



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI DELLA  
Tuscia

**Università degli Studi della Tuscia di Viterbo**  
**Dipartimento per la innovazione nei sistemi biologici, agroalimentari e forestali**

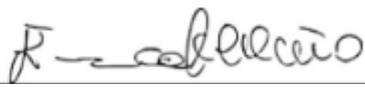
**Corso di Dottorato di Ricerca in**  
**Scienze, tecnologie e biotecnologie per la sostenibilità- XXXIII ciclo**

**TITOLO TESI DI DOTTORATO DI RICERCA**

**ACIDO FULVICO COME RISORSA AMBIENTALE PER LA VALORIZZAZIONE DEI  
SERVIZI ECOSISTEMICI DELLA VALLE ANTICOLANA**

Settore scientifico-disciplinare  
**s.s.d. AGR/13- CHIMICA AGRARIA**

**Tesi di dottorato di:**  
Dott.ssa ENRICA ALLEVATO

Firma 

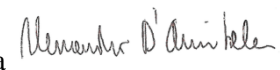
**Coordinatore del corso**  
Prof. Andrea Vannini

Firma 

**Tutore**  
Prof.ssa Silvia Rita Stazi

Firma 

**Co-tutore**  
Prof. Alessandro D'Annibale

Firma 

**A.A. 2019/20**



## INDICE

<b>RIASSUNTO.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>EXTENDED ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>

### **CAPITOLO 1**

<b>PREMESSA .....</b>	<b>19</b>
○ Aspetti territoriali e geologici della Valle Anticolana.....	21
○ Acque minerali del bacino idrotermale di Fiuggi.....	25
<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>30</b>
○ LE SOSTANZE UMICHE.....	30
La sostanza organica .....	30
Definizione e origine delle sostanze umiche.....	36
Proprietà chimiche delle sostanze umiche.....	39
Struttura delle sostanze umiche.....	42
Caratteristiche delle sostanze umiche acquatiche .....	44
<b>OBIETTIVO .....</b>	<b>46</b>

### **CAPITOLO 2**

<b>MATERIALI &amp; METODI .....</b>	<b>51</b>
○ AREA DI STUDIO E CAMPIONAMENTO DI ACQUA E SUOLO.....	51
Sito sperimentale 1 .....	51
Sito sperimentale 2 .....	54
○ CARATTERIZZAZIONE FISICO-CHIMICA DEI CAMPIONI DI SUOLO	
.....	56
Granulometria.....	56
pH (in H <sub>2</sub> O e KCl 1M) .....	57

Capacità di scambio cationico (CSC).....	57
Carbonio organico totale (TOC) ed Azoto totale (TN).....	58
Conducibilità elettrica .....	59
Carbonati totali .....	59
○ ISOLAMENTO DEGLI ACIDI FULVICI DAL SUOLO E DALL'ACQUA SECONDO IL METODO IHSS.....	59
○ CARATTERIZZAZIONE DELL'ACIDO FULVICO ESTRATTO DAL SUOLO E DALL'ACQUA MINERALE DI FIUGGI CON SPETTROSCOPIA IR A TRASFORMATATA DI FOURIER (FT-IR) .....	61
○ CARATTERIZZAZIONE DELL'ACIDO FULVICO ESTRATTO DAL SUOLO E DALL'ACQUA MINERALE DI FIUGGI CON (PIROLISI) GAS CROMATOGRAFIA-SPETTROMETRIA DI MASSA (PY-GC-MS) .....	61
○ CARATTERIZZAZIONE DELL'ACIDO FULVICO ESTRATTO DAI TERRENI E DALL'ACQUA MINERALE CON ANALISI $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ NMR .	62
○ DETERMINAZIONE DELLE ATTIVITÀ ENZIMATICHE.....	62
○ DETERMINAZIONE DEI FOSFOLIPIDI DI MEMBRANA.....	64
○ ANALISI STATISTICA .....	65

### **CAPITOLO 3**

#### **RISULTATI & DISCUSSIONI..... 66**

○ IL RUOLO DELLE SOSTANZE UMICHE DI CASTAGNO NELLA VALORIZZAZIONE DELLE ACQUE MINERALI: ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE NELLE ACQUE DI FIUGGI.....	66
Caratteristiche fisico-chimiche dei suoli .....	66
Caratterizzazione dell'acido fulvico estratto dal suolo e dall'acqua minerale con spettroscopia IR a trasformata di Fourier (FT-IR) .....	69
Caratterizzazione dell'acido fulvico estratto dal suolo e dall'acqua minerale con pirolisi- GC-MS .....	71
Caratterizzazione dell'acido fulvico estratto dal suolo e dall'acqua minerale con spettroscopia NMR.....	75

