

**Università degli studi di Udine
Università degli studi di Trieste**

**Corso di Laurea Magistrale in
Analisi e Gestione dell'Ambiente**

PROVA FINALE

**Utilizzo di nanoidrossiapatite in agricoltura.
Osservazioni sulla dinamica del fosforo nel
terreno e germinazione in specie modello**

Relatore
Prof. Guido Fellet

Laureando
Lorenzo Sinigaglia

Correlatori
Prof. Luca Marchiol
Dott.ssa Laura Pilotto

Anno Accademico 2022/2023

Indice

Riassunto	5
<i>Summary</i>	6
1. Introduzione.....	7
1.1 Nanotecnologia e nanoparticelle	7
1.2 La nanotecnologia nel settore primario	8
1.2.1 Le nanoparticelle di fosforo	10
1.2.2 Il ruolo di <i>Pseudomonas alloputida</i> nella biodisponibilità del fosforo	12
2. Scopo del lavoro	15
3. Materiali e metodi.....	17
3.1 Caratterizzazione della nanoidrossiapatite	17
3.2 Test di percolazione.....	20
3.2.1 Caratterizzazione chimico-fisica del terreno	20
3.2.2 Produzione degli inoculi di <i>Pseudomonas alloputida</i>	21
3.2.3 Test di solubilizzazione delle nHAP e di lisciviazione del P in colonne di terreno.....	21
3.2.4 Caratterizzazione dei percolati e del terreno a fine esperimento	25
3.3 Test di germinazione	26
3.4 Elaborazione dati	30
4. Risultati.....	31
4.1 Test di percolazione.....	31
4.1.1 P disciolto e P totale.....	31
4.1.2 P biodisponibile	35
4.2 Test di germinazione	37
4.2.1 Percentuale di germinazione	37
4.2.2 Lunghezza Radicale	39
5. Discussione.....	41
5.1 Test di percolazione.....	41
5.2 Test di germinazione	43
6. Conclusioni.....	45
Bibliografia e sitografia.....	47
Ringraziamenti	53

Riassunto

Le nanotecnologie hanno avuto uno sviluppo tumultuoso negli ultimi decenni. Le proprietà dei nanomateriali suggeriscono un potenziale interesse applicativo anche in agricoltura, principalmente nella nutrizione e difesa delle piante. Queste innovazioni scientifiche possono risolvere dei problemi agrari attuali e futuri. Uno di questi problemi è l'utilizzo di fosforo come fertilizzante. Il fosforo è uno dei principali macronutrienti necessari alle piante per vivere, in quanto utilizzato dalle piante per trasportare energia. In agricoltura vengono utilizzate notevoli quantità di fosforo come ammendante, per sopperire la grande quantità di fosforo che viene perso. Il fosforo possiede una buona solubilità e ciò lo porta a migrare nelle zone più profonde del suolo, durante i periodi piovosi o di irrigazione. Il continuo allontanarsi del fosforo dalla zona superficiale del terreno e, di conseguenza, dalle radici delle piante, porta alla necessità di continue fertilizzazioni nel breve periodo. Un secondo problema è legato al progressivo esaurimento delle riserve note di rocce fosfatiche utilizzate per la produzione di fertilizzanti. L'impiego di fertilizzanti alla scala nanometrica potrebbe migliorare l'efficienza della nutrizione fosfatica e potrebbe consentire di ridurre le perdite di fosforo. Inoltre, l'impiego di materiali di scarto o sottoprodotti del settore alimentare come fonte di fosforo potrebbe attenuare il problema del declino delle fonti minerali. L'idrossiapatite, presente in molti tessuti ossei animali, macinata e trattata correttamente, può fornire nanoparticelle ricche di fosforo che possono essere utilizzate come fertilizzanti a bassa solubilità e lento rilascio. L'utilizzo di microorganismi fosfolubilizzanti, come *Pseudomonas alloputida* K., in combinazione con idrossiapatite, aumenta il fosforo biodisponibile a discapito di un aumento minimo di solubilità e di perdite, non comparabili con i fertilizzanti tradizionali.

In conclusione, questo studio individua il rilascio di fosforo nel terreno di nanoidrossiapatite e lo compara con i fertilizzanti convenzionali, definisce la tossicità della nanoidrossiapatite su semi di interesse agrario e valuta l'utilizzo della nanotecnologia in ambito agrario come alternativa efficace, sicura e sostenibile in un'idea di Economia Circolare.

Parole chiave: “*nano-enabled*” *agricolture*, nanoidrossiapatite, fosforo, nanofertilizzanti, *Pseudomonas alloputida*, economia circolare.

Summary

Nanotechnologies have had a tumultuous development in recent decades. The properties of nanomaterials suggest a potential application interest in agriculture, especially in plant nutrition and defense. These scientific innovations may be able to solve current and future agricultural problems. One of these problems is the use of phosphorus as a fertilizer. Phosphorus is one of the main macronutrients needed by plants to live, as it is used by them to transport energy. In agriculture, considerable quantities of phosphorus are used as a soil improver, to make up for the large quantity of phosphorus that is lost. Phosphorus has good solubility, this leads its migration into the deeper areas of the soil, during rainy or irrigation periods. The continuous removal of phosphorus from the surface area of the soil and, consequently, from the roots of plants, leads to the constant need of fertilization in the short term. A second problem is linked to the progressive depletion of known reserves of phosphate rocks used to produce fertilizers. The use of fertilizers at the nanometric scale could improve the efficiency of phosphate nutrition and reduce phosphorus losses. Furthermore, the use of waste materials or by-products from the food sector as a source of phosphorus could mitigate the problem of the decline of mineral sources. Hydroxyapatite, a mineral present in many animal bone tissues, when grounded and treated properly, can provide phosphorus-rich nanoparticles that can be employed as low-solubility, slow-release fertilizers. The use of phosphosolubilizing microorganisms, such as *Pseudomonas alloputida* K., in combination with hydroxyapatite, increases bioavailable phosphorus at the expense of a minimal increase in solubility and losses, which is not comparable with traditional fertilizers.

In conclusion, this study identifies the release of phosphorus in nanohydroxyapatite soil and compares it with conventional fertilizers, defines the toxicity of nanohydroxyapatite on seeds of agricultural interest and evaluates the use of nanotechnology in the agricultural sector as an effective, safe and sustainable alternative in an idea of Circular Economy.

Keywords: “nano-enabled” agriculture, nanohydroxyapatite, phosphorus, nanofertilizers, *Pseudomonas alloputida*, circular economy.

1. Introduzione

1.1 Nanotecnologia e nanoparticelle

La nanotecnologia è quella branca della scienza e della tecnologia che studia e manipola la materia su scala dimensionale compresa fra 1 e 100 nanometri, individuando ed osservando gli aspetti chimici, fisici, meccanici e ottici che si manifestano a questa scala (Dutta & Das, 2021; National Nanotechnology Initiative). Questa disciplina negli ultimi anni ha trovato numerose applicazioni in molteplici ambiti: biomedico, tessile, alimentare, ambientale, ingegneristico ed energetico (Harinisri et al., 2023), ampliando, migliorando e rivoluzionando lo sviluppo in questi settori. Il concetto di nanotecnologia nasce dal discorso di Richard P. Feynman, Premio Nobel per la fisica nel 1965, “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” nel quale teorizzò la possibilità di manipolare la materia a livello di atomi e molecole (Feynman, 2018). Più tardi, nel 1974, lo scienziato giapponese Norio Taniguchi utilizzò per la prima volta il termine nanotecnologia definendola come il “processo di separazione, consolidamento e deformazione dei materiali di un atomo o di una molecola” (Taniguchi, 1974). Secondo la definizione ISO 80004-1:2023 (*International Standard Organization*) il termine nanotecnologia è “l’applicazione della conoscenza scientifica e il controllo della materia prevalentemente nella nanoscala (lunghezza approssimativamente da 1 nm a 100 nm) per utilizzare le proprietà e i fenomeni che sono influenzati dalla dimensione e dalla struttura della materia e che pertanto si distinguono da quelli associati ai singoli atomi o molecole”. L’ISO definisce anche il termine nanomateriali: “materiali con una dimensione esterna o una superficie di struttura interna a grandezza nanometrica”; inoltre pone la definizione di nanomateriali nella definizione generale di particella identificando intrinsecamente il termine nanoparticelle (ISO 80004-1:2023). Le nanoparticelle possiedono un alto rapporto superficie volume, il quale conferisce la capacità di una elevata interazione tra queste e l’ambiente in cui si trovano (Ranjan et al., 2016).

La sintesi di nanoparticelle può essere condotta attraverso due diverse modalità: “*top-down*” e “*bottom-up*” (Dutta & Das, 2021). Nella modalità *top down*, la produzione di nanoparticelle avviene tramite la riduzione a nanoscala dei materiali di partenza tramite processi di litografia, decomposizione termica, ablazione laser, incisione e fresatura meccanica (Abou El-Nour et al., 2010); nella seconda modalità (“*bottom-up*”) la formazione di nanoparticelle si origina da processi di riduzione di reagenti di partenza e da reazioni controllate per via enzimatica (Keat et al., 2015) tramite processi di pirolisi, riduzione chimica, processo “sol-gel” e sintesi *green* (Dutta & Das, 2021). La nanotecnologia negli ultimi decenni è entrata a far parte della tecnologia cosiddetta “*green*” (*Green Nanotechnology*) comprendente diversi settori, tra cui quello chimico, ingegneristico, ambientale e agricolo. Entro questi settori la nanotecnologia si propone di incentivare la transizione ecologica dei processi produttivi e lo

sviluppo di alternative di processo nel rispetto della circolarità e della Economia Verde (Harinisri et al., 2023).

1.2 La nanotecnologia nel settore primario

La popolazione mondiale, oggi di 8 miliardi di individui, è in costante crescita e l'Organizzazione Mondiale della Sanità stima possa raggiungere i 10 miliardi entro il 2050 (UN. World Population Prospects, 2011). Le nuove richieste necessitano di un aumento del 30% dei campi coltivati (Ranjan et al., 2016) e un aumento del 50-80% della produzione agricola (Lowry et al., 2019). Questa nuova situazione richiede, di conseguenza, anche un aumento di input produttivi (fertilizzanti, acqua ed energia) necessari per la produzione agraria (Lowry et al., 2019), ma al tempo stesso di una riduzione degli sprechi (Kah et al., 2019). Ciò mette in discussione la capacità della attuale produzione agricola, già ai suoi limiti, di soddisfare i bisogni primari della popolazione. È necessario, dunque, introdurre nuove tecnologie per assicurare una produzione di cibo in grado di far fronte alla crescente domanda. Le nanotecnologie sono un esempio in tal senso (Ranjan et al., 2016). L'agricoltura "*Nano-enabled*" assume i connotati di una soluzione emergente per risolvere questo immediato problema (Wu et al., 2022). Le nanotecnologie si inseriscono nel settore delle alternative ai prodotti chimici utilizzati per la produzione primaria: nanopesticidi e nanofertilizzanti (Guleria et al., 2022). I primi sono materiali "*nano-enabled*" capaci di controllare parassiti in agricoltura e grazie alla loro alto rapporto superficie-volume offrono molteplici benefici, come stabilità, durabilità, minor quantitativo di applicazione e maggiore efficienza a parità di dosaggio, se utilizzati in agricoltura (da Silva Pontes et al., 2023). I nanofertilizzanti, invece, sono vettori di nutrienti che possono essere incapsulati o rivestiti all'interno di strutture appunto nanometriche per consentire il rilascio controllato del nutriente nonché la sua successiva graduale diffusione nel terreno (Nongbet et al., 2022). I nanofertilizzanti se comparati con le loro controparti tradizionali, guadagnano un'efficienza relativa del 20-30% (Kah et al., 2019), riducendo notevolmente la richiesta di aggiunte al terreno nel lungo periodo fino a 80-140 kg·ha⁻¹ di fertilizzante convenzionale (Raliya et al., 2017), modificando anche i regimi idrici, le temperature del suolo e il movimento dei nutrienti nel suolo (Kah et al., 2019). I nanofertilizzanti molto spesso vengono classificati in base al materiale di cui sono fatti e, di conseguenza, in base agli elementi di cui sono composti. Tale classificazione non è esaustiva in quanto non prendono in considerazione altri aspetti. Ad esempio, in una classificazione più completa i nanofertilizzanti possono essere classificati in base alla loro azione o funzione, ai nutrienti che le compongono e in base alla loro consistenza o alle loro caratteristiche (Yadav et al., 2023). I nanofertilizzanti classificati sulla base del metodo di azione, vengono ulteriormente suddivisi in quattro sottogruppi:

- *controlled-release*: controllano il rilascio di nutrienti e di conseguenza migliorano l'assorbimento da parte delle piante (DeRosa et al., 2010);
- *targeted delivery* (nanoaptameri): individuano specifiche molecole o nutrienti nel suolo e le rendono disponibili agli enzimi nella rizosfera (Rameshaiah et al., 2015);
- *plant growing stimulating*: alcuni nanofertilizzanti, come i *carbon nanotubes*, stimolano la crescita delle piante interagendo con le radici e incrementando gli ormoni della crescita (Mondal et al., 2011);
- *water and nutrient loss controlling*: riescono a rilasciare nutrienti in modo controllato riducendo notevolmente la richiesta di acqua (Okey-Onyesolu et al., 2021) o creano uno strato idrofobo che diminuisce le perdite di acqua dal suolo per evaporazione (Sivarethinamohan & Sujatha, 2021).

I nanofertilizzanti classificati considerando i nutrienti di cui sono vettori possono essere ulteriormente suddivisi in quattro gruppi:

- *inorganici*: comprende una vasta gamma basata sui macronutrienti (N, P, K, Ca, Mg, S) e sui i micronutrienti (Bo, Cu, Fe, Ni, Ti, Zn) necessaria alla crescita delle piante (Yadav et al., 2023);
- *organici*: polimeri composti da N, P e K capaci di rilascio graduale nel suolo (Fatima et al., 2021);
- *ibridi*: studiati per un rilascio lento di micronutrienti (Tarafder et al., 2020);
- *nutrient loaded*: nanofertilizzanti caratterizzati da strutture capaci di adsorbire elevate quantità di nutrienti e acqua; un esempio sono le zeoliti nano-porose che possiedono una struttura a favo (*Honeycomb structure*) (Sharma et al., 2022).

Infine, i nanofertilizzanti classificati sulla base della loro consistenza sono distinti in:

- *surface coated*: comprende nanoparticelle a base di Si, Fe o altri elementi ricoperte da Au, Ag, TiO₂ o C, questi elementi facilitano l'aderenza delle nanoparticelle ai tessuti delle piante e il loro assorbimento nella cellula (Solanki et al., 2015);
- *syntetic polymer-coated*: possiedono un rivestimento in polimeri che proteggono le nanoparticelle dalla degradazione nell'ambiente (Tayagi et al., 2022);
- *biological product-coated*: comprende nanoparticelle ricoperte da componenti organici o da microorganismi che risultano in una fertilizzazione più efficiente della pianta (Liu & Lal, 2015; Kottegoda et al., 2011);
- *nanocarrier*: migliorano il trasporto e la consegna dei nutrienti dal suolo alla pianta, aumentando la biodisponibilità dei nutrienti, diminuendo le perdite e migliorando la crescita della pianta (Liu & Lal, 2015).

