



**BIOMASSHUB**  
biometano per una società sostenibile

# Attività di valutazione della tossicità di suoli fertilizzati e relative matrici fertilizzanti

## Progetto BIOMASS-HUB

Report Attività 2020-2021

Marco Guida, Federica Carraturo, Antonietta Siciliano  
Centro Servizi Metrologici e Tecnologici Avanzati dell'Università di Napoli Federico II

Fabrizio Adani  
Gruppo RICICLA - Università degli Studi di Milano - DiSAA

REALIZZATO CON IL SOSTEGNO DI



PATROCINIO  
Comune di  
Milano



**UNIONE EUROPEA**  
Fondo europeo di sviluppo regionale



Regione  
Lombardia



POR 2014-2020 / INNOVAZIONE E COMPETITIVITÀ



# Premessa

Nell'ambito del progetto di ricerca finanziato da Regione Lombardia "Biomass Hub", avente l'obiettivo di creare una bioraffineria per la produzione integrata di biocombustibili, bio-metano, energia, fertilizzanti e biomateriali, è stato effettuato uno studio finalizzato alla valutazione della ecotossicità di matrici fertilizzanti e di suoli con esse fertilizzati.

Tale studio è inserito tra le attività, previste dal progetto di ricerca, di valorizzazione, valutazione degli impatti e monitoraggio delle matrici fertilizzanti.

Lo studio è stato concepito in modo tale che fosse il piu' possibile rappresentativo delle condizioni di reale utilizzo agronomico delle matrici fertilizzanti, pertanto:

- sono state tenute in debito conto le effettive modalità di utilizzo in campo delle matrici fertilizzanti investigate;
- la valutazione è stata condotta su una molteplicità di matrici fertilizzanti che, per uso e/o funzione, sono paragonabili e confrontabili tra loro (alcune matrici fertilizzanti sono storicamente utilizzate in agricoltura), così da poter confrontare i risultati delle matrici fertilizzanti derivate dai rifiuti organici quali fanghi e derivati dei fanghi (fanghi, digestato da fanghi e gessi di defecazione) con quelli di fertilizzanti chimici (urea) e organici (reflui zootecnici e compost) di largo e comune utilizzo.

Le matrici testate ed i suoli fertilizzati con tali matrici sono sinteticamente elencate in **Tabella 1** ed in **Figura 1**.

|                              | Tipologia   |
|------------------------------|---|
| <b>Matrici Fertilizzanti</b> | Urea (Chimico)  |
|                              | Compost da umido  |
|                              | Digestato zootecnico  |
|                              | Refluo suino (Liquame)  |
|                              | Gesso di defecazione da fanghi (Gesso)  |
|                              | Fango R10   |
|                              | Digestato da fanghi R10   |
| <b>Suoli trattati</b>        | Controllo   |
|                              | Urea (Chimico)  |
|                              | Compost da umido  |
|                              | Digestato zootecnico  |
|                              | Refluo suino (Liquame)  |
|                              | Gesso di defecazione da fanghi (Gesso)  |
|                              | Fango R10   |
|                              | Digestato da fanghi R10 <ul style="list-style-type: none"><li>• Digestato per fertilizzare Mais</li><li>• Digestato per fertilizzare Riso</li></ul> |

**Tabella 1** - Tipologia delle matrici fertilizzanti e dei suoli

| Matrici Fertilizzanti  | Informazioni   |
|--|--|
|  <p><b>UREA</b><br/>(Chimico)</p>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Fertilizzante azotato, molto utilizzato per il suo alto titolo in azoto</b></li> <li>• Molti batteri presenti nel terreno infatti possiedono un enzima chiamato <b>ureasi in grado di idrolizzare l'urea in ammoniaca e anidride carbonica, rendendo in questo modo l'azoto disponibile per le piante.</b></li> </ul>  |
|  <p><b>GESSO DI DEFECAZIONE</b><br/>(Gesso)</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Correttivo agricolo, risultante dalla reazione chimica (idrolisi basica, ed eventuale attacco enzimatico) di materiali biologici mediante calce e/o acido solforico, seguita da precipitazione del solfato di calcio e calce viva</b></li> <li>• La sua azione si esplica <b>migliorando lo caratteristiche chimico-fisiche dei terreni alcalini acidi e/o sabbiosi</b> quali, ad esempio, la reazione del terreno (pH), il contenuto di sostanza organica, la ritenzione idrica.</li> </ul> |
|  <p><b>REFLUO SUINO</b><br/>(Liquame)</p>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Reflui provenienti dagli allevamenti suini, costituiti dagli escrementi e dalle urine degli animali allevati diluiti nelle acque</b> impiegate per le pulizie dei locali di allevamento</li> <li>• A questi si aggiungono <b>residui di alimenti, peli, paglie, sostanze impiegate per la disinfezione e detergenti</b></li> </ul>   |
|  <p><b>COMPOST DA UMIDO</b></p>                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Risultato della bio-ossidazione e dell'umificazione di un misto di materie organiche da parte di macro e microrganismi</b> e condizioni particolari</li> <li>• <b>Presenza di ossigeno ed equilibrio tra gli elementi chimici</b> della materia coinvolta nella trasformazione</li> </ul>  |
|  <p><b>FANGO R10</b></p>                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Fanghi derivanti dal trattamento delle acque reflue che sono sottoposti alla disciplina dei rifiuti (R10)</b>, risultanti dal trattamento chimico con calce viva, in modo da ridurre in maniera rilevante il loro potere fermentescibile e gli inconvenienti sanitari della loro utilizzazione</li> <li>• <b>Ottimo materiale fertilizzante, ad effetto concimante</b></li> </ul>  |
|  <p><b>DIGESTATO ZOOTECNICO</b></p>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Residuo del processo di digestione anaerobica</b></li> <li>• <b>Ottimo materiale fertilizzante, ad effetto concimante</b></li> <li>• Proviene appunto dalla <b>digestione di effluenti zootecnici</b></li> </ul>   |
|  <p><b>DIGESTATO DA FANGHI</b><br/>(R10)</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Residuo del processo di digestione anaerobica</b></li> <li>• <b>Ottimo materiale fertilizzante, ad effetto concimante, derivante dalla co-digestione anaerobica termofila di fanghi (R10) ed altri rifiuti organici</b></li> </ul>   |

