biomassa finemente macinata.
- temperatura accuratamente controllata di circa 500°C;
- raffreddamento rapido dei vapori di pirolisi per dare il prodotto bio-olio.

Il prodotto principale, il bio-olio, si ottiene con rese fino all'80%, insieme al sottoprodotto char e gas che viene utilizzato all'interno del processo, quindi non ci sono flussi di rifiuti.

I liquidi derivanti dalla pirolisi veloce sono di colore marrone scuro e fluidi, simili a un olio combustibile di media viscosità.

Il bio-olio può sostituire l'olio combustibile o il diesel in molte applicazioni tra cui: caldaie, forni, motori e turbine. Inoltre dal bio-olio, possono essere estratte o derivate numerose sostanze chimiche, tra cui aromi alimentari, resine, prodotti chimici per l'agricoltura, fertilizzanti. (Bridgwater, Peacocke, 2000)

La reazione di pirolisi è caratterizzata da reazioni chimiche molto complesse che possono essere riassunte in tre fasi principali:

1. 25-150 °C essiccamento della materia;
2. 150-250 °C: liberazione dell'acqua di idratazione chimica e rottura dei legami chimici più deboli;
3. Oltre i 250 °C: decomposizione termica per disidratazione, depolimerizzazione, deidrogenazione e cracking termico.

(Galvagno et al., 2002.)

I prodotti e le relative quantità che si possono ottenere dalla pirolisi sono diversi a seconda del tipo di pirolisi, ma in generale si produce:

- frazione solida: 20 – 30% in peso del materiale iniziale, a base carboniosa, per questo motivo ha buon potere calorifico (8000 kcal/kg) e quindi può essere utilizzato anche come combustibile;
- frazione liquida: 50–60% in peso, può essere considerata come un bio-olio, che contiene: idrocarburi aromatici (come benzene, toluene e xileni) e numerose sostanze ossigenate, clorurate e solforate in relazione al materiale di partenza. Nel caso di questo lavoro di tesi sono state estratte: una parte solubile in acqua chiamata water soluble e una parte invece insolubile rinominata lignina pirolitica.
- frazione gassosa: costituisce il 15 – 30% in peso, è chiamato anche gas di pirolisi o syngas ed è composto prevalentemente da idrogeno, monossido di carbonio, anidride carbonica, idrocarburi leggeri. Generalmente è caratterizzato da un potere calorifico medio alto (15-22 MJ/kg) e può essere utilizzato per diversi scopi come essiccare il materiale di partenza, generare potenza elettrica, oppure può essere immagazzinato e venduto a terzi.

Esistono diverse modalità di esecuzione del processo pirolitico e da questo dipende la produzione di bio-olio, gas di pirolisi e residuo carbonioso:

- la pirolisi lenta o convenzionale, avviene a temperature moderate circa 500 °C, con lunghi tempi di reazione; da cui si ottengono approssimativamente le tre frazioni in uguale proporzioni;
- la carbonizzazione, che avviene a temperature comprese tra i 300 e 500 °C. Da tale processo si recupera solo la frazione solida, per cui si procede in modo da minimizzare le altre frazioni;
- la pirolisi veloce, a temperature medio basse (da 500 a 650 °C), in cui le reazioni della gassificazione avvengono velocemente e con tempi di contatto brevi in modo

da ridurre il riformarsi di composti intermedi, favorendo la produzione della frazione liquida fino al 70-80% in peso della biomassa in entrata; (Fig 1.7)

- la flash pyrolysis, realizzata in modo da mantenere gli stessi tempi di contatto della “pirolisi veloce”, ma a temperature superiori a 650 °C e con tempi di contatto inferiori ad un secondo, in modo da favorire la produzione della frazione gassosa (Bridgwater e Peacocke, 2000).

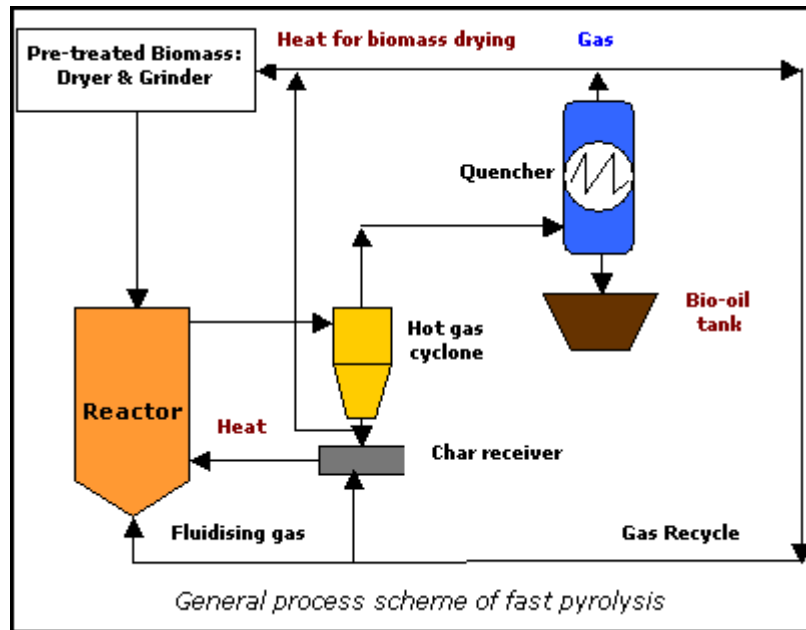


Fig 1.7. Schema generale pirolisi veloce fonte: Università di Cagliari (<https://sites.unica.it/fitogen/pirolisi-e-pirogassificazione-delle-biomasse/>).

1.7 I principi dell'economia circolare

La sfera economica e la sfera ambientale da sempre, sono collegate in una profonda relazione influenzandosi reciprocamente: il sistema economico, rappresentato dalle attività antropiche, richiede l'utilizzo di risorse naturali. L'equilibrio tra le due sfere ha cominciato ad essere compromesso dopo il cambiamento dei processi produttivi, dovuto all'industrializzazione, che ha introdotto un modello di crescita economica incentrata sul consumo quantitativo di beni e ancora oggi alla base dell'economia. Tale impostazione comporta che la sfera economica pesi, sempre di più, rispetto a quella ambientale, sfruttando le risorse naturali, alterando il clima e, conseguentemente, minacciando gli ecosistemi. (Giorgi et al., 2017)

Nel caso di questo lavoro di tesi è stato importante sviluppare nuovi inibitori naturali dell'ureasi derivanti da biomasse di scarto, in modo tale da sostituirli a quelli già attualmente presenti sul mercato di origine chimica. Questa ricerca si è basata su un caposaldo fondamentale dei principi dell'economia circolare, ovvero il riuso il quale permette di produrre meno rifiuti e utilizzare meno materie prime in partenza.

L'economia circolare è un modello di produzione e consumo che implica condivisione, prestito, riutilizzo, riparazione, ricondizionamento e riciclo dei materiali e prodotti esistenti il più a lungo possibile.

In questo modo si estende il ciclo di vita dei prodotti, contribuendo a ridurre i rifiuti al minimo. Una volta che il prodotto ha terminato la sua funzione, i materiali di cui è composto vengono infatti reintrodotti, laddove possibile, nel ciclo economico. Così si possono continuamente riutilizzare all'interno del ciclo produttivo generando ulteriore valore. (Fig. 1.8)



Fig 1.8. Descrizione dello schema di produzione di beni e di servizi in ottica di economia circolare fonte: V. Prieto-Sandoval et al. (2018).

I principi dell'economia circolare contrastano con il tradizionale modello economico lineare, fondato invece sul tipico schema "estrarre, produrre, utilizzare e gettare". Il modello economico tradizionale dipende dalla disponibilità di grandi quantità di materiali e energia facilmente reperibili e a basso prezzo. (V. Prieto-Sandoval et al., 2018)

Grazie a misure come prevenzione dei rifiuti, ecodesign e riutilizzo dei materiali, le imprese europee otterrebbero un risparmio e ridurrebbero nel contempo le emissioni totali annue di gas serra. Al momento la produzione dei materiali che utilizziamo ogni giorno come plastica, metalli, carta e fibre tessili è responsabile del 45% delle emissioni di CO₂ annue.

La transizione verso un'economia più circolare può portare numerosi vantaggi, tra cui:

- riduzione della pressione sull'ambiente;
- più sicurezza circa la disponibilità di materie prime;
- aumento della competitività;
- impulso all'innovazione e alla crescita economica;
- incremento dell'occupazione;

Il modello di economia circolare si basa sulle tre "R": Ridurre, Riusare, Riciclare.

- ridurre: ridurre i consumi della materia prima progettando prodotti con una obsolescenza a lungo termine costi inferiori e manutenzione semplice.
- riusare: riutilizzare le materie prime e i prodotti in modo da non perdere l'energia spesa per generare il prodotto stesso.
- riciclare: è l'ultimo passaggio per recuperare materia.

L'economia circolare, secondo la definizione data dalla Ellen MacArthur Foundation, è un modello ripensato radicalmente rispetto al modello di produzione classico che si basa sul massimo sfruttamento delle risorse naturali ed è volto all'obiettivo di massimizzare il profitto attraverso la riduzione dei costi di produzione. Un'impostazione circolare volge alla revisione di tutte le fasi della produzione. Questa focalizzazione passa attraverso 3 principi fondamentali indicati proprio dalla fondazione Ellen MacArthur:

1. Preservare e aumentare il capitale naturale, controllando i depositi limitati e bilanciando il flusso di risorse rinnovabili;
2. Ottimizzare il rendimento delle risorse tramite la circolazione di prodotti, componenti e materiali di altissimo valore, in ogni momento, in entrambi i cicli, biologici e tecnici;
3. Individuazione ed eliminazione delle esternalità negative che possono scoraggiare l'efficacia del sistema.

Il primo principio indica che il sistema, nel momento in cui ne ha bisogno, deve decidere quali risorse utilizzare e preferire i migliori processi e tecnologie che utilizzano risorse rinnovabili.

Il secondo principio parla della differenza tra cicli biologici e tecnici. I cicli biologici gestiscono tutti i nutrienti rinnovabili che devono essere reintegrati nella biosfera in modo che con la decomposizione tornino ad essere materia prima per altri cicli successivi. I cicli tecnici

gestiscono tutti i materiali non rinnovabili che non possono essere reimmessi nella biosfera e che devono quindi essere progettati per circolare il più a lungo possibile, non necessariamente soltanto tramite riciclo. Per entrambi i cicli sono preferibili cicli ristretti con i quali si permette la conservazione di più valore ed energia. Così facendo non si progetta soltanto per riciclare ma anche per ristrutturare e rigenerare. Il terzo principio presta attenzione all'importanza di evitare esternalità negative come inquinamento dell'aria e dell'acqua, inquinamento acustico e il rilascio di sostanze tossiche. Queste esternalità creano seri danni all'ambiente e scoraggiano l'efficacia del sistema economico. (Meadowcroft, 2007)

In Italia sul piano politico mai come in questi ultimi anni si è sentita l'esigenza di parlare di qualcosa di diverso, proprio perché il modello economico produttivo attuale è ormai saturo, pronto per essere sostituito. Impegnata in questo campo dal 2015, la Commissione Europea, in questo anno, ha approvato un pacchetto di norme sull'economia circolare che obbligherà i Paesi membri a riciclare almeno il 70% dei rifiuti urbani e l'80% dei rifiuti da imballaggio, oltre al divieto di gettare in discarica quelli biodegradabili e riciclabili. Norme che dovrebbero entrare in vigore dal 2030 e che sono adesso al vaglio del Parlamento europeo. È un'economia che protegge l'ambiente e permette di risparmiare sui costi di produzione e di gestione, producendo degli utili, in questo l'Italia è in un'ottima posizione nel quadro europeo.

2. Obiettivi

Lo scopo principale di questo lavoro di tesi è stato quello di valutare la potenzialità di diversi prodotti di pirolisi di biomasse vegetali come inibitori dell'ureasi, nell'ottica di un loro possibile utilizzo in campo agrario. In particolare, si sono considerati lignina pirolitica, frazione idrosolubile del bio-olio e biochar prodotti per pirolisi veloce di legno di larice, legno di pioppo e paglia di panico.

Il lavoro si è articolato in tre aspetti principali:

- la produzione delle diverse frazioni tramite pirolisi e la loro successiva caratterizzazione chimica;
- la valutazione della capacità di ciascuna frazione di inibire l'attività ureasica dei batteri del suolo;
- la valutazione dell'ecotossicità delle varie frazioni nei riguardi di alcuni organismi del suolo (lombrichi, piante, batteri).

Sono stati scelti i prodotti di pirolisi (lignine pirolitiche frazione idrosolubile del bio-olio e biochar), come possibili inibitori dell'ureasi, perché è stato osservato che contenevano catecolo e altre sostanze simili, le quali potevano sviluppare un potenziale inibitorio nei confronti dell'enzima ureasi.

Come illustrato nei paragrafi precedenti, le emissioni di ammoniaca dovute all'utilizzo dell'urea come fertilizzante azotato sono un problema ambientale rilevante. Sostituire gli inibitori dell'ureasi di sintesi attualmente sul mercato come l'NBPT con prodotti derivati da biomasse residuali, significherebbe contribuire a soluzioni per questo problema che rispettino i principi della chimica sostenibile e dell'economia circolare.

3 Materiali e metodi

3.1 Preparazione e caratterizzazione dei prodotti di pirolisi

Tutto il lavoro sperimentale di laboratorio è stato eseguito presso i Laboratori di Scienze Ambientali Renzo Sartori dell'Università di Bologna, Campus di Ravenna, in particolare presso il laboratorio di chimica organica (Dipartimento di Chimica Giacomo Ciamician) e il laboratorio di ecotossicologia (Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali).

3.1.1 Biomasse utilizzate

I prodotti valutati come inibitori dell'ureasi nel presente lavoro sono stati ottenuti attraverso la pirolisi di tre diverse biomasse vegetali:

- legno di pioppo (*Populus* sp.), rami tagliati da alberi presenti all'esterno dei Laboratori di Scienze Ambientali Renzo Sartori;
- paglia di panico (*Setaria italica*) triturrata ed essiccata a 60° fornito da A. Monti.
- Ceppo di legno di larice (*Larix decidua*) fornito da falegname.

Le tre biomasse selezionate sono state successivamente trattate tramite pirolisi e nelle fasi successive dello studio sono stati utilizzati i prodotti così ottenuti.

3.1.2 Pirolisi

Il pirolizzatore è uno strumento che permette di lavorare ad alte temperature in assenza di ossigeno. Nel presente studio si è utilizzato pirolizzatore di marca Carbolite. Esso è composto principalmente da un reattore centrale che ha la funzione di riscaldare un tubo in vetro, il quale viene inserito al suo interno ed è a sua volta collegato, ad un camino dove escono i gas di pirolisi. Inoltre, ha una parte separata che rappresenta il motore utilizzata per le impostazioni di base: accensione, spegnimento, impostazione della temperatura di pirolisi desiderata. (Fig. 3.2c). Il campione viene inserito all'interno del tubo centrale attraverso un'asta porta

campione e successivamente chiuso attraverso una campana di vetro, in modo da non fare entrare ossigeno nel reattore per non andare incontro a combustione del campione stesso.(Fig. 3.2a) .I prodotti di pirolisi sono principalmente tre: il biochar che rappresenta la parte solida, il bio-olio che rappresenta la frazione solubile in acqua e la lignina pirolitica che rappresenta la frazione non solubile in acqua e i gas . Tutti e tre questi prodotti sono stati quantificati dopo ognuna delle pirolisi effettuate e su di essi è stato fatto un bilancio, a differenza dei gas di pirolisi che invece non sono stata trattenuti. Prima di procedere alla pirolisi è stato necessario preparare il macchinario e assemblare i suoi componenti:

Si è proceduto quindi con l'inserimento del tubo in vetro nella parte centrale del reattore nel quale è stato inserito un flusso di azoto costante.

Dopodiché stata montata in successione la trappola ad acqua e un adattatore nel quale è stato attaccato un tubo di scarico per i gas di pirolisi. È stato acceso quindi il pirolizzatore e impostata la temperatura di 550°, dopo qualche minuto il pirolizzatore si è stabilizzato ed è stato possibile caricare la biomassa, circa 5-6 g per pirolisi, la quale è stata inserita attraverso l'asta porta campione nel centro del reattore. Dopo 5 min è stato possibile estrarre il campione dal reattore e inserirlo in un beaker, la parte prelevata residuale rappresenta il biochar. (Fig 3.1)

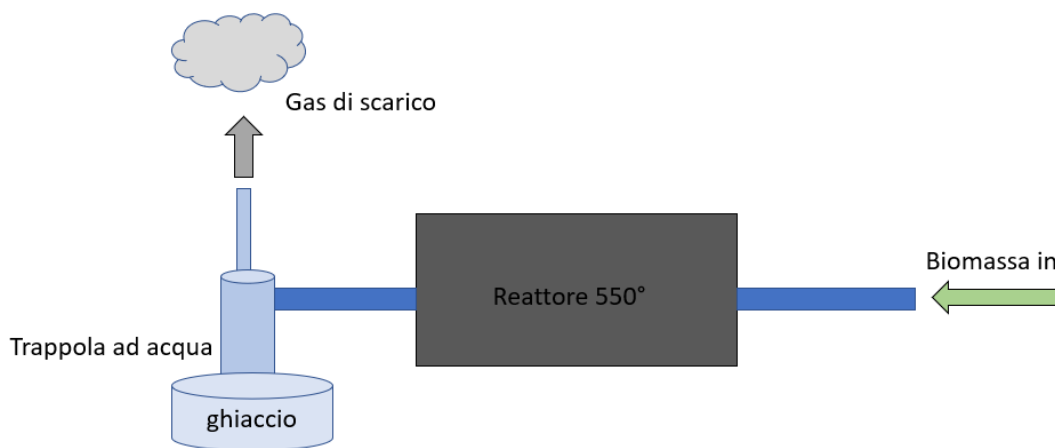


Fig 3.1. Schema semplificato componenti pirolizzatore.

Questi passaggi sono stati effettuati fintanto che non è stata raggiunta la grammatura di biomassa desiderata, dopodiché il macchinario è stato spento e si è dovuto attendere fino a che la temperatura del reattore non scendesse sotto i 100°C per effettuare il successivo lavaggio delle sue parti, al fine di estrarre le varie frazioni. La frazione solubile in acqua anche chiamata water soluble è stata ottenuta lavando la trappola ad acqua tramite acqua deionizzata (Fig 3.2b).

Attraverso l'uso di cotone e di una siringa è stata filtrata per evitare residui di cenere, attraverso un cilindro graduato è stata misurata la quantità derivata di questa frazione. Allo stesso modo si è proceduto per la frazione insolubile in acqua definita anche lignina pirolitica, unica eccezione è stato l'uso, al posto dell'acqua deionizzata, dell'acetone come solvente per il lavaggio. A questo punto la frazione insolubile è stata posizionata sotto un flusso di azoto per eliminare il solvente utilizzato per l'estrazione, successivamente entrambi i prodotti di pirolisi sono stati posti in frigorifero, pronti per il loro utilizzo.

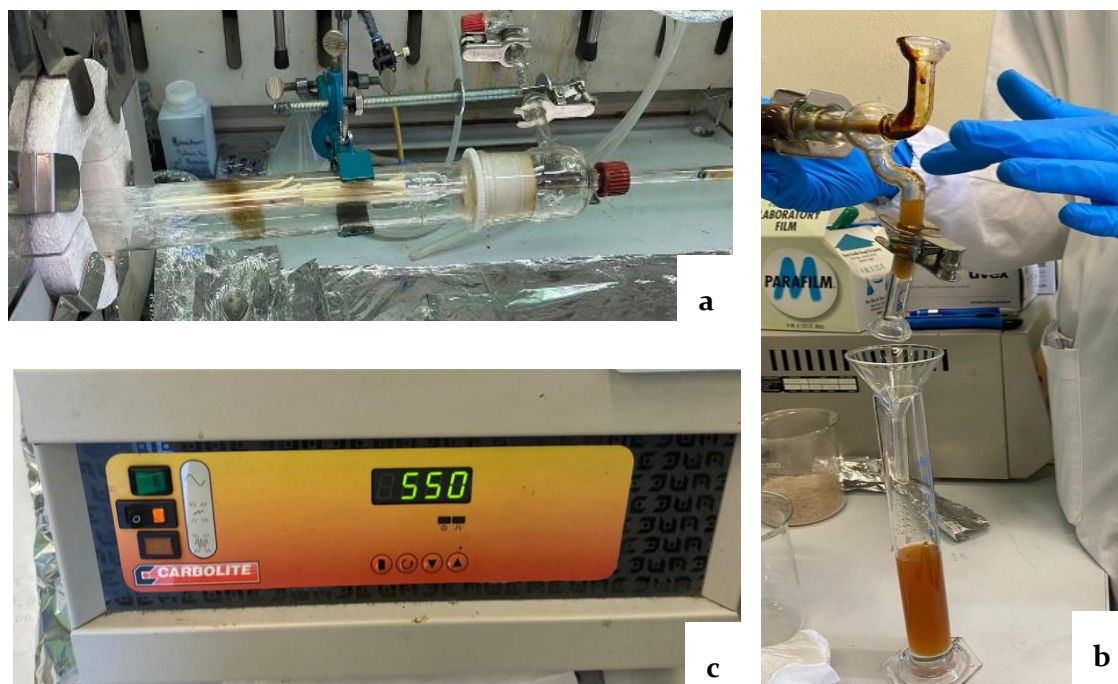


Fig 3.2. a) Tubo di vetro annesso asta porta campione e campana sigillante. b) Estrazione della frazione solubile in acqua attraverso acqua deionizzata e cilindro graduato c) Motore del pirolizzatore acceso a 550°C.

3.1.3 Frazionamento

La frazione solubile in acqua (water soluble) è stata ulteriormente suddivisa, in una frazione solubile in etilacetato ed in una insolubile in etilacetato. A questo scopo, bio-olio ed etilacetato in egual volume, sono stati versati in un imbuto separatore il quale è stato poi agitato e quindi posto su un supporto metallico, attendendo che le due fasi si separassero (Fig 3.3).

La parte sovrastante era costituita dalla frazione solubile in etilacetato mentre la parte sottostante, dalla frazione insolubile in etilacetato. A questo punto, aprendo il rubinetto è stata prelevata la frazione insolubile in etilacetato.

Successivamente è stata prelevata la frazione solubile in etilacetato. È stata quindi reinserita la frazione insolubile in etilacetato appena prelevata dall'imbuto e allo stesso modo è stato inserito all'interno lo stesso quantitativo di etilacetato dell'inizio. Sono stati ripetuti i passaggi descritti precedentemente e al termine di questi è stata prelevata la frazione insolubile in etilacetato, e quella invece in esso solubile.

Alla frazione solubile in etilacetato è stato aggiunto sodio solfato anidro (Na_2SO_4) per rimuovere eventuali tracce di acqua.

Si è proceduto poi alla pesatura di una fiala nella quale è stata poi versata la frazione solubile in etilacetato ed attraverso un filtro costituito da un imbuto riempito di cotone idrofilo, è stata filtrata per separare il solfato di sodio dalla frazione in etilacetato. Al termine è stata messa sotto azoto per eliminare tracce di etilacetato rimaste e ripesata per avere il peso netto della frazione solubile in etilacetato.

Per la misurazione del volume di frazione insolubile in etilacetato ottenuta, è stata usata una pipetta. Successivamente 50 μL di questa frazione sono stati trasferiti in una piccola fiala sotto azoto e pesati per quantificare la sua concentrazione.

In Tab 3.1 sono stati riportati i codici relativi alle frazioni utilizzate nei diversi esperimenti effettuati, verranno citate nel medesimo modo nel corso di tutta la tesi.



Fig.3.3. Sequenza di immagini raffigurante le fasi del frazionamento.

Tab 3.1. Tabella riassuntiva dei codici utilizzati per identificare i prodotti di pirolisi studiati.

Nome della frazione in forma estesa	Codice
Lignina pirolitica	LP
Lignina pirolitica larice	LP_LA
Lignina pirolitica panico	LP_PA
Lignina pirolitica pioppo	LP_PI
Frazione solubile in acqua	WS_t.q.
Frazione solubile in acqua larice	WS_LA_t.q.
Frazione solubile in acqua panico	WS_PA_t.q.
Frazione solubile in acqua pioppo	WS_PI_t.q.
Frazione insolubile in etilacetato	WS_H ₂ O
Frazione insolubile in etilacetato larice	WS_LA_H ₂ O
Frazione insolubile in etilacetato panico	WS_PA_H ₂ O
Frazione insolubile in etilacetato pioppo	WS_PI_H ₂ O
Frazione solubile in etilacetato	WS_EtOAc
Frazione solubile in etilacetato larice	WS_LA_EtOAc
Frazione solubile in etilacetato panico	WS_PA_EtOAc
Frazione solubile in etilacetato pioppo	WS_PI_EtOAc
Acetone con supporto biochar	Bioc+acetone
Lignina pirolitica con supporto biochar	Bioc+LP
Lignina pirolitica larice con supporto biochar	Bioc+LP LA
Lignina pirolitica panico con supporto biochar	Bioc+LP PA
Lignina pirolitica pioppo con supporto biochar	Bioc+LP PI

3.1.4 Caratterizzazione chimica dei prodotti di pirolisi

Le sostanze presenti all'interno delle diverse frazioni ottenute con la pirolisi sono state individuate e quantificate tramite gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS).

Per quanto riguarda la frazione solubile in acqua, i campioni da sottoporre alla lettura sono stati preparati ponendo un'aliquota di 100 µL in una fiala pre-pesata. La fiala è stata tenuta sotto azoto per 24 h, in modo da far evaporare completamente l'acqua. La fiala è stata quindi nuovamente pesata, ottenendo per differenza la massa totale delle sostanze in soluzione nel campione originale. Successivamente sono stati aggiunti 100 µL di acetonitrile, 80 µL di N, O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamide (BSTFA) e 20 µL di piridina. A questo punto la soluzione era pronta per essere analizzata in gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-

MS). Per quanto riguarda la lignina pirolitica invece, ne sono stati prelevati 3 mg a cui sono stati aggiunti 100 μ L di acetonitrile, 80 μ L di BSTFA e 20 μ L di piridina. La fiala è stata posizionata sopra ad una piastra riscaldata per 2 ore a 70 °C; successivamente sono stati aggiunti altri 2 mL di acetonitrile. 0,5 mL della soluzione così ottenuta sono stati analizzati mediante GC-MS.

Per quanto riguarda le frazioni insolubili e solubili in etilacetato derivate dal frazionamento della frazione solubile in acqua, sono stati prelevati 20 microlitri fatti seccare sotto azoto e successivamente misurati in CG-MS.

Per l'analisi CG-MS è stato utilizzato gas cromatografo Agilent Technologies 5977E MSD e 7820A GC System (Fig 3.4).



Fig 3.4. Gas cromatografo Agilent Technologies 5977E MSD e 7820A GC System presente nei laboratori dell'università.

Le quantità scelte per tutti gli esperimenti effettuati, sono state selezionate tramite il parametro del catecolo. Attraverso l'analisi CG-MS è stato possibile quantificare la concentrazione di catecolo presente in ciascuna frazione infatti, esse contengono, oltre ad un'altra serie di sostanze, tutte e tre il catecolo che è esso stesso un inibitore dell'ureasi. Si è deciso quindi dopo aver testato diverse quantità di catecolo (50 μ g/g 5 μ g/g e 0,5 μ g/g), di saggiare una quantità di sostanza tale per cui, in ogni trattamento fossero presenti 5 μ g/g di catecolo in modo che le quantità di tutti i trattamenti fossero standardizzate tra loro. In alcuni casi è stato necessario utilizzare una maggior

quantità di materiale per la diversità intrinseca dei lotti di produzione derivati da pirolisi delle biomasse.

3.2 Misura dell'attività ureasica

Questa misurazione è stata effettuata al fine di valutare e confrontare tra di loro le capacità di inibire l'attività dell'ureasi delle frazioni saggiate. Questo è stato fatto attraverso due metodologie principali: la prima permette di valutare quanta ammoniaca viene rilasciata nel suolo, sotto forma di ammonio, mentre il secondo metodo valuta l'ammoniaca che viene dispersa in atmosfera catturandola tramite una trappola ad acido borico. Quello che è stato fatto attraverso questi due esperimenti è misurare l'attività dell'ureasi in presenza e in assenza degli inibitori da saggiare.

3.2.1 Misura dell'attività ureasica: metodo basato sull'accumulo di ammonio nel suolo

Il suolo utilizzato per la misura dell'attività ureasica è stato prelevato da un campo ad uso agricolo poco distante dall'università. Il suolo è stato seccato all'aria per 24 – 48 h, privato manualmente di radici o altro materiale organico visibile, e infine triturato e setacciato tramite un mulino a cilindri DARGENT SA con maglia da 2 mm. Le repliche sperimentali erano costituite da beute di vetro da 50 mL con tappo smerigliato. In ciascuna beuta sono stati inseriti 5 g di suolo; tramite una pipetta graduata è stato poi aggiunto il volume richiesto di frazione da saggiare, calcolato in modo da ottenere nel suolo una concentrazione di catecolo pari a 5 µg/g (Tab. 3.2). Per quanto riguarda la preparazione dei campioni delle lignine pirolitiche con aggiunta di biochar, è stato prima inserito il biochar nelle beute e successivamente è stata inserita la soluzione di lignina pirolitica e acetone e lasciato sotto cappa aspirante per 24 h, facendo così evaporare il solvente utilizzato, infine è stato aggiunto il suolo (Tab 3.3). Il biochar usato per questo lavoro di tesi è stato derivato dalle pirolisi delle tre biomasse. I diversi biochar sono stati sminuzzati e miscelati tra di loro ottenendo un biochar finale costituito da diverse percentuali basate sul peso di ogni frazione utilizzata: 20% biochar derivante da panico, 36% di pioppo e il 44% di larice. È stato infine, aggiunto il giusto volume di acqua deionizzata calcolato sperimentalmente e diverso per ogni frazione, in modo tale che il totale tra acqua e frazione inserita fosse 5 mL, sono stati inseriti poi 2,5 mL di urea 0,08 M (Fig 3.5).