La conoscenza delle proprietà delle nanoparticelle impiegate come nanofertilizzanti è cruciale per comprendere quali possano essere gli effetti della loro applicazione sulle proprietà chimico-fisiche, biologiche del suolo e sull'effetto a livello di sistema suolo-pianta da cui dipende il loro utilizzo (Kalwani et al., 2022). Ad esempio, le nanoparticelle metalliche modificano il pH, la forza ionica e la sostanza organica del suolo; inoltre possono effettuare legami con altri elementi, come per esempio il fosforo, diminuendone la biodisponibilità (Dimkpa, 2018). Riduzioni del pH e diminuzione della sostanza organica e dei nutrienti possono comportare effetti nocivi per i microrganismi presenti nella rizosfera e a carico delle piante; inoltre, ci possono essere degli effetti positivi e negativi dipendentemente dalle interazioni con i microrganismi che compongono la rizosfera stessa (Kalwani et al., 2022). Le nanoparticelle, inoltre, possono avere degli effetti molto diversi rispetto ai fertilizzanti tradizionali sui semi: alterando le caratteristiche chimico-fisiche del suolo e della superficie del seme stesso, possono favorire la germinazione o indurre meccanismi di tossicità (Loneragan et al., 1979).

L'applicazione dei nanofertilizzanti può avvenire sia attraverso l'applicazione al suolo ma anche fogliarmene. Dal punto di vista fitosanitario, si è dimostrato che applicazioni di nano-Cu, nano-Si e nano-Zn hanno indotto un miglioramento generale della salute delle piante, permettendo una migliore gestione delle malattie (nano-Cu), dei batteri patogeni in particolare con applicazioni di nano-Zn e conferendo maggiore resistenza (nano-Si) (Elmer et al., 2023).

Le nanoparticelle trovano numerose applicazioni anche in contesti paralleli come quelli relativi alla bonifica del terreno; esse possono agire immobilizzando i contaminanti, attraverso processi redox, ma anche come promotori per il biorimediazione ossia per la attivazione di processi di bonifica da parte di microrganismi (Wu et al., 2023).

1.2.1 Le nanoparticelle di fosforo

Il fosforo (P), insieme ad azoto (N), potassio (K), calcio (Ca), magnesio (Mn) e zolfo (S), è uno dei macronutrienti necessari alla crescita e allo sviluppo delle piante (Pereira et al., 2015). Il P nelle piante è utilizzato per trasferire energia come ADP e ATP (adenosina di- e trifosfato), come componente dei nucleotidi e come elemento cardine per la fotosintesi e per la respirazione aerobica (Chadwick et al., 2023). Il P è utilizzato come fertilizzante in agricoltura in elevate quantità e si stima che l'80-90% del P utilizzato venga disperso nell'ambiente (Solanki et al., 2015). La maggior parte del P perso, si muove verso la falda o altri corpi idrici provocando, insieme all'azoto e al potassio, l'eutrofizzazione di laghi, fiumi e ruscelli (Rai et al., 2015). Una certa frazione forma legami con altri elementi come Ca-P, Mg-P, Al-P, Zn-P, Fe-P e permane nel suolo sottoforma di P non disponibile alle piante (Raliya et al. 2017).

Il P utilizzato in agricoltura deriva da rocce fosfatiche. Attualmente si stima che le riserve di queste rocce si esauriranno tra circa 300-400 anni (Van Kauwenbergh, 2010) e che i prodotti derivati finiscano in 400-800 anni, un periodo relativamente breve (Dawson & Hilton, 2011). Serve quindi identificare una fonte alternativa di P che sia sostenibile nel lungo-lunghissimo periodo. La soluzione a questo problema potrebbe essere l'impiego delle nanotecnologie, e nel caso specifico, per lo sviluppo di nanofertilizzanti di P. Come precedentemente descritto le nanoparticelle possiedono caratteristiche fisiche particolari e un approccio "top-down" nella sintesi di nanoparticelle di P potrebbe dimostrarsi un'ottima alternativa ai fertilizzanti tradizionali nel settore agrario (Paragrafo 1.1, 1.2). L'idrossiapatite è un minerale con formula chimica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ con un alto quantitativo di Ca e P (Chhowalla, 2017), e l'utilizzo in forma nanometrica (nHAP) potrebbe risolvere il problema sopracitato. Le nanoparticelle di idrossiapatite (nHAP) prodotte con un approccio "bottom-up" sono sintetizzate per precipitazione o da reazioni termiche di composti con alto contenuto di P e Ca (Wei et al., 2011); la temperatura di sintesi influenza notevolmente la cristallizzazione e la formazione di nanoparticelle: a basse temperature (<400°C) la cristallizzazione ha una resa e una purezza piuttosto ridotte; ad alte temperature (>700°C) la sintesi di idrossiapatite sembra essere ottimale, indipendentemente dal prodotto di origine e dai prodotti utilizzati per la sintesi; temperature maggiori di 1100°C sono necessarie per ottenere una cristallizzazione completa (Ferraz et al., 2004). L'approccio "top-down" vede l'utilizzo di rocce fosfatiche per la sintesi di nHAP; queste non sono le uniche fonti di nHAP. Molti scarti o rifiuti dell'industria alimentare: lische di pesce (Le Ho et al., 2022; Trung et al., 2022), ossa di animali (Dawson & Hilton, 2011) e gusci d'uovo (Chaudhuri et al., 2013) sono alcuni esempi di rifiuti costituiti da idrossiapatite che rappresentano delle interessanti fonti alternative. La nHAP è stata ampiamente studiata; uno studio di Ahmed et al. nel 2021 ha prodotto della HAP da ossa di pecora, pollo e maiale, operando un trattamento termico a diverse temperature (300°C, 500°C, 700°C e 900°C) per poi essere applicata come fertilizzante a delle piante di lattuga (*Lactuca sativa* L.). Questo studio ha evidenziato che temperature minori di 700°C portano alla produzione di idrossiapatite poco cristallizzata, ma con una solubilità del P maggiore rispetto a HAP sintetizzata a temperature maggiori (Ahmed et al., 2021). La nHAP è stata studiata anche in associazione alla molecola di urea (Urea-nHAP) come nanofertilizzante ad alto contenuto sia di P che di N. L'Urea-nHAP rilascia N e P dodici volte più lentamente rispetto all'urea convenzionale, diminuendo drasticamente la quantità di aggiunte al terreno nel lungo periodo (Chhowalla, 2017). La nHAP è stata anche studiata nel comportamento in suoli argillosi (Kottegoda et al., 2013a) e a contatto con elementi legnosi e di conseguenza con la cellulosa (Kottegoda et al., 2013b).

Fino a poco fa, la ricerca sulla nHAP era particolarmente focalizzata e limitata all'utilizzo di nanoparticelle in ambito medico, biomedico e chimico (Ferraz et

al., 2004, Cengiz et al., 2008, Loo et al., 2010). La ricerca in ambito agronomico e ambientale sulla nHAP è ancora in fase di evoluzione; sono stati svolti studi sull'utilizzo di nHAP su specie di interesse agronomico come la lattuga (Cruz-Hernández et al., 2023) e il pomodoro (Marchiol et al., 2019), ma sono necessari ulteriori studi sugli effetti della nHAP su altre specie di interesse agronomico.

1.2.2 Il ruolo di *Pseudomonas alloputida* nella biodisponibilità del fosforo

L'assorbimento di macro e micronutrienti da parte delle piante dipende dai fattori del suolo (pH, contenuto di materia organica, presenza di argilla, legami ionici), ma anche dall'attività delle piante, da processi di invecchiamento e dall'attività microbica (Rodrigues et al., 2023). Le nanotecnologie, negli ultimi anni, si sono estese allo studio dell'aumento della fertilità del suolo, ampliando le conoscenze sulle interazioni tra nanoparticelle e le comunità microbiche (Zhang et al., 2023). L'interazione delle nanoparticelle con la rizosfera è riconducibile a due principali processi: il bioaccumulo e la trasformazione delle nanoparticelle. Il primo comporta l'accumulo di elementi nella biosfera mentre il secondo riguarda la dispersione nell'ambiente di nutrienti assorbibili dalle piante (Dong et al., 2023). Nel caso specifico della nHAP, il limite principale alla sua applicazione come nanofertilizzante è la sua scarsa solubilità (Fox et al., 2012). Pertanto, sono necessari degli studi per individuare delle strategie per il miglioramento del rilascio di P nel suolo, e fra le varie potenziali vie per trovare una soluzione al problema emerge come promettente lo studio di microorganismi capaci di solubilizzare e rilasciare P inorganico ed organico nella rizosfera (De Zutter et al., 2022). Tra i microorganismi che possiedono queste caratteristiche troviamo: *Agrobacterium spp*, *Bacillus circulans* J. e, una delle specie più studiate, *Pseudomonas spp* (Babalola & Glick, 2012). Queste specie rilasciano acidi organici che acidificano la rizosfera e l'abbassamento del pH provoca un rilascio ioni P per sostituzione con ioni H⁺ e con Ca²⁺ (Goldstein, 1994).

Pseudomonas sp. è un genere complesso di batteri composto da più di 250 specie (Passarelli-Araujo et al., 2021). Questo è suddiviso ulteriormente in diversi lignaggi filogenetici tra cui *P. fluorescens* T. e *P. aeruginosa* C. che sono i gruppi più numerosi (Mulet et al., 2010). Il lignaggio di *P. fluorescens* è composto a sua volta da diversi gruppi; il secondo per dimensione e importanza è *P. putida* (Passarelli-Araujo et al., 2021). *P. putida* T. è un batterio rizosferico saprofitico che colonizza comunemente il suolo e le acque. Esso possiede un metabolismo versatile che lo rende una specie attrattiva per la sua resistenza in condizioni di siccità e stress. La sua capacità di prosperare in ambienti complessi lo rende una specie adeguata al biorisanamento, inoltre, non possiede determinanti patogenici, per cui può essere utilizzato in molteplici ambiti senza procurare danni alla salute umana (Volke et al., 2020). Negli ultimi anni l'industria genetica ha utilizzato *P. putida* come promotore biologico per la produzione di polimeri, prodotti chimici

sfusi, medicinali ed altri prodotti (Weimer et al., 2020). Le sue applicazioni continuano con il biorisanamento (de Lorenzo, 2008) e come promotore della crescita delle piante. *Pseudomonas putida*, infatti promuove la crescita radicale sintetizzando nella rizosfera acido indolacetico e fosfati (Matilla & Krell, 2018), aumentando l'abilità dei semi di ancorarsi al suolo, aumentando di conseguenza la loro probabilità di sopravvivenza (Patten & Glick, 2002). Il ceppo di *P. putida* maggiormente studiato è sicuramente il KT2440 (i.e mt-2 = DSM 6125 = ATCC 47054) (Keshavarz-Tohid et al., 2019), ceppo che colonizza il suolo rizosferico e gioca un importante ruolo nella sintesi catabolica di prodotti intermedi necessari alla crescita delle piante terrestri (Jiménez et al., 2002). Recentemente, Keshavarz-Tohid et al. (2019) hanno dimostrato che il ceppo di *P. putida* KT2440, possiede un corredo genetico diverso dalla specie principale di *P. putida* (ceppo NBRC 14164) e che quindi si dovesse classificare come una nuova specie, in seguito denominata *Pseudomonas alloputida* K. (Passarelli-Araujo et al., 2021; Keshavarz-Tohid et al., 2019). *Pseudomonas alloputida* fa parte del gruppo di batteri capaci di solubilizzare molecole contenenti P (Babalola & Glick, 2012). Questa specie rilascia nel suolo acido gluconico e acido 2-chetogluconico (Goldstein, 1995) nello spazio extracellulare che chela cationi divalenti (es. Ca^{2+}). Il meccanismo di solubilizzazione avviene per forme minerali fosfatice poco solubili, come idrossiapatite e fosfato tricalcico (Castagno et al., 2011); inoltre l'alta presenza di composti carboniosi come il glucosio, glicerolo o citrato nel suolo comporta un notevole aumento della disponibilità di P per l'assorbimento da parte delle piante (An & Moe, 2016). In conclusione, *P. alloputida* rappresenta un possibile tassello mancante per l'utilizzo di nanoparticelle di idrossiapatite come nanofertilizzante per specie di interesse agrario.

2. Scopo del lavoro

Il progetto di ricerca di durata biennale PRIN2022 Cleopatra (Figura 1), finanziato dal Ministero dell'Università (MUR), mira a sviluppare un fertilizzante fosfatico *smart* nella prospettiva della agricoltura nano-abilitata.



Figura 1: Logo del progetto PRIN 2022AAATEA Cleopatra.

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di condurre delle osservazioni su nanoparticelle di idrossiapatite sintetizzate a partire da ossa di pollo trattate termicamente a due diverse temperature (300°C e 700°C), per poi essere macinate a granulometria nanometrica ed essere impiegate come fonte di P per:

1. valutare tramite percolazione in colonna la permanenza nel terreno del fosforo apportato attraverso la somministrazione di due tipi di nHAP a confronto con un fertilizzante minerale fosfatico tradizionale (superfosfato triplo), in condizioni di sterilità e in presenza di batteri fosforo solubilizzanti (*Pseudomonas alloputida*);
2. stimare l'effetto delle nHAP sulla germinabilità dei semi e sulla lunghezza radicale di due specie di interesse agrario: *Hordeum vulgare* L. (orzo) e *Solanum lycopersicum* L. (pomodoro).

3. Materiali e metodi

Per il raggiungimento degli obiettivi di questo lavoro sono state allestite due prove sperimentali: un test di percolazione e un test di germinazione, precedute da una fase iniziale di sintesi delle nanoparticelle.

3.1 Caratterizzazione della nanoidrossiapatite

Le nanoparticelle utilizzate sono state sintetizzate utilizzando un procedimento proposto dall'Istituto di Nanotecnologia CNR-Nanotec di Lecce.

Nello studio sono state utilizzate due tipologie di nHAP, caratterizzate da due diverse temperature di sintesi. Le prime (nHAP₃₀₀, Figura 2) sono state sintetizzate ad una temperatura di 300°C e si presentano di colore nero, dovuto alla presenza di carbonio organico residuo; le seconde (nHAP₇₀₀, Figura 3) sono state sintetizzate ad una temperatura di 700°C e si presentano di colore bianco grazie alla completa ossidazione del carbonio organico a CO₂ durante il trattamento termico.

La produzione di nHAP₃₀₀ è iniziata con la pulizia delle ossa di pollo da residui di carne, grasso, tendini ed elementi cartilaginei. Le ossa ripulite sono state posizionate in crogioli per poi essere collocate in una muffola. La temperatura della muffola ha seguito una rampa di riscaldamento di 5°C al minuto fino al raggiungimento della temperatura di 300°C per poi essere mantenuta costante per 1 ora; dopodiché la muffola è stata spenta. Le ossa raffreddate sono state macinate, prima manualmente mediante l'utilizzo di un pestello e mortaio, poi finemente tramite l'utilizzo di un mulino a palle (Retsch MM2 Mixer Mill) ad una frequenza vibrazionale di 40 Hz e per 40 minuti in capsule di zirconio, (ZrO₂). Le nanoparticelle sono state infine trasferite in un contenitore.