○ DISCUSSIONI .....	79
---------------------	----

#### **CAPITOLO 4**

<b>RISULTATI &amp; DISCUSSIONI.....</b>	<b>85</b>
-----------------------------------------	-----------

○ IL CAMBIAMENTO DI DESTINAZIONE D'USO DEL SUOLO NEL BACINO DI FIUGGI INFLUISCE SUL PROCESSO DI UMIFICAZIONE, PORTANDO A DIVERSE CARATTERISTICHE DEGLI ACIDI FULVICI: IMPLICAZIONI SULLA QUALITÀ DEL TERRENO/ACQUA DI FALDA.....	85
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Caratteristiche fisico-chimiche dei suoli .....	86
-------------------------------------------------	----

Caratterizzazione dell'acido fulvico estratto dal suolo e dall'acqua minerale con analisi FT-IR.....	88
------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Attività enzimatica e biochimica della comunità microbica del suolo.....	90
--------------------------------------------------------------------------	----

I fosfolipidi di membrana .....	93
---------------------------------	----

○ DISCUSSIONI .....	96
---------------------	----

#### **CAPITOLO 5**

<b>CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE .....</b>	<b>104</b>
----------------------------------------	------------

<b>PROSPETTIVE FUTURE .....</b>	<b>107</b>
---------------------------------	------------

<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>110</b>
--------------------------	------------



## **RIASSUNTO**

Secondo le Nazioni Unite le foreste sono una componente chiave per assicurare la purificazione e l'offerta sostenibile di acqua. In questo quadro l'acqua di Fiuggi costituisce un'eccellenza. Nel deflusso ipodermico delle acque piovane, queste attraversano un ecosistema complesso (piante di castagno, lettiera di castagno e suoli vulcanici) che arricchisce le acque tanto da conferirgli proprietà benefiche per la salute. Si tratta di un servizio ecosistemico "non convenzionale" il cui sistema nel suo complesso deve essere oggetto di salvaguardia e valorizzazione, unitamente alla conoscenza nel dettaglio del processo di arricchimento. Studi condotti sugli acidi fulvici rilevati nelle acque di Fiuggi ne hanno evidenziato effetti benefici a livello renale (Fraoli et al. 2001); è stato inoltre dimostrato l'effetto degradativo di tali molecole sul reticolo cristallino dei sali di calcio (ossalati, fosfati, ecc.) nei calcoli renali e la conseguente formazione di complessi solubili di calcio (Davydova et al. 2014).

Nell'ottica di valorizzare il contributo dell'ecosistema castanicolo della Valle Anticolana, il progetto di tesi ha focalizzato l'attenzione sui prodotti derivanti dai processi di umificazione (acido fulvico, FA) che si svolgono nel suolo del castagneto che sovrasta le sorgenti delle acque minerali di Fiuggi.

Le sostanze umiche sono anche presenti nella falda acquifera a seconda della geologia e della chimica della falda. Inoltre, l'ambiente in cui avvengono i processi di umificazione influenza fortemente la composizione strutturale dei composti umici che si differenziano per struttura e composizione elementare.

Il lavoro di ricerca è stato strutturato con due principali obiettivi

- 1) studi di caratterizzazione (pirolisi-GC-MS, NMR e FT-IR) svolti a carico della componente fulvica estratta dal suolo e dall'acqua minerale;
- 2) studi su come diverse coperture e usi del suolo influenzano le proprietà chimiche, fisiche e biochimiche del suolo; in particolare, è stato studiato l'effetto dei diversi tipi di copertura sulle sostanze umiche da un punto di vista qualitativo

e quantitativo, attraverso l'analisi comparativa delle sostanze umiche estratte dai suoli e dall'acqua mediante FT-IR, e, l'attività biochimica ed enzimatica della popolazione microbica del suolo coinvolta nei processi di umificazione di tre aree a diversa gestione presenti nell'area oggetto dello studio.

I risultati ottenuti da questo studio hanno mostrato, nel confronto tra gli FA presenti nell'acqua e quelli isolati dal suolo sovrastante l'acquifero, delle analogie spettrali e similarità qualitative dei profili pirolitici. Dal confronto tra i diversi usi del suolo si evidenzia che l'uso del suolo influenza i processi di umificazione e quindi anche gli FA da un punto di vista quali/quantitativo.

**Key words:** Acido fulvico, acqua, servizi ecosistemici, castagneto, processo di umificazione

## **ABSTRACT**

According to the United Nations, forests are a key component in ensuring purification and sustainable water supply. In this context Fiuggi mineral water is an excellence. In the hypodermic runoff of rainwater, it flows through a complex ecosystem (chestnut trees, chestnut litter and volcanic soils) that enriches the water to such an extent as to give it beneficial properties for health. This is an "unconventional" ecosystem service whose overall system must be safeguarded and enhanced, together with detailed knowledge of the enrichment process. Studies conducted on fulvic acids detected in the waters of Fiuggi have shown beneficial effects at renal level (Fraoli et al. 2001); the degradation effect of these molecules on the crystalline lattice of calcium salts (oxalates, phosphates, etc.) in kidney stones and the consequent formation of calcium soluble complexes has also been demonstrated (Davydova et al. 2014).