La beuta è stata chiusa con il tappo e ulteriormente sigillata usando pellicola da laboratorio. I campioni sono stati inseriti in stufa a 37° per 10 minuti per riattivare l'enzima presente nel terreno. Le beute sono state poi riposte per 24 h in bagno termostato a 37°C. Il giorno dopo sono state prelevate dal bagno termostato e al loro interno sono stati inseriti 50 mL di soluzione di KCl-HCl 1M per bloccare l'idrolisi dell'urea. Le beute sono state poi poste su un agitatore meccanico per 1 ora. È stata quindi eseguita la distillazione, tramite un distillatore Kjeldahl Velp UDK 126A (Fig 3.6b). A questo scopo, il campione è stato trasferito dalla beuta ad un apposito cilindro, dove sono stati aggiunti 25 mL di NaOH al 32% che rappresentavano le basi da inserire nel distillatore. Il cilindro è stato poi inserito all'interno del distillatore. Il distillato è stato raccolto in una beuta da 250 mL contenente 25 mL di acido bórico 40 mol/ g che aveva la funzione di intrappolare l'ammonio. La distillazione è stata fermata quando nella beuta sono stati raccolti 150 mL di distillato. Dopodiché si è proceduto con la titolazione acido-base del distillato con H₂SO₄ 0,05 M presente in buretta, usando una miscela di bromo cresolo e rosso metile come indicatore, il quale vira dal colore verde al colore rosa intenso. È stato poi annotato il volume di H₂SO₄ necessario al viraggio. (Fig 3.6 a)

In questo modo è stato possibile ottenere una misura della quantità di ammonio che si sviluppa nel suolo, dovuto all'attività ureasica dei batteri presenti in esso. Tale processo ci permette di valutare quindi l'attività di inibizione dell'enzima ureasi per diversi prodotti di pirolisi testati, confrontandoli con la condizione standard con solo urea.

Sono stati eseguiti 4 esperimenti, nei primi tre sono stati trattati i WS delle diverse biomasse, nell'ultimo sono state trattate le lignine pirolitiche con supporto del biochar. In ognuno di questi esperimenti sono state effettuate 3 repliche per ogni trattamento.

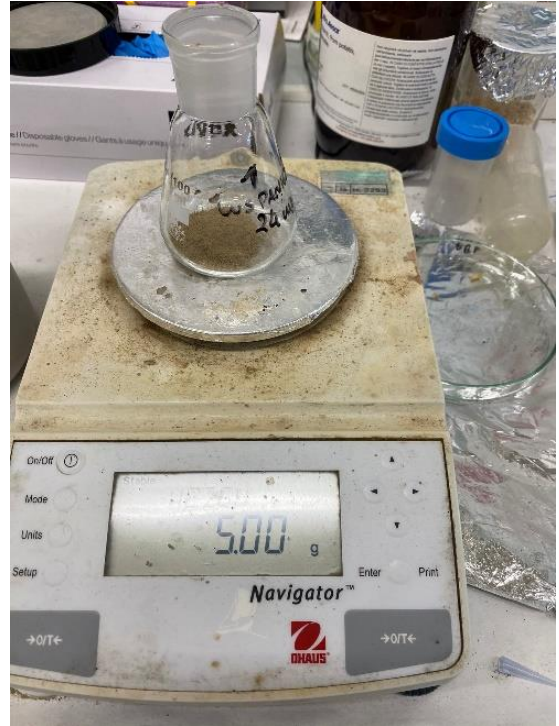
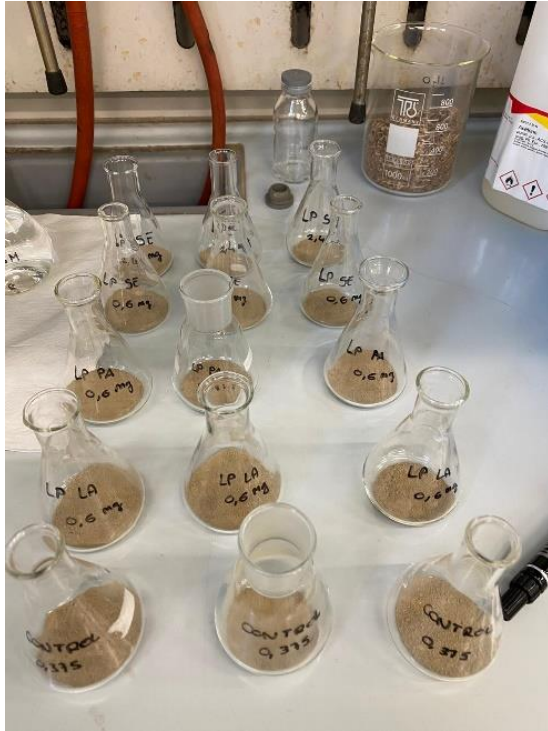


Fig 3.5. Misura dell'attività ureasica basata sull'accumulo di ammonio nel suolo: preparazione del suolo nelle beute.



a



b

Fig 3.6. Distillazione e titolazione per la determinazione dell'ammonio accumulato nel suolo: a) aggiunta dell'indicatore al distillato, b) distillatore.

Tab 3.2. Tabella riassuntiva delle soluzioni da inserire nel test per la misurazione dell'attività ureasica nel suolo.

Trattamenti	Quantità inibitore (mL)	Suolo (g)	H₂O (mL)	Soluzione di urea 0,08 M (mL)
Controllo	/	5	5	2,5
WS_LA_t.q.	0,030	5	4,97	2,5
WS_LA_H2O	0,030	5	4,97	2,5
WS_LA_EtOAc	0,030	5	4,97	2,5
WS_PA_t.q.	0,133	5	4,867	2,5
WS_PA_H2O	0,133	5	4,867	2,5
WS_PA_EtOAc	0,133	5	4,867	2,5
WS_PI_t.q.	0,057	5	4,943	2,5
WS_PI_H2O	0,057	5	4,943	2,5
WS_PI_EtOAc	0,057	5	4,943	2,5

Tab 3.3. Tabella riassuntiva delle soluzioni da inserire nel test per la misurazione dell'attività ureasica nel suolo con biochar come supporto.

Trattamenti	Quantità inibitore (ml)	Suolo (g)	H₂O (mL)	Soluzione di urea 0,08 M (mL)	Biochar (g)	Acetone (mL)
Controllo	/	5	5	2,5	/	/
Biochar	/	5	5	2,5	0,050	/
Bio+ acetone	/	5	5	2,5	0,050	2
Bioc+LP LA	0,00438	5	5	2,5	0,050	2
Bioc+LP PA	0,00486	5	5	2,5	0,050	2
Bioc+LP PI	0,00562	5	5	2,5	0,050	2

3.2.2 Misura dell'attività ureasica: metodo basato sull' ammoniaca rilasciata in aria

Lo scopo del metodo è stato di valutare quanta NH₃ veniva rilasciata in aria dopo 24, 48, 72 h in atmosfera, in seguito all'attività ureasica dei batteri presenti nel suolo.

Con questo metodo è stato condotto un solo esperimento in cui sono stati valutati due inibitori dell'ureasi (catecolo e WS_PA_t.q.), oltre ad un trattamento di controllo in cui non era presente alcun inibitore. Le repliche sperimentali erano costituite da fiale da 25 mL; per ogni trattamento e per ogni tempo di incubazione sono state allestite 2 repliche.

Per catturare l'ammoniaca dall'aria è stata utilizzata carta da filtro impregnata di acido borico. A questo scopo sono state ritagliate strisce di 10 cm di lunghezza e 2,3 cm di larghezza da un foglio di carta da filtro. Ciascuna striscia è stata poi arrotolata e cucita alle estremità, in modo tale che non potesse srotolarsi (Fig. 3.7a).

Acqua deionizzata, suolo, urea ed inibitore sono stati inseriti nelle fiale nelle quantità riportate in Tab.3.4. Come per gli altri esperimenti i volumi delle soluzioni di inibitori sono stati calcolati in modo da ottenere nel suolo una concentrazione di catecolo pari a 5 µg/g. Provenienza e trattamento del suolo utilizzato sono stati gli stessi descritti al paragrafo 3.2.1. Il contenuto delle fiale è stato poi mescolato accuratamente con una bacchetta in metallo.

Per impregnare ciascuna delle strisce di carta da filtro precedentemente predisposte, si sono preparati circa 3 mL di una soluzione di acido borico 40 mol/g in una piastra Petri, che è stata poi pesata (Fig 3.7b). La striscia di carta arrotolata è stata appoggiata per pochi secondi all'interno della piastra Petri in modo che potesse assorbire l'acido borico, poi con l'aiuto di una pinzetta è stata rimossa dalla capsula e strizzata per eliminare l'acido borico in eccesso. A questo punto è stato registrato il peso della capsula in modo tale da sapere quanto acido borico è stato assorbito dalla carta. La striscia di carta impregnata è stata poi lasciata per circa 3 h sotto cappa in modo che tutta l'acqua assorbita evaporasse, lasciando solo l'acido borico. Al termine delle 3 h la striscia di carta arrotolata è stata sospesa all'interno della fiala con un filo di cotone. Il tutto è stato chiuso con un sotto tappo di plastica e un tappo di metallo pressato a formare il vuoto. In questo modo la striscia di carta rimaneva sospesa senza venire a contatto né con il suolo sul fondo, né con le pareti della fiala.

Le fiale sono state incubate in bagno termostato a 37°C per tempi differenti: 24, 48 e 72 h (Fig 3.7c, d). Allo scadere del tempo di incubazione prefissato, ciascuna fiala è stata aperta e la striscia di carta arrotolata presente al suo interno è stata trasferita in un becher con 3 mL di acqua deionizzata dove è stata lasciata riposare 15 min, prima di procedere con la titolazione. Tramite una pinzetta la carta è stata poi strizzata all'interno del becher in modo da rilasciare l'acido borico intrappolato in essa, nel quale sono stati aggiunti 20 microlitri di indicatore (bromo cresolo e rosso metile 0,005M). Infine, per titolazione acido-base è stata usata una micro-pipetta contenente la soluzione di H₂SO₄ 0,005 M. Sono stati registrati quanti ml sono stati necessari affinché avvenisse il viraggio dell'indicatore, e tramite tali passaggi siamo stati in grado di quantificare quanta NH₃ viene rilasciata in atmosfera. La percentuale di NH₃ volatilizzata in atmosfera è stata calcolata tramite il rapporto tra le mmol di NH₃ titolate sulle mmol di NH₃ totali potenzialmente presenti nel suolo.

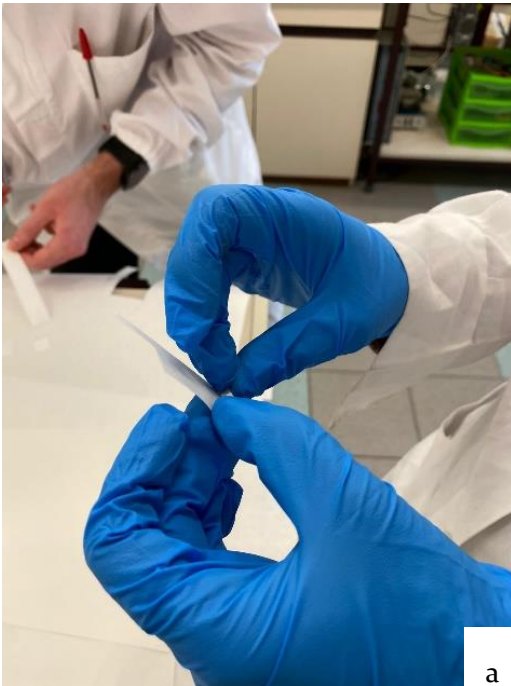


Fig 3.7. Sequenza d'immagini che descrivono le fasi della preparazione dei campioni per la misurazione dell'attività ureasica in atmosfera: a) Preparazione del filtro arrotolato, b) Pesatura della Petri contenente acido borico, c) Posizionamento dei campioni all'interno del bagno termostato, d) Campioni finiti prelevati dal bagno termostato.

Tab 3.4 Tabella riassuntiva soluzioni inserite nella misura dell'attività ureasica in atmosfera

Trattamenti	Quantità inibitore (mL)	Suolo (g)	H₂O (mL)	Soluzione di Urea 1 M (mL)
Controllo	/	5	5	2,5
catecolo	0,50	5	4,5	2,5
WS_PA_t.q	0,65	5	4,35	2,5

3.3 Saggi di tossicità

3.3.1 Preparazione suolo artificiale

I test di tossicità sulla pianta erbacea monocotiledone *Avena sativa* e sul lombrico *Eisenia andrei* sono stati eseguiti utilizzando lo stesso suolo artificiale, che è stato preparato, in conformità con le indicazioni di OECD (2016), con la seguente composizione (basata su componenti essiccati a 40°C fino a peso costante):

- 10% di torba di sfagno: torba di sfagno irlandese acquistata da Vigorplant Italia srl, Via A. Volta 2, 26861 Fombio (LO).
- 20% caolino: caolino lavato e micronizzato acquistato da General Copper, via Masaccio 30, 37053 Cerea (VR),
- 70% sabbia di quarzo: sabbia fine del fiume Po acquistata da Bacchi, via Argine Cisa 19/A, 42022 Boretto (RE),

Questi componenti, prima di venir miscelati tra di loro, sono stati trattati. Si è preceduto ad essiccare la sabbia e setacciarla manualmente con un setaccio a maglie da 500 µm per raggiungere i diametri delle particelle richiesti dalla linea guida (prevalentemente sabbia fine con più del 50%

delle particelle tra 50 e 200 μm). La torba è stata essiccata a 40° C in stufa per 24-48 h e successivamente è stata macinata e setacciata attraverso un mulino a cilindri DARGENT SA con maglia da 2 mm. Per quanto riguarda il caolino si è proceduto solamente all'essiccamento in stufa anch'esso a 40°C.

I costituenti secchi del terreno sono stati miscelati con una spatola all'interno di contenitori di plastica. 2 kg per ciascuno dei contenitori in modo che la miscelazione fosse facile da ottenere e il risultato fosse un prodotto del tutto omogeneo (Fig 3.8).

Immediatamente prima dell'inizio di ogni esperimento, i terreni asciutti sono stati inumiditi aggiungendo acqua distillata (30 mL/100 g di suolo secco per i test su avena, 40 mL/100 g di suolo secco per il test di tossicità con i lombrichi). La quantità di acqua aggiunta era tale da produrre un substrato umido e adatto alla vita di lombrichi e la crescita delle piante, ma da cui non si separasse acqua libera, nemmeno se era compresso nella mano.

Il suolo artificiale è stato utilizzato in tutte le prove di tossicità, preferendolo ad un suolo naturale, per i seguenti motivi:

- 1) La Linea guida OECD 222 (OECD, 2016) raccomandano l'uso di terreno artificiale per il test di riproduzione sul lombrico, in ugual modo la norma ISO 11269-2 (ISO, 2012) raccomanda l'uso di terreno artificiale per eseguire test di tossicità sulle piante.
- 2) Utilizzare un suolo artificiale permette di poter lavorare in condizioni più controllabili, standardizzate e ripetibili di un suolo naturale.
- 3) Un terreno artificiale è meno incline alla crescita di piante non utilizzate nel test o di organismi che potrebbero interferire con le sostanze saggiate.



Fig 3.8. Sequenza di immagini che raffigurano il momento della pesatura di ogni componente del suolo artificiale e il miscelamento delle varie componenti.

3.3.2 Lombrichi

Il lombrico *Eisenia andrei* è stato utilizzato per eseguire un saggio della durata di 56 giorni, secondo le indicazioni della linea guida OECD n. 222 (OECD 2016) e la norma ISO n.11268-2 (ISO, 2012). L'obiettivo del saggio è stato quello di valutare l'effetto letale e sub-letale delle sostanze in esame sugli organismi ed è stato suddiviso in due fasi:

- 1) la mortalità e gli effetti sulla crescita dei vermi adulti sono stati determinati dopo 28 giorni d'esposizione, contando il numero di sopravvissuti e misurandone il peso;
- 2) gli adulti sono stati quindi rimossi dal terreno e gli effetti sulla riproduzione sono stati valutati dopo ulteriori 28 giorni di esposizione in base al numero e al peso di giovani (progenie) e il numero di bozzoli deposti presenti nel suolo.

Con *E. andrei* sono stati condotti due diversi esperimenti. Il primo ha valutato la tossicità della lignina pirolitica e delle frazioni WS ottenute per pirolisi dalle tre biomasse considerate. Il secondo ha valutato gli effetti della combinazione tra lignina pirolitica e biochar.

3.3.2.1 Organismi utilizzati per saggi

E. andrei (Annelida, Oligochaeta, Lumbricidae), è un verme segmentato, con simmetria bilaterale. L'adulto è caratterizzato da una ghiandola esterna detta clitello, che si presenta come un rigonfiamento che interessa alcuni segmenti posti subito dietro ai pori genitali, la cui funzione è produrre i bozzoli all'interno dei quali sono deposte le uova. In condizioni ottimali la durata del loro ciclo di vita (dal bozzolo appena deposto all'adulto clitellato) varia da 45 a 51 giorni. Sono animali ermafroditi insufficienti e si riproducono normalmente attraverso copulazione e fecondazione incrociata, in seguito alla quale producono bozzoli contenenti 1-20 uova fecondate. I neonati, non pigmentati sono lunghi solo pochi millimetri, quando emergono dai bozzoli, acquisiscono la loro pigmentazione adulta entro pochi giorni.

I lombrichi sono considerati eccellenti bioindicatori della qualità del suolo in quanto sensibili ad un gran numero di contaminanti, ubiquitari e strettamente a contatto con il substrato in cui vivono. La modalità di esposizione dei lombrichi alle sostanze testate presenti nel terreno è per lo più tramite l'assorbimento dell'acqua interstiziale attraverso la superficie corporea priva di cuticole e in misura minore dall'ingestione di suolo e materia organica e dalla respirazione dell'aria interstiziale.

La coltura di *Eisenia andrei* è stata acquistata da un vermicoltore (Lombricoltura Compagnoni Mandello del Lario, LC, Italia) e mantenuta in laboratorio per diverse settimane prima di effettuare gli esperimenti (Fig.3.9). I lombrichi, una volta arrivati dalla lombricoltura, sono stati selezionati, divisi e sistemati in vasche da 10 L per garantire la corretta crescita dei vermi fino alla dimensione necessaria per eseguire il saggio; ogni vasca conteneva un numero di vermi compreso tra 240 e 380. Il substrato era costituito da una miscela di 1 kg di torba di sfagno, 1 kg di suolo naturale, ed 1 L di acqua distillata. Le vasche di allevamento sono state mantenute in cella termostatica alle condizioni ambientali in seguito utilizzate per i saggi: temperatura 20 ± 1 °C, ciclo luce-buio 16:8 h, illuminazione 700 lx.

Settimanalmente, i lombrichi sono stati alimentati con fiocchi d'avena e crusca e il terreno è stato inumidito con acqua distillata fino al raggiungimento dell'umidità ottimale.

I lombrichi selezionati per gli esperimenti erano adulti, di almeno 8 settimane di età, con un clitello ben sviluppato e di dimensioni il più possibile simili tra di loro.



Fig. 3.9. Lombrichi della specie *Eisenia andrei* sulla superficie del substrato, all'interno di una vasca di allevamento.

3.3.2.2 Preparazione dei trattamenti

Tutte le unità sperimentali usate per i saggi su *E. andrei* erano costituite da vaschette di vetro (20×12 cm, altezza 8 cm) ognuna contenente 500 g di terreno artificiale secco, preparato secondo quanto spiegato nel paragrafo 3.3.2, inumidito con 200 mL di acqua. La preparazione delle vaschette ed in particolare l'aggiunta del materiale da saggiare è stata però diversa a seconda del trattamento. (Fig 3.10).



Fig 3.10. Immagini che raffigurano diversi passaggi per l'allestimento del saggio: preparazione delle vaschette, la pesata del suolo artificiale e i rispettivi trattamenti da testare.

Per il trattamento di controllo, 200 mL di acqua distillata sono stati versati sul suolo secco già pesato all'interno della vaschetta.

Per le frazioni WS_{t.q.} e WS_{H₂O}, la quantità di materiale richiesta è stata diluita con acqua distillata fino ad un volume complessivo di 200 mL. La soluzione così ottenuta è stata quindi versata sul suolo secco già pesato all'interno della vaschetta.

Per le frazioni LP e WS_{EtOAc}, la quantità richiesta è stata diluita in 10 mL di acetone. La soluzione così ottenuta è stata quindi miscelata con il suolo secco già pesato all'interno della vaschetta. Le vaschette sono poi state lasciate sotto cappa aspirante per due ore per far evaporare l'acetone. A questo punto è stata aggiunta l'acqua necessaria a inumidire il suolo. Allo stesso modo, ma usando acetone puro senza aggiunte, è stato preparato il trattamento di controllo per il solvente.

Nel caso del secondo esperimento, in cui i materiali saggiati erano miscele di lignina pirolitica e biochar, 5 g biochar sono stati posizionati all'interno delle vaschette; al biochar è stata poi aggiunta la quantità richiesta di lignina pirolitica, diluita con 10 mL di acetone. Le vaschette sono state lasciate poi sotto cappa aspirante per diverse ore. È stato aggiunto ad ogni vaschetta il suolo artificiale amalgamandolo al biochar il più possibile, è stata poi aggiunta l'acqua per inumidire il suolo. Il biochar utilizzato è stato derivato dalle pirolisi effettuate delle biomasse pioppo panico e larice. È stato scelto di utilizzare una miscela dei tre biochar ottenuti triturandoli con un mortaio e amalgamandoli insieme a formare un unico biochar_mix.

Una volta completata le preparazioni descritte, tutte le vaschette sono state pesate, chiuse con un coperchio e collocate nella cella termostatica usata per l'esperimento, già impostata alle condizioni ambientali utilizzate (temperatura 20 ± 1 °C, ciclo luce-buio 16:8 h, illuminazione 700 lx).

3.3.2.3 Esposizione dei lombrichi ai suoli trattati e valutazione degli effetti

Il giorno successivo alle operazioni descritte nel paragrafo 3.3.2.3 ogni vaschetta è stata pesata per valutare perdita di acqua per evaporazione ed il peso originale è stato ripristinato aggiungendo acqua distillata. Il suolo è stato poi rimescolato con una spatola per renderlo omogeneo e soffice. È stato quindi prelevato un campione di suolo di 7 g (Fig 3.11d) da utilizzare successivamente per la misura del pH. Successivamente è stato preparato l'alimento pesando 2 g di farina di avena e 5 g di acqua all'interno di un becher, il composto mescolato è stato posto all'interno del suolo (Fig 3.11 c).

Per prima cosa si è proceduto a selezionare i lombrichi da inserire all'interno delle vaschette, i criteri utilizzati per la scelta sono stati: la grandezza del lombrico e la presenza del clitello. Tra quelli selezionati sono stati fatti dei gruppetti da 10 cercando di renderli omogenei tra di loro. Dopodiché ogni gruppetto di 10 è stato assegnato in modo casuale in una vaschetta. Tali operazioni sono state da noi definite "giorno 0" cioè il giorno dell'inizio del saggio, lo stesso procedimento viene ripetuto per le altre repliche in giorni diversi. Le vaschette complete sono state poi chiuse e riposte in incubatore. (Fig. 3.11a)

Una volta a settimana era eseguito il controllo settimanale durante il quale le vaschette erano pesate, era reintegrata la perdita d'acqua per evaporazione, ed era somministrato.

Passati 28 giorni ogni vaschetta contenente i vermi è stata rovesciata delicatamente su una vaschetta contenitrice più grande e tramite bacchetta di vetro sono stati recuperati gli adulti presenti al suo interno. Si è proceduto poi alla pesatura e al conteggio dei lombrichi, il peso degli adulti serve a valutare l'accrescimento dei lombrichi, mentre il conteggio degli adulti definisce la sopravvivenza. Ciascun lombrico è stato poi trasferito in una capsula Petri con un foglio di carta da filtro sul fondo e 2 mL di acqua deionizzata e sono stati riposti a spurgare per 48 h in incubatore a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Fig 3.11 b).

Il suolo estratto è stato poi rimesso all'interno della propria vaschetta e in egual modo è stato dato il nutrimento per le uova e per i nuovi nati rimasti invece nel terreno.

Gli adulti, al termine delle 48 h trascorse in incubatore sono stati inseriti all'interno di contenitori e riposti in congelatore per poter eseguire su di essi successive analisi relative all'accumulo di IPA o altri inquinanti all'interno dei tessuti.

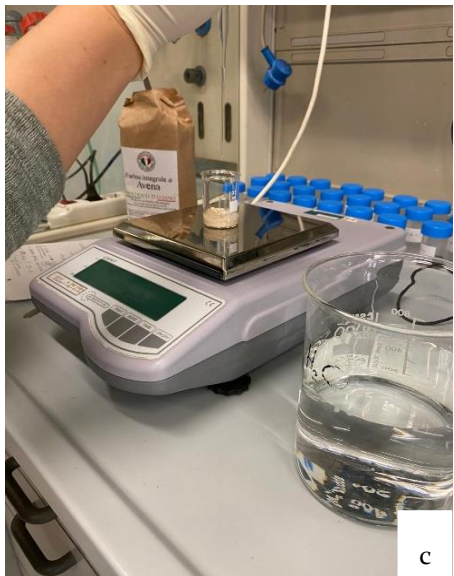
Dopo 56 giorni dall'inizio dell'esposizione l'esperimento è stato concluso. Il suolo contenuto in ciascuna vaschetta è stato trasferito in un contenitore di dimensioni maggiori dove è stato ispezionato con l'aiuto di una bacchetta di vetro, prelevando con una pinzetta tutti i neonati e i bozzoli trovati (Fig 3.12 a). I bozzoli sono stati trasferiti all'interno di un becher con acqua deionizzata, questa operazione è stata fatta per riconoscere e contare separatamente i bozzoli pieni e quelli vuoti. Infatti, i pieni vanno fondo mentre i vuoti rimangono a galla (Fig 3.12a). I neonati recuperati sono stati immersi in acqua in modo da separarli dal suolo che rimaneva ad essi adeso e inseriti poi in una vaschetta con un foglio di carta da filtro sul fondo, per pulirli ulteriormente e infine contati. Dopo il conteggio i neonati sono stati inseriti in una busta di foglio di alluminio pre-pesata ed è stata eseguita un'ulteriore pesata per misurare il peso umido dei neonati. Infine, i neonati sono stati riposti in stufa a 60°C per 3 giorni. È stata effettuata un'ultima pesata al termine dei tre giorni per ottenere il peso secco dei neonati. (Fig. 3.11).



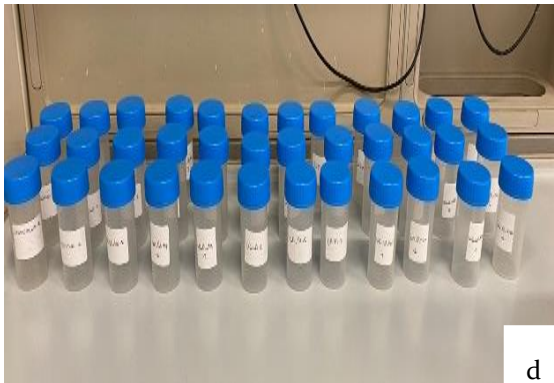
a



b



c



d

Fig 3.11. a) Incubatore contenente i lombrichi, b) Piastre petri contenenti gli adulti c) Preparazione alimento lombrichi d) Contenitori per i campioni di suolo per per la misura del pH.

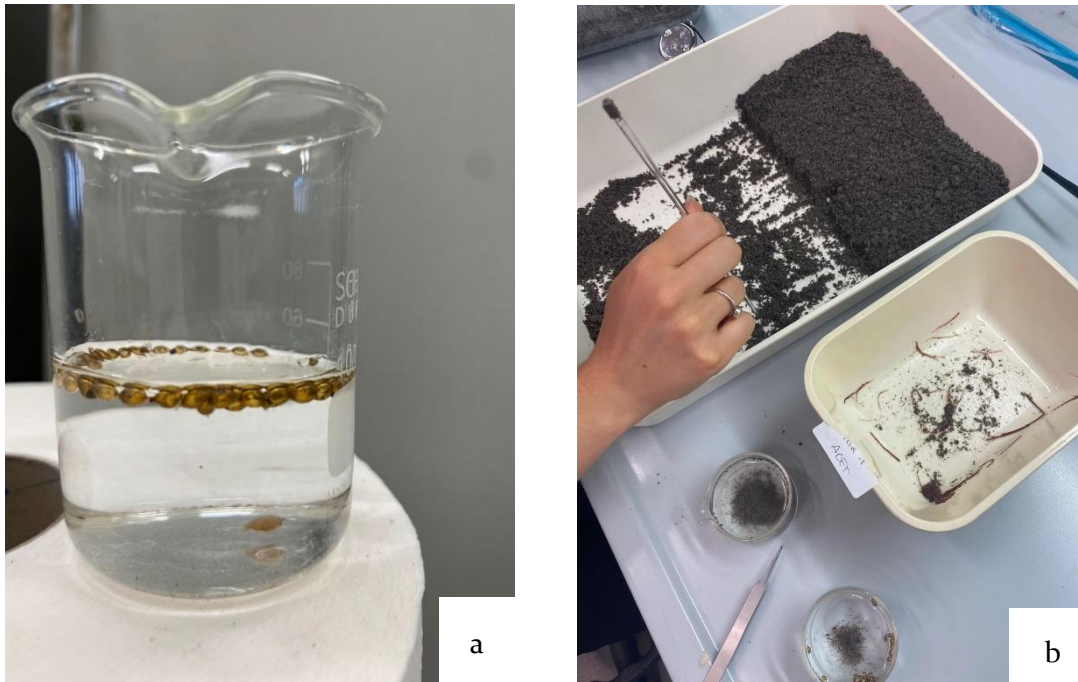


Fig. 3.12 a) Becher contenute bozzoli pieni e vuoti ritrovati nel suolo, b) Immagine raffigurante il momento dell'estrazione dei neonati e dei bozzoli dal suolo

3.3.2.4 disegno sperimentale

Per il saggio di tossicità dei lombrichi sono stati eseguiti come già detto in precedenza due esperimenti, nel primo sono state saggiate le frazioni estratte dalle biomasse esaminate senza il supporto del biochar, nel secondo invece sono state valutate solo le lignine pirolitiche delle tre biomasse con il supporto del biochar. Per il primo esperimento sono stati saggiati 12 trattamenti, definiti in Tab 3.5, con 3 repliche ciascuno. Tenendo conto dell'elevato numero di repliche, l'inizio dell'esperimento è stato suddiviso in tre giorni consecutivi, in ognuno dei quali è stata allestita una singola replica per ciascun trattamento. Come conseguenza, tutte le fasi descritte in precedenza sono avvenute in tre giorni consecutivi, uno per ciascuna replica. Per quanto riguarda il secondo esperimento, sono stati saggiati 6 trattamenti, con 4 repliche ciascuno (Tab. 3.6). Anche in questo caso si è deciso di suddividere l'inizio dell'esperimento, e di conseguenza le fasi successive, in due giornate separate; nella prima sono state trattate replica 1 e replica 2 e nella seconda giornata replica 3 e replica 4.