La produzione delle nHAP₇₀₀ si è svolta secondo un procedimento simile a quello delle nHAP₃₀₀; in questo caso la rampa di riscaldamento di 5°C al minuto si è conclusa al raggiungimento di 700°C e la macinazione finale è stata effettuata ad una frequenza di 40 Hz per 10 minuti.

Le velocità e i tempi di macinazione del mulino a palle sono stati definiti sulla base di analisi di diversi campioni macinati a diversi tempi e velocità, spediti ed analizzati dal CNR-Nanotec.



Figura 2: Foto dei vari stadi di produzione delle nHAP₃₀₀. Da sinistra verso destra: ossa di pollo pulite, ossa dopo il trattamento termico a 300°C, nanoparticelle dopo la macinazione al mulino a palle (Foto di Laura Pilotto).



Figura 3: Foto dei vari stadi di produzione delle nHAP₇₀₀. Da sinistra verso destra: ossa di pollo pulite, ossa dopo il trattamento termico a 700°C, nanoparticelle dopo la macinazione al mulino a palle (Foto di Laura Pilotto).

In questa sede, la morfologia delle nanoparticelle è stata analizzata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) utilizzando uno strumento di Carl Zeiss Merlin, dotato di una colonna Gemini II e di una lente integrata ad alta efficienza per gli elettroni secondari (Figura 4). Le nHAP₃₀₀ si presentano in dimensioni comprese tra 50 e 250 nm, le nHAP₇₀₀ si presentano in dimensioni comprese tra 50 e 400 nm.

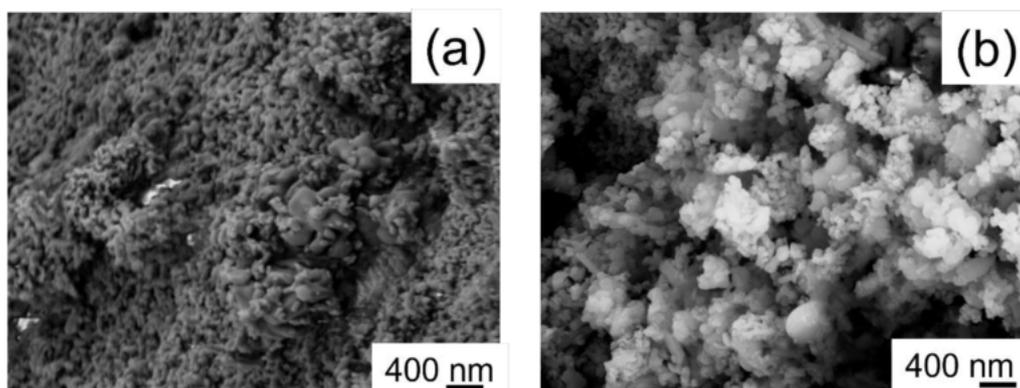


Figura 4: Immagini della microscopia elettronica a scansione (SEM) di nHAP₃₀₀ (a) e nHAP₇₀₀ (b) (Immagini di CNR-Nanotec).

I campioni sono stati metallizzati con un sottile film di oro prima dell'analisi. La composizione di fase delle nanopolveri è stata determinata mediante diffrazione di raggi X (XRD) con un diffrattometro X' Pert PRO MRD, dotato di un rivelatore veloce RTMS, utilizzando una radiazione $\text{CuK}\alpha$ (40 kV e 40 mA). I dati sono stati registrati nell'intervallo $20\text{-}60^\circ$ 2θ , con un passo-scan virtuale di 0.02° e un tempo virtuale per passo di 200 s.

Le nanoparticelle prodotte sono state analizzate all'ICP-OES presso i laboratori di Udine, per identificare il contenuto di P, necessario per il calcolo dei quantitativi di nanoparticelle necessarie alla prova, ma anche di altri elementi (Tabella 1). Le nHAP₃₀₀ presentano un contenuto di P di $88.3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, mentre le nHAP₇₀₀ presentano un contenuto di P pari a $194.3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Tabella 1: Concentrazioni elementi presenti nella nHAP

Concentrazione ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	nHAP ₃₀₀	nHAP ₇₀₀
Ca	173.262 ± 16.923	357.067 ± 5.162
Cu	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.000
Fe	0.122 ± 0.007	0.269 ± 0.003
K	5.898 ± 0.348	12.599 ± 0.049
Mg	3.909 ± 0.160	8.114 ± 0.071
Mn	0.004 ± 0.000	0.010 ± 0.000
Na	2.716 ± 0.190	6.929 ± 0.348
P	88.342 ± 3.260	194.339 ± 2.894
Zn	0.182 ± 0.006	0.355 ± 0.004

3.2 Test di percolazione

Il test di percolazione si compone di quattro fasi: caratterizzazione del terreno utilizzato nella prova, produzione di terreno inoculato di *P. alloputida*, test di solubilizzazione delle nHAP e di lisciviazione del P in colonne di terreno e, infine, l'analisi del P biodisponibile del terreno al termine della prova sperimentale.

3.2.1 Caratterizzazione chimico-fisica del terreno

La caratterizzazione chimico-fisica del terreno è stata eseguita attraverso: l'analisi granulometrica, l'identificazione del P totale e biodisponibile (P_{Olsen}), la misura del pH, la misura della conducibilità elettrica (CE) ed infine la determinazione della capacità di scambio cationico (CSC). La caratterizzazione è necessaria per identificare le caratteristiche del terreno utilizzato, le concentrazioni base degli elementi e il valore del pH utilizzate come base di comparazione e come valori di base nella fase di elaborazione dati. Sono stati utilizzati i seguenti metodi:

- Metodo Ufficiale n°II.5 (G.U. n°248/99) per l'analisi granulometrica (Tabella 2).
- Protocollo USEPA 3051A per l'analisi del P totale (P_{terreno} , Tabella 3).
- Metodo Olsen Ufficiale n°XV.3 (G.U. n°248/99) per l'analisi del P biodisponibile (P_{Olsen} , Tabella 3).
- Metodo Ufficiale n°III.1 (G.U. n°248/99) per la misura del pH (Tabella 3).
- Metodo Ufficiale n°IV.1 (G.U. n°248/99) per la misura della conducibilità elettrica (Tabella 3).
- Metodo Ufficiale n°XIII.2 (G.U. n°248/99) per la determinazione della capacità di scambio cationico (Tabella 3).

Tabella 2: Caratterizzazione granulometrica del terreno utilizzato per il test nelle sue componenti, argilla, limo e sabbia, espresse in percentuale.

Tessitura (%)	
Argilla	22
Limo	24
Sabbia	54

Tabella 3: Dati del pH, Conducibilità Elettrica, Capacità di Scambio Cationico, P_{terreno} e P_{olsen} del terreno utilizzato nel test.

Parametro	Valore
pH	7.6
Conducibilità elettrica (CE)	434.33±11.15 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$
Capacità di scambio cationico (CSC)	30.07±0.76 $\text{cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$
P_{terreno}	1033.79±27.23 ppm
P_{olsen}	44.72±0.04 ppm

3.2.2 Produzione degli inoculi di *Pseudomonas alloputida*

Nello studio è stato utilizzato del terreno inoculato con il microorganismo *Pseudomonas alloputida* DSM 6125.

Gli inoculi utilizzati nel test di percolazione sono stati prodotti grazie alla collaborazione con l'Università Libera di Bolzano.

Il ceppo batterico è stato coltivato in terreno Luria-Bertano (LB) sotto agitazione orbitale a 180 $\text{giri}\cdot\text{min}^{-1}$ per 48 ore. Successivamente, le cellule sono state raccolte tramite centrifugazione a 4500 xg per 10 minuti, lavate e risospese in una soluzione salina sterile (0.85% $\text{p}\cdot\text{v}^{-1}$ NaCl). La sospensione batterica è stata regolata ad una concentrazione standard di 10^8 $\text{cellule}\cdot\text{ml}^{-1}$ che è stata utilizzata come inoculante per l'esperimento. Il terreno inoculato è stato fatto asciugare all'aria sotto cappa a flusso laminare, per poi essere utilizzato nell'esperimento.

3.2.3 Test di solubilizzazione delle nHAP e di lisciviazione del P in colonne di terreno

Di seguito vengono descritti i disegni sperimentali nonché i protocolli di gestione dei test.

Il test si compone di due fattori: tipo di fertilizzante (FERT) e microorganismo (MO). Il fattore FERT comprende quattro livelli: controllo (Ctrl) (assenza di fertilizzante), Superfosfato Triplo (TSP), nanoparticelle prodotte a 300°C (nHAP₃₀₀) e nanoparticelle prodotte a 700°C (nHAP₇₀₀). Il fattore MO si compone di due livelli definiti dalla presenza (MO₊) o assenza (MO₋) dell'inoculo di *P. alloputida*. Per ogni combinazione sono state prodotte 4 repliche per un totale di 32 colonne.

Il test di solubilizzazione delle nHAP e di lisciviazione del P in colonne di terreno si compone di tre fasi: preparazione materiali, allestimento delle colonne e fase di adattamento.

I materiali utilizzati sono:

- terreno setacciato a 2 mm e sterilizzata in autoclave;

- terreno setacciato a 2 mm, sterilizzata in autoclave e inoculata con *P. alloputida* (Paragrafo 3.2.2);
- sabbia sterile;
- Superfosfato Triplo (TSP);
- nanoparticelle nHAP₃₀₀;
- nanoparticelle nHAP₇₀₀.

Nella fase di allestimento delle colonne senza inoculo sono state prese quattro colonne in PVC di lunghezza pari a 0.30 m e di diametro pari a 0.043 m per ogni livello del fattore FERT e sono stati posizionati in verticale su degli appositi sostegni. Nel fondo di ciascuna colonna è stato posizionato un pezzo di geotessuto Agricova 17 g·mq⁻¹ e al di sopra sono stati adagiati 80 g di sabbia sterile per favorire il drenaggio. In un contenitore a parte, sono stati pesati l'equivalente di 300 g di terreno secco, precedentemente mescolata ad un quantitativo in peso pari al 10% di sabbia per facilitare l'infiltrazione dell'acqua; ad esclusione delle colonne di controllo, prima dell'omogeneizzazione, sono stati aggiunti i trattamenti secondo il disegno sperimentale previsto: 0.99623 g di Superfosfato Triplo, 2.26394 g di nHAP₃₀₀ e 1.02913 g di nHAP₇₀₀, in modo tale da apportare un quantitativo di P elementare pari a 0.200g in ogni colonna; la miscela è stata omogeneizzata per 1 minuto e collocata al di sopra dello strato drenante. Sono stati aggiunti 40 g di sabbia sterile, le colonne sono state coperte da parafilm bucherellato, ed infine disposte nelle loro strutture di sostegno con un imbuto e una provetta in polipropilene (PP) da 50 ml per la raccolta dei percolati (Figura 5).

L'intera operazione è stata ripetuta per le restanti colonne (16), ma in questo caso è stato utilizzato il terreno inoculato con *P. alloputida*, rispettando le stesse quantità delle colonne precedenti (Figura 6).



Figura 5: Colonne MO. a inizio esperimento.



Figura 6: Colonne MO₊ a inizio esperimento.

Una settimana dopo la fase di allestimento sono stati versati 100 ml di acqua MilliQ (bidistillata) in ogni colonna per portare il terreno alla capacità di campo; il percolato è stato raccolto in provette da 50 ml e dopo 24 ore, queste sono state prelevate ed è stato registrato il volume. Le provette sono state sostituite con delle nuove. La fase di adacquamento è proseguita a regime per ulteriori sei settimane, per una durata complessiva di sette settimane. Ad inizio di ciascuna settimana, alle colonne venivano somministrati 50 ml di MilliQ ed il giorno successivo i percolati venivano prelevati per essere analizzati (Paragrafo 3.2.4).

Il test di percolazione si è concluso dopo una settimana dall'ultimo adacquamento. Ogni colonna è stata svuotata, è stata eliminata la sabbia agli estremi di ogni colonna e il terreno di ogni colonna è stato omogeneizzato (Figura 7) per poi essere steso in contenitori sterili a seccare all'aria, operazione necessaria per l'analisi del P biodisponibile (P_{Olsen}). Una volta asciutto, il terreno è stato macinato e posto in sacchetti etichettati (Figura 8).



Figura 7: Recupero del terreno della prima colonna Ctrl:MO₋, con eliminazione della sabbia di drenaggio.



Figura 8: Macinazione tramite pestello e mortaio del terreno essiccato all'aria della seconda replica di TSP:MO₊.

3.2.4 Caratterizzazione dei percolati e del terreno a fine esperimento

I percolati sono stati caratterizzati quantificando il P disciolto (P_{dis}) ed il P totale (P_{tot}).

Il procedimento per la quantificazione del P_{dis} è stato condotto seguendo il seguente protocollo: sono stati prelevati 15 ml di percolato con una siringa e successivamente la soluzione è stata filtrata con filtri PTFE a $0.45 \mu m$ e trasferita in provette da 15 ml; questa operazione è stata ripetuta per tutti i campioni. I percolati filtrati sono stati analizzati utilizzando lo strumento ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma – Optical Emmission Spectroscopy*, Agilent 5800, Figura 9). Il P identificato all'ICP-OES è il P corrispondente alla lunghezza d'onda 213.618 nm.



Figura 9: ICP-OES con autocampionatore utilizzato per le analisi.

L'analisi del P_{tot} sui percolati è stata condotta utilizzando il protocollo USEPA 3015A; sono stati utilizzati un mineralizzatore a microonde (*Milestone Ethos Easy*, Figura 10) e acido nitrico (HNO_3) al 69% per la mineralizzazione dei campioni acquosi, dopodiché, i campioni sono stati filtrati e analizzati all'ICP-OES (P 213.618 nm).



Figura 10: Mineralizzatore a microonde utilizzato per la mineralizzazione dei campioni.

Al termine dell'esperimento il terreno presente in ogni colonna è stato sottoposto ad un'analisi del P biodisponibile (P_{Olsen}).

L'analisi del P_{Olsen} è stata condotta utilizzando il metodo Olsen Ufficiale n°XV.3 (G.U. n°248/99) e i campioni sono stati analizzati all'ICP-OES (P 213.618 nm).

3.3 Test di germinazione

La seconda parte della tesi ha avuto per obiettivo lo studio dell'effetto delle nHAP sulla germinabilità dei semi di due specie di interesse agrario: l'orzo (*Hordeum vulgare* L. varietà Marjorie) e il pomodoro (*Solanum lycopersicum* L. varietà ISI 31060/SCOOTER-F1). Le nHAP, quindi, sono state prima studiate nel terreno, per poi essere studiate nel sistema pianta, nelle sue primissime fasi di sviluppo (la germinazione). La quantità di nanoparticelle che interagisce in diverso modo con il seme potrebbe favorire la germinazione o indurre meccanismi di tossicità, oltre ad avere una possibile influenza sulle caratteristiche chimico-fisiche dell'ambiente che circonda il seme stesso. In questo studio sono state considerate diverse dosi (0, 10, 100, 1000, 10000 ppm) di nanoparticelle di idrossiapatite nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀. Per ogni specie agraria e tipologia di nanoparticelle sono stati selezionati 100 semi per trattamento, suddivisi in 5 repliche (20 semi per piastra Petri) per un totale di 2000 semi totali.