**Figura 1** - Tipologia e principali caratteristiche delle matrici fertilizzanti in esame.

Per garantire il raggiungimento di risultati affidabili e significativi, per lo studio della tossicità è stato adottato un approccio multi-specie utilizzando più organismi modello; al contempo per lo studio della distribuzione e della ripartizione dei contaminanti, è stato adottato un approccio multi-matrice.

# Descrizione dello studio

Le matrici fertilizzanti testate si riferiscono a quelle prodotte dalle aziende che partecipano come partner al progetto **Biomass Hub (Agromatrici srl del Gruppo F.lli Visconti e Acqua e Sole srl)** e a matrici fertilizzanti tradizionalmente utilizzate in agricoltura, come precedentemente indicato. La sperimentazione ha considerato due approcci ecotossicologici: **i.** test condotti sulle matrici tal quali e **ii.** test condotti su elutriati (fase liquida ottenuta dalla matrice solida attraverso la estrazione di particolato fine e sostanze solubili mediante lavaggio).

I suoli fertilizzati con tali matrici sono stati testati con riferimento a due differenti profondità, 0-30 cm e 30-60 cm. Le analisi ecotossicologiche sono state eseguite campionando il suolo a diversi intervalli di tempo, precedenti ed antecedenti alla fertilizzazione. Si precisa, inoltre, con riferimento alla matrice Digestato da fanghi R10, che i campionamenti sono stati eseguiti all'interno di una sperimentazione di pieno campo triennale condotta nell'ambito di due progetti EU-H2020 inerenti l'uso del digestato in sostituzione dei fertilizzanti chimici di sintesi, rappresentando, quindi, suoli che hanno ricevuto per tre anni consecutivi il digestato da fanghi.

I campioni di suolo sono prelevati come di seguito riportato:

- **t<sub>0</sub>**: prima della fertilizzazione;
- **t<sub>1</sub>**: subito dopo la fertilizzazione ;
- **t<sub>2</sub>**: a distanza di un mese dalla fertilizzazione ;
- **t<sub>3</sub>**: dopo il raccolto;
- **t<sub>4</sub>**: a distanza di un anno dall'ultima fertilizzazione

Allo stato attuale sono già stati campionati e caratterizzati i campioni di suolo prelevati al tempo  $t_0$ ,  $t_1$  e  $t_2$ , cui si riferisce il presente report.

I campionamenti sono stati effettuati dal Gruppo Ricicla - Disaa dell'Università degli Studi di Milano e recapitati presso i Laboratori di Igiene: Acque, Alimenti e Ambiente, del Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, dove sono stati successivamente analizzati utilizzando una batteria di saggi ecotossicologici con organismi test appartenenti a livelli trofici differenti (**Tabella 2** e **Figura 2**).



|                       | Indicatore                      | Test  | Metodica di riferimento |
|-----------------------|---------------------------------|---|-------------------------|
| Matrici Fertilizzanti | <i>Daphnia magna</i>            | Test di immobilità (acuto)                    | UNI EN ISO 6341:2013    |
|                       | <i>Raphidocelis subcapitata</i> | Inibizione della crescita algale              | ISO 8692:2012           |
|                       | <i>Alliivibrio fisheri</i>      | Test di inibizione e bioluminescenza          | ISO 11348-3:2007        |
|                       | <i>Lepidium sativum</i>         | Test di germinazione ed allungamento radicale | UNICHIM 1651:2003       |
|                       | <i>Sinapsis alba</i>            | Test di germinazione ed allungamento radicale | UNICHIM 1651:2003       |
|                       | <i>Sorghum saccharatum</i>      | Test di germinazione ed allungamento radicale | UNICHIM 1651:2003       |
|                       | <i>Caenorhabditis elegans</i>   | Valutazione della mortalità                   | ASTM E2172-01:2014      |
| Suoli trattati        | <i>Daphnia magna</i>            | Test di immobilità (acuto)                    | UNI EN ISO 6341:2013    |
|                       | <i>Raphidocelis subcapitata</i> | Inibizione della crescita algale              | ISO 8692:2012           |
|                       | <i>Alliivibrio fisheri</i>      | Test di inibizione e bioluminescenza          | ISO 11348-3:2007        |
|                       | <i>Lepidium sativum</i>         | Test di germinazione ed allungamento radicale | UNICHIM 1651:2003       |
|                       | <i>Sinapsis alba</i>            | Test di germinazione ed allungamento radicale | UNICHIM 1651:2003       |
|                       | <i>Sorghum saccharatum</i>      | Test di germinazione ed allungamento radicale | UNICHIM 1651:2003       |
|                       | <i>Caenorhabditis elegans</i>   | Valutazione della mortalità                   | ASTM E2172-01:2014      |