With a view to enhancing the contribution of the chestnut forest ecosystem of the Anticolana Valley, the thesis project focused on the products deriving from the humification processes (fulvic acid, FA) that take place in the soil of the chestnut grove above the springs of the mineral Fiuggi mineral water.

Humic substances are also present in the aquifer depending on the aquifer geology and chemistry. Moreover, the environment in which the humification processes take place strongly influences the structural composition of the humic compounds, which are different in structure and elementary composition.

The research work has been structured with two main objectives

- 1) characterization studies (pyrolysis-GC-MS, NMR and FT-IR) carried out on the fulvic component extracted from soil and mineral water;
- 2) studies about the effect of different soil coverages and land uses on the chemical, physical and biochemical properties of soil; in particular, the effect of different types of coverage on humic substances was studied from a qualitative and quantitative point of view, through the comparative analysis of humic

substances extracted from soils and water by FT-IR, and, the biochemical and enzymatic activity of the microbial soil population involved in the humification processes of three differently managed areas present in the study area.

The results obtained from this study showed, in the comparison between the FA extract from water and those isolated from the soil above the aquifer, spectral analogies and qualitative similarities of pyrolytic profiles. The comparison among the different soil land uses shows that soil use influences the humification processes and therefore also the FA from a qualitative/quantitative point of view.

**Key words:** fulvic acid, water, ecosystem services, chestnut forest, humification processes

## **EXTENDED ABSTRACT**

### **FULVIC ACID AS AN ENVIRONMENTAL RESOURCE FOR THE ECOSYSTEM SERVICES ENHANCEMENT OF THE ANTICOLANA VALLEY**

The PhD thesis project, with a view to enhancing the contribution of the chestnut ecosystem, studies the humification products (fulvic acid, FA) that originate from the chestnut forest soil above the mineral springs of the Fiuggi mineral waters in order to compare them with the organic substance isolated from the mineral waters of Fiuggi. Humic substances are present in aquifer depending on the aquifer geology and chemistry. Moreover, the environment in which the humification processes take place strongly influences the structural composition of the humic compounds that differ in structure and elemental composition.

#### **INTRODUCTION**

This research work has been organized with two main objectives

- 1) characterization studies (pyrolysis-GC-MS, NMR and FT-IR) carried out on the fulvic component extracted from the soil and mineral water of Fiuggi;
- 2) studies about the effect of different soil coverages and land uses on the chemical, physical and biochemical properties of soil. In particular, the effect of different types of cover on soil humification processes and humic substances from a qualitative and quantitative point of view has been investigated through the comparative analysis of humic substances extracted from soil and water by FT-IR, the biochemical and enzymatic activity of the soil microbial population involved in the humification processes of three areas with different management present in the study area, and the determination of the EL-FAME profile for the soil microbial community characterization.

## BACKGROUND

The chestnut forest ecosystems cover an area of about 35,000 hectares in the Lazio Region. They represent an ecological and socio-economic reality relevant especially for inland areas.

Their traditional ecosystem services are chestnuts, wood, carbon dioxide absorption, tourism and recreational activities. The surface area of chestnut trees in the territory of Fiuggi is quite small. Slightly more than 200 hectares, however, it has relevant functions. Compared to the conventional context, the chestnut forest of Fiuggi provide an "unconventional" one, produced by the complex "water-chestnut forest-litter and soil". Some old studies have recognized to the forest ecosystem a direct responsibility for the enrichment of water with humic substances with remarkable therapeutic properties. Directly because, the extensive forest chestnut of the Anticolana Valley (250 hectares) is located above the hydro-mineral basins of the waters of Fiuggi. The chemistry of the Fiuggi natural waters basin is significantly influenced by the characteristics of the litter and soil. Rainwater, in its continuous vertical flows it passes from chestnut litter and then in pyroclastic layers characterizing of this area. Mineral water improve its quality during the underground cours. As consequence of the chemical-physical processes, water acquires its composition (Davydova et al. 2014) with low mineral salts and enriched with organic substances.

Fulvic acids in soil are water soluble in a wide range of pH (3-8): rainwater flows through soil with the effect of moving fulvic acid in the ground water. The presence of chestnut groves in the Anticolana Valley has enriched Fiuggi hydrothermal water organic compounds, providing them with important properties: it prevents stones formation and/or facilitates their expulsion. Water exploitation has positive effects on local socio-economy system. The Fiuggi basin and its delicate hydrogeological balance are extremely sensitive to geological, hydrogeological and ecological features of the area. The particular sensitivity and fragility of the natural system is due the high plant cover types variability.