I parametri rilevati sono: numero di semi germinati per piastra, lunghezza radicale e percentuale di germinazione.

In questo esperimento è stato utilizzato il protocollo EPA OPPTS 850.4200 modificato (Ecological Effects Test Guidelines: OPPTS 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity, 1996).

I semi sono stati immersi in acqua MilliQ, i semi galleggianti sono stati scartati, mentre il resto è stato lasciato asciugare per 12 ore. È stata preparata una sospensione madre a 100000 ppm, sospendendo 5 g di nanoparticelle in acqua MilliQ in un matraccio da 50 ml successivamente sonicata per 30 minuti. Dalla sospensione madre sono state preparate le diverse sospensioni per diluizioni successive:

- 10000 ppm: dalla sospensione madre sono stati prelevati 10 ml e trasferiti in un matraccio da 100 ml portando a volume con MilliQ;
- 1000 ppm: dalla sospensione a 10000 ppm sono stati prelevati 10 ml e trasferiti in un matraccio da 100 ml portando a volume con MilliQ;
- 100 ppm: dalla sospensione a 1000 ppm sono stati prelevati 10 ml e trasferiti in un matraccio da 100 ml portando a volume con MilliQ;
- 10 ppm: dalla sospensione a 100 ppm sono stati prelevati 10 ml e trasferiti in un matraccio da 100 ml portando a volume con MilliQ;

Le diluizioni sono state sonicate per 30 minuti. Sono stati trasferiti 40 ml di sospensione in matracci conici di Erlenmeyer da 50 ml per poi aggiungervi 100 semi a provetta (Figura 11 e Figura 12). Inoltre, è stata preparata una provetta di controllo con soli 40 ml di MilliQ. Le provette sono state posizionate in un oscillatore meccanico e lasciate in agitazione per 8 ore per permettere l'imbibizione dei semi prima della fase successiva (Ortega-Ortiz et al., 2022).

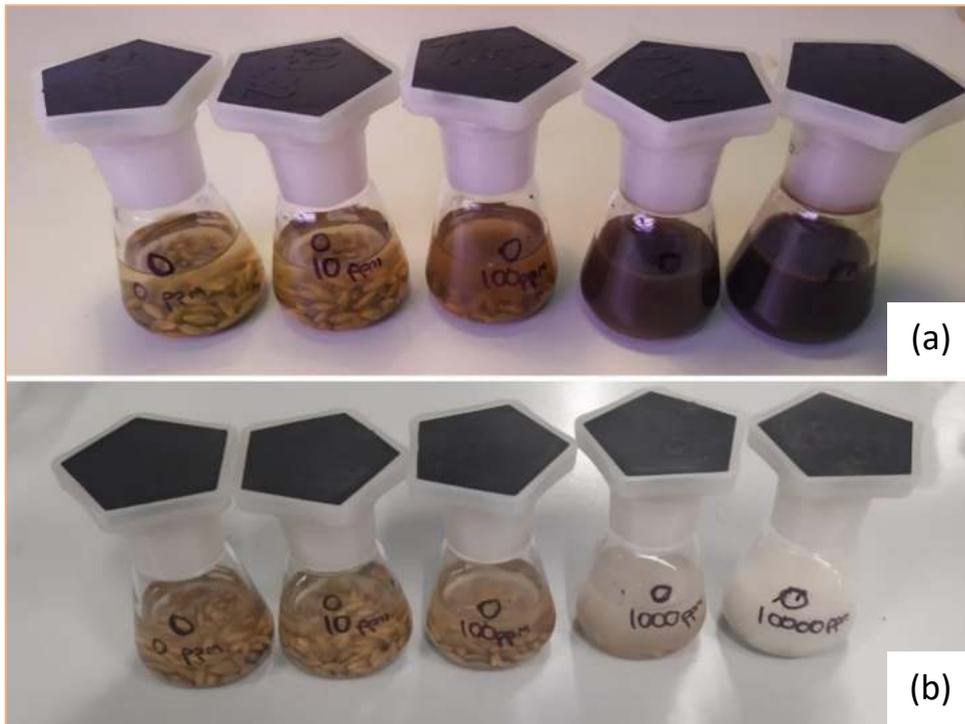


Figura 11: Semi di Orzo in sospensioni di nHAP₃₀₀ (a) e di nHAP₇₀₀ (b) (Foto di Laura Pilotto).



Figura 12: Semi di pomodoro in sospensioni di nHAP₃₀₀ (a) e di nHAP₇₀₀ (b) (Foto di Laura Pilotto).

Conclusa l'agitazione delle provette, i semi sono stati disposti su carta filtro imbibita con 5 ml di MilliQ in piastre Petri, per un totale di 20 semi per piastra. I semi sono stati incubati al buio in camera di crescita a 25°C fino a germinazione. Durante il periodo di incubazione è stata aggiunta dell'acqua MilliQ per mantenere costante il peso. Un seme si considera germinato quando presenta una radichetta a quattro giorni dall'inizio del periodo di incubazione. Al termine della germinazione i semi sono stati prelevati e disposti su cartoncino di colore nero accanto ad un righello, posto per la scala, e sono state scattate delle foto per l'elaborazione dati al computer (Figura 13 e Figura 14).



Figura 13: Due esempi delle foto utilizzate per l'elaborazione al software ImageJ dei semi germinati di Orzo. A sinistra sono fotografati i semi trattati con nHAP₃₀₀ a concentrazione di 1000 ppm, a destra sono raffigurati i semi trattati con nHAP₇₀₀ a concentrazione di 10 ppm.

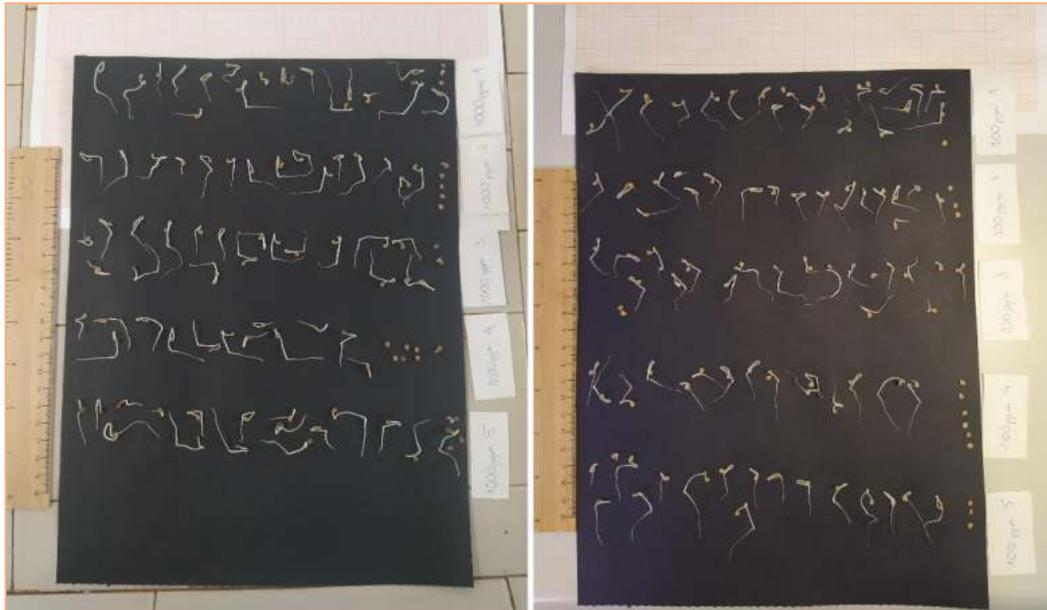


Figura 14: Due esempi delle foto utilizzate per l'elaborazione al software ImageJ dei semi germinati di Pomodoro. A sinistra sono fotografati i semi trattati con nHAP₃₀₀ a concentrazione di 1000 ppm, a destra sono raffigurati i semi trattati con nHAP₇₀₀ a concentrazione di 100 ppm.

3.4 Elaborazione dati

I dati del test di percolazione sono stati importati nell'applicazione "RStudio", un ambiente di sviluppo integrato per R, un linguaggio di programmazione per il calcolo statistico e la grafica, ed elaborati. Sono state eseguite delle analisi della varianza (ANOVA) a due vie sui fattori FERT e MO per identificare le differenze sui dati dei diversi trattamenti. Inoltre, tramite la comparazione multipla di Tuckey è stata valutata la significatività del test appena effettuato.

Le foto scattate al termine del test di germinazione sono state prima importate sull'applicazione "ImageJ" nella quale sono state identificate le lunghezze radicali e per ogni seme; nel caso del pomodoro era presente una singola radichetta da misurare, nell'orzo sono state misurate tutte le radici ed è stata calcolata media delle radici con maggior lunghezza. Le misure sono state riportate in una tabella Excel. Su Excel sono stati identificati il numero di semi germinati e la percentuale di germinazione. I dati di lunghezza radicale sono stati importati su "Rstudio" e sono state effettuati un test ANOVA a due vie, un test di Tuckey per individuare le differenze tra trattamento e la loro significatività e un t-test del fattore MO.

4. Risultati

4.1 Test di percolazione

4.1.1 P disciolto e P totale

In Figura 15 sono illustrate le perdite cumulative di P disciolto (P_{dis}) calcolate dai dati ottenuti dalle analisi all'ICP-OES nel corso del test. I dati sono espressi in mg. Le significatività tra trattamenti (FERT e MO) è riportata nel testo.

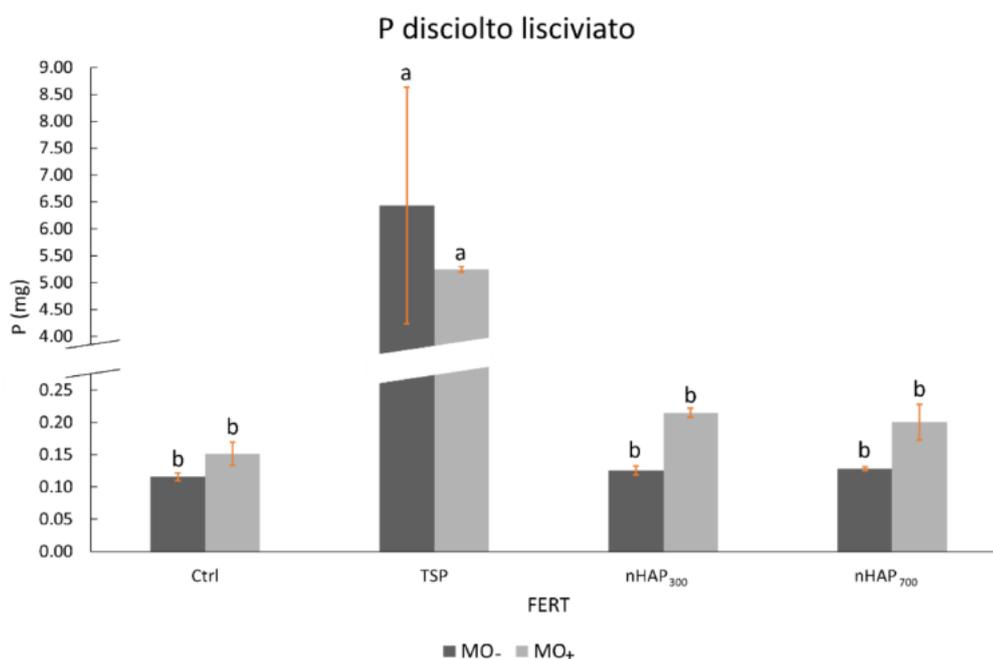


Figura 15: Perdite cumulative di P_{dis} (in mg), in riferimento al fattore FERT e al fattore MO sul terreno a fine prova. Trattamenti con la stessa lettera non sono significativamente differenti.

I dati del P_{dis} individuano quantitativi di P nella soluzione percolata relativamente bassi nelle soluzioni dei livelli Ctrl, nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀ sia in presenza, che in assenza del microrganismo rispetto a TSP. Nei campioni MO-, il dato medio più basso si ha nel controllo (0.1159 mg) con valori medi leggermente superiori per i trattamenti nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀ (0.1257 e 0.1286 mg). La quantità media di P disciolto dalle colonne sottoposte al livello TSP (6.4353 mg) è circa 50-55 volte superiore rispetto agli altri livelli. Nei campioni MO+ il dato medio più basso è dato dal livello Ctrl (0.1515 mg), seguito da nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀ (0.2148 e 0.2003 mg). La quantità media di P disciolto dalle colonne sottoposte al livello TSP (5.2422 mg) è circa 24-34 volte superiore rispetto agli altri livelli. I dati ANOVA hanno individuato una significatività alta nel fattore FERT (p-value < 0.001, ***), nessuna significatività nel fattore MO (p-value = 0.460) e nessuna significatività nella combinazione dei due fattori (p-value = 0.386).

È stato effettuato un t-test per la comparazione del fattore MO (MO.:MO+) per ogni livello del fattore FERT; Ctrl (p-value = 0.063) e TSP (p-value = 0.357) non hanno individuato differenze significative; nHAP₇₀₀ (p-value = 0.013, *) ha individuato una bassa significatività; infine, nHAP₃₀₀ (p-value < 0.001, ***) ha individuato una alta significatività.

È stata effettuata un'ANOVA considerando solo i dati di Ctrl, nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀, togliendo i dati del TSP per individuare eventuali differenze tra controllo e nanoparticelle (Figura 16).

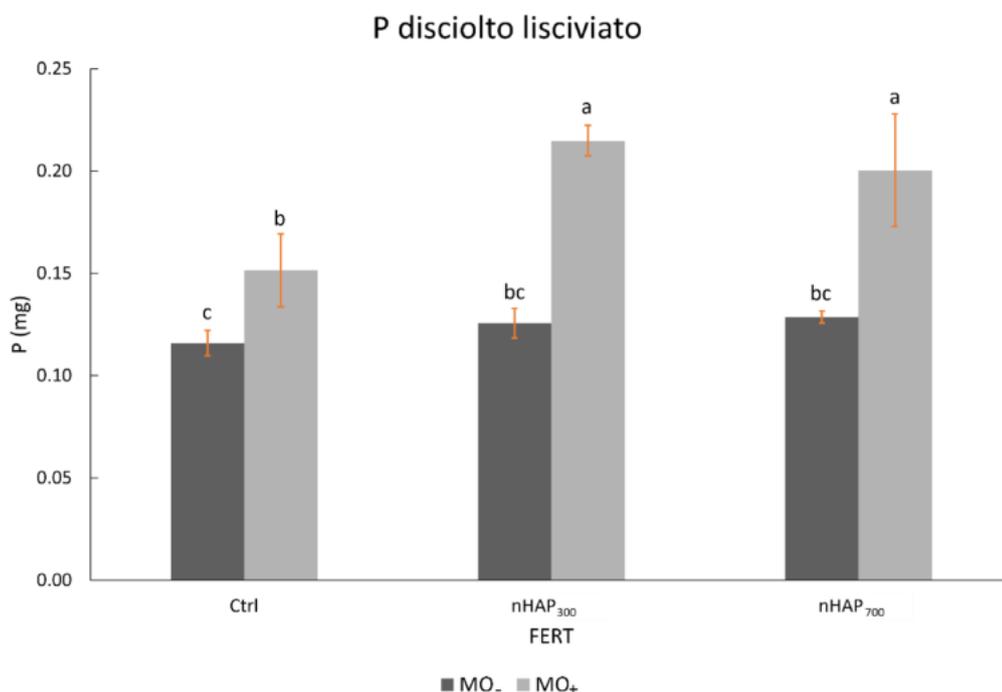


Figura 16: Perdite cumulative di P_{dis} (in mg), in riferimento al fattore FERT e al fattore MO di Ctrl, nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀. Trattamenti con la stessa lettera non sono significativamente differenti.