Tabella 2 - Bioindicatori, endpoints e metodi utilizzati per la sperimentazione.

| Bioindicatore   | Test  | Metodica di riferimento | Informazioni   |
|---|---|-------------------------|--|
|  <i>Aliivibrio fisheri</i>       | Test di inibizione e bioluminescenza          | ISO 11348-3:2007        | <b>INFO: BATTERIO GRAM NEGATIVO</b> di forma bastoncellare, si muove tramite l'uso di un singolo flagello polare.<br><b>HABITAT:</b> Ambienti marini.  |
|  <i>Raphidocelis subcapitata</i> | Inibizione della crescita algale              | ISO 8692:2012           | <b>INFO:</b> <i>Raphidocelis subcapitata</i> ( <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ) NIES-35 è un' <b>ALGA VERDE</b> precedentemente nota come " <i>Selenastrum capricornutum</i> NIVA-CHL1".<br><b>HABITAT:</b> Acque dolci. |
|  <i>Lepidium sativum</i>         | Test di germinazione ed allungamento radicale | UNICHIM 1651:2003       | <b>INFO: PIANTA ERBACEA</b> diffusa in Italia, generalmente usata per la determinazione della fitotossicità del compost.<br><b>HABITAT:</b> Pianta annuale a crescita rapida (cresce d'acqua) tipica di Asia e Africa del Nord.  |

| Bioindicatore   | Test  | Metodica di riferimento | Informazioni   |
|---|---|-------------------------|--|
|  <i>Sinapsis alba</i>            | Test di germinazione ed allungamento radicale | UNICHIM 1651:2003       | <b>INFO:</b> <i>Sinapsis alba</i> o <i>Brassica hirta</i> è una <b>PIANTA ERBACEA</b> appartenente alla famiglia delle Crucifere.<br><b>HABITAT:</b> Pianta erbacea annuale. Originaria di Africa e India.   |
|  <i>Sorghum saccharatum</i>      | Test di germinazione ed allungamento radicale | UNICHIM 1651:2003       | <b>INFO:</b> <b>PIANTA ERBACEA</b> anche detta <i>Sorghum vulgare</i> o <i>bicolor</i> , meglio conosciuto come miglio o mais di Guinea.<br><b>HABITAT:</b> Tipica di Africa, America, Asia. Pianta annuale.   |
|  <i>Daphnia magna</i>            | Test di immobilità (acuto)                    | UNI EN ISO 6341:2013    | <b>INFO:</b> <i>Daphnia magna</i> è di piccolo <b>CROSTACEO D'ACQUA DOLCE</b> classe Brachiopodi, ordine Cladoceri.<br><b>HABITAT:</b> Piccole pozze temporanee, grandi bacini idrici come nei laghi.  |
|  <i>Caenorhabditis elegans</i> | Valutazione della mortalità                   | ASTM E2172-01:2014      | <b>INFO:</b> <b>NEMATODE</b> (in gergo, <b>VERME CILINDRICO</b> ) molto usato per studi in vivo, in biomedicina e tossicologia: offre caratteristiche complementari a comuni modelli cellulari.<br><b>HABITAT:</b> Habitat naturale sconosciuto. Ritorvati in frutti in decomposizione o steli di piante |

**Figura 2** - Tipologia e principali caratteristiche dei bioindicatori utilizzati nella sperimentazione.

I risultati dei test al termine della sperimentazione pianificata (e dunque a seguito delle analisi condotte fino al t4, dopo un anno dall'ultimo trattamento) verranno ulteriormente elaborati utilizzando un indice ecotossicologico (Grenni, et al. 2018. A bioassay battery for the ecotoxicity assessment of soils conditioned with two different commercial foaming products. Ecotoxicol. Environ. Saf., 148, 1067-1077) al fine di ottenere una valutazione complessiva dell'effetto biologico legato alla frazione biodisponibile delle sostanze contaminanti che, a sua volta, dipende dalle sostanze chimiche presenti e dalle condizioni ambientali.



**APPROCCIO MULTI-SPECIE** (per lo studio della tossicità su più organismi modello) e **APPROCCIO MULTI-MATRICE** (per lo studio della distribuzione e della ripartizione dei contaminanti) **applicati per offrire le migliori garanzie di raggiungere risultati il più possibile affidabili e rappresentativi**