Tab 3.5. Tabella riassuntiva quantità inserite nel primo esperimento dei lombrichi

Trattamenti	Suolo(g)	Quantità di inibitore	H₂O (mL)	Acetone (mL)
Controllo	500	/	200	/
Acetone	500	/	200	10
WS_PI_t.q.	500	5,7 mL	194,3	/
WS_PI_H ₂ O	500	5,7 mL	194,3	/
LP_PI	500	2,266 g	200	10
WS_PA_t.q.	500	13,3 mL	186,7	/
WS_PA_H ₂ O	500	13,3 mL	186,7	/
WS_PA_EtOAc	500	13,3 mL	186,7	/
LP_PA	500	1,256 g	200	10
WS_LA_t.q.	500	3 mL	197	/
WS_LA_H ₂ O	500	3 mL	197	/
WS_LA_EtOAc	500	3 mL	197	/
LP_LA	500	1,186 g	200	10

Tab 3.6. Tabella riassuntiva quantità inserite nel secondo esperimento dei Lombrichi

Trattamenti	Suolo(g)	Quantità di inibitore (g)	H₂O (mL)	Acetone (mL)	Biochar (g)
Controllo	500	/	200	/	5
Biochar	500	/	200	/	5
Bio+ acetone	500	/	200	10	5
Bioc+LP LA	500	0,438	200	10	5
Bioc+LP PA	500	0,486	200	10	5
Bioc+LP PI	500	0,562	200	10	5

3.3.3 Avena

La fitotossicità dei prodotti di pirolisi è stata valutata misurando gli effetti sulla germinazione e sull'accrescimento nelle prime fasi del ciclo vitale dell'avena (*Avena sativa*) seminata su suolo artificiale, secondo la norma ISO 11269-2 (2012).

3.3.3.1 Organismi utilizzati per i saggi

È stata scelta *A.sativa* come organismo modello per l'esperimento perché è risultata essere una specie raccomandata dall'EPA degli Stati Uniti, come riportato dalle linee guida OCSE 208 (2016). Questa specie è stata ampiamente utilizzata nei saggi di tossicità per testare erbicidi, metalli pesanti e salinità. La sua sensibilità ad un'ampia varietà di fattori di stress garantisce il suo utilizzo in diversi settori. Si tratta di una pianta annuale monocotiledone appartenente alla famiglia delle Poaceae (o Gramineae), di altezza tipicamente compresa tra 0,70 e 1,25 m. La specie è ermafrodita (ha organi sia maschili che femminili per la riproduzione) e generalmente viene impollinata dal vento; il suo seme è definito cariosside. Inoltre, le piante di avena prediligono un terreno povero ed asciutto e condizioni di pH compreso tra 4,5 e 8,6.

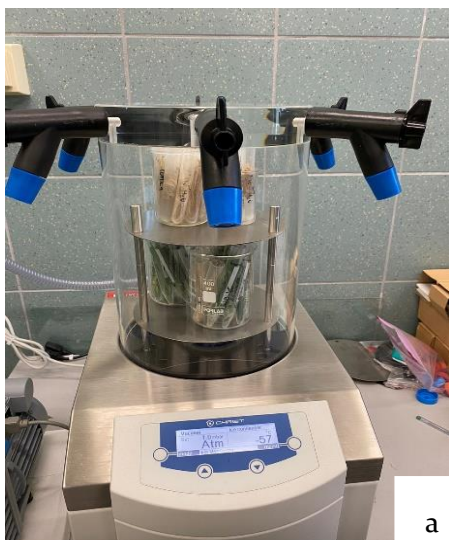
3.3.3.2 Preparazione dei trattamenti

Per effettuare gli esperimenti sono stati utilizzati vasi di plastica di altezza 10 cm. In ogni vaso è stato inserito un dischetto di carta da filtro posizionato sul fondo; sono stati inseriti poi 200 g di suolo artificiale cercando di non pressare il terreno e di mantenerlo il più soffice possibile. (Fig. 3.14a).

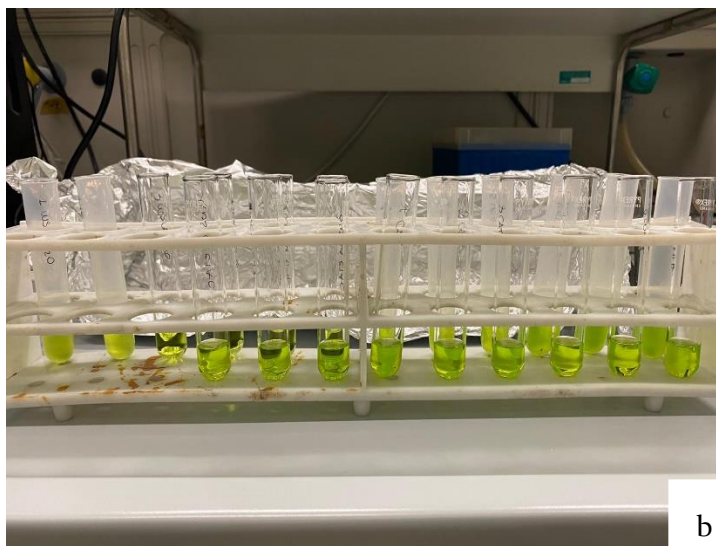
Per il trattamento di controllo sono stati versati 60 mL di acqua deionizzata sul suolo che è poi stato lasciato riposare per un paio di ore. Per le frazioni LP e quelle WS_EtOAc, la quantità richiesta di materiale è stata diluita con 4 mL di acetone e poi versata sul suolo preparato nel vaso; il vaso è stato lasciato sotto cappa aspirante un paio d'ore, per far evaporare il solvente utilizzato. Successivamente è stato aggiunto il volume di acqua necessario per arrivare a 60 mL (si veda Tab. 3.7). Per le frazioni WS_t.q. e WS_H₂O invece, la quantità di materiale richiesta è stata diluita con acqua distillata fino ad ottenere un volume complessivo di 60 mL; la soluzione così ottenuta è stata poi versata sul suolo nel vaso, che è stato poi lasciato riposare un paio di ore.

Successivamente, utilizzando una pinzetta, subito al di sotto della superficie nel suolo di ogni vaso, sono stati inseriti 10 semi equidistanti tra loro, in modo da avere spazio per poter germinare (i semi devono essere inseriti nel verso corretto, la parte apicale mostra un piccolo ciuffetto che deve essere riposto verso l'alto). I vasetti sono stati poi posizionati in incubatore a 20 ± 1 C° e 7000 lx (ISO 12268 ,2012) di luminosità (Fig3.14 c). Ogni due giorni le piante erano innaffiate riportando sempre il peso a quello iniziale. (Fig 3.14 b); I vasetti erano anche scambiati di posizione, secondo uno schema di rotazione prefissato, per compensare le piccole differenze di temperatura e illuminazione all'interno dell'incubatore.

L'esperimento ha avuto una durata totale di 3 settimane. Al termine della prima settimana è stata valutata la germinazione delle piantine nate su un totale di 10 semi, poi è stato fatto lo sfoltoimento, ovvero per ogni vasetto sono state lasciate solo 5 piantine equidistanti tra loro, sradicando le altre. Al termine delle 3 settimane le 5 piantine di avena sono state estratte dal vasetto molto delicatamente, lavate, separate tra loro e appoggiate su carta da filtro per eliminare l'acqua in eccesso. Per ogni piantina è stata valutata tramite un righello, la lunghezza del fusto e quella della radice ed è stato anche misurato il peso del fusto a fresco. Fusto e radice separati in provette sono stati riposti in congelatore e successivamente sono stati liofilizzati per 24 h ore per poter misurare il peso a secco di entrambi (Fig 3.13 a). Infine, è stato effettuato il test che valuta la concentrazione di clorofilla nel trattamento, sul fusto delle piantine, il quale è stato sminuzzato e ne sono stati pesati 10 mg che sono stati immersi in 10 mL di soluzione di acetone al 90% per far avvenire l'estrazione e lasciato riposare al buio per 24 h al termine delle quali, sono stati prelevati ulteriori 1,8 mL di acetone al 90% e 200 µL di estratto (derivato dalla soluzione con acetone e fusto sminuzzato precedentemente descritta) e misurata tramite spettrofotometro (lunghezza d'onda 750 nm e 665 nm) la concentrazione di clorofilla a presente nell'estratto del trattamento esaminato (Fig 3.13b). Il risultato fornito dallo spettrofotometro è dato dalla media di tre analisi in successione. La misura ci permette di fare una valutazione indiretta della facoltà di attuare la fotosintesi clorofilliana delle piante di avena. Quantificare la clorofilla ci consente di avere ulteriori dati quantitativi sullo stato di salute delle piante.



a



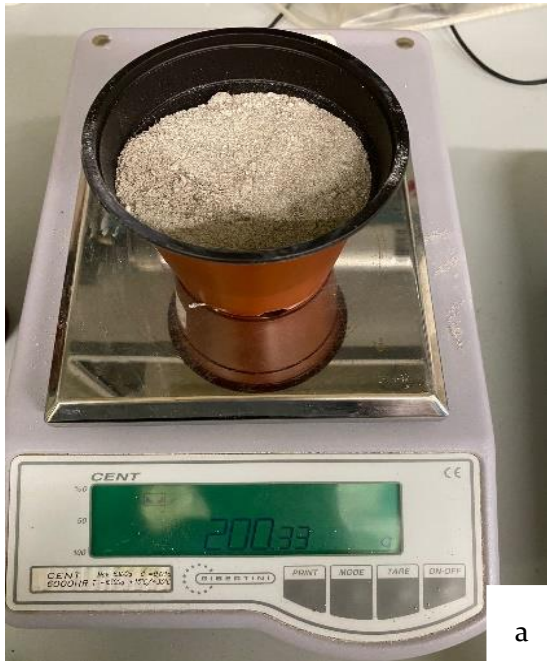
b

Fig. 3.13. a) Liofilizzatore presente nel laboratorio b) Provette preparate con soluzione di acetone al 90% e estratto di fusto.

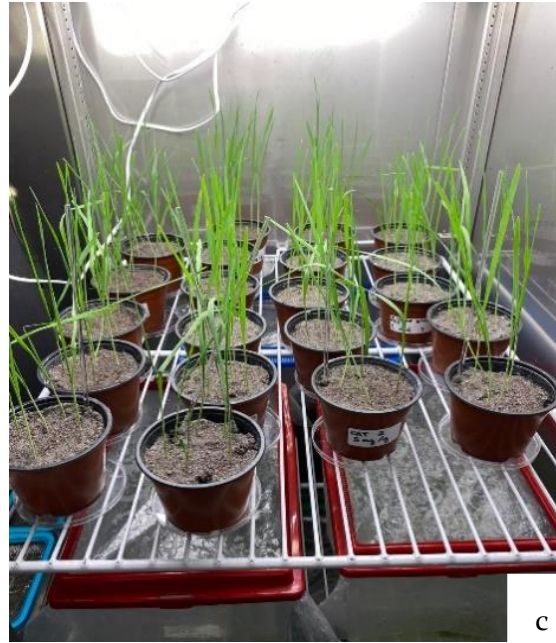
3.3.3.3 Disegno sperimentale

Questo saggio è stato eseguito per le tre biomasse esaminate attraverso due esperimenti separati tra loro, nel primo esperimento sono stati saggiati i prodotti di pirolisi del larice, nel secondo esperimento effettuato invece, sono stati saggiati i prodotti del pioppo e del panico. Per ognuno degli esperimenti sono state effettuate 3 repliche per ogni trattamento per un totale di 21 trattamenti (riportati in Tab 3.7).

Le quantità di prodotti di pirolisi saggiati sono state selezionate tale da ottenere una concentrazione di 5 μg di catecolo per g di suolo secco, come per gli altri esperimenti fin qui descritti.



a



c



b

Fig 3.14. Serie di immagini raffigurante le diverse fasi di attuazione del saggio su *Avena sativa* quali: a) Pesatura del suolo artificiale, b) Idratazione con acqua deionizzata per riportare al peso iniziale, c) Incubatore contenente piantine in fase di crescita.

Tab 3.7. Tabella riassuntiva delle quantità di sostanze saggiate tramite test *Avena sativa*.

Trattamenti	Quantità inibitore	di	g suolo	ml di H2O	ml acetone
Controllo	/		200	60	/
Acetone	/		200	60	4
WS_ PI_ t.q.	1,29 mL		200	58,7	4
WS_ PI_ H ₂ O	1,29 mL		200	58,7	4
WS_ PI_ EtOAc	1,29 mL		200	58,7	4
LP_ PI	0,134 g		200	60	4
WS_ PA_ t.q.	1,28 mL		200	58,7	4
WS_ PA_ H ₂ O	1,28 mL		200	58,7	4
WS_ PA_ EtOAc	1,28 mL		200	58,7	4
LP_ PA	0,148 g		200	60	4
WS_ LA_ t.q.	1,2 mL		200	88,225	4
WS_ LA_ H ₂ O	1,2 mL		200	88,225	4
WS_ LA_ EtOAc	1,2 mL		200	88,225	4
LP_ LA	0,474 g		200	60	4

3.3.4 Crescione

3.3.4.1 Organismi utilizzati per il saggio

Il crescione (*Lepidium sativum*, famiglia Brassicaceae) è un'erba annuale dicotiledone alta circa 15 -70 cm e produce semi rossi di circa 2 mm di grandezza. *L. sativum* è stato scelto come organismo modello in quanto specie sperimentale sensibile raccomandata nel metodo UNI 11357 (UNI, 2010). Esso è stato ampiamente utilizzato nei test di tossicità per la sua crescita rapida e perché è economico e facile da analizzare. La tossicità è stata valutata in base agli effetti su germinazione dei semi e crescita dei germogli a contatto con carta da filtro impregnata con soluzioni dei prodotti di pirolisi studiati.

3.3.4.2 Procedura del saggio

Il saggio è stato applicato solo alle frazioni solubili in acqua derivate dalla pirolisi delle tre biomasse considerate, che sono state saggiate simultaneamente in un unico esperimento. Per ogni trattamento sono state allestite 3 repliche. Le quantità di inibitore saggiate sono state selezionate sempre prendendo come riferimento i 5 µg catecolo come negli esperimenti precedentemente descritti.

Ciascuna unità sperimentale era costituita da una piastra Petri del diametro di 9 cm al cui interno, sul fondo, è stato inserito un disco di carta da filtro: All'interno di ciascuna piastra Petri sono stati inseriti 25 semi di crescione, distribuendoli regolarmente sulla superficie del disco di carta, in modo che avessero spazio sufficiente per germogliare. Per il trattamento di controllo sono stati aggiunti 5 mL di acqua distillata. Per le frazioni WS_EtOAc la quantità richiesta (Tab. 3.8) è stata diluita con acetone ed iniettata all'interno della piastra Petri dopodiché è stata aggiunta la quantità d'acqua necessaria ad arrivare a 5 mL totali. Per quanto riguarda le frazioni WS_t.q. e WS_H₂O, la quantità richiesta è stata diluita con acqua e inserita nella Petri. Le piastre sono state chiuse con coperchio e pellicola, e sono state mantenute per 72 h all'interno di un contenitore al buio in incubatore a temperatura di 20±1 C°.

La valutazione sulla germinazione è stata effettuata al termine delle 72 h, contando il numero di semi germinati su un totale di 25 esposti. È stata inoltre misurata la lunghezza del fusto e della radice dei germogli tramite righello (Fig 3.15 b, c).

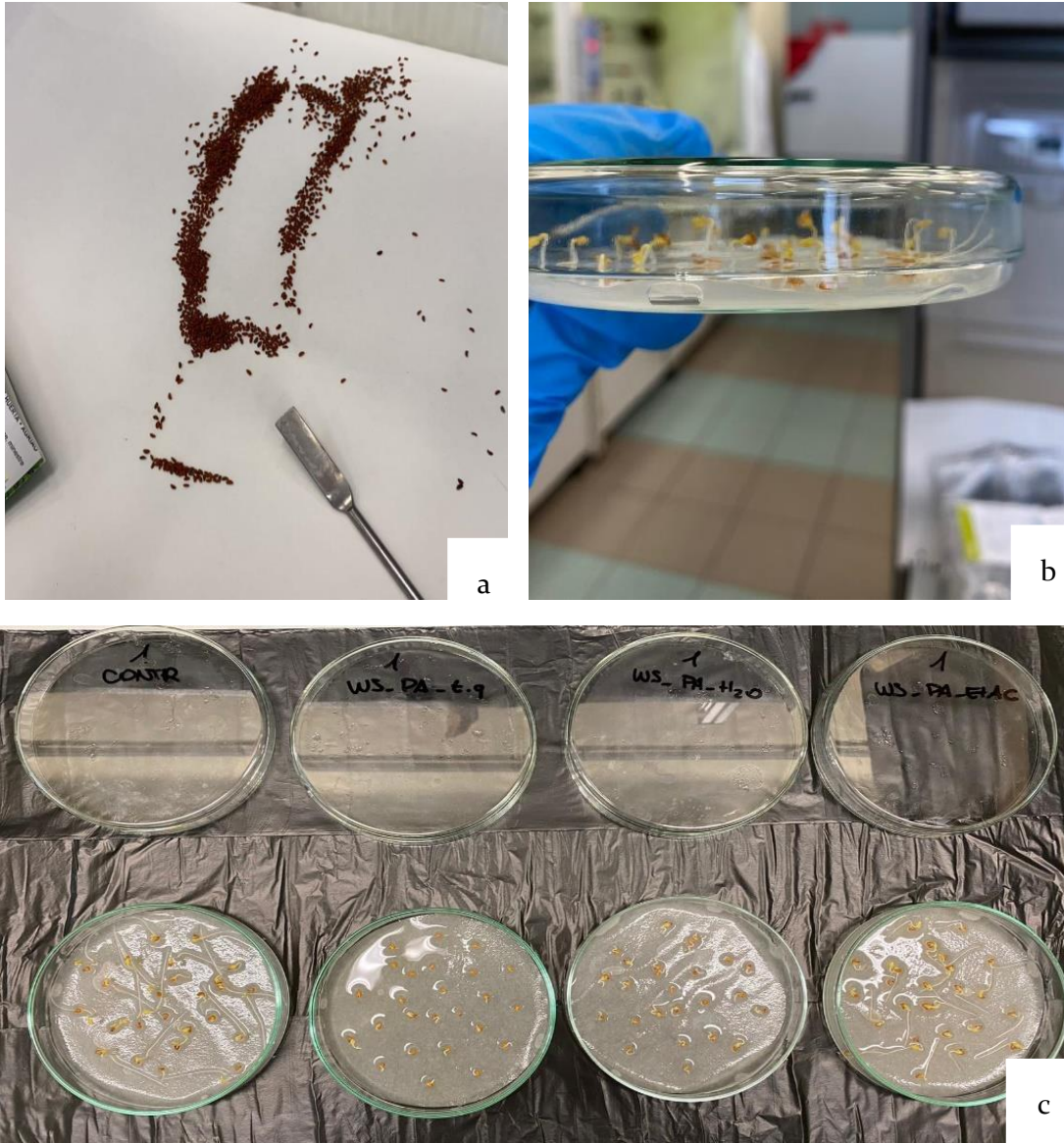


Fig.3.15. Saggio sulla germinazione del crescione: a) Selezione dei semi di crescita, b) Germinazione dei semi dopo 72h c) Confronto tra diversi trattamenti saggianti.

Tab .3.8. Tabella riassuntiva delle quantità delle soluzioni inserite nel test relativo al crescione.

Trattamenti	Quantità di inibitore (mL)	Quantità di H₂O (mL)
Controllo	/	5
WS_LA_t.q.	0,020	4,98
WS_LA_H ₂ O	0,020	4,98
WS_LA_EtOAc	0,020	4,98
WS_PA_t.q.	0,089	4,911
WS_PA_H ₂ O	0,089	4,911
WS_PA_EtOAc	0,089	4,911
WS_PI_t.q.	0,038	4,962
WS_PI_H ₂ O	0,038	4,962
WS_PI_EtOAc	0,038	4,962

3.3.5 Respirazione batterica

Con questo saggio si è voluto valutare, tramite la respirazione del suolo che è un indicatore di attività microbica, se la comunità batterica nel suo complesso fosse o meno influenzata dalla presenza dei prodotti di pirolisi. Si è deciso di saggiare solo la frazione WS_t.q. di tutte e tre le biomasse prese in esame.

3.3.5.1 Procedura del saggio

Provenienza e trattamento del suolo utilizzato sono stati gli stessi descritti al paragrafo 3.2.1. Sono state preparate 12 bottigliette di vetro scuro con annesse testine che avevano il compito di misurare la CO₂ emessa dalla respirazione effettuata dai batteri del suolo. All'interno di ogni bottiglia sono stati inseriti 126 g di suolo e un agitatore magnetico (Fig 3.16). La quantità di inibitore da testare è stata diluita con acqua deionizzata ed è stato aggiunto all'interno delle bottiglie (WS_PA_t.q., WS_PI_t.q., WS_LA_t.q.), per il controllo è stata inserita solamente acqua deionizzata vedi Tab 3.9. All'interno delle bottiglie è stata posizionata una tettarella porta pastiglie di KOH, nella quale sono state inserite una quantità di circa una decina di pastiglie per bottiglia. Le bottiglie sono state poi chiuse con una testina apposita impostata a 250 come soglia limite per la registrazione dei dati a cui respirazione poteva arrivare, ed è stato avviato l'esperimento. Le bottiglie sono state riposte all'interno di un piano magnetico apposito attaccato alla corrente di modo tale che gli agitatori stessero in funzione e incominciassero ad agitare il composto all'interno. Il tutto è stato coperto con un sacchetto nero e riposto in cella termostatica a 20±1 °C. I dati sono stati prelevati ogni giorno fino a un totale di 28 giorni.

Per questo esperimento sono state fatte 3 repliche per ogni trattamento per un totale di 12 campioni esaminati.



Fig 3.16. Inserimento del suolo nelle bottiglie per il saggio sulla respirazione batterica.

Tab.3.9. Tabella riassuntiva delle quantità inserite nel test per la respirazione.

Trattamenti	Quantità inibitore (mL)	suolo (g)	Quantità H₂O (mL)
controllo	/	126g	74,4
WS_ PI_ t.q.	0,813	126g	73,587
WS_LA_ t.q.	5,20	126g	69,17
WS_PA_ t.q.	0,819	126g	73,581

3.4 Analisi dati

Per l'analisi dei dati derivati dagli esperimenti effettuati, sono stati utilizzati come test statistici ANOVA ad un fattore e test di Dunnet, tramite l'uso del programma Statistica (versione 10). Questo ha permesso in primo luogo, di fare un'analisi della varianza e in secondo luogo, tramite test di Dunnet, individuare quali trattamenti dossero sigificativamente diversi dal controllo usando come livello di significatività $\alpha = 0.05$. Questa metodologia di analisi è stata adottata per ogni esperimento ad eccezione dell'esperimento con il lombrico *E. andrei*, lignina pirolitica con supporto del biochar, nel quale è stato usato un disegno a blocchi completi randomizzati. Questo approccio è stato necessario per tener conto delle differenze esistenti tra lombrichi provenienti da diverse vasche di allevamento..

4. Risultati

4.1 Bilanci pirolisi

In Tab 4.1 sono state riportate le rese delle tre frazioni ottenute dalla pirolisi delle biomasse considerate nel presente studio, la frazione mancante in tabella risulta essere il gas di pirolisi, che nel nostro caso non è stato recuperato e quindi determinato.

Tab 4.1 Tabella riassuntiva con le percentuali dei resi di pirolisi delle biomasse saggiate nelle diverse frazioni in uscita dalla pirolisi, relative al peso secco della biomassa in entrata.

Biomassa	Lignina pirolitica	Frazione solubile in acqua	Biochar
panico	13,5%	3,6%	25%
larice	13,5%	11,5%	22,9%
pioppo	9,5%	8,6%	22,2%

La Fig. 4.1 raffigura il risultato dei frazionamenti effettuati con acqua ed etilacetato. Per tutte e tre le biomasse esaminate, la percentuale più alta risulta essere quella solubile in acqua superiore al 50 %, a discapito della frazione in etilacetato.

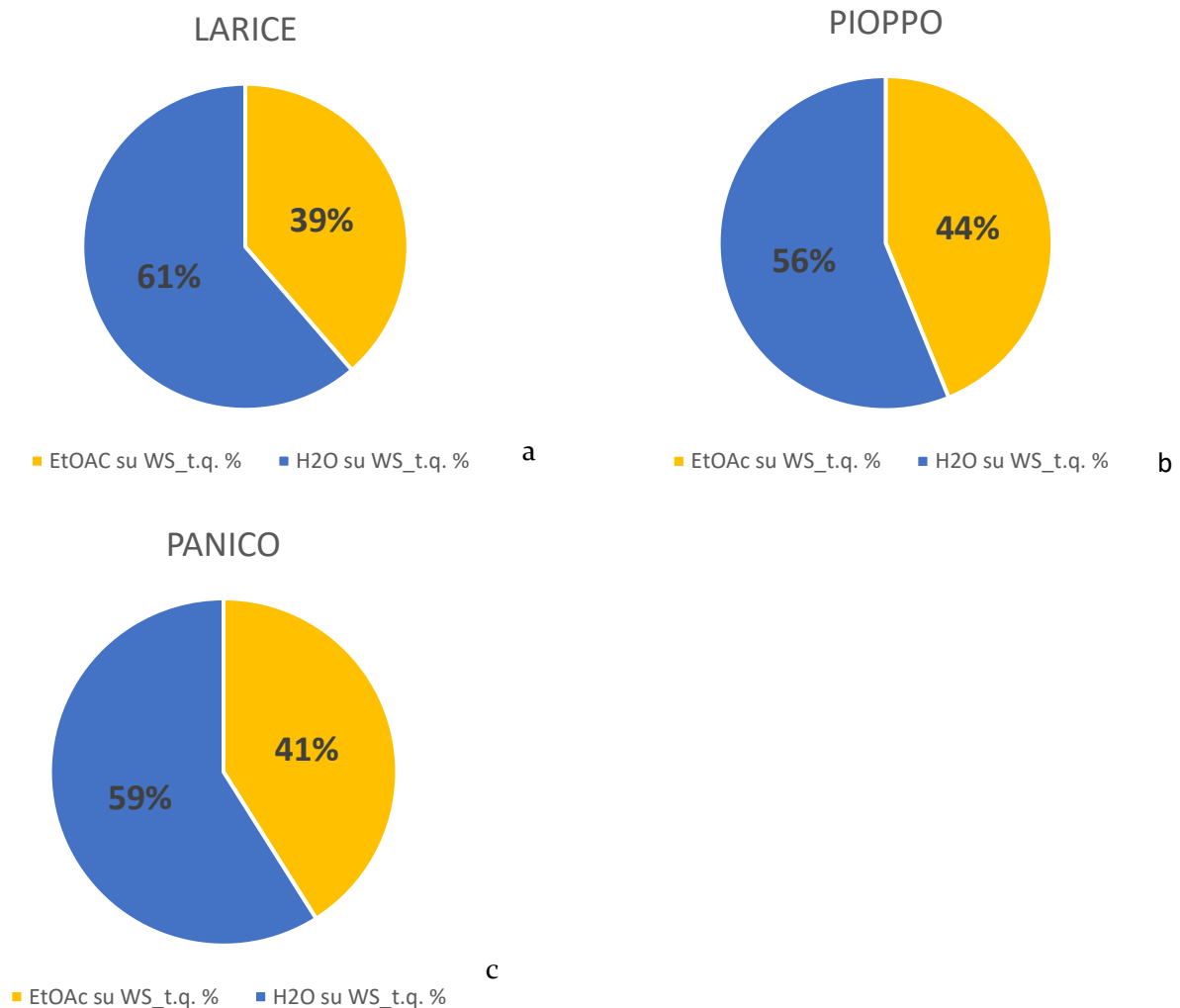


Fig 4.1 Percentuali derivate dal peso (mg) totale di WS_t.q. di ogni biomassa. a) Grafico raffigurante il frazionamento del larice, b) Grafico raffigurante frazionamento pioppo, c) Grafico raffigurante frazionamento panico.

4.2 Composizione chimica e analisi dei prodotti di pirolisi

In Fig. 4.2 a, c, e, è stata riportata la composizione chimica delle lignine pirolitiche derivate dai risultati delle analisi GC-MS. Per tutte e tre le biomasse la percentuale maggiormente presente è risultata essere quella appartenente alla categoria dei composti aromatici C₆, seguita dagli zuccheri, i quali rappresentano anch'essi una buona parte dei composti chimici presenti all'interno delle lignine. Seguono poi i grassi e gli acidi carbossilici corti presenti in minore quantità. Mentre nei grafici a torta riportati in Fig. 4.2 b,d,f, raffiguranti la composizione chimica delle frazione solubile in acqua, si può vedere che la percentuale maggiore è rappresentata dai composti non identificati mentre le restanti parti sono zuccheri e composti aromatici.

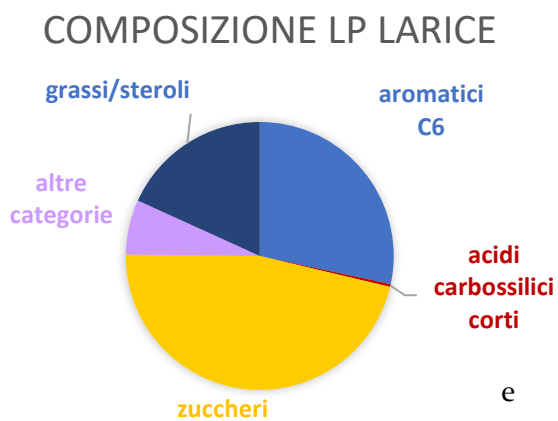
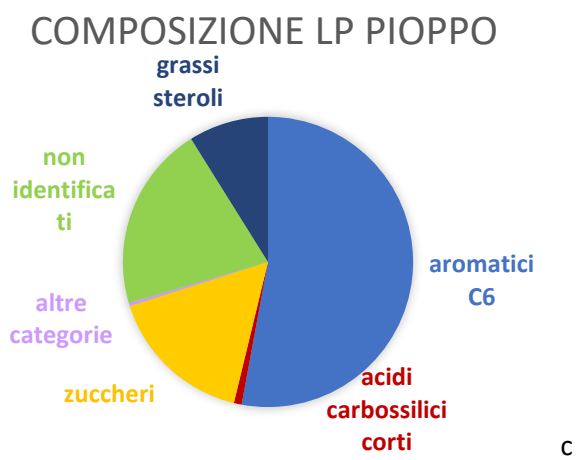
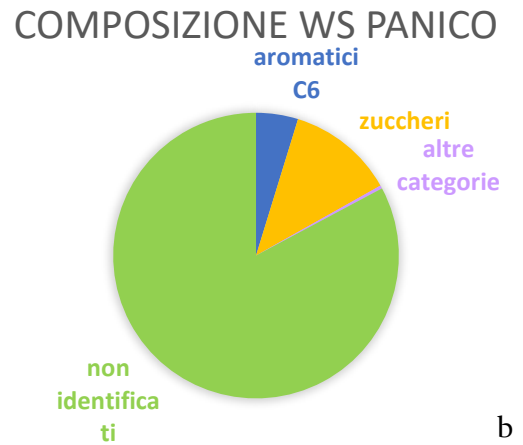
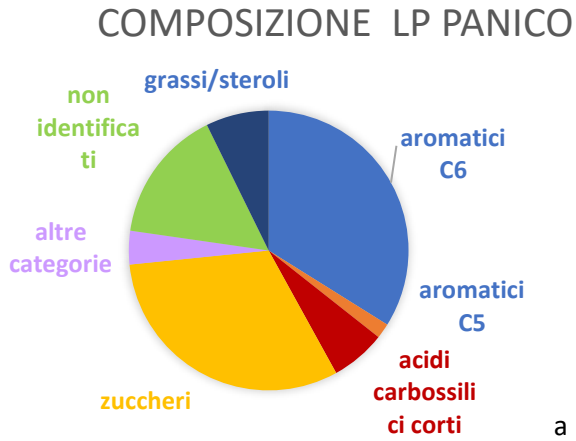


Fig 4.2. Percentuali calcolate sul totale delle aree derivante dalla somma dei picchi in uscita dal GC-MS a) Composizione chimica della lignina pirolitica del panico, b) composizione chimica WS panico, c) composizione chimica della lignina pirolitica del pioppo, d) composizione chimica WS pioppo, e) composizione chimica della lignina pirolitica del larice, f) composizione chimica WS larice.