L'ANOVA dei dati di Ctrl, nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀ del P_{dis} ha evidenziato una significatività alta sia per il fattore FERT che per il fattore MO (p-value < 0.001, ***) e una media significatività per il fattore combinato FERT:MO (p-value = 0.007, **).

In Figura 17 sono illustrate le perdite cumulative di P totale (P_{tot}) dei dati ottenuti dalle analisi all'ICP-OES nel corso del test. I dati del P ottenuti sono espressi in mg. Le significatività tra trattamenti (FERT e MO) è descritta nel testo.

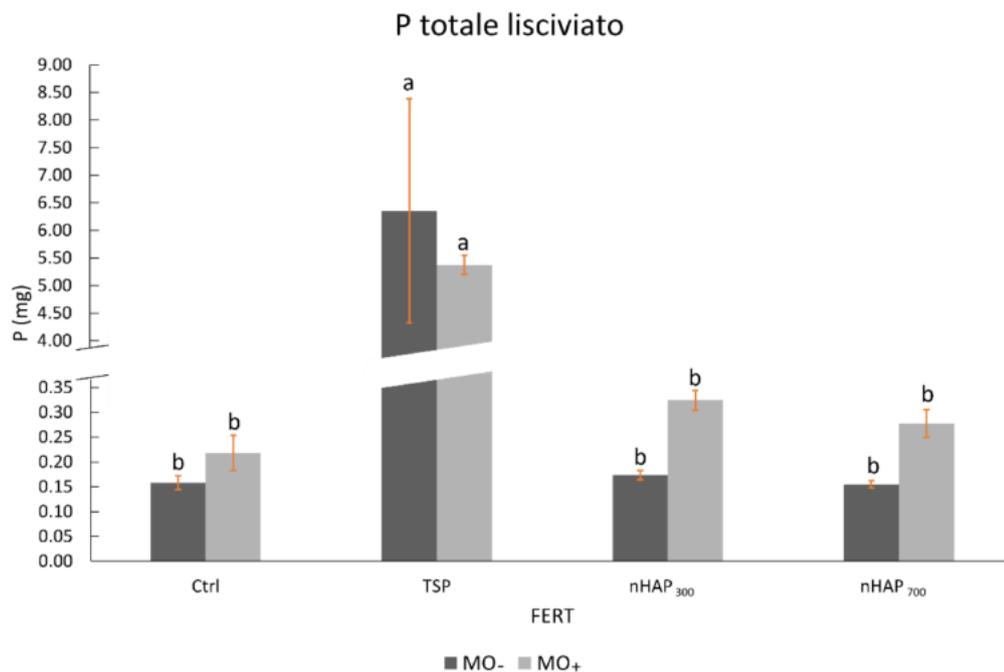


Figura 17: Perdite cumulative di P_{tot} (in mg), in riferimento al fattore FERT e al fattore MO. Trattamenti con la stessa lettera non sono significativamente differenti.

I dati del P_{tot} individuano quantitativi di P nella soluzione percolata relativamente bassi nelle soluzioni dei livelli Ctrl, nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀ sia in presenza, che in assenza del microrganismo rispetto a TSP. Nei campioni MO-, il valore più basso è dato dai campioni nHAP₇₀₀ (0.1554 mg) seguiti da Ctrl e nHAP₃₀₀ (0.1578 e 0.1736 mg).

La quantità media di P disciolto dalle colonne sottoposte al livello TSP (6.3532 mg) è circa 36-41 volte superiore rispetto agli altri livelli. Nei campioni MO+ il dato medio più basso è dato dal livello Ctrl (0.2186 mg), seguito da nHAP₇₀₀ e nHAP₃₀₀ (0.2779 e 0.3242 mg). La quantità media di P disciolto dalle colonne sottoposte al livello TSP (5.3708 mg) è circa 16-25 volte superiore rispetto agli altri livelli. L'elaborazione ANOVA ha registrato una significatività alta nel fattore FERT (p-value < 0.001, ***), nessuna significatività nel fattore MO (p-value = 0.624) e nessuna significatività nella combinazione dei due fattori (p-value = 0.416). È stato effettuato un t-test per la comparazione del fattore MO (MO-:MO+) per ogni livello del fattore FERT; per il livello TSP (p-value = 0.034, *) sono state individuate differenze significative, mentre per il Ctrl (p-value = 0.357) si è registrata una bassa significatività. Per nHAP₇₀₀ (p-value = 0.002, **) la significatività si è attestata ad un livello medio; infine, per nHAP₃₀₀ (p-value < 0.001, ***) ha presentato una alta significatività.

Anche per P_{tot} è stata effettuata un'ANOVA considerando solo i dati di Ctrl, nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀, togliendo i dati del TSP (Figura 18).

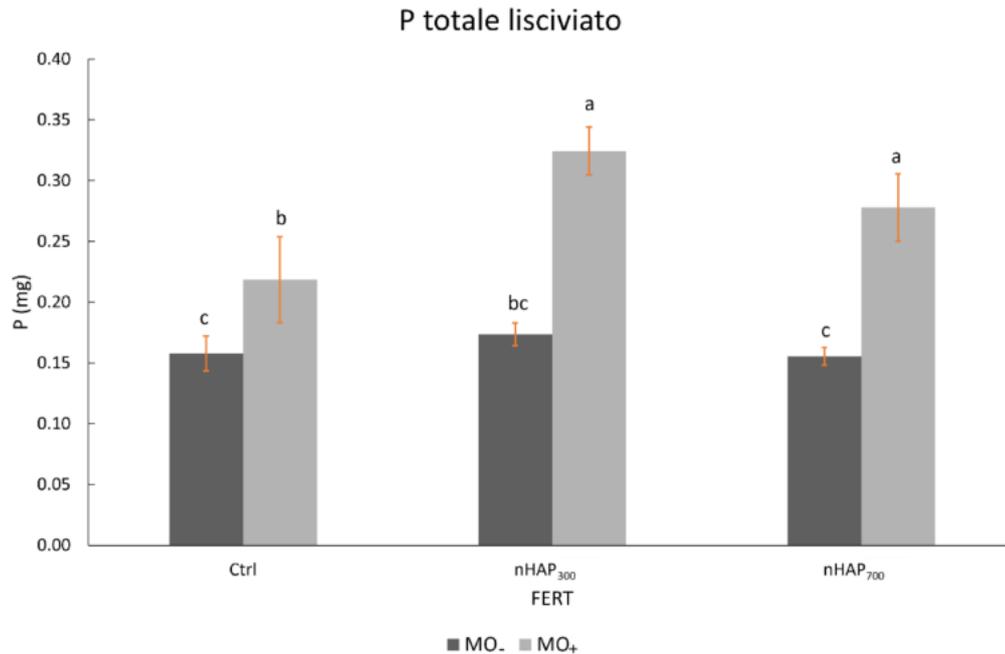


Figura 18: Perdite cumulative di P_{tot} (in mg), in riferimento al fattore FERT e al fattore MO di Ctrl, nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀. Trattamenti con la stessa lettera non sono significativamente differenti.

L'ANOVA dei dati di Ctrl, nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀ del P_{tot} ha evidenziato una significatività alta sia per il fattore FERT che per il fattore MO (p-value < 0.001, ***) e una media significatività per il fattore combinato FERT:MO (p-value = 0.002, **).

I dati del P_{dis} e P_{tot} risultano molto simili. Entrambi presentano i valori più bassi nei campioni legati dal fattore MO. nei livelli nHAP₃₀₀ o nHAP₇₀₀, con un leggero aumento per i rispettivi campioni in presenza del fattore MO+. È particolare l'iterazione del microrganismo nel caso dei campioni TSP, nei quali è evidente una diminuzione del P nelle soluzioni analizzate.

Questa prima analisi del test di percolazione evidenzia come il TSP sia il livello di FERT con maggior rilascio di P nel percolato rispetto agli altri. Le nanoparticelle di P, invece, grazie alle loro caratteristiche chimiche e fisiche, sono meno mobili nella colonna di terreno.

L'ANOVA che considera solo i livelli di controllo e nanoparticelle sia in P_{dis} sia in P_{tot} definisce delle differenze non individuabili con l'inserimento del livello TSP nell'analisi.

4.1.2 P biodisponibile

In Figura 19 sono illustrate le concentrazioni di P_{Olsen} dei dati ottenuti dalle analisi all'ICP-OES alla fine del test. I dati del P ottenuti sono in ppm. Le significatività tra trattamenti (FERT e MO) è descritta nel testo.

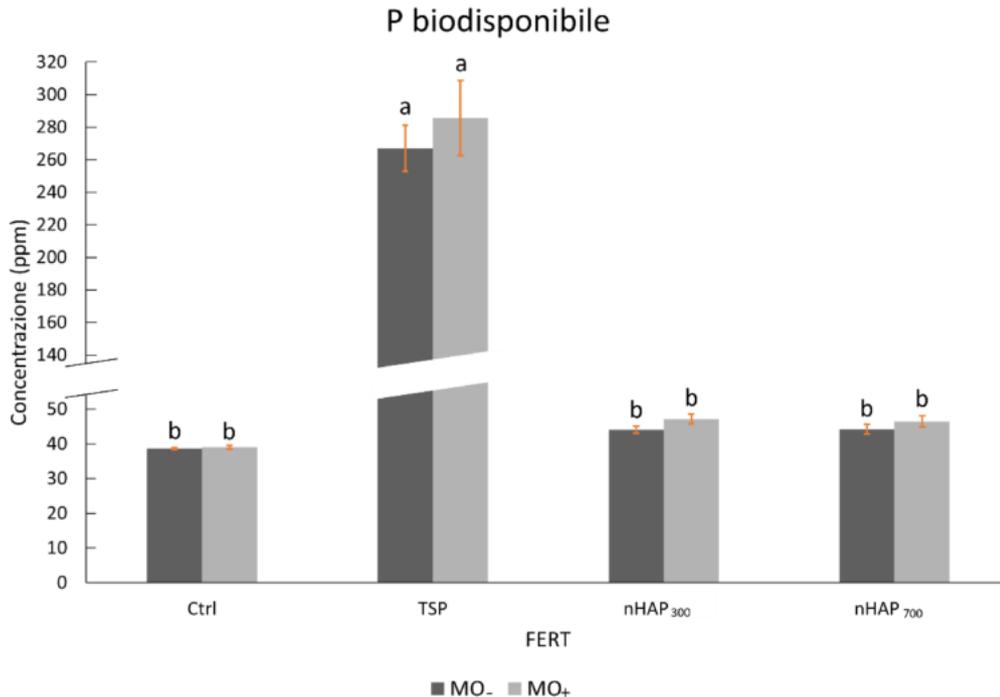


Figura 19: Concentrazione di P_{Olsen} (in ppm), in riferimento al fattore FERT e al fattore MO. Trattamenti con la stessa lettera non sono significativamente differenti.

I dati del P_{dis} individuano quantitativi di P nella soluzione percolata relativamente bassi nelle soluzioni dei livelli Ctrl, nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀ sia in presenza, che in assenza del microrganismo rispetto a TSP. Nei campioni MO-, il dato medio più basso si ha nel Ctrl (38.6707 ppm,) con valori medi leggermente superiori per i trattamenti nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀ (44.0363 e 44.2385 ppm). La concentrazione media di P biodisponibile dalle colonne TSP (266.9538 ppm) è circa 6-7 volte superiore rispetto agli altri livelli. Nei campioni MO+ il dato medio più basso è dato dal livello Ctrl (39.0807 ppm), seguito da nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀ (47.1640 e 46.4908 ppm). La quantità media di P disciolto dalle colonne sottoposte al livello TSP (285.6505 ppm) è circa 6-7 volte superiore rispetto agli altri livelli. I dati ANOVA hanno individuato una significatività alta del fattore FERT (p-value < 0.001, ***), nessuna significatività del fattore MO (p-value = 0.069) e nessuna significatività della combinazione dei due fattori (p-value = 0.205). È stato effettuato un t-test per la comparazione del fattore MO (MO-:MO+) per ogni

livello del fattore FERT: l'unica significatività riscontrata è per il livello nHAP₃₀₀ (p-value = 0.013, *), mentre per gli altri livelli le differenze non sono risultate significative considerati i p-value risultanti: Ctrl (0.323), TSP (0.193) e nHAP₇₀₀ (0.077).

Anche per questo parametro è stata effettuata un'ANOVA considerando solo i dati di Ctrl, nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀, togliendo i dati del TSP (Figura 20).

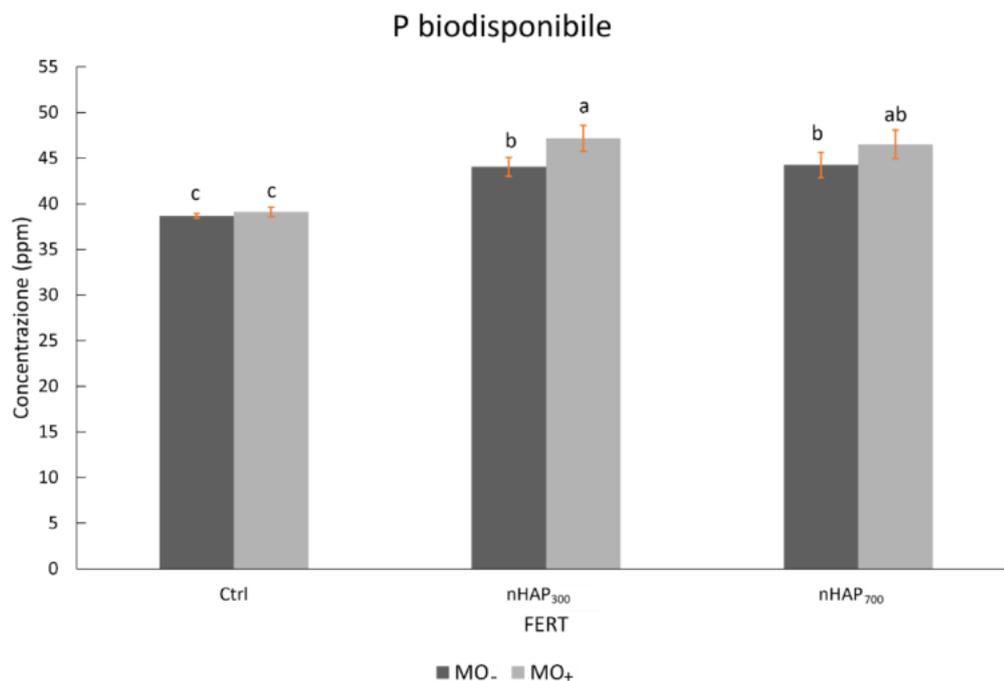


Figura 20: Concentrazione di P_{Olsen} (in ppm), in riferimento al fattore FERT e al fattore MO di Ctrl, nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀. Trattamenti con la stessa lettera non sono significativamente differenti.