Moreover, as observed in previous study, the different soil land uses could affect ground/spring water quality through variation of the humic substances (fulvic acids) characteristics due to different humification process pathway.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Study area and Soil sampling***

The study area is the Anticolana Valley, in Lazio region in central Italy (Figure. 1A), where the municipality of Fiuggi is the most important city (Latitude: 41° 47' 52.08" N, Longitude: 13° 13' 25.90" E). The area between the Municipality of Fiuggi (geographical coordinates: 41°48' N and 13°13' E) and the Municipality of Acuto (geographical coordinates: 41°47' 30.94 N and 13°10' 23.94 E) is covered by 212 hectares of chestnut coppice forest.

This area has been included in the EU Natura 2000 Network for the relevant ecological values of the chestnut habitat and other minor species important for flora and fauna (Regional Council Resolution 158/2016).

### ***Experimental site 1***

The present study considered samples taken from three forest areas:

Bosco d'Anagni (Lat: 41°47.2454- Long: 13°13.0799- mt quota: 50.010266)

Bosco Le Prata (Lat: 41°47.1595- Long: 13°13.4982- mt quota: 50.006155)

Bosco Le Cese (Lat: 41°46.5775- Long: 13°13.0414- mt quota: 50.032194)

Three homogeneous plots (150 x 150 m) that represent the three areas have been chosen. The forest areas are located above the oligomineral spring of the Fiuggi waters.

Soil sampling was performed according to a randomized block design, taking 4 soil samples per site, each soil sample was a compound of 3 theses. All 12 samples were analysed separately.

## ***Experimental site 2***

To emphasize the ecosystem service played by the chestnut cover on the quality of spring waters, this research focuses its attention on a representative Basin's Fiuggi area: Le Cese. This area, derived from volcanic tufa, includes from the North - East to South-West direction, three different land use soil types: golf green – chestnut forest – natural herbaceous species.

Soil sampling was performed according to a randomized block design, 3 parallel transects were identified and on each transect 9 different samples were taken.

### ***Isolation of fulvic acids from soil and water according to IHSS method***

According to the method standardized by the International Humic Substances Society (IHSS), for the isolation of fulvic acids from the soil, 10 g of soil samples were suspended in 100 ml 0.1 M HCl, and equilibrated at a pH value between 1 and 2 with 1 M HCl at room temperature.

The suspension was shaken for 1 hour and then centrifuged at low speed. The supernatant (FA Extract 1) was used for the isolation of fulvic acid.

The residual fraction was neutralized with 1 M NaOH at pH 7 by adding 100 ml of 0.1 M NaOH in N<sub>2</sub> atmosphere. The suspension was agitated intermittently for at least 4 hours under N<sub>2</sub> flow. The alkaline suspension was left to decant for 24 hours and the supernatant recovered after centrifugation and equilibrated to pH 1 with HCl 6M. The sample was centrifuged to separate the fractions of humic acid (precipitate) and fulvic acid (supernatant - FA Extract 2). The supernatants derived from the two extractions were passed through columns of Polyvinylpyrrolidone (PVP) (0.15 ml resin per gram of initial dry weight of the sample with a flow rate of 15 volumes read per h). Once the effluent was removed, the polyvinylpyrrolidone (PVP) column containing absorbed fulvic acid was washed with 0.65 volumes of distilled H<sub>2</sub>O column. Then the fulvic fraction adsorbed on Polyvinylpyrrolidone (PVP) was separated with a bed of 0.1 M NaOH.

The recovered solution was immediately acidified with HCl 6 M at pH 1. The final eluates obtained from each extracts were pooled and passed in a new column packed with Polyvinylpyrrolidone (PVP) following the same protocol of the isolation of the previous fractions. The desorbed eluate was acidified using a cation exchange resin saturated with H<sup>+</sup> (Amberlite 120) using three times the mole of Na<sup>+</sup> ions in solution. The eluate was frozen and lyophilized to recover the fulvic acid. At the same time, in order to isolate the fulvic fraction, 280 litres of mineral water, taken from the Fiuggi plant, were subjected to: concentration with DAX8 resin, acidification with amberlite, freeze-drying. The method was described in Thurman and Malcom 1981, and standardized by IHSS.

#### ***Characterization of fulvic acid extracted from soils and mineral water with Fourier-transform (FT)-IR analysis***

The fulvic fraction isolated from soil and mineral water samples has been characterized with FT-IR. For the determination of FT-IR spectra of fulvic acids, in water and soil, about 2 mg of FA sample were ground and homogenized together with 100 mg of anhydrous KBr (or other anhydrous halide such as KBr, NaCl or CsI), in an agate mortar and finally compressed under vacuum with a hydraulic press to obtain a homogeneous tablet. For the determination of the spectra a FT-IR Jasco 4100 was used.