4.3 Misura dell'attività ureasica

4.3.1 Misura dell'attività ureasica basata sull'accumulo di ammonio nel suolo: frazioni solubili in acqua

In Fig 4.3, 4.4 e 4.5 è riportata l'attività ureasica nel suolo trattato con le frazioni solubili in acqua derivate dalla pirolisi di larice, panico e pioppo, misurata con il metodo basato sull'accumulo di ammonio nel suolo stesso. Le misurazioni sono state fatte attraverso tre esperimenti, uno per ogni biomassa, effettuati in momenti separati.

Per tutti e tre gli esperimenti, le differenze tra trattamenti sono risultate altamente significative ($P < 0.001$, Tab. 4.2, 4.3, 4.4). In particolare, tutte le frazioni hanno ridotto in modo altamente significativo l'attività ureasica rispetto al controllo. L'effetto delle frazioni è stato simile per le tre biomasse con una attività residua poco superiore 40% nel caso di WS_t.q. e WS_EtOAc è attorno all'80% per WS_H2O.

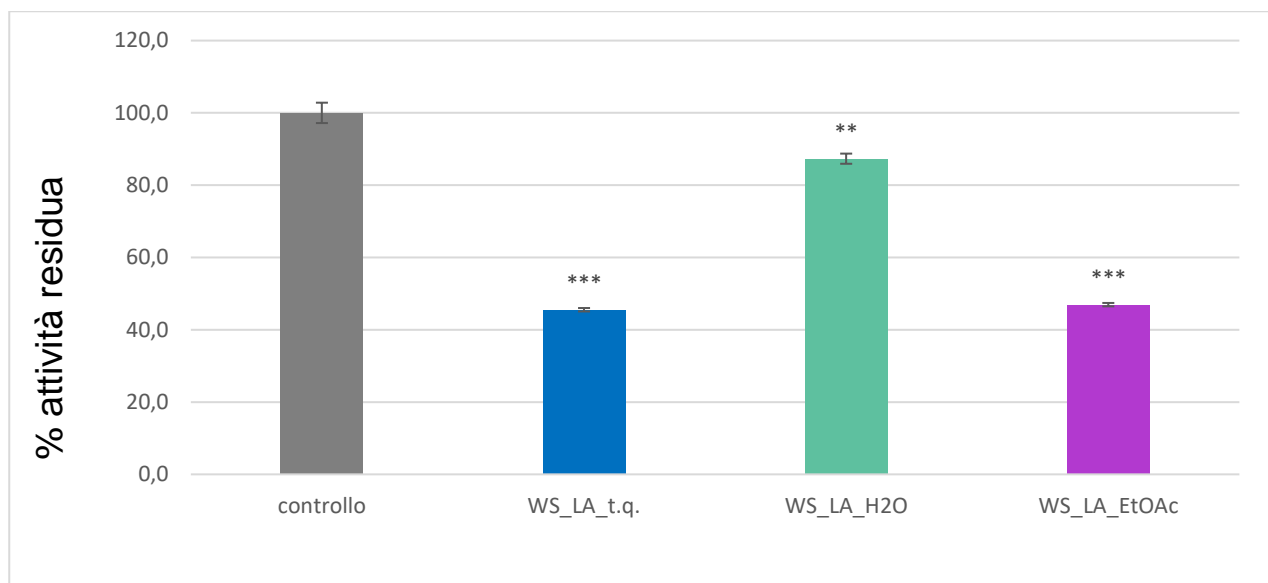


Fig.4.3. Effetto delle tre frazioni solubili in acqua ottenute dalla pirolisi del larice sull'attività ureasica del suolo. L'attività è stata misurata con il metodo basato sull'accumulo di ammonio nel suolo ed espressa come percentuale dell'attività media del trattamento di controllo (media \pm errore standard, $n = 3$). Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto al controllo (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

Tab 4.2 Tavola ANOVA per l'effetto delle tre frazioni solubili in acqua ottenute dalla pirolisi del larice sull'attività ureasica del suolo.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
tra trattamenti		6989,35	3	2329,78	299,858	< 0,001
residua		62,16	8	7,77		

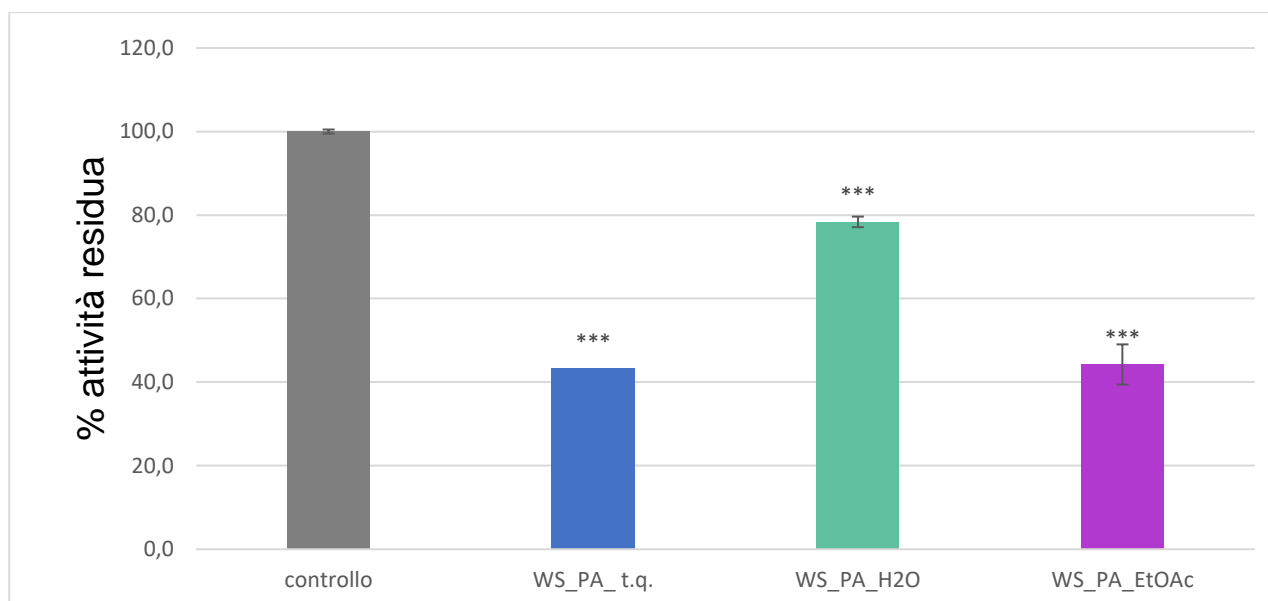


Fig 4.4. Effetto delle tre frazioni solubili in acqua ottenute dalla pirolisi del panico sull'attività ureasica del suolo. L'attività è stata misurata con il metodo basato sull'accumulo di ammonio nel suolo ed espressa come percentuale dell'attività media del trattamento di controllo (media \pm errore standard, $n = 3$). Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto al controllo (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

Tab 4.3. Tavola ANOVA per l'effetto delle tre frazioni solubili in acqua ottenute dalla pirolisi del panico sull'attività ureasica del suolo.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
tra trattamenti		6895,86	3	2298,62	122,775	< 0,001
residua		149,78	8	18,72		

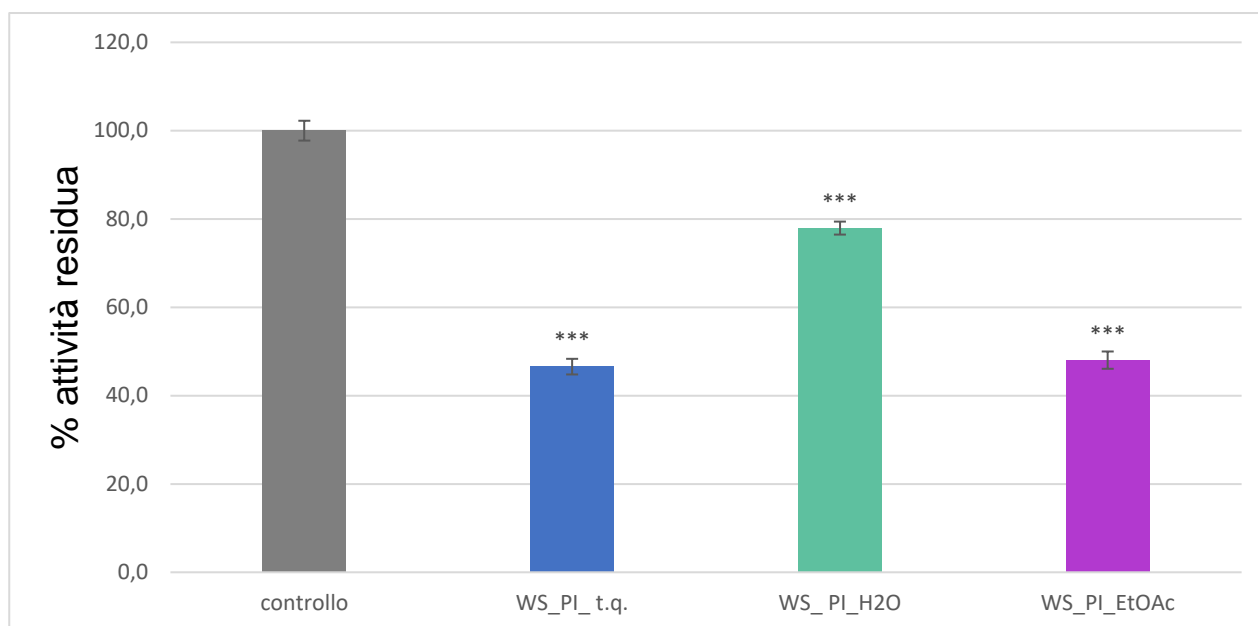


Fig 4.5. Effetto delle tre frazioni solubili in acqua ottenute dalla pirolisi del pioppo sull'attività ureasica del suolo. L'attività è stata misurata con il metodo basato sull'accumulo di ammonio nel suolo ed espressa come percentuale dell'attività media del trattamento di controllo (media \pm errore standard, $n = 3$). Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto al controllo (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

Tab 4.4. Tavola ANOVA per l'effetto delle tre frazioni solubili in acqua ottenute dalla pirolisi del pioppo sull'attività ureasica del suolo.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
tra trattamenti		5941,46	3	1980,49	186,260	< 0,001
residua		85,06	8	10,63		

4.3.2 Misura dell'attività ureasica basata sull'accumulo di ammonio nel suolo: lignine pirolitiche con supporto di biochar

In Fig 4.6, sono riportati i risultati dell'esperimento che ha valutato l'effetto sull'attività ureasica delle tre lignine pirolitiche con il supporto del biochar. Le differenze tra trattamenti sono risultate altamente significative ($P < 0.001$, Tab. 4.5). In particolare, le tre lignine pirolitiche hanno ridotto in modo altamente significativo l'attività ureasica rispetto al controllo, mentre l'attività del suolo trattato con solo biochar o con biochar + acetone è risultata molto vicina a quella del controllo. L'effetto delle tre lignine pirolitiche è risultato molto simile, con una attività residua attorno al 60%.

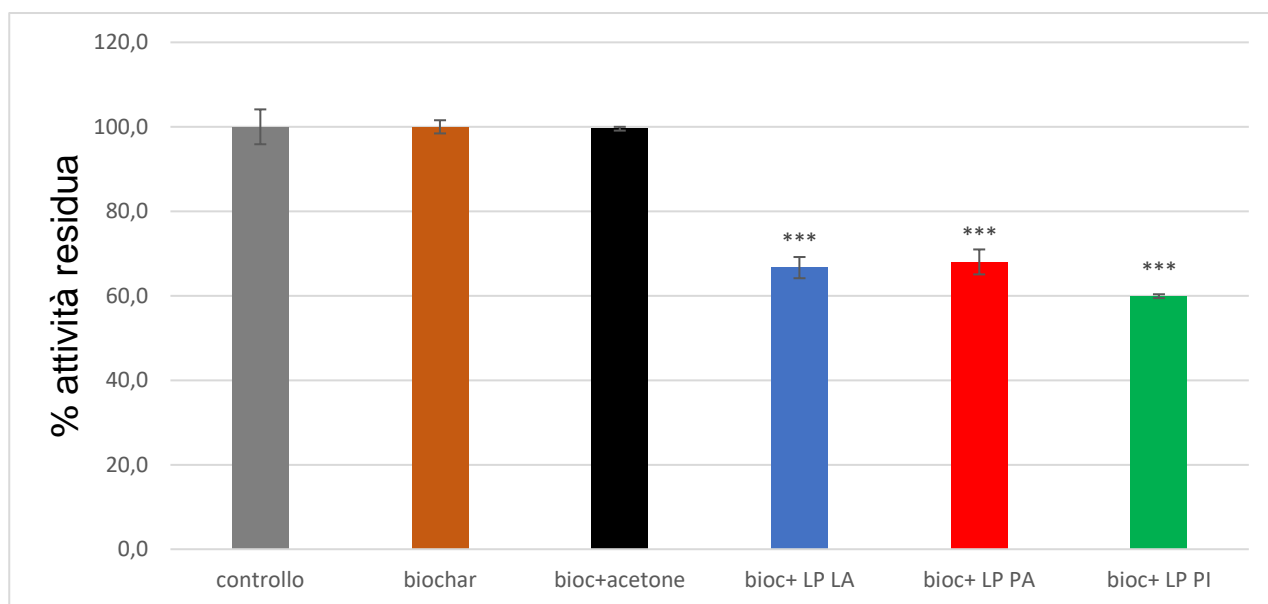


Fig 4.6. Effetto delle lignine pirolitiche ottenute da larice, panico e pioppo con supporto di biochar sull'attività ureasica del suolo. L'attività è stata misurata con il metodo basato sull'accumulo di ammonio nel suolo ed espressa come percentuale dell'attività media del trattamento di controllo (media \pm errore standard, $n = 3$). Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto al controllo (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

Tab 4.5 tavola ANOVA per l'effetto delle lignine pirolitiche ottenute da larice, panico e pioppo, con supporto di biochar, sull'attività ureasica del suolo.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
tra trattamento		5621,4	5	1124,3	64,429	< 0,001
residua		209,4	12	17,4		

4.3.3 Misura dell'attività ureasica basata sull'ammoniaca rilasciata in aria

Questo saggio è stato eseguito per valutare l'effetto degli inibitori dell'ureasi sulla volatilizzazione dell'ammoniaca in atmosfera. Oltre al trattamento di controllo, in cui al suolo è stata aggiunta solo urea, sono stati valutati il catecolo (50 µg/g) e la frazione WS_PA_t.q. In Fig 4.7 è riportata la percentuale di ammoniaca volatilizzata in atmosfera dopo 24, 48 e 72 ore, di incubazione ottenuta dal rapporto tra le mmol di NH₃ titolate sulle mmol di NH₃ potenzialmente ottenibili dalla completa idrolisi dell'urea aggiunta al suolo. I dati riguardanti i giorni seguenti non sono stati riportati, in quanto ritenuti non affidabili a causa della perdita di alcune repliche per problemi tecnici. Nel trattamento di controllo le perdite di ammoniaca più elevate, si sono verificate tra le 24 e le 48 ore, cioè durante il secondo giorno di incubazione. Allo scadere delle 48 ore hanno raggiunto un valore complessivo attorno al 6%, che poi è restato sostanzialmente costante, considerando la larghezza delle barre di errore. Il rilascio di ammoniaca dal suolo trattato con catecolo ha seguito lo stesso andamento temporale ma con un valore complessivo attorno al 3%, molto inferiore a quello del controllo. Il suolo trattato con la frazione WS_PA_t.q. mantiene valori molto bassi, ben al di sotto dell'1% per tutto il periodo di incubazione, senza evidenti variazioni temporali.

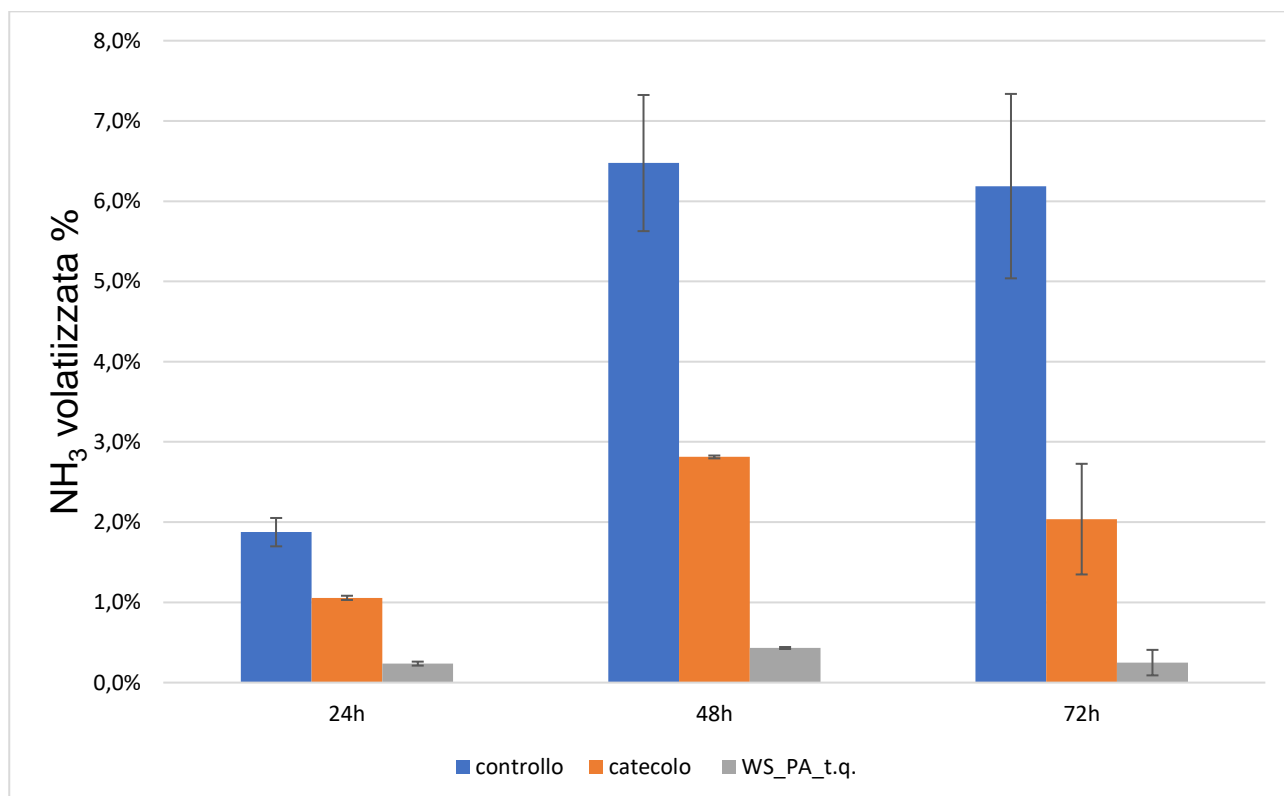


Fig 4.7. Effetto del catecolo e della frazione WS_PA_t.q. sull'attività ureasica del suolo: percentuale di ammoniaca volatilizzata in funzione del tempo ottenuta dal rapporto tra le mmol di NH₃ titolate sulle mmol di NH₃ potenzialmente presenti nel suolo (media ± errore standard, n = 2).

4.4 Saggi di tossicità

4.4.1 Lombrichi

4.4.1.1 Tossicità delle lignine pirolitiche e delle frazioni solubili in acqua

In Fig. 4.8 è riportato il peso vivo dei vermi adulti subito prima dell'inizio dell'esposizione ai suoli trattati con lignine pirolitiche e frazioni solubili in acqua, in funzione dei diversi trattamenti. Più precisamente, è riportato il peso dei gruppi di 10 individui assegnati alle singole unità sperimentali. Questa misura è stata effettuata per valutare l'accrescimento dei vermi durante il periodo di esposizione e per verificare che i gruppi di individui sottoposti ai diversi trattamenti fossero inizialmente omogenei.

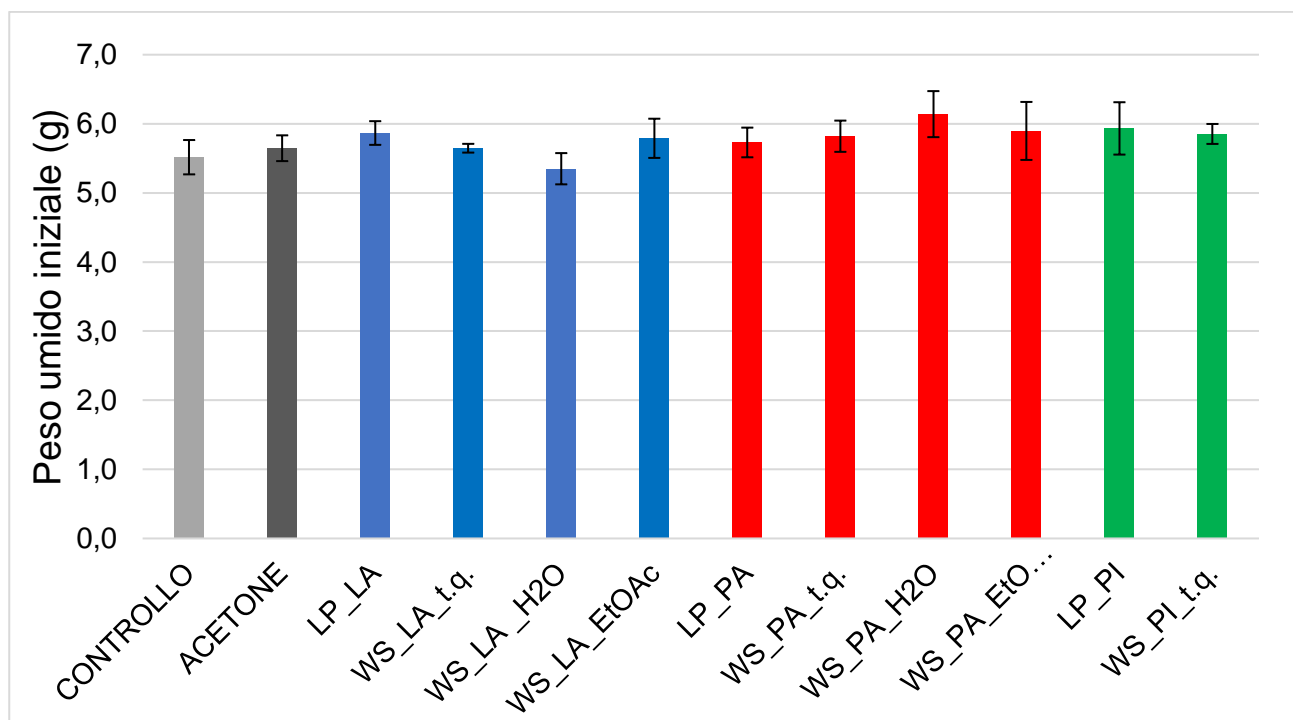


Fig. 4.8. Effetto di prodotti di pirolisi sul lombrico *Eisenia andrei*: peso vivo dei vermi adulti subito prima dell'inizio dell'esposizione ai diversi trattamenti (media ± errore standard, n = 3).

Il peso totale dei gruppi di 10 individui era compreso tra 5,02 e 6,56 g. Le differenze tra trattamenti appaiono contenute e non risultano statisticamente significative (Tab. 4.6).

Tab 4.6. Tavola di ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi sul lombrico *Eisenia andrei*: peso vivo dei vermi adulti subito prima dell'inizio dell'esposizione ai diversi trattamenti.

Sorgente di variazione	SS	df	MS	F	P
tra trattamenti	1,414	11	0,129	0,635	0,782
residua	4,860	24	0,202		

La Fig. 4.9 riporta la percentuale di vermi adulti sopravvissuti fino alla fine della prima fase del saggio, dopo un'esposizione di 28 giorni, in funzione dei diversi trattamenti. La sopravvivenza è stata del 100% o di poco inferiore in quasi tutti i trattamenti. Gli unici due trattamenti in cui la sopravvivenza è stata minore sono WS_PA_H2O, dove tutti gli adulti sono morti durante i primi giorni di esposizione (sopravvivenza 0 %) e LP_PI, dove invece è risultata essere del 45% circa, con una variabilità molto elevata tra le repliche.

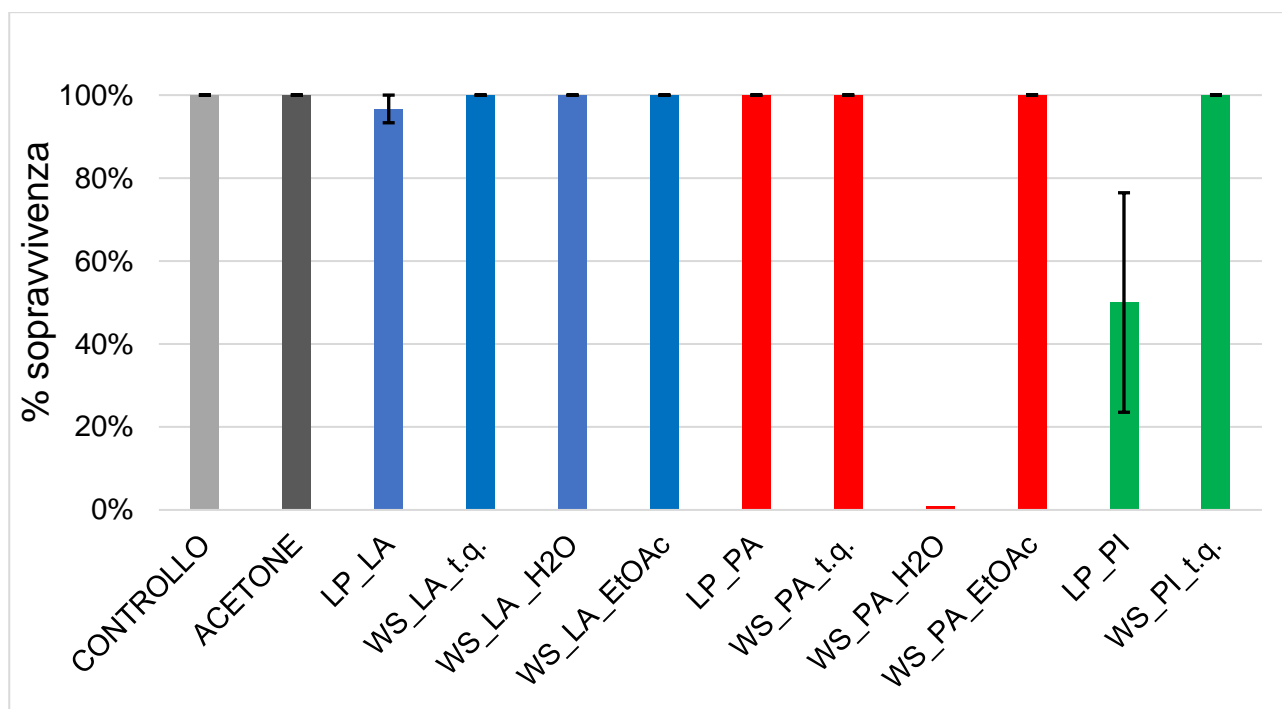


Fig. 4.9. Effetto di prodotti di pirolisi sul lombrico *Eisenia andrei*: sopravvivenza dei vermi adulti dopo 28 giorni di esposizione ai diversi trattamenti (media \pm errore standard, $n = 3$).

Nel caso della percentuale di sopravvivenza, variabile che non si adatta alle assunzioni dell'ANOVA, non è stato eseguito un test statistico formale. Nonostante ciò, l'effetto del trattamento WS_PA_H2O appare molto drastico e univoco. Anche LP_PI, nonostante le differenze tra repliche, ha dimostrato un effetto avverso rilevante.

In Fig. 4.10 è riportato il peso vivo dei vermi adulti dopo 28 giorni di esposizione in funzione dei diversi trattamenti. Più precisamente è riportato il peso totale dei vermi sopravvissuti nelle singole unità sperimentali.

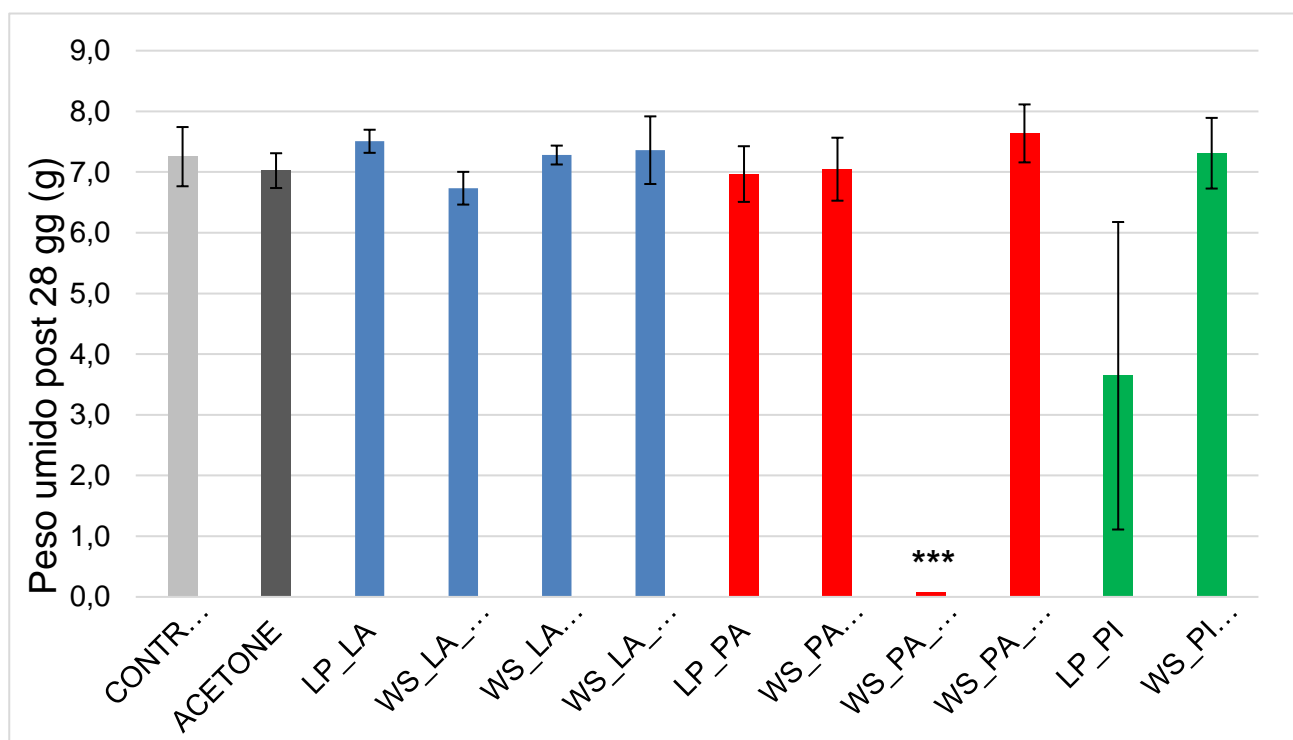


Fig. 4.10. Effetto di prodotti di pirolisi sul lombrico *Eisenia andrei*: peso vivo dei vermi adulti dopo 28 giorni di esposizione ai diversi trattamenti (media \pm errore standard, $n = 3$).