L'ANOVA dei dati di Ctrl, nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀ del P_{Olsen} ha riportato una significatività alta sia per il fattore FERT (p-value < 0.001, ***) che per il fattore MO (p-value = 0.001, ***) e nessuna significatività per il fattore combinato FERT:MO (p-value = 0.141). Questa analisi che considera solo i livelli di controllo e nanoparticelle definisce delle differenze non individuabili con l'inserimento del livello TSP.

4.2 Test di germinazione

4.2.1 Percentuale di germinazione

In Figura 21 e Figura 22 sono riportati i risultati sulla percentuale di germinazione dei semi di orzo e pomodoro, trattati con nanoparticelle nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀, a diverse concentrazioni.

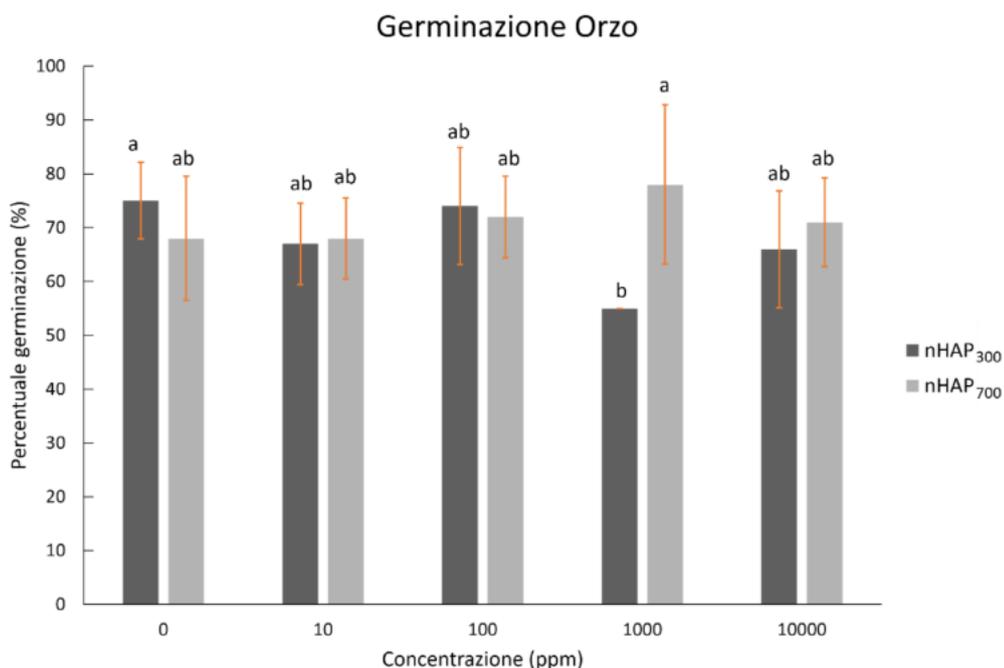


Figura 21: Percentuale di germinazione dell'orzo per concentrazione e tipologia di nanoparticelle. Trattamenti con la stessa lettera non sono significativamente differenti.

La germinazione media dell'orzo si attesta tra il 55 e 75% per semi trattati con nHAP₃₀₀ e tra il 68 e 78% per semi trattati con nHAP₇₀₀. L'analisi statistica non individua differenze significative dei dati della germinazione sia per la concentrazione di nanoparticelle (p-value = 0.693), sia per la tipologia di nanoparticelle (p-value = 0.185), sia per la combinazione di entrambi (p-value = 0.628).

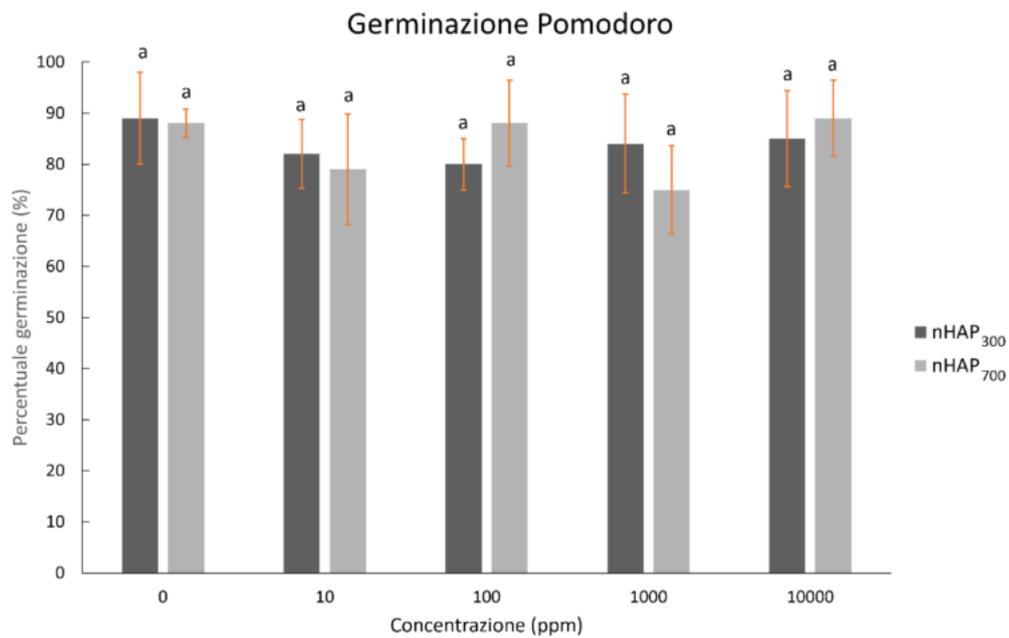


Figura 22: Percentuale di germinazione del pomodoro per concentrazione e tipologia di nanoparticelle. Trattamenti con la stessa lettera non sono significativamente differenti.

La germinazione media del pomodoro si attesta tra l'80 e l'89% per semi trattati con nHAP₃₀₀ e tra il 75 e l'89% per semi trattati con nHAP₇₀₀. L'analisi statistica non individua differenze significative sia per la concentrazione di nanoparticelle (p-value = 0.278), sia per la tipologia di nanoparticelle (p-value = 0.936), sia per la combinazione di entrambi (p-value = 0.486).

4.2.2 Lunghezza Radicale

In Figura 23 e Figura 24 sono riportate le lunghezze radicali (cm) dei semi di orzo e pomodoro, trattati con nanoparticelle nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀, a diverse concentrazioni.

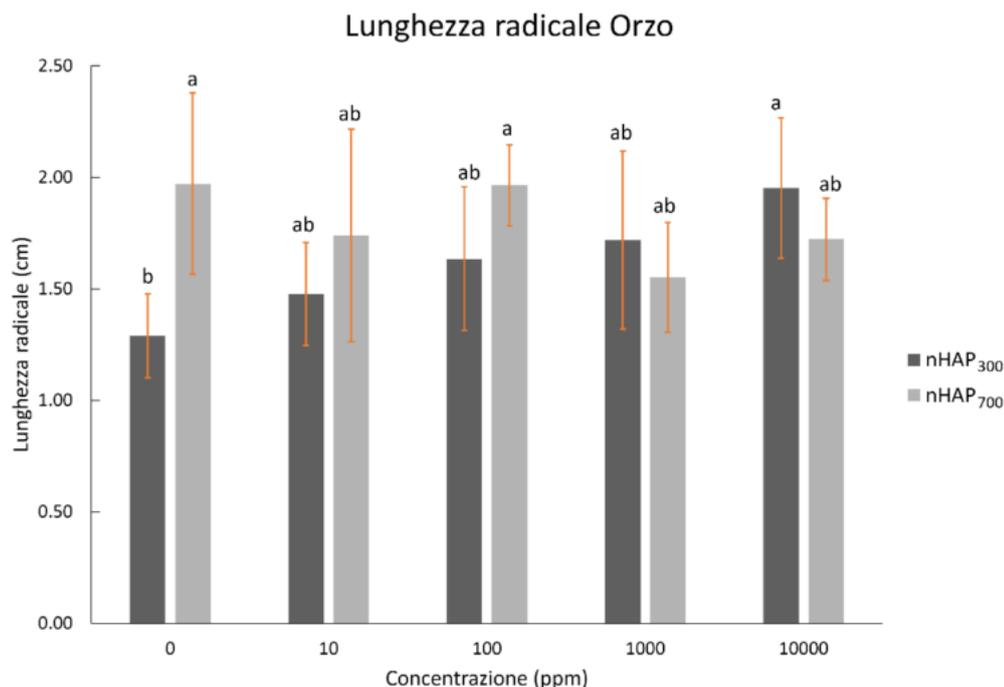


Figura 23: Lunghezze radicali medie dell'orzo per concentrazione e tipologia di nanoparticelle. Trattamenti con la stessa lettera non sono significativamente differenti.

Per identificare la lunghezza radicale dell'orzo sono state misurate tutte le radici, dopodiché è stata scelta la radichetta con lunghezza maggiore ed è stata fatta una media per replica e per trattamento. Le lunghezze medie per semi di orzo trattati con nHAP₃₀₀ variano da 1.289 a 1.951 cm, i semi trattati con nHAP₇₀₀ hanno una lunghezza radicale compresa tra 1.552 e 1.972 cm. La concentrazione di nanoparticelle non influenza la lunghezza radicale (p-value = 0.161) così come la tipologia di nanoparticelle (p-value = 0.0639), la combinazione di concentrazione e tipologia di nanoparticelle ha una bassa significatività (p-value = 0.0194, *).

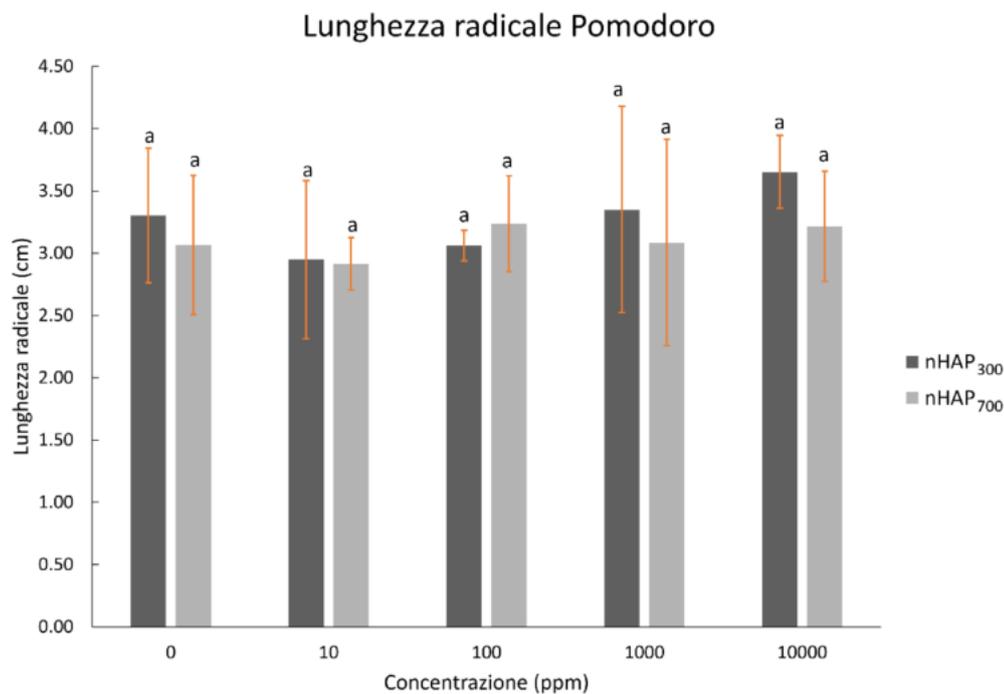


Figura 24: Lunghezze radicali del pomodoro per concentrazione e tipologia di nanoparticelle. Trattamenti con la stessa lettera non sono significativamente differenti.

La specie del pomodoro è stata più semplice da misurare in quanto presenta una sola radichetta germinativa; i dati utilizzati sono le lunghezze medie delle radichette per trattamento. Per semi trattati con nHAP₃₀₀ le lunghezze radicali variano tra 2.947 e 3.652 cm, per semi trattati con nHAP₇₀₀ le lunghezze radicali variano tra 2.915 e 3.273 cm. La concentrazione di nanoparticelle ha una bassa significatività sulla lunghezza radicale (p-value = 0.049, *), la tipologia di nanoparticelle (p-value = 0.223) e la combinazione di concentrazione e tipologia di nanoparticelle (p-value = 0.264) non hanno significatività.

5. Discussione

5.1 Test di percolazione

L'analisi dei percolati e del P_{dis} ha evidenziato una concentrazione elevata di P in corrispondenza dei percolati raccolti dalle colonne TSP. Questi valori sono molto superiori (circa 50-55 volte) ai valori di concentrazione derivati da soluzioni di colonne di Ctrl, nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀ (Figura 15). Questo risultato rispecchia le previsioni; il TSP rappresenta un fertilizzante più mobile nel profilo verticale del suolo, invece, nHAP permane maggiormente nel terreno per la sua scarsa solubilità, ottenendo dei dati simili al controllo. I dati di P_{tot} , corrispondenti al P totale mineralizzato della soluzione percolata, sono simili ai dati di P_{dis} in relazione al fattore FERT, con quantitativi di P perso leggermente superiori. Questo leggero aumento dei dati medi è da attribuire alla mineralizzazione in microonde del P contenuto in particelle superiori a 0.45 μm . Uno studio del 2010 condotto da Gikonyo et al. ha ottenuto dei risultati simili; l'esperimento ha comparato le perdite di P in colonne di terreno inserite nel suolo e trattate con TSP e altre rocce fosfatice. Le colonne trattate con TSP hanno manifestato una perdita maggiore di P rispetto agli altri trattamenti. L'esperimento ha messo in luce come le perdite di P siano influenzate dalla saturazione del P solubile del terreno e che ulteriori aggiunte di TSP portino ad una saturazione del P più rapida rispetto agli altri trattamenti (Gikonyo et al., 2010).

La presenza di nHAP nel suolo aumenta la concentrazione di P biodisponibile nel terreno (Figura 19). Xiong et al. nel 2018, hanno condotto un esperimento in colonne di terreno trattate con TSP e nHAP. In questo studio hanno potuto osservare che l'utilizzo di nHAP come fertilizzante in Ultisuoli acidi risulti in un rilascio lento e sostenuto di P, portando ad un aumento del P biodisponibile. Al contrario, il TSP inizialmente rilascia molto velocemente il P per poi avere una diminuzione della biodisponibilità. In Vertisuoli alcalini, tuttavia, i campioni trattati con TSP presentano livelli di P biodisponibile maggiori rispetto ai campioni trattati con nHAP. Questo dato è dovuto alla bassa solubilità del nHAP a pH elevati (Xiong et al., 2018).