#### ***Comparative analysis of chromatographic profiles by pyrolysis gas chromatography mass spectrometry (Py-GC-MS)***

Approximately 4 mg of freeze-dried fulvic acid was mixed with 10 µl tetramethylammonium hydroxide (TMAH) dissolved in methanol (50% w/v) (SigmaAldrich), and heated for 5 minutes at 40°C to evaporate the methanol. The GC separations were performed on a Shimadzu QP5050 gas chromatograph (Figure 23), using a BPX capillary column (SGE) (30 m x 0.25 mm). The column temperature was programmed from 60 to 300°C. Compounds were identified

with GC retention times and comparisons of their mass spectra with NIST 107 and NIST 21 libraries.

### ***Comparative analysis of NMR spectra related to $^{13}\text{C}$ and $^1\text{H}$ of fulvic acid isolated from soil and mineral water***

NMR spectra for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  were recorded using Bruker DRX spectrometers (Bruker, Karlsruhe, Germany) with tetramethylsilane (TMS) as standard. Approximately 100 mg of lyophilised sample was dissolved in 1 ml of 0.1M NaOD/D<sub>2</sub>O under N<sub>2</sub>. The samples thus prepared were brought to pH 13. After filtration, approximately 0.5 ml of the sample was put into an NMR test tube for the analysis.

### ***Biochemical and enzymatic activity***

Enzyme activities have been measured with the fluorimetric method according to Marx et al. (2001) and Vepsäläinen et al. (2001), using fluorogenic methylumbelliferyl (MUF)- substrates method. The enzymes studied are involved in the C and N biogeochemical cycles:  $\beta$ -glucosidase (BG; EC 3.2.1.21),  $\alpha$ -glucosidase (AG; EC 3.2.1.20),  $\beta$ -xylosidase = xylosidase (Xylo; EC 3.2.2.27),  $\beta$ -cellobiohydrolase = cellulase (CELL; EC 3.2.1.91), N-acetyl- $\beta$ glucosaminidase = chitinase (CH; EC 3.2.1.30), leucine aminopeptidase (LAP; EC 3.4.11.1).

SEIc/Corg ratio, expression of specific enzyme activities with respect to total organic C (Marinari et al., 2020), has been calculated.

Shannon's diversity index ( $H' = \sum p_i \ln p_i$ ) was computed from enzymatic rates as a measure of functional diversity (Bending et al., 2004), where "pi" is the ratio of a single enzymatic activity to the sum of all enzymatic activities.

### ***EL-FAME profile***

The structure of the microbial community has been characterised by the analysis of fatty acid methyl esters (EL-FAME), using a transesterification method.

FAME were quantified in GC-MS. Methylated fatty acids have been identified based on their mass spectrum and using BAME 24 (47080 U) and 37 FAME Mix (47885-U, Sigma-Aldrich) as chemical standards. The data were expressed as a relative quantity, calculated as the area of each EL-FAME peak compared to the summed area of all EL-FAME peaks.

### **CONCLUSIONS**

With a view to enhancing the contribution of the chestnut ecosystem, the thesis project studied, in the first phase of the project, the humification products (fulvic acid, FA) that originate from the soils of the chestnut groves above the mineral springs of the mineral waters of Fiuggi, with the aim of comparing them with the organic substance isolated from the Fuggi mineral waters in order to enhance the similarity and identify in the chestnut grove the origin of the fulvic acid present in the waters. The PhD thesis project included characterization studies (pyrolysis-GC-MS, NMR, FT-IR, IRMS) carried out on the fulvic component extracted from soil and mineral water. The analytical results obtained show that the fulvic acids present in Fiuggi mineral water (154 mg of FA were isolated in 280 l of water, corresponding to a concentration of 0.55 mg l<sup>-1</sup>) have spectral similarities and qualitative similarities of the pyrolytic profiles with the fulvic acid isolated from the soil above the aquifer covered by a chestnut forest.

A second research objective was to study the effect of different soil coverage and land uses on chemical, physical and biochemical properties of soil.

The results obtained show that the natural grassland present a better state of SOIL health and a greater quantity of SOM, compared to chestnut forest soil and golf field. Despite this, based on the quantity of FA found, it can be inferred that chestnut forest has a greater capacity to produce humic substances with high

solubility. Furthermore, by the comparative analysis of Fourier-transform (FT)-IR spectra of the FA isolated from soils and mineral water, it can be assumed that the FA in mineral water originates from the humification processes that take place in chestnut forest. Therefore, this study suggest that in Fiuggi area the water quality can be affected by land use. The water quality is closely related to the ability of the soil to function and promote the productivity of plants and animals. The maintenance and promotion of soil quality is therefore a fundamental requirement to ensure the sustainability of the ecosystem.