Nel trattamento WS_PA_H2O, il peso è risultato 0 g, in quanto non ci sono stati sopravvissuti. Nel trattamento LP_PI, come avvenuto per la sopravvivenza, si è osservata un'elevata variabilità tra le repliche ed un peso totale in media inferiore rispetto a quello iniziale. In tutti gli altri trattamenti, dove la sopravvivenza è stata del 100% o quasi, il peso dopo 28 giorni di esposizione è aumentato rispetto a quello iniziale. Una volta escluso dall'analisi statistica il trattamento WS_PA_H2O, non sono state evidenziate differenze significative tra gli altri trattamenti (Tab. 4.7). Quindi, nonostante il valore medio per LP_PI fosse molto più basso rispetto agli altri, la differenza non è risultata statisticamente significativa a causa della elevata variabilità tra le repliche del trattamento.

Tab.4.7. Tavola di ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi sul lombrico *Eisenia andrei*: peso vivo dei vermi adulti dopo 28 giorni di esposizione ai diversi trattamenti.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti		36,70	10	3,67	1,64	0,161
residua		49,36	22	2,24		

Per quanto riguarda il numero di bozzoli deposti, (Fig.4.11), le differenze tra trattamenti sono risultate altamente significative (Tab. 4.8). In particolare, nei trattamenti: LP_LA, WS_PA_EtOAc e LP_PI è stata osservata una riduzione significativa del numero di bozzoli deposti rispetto al controllo.

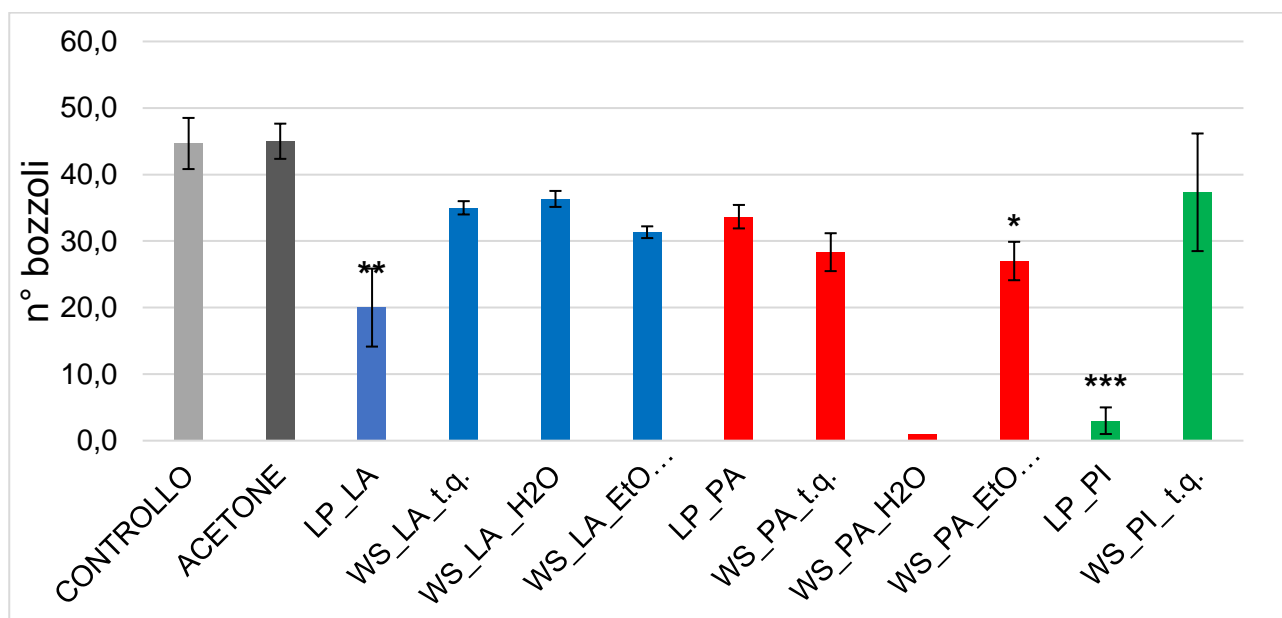


Fig. 4.11. Effetto di prodotti di pirolisi sul lombrico *Eisenia andrei*: numero di bozzoli deposti dagli adulti durante 28 giorni di esposizione ai diversi trattamenti (media \pm errore standard, $n = 3$). Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto al controllo (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

Tab 4.8 Tavola di ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi sul lombrico *Eisenia andrei*: numero di bozzoli deposti dagli adulti durante 28 giorni di esposizione ai diversi trattamenti.

Sorgente di variazione	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti	4207,88	10	420,79	9,583	< 0,001
residua	966,00	22	43,91		

Per quanto riguarda la percentuale di schiusa dei bozzoli (Fig.4.12), le differenze tra trattamenti non sono risultate significative (Tab. 4.9).

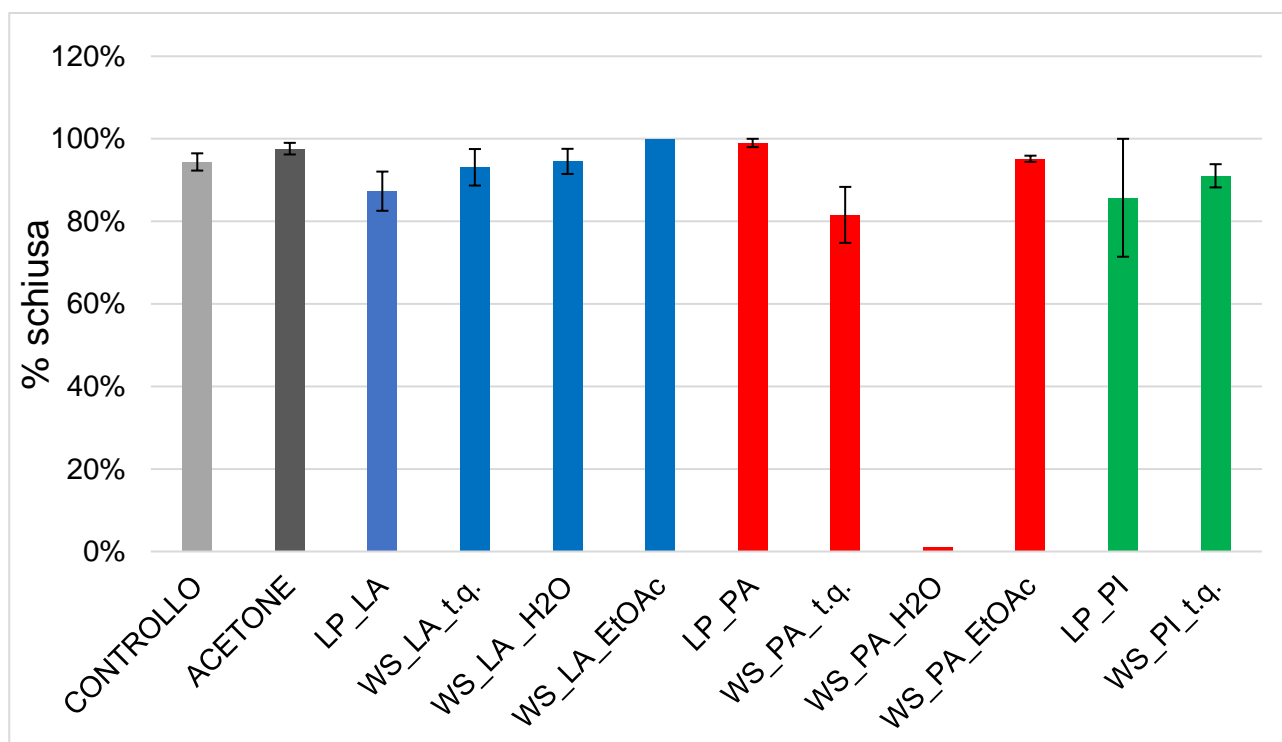


Fig. 4.12. Effetto di prodotti di pirolisi sul lombrico *Eisenia andrei*: percentuale di schiusa dei bozzoli dopo 56 giorni di esposizione ai diversi trattamenti (media \pm errore standard, $n = 3$).

Tab 4.9. Tavola di ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi sul lombrico *Eisenia andrei*: percentuale di schiusa dei bozzoli dopo 56 giorni di esposizione ai diversi trattamenti.

Sorgente di variazione	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti	0,100	10	0,010	1,158	0,368
residua	0,190	22	0,009		

Il numero di neonati vitali recuperati alla fine dei 56 giorni dell'esperimento è riportato in Fig. 4.13. Le differenze tra trattamenti sono risultate altamente significative (Tab. 4.10). Nello specifico è stata osservata una riduzione significativa rispetto al controllo nei trattamenti: LP_LA e WS_LA_t.q. WS_PA_t.q. e WS_PA_EtOAc, LP_PI e WS_PI_t.q.

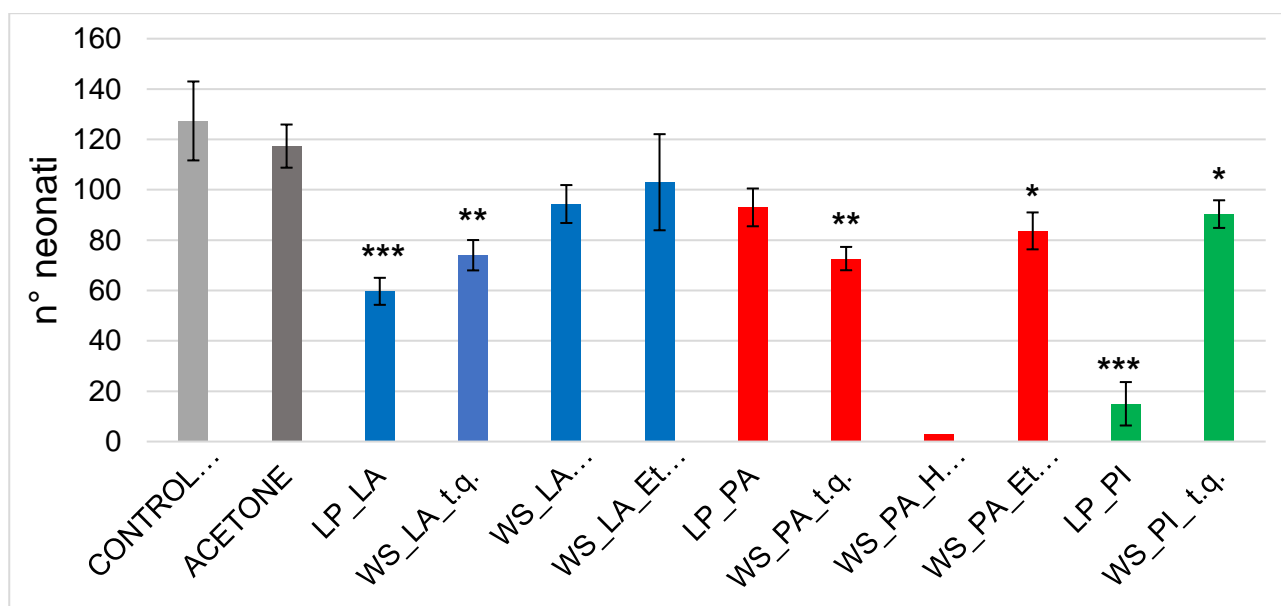


Fig 4.13. Effetto di prodotti di pirolisi sul lombrico *Eisenia andrei*: numero di neonati dopo 56 giorni di esposizione ai diversi trattamenti (media \pm errore standard, $n = 3$). Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto al controllo (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

Sorgente di variazione	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti	27467	10	2746	9,670	<0,001
residua	6248	22	284,0		

Tab 4.10. Tavola di ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi sul lombrico *Eisenia andrei*: numero di neonati dopo 56 giorni di esposizione ai diversi trattamenti.

In Fig 4.14, che considera il peso secco dei neonati vitali recuperati alla fine dei 56 giorni dell'esperimento, possiamo dedurre che tutti i trattamenti risultano significativamente differenti dal controllo ad eccezione dell'acetone (Tab. 4.11) Nello specifico la LP_LA, il WS_LA_t.q. LP_PA, WS_PA_t.q. WS_PA_EtOAc, LP_PI e WS_PI_t.q. risultano essere significativamente differenti dal controllo.

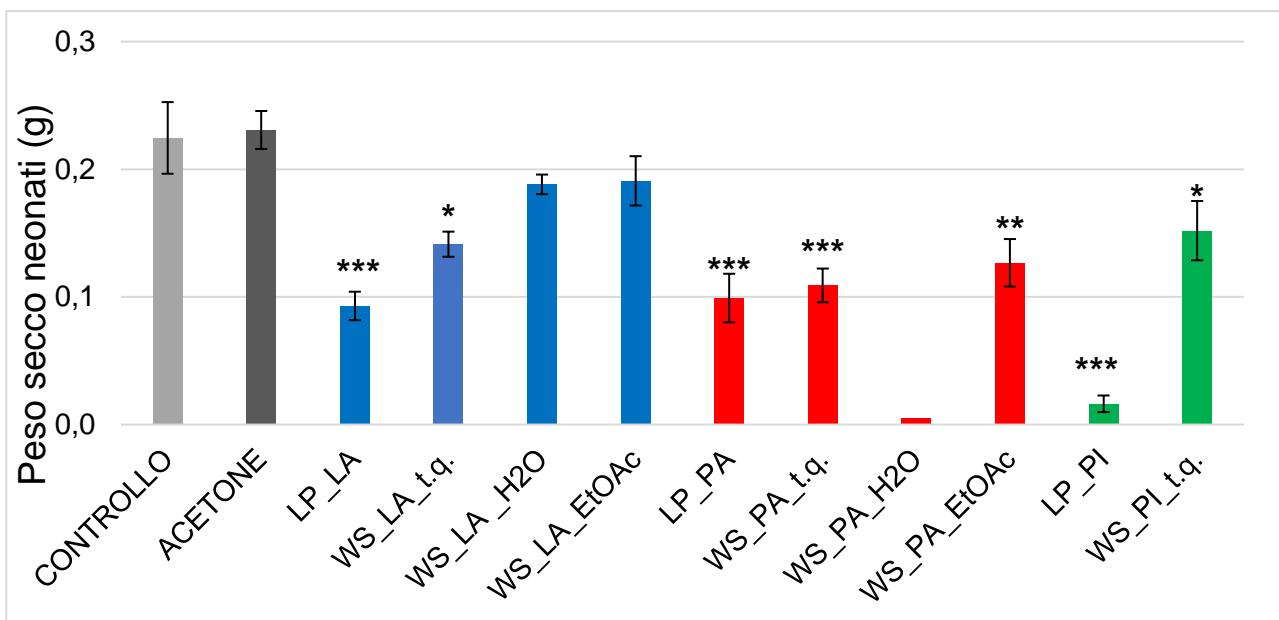


Fig. 4.14. Effetto di prodotti di pirolisi sul lombrico *Eisenia andrei*: peso secco dei neonati vitali recuperati dopo 56 giorni di esposizione ai diversi trattamenti (media \pm errore standard, $n = 3$). Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto al controllo (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

Tab. 4.11. Tavola di ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi sul lombrico *Eisenia andrei*: peso secco dei neonati vitali dopo 56 giorni di esposizione ai diversi trattamenti.

Sorgente di variazione	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti	0,122	10	0,012	14,32	<0,001
residua	0,019	22	0,001		

Il pH del suolo misurato all'inizio e alla conclusione dei 56 giorni di esposizione (Tab. 4.12), si è mantenuto vicino alla neutralità, senza differenze di rilievo tra i trattamenti e un leggera tendenza a diminuire nel corso dell'esperimento.

Tab 4.12. Valori di pH del suolo all'inizio e alla conclusione dei 56 giorni di esposizione del saggio per la valutazione della tossicità delle lignine pirolitiche e delle frazioni solubili in acqua su *Eisenia andrei*. Per ogni trattamento è riportata la media delle tre repliche.

TRATTAMENTI	pH iniziale	pH dopo 56 giorni
CONTROLLO	7,1	6,7
ACETONE	7,2	6,9
LP_LA	7,3	7,3
LP_PA	7,3	7,3
LP_PI	7,3	7,3
WS_LA_t.q.	7,3	7,1
WS_PA_t.q.	7,3	7,0
WS_PI_t.q.	7,3	7,1
WS_LA_H2O	7,4	7,1
WS_PA_H2O	7,3	7,1
WS_LA_EtOAc	7,3	7,1
WS_PA_EtOAc	7,3	7,0

4.4.1.2 Tossicità delle lignine pirolitiche con supporto di biochar

Come spiegato nel paragrafo 3.4, per l'analisi statistica dei risultati di questo saggio è stato adottato un disegno a blocchi completi randomizzati, perché per alcuni degli endpoint considerati sono state osservate evidenti differenze tra i lombrichi provenienti da diverse vasche di allevamento. Ogni vasca ha fornito gli individui utilizzati per una replica di tutti i trattamenti.

In Fig. 4.15, è riportato il peso vivo dei vermi adulti, subito prima dell'inizio dell'esposizione ai suoli trattati con lignine pirolitiche con supporto di biochar, in funzione dei diversi trattamenti. Più precisamente, è riportato il peso dei gruppi di 10 individui assegnati alle singole unità sperimentali. Le differenze tra individui provenienti da diverse vasche di allevamento sono risultate altamente significative (Tab. 4.13). Le differenze tra trattamenti invece non sono risultate significative, suggerendo che le differenze esistenti tra i diversi lotti di lombrichi utilizzati per il saggio, non determinano comunque differenze sistematiche tra gli individui assegnati ai diversi trattamenti.

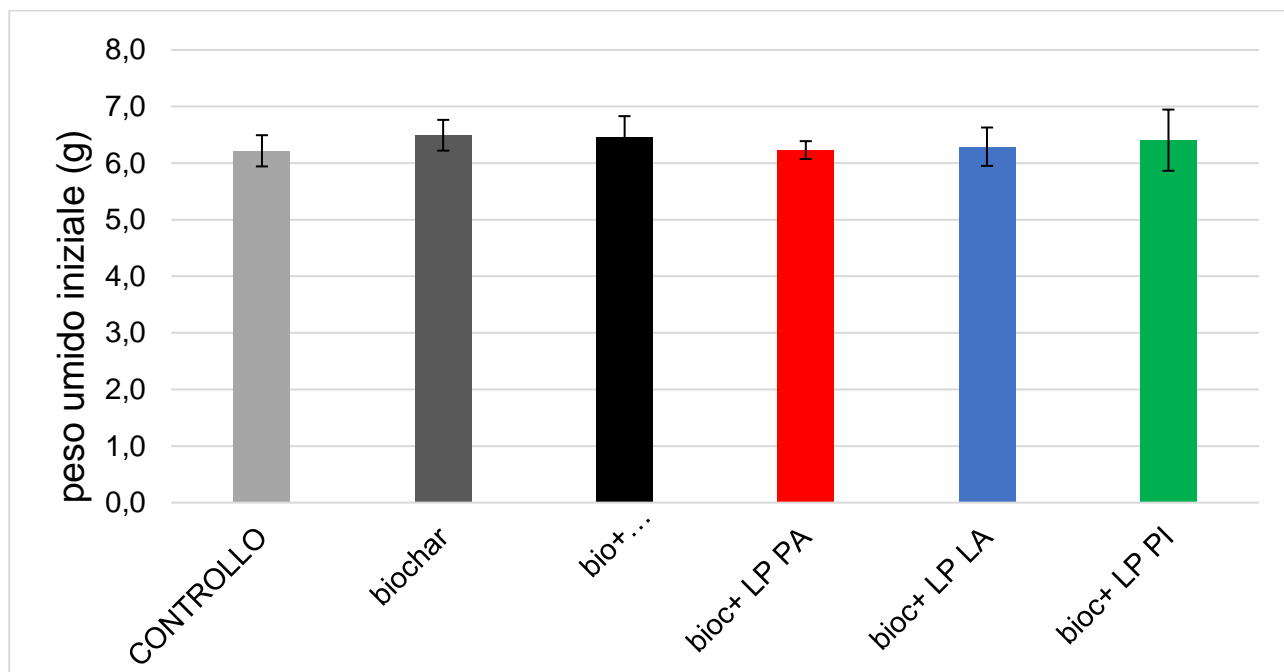


Fig 4.15. Effetto delle lignine pirolitiche con supporto di biochar sul lombrico *Eisenia andrei*: peso vivo dei vermi adulti subito prima dell'inizio dell'esposizione ai diversi trattamenti (media \pm errore standard, $n = 4$).

Tab. 4.13. Tavola di ANOVA per l'effetto delle lignine pirolitiche con supporto di biochar sul lombrico *Eisenia andrei*: peso vivo dei vermi adulti subito prima dell'inizio dell'esposizione ai diversi trattamenti.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
tra vasche		4,858	3	1,619	6,562	0,004
tra trattamenti		0,290	5	0,058	0,236	0,940
residua		3,701	15	0,246		

In Fig 4.16, possiamo invece osservare la sopravvivenza, che in questo caso è risultata essere in tutti i trattamenti del 100%.

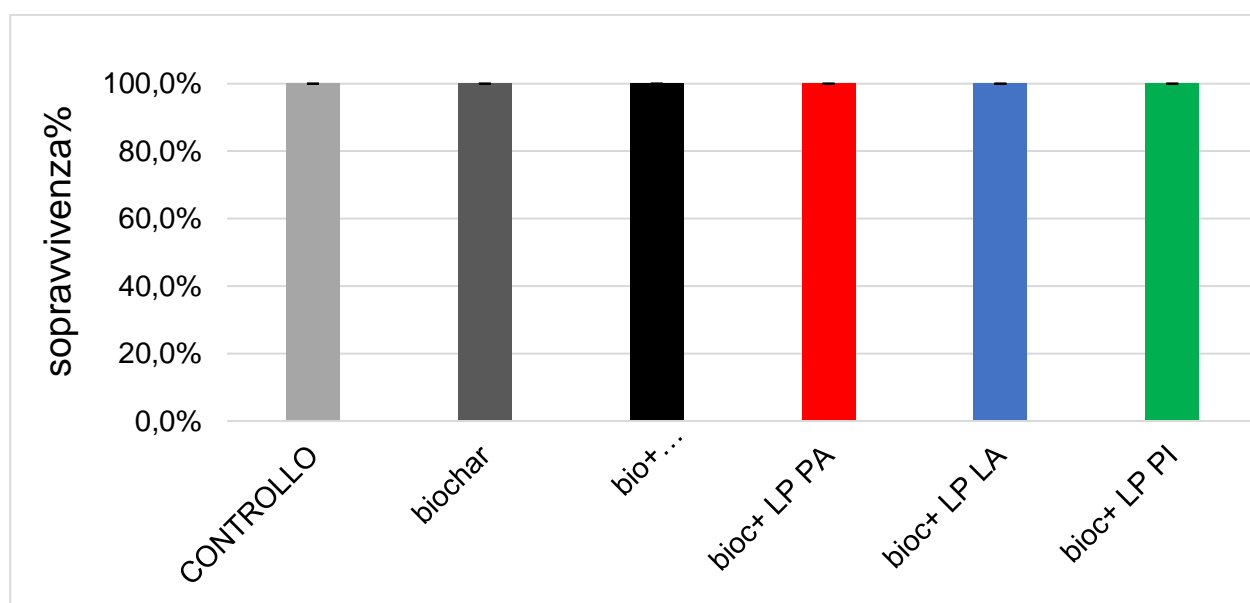


Fig 4.16. Effetto delle lignine pirolitiche con supporto di biochar sul lombrico *Eisenia andrei*: sopravvivenza lombrichi adulti dopo 28 giorni di esposizione ai diversi trattamenti (media \pm errore standard, $n = 4$).

In Fig 4.17 è riportato il peso vivo dei vermi adulti dopo 28 giorni di esposizione in funzione dei diversi trattamenti. Più precisamente è riportato il peso totale dei vermi sopravvissuti nelle singole unità sperimentali. Le differenze tra vasche di allevamento sono risultate significative, ma non quelle tra trattamenti. (Tab 4.14)

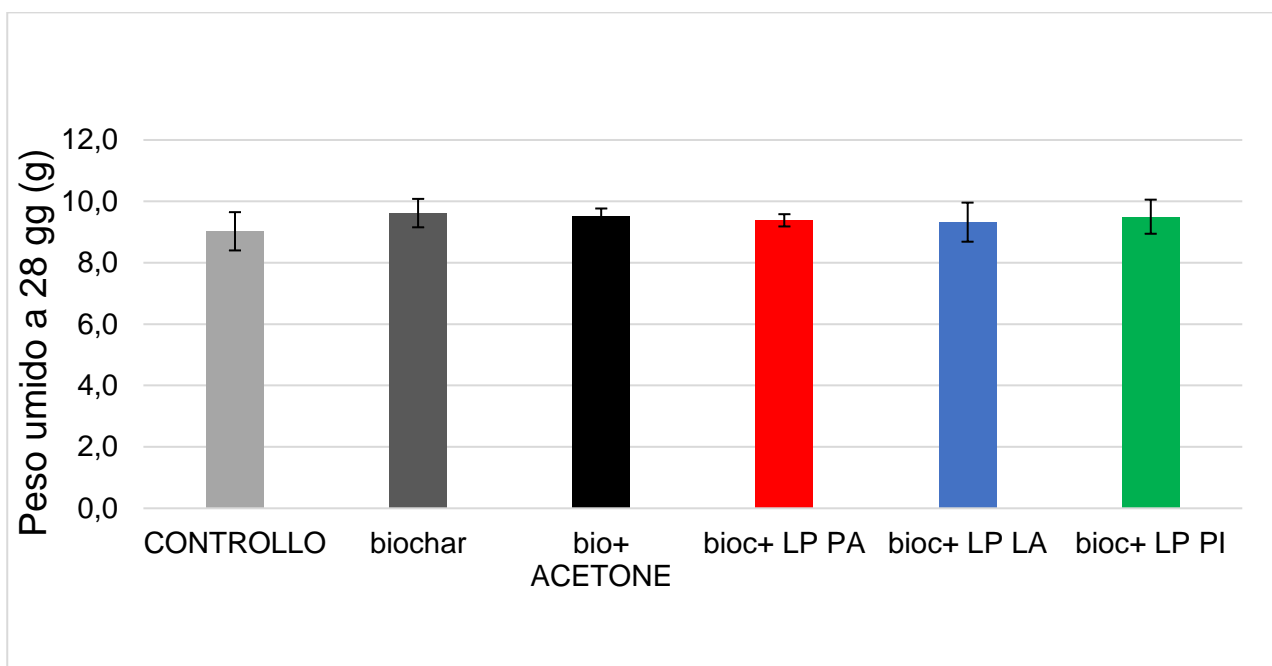


Fig 4.17. Effetto delle lignine pirolitiche con supporto di biochar sul lombrico *Eisenia andrei*: peso vivo dei vermi adulti dopo 28 giorni di esposizione ai diversi trattamenti (media \pm errore standard, $n = 4$).

Tabella 4.14. Tavola di ANOVA per l'effetto delle lignine pirolitiche con supporto di biochar sul lombrico *Eisenia andrei*: peso vivo dei vermi adulti dopo 28 giorni di esposizione ai diversi trattamenti.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
tra vasche		7,446	3	2,482	3,859	0,031
tra trattamenti		0,862	5	0,172	0,268	0,923
residua		9,647	15	0,643		

In Fig 4.18 è riportato il numero di bozzoli depositi. Non sono risultate significative né le differenze tra vasche di allevamento, né quelle tra trattamenti (Tab 4.15).

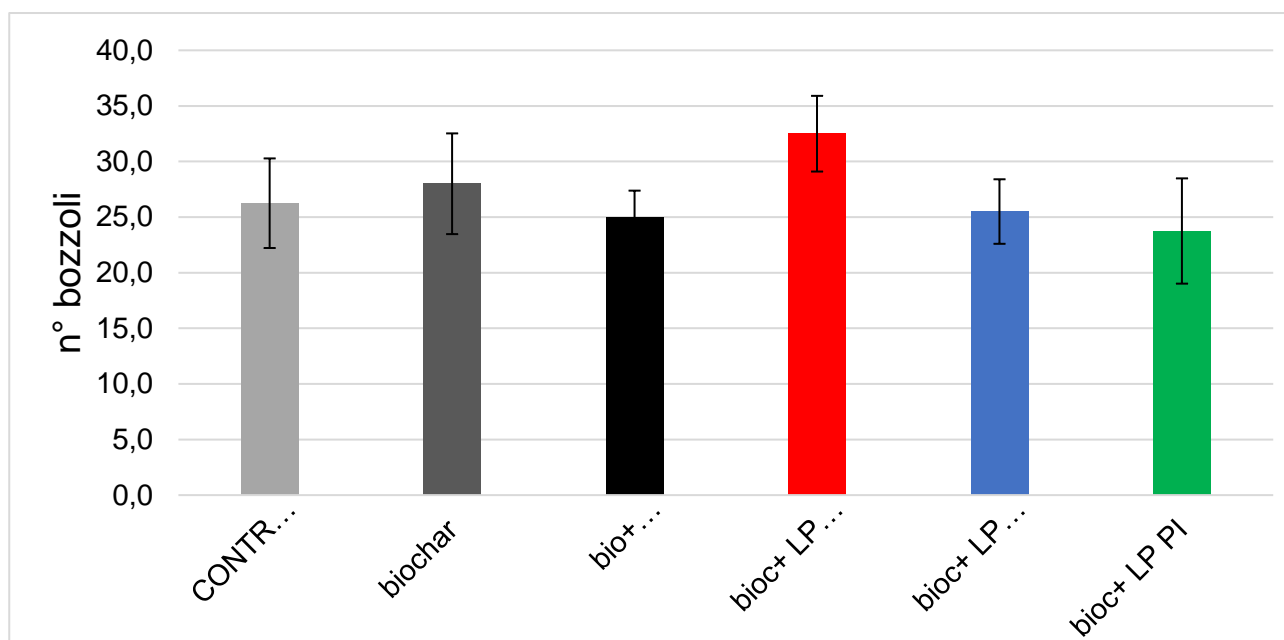


Fig 4.18. Effetto delle lignine pirolitiche con supporto di biochar sul lombrico *Eisenia andrei*: numero di bozzoli deposti dagli adulti durante 28 giorni di esposizione ai diversi trattamenti (media \pm errore standard, $n = 4$).