Nell'esperimento di questo elaborato, l'analisi statistica ha individuato che il fattore FERT è il solo a presentare differenze significative, sia nel P disciolto, sia nel P totale dei percolati. Il fattore MO invece non presenta significatività. Nello studio di P_{dis} e P_{tot} , il fattore MO₊ si comporta diversamente nelle colonne TSP rispetto alle colonne Ctrl, nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀; nelle colonne trattate con TSP, la presenza del microrganismo comporta una diminuzione della quantità di P sia in P_{dis} che in P_{tot} , invece, negli altri livelli vi è un aumento, seppur non significativo. Questo fenomeno è, probabilmente, da attribuire alla frazione biodisponibile del P "nativo" del terreno (P_{Olsen}) (Figura 19). Nelle colonne TSP, dove è presente un'elevata concentrazione di P i microrganismi proliferano, utilizzando le risorse già presenti; nel caso di Ctrl, nHAP₃₀₀, nHAP₇₀₀, i microrganismi devono

solubilizzare il P per poterlo assorbire, ma rendendolo più mobile. I dati del P_{Olsen} indicano un leggero aumento, non significativo, delle concentrazioni di P rispetto alle colonne MO-. La presenza di batteri P-solubilizzanti come *P. alloputida* nel terreno delle colonne permette un rilascio lento, ma costante di P nel tempo (Castagno et al., 2011). Una piccola parte di P solubilizzato viene lisciviato dall'acqua (Figura 15 e Figura 17), un'altra parte permane nel terreno, aumentando la biodisponibilità di P (Figura 19).

Uno studio di Montalvo et al. del 2015, ha proposto un esperimento di percolazione in colonna simile a quello proposto in questo elaborato. Nell'esperimento sono stati studiati i percolati derivati da colonne di Andisuoli e Ossisuoli trattati con TSP e nHAP. L'esperimento ha messo confermato come il movimento del P nella colonna dipenda fortemente dal tipo di terreno: gli Andisuoli presentavano percolati con bassa concentrazione di P nelle colonne TSP e alta nelle colonne nHAP; al contrario gli ossisuoli presentavano percolati con concentrazione alta di P nelle colonne TSP e bassa nelle colonne nHAP. Gli autori hanno giustificato il fenomeno asserendo che queste differenze siano dovute anche alle caratteristiche fisico-chimiche delle nHAP. Dopo aver inserito una membrana filtrante da 3-kDa per separare il P disciolto con il P particellare, hanno osservato che negli Andisuoli le nanoparticelle si muovevano nella colonna nella loro interezza, invece, negli Ossisuoli riuscivano a aderire alle particelle di terreno e rimanere fisse. Il TSP, invece, si comporta in modo inverso, a causa della sua alta solubilità (Montalvo et al., 2015). Il test di percolazione proposto in questo elaborato trova delle similitudini con i risultati degli Ossisuoli.

Uno studio condotto Sakhno et al. (2022) ha utilizzato nHAP e dicalcio fosfato anidro (DCPA), entrambi arricchiti con Na o K, come fertilizzante per la coltivazione della lattuga (*Lactuca sativa* L.) in vaso. L'acqua di percolazione delle piante è stata raccolta e analizzata per individuare la quantità di P lisciviato. Il quantitativo minimo di P perso è stato misurato nel controllo, mentre il quantitativo maggiore è stato riscontrato in corrispondenza del trattamento con DCPA arricchito in sodio. I campioni nHAP hanno registrato delle perdite di P molto basse, inducendo gli autori a considerare le nHAP come un "prodotto *nano-enabled* ottimale sulla base di valutazione agronomica e ambientale" (Sakhno et al., 2022).

Un altro studio condotto da Elliott et al. nel 2002 ha evidenziato come le perdite di P derivato da fertilizzazione con TSP sia correlata alla tipologia di suolo, valutando il movimento del P in colonna con diversi biosuoli trattati con TSP e pollina. Suoli molto sabbiosi possiedono una scarsa capacità di trattenere il TSP con perdite elevate (fino al 20% del quantitativo aggiunto), invece la maggior parte dei biosuoli non riscontrava perdite eccessive (<5%) (Elliott et al., 2002). Anche nel lavoro descritto in questo elaborato sono state individuate delle perdite di P nel TSP basse rispetto al quantitativo di P aggiunto, ma molto maggiori rispetto agli altri livelli (Figura 15), confermando le potenzialità delle nHAP dal

punto di vista del minor impatto sull'ambiente rispetto ai fertilizzanti fosfatici convenzionali.

5.2 Test di germinazione

Nel test di germinazione, i semi sono entrati a contatto con diverse nanoparticelle a diverse concentrazioni nella fase di imbibizione. Il nostro lavoro ha permesso di verificare come la presenza di nHAP nella fase di imbibizione e nella fase di crescita non costituisca un elemento negativo alla germinazione e sviluppo del seme. Uno studio di Szameitat et al. nel 2021 ha valutato il comportamento delle radici di orzo (*H. vulgare*) coltivato in idroponica in una soluzione povera di P. L'aggiunta di nHAP nella soluzione ha portato ad una ristabilizzazione dello stato fisiologico della pianta portando ad ottenere delle radici più vigorose e in salute (Szameitat et al., 2021). Il parallelismo dell'ambiente povero di P in entrambi gli esperimenti fa pensare che l'utilizzo di nHAP come fonte di P sia un'alternativa allettante per la nutrizione delle piante, soprattutto nelle prime fasi di vita.

Uno studio di Marchiol et al. del 2019 ha analizzato l'effetto della nHAP sulla germinazione e lunghezza radicale di semi di pomodoro (*S. lycopersicum*). Nell'esperimento i semi di pomodoro sono stati immersi in soluzioni contenenti nHAP a diverse concentrazioni e successivamente coltivati in piastre Petri su carta da filtro in una camera di crescita. La presenza di nHAP non ha avuto nessuna conseguenza sulla germinazione, mentre la lunghezza radicale è stata influenzata positivamente dalle diverse concentrazioni, con dei valori massimi misurati a concentrazioni di $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Marchiol et al., 2019). I risultati ottenuti in questo esperimento sono simili per la germinazione del pomodoro, ma possiedono una diversa significatività rispetto alla lunghezza radicale, che è risultata bassa nel caso di questo studio e alta nello studio proposto da Marchiol et al. (2019).

Liu et al. nel 2015 hanno realizzato uno studio dell'effetto della nHAP sulla germinazione dei semi di cetriolo (*Cucumis sativus* L.). L'esperimento è stato effettuato in piastre Petri con applicazioni spray di soluzione a diverse concentrazioni di nHAP durante il periodo di germinazione. Lo studio ha identificato un marcato aumento della germinazione sui campioni trattati con nHAP a 1000 ppm ed una lunghezza media maggiore delle radici sempre nello stesso trattamento (Liu et al., 2015). Il test di germinazione condotto a Udine ha individuato delle similarità con lo studio di Liu et al. per quanto concerne la lunghezza radicale dei semi, nonostante le diverse specie e modalità di applicazione della nHAP.

Sekina et al. nel 2022 hanno studiato gli effetti delle nHAP sulla germinazione in piastre di semi di radicchio, pomodoro, frumento e cetriolo. Questo studio ha evidenziato che l'imbibizione dei semi in sospensioni contenenti nanoparticelle inibiva la germinazione e diminuiva significativamente la lunghezza radicale di tutte le specie studiate (Sekina et al., 2022). Questo loro lavoro è in disaccordo

con il test di germinazione descritto in questo elaborato e con gli altri studi sopracitati. Questi risultati contrastanti possono essere dovuti a molteplici fattori, come le diverse modalità e i diversi tempi di applicazione o imbibizione dei semi con sospensioni di nHAP a diverse concentrazioni.

Il ruolo della nHAP come promotore dell'allungamento radicale è stato confermato anche in diversi esperimenti in vaso. Uno studio di Syhlaja et al. nel 2022, ha scoperto che l'utilizzo di nHAP come nanofertilizzante per la coltivazione di *Cyamopsis tetragonoloba* L. (Fagiolo a grappolo) migliorava la lunghezza radicale e anche la biomassa delle radici delle piante (Shylaja et al., 2022).

Secondo altri autori, la germinazione dei semi non è in realtà influenzata dalla presenza delle nanoparticelle; Lin & Xing nel 2017 hanno studiato la germinazione di semi di colza (*Brasica napus* L.), ravanella (*Raphanus sativus* L.), Loietto perenne (*Lolium perenne* L.), lattuga (*L. sativa*), mais (*Zea mais* L.) e cetriolo (*Cucumis sativus* L.) trattati con nanoparticelle di Zn e Al; in questo studio hanno immerso i semi in sospensioni trattate con le nanoparticelle e hanno scoperto che le nanoparticelle non influivano sulla germinazione, ma solo sulla lunghezza radicale. La non tossicità delle nanoparticelle sulla germinazione è stata attribuita alla dimensione delle nanoparticelle (da 5 a 100 nm dipendentemente dal tipo di nanoparticelle); ciò perché la superficie del seme non permetteva l'assorbimento delle nanoparticelle, eliminando la possibilità che queste potessero avere effetti tossici nella germinazione (Lin & Xing, 2007). Nell'esperimento proposto in questo trattato propone che anche nel caso della nHAP la dimensione delle nanoparticelle (nHAP₃₀₀ = 50-250 nm e nHAP₇₀₀ = 50-400 nm) non abbia avuto influenza sulla germinazione dei semi delle specie studiate.

6. Conclusioni

Nella prima parte della tesi è stato studiato il movimento del fosforo in colonne di terreno trattate con superfosfato triplo e nanoparticelle sintetizzate a 300°C e 700°C, analizzando sia la soluzione acquosa percolata dalle colonne che il terreno a fine esperimento. Inoltre, sono stati eseguiti degli studi in parallelo in terreno inoculato con *P. alloputida*, un microorganismo fosfolubilizzante rizosferico. I risultati ottenuti, indicano perdite di P nelle colonne trattate con TSP molto maggiori rispetto al Ctrl, nHAP₃₀₀ e nHAP₇₀₀, sia per contenuto di P disciolto che di P totale. Le analisi del P biodisponibile (P_{Olsen}) hanno dato come risultato una concentrazione di P molto maggiore nel TSP rispetto agli altri livelli. Questo risultato era atteso mentre i dati del P_{Olsen} da colonne trattate con nanoparticelle sono più bassi del previsto. La presenza di *P. alloputida* nelle colonne di terreno non ha prodotto i risultati attesi. Sono necessari ulteriori studi per meglio identificare il ruolo dei microorganismi fosfolubilizzanti, mettendo in luce eventuali modifiche del P nelle varie forme in cui si può trovare nel suolo (anche nella forma immobilizzata perché assorbita e assimilata dalla componente microbica).

Questo esperimento è stato effettuato in modo da replicare un sistema molto semplificato rispetto alla realtà. I dati ottenuti potrebbero variare in un sistema molto più complesso come un terreno agrario coltivato. L'estensione dell'area coltivata, la profondità del terreno, il clima, i microorganismi che popolano il terreno e la presenza di piante nel suolo sono alcune fra le variabili che determinano il comportamento del P nel terreno, influenzandone gli equilibri fra le varie forme presenti. Gli stessi parametri possono avere un effetto diverso anche su *P. alloputida*.

Nella seconda parte del test è stato studiato l'effetto delle nanoparticelle sulla germinazione dei semi di *H. vulgare* (orzo) e *S. lycopersicum* (pomodoro). Il test di germinazione non ha individuato effetti sulla germinazione di entrambe le specie. Le nHAP₃₀₀ sembrano avere un effetto positivo sulla crescita della radice in entrambe le specie. Questo dato è certamente incoraggiante e da stimolo per ulteriori approfondimenti futuri.

Questa tesi ha posto le basi per lo studio delle nanoparticelle di idrossiapatite come fertilizzante in ambito agrario. Sono necessari ulteriori studi su diversi suoli, sulle fasi di crescita della pianta, oltre alla germinazione, su specie diverse e in un sistema più complesso fino al pieno campo, per poter definire la nanoidrossiapatite come un fertilizzante alternativo e sostenibile da impiegarsi in agricoltura.

Bibliografia e sitografia

Abou El-Nour, K. M., Eftaiha, A. A., Al-Warthan, A., & Ammar, R. A. (2010). Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian journal of chemistry*, 3(3), 135-140.

Ahmed, M., Nigussie, A., Addisu, S., Belay, B., & Sato, S. (2021). Valorization of animal bone into phosphorus biofertilizer: effects of animal species, thermal processing method, and production temperature on phosphorus availability. *Soil Science and Plant Nutrition*, 67(4), 471-481.

Babalola, O. O., & Glick, B. R. (2012). The use of microbial inoculants in African agriculture: current practice and future prospects. *J. Food Agric. Environ*, 10(3&4), 540-549.

Castagno, L. N., Estrella, M. J., Sannazzaro, A. I., Grassano, A. E., & Ruiz, O. A. (2011). Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). *Journal of applied microbiology*, 110(5), 1151-1165.

Cengiz, B., Gokce, Y., Yildiz, N., Aktas, Z., & Calimli, A. (2008). Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 322(1-3), 29-33.

Chadwick, J. J., Zhang, P., Ullah, S., & Lynch, I. (2023). Use of nanotechnology to increase nutrient use efficiency, enhance crop nutrition, and reduce agrochemical pollution. In *Nano-Enabled Sustainable and Precision Agriculture* (pp. 17-41). Academic Press.

Chaudhuri, B., Mondal, B., Modak, D. K., Pramanik, K., & Chaudhuri, B. K. (2013). Preparation and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite from eggshell and K₂HPO₄ solution. *Materials Letters*, 97, 148-150.

Chhowalla, M. (2017). Slow release nanofertilizers for bumper crops.

Cruz-Hernández, M., Velázquez-Herrera, F. D., & Fetter, G. (2023). Synthetic hydroxyapatites as high-performance fertilizers for lettuce plant growth. *Rhizosphere*, 100718.

da Silva Pontes, M., de Lima Forini, M. M., Caires, A. R. L., Santiago, E. F., Tripathi, D. K., Kah, M., & Grillo, R. (2023). Nanopesticides—modes of action and impacts. *Nano-Enabled Sustainable and Precision Agriculture*, 79-103.

Dawson, C. J., & Hilton, J. (2011). Fertiliser availability in a resource-limited world: Production and recycling of nitrogen and phosphorus. *Food Policy*, 36, S14-S22.

de Lorenzo, V. (2008). Systems biology approaches to bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, 19(6), 579-589.

DeRosa, M. C., Monreal, C., Schnitzer, M., Walsh, R., & Sultan, Y. (2010). Nanotechnology in fertilizers. *Nature nanotechnology*, 5(2), 91-91.

De Zutter, N., Ameye, M., Bekaert, B., Verwaeren, J., De Gelder, L., & Audenaert, K. (2022). Uncovering new insights and misconceptions on the effectiveness of phosphate solubilizing rhizobacteria in plants: a meta-analysis. *Frontiers in Plant Science*, 13, 858804.