## **CAPITOLO 1**

### **PREMESSA**

All'inizio del XXI secolo, le Nazioni Unite hanno pubblicato il Millennium Ecosystem Assessment (ONU, 2006). Uno degli obiettivi era la conservazione e l'uso sostenibile di questi sistemi e il loro contributo al benessere umano. Una delle principali prove dello studio è stata l'identificazione di due componenti: il capitale naturale e i servizi ecosistemici. La conservazione del capitale naturale è un obiettivo imperativo per garantire la continuità, la qualità e la quantità dei servizi ecosistemici, che sono il flusso dei benefici che contribuiscono al benessere umano.

Il 6° Obiettivo degli Obiettivi di Sviluppo Sostenibile 2015-2030 riguarda l'acqua. La scarsità d'acqua, la scarsa qualità dell'acqua e l'inadeguatezza dei servizi igienici hanno un impatto negativo sulla sicurezza alimentare (ONU 2015). L'acqua è una risorsa fondamentale per gli organismi viventi del pianeta, oltre che per l'attività agricola e industriale. Tuttavia, esistono acque che, per le loro intrinseche proprietà terapeutiche, forniscono servizi non convenzionali di notevole interesse per le comunità e per il sistema socioeconomico e sociosanitario. Esiste una stretta relazione tra le risorse idriche e le foreste, per cui la gestione forestale e la qualità dell'acqua sono strettamente legate.

Le foreste, la lettiera degli alberi e la fauna associata modificano radicalmente il suolo in modi cruciali per l'idrologia dei bacini idrografici, la qualità dell'acqua e l'habitat dei corsi d'acqua. I suoli forestali si differenziano dai suoli agricoli e da quelli urbani e suburbani in termini di organismi. Le foreste sviluppano sistemi radicali profondi ed estesi, depositano foglie, aghi e lettiera di arti sulla superficie del suolo che si traduce in un suolo forestale con livelli relativamente elevati di materia organica e che ospita una micro e macrofauna diversificata (Neary, 2009). L'acqua piovana viene intercettata dalla chioma della foresta e questo ne

riduce la potenza. Dalle foglie l'acqua piovana cade lentamente a terra, attraversando la lettiera, il suolo e poi raggiunge la falda acquifera.

Nelle aree forestali la chimica delle acque naturali è immediatamente influenzata dall'acqua di deposito e dal rilascio di sostanze nutritive da parte della vegetazione (Prestininzi, 1999).

Nella Valle Anticolana (Lazio, Italia) l'acqua piovana è oggetto di un processo più complesso. Un'area di 212 ettari coperti da bosco ceduo di castagno ha interessato parte del Comune di Fiuggi (coordinate geografiche: 41°48' N e 13°13' E) e di Acuto (coordinate geografiche: 41°47' 30.94 N e 13°10' 23.94 E). Quest'area è stata inserita nella Rete Natura 2000 dell'UE per i valori ecologici rilevanti dell'habitat del castagno e di altre specie minori importanti per la flora e la fauna (Delibera del Consiglio Regionale 158/2016). In quest'area l'acqua piovana intercettata dalla chioma del castagneto, nei suoi continui flussi verticali, passa dalla lettiera del castagno e poi negli strati piroclastici che caratterizzano quest'area. Le acque minerali migliorano la loro qualità durante i corsi sotterranei (Calace, 1999).