Tab.4.15. Tavola di ANOVA per l'effetto delle lignine pirolitiche con supporto di biochar sul lombrico *Eisenia andrei*: numero di bozzoli deposti dagli adulti durante 28 giorni di esposizione ai diversi trattamenti.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
tra vasche		154,33	3	51,44	0,894	0,467
tra trattamenti		193,83	5	38,77	0,673	0,649
residua		863,17	15	57,54		

La percentuale di schiusa è stata prossima al 100% in tutti i trattamenti (Fig. 4.19). Non sono risultate significative né le differenze tra vasche di allevamento, né quelle tra trattamenti (Tab. 4.16).

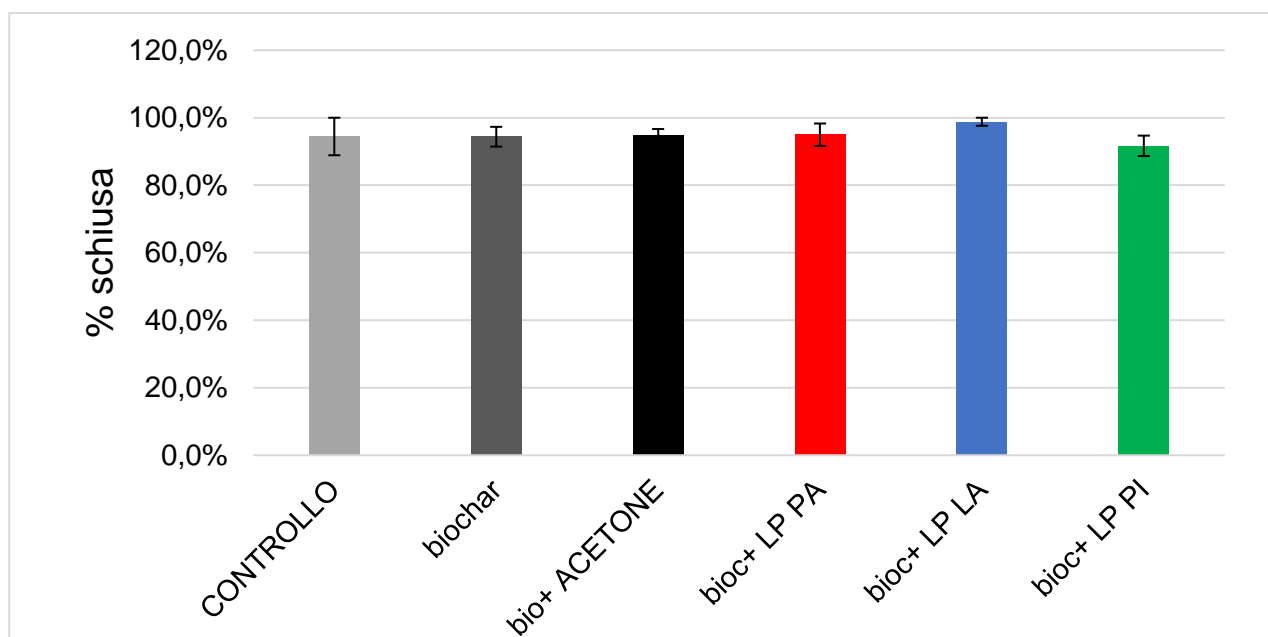


Fig 4.19. Effetto delle lignine pirolitiche con supporto di biochar sul lombrico *Eisenia andrei*: percentuale di schiusa dei bozzoli dopo 56 giorni di esposizione ai diversi trattamenti (media \pm errore standard, $n = 4$).

Tab 4.16. Tavola di ANOVA per l'effetto delle lignine pirolitiche con supporto di biochar sul lombrico *Eisenia andrei*: percentuale di schiusa dei bozzoli dopo 56 giorni di esposizione ai diversi trattamenti.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
tra vasche		0,028	3	0,009	2,853	0,072
tra trattamenti		0,010	5	0,002	0,641	0,672
residua		0,049	15	0,003		

In figura 4.20 è riportato il numero di neonati. Sono risultate significative sia le differenze tra vasche di allevamento che quelle tra trattamenti (Tab 4.17). In particolare, il trattamento biochar + acetone ha determinato una riduzione altamente significativa del numero di neonati rispetto al controllo. Sono inoltre risultate molto alla significatività le differenze rispetto al controllo per bioc+ LP LA e bioc LP PI (in entrambe i casi $P = 0.0501$). Non lontana dalla significatività è anche la differenza tra controllo e il trattamento con solo biochar ($P = 0.053$).

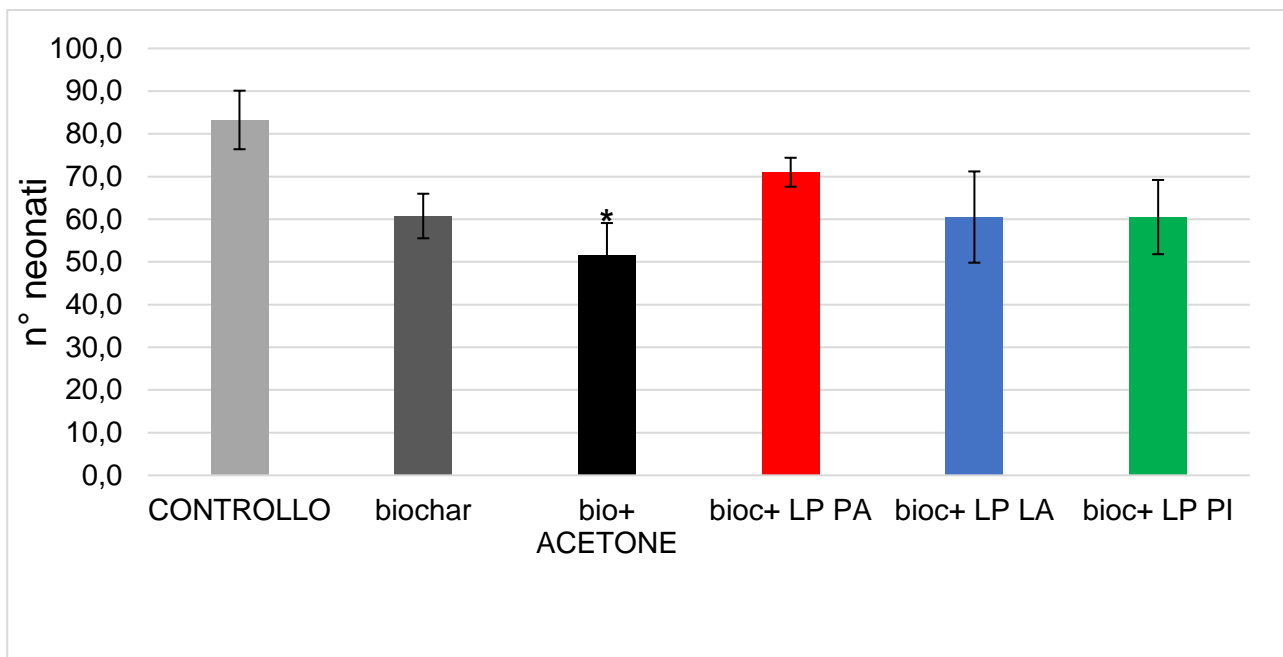


Fig 4.20. Effetto delle lignine pirolitiche con supporto di biochar sul lombrico *Eisenia andrei*: numero di neonati dopo 56 giorni di esposizione ai diversi trattamenti (media \pm errore standard, $n = 4$). Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto al controllo (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

Tab 4.17. Tavola di ANOVA per l'effetto delle lignine pirolitiche con supporto di biochar sul lombrico *Eisenia andrei*: numero di neonati dopo 56 giorni di esposizione ai diversi trattamenti.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
tra vasche		2040,8	3	680,3	5,207	0,011
tra trattamenti		2435,3	5	487,1	3,728	0,021
Error		1959,7	15	130,6		

Per quanto riguarda il peso secco dei neonati (Fig 4.21), Non sono risultate significative né le differenze tra vasche di allevamento, né quelle tra trattamenti (Tab 4.18).

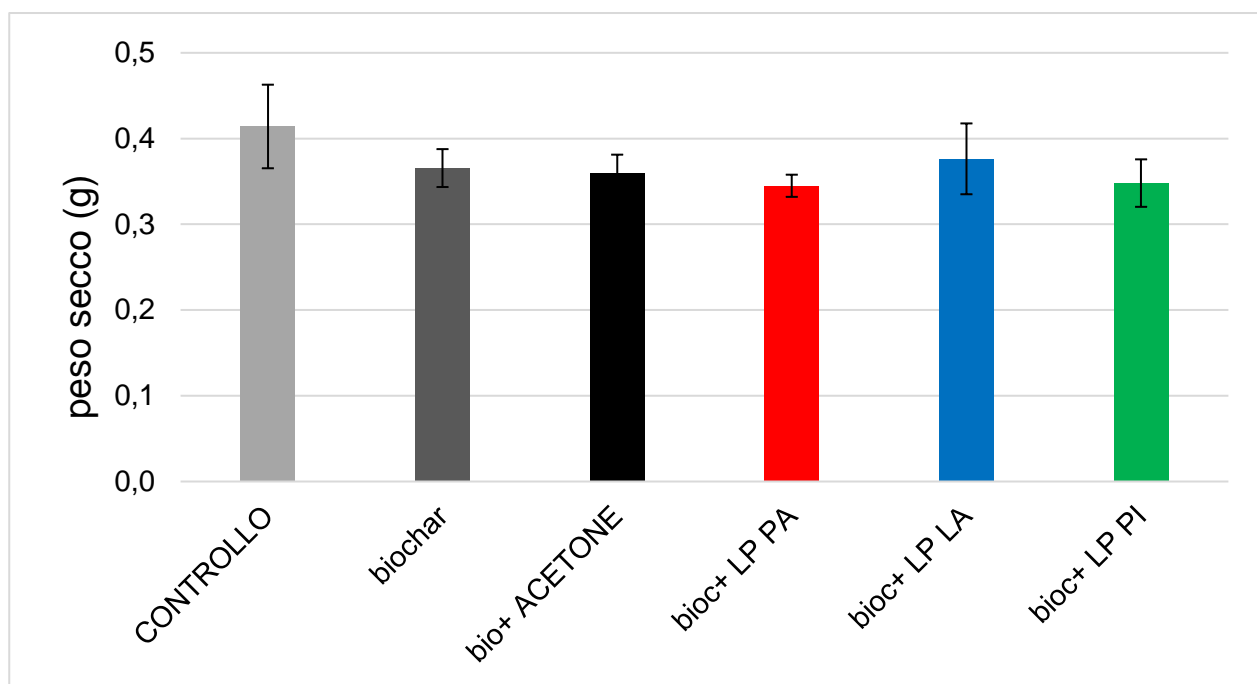


Fig 4.21. Effetto delle lignine pirolitiche con supporto di biochar sul lombrico *Eisenia andrei*: peso secco dei neonati vitali recuperati dopo 56 giorni di esposizione ai diversi trattamenti (media \pm errore standard, $n = 4$).

Tab 4.18. Tavola di ANOVA per l'effetto delle lignine pirolitiche con supporto di biochar sul lombrico *Eisenia andrei*: peso secco dei neonati vitali recuperati dopo 56 giorni di esposizione ai diversi trattamenti.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
tra vasche		0,021	3	0,007	2,199	0,130
tra trattamenti		0,013	5	0,002	0,772	0,584
residua		0,050	15	0,003		

Il pH del suolo misurato all'inizio dell'esposizione è risultato leggermente acido (Tab. 4.19), ma comunque entro valori considerati normali per il suolo artificiale utilizzato (OECD, 2016). Alla fine dell'esposizione i valori risultano più elevati, attorno alla neutralità.

Tab 4.19. Valori di pH del suolo all'inizio e alla conclusione dei 56 giorni di esposizione del saggio per la valutazione della tossicità delle lignine pirolitiche con supporto del biochar su *Eisenia andrei*. Per ogni trattamento è riportata la media delle quattro repliche.

TRATTAMENTI	pH iniziale	pH dopo 56 giorni
CONTROLLO	6,5	6,8
biochar	6,2	6,9
bio+ ACETONE	6,0	7,0
BIOC+ LP PA	5,9	6,9
BIOC+ LP LA	5,9	7,0
BIOC+ LP PI	5,8	7,0

4.4.2 Avena

Per la valutazione della tossicità dei prodotti di pirolisi su *Avena sativa*, sono stati effettuati due esperimenti distinti. Il primo ha valutato i prodotti di pirolisi del larice, il secondo ha valutato contemporaneamente i prodotti di panico e pioppo.

Dalla Fig 4.22 che considera la percentuale di germinazione del larice, possiamo dedurre che non ci sono differenze statisticamente significative tra i trattamenti. (Tab 4.20)

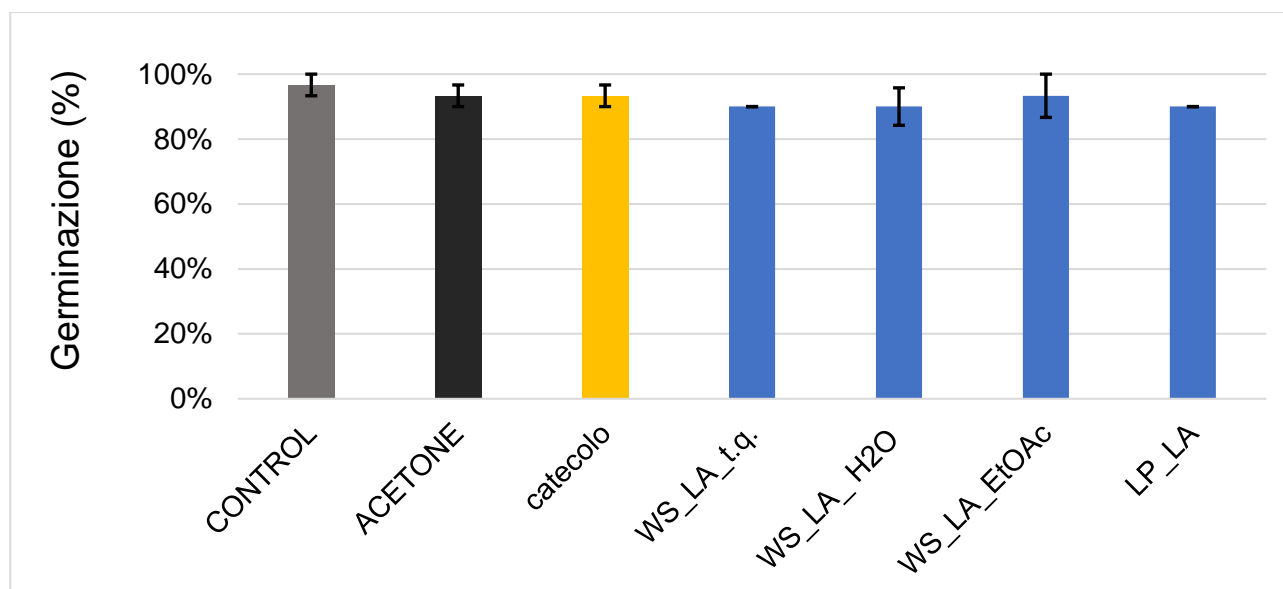


Fig 4.22 Effetto di prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: percentuale di germinazione dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi del larice (media \pm errore standard, $n = 3$).

Tab 4.20. Tavola ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: percentuale di germinazione dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi del larice.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti		1,143	6	0,190	0,400	0,867
residua		6,667	14	0,476		

Quello che si evince dal seguente grafico in Fig. 4.23 è che non ci sono differenze statisticamente significative tra i vari trattamenti saggiati, (Tab 4.21) le piantine risultano tutti germinate al 100%.

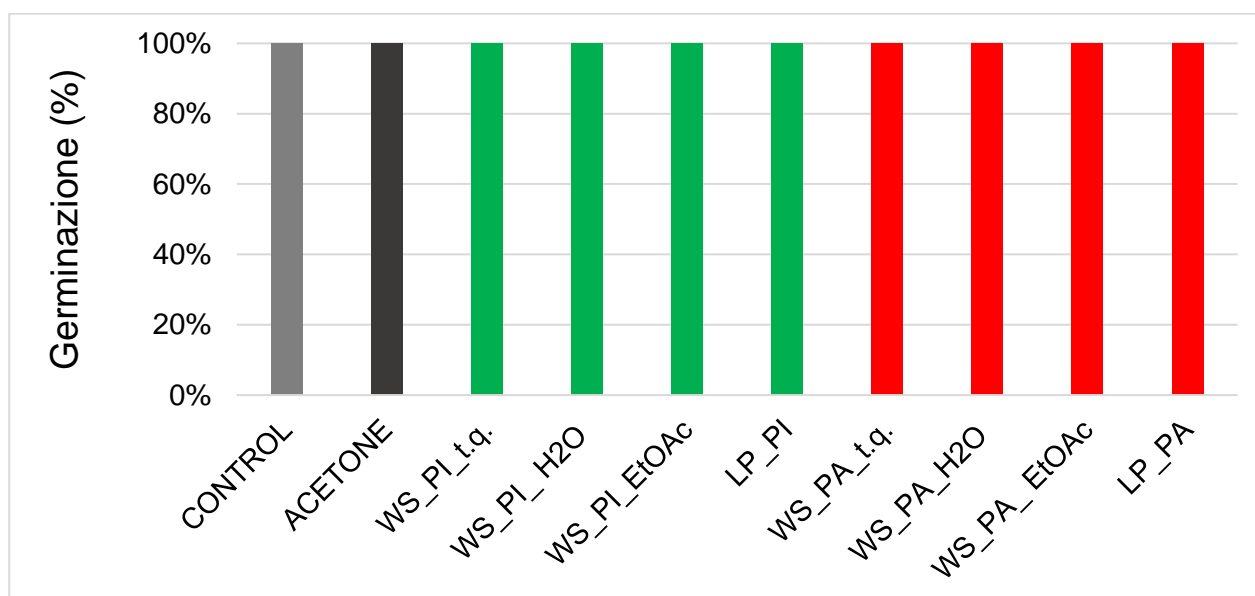


Fig. 4.23. Effetto di prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: percentuale di germinazione dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi del pioppo e panico (media \pm errore standard, $n = 3$).

Tab 4.21. Tavola ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: percentuale di germinazione dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi del pioppo e panico.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti		4,533	9	0,504	0,756	0,656
residua		13,333	20	0,667		

Nel grafico in Fig 4.24, è riportata la lunghezza del fusto. Le differenze tra trattamenti sono risultate altamente significative (Tab 4.22), nello specifico è stata osservata una riduzione significativa rispetto al controllo nei trattamenti: WS_LA_t.q. e WS_LA_H2O.

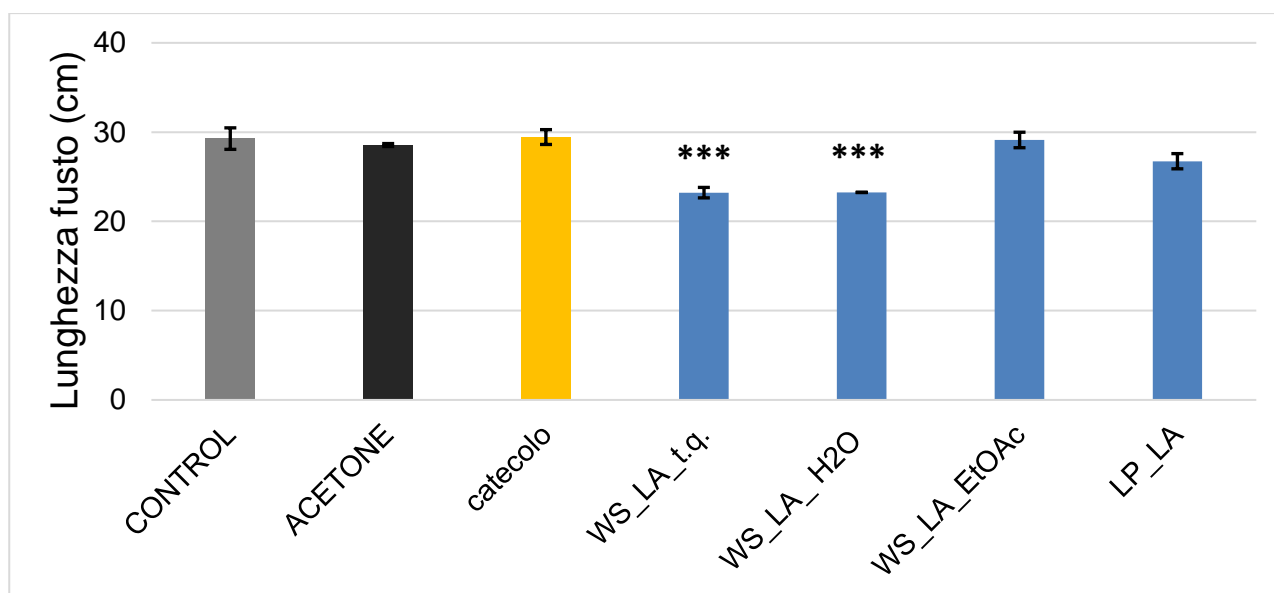


Fig 4.24. Effetto di prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: lunghezza fusto dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi del larice (media \pm errore standard, $n = 3$). Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto al controllo (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

Tab. 4.22. Tavola ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: lunghezza fusto dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi del larice.

Sorgente di variazione	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti	139,36	6	23,23	13,587	<0,001
residua	23,93	14	1,71		

In Fig 4.25, non si evidenziano differenze significative per quanto riguarda la lunghezza del fusto nel saggio riguardante pioppo e panico (Tab 4.23).

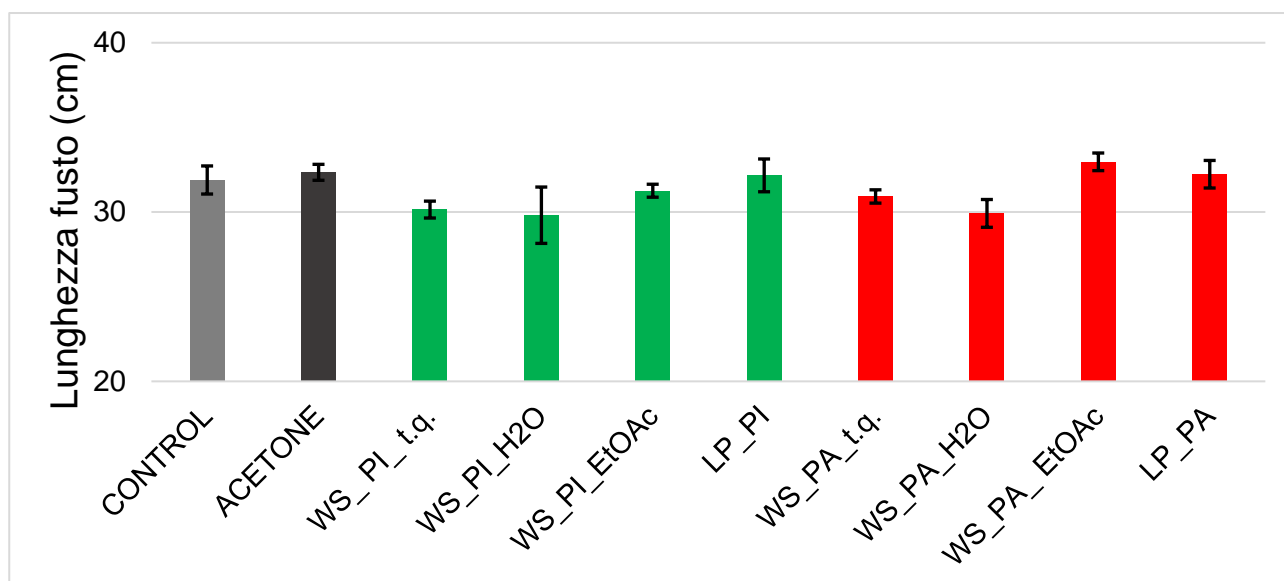


Fig. 4.25. Effetto di prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: lunghezza fusto dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi del pioppo e del panico (media \pm errore standard, $n = 3$).

Tab. 4.23. Tavola ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: lunghezza fusto dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi del pioppo e del panico.

Sorgente di variazione	df	SS	MS	F	P
Tra trattamenti	9	34,18	3,80	1,87	0,117
residua	20	40,64	2,03		

Nel grafico in Fig. 4.26 è riportato il peso secco del fusto. Le differenze tra trattamenti sono risultate altamente significative (Tab 4.24), nello specifico è stata osservata una riduzione significativa rispetto al controllo nei trattamenti: WS_LA_t.q. e WS_LA_H2O e LP_LA.

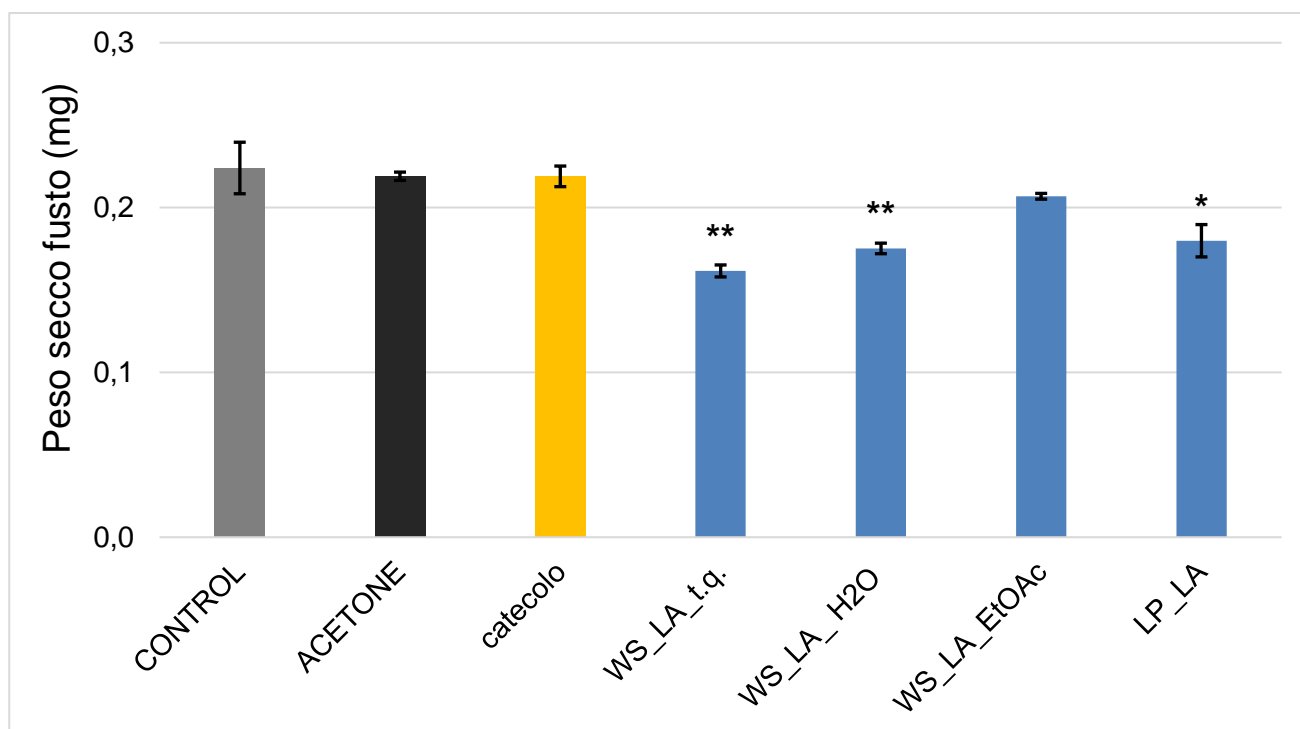


Fig. 4.26. Effetto di prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: peso secco fusto dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi del larice (media \pm errore standard, $n = 3$). Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto al controllo (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

Tab 4.24. Tavola ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: peso secco fusto dopo 3 settimane di pirolisi del larice.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti		0,050	6	0,008	9,78	<0,001
residua		0,011	13	0,000		

Dal grafico (Fig 4.27) si evidenzia che non ci sono differenze statisticamente significative tra i trattamenti per quanto riguarda il peso secco del fusto di panico e pioppo. (Tab 4.25)

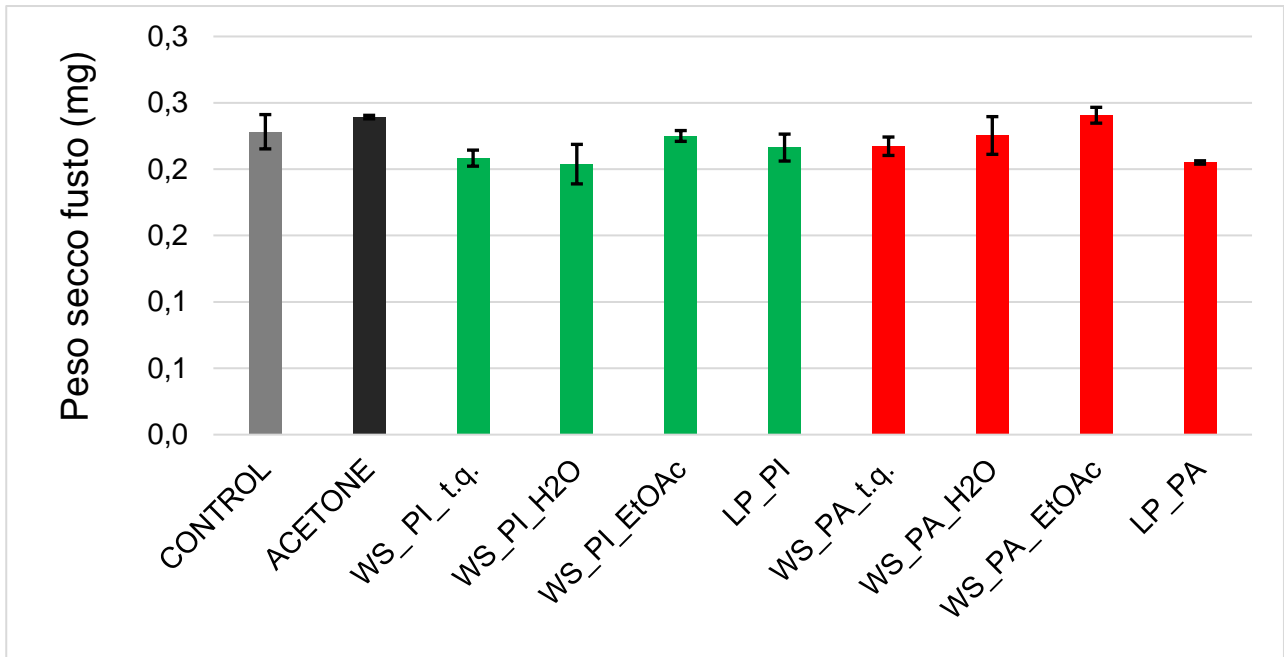


Fig 4.27. Effetto di prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: peso secco del fusto dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi di panico e pioppo (media \pm errore standard, $n = 3$).