- Dimkpa, C. O. (2018). Soil properties influence the response of terrestrial plants to metallic nanoparticles exposure. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 6, 1-8.
- Dong, C., Jiao, C., & Zhang, Z. (2023). Nanomaterial transport and transformation in soil–plant systems: role of rhizosphere chemistry. In *Nano-Enabled Sustainable and Precision Agriculture* (pp. 355-375). Academic Press.
- Dutta, D., & Das, B. M. (2021). Scope of green nanotechnology towards amalgamation of green chemistry for cleaner environment: A review on synthesis and applications of green nanoparticles. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 15, 100418.
- Elliott, H. A., O'connor, G. A., & Brinton, S. (2002). Phosphorus leaching from biosolids-amended sandy soils. *Journal of Environmental Quality*, 31(2), 681-689.
- Elmer, W., Smith, S. L., Karmous, I., Santra, S., & White, J. C. (2023). Nanofertilization for plant health. In *Nano-Enabled Sustainable and Precision Agriculture* (pp. 105-117). Academic Press.
- EPA (United States Environmental Protection Agency) (1996) Ecological Effects Test Guidelines: OPPTS 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. EPA, Washington, DC, EPA 712-C-96-154. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P100RF51.PDF?Dockey=P100RF51.PDF>.
- Fatima, F., Hashim, A., & Anees, S. (2021). Efficacy of nanoparticles as nanofertilizer production: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 1292-1303.
- Ferraz, M. P., Monteiro, F. J., & Manuel, C. M. (2004). Hydroxyapatite nanoparticles: a review of preparation methodologies. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 2(2), 74-80.
- Feynman, R. (2018). There's plenty of room at the bottom. In *Feynman and computation* (pp. 63-76). CRC Press.
- Fox, K., Tran, P. A., & Tran, N. (2012). Recent advances in research applications of nanophase hydroxyapatite. *ChemPhysChem*, 13(10), 2495-2506.
- Gikonyo, E., Zaharah, A. R., Hanafi, M. M., & Anuar, R. (2010). Phosphorus leaching in an acid tropical soil “recapitalized” with phosphate rock and triple superphosphate. *The Scientific World Journal*, 10, 1498-1508.
- Goldstein, A. H. (1994). Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, DC, 197-203.
- Goldstein, A. H. (1995). Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biological Agriculture & Horticulture*, 12(2), 185-193.
- Guleria, G., Thakur, S., Shandilya, M., Sharma, S., Thakur, S., & Kalia, S. (2022). Nanotechnology for sustainable agro-food systems: The need and role of nanoparticles in protecting plants and improving crop productivity. *Plant Physiology and Biochemistry*.
- G.U. Supplemento ordinario n.248 del 21 ottobre 1999, Serie generale, Approvazione dei “Metodi ufficiali di Analisi chimica del suolo”, pp. 25-28, 32-33, 34-37, 150-152, 198-200
- Harinisri, K., Jayanthi, N., & Kumar, R. S. (2023). Diverse application of green nanotechnology– A review. *Materials Today: Proceedings*.

ISO, 2023. 80004-1:2023. Nanotechnologies – Vocabulary. *Part 1: Core vocabulary*, 3.1.1, 3.1.3, 3.1.4, 3.2.1. <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:80004:-1:ed-1:v1:en>, data consultazione 07/2023.

Jiménez, J. I., Miñambres, B., García, J. L., & Díaz, E. (2002). Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology*, 4(12), 824-841.

Kah, M., Tufenkji, N., & White, J. C. (2019). Nano-enabled strategies to enhance crop nutrition and protection. *Nature nanotechnology*, 14(6), 532-540.

Kalwani, M., Chakdar, H., Srivastava, A., Pabbi, S., & Shukla, P. (2022). Effects of nanofertilizers on soil and plant-associated microbial communities: Emerging trends and perspectives. *Chemosphere*, 287, 132107.

Keat, C. L., Aziz, A., Eid, A. M., & Elmarzugi, N. A. (2015). Biosynthesis of nanoparticles and silver nanoparticles. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1), 1-11.

Keshavarz-Tohid, V., Vacheron, J., Dubost, A., Prigent-Combaret, C., Taheri, P., Tarighi, S., ... & Muller, D. (2019). Genomic, phylogenetic and catabolic re-assessment of the *Pseudomonas putida* clade supports the delineation of *Pseudomonas alloputida* sp. nov., *Pseudomonas inefficax* sp. nov., *Pseudomonas persica* sp. nov., and *Pseudomonas shirazica* sp. nov. *Systematic and applied microbiology*, 42(4), 468-480.

Kottegoda, N., Munaweera, I., Madusanka, N., & Karunaratne, V. (2011). A green slow-release fertilizer composition based on urea-modified hydroxyapatite nanoparticles encapsulated wood. *Current science*, 73-78.

Kottegoda, N., Munaweera, I., Madusanka, A. N., & Karunaratne, V. (2013a). Compositions for sustained release of agricultural macronutrients and process thereof. *U.S. Patent No. 8,361,185*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Kottegoda, N., Munaweera, I., Samaranayake, L., Gunasekara, S., De Alwis, A., Karunaratne, V., & Madusanka, A. N. (2013b). Cellulose based sustained release macronutrient composition for fertilizer application. *U.S. Patent No. 8,617,284*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Le Ho, K. H., Dao, V. H., Pham, X. K., Nguyen, P. A., Phan, B. V., Doan, T. T., & Lam, T. H. (2022). Physicochemical properties, acute and subchronic toxicity of nano-hydroxyapatite obtained from *Lates calcarifer* fish bone. *Regional Studies in Marine Science*, 55, 102560.

Lin, D., & Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental pollution*, 150(2), 243-250.

Liu, R., & Lal, R. (2015). Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the total environment*, 514, 131-139.

Liu, W., Wang, S., Sun, H., Zuo, Q., Lai, Y., & Hou, J. (2015). Impact of nanometer hydroxyapatite on seed germination and root border cell characteristics. *RSC advances*, 5(101), 82726-82731.

- Loneragan, J. F., Grove, T. S., Robson, A. D., & Snowball, K. (1979). Phosphorus toxicity as a factor in zinc-phosphorus interactions in plants. *Soil Science Society of America Journal*, 43(5), 966-972.
- Loo, S. C. J., Moore, T., Banik, B., & Alexis, F. (2010). Biomedical applications of hydroxyapatite nanoparticles. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(4), 333-342.
- Lowry, G. V., Avellan, A., & Gilbertson, L. M. (2019). Opportunities and challenges for nanotechnology in the agri-tech revolution. *Nature nanotechnology*, 14(6), 517-522.
- Maguire, R. O., & Sims, J. T. (2002). Soil testing to predict phosphorus leaching. *Journal of environmental quality*, 31(5), 1601-1609.
- Marchiol, L., Filippi, A., Adamiano, A., Degli Esposti, L., Iafisco, M., Mattiello, A., ... & Braidot, E. (2019). Influence of hydroxyapatite nanoparticles on germination and plant metabolism of tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Preliminary evidence. *Agronomy*, 9(4), 161.
- Matilla, M. A., & Krell, T. (2018). Plant growth promotion and biocontrol mediated by plant-associated bacteria. *Plant microbiome: stress response*, 45-80.
- Method 3015A, "Microwave Assisted Acid Digestion of Aqueous Samples and Extracts", Revision 1, February 2007, Final Update IV to the Third Edition of the Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, EPA publication SW-846.
- Method 3051A, "Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, Soils, and Oils", Revision 1, February 2007, Final Update IV to the Third Edition of the Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, EPA publication SW-846.
- Mondal, A., Basu, R., Das, S., & Nandy, P. (2011). Beneficial role of carbon nanotubes on mustard plant growth: an agricultural prospect. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 4519-4528.
- Montalvo, D., McLaughlin, M. J., & Degryse, F. (2015). Efficacy of hydroxyapatite nanoparticles as phosphorus fertilizer in andisols and oxisols. *Soil Science Society of America Journal*, 79(2), 551-558.
- Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental microbiology*, 12(6), 1513-1530.
- National Nanotechnology Initiative, <https://www.nano.gov/national-nanotechnology-initiative>, data consultazione 07/2023.
- Nongbet, A., Mishra, A. K., Mohanta, Y. K., Mahanta, S., Ray, M. K., Khan, M., ... & Chakrabarty, I. (2022). Nanofertilizers: a smart and sustainable attribute to modern agriculture. *Plants*, 11(19), 2587.
- Okey-Onyesolu, C. F., Hassanisaadi, M., Bilal, M., Barani, M., Rahdar, A., Iqbal, J., & Kyzas, G. Z. (2021). Nanomaterials as nanofertilizers and nanopesticides: An overview. *ChemistrySelect*, 6(33), 8645-8663.
- Ortega-Ortiz, H., Gaucin-Delgado, J. M., Preciado-Rangel, P., Fortis-Hernandez, M., Hernandez-Montiel, L. G., La CRUZ-LAZARO, E. D., & Liliana, L. C. (2022). Copper oxide nanoparticles biosynthesized improve germination and bioactive compounds in wheat sprouts. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 50(1), 12657-12657.

- Passarelli-Araujo, H., Jacobs, S. H., Franco, G. R., & Venancio, T. M. (2021). Phylogenetic analysis and population structure of *Pseudomonas alloputida*. *Genomics*, *113*(6), 3762-3773.
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology*, *68*(8), 3795-3801.
- Pereira, E. I., Giroto, A. S., Bortolin, A., Yamamoto, C. F., Marconcini, J. M., de Campos Bernardi, A. C., & Ribeiro, C. (2015). Perspectives in nanocomposites for the slow and controlled release of agrochemicals: Fertilizers and pesticides. *Nanotechnologies in food and agriculture*, 241-265.
- Rai, M., Ribeiro, C., Mattoso, L., & Duran, N. (Eds.). (2015). *Nanotechnologies in food and agriculture* (Vol. 33). Cham/Heidelberg/New York/Dordrecht/London: Springer.
- Raliya, R., Saharan, V., Dimkpa, C., & Biswas, P. (2017). Nanofertilizer for precision and sustainable agriculture: current state and future perspectives. *Journal of agricultural and food chemistry*, *66*(26), 6487-6503.
- Rameshaiah, G. N., Pallavi, J., & Shabnam, S. (2015). Nano fertilizers and nano sensors—an attempt for developing smart agriculture. *Int J Eng Res Gen Sci*, *3*(1), 314-320.
- Ranjan, S., Dasgupta, N., & Lichtfouse, E. (Eds.). (2016). *Nanoscience in food and agriculture I* (Vol. 20). Cham: Springer International Publishing.
- Rodrigues, S. M., Avellan, A., Salvador, D., Rodrigues, S., Miranda, M., Morais, B., ... & Lowry, G. V. (2023). Nanofertilizers—synthesis, advantages, and the current status. In *Nano-Enabled Sustainable and Precision Agriculture* (pp. 43-77). Academic Press.
- Sakhno, Y., Ma, C., Borgatta, J., Jin, Y., White, J. C., & Jaisi, D. P. (2022). Role of Cation Substitution and Synthesis Condition in a Calcium Phosphate-Based Novel Nanofertilizer on Lettuce (*Lactuca sativa*) Yield. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *10*(47), 15414-15422.
- Sekina, S., Khaled, Y., & Ramadan, F. (2022). Effect of Hydroxyapatite and Zinc Oxide Nanoparticles on the Germination of Some Seeds.
- Sharma, V., Javed, B., Byrne, H., Curtin, J., & Tian, F. (2022). Zeolites as carriers of nano-fertilizers: From structures and principles to prospects and challenges. *Applied Nano*, *3*(3), 163-186.
- Shylaja, S., Prashanthi, Y., & Rao, T. N. (2022). Synthesis and evaluating the effects of nano hydroxyapatite on germination, growth and yield of cluster beans. *Materials Today: Proceedings*, *64*, 917-921.
- Sivarethinamohan, R., & Sujatha, S. (2021, February). Unlocking the potentials of using nanotechnology to stabilize agriculture and food production. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2327, No. 1). AIP Publishing.
- Solanki, P., Bhargava, A., Chhipa, H., Jain, N., & Panwar, J. (2015). Nano-fertilizers and their smart delivery system. *Nanotechnologies in food and agriculture*, 81-101.
- Szameitat, A. E., Sharma, A., Minutello, F., Pinna, A., Er-Rafik, M., Hansen, T. H., ... & Husted, S. (2021). Unravelling the interactions between nano-hydroxyapatite and the roots of phosphorus deficient barley plants. *Environmental Science: Nano*, *8*(2), 444-459.

- Taniguchi, N. (1974). On the basic concept of nano-technology'. In *Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II, 1974*. Japan Society of Precision Engineering.
- Tarafder, C., Daizy, M., Alam, M. M., Ali, M. R., Islam, M. J., Islam, R., ... & Khan, M. Z. H. (2020). Formulation of a hybrid nanofertilizer for slow and sustainable release of micronutrients. *ACS omega*, 5(37), 23960-23966.
- Trung, T. S., Minh, N. C., Cuong, H. N., Phuong, P. T. D., Dat, P. A., Nam, P. V., & Van Hoa, N. (2022). Valorization of fish and shrimp wastes to nano-hydroxyapatite/chitosan biocomposite for wastewater treatment. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 7(4), 100485.
- UN. World Population Prospects (2011). The 2010 Revision United Nations, New York.
- Van Kauwenbergh, S. J. (2010). *World phosphate rock reserves and resources* (p. 48). Muscle Shoals: Ifdc.
- Wei, Z., Wang, Y., He, C., Wei, W., & Cui, J. (2011). Phosphorus fertilizer comprising nano-hydroxyapatite and its preparation process.
- Weimer, A., Kohlstedt, M., Volke, D. C., Nickel, P. I., & Wittmann, C. (2020). Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 7745-7766.
- Wu, H., & Li, Z. (2022). Recent advances in nano-enabled agriculture for improving plant performance. *The Crop Journal*, 10(1), 1-12.
- Wu, T., Hou, J., White, J. C., & Lin, D. (2023). Nanomaterials for soil contaminant remediation. In *Nano-Enabled Sustainable and Precision Agriculture* (pp. 143-180). Academic Press.
- Xiong, L., Wang, P., Hunter, M. N., & Kopittke, P. M. (2018). Bioavailability and movement of hydroxyapatite nanoparticles (HA-NPs) applied as a phosphorus fertiliser in soils. *Environmental Science: Nano*, 5(12), 2888-2898.
- Yadav, A., Yadav, K., & Abd-Elsalam, K. A. (2023). Nanofertilizers: Types, Delivery and Advantages in Agricultural Sustainability. *Agrochemicals*, 2(2), 296-336.
- Zhang, P., Lynch, I., Handy, R. D., & White, J. C. (2023). A brief history of nanotechnology in agriculture and current status. In *Nano-Enabled Sustainable and Precision Agriculture* (pp. 3-14). Academic Press.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare i miei genitori, Cristina e Piero, mia sorella Mariaelena, i miei nonni, Giovanni e Anna Maria, i miei zii, Arianna, Isabella, Aldo e Rino, i miei cugini Sofia e Tommaso e i miei amici. Grazie per avermi supportato durante questo percorso universitario. Vorrei ringraziare il professor Guido Fellet, il professor Luca Marchiol e la dottoressa Laura Pilotto per avermi guidato nella fase sperimentale e nella stesura di questo elaborato. Grazie.