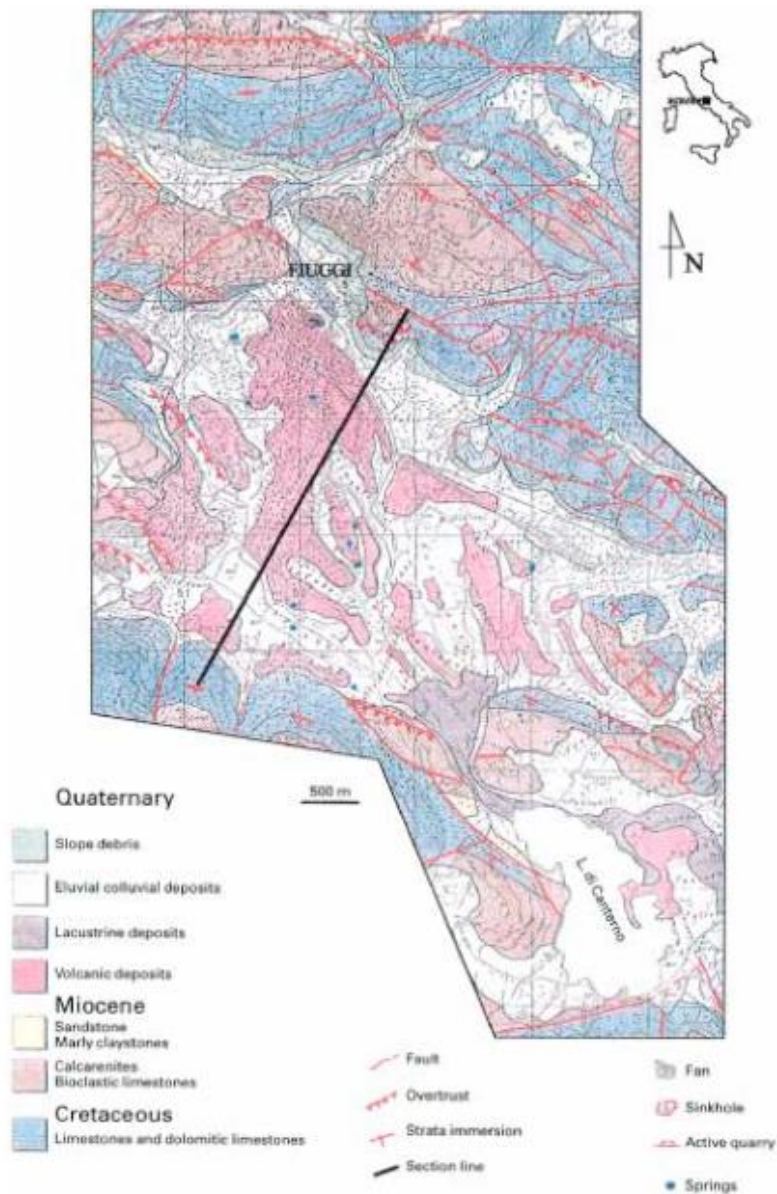
## **Aspetti territoriali e geologici della Valle Anticolana**

Il bacino di Fiuggi si trova all'interno della cresta calcarea dei Monti Ernici e rappresenta una depressione endoreica allungato in direzione NW-SE, a un'altitudine media di 580 m sul livello del mare (Prestininzi et al.,1999).

Il bacino era originariamente costituito da terreno calcareo e nel tempo fu riempito con vari sedimenti quaternari. Tali terreni erano inizialmente carboniosi con clasti, sabbie e ghiaie trasportati poi via dalle pendici del bacino idrografico. La presenza di queste terre sopra il calcare del bacino fu probabilmente il principale fattore condizionante che portò alla successiva evoluzione della depressione. I prodotti vulcanici presenti nel bacino sono costituiti prevalentemente da sabbie piroclastiche e livelli di pomice che, a causa di condizioni deposizionali speciali, sono mescolati con cinerite argillizzata e sedimenti limoso-argillosi degli ambienti lacustri. Ciò ha dato origine a una struttura stratigrafica fortemente differenziata connessa a una struttura idrogeologica altrettanto complessa (Figura1).

La piana di Fiuggi appartiene al bacino idrografico sotto il lago di Canterno che è la destinazione finale di tutto il deflusso superficiale. Il corso d'acqua più importante che attraversa l'area è la fossa del Diluvio, che scorre da nord-ovest della città di Fiuggi per circa 2 km in direzione sud-est dove converge al centro della pianura e procede nella stessa direzione fino a quando non scarica nel lago di Canterno. Vicino a 'Madonna della Stella' il Diluvio intercetta il Fosso delle Cese che scorre da nord-ovest ai pendii della zona.

Il profilo idrogeologico (Figura 2) può essere ampiamente riassunto come una falda acquifera principale di estensione regionale situata nei depositi carboniosi più antichi (mesozoico-cenozoico) che compongono sia il fondo del bacino che l'ambiente circostante. Il fondo di questa falda acquifera è al livello delle grandi sorgenti, situate sul versante sinistro della 'Valle Latina'. La più settentrionale di queste sorgenti si trova a 300 m sopra il livello del mare.



**Figura 1** Profilo geologico (fonte: Prestininzi, 1999)

Per questo motivo, l'acqua che circola nel sottosuolo, e che influenza direttamente l'acqua "minerale" di Fiuggi, insiste su depositi recenti (quaternari) che riempiono il bacino e sono ad un'altitudine di circa 600 m sul livello del mare. L'acqua proveniente dalle piogge locali permea nel sottosuolo del bacino e satura il complesso di sedimenti quaternari dando origine ad un sistema di falde che interagisce con il sistema ecologico-litologico. Essendo costituito da materiali

variamente permeabili, in successione litostratigrafica, si producono strati d'acqua di diversa capacità e proprietà idrochimiche. Essendo concava la morfologia della depressione, la tendenza generale della stratificazione favorisce il trasferimento di acqua dalle aree marginali al centro della depressione dove si trovano le fonti più importanti.