Tab 4.25. Tavola ANOVA per l'effetto dei prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: peso secco fusto dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi di pioppo e panico.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti		0,005	9	0,000	2,072	0,083
residua		0,005	20	0,000		

Dal grafico in Fig 4.28, raffigurante la lunghezza della radice notiamo che non si evidenziano differenze statisticamente significative tra i trattamenti saggiati. (Tab 4.26)

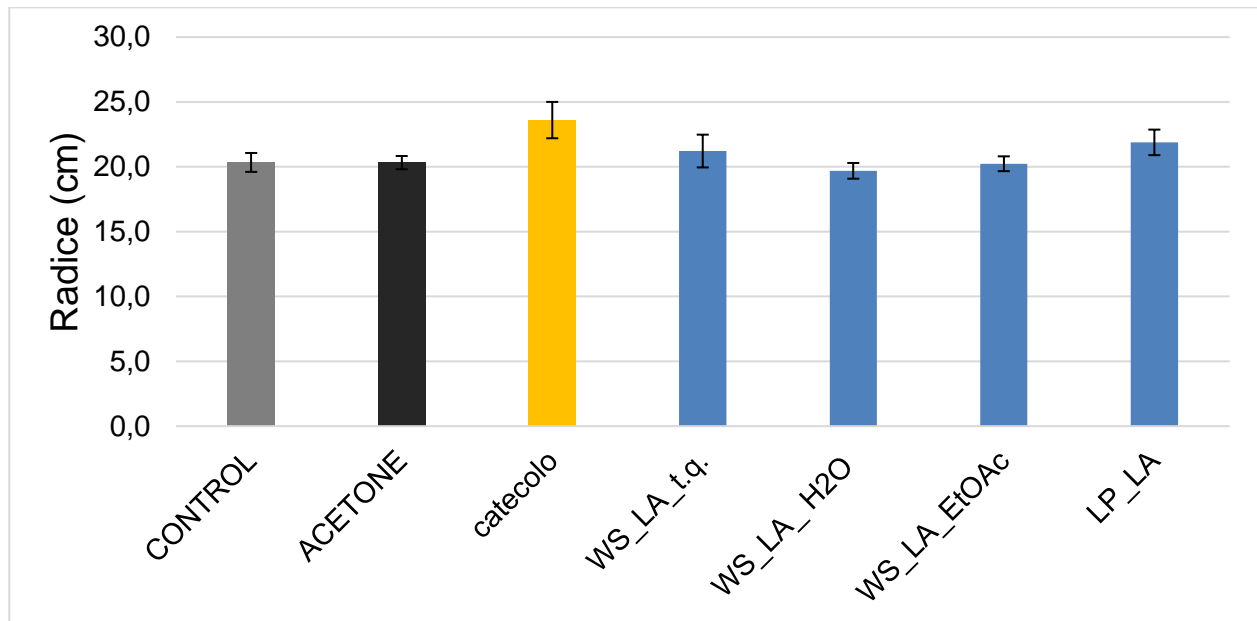


Fig. 4.28. Effetto dei prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: lunghezza radice dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi del larice (media \pm errore standard, $n = 3$).

Tab 4.26. Tavola ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: lunghezza radice dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi del larice.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti		32,368	6	5,395	2,093	0,120
residua		36,091	14	2,578		

Anche in questo caso, così come per il larice, non si evidenziano differenze significative (Tab 4.27), per la lunghezza della radice nel pioppo e nel panico (Fig 4.29)

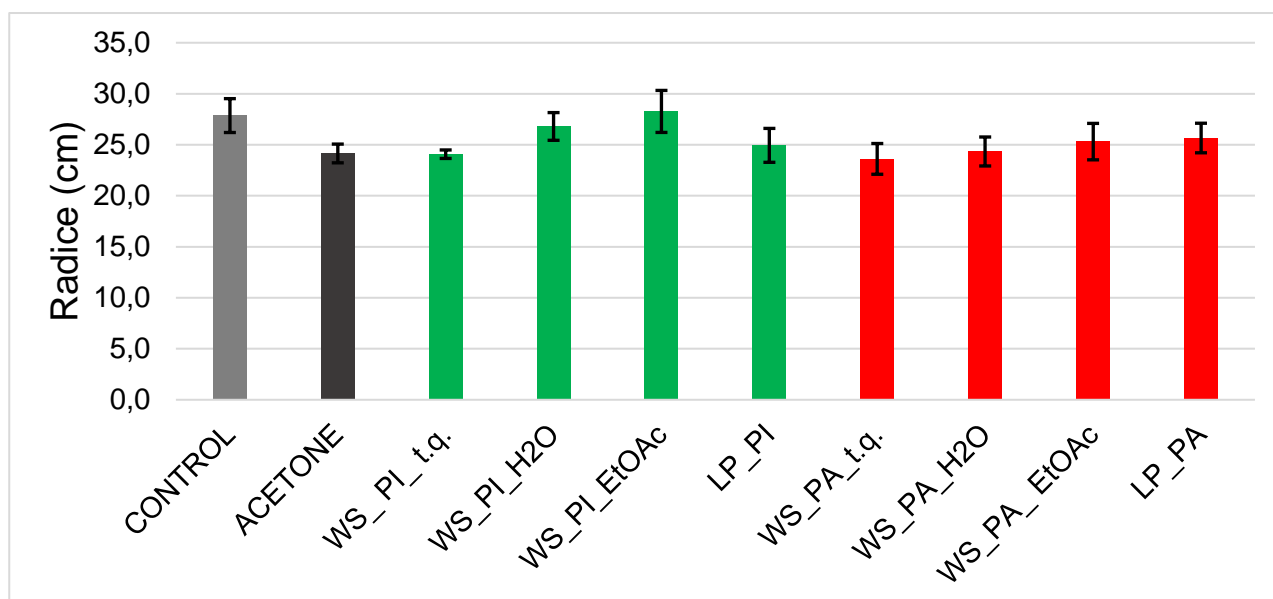


Fig. 4.29. Effetto dei prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: lunghezza radice dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi di pioppo e panico (media \pm errore standard, $n = 3$).

Tab 4.27. Tavola ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: lunghezza radice dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi di pioppo e panico.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti		72,14	9	8,02	1,203	0,346
residua		133,24	20	6,66		

Nel grafico in Fig. 4.30 è riportato il rapporto tra il peso secco e il peso umido delle piantine di avena, questo end-point viene effettuato per valutare il turgore delle stesse. Le differenze tra trattamenti sono risultate altamente significative (Tab 4.28), nello specifico è stata osservata una riduzione significativa rispetto al controllo nei trattamenti: ACETONE, WS_LA_t.q. e LP_LA.

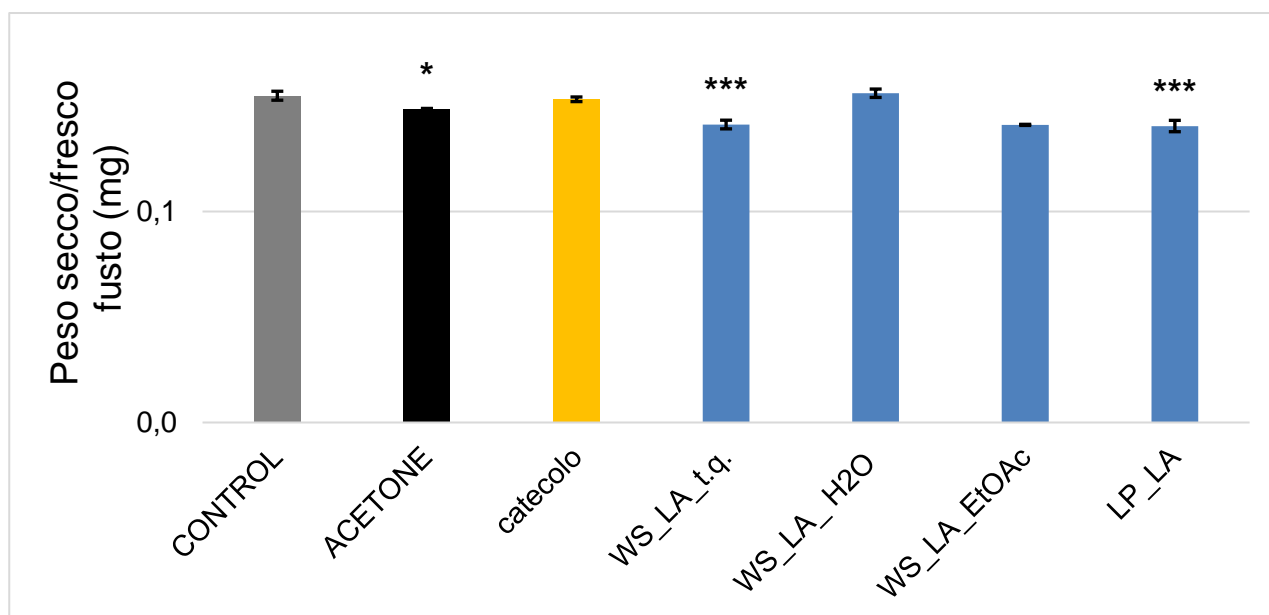


Fig. 4.30. Effetto di prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: rapporto peso secco / peso umido radice dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi del larice (media \pm errore standard, $n = 3$). Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto al controllo (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

Tab 4.28. Tavola ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: rapporto peso secco / peso umido radice dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi del larice.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti		0,000	6	0,000	15,87	<0,001
residua		0,000	14	0,000		

In Fig 4.31 è riportato il rapporto tra peso umido e peso secco delle piantine nelle biomasse panico e pioppo, non si evidenziano differenze statisticamente significative tra i trattamenti Tab 4.29.

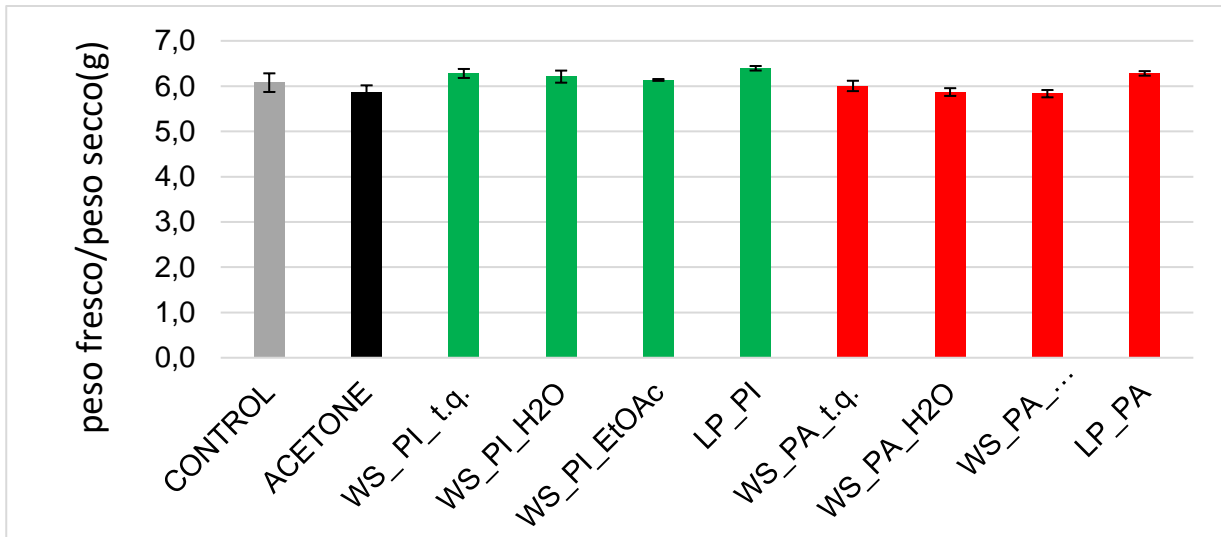


Fig. 4.31. Effetto di prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: rapporto peso secco / peso umido radice dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi del pioppo e panico (media \pm errore standard, $n = 3$).

Tab 4.29. Tavola ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: rapporto peso secco / peso umido radice dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi di pioppo e panico.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti		1,063	9	0,118	3,13	0,016
residua		0,755	20	0,038		

Attraverso il grafico in Fig 4.32 che raffigura la concentrazione di clorofilla presente nel fusto delle piantine di avena, possiamo osservare che le differenze tra trattamenti sono risultate altamente significative (Tab 4.30), nello specifico è stata osservata una riduzione significativa rispetto al controllo nel trattamento riguardante l'ACETONE.

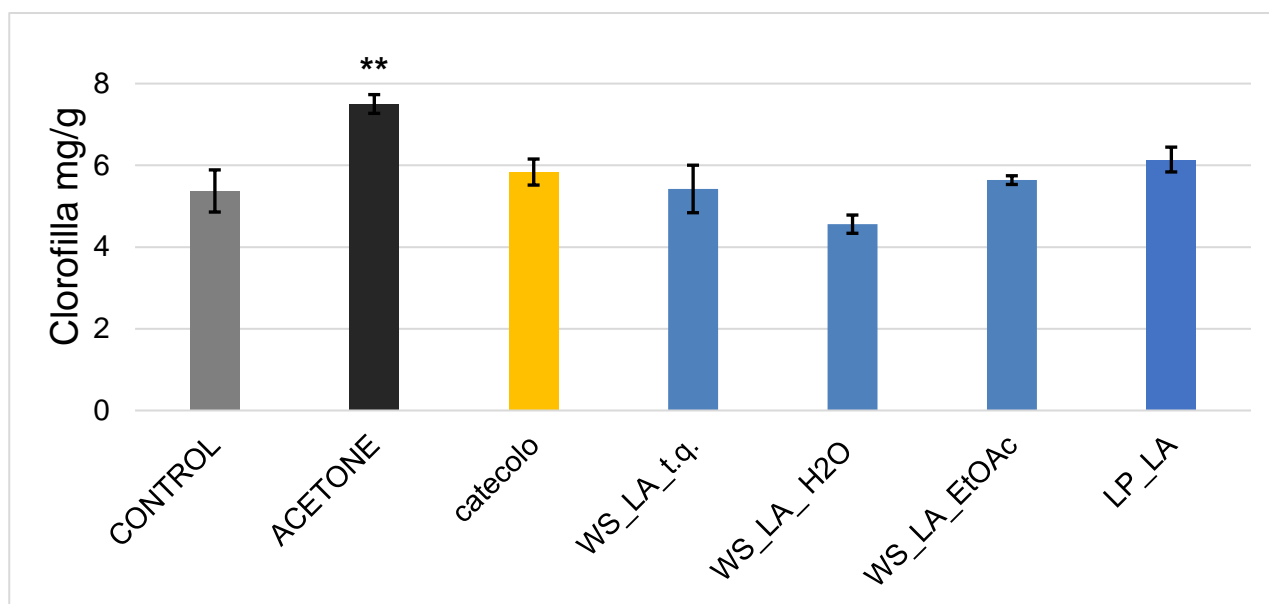


Fig. 4.32. Effetto di prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: valutazione della clorofilla dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi del larice (media \pm errore standard, $n = 3$). Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto al controllo (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

Tab 4.30. Tavola ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: valutazione della clorofilla dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi del larice.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti		14,698	6	2,449	6,27	0,002
residua		5,470	14	0,390		

In Fig 4.33 non si evidenziano differenze significative (Tab 4.31) per quanto riguarda la concentrazione di clorofilla nelle piantine di avena riguardanti l'esperimento effettuato, sul pioppo e sul panico.

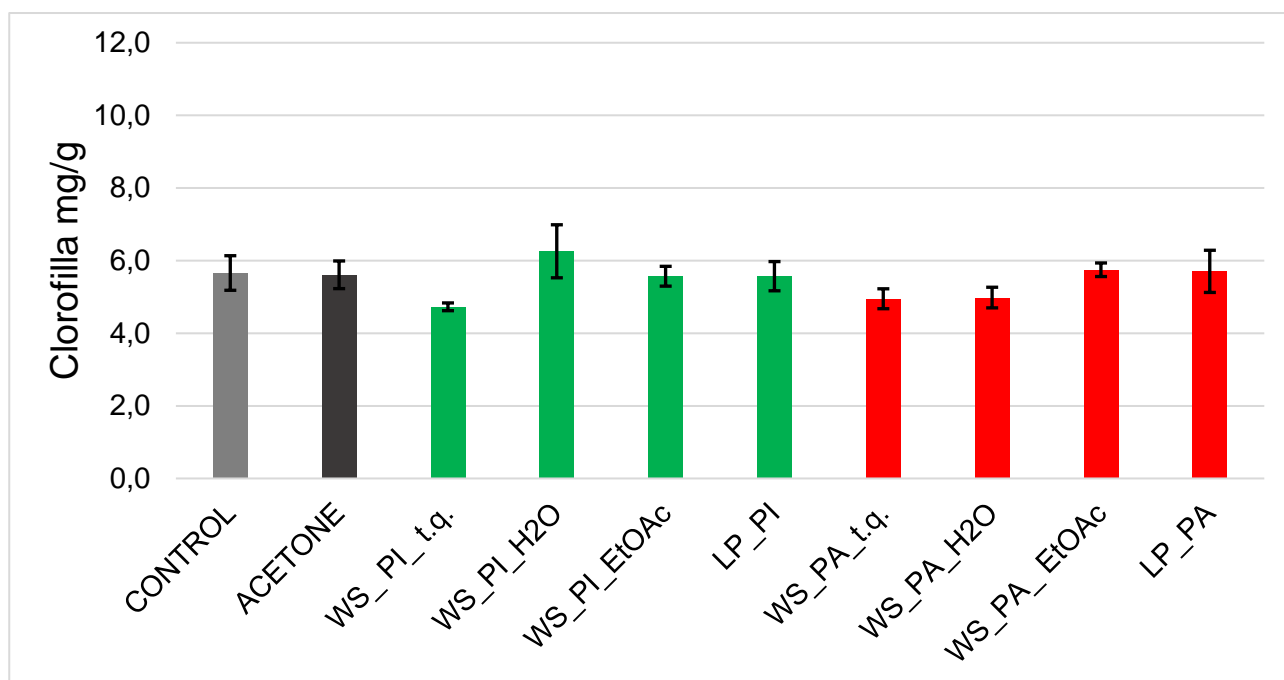


Fig. 4.33. Effetto di prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: valutazione della clorofilla dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi di pioppo e panico (media \pm errore standard, $n = 3$).

Tab 4.31. Tavola ANOVA per l'effetto di diversi prodotti di pirolisi su *Avena sativa*: valutazione della clorofilla dopo 3 settimane di esposizione ai prodotti di pirolisi di pioppo e panico.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti		5,655	9	0,628	1,25	0,324
residua		10,090	20	0,504		

4.4.3 Crescione

Dal grafico in Fig 4.34 è rappresentata la lunghezza della radice. Quello che si osserva è che le differenze tra trattamenti sono risultate altamente significative (Tab 4.32), nello specifico è stata osservata una riduzione significativa rispetto al controllo nei trattamenti: WS_LA_t.q., WS_LA_H2O, WS_LA_EtOAc, WS_PA_t.q., WS_PA_H2O, WS_PA_EtOAc, WS_PI_t.q., WS_PI_H2O, WS_PI_EtOAc. Si può inoltre notare che la frazione t.q. risulta essere più tossica, rispetto alla frazione in EtOAc che risulta essere meno tossica in tutte e tre le biomasse saggiate.

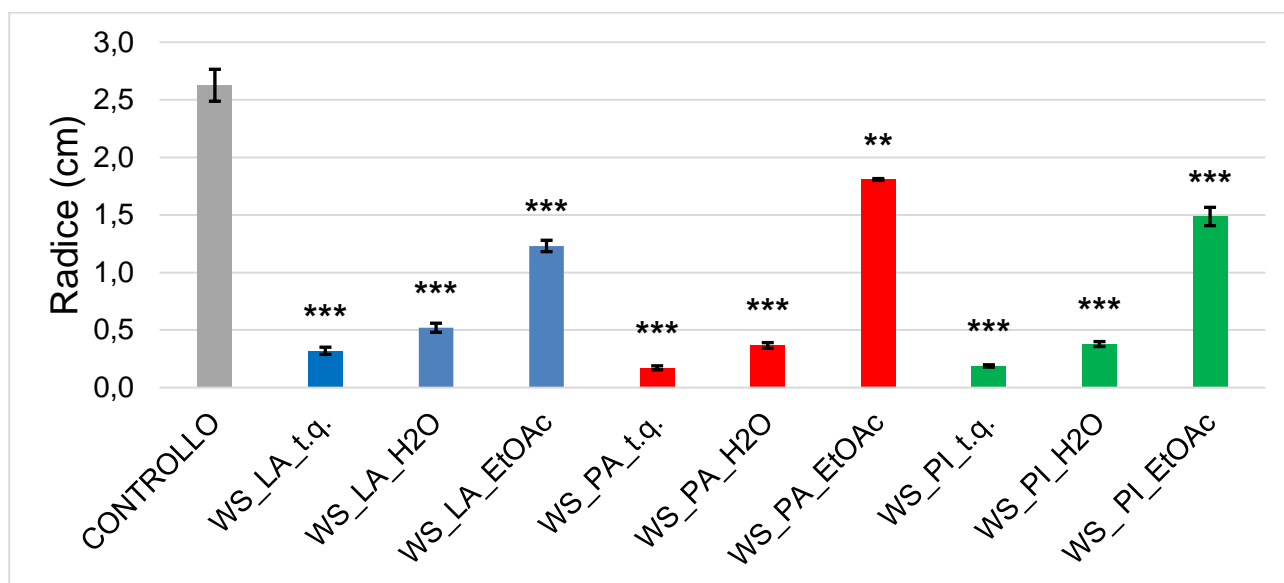


Fig. 4.34. Effetto di prodotti di pirolisi sui semi di Crescione: lunghezza radice dopo 72 h di esposizione ai prodotti di pirolisi (media \pm errore standard, $n = 3$). Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto al controllo (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

Tab 4.32. Tavola ANOVA effetto di prodotti di pirolisi sui semi di Crescione: lunghezza radice dopo 72 h di esposizione ai prodotti di pirolisi.

Sorgente di variazione	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti	4,603	9	0,511	194,590	<0,001
residua	0,049	19	0,002		

Anche in questo caso, quello che si evidenzia dal grafico in Fig 4.35, raffigurante la lunghezza del fusto, le differenze tra trattamenti sono risultate altamente significative (Tab 4.33), nello specifico è stata osservata una riduzione significativa rispetto al controllo nei trattamenti: WS_LA_t.q., WS_LA_H2O, WS_LA_EtOAc, WS_PA_t.q., WS_PA_H2O, WS_PI_t.q., WS_PI_H2O, WS_PI_EtOAc

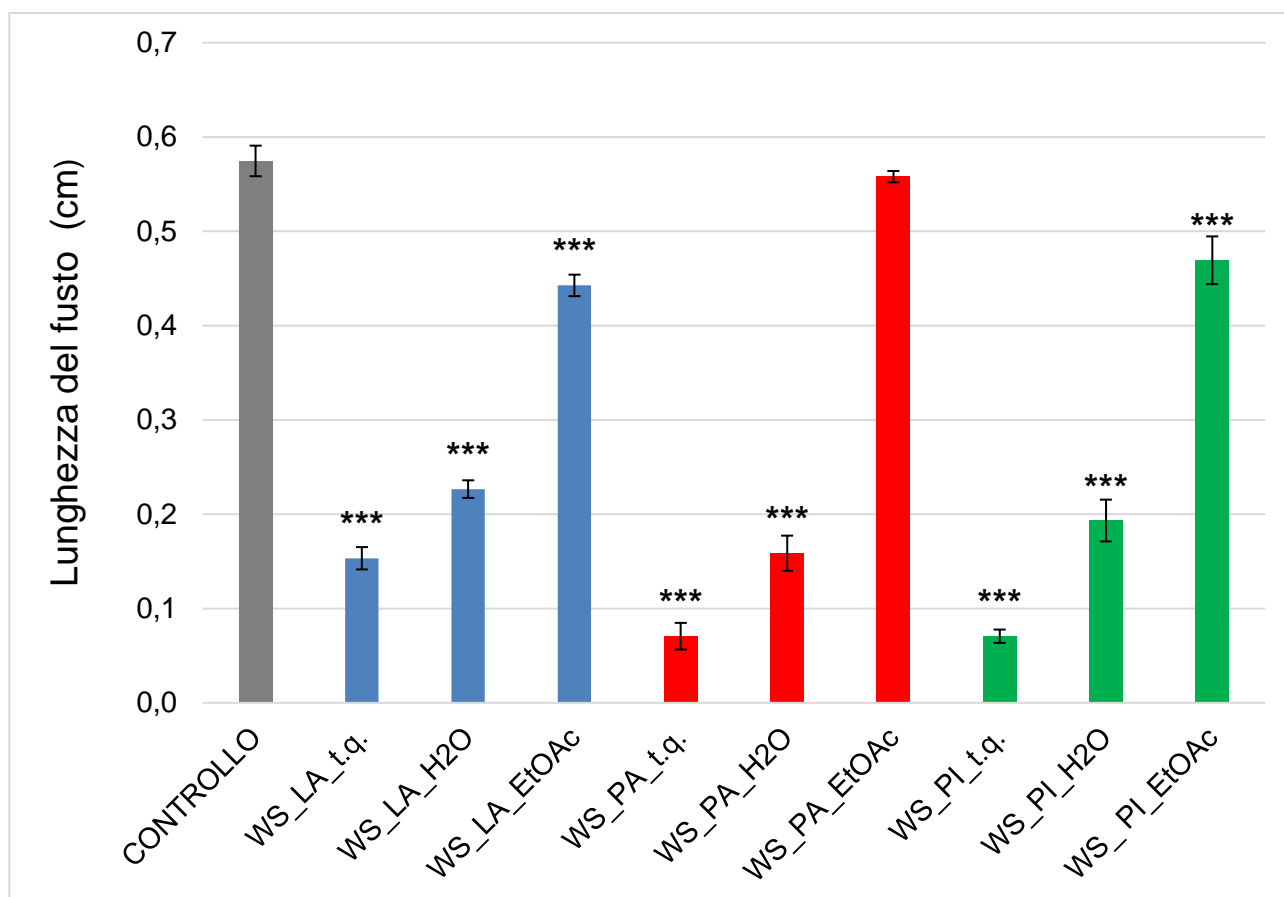


Fig. 4.35 Effetto di prodotti di pirolisi sui semi di Crescione: lunghezza fusto dopo 72 h di esposizione ai prodotti di pirolisi saggiati (media \pm errore standard, $n = 3$). Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto al controllo (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

Tab 4.33. Tavola ANOVA Effetto di prodotti di pirolisi sui semi di Crescione: lunghezza fusto dopo 72 h di esposizione ai prodotti di pirolisi saggiati.

Sorgente di variazione	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti	0,988	9	0,109	147,061	<0,001
residua	0,014	19	0,000		

Per quanto riguarda la germinazione si evidenziano differenze statisticamente significative nei trattamenti (Tab 4.34). Infatti i trattamenti, raggiungono quasi tutti il 100%, ad eccezione del WS_PA t.q. che arriva al 90%. (Fig 4.36)

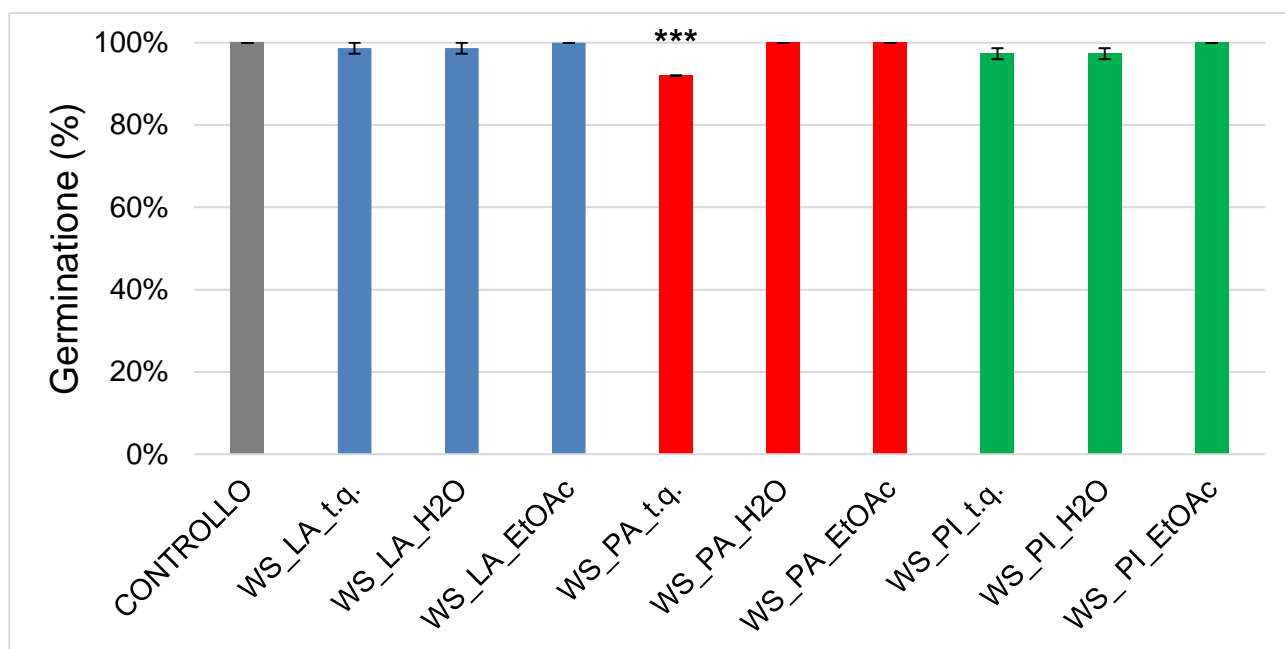


Fig. 4.36. Effetto di prodotti di pirolisi sui semi di Crescione: percentuale di germinazione dopo 72 h di esposizione ai prodotti saggati (media \pm errore standard, $n = 3$). Gli asterischi indicano una differenza significativa rispetto al controllo (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

Tab 4.34. Tavola ANOVA Effetto di prodotti di pirolisi sui semi di Crescione: percentuale di germinazione dopo 72 h di esposizione ai prodotti saggati.

Sorgente variazione	di	SS	df	MS	F	P
Tra trattamenti		10,37	9	1,15	8,2	<0,001
residua		2,67	19	0,14		

4.5 Respirazione batterica

Attraverso il grafico riportato in Fig 4.37, quello che emerge è che i prodotti di pirolisi da noi testati nei saggi di tossicità precedentemente descritti, non risultano essere battericidi. Infatti, se saggiati sulla comunità batterica presente spontaneamente nel suolo, si può osservare che i batteri emettono CO₂, attuano la respirazione e risultando perciò, essere vivi al momento del saggio. Concludendo dal test effettuato non si evidenzia nessuna inibizione sulla comunità batterica presente nel suolo.

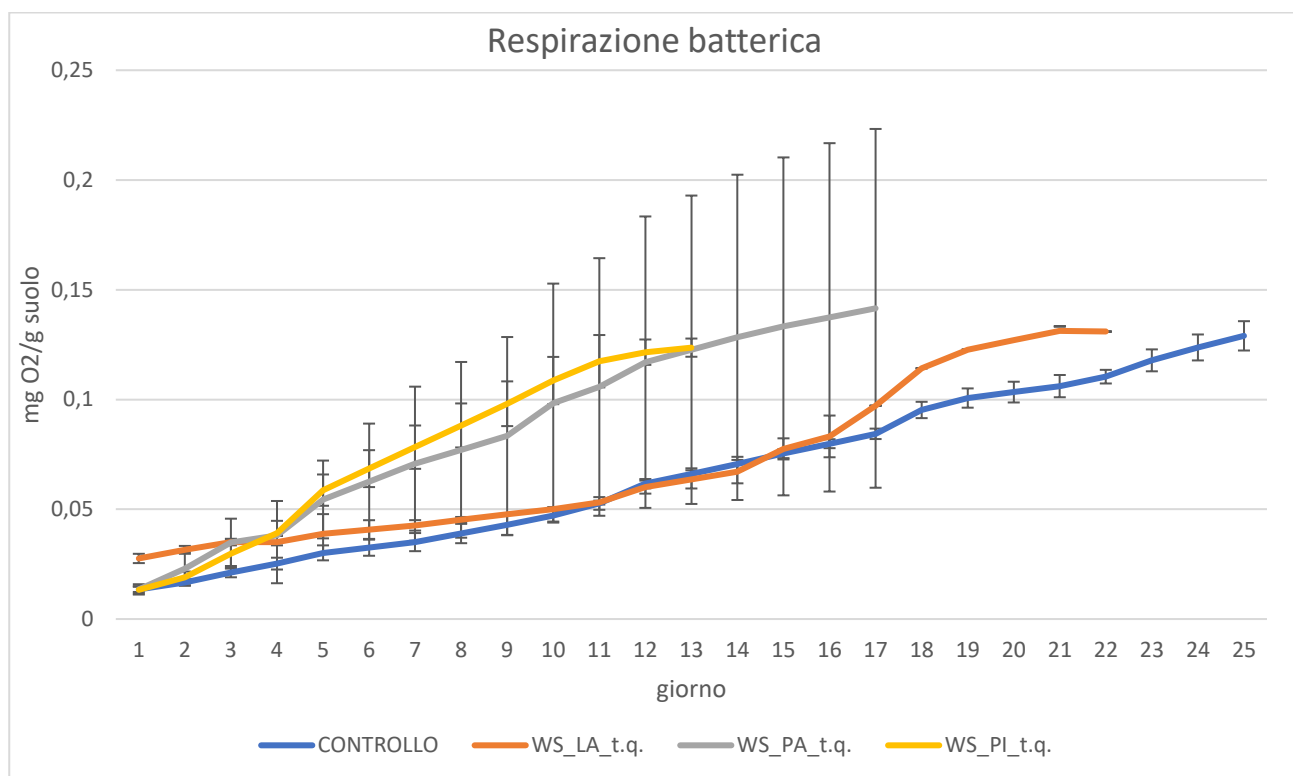


Fig. 4.37. Grafico raffigurante il comportamento dei batteri presenti nel suolo alla presenza dei diversi prodotti di pirolisi, in funzione della respirazione batterica dal giorno 0 fino al giorno 28.

5. Discussione

Nel presente lavoro di tesi sono stati valutati prodotti di pirolisi derivanti da tre biomasse vegetali (panico, larice e pioppo) ai fini del loro potenziale utilizzo come inibitori dell'ureasi in campo agricolo. Due sono state le caratteristiche prese in considerazione: l'effettiva capacità delle diverse frazioni di rallentare la produzione di ammoniaca per idrolisi dell'urea e l'ecotossicità delle frazioni stesse. Entrambe queste proprietà sono importanti per una eventuale applicazione pratica in quanto un formulato con una elevata capacità di inibizione dell'ureasi sarebbe inutilizzabile se provocasse effetti avversi generalizzati sugli organismi del suolo.

La capacità di inibire l'ureasi è stata valutata con due metodi diversi. Il primo di questi, basato sull'accumulo di ammonio nel suolo, era già stato applicato in studi precedenti compiuti presso i Laboratori di Scienze Ambientali (Laboratorio di Chimica Organica, dati non pubblicati). Questo ha permesso un confronto diretto tra i risultati del presente lavoro e risultati ottenuti precedentemente sia sugli stessi prodotti di pirolisi che su NBPT e catecolo, sostanze che sono state prese come riferimento in quanto la loro capacità di inibire l'ureasi è ben documentata (Fig. 5.1).

Quello che emerge da questo confronto è che i prodotti di pirolisi saggiati hanno un buon effetto inibitorio sull'enzima ureasi, rallentando quindi l'idrolisi dell'urea in ammoniaca e riducendo la lisciviazione nel terreno e la volatilizzazione in atmosfera. Per le frazioni solubili in acqua non ulteriormente frazionati (WS_t.q.), saggiate ad una concentrazione equivalente a 5 µg/g di catecolo, l'inibizione è risultata essere circa del 50%. Questo valore non è molto inferiore all'inibizione provocata dall'NBPT a 96 µg/g, concentrazione corrispondente a quella raggiunta nel suolo in base all'utilizzo raccomandato per i formulati commerciali che contengono questo principio attivo. La capacità delle frazioni WS_t.q. è risultata dipendente, come atteso, dalla concentrazione e ha raggiunto valori attorno all'80%, superiori a quella dell'NBPT, a concentrazioni equivalenti a 50 µg/g di catecolo, per ridursi molto, senza però annullarsi a concentrazioni equivalenti a 0,5 µg/g di catecolo.

La frazione solubile in etilacetato (WS_EtOAc) e quella insolubile in etilacetato (WS_H2O), entrambe derivate dall'ulteriore frazionamento di WS_t.q., sono state saggiate solo alla concentrazione equivalente a 5 µg/g di catecolo. La capacità di inibizione della frazione WS_EtOAc è risultata simile a quella della frazione idrosolubile indivisa, mentre risulta essere inferiore, circa del 20% per la frazione WS_H2O. Questo sembra indicare che, con la separazione, i composti responsabili dell'inibizione si trasferiscano prevalentemente alla fase etilacetato.

Per le lignine pirolitiche saggate alla concentrazione 5 µg/g di catecolo, quello che si osserva è che hanno una capacità di inibizione pari all'80%, maggiore quindi di quella evidenziata dal NBPT. Se confrontiamo le lignine pirolitiche sole con le lignine pirolitiche associate al biochar, possiamo dedurre che il biochar provoca un effetto sulla capacità di inibizione delle lignine, le percentuali di inibizione infatti diminuiscono, passando da un 80% di inibizione ad un 50%.

Confrontando i prodotti di pirolisi con il catecolo puro, ciò che emerge a parità di concentrazione di catecolo nelle frazioni, le seguenti, risultano avere una capacità anti-ureasica maggiore rispetto al catecolo puro, va però detto, che all'interno dei prodotti di pirolisi oltre al catecolo, sono presenti numerose altre sostanze che possono in parte, influenzare positivamente la capacità inibitoria. Inoltre è stato osservato che la biomassa di origine non sembra influenzare l'attività anti-ureasica delle frazioni saggate, infatti i trattamenti in tutte le biomasse hanno avuto comportamenti simili. Altri prodotti derivati da sostanze di scarto sono stati studiati nell'articolo di Samori et al (2019), attraverso il quale è stato osservato, che gli scarti di vinaccia di uva rossa dai quali sono stati estratti polifenoli, aventi un'attività inibitoria quasi del 90%, e quindi utilizzabili in campo agrario.

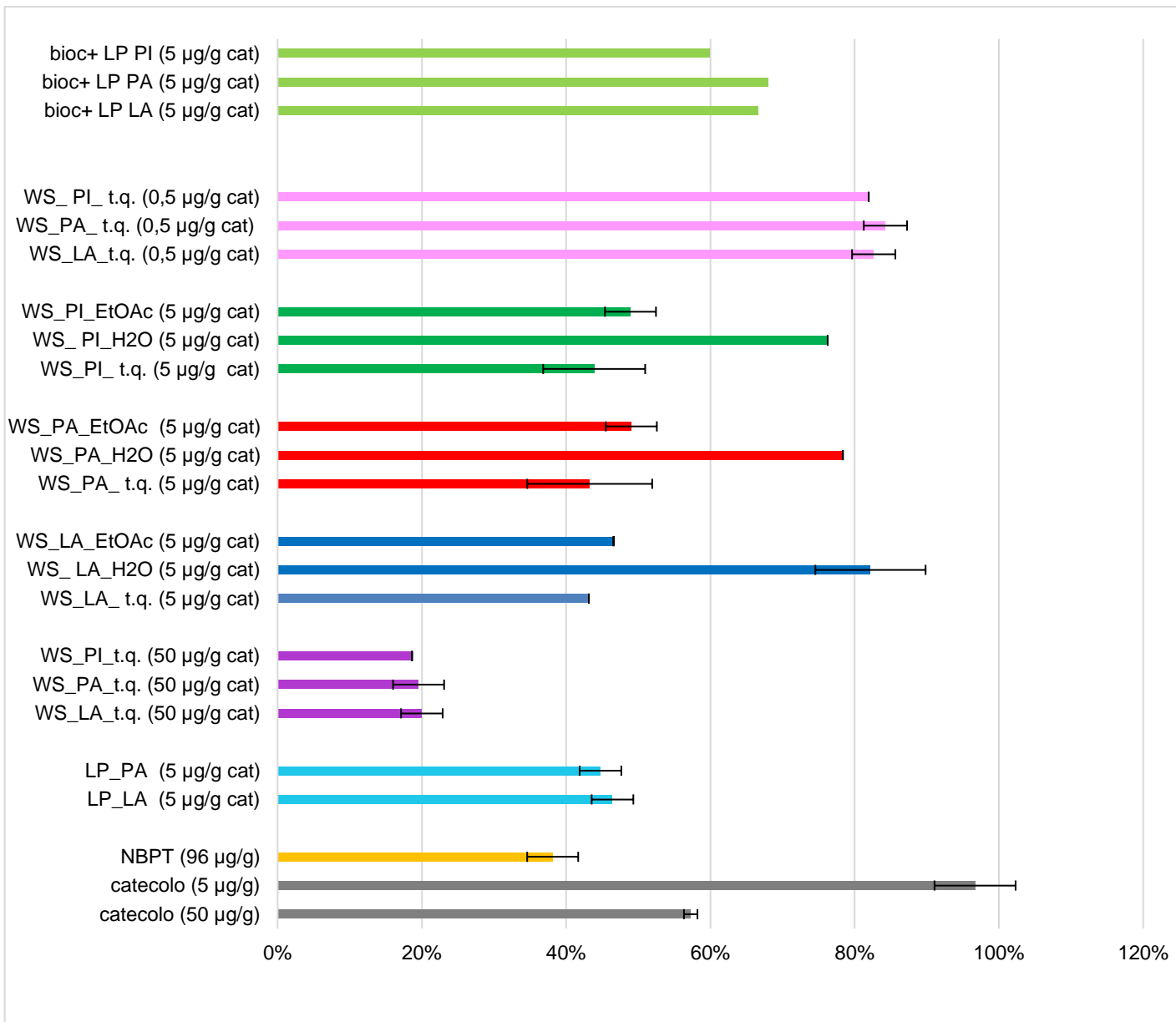


Fig. 5.1 Grafico riguardante i risultati forniti dal laboratorio di chimica organica non ancora pubblicati, raffiguranti i diversi trattamenti a confronto con diverse quantità di catecolo, per quanto riguarda la percentuale dell'attività ureasica residua nel suolo calcolata rispetto al controllo.

Il secondo metodo per valutare la capacità di inibizione dell'ureasi si è basato sulla misura dell'ammoniaca rilasciata in aria. Questo metodo è stato applicato in un solo esperimento con cui è stato valutato il catecolo puro alla concentrazione 50 µg/g e la frazione WS_PA_t.q. ad una concentrazione corrispondente a µg/g di catecolo. Il dispositivo per effettuare questa misura è stato ideato nel corso del presente lavoro. Anche per l'assenza di dati di confronto ottenuti con lo stesso metodo questo esperimento è rilevante più come base di partenza per la messa a punto del metodo che per i risultati effettivamente ottenuti, che sono stati parziali, a causa di alcuni problemi tecnici. È stato comunque possibile evidenziare come, sia in assenza di inibitori che in presenza di catecolo la

maggior parte dell'ammoniaca proveniente dall'idrolisi dell'urea fosse rilasciata in atmosfera nelle prime 48 ore di incubazione. Già a 72 ore, infatti non è stato osservato un incremento della quantità di ammoniaca rilasciata in aria rispetto alle 48 ore. L'esperimento ha poi confermato l'attività anti-ureasica della frazione WS_PA_t.q. Anche Cantarella et al. (2001) hanno valutato il comportamento di inibitori dell'ureasi nei suoli e osservato l'andamento delle emissioni di ammoniaca in atmosfera nel tempo. Ciò che si evidenzia nel trattamento con sola urea, in assenza di inibitori, è una similitudine dell'andamento della volatilizzazione dell'ammoniaca con il nostro saggio, volatilizzazione che risulta essere maggiore nelle prime 72 h per ridursi di molto nei giorni successivi. Anche sul campo si riscontra un andamento simile infatti, Dawar et al. (2011), hanno valutato il formulato Agrotain, il cui principio attivo è l'NBPT. Quello che si è osservato è che l'NBPT ha ritardato e abbassato il picco di volatilizzazione dell'ammoniaca, ritardando l'idrolisi dell'urea durante i primi 7 giorni dopo la sua applicazione. Il ritardo del picco derivato dall' NBPT ha concesso quindi, più tempo alle piogge o all'irrigazione per spostare l'urea aggiunta dallo strato superficiale agli strati più profondi del suolo. Questa distribuzione dell'urea nella zona di radicazione ha il potenziale per migliorare l'efficienza di utilizzo dell'azoto e ridurre al minimo le perdite di esso associate alla volatilizzazione dell'ammoniaca. Le perdite di NH₃ legate alla somministrazione della sola urea sono stimate al 18%-37% mentre, associando l'uso di NBPT diventano dal 3-5 %. In conclusione anche in questo caso così come per i derivati del catecolo, questi inibitori di sintesi, hanno dei buoni risultati sul campo e sull'inibizione dell'urea, ma essendo di origine chimica, non sono in linea con lo stile di pensiero della chimica verde dell'economia circolare, principale obiettivo invece, del seguente lavoro di tesi.

Altro obiettivo fondamentale del seguente lavoro di tesi, è stato quello di valutare i nuovi inibitori dell'ureasi per quanto riguarda la loro tossicità su organismi modello, nello specifico: il lombrico *Eisenia andrei*, la pianta di *Avena sativa* e semi di Crescione.

Quello che è emerso dai risultati dei saggi effettuati è che i nuovi inibitori saggiati risultano essere significativamente tossici. Nello specifico i trattamenti WS_PA_H₂O e LP_PI sono risultati tossici in termini di sopravvivenza, mentre WS_LA_t.q è risultato tossico per il numero di neonati prodotti nel saggio testato sul lombrico *Eisenia andrei*. WS_LA_t.q. e WS_LA_H₂O sono invece, risultati tossici per la pianta di *Avena sativa*. Risultati differenti invece, li abbiamo nel saggio sui semi di Crescione. Nel quale si osserva una regolarità riscontrata in tutte le biomasse saggiate, la frazione maggiormente tossica è la frazione t.q., seguita da quella insolubile in etilacetato e da quella invece solubile in esso. Il medesimo trend viene ripetuto in tutte le tre biomasse esaminate. Inoltre è stato osservato che la fitotossicità dei prodotti di pirolisi, sembra essersi attenuata attraverso la presenza del suolo, infatti sul

crescione gli effetti di tossicità sono stati evidenziati significativamente sulla lunghezza del fusto e della radice ma non sulla germinazione che risultata essere sempre del 100%.

Inoltre è emerso dai saggi di tossicità effettuati, che la frazione solubile in etilacetato (WS_EtAoc) è risultata essere la frazione avente minor tossicità, in tutti gli organismi modello saggiati.

Ciò è deducibile ipotizzando, che nel momento del frazionamento, partendo dalla frazione t.q. ottenendo le due frazioni solubili in etilacetato e insolubili in esso, la parte che contiene maggiori sostanze tossiche migra più favorevolmente nella frazione insolubile in etilacetato e quindi risulta essere la frazione che acquista maggiore tossicità.

Anche nel caso dell'esperimento di Samorì et al del 2019, abbiamo un effetto simile al nostro in termini di tossicità, è emerso infatti, che i NADES a base di urea hanno avuto effetti reputati tossici sia sul lombrico *Eisenia andrei* sia sull'*Avena sativa*, mentre il cloruro di colina HBA è stato reputato tossico solo per i bozzoli ma non ha riscontrato effetti negativi su altre fasi del ciclo di vita dell'organismo e sulla pianta di *Avena sativa*.

Per quanto riguarda l'esperimento con le lignine pirolitiche supportate da biochar invece, si evidenzia un differente risultato. Nel saggio effettuato su *Eisenia andrei* nessun nuovo inibitore testato, è risultato essere tossico per questo organismo modello in termini di sopravvivenza; come se la presenza del biochar andasse ad attenuare la tossicità intrinseca delle lignine pirolitiche.

Infatti, volendo fare un confronto tra i due esperimenti effettuati nella seguente tesi, sul lombrico *Eisenia andrei*, quello che si osserva è che per quanto riguarda la sopravvivenza degli adulti, nel primo saggio risulta essere minore rispetto al secondo dove è del 100% in tutti i trattamenti. Mentre in termini di riproduzione (n° neonati) risulta essere minore nel saggio con le lignine con il supporto del biochar. È stato visionato però, che i trattamenti con il biochar sembra che oltre a ridurre la tossicità delle lignine pirolitiche, riducano anche la loro attività inibitoria sull'enzima ureasi.

Inoltre è stato osservato che il trattamento con solo biochar in alcuni casi sembra essere esso stesso tossico per i lombrichi nell'esperimenti effettuati. Infatti, a supporto di ciò, anche attraverso gli articoli di Chan et al. (2008, 2007), Lieschet al. (2010) e Elliston et al. (2020), i quali hanno valutato gli effetti di tossicità del biochar derivato da lettiera di pollame nel primo caso, da trucioli di pino e pollame nel secondo, paglia di grano e lolla di riso nell'ultimo caso, testati sulla pianta di ravanello, su *Eisenia fetida* e su *Lumbricus terrestris*, emergono risultati contrastanti. Nel primo caso il biochar sembra aumentare la resa di produzione legata alla capacità di esso di aumentare la disponibilità di N, nel secondo caso invece nell'articolo di Chan et al. (2007), sembra non avere nessun effetto benefico sulla pianta di ravanello. Nel caso dell'articolo di Lieschet al. (2010)

entrambi i biochar utilizzati hanno aumentato il pH del suolo creando in questo modo, un ambiente poco favorevole per la vita del lombrico causandone, in alcuni casi anche la morte. Scenario osservato anche nell'articolo di Elliston dove alti tassi di applicazione di biochar hanno determinato un aumento delle concentrazioni di cloruro e fosfato solubili in acqua, che hanno influenzato la variazione di massa nel tempo del lombrico e la sopravvivenza. Anche attraverso l'esperimento effettuato in questa tesi, non possiamo avere la certezza della non tossicità di questa sostanza, in quanto emergono dalle analisi dati ambigui non conclusivi. Quello che possiamo però affermare con certezza, è che la tossicità o i benefici del biochar sono differenti a seconda della biomassa di partenza da cui è ottenuto e anche dal trattamento termico a cui è sottoposto.

È stata inoltre valutata anche la respirazione batterica al fine di valutare se i nuovi inibitori saggiati fossero o meno battericidi, ciò che è emerso è che questi inibitori non hanno influenza negativa sulla comunità batterica presente spontaneamente nel suolo. Quindi l'attività anti-ureasica risulta essere specifica, non dovuta alle possibili capacità battericide dei prodotti di pirolisi.

6. Conclusioni

I risultati ottenuti indicano che i prodotti di pirolisi derivati da biomasse vegetali residuali potrebbero effettivamente avere uno sviluppo nel settore agricolo come inibitori dell'ureasi, e sono potenzialmente in grado di sostituire gli inibitori di sintesi utilizzati oggi anche se, allo stato dei fatti, presentano alcuni aspetti problematici.

Sia le lignine pirolitiche che le frazioni idrosolubili del bio-olio, prodotti per pirolisi veloce di legno di larice, legno di pioppo e paglia di panico, hanno dimostrato una rilevante capacità di inibire l'idrolisi dell'urea ad opera delle ureasi batteriche. Questa capacità è paragonabile a quella dell'NBPT il principio attivo di sintesi attualmente utilizzato a tale scopo in campo agrario.

L'ulteriore frazionamento della componente idrosolubile produce una frazione solubile in etilacetato che mantiene la capacità di inibire l'ureasi e una non solubile in etilacetato con una capacità molto più ridotta.

D'altra parte, le stesse frazioni, a concentrazioni che causano una inibizione dell'ureasi che potrebbe avere un interesse applicativo, hanno anche dimostrato una tossicità non trascurabile. La condizione per un utilizzo di questi prodotti sembra quindi individuare un modo per limitare gli effetti avversi su piante e organismi del suolo.

Analizzando i risultati ottenuti è emerso che la frazione solubile in etilacetato, che mantiene la capacità di inibizione della frazione idrosolubile da cui deriva, risulta essere tra le meno tossiche per tutti e tre gli organismi modello saggiati.

La combinazione con il biochar sembra attenuare la tossicità delle lignine pirolitiche per i lombrichi, ma sembra anche abbassare la loro capacità di inibizione dell'ureasi. Inoltre, non si può escludere che il biochar stesso sia in una certa misura tossico per i lombrichi. Anche sulla base delle informazioni desunte dalla letteratura, è possibile affermare che i benefici o la tossicità di questo materiale dipendono dal tipo di biomassa di origine e dal tipo di trattamento termico a cui è stato sottoposto.

Non si evidenzia una biomassa migliore tra le tre saggiate, nè in termini di inibizione dell'enzima, nè in termini di tossicità, esse hanno un comportamento equivalente.

È stato inoltre osservato, che la respirazione batterica non è stata inibita dai prodotti di pirolisi saggiati perciò, si deduce che la loro attività anti-ureasica si specifica, non dovuta ad una generica azione battericida.

In conclusione, il presente studio rappresenta un buon punto di partenza, ma sono necessari ulteriori approfondimenti per sviluppare ulteriori inibitori derivati da biomasse, in modo tale da poter effettuare un confronto con quelli esistenti e poter selezionare i più promettenti.

Sostituire gli inibitori dell'ureasi di sintesi chimici con prodotti derivati dalle biomasse vegetali avrebbe un impatto positivo sull'ambiente, in quanto non si dovrebbero utilizzare nuove materie prime. Tramite gli inibitori derivati dalle biomasse residuali quello che veniva considerato prima scarto, diviene la nuova materia prima di partenza, riducendo rifiuti e sprechi.

Bibliografia

- Balsari P, Gioelli F, 2000. Analisi delle emissioni di ammoniaca da concimi tradizionali e contenenti azoto stabilizzato. *L'Informatore Agrario* 16: 43-46.
- Benini S, Rypniewski WR, Wilson KS, Miletto S, Ciurli S, Mangani S, 1999. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure* 7: 205-216.
- Benini S, Rypniewski WR, Wilson KS, Mangani S, Ciurli S, 2004. Molecular details of urease inhibition by boric acid: insights into the catalytic mechanism. *J Am Chem Soc* 126: 3714-3715.
- Brenna S, Riparbelli C, 2007. *Ersaf, Lombardia*.
- Bridgwater AV, 2012. Review of fast pyrolysis of biomass and product upgrading. *Biomass and Bioenergy* 38: 68-94. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.048>.
- Bridgwater AV, Peacocke, GVC, 2000. Fast pyrolysis processes for biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 4: 1-7. [https://doi.org/10.1016/S1364-0321\(99\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S1364-0321(99)00007-6).
- Broadbent FE, Hill GN, Tyler K, 1958. Transformations and Movement of Urea in Soils. *Soil Science Society of America Journal* 22:303-307. <https://doi.org/10.2136/sssaj1958.03615995002200040010x>
- Chan KY, Dorahy CG, Tyler S, Wells AT, Milham PP, Barchia I, 2007. Phosphorus accumulation and other changes in soil properties as a consequence of vegetable production in the Sydney region, New South Wales, Australia. *Australian Journal of Soil Research* 45:139–146. <https://doi.org/10.1071/SR06079>
- Chan KY, Van Zwieten L, Meszaros I, Downie A, Joseph S, 2007. Agronomic values of green waste biochar as a soil amendment. *Australian Journal of Soil Research* 45: 629–634. <https://doi.org/10.1071/SR07109>
- Chan KY, Van Zwieten L, Meszaros I, Downie A, Joseph S, 2008. Using poultry litter biochars as soil amendments. *Australian Journal of Soil Research* 46: 437- 444. <https://doi.org/10.1071/SR08036>

- Dawar K, Zaman M, Rowarth J S. 2011. Urea hydrolysis and lateral and vertical movement in the soil: effects of urease inhibitor and irrigation. *Biology and Fertility of Soils* 47: 139–146 <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0515-3>
- Davis, 1957. Contribution from the Department of Soils and Plant Nutrition, University of California. Soil Science Society of America.
- D’Elia I, Contaldi M, De Lauretis R, Pignatelli T, Vialetto G, 2007. Scenari di emissioni di inquinanti atmosferici in Italia. *Ingegneria Ambientale* 6: 308-318.
- Elliston T, Oliver IW, 2020. Ecotoxicological assessments of biochar additions to soil employing earthworm species *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris*. *Environ Science and Pollution Research* 27: 33410–33418. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04542-2>
- Galvagno S, Casu T, Casabianca A, Calabrese G, Cornacchia, 2002. Pyrolysis process for the treatment of scrap tyres: preliminary experimental results. *Waste Management* 22: 917-923. [https://doi.org/10.1016/S0956-053X\(02\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S0956-053X(02)00083-1)
- Giorgi S, Lavagna M, Campioli A, 2017. Fondamenti, Interpretazioni E Analisi Dello Stato Dell’arte. Politecnico Di Milano, *Ingegneria Dell’ambiente* 4: 263-276. <https://doi.org/10.14672/Ida.V4i3.1141>.
- ISO, 2012. Soil quality Effects of pollutants on earthworms Part 2: Determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. ISO 11268-2:2012(E). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland
- ISO, 2012. Soil quality Determination of the effects of pollutants on soil flora Part 2: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants. ISO 11269-2:2012 (E). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISTAT, 2005. La distribuzione per uso agricolo dei fertilizzanti, Statistiche in breve giugno 2006. SINAB, Sistema d’Informazione Nazionale sull’Agricoltura biologica.
- Klimczyk M, Siczek A, Schimmelpfennig L, 2021. Improving the efficiency of urea-based fertilization leading to reduction in ammonia emission. *Science of The Total Environment* 771: 145-483. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145483>.
- Liesch AM, Weyers SL, Gaskin JW, Das KC, 2010. Impact of two different biochars on earthworm growth and survival. *Annals of Environmental Science* 4: 1-9.

MacArthur E, 2013. "Towards the circular economy. *Journal of Industrial Ecology* 2: 23-44.

Masoni A, Ercoli L, 2010. Azoto nel terreno. Riduzione dell'inquinamento delle acque dai nitrati provenienti dall'agricoltura. Felici Editore S.r.l. 7: 211-241.

Mazzei L, Cianci M, Musiani F, Lente G, Palombo M, Ciurli S, 2017. Inactivation of urease by catechol: Kinetics and structure. *Journal of Inorganic Biochemistry* 166: 182-189.

Meadowcroft, J, 2007. National sustainable development strategies: features, challenges and reflexivity. *European Environment* 17.3: 152-163. <https://doi.org/10.1002/eet.450>.

Nastri A, Gioacchini P, Marzadori C, Giovannini C, Vittori Antisari L, Gessa C, 2002. Influence of urease and nitrification inhibitors on N losses from soils fertilized with urea. *Biol Fertil soils* 36: 129-135. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0521-1>.

OECD, 2016. Guideline for the testing of chemicals No. 222: Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*). Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

Pagoni A, Daliani T, Macegoniuk K, Vassiliou S, Berlicki L, 2019. Catechol-based inhibitors of bacterial urease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 29:1085-1089. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.02.032>.

Prieto-Sandoval V, Jaca C, Ormazabal M, 2018. Towards a consensus on the circular economy. *Journal of Cleaner Production* 179: 605-615. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.224>.

Revie A, 2009. Ureases. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic* 59: 22-40. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.01.004>.

Samorì C, Mazzei L, Ciurli S, Cravotto G, Grillo G, Guidi E, Pasteris A, Tabasso S, Galletti P, 2019. Urease Inhibitory Potential and Soil Ecotoxicity of Novel "Polyphenols-Deep Eutectic Solvents Formulations". *ACS Sustainable Chem. Eng* 7: 15558–15567. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b03493>.

Seinfeld, Pandis, 1998. Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development* 40: 7-26. <https://doi.org/10.1080/00139157.1999.10544295>.

- Svane S, Sigurdarson J J, Finkenwirth F, Eitinger T, Karring H, 2020. Inhibition of urease activity by different compounds provides insight into the modulation and association of bacterial nickel import and ureolysis. *Sci Rep* 10: 8503. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65107-9>
- Wan X, Wu W, Shah F, 2021. Nitrogen fertilizer management for mitigating ammonia emission and increasing nitrogen use efficiencies by ¹⁵N stable isotopes in winter wheat. *Science of The Total Environment* 790. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147587>.
- Xiao H, Ma T, Fu W, Peng X, Zhang A, Zhu H, 2010. The synthesis, structure and activity evaluation of pyrogallol and catechol derivatives as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45: 5064-5070. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.08.015>.
- Zadeh E, Abdulkhali A, Aboelazayem O, Saha B, 2020. Recent Insights into Lignocellulosic Biomass Pyrolysis: A Critical Review on Pretreatment, Characterization, and Products Upgrading 8: 799. <https://doi.org/10.3390/pr8070799>.
- Zerner B, 1991. Recent advances in the chemistry of an old enzyme, urease. *Bioorganic Chemistry* 19: 116-131. [https://doi.org/10.1016/0045-2068\(91\)90048-T](https://doi.org/10.1016/0045-2068(91)90048-T).