Inoltre, la successione litostratigrafica contiene corpi sedimentari dalla deposizione fluviale nelle incisioni fatte da corsi d'acqua, che hanno nel tempo eroso in modo discontinuo i terreni vulcanici.

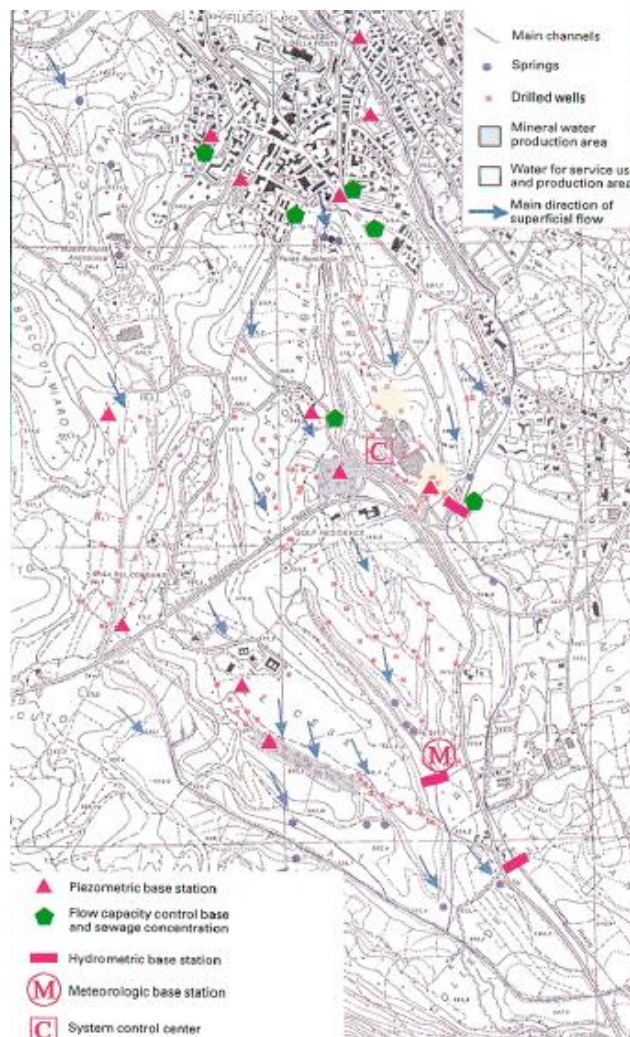
La falda acquifera del bacino di Fiuggi è quindi caratterizzata dall'alternanza di depositi poco permeabili, rappresentati da livelli lacustri argillosi e limosi, con sedimenti più permeabili e livelli piroclastici. Questa alternanza provoca una chiara frammentazione della risorsa idrica sotterranea sia verticalmente che orizzontalmente. Questa situazione è resa ancora più complessa dalla presenza di depositi di detriti pendenti fortemente interdigitati con depositi lacustri e piroclastici ai bordi del bacino che potrebbero suggerire una fornitura laterale, anche se limitata della falda acquifera. In questa situazione, i siti sorgivi più importanti da un punto di vista storico sono la 'Sorgente Anticolana' e la Sorgente Bonifacio VIII, situate all'interno del bacino, di solito ai piedi di piccole creste dove i sedimenti piroclastici sono più spessi.

Analisi delle caratteristiche idrogeochimiche delle acque 'minerali' di Fiuggi mostrano una salinità e durezza estremamente basse, tipiche delle acque a circolazione rapida e breve vita sotterranea.

La falda acquifera dell'acqua "minerale" di Fiuggi può essere schematizzata come un sistema di strati sovrapposti, indirettamente comunicanti attraverso fenomeni di drenaggio, tipici di depositi poco permeabili che consentono il movimento verticale dell'acqua sotterranea. Data la discontinuità dell'area dei diversi livelli, non è possibile fornire una descrizione dettagliata della circolazione delle acque. Ci sono attualmente quattro aree: ovvero le sorgenti storiche Anticolana, Bonifacio VIII, Sambuco Villaggio e le Cese. Gli

affioramenti carboniosi del bacino di Fiuggi hanno un'area di circa 40 km<sup>2</sup> e consentono un'infiltrazione media annuale di poco meno di 0.9 m<sup>3</sup> / s.

L'efficienza di infiltrazione è di 500 mm / anno. Nel suo flusso verticale continuo veloce, l'acqua passa attraverso il suolo vegetale, i terreni vulcanici e torbosi. Oltre ai rari minerali presenti in questo terreno, l'acqua assume alcune macromolecole di acido umico e acido fulvico (Calace, 1999).



**Figura 2** Profilo idrogeologico (Prestininzi et al., 1999)

## **Acque minerali del bacino idrotermale di Fiuggi**

L'Acqua di Fiuggi è conosciuta da tempo per le sue proprietà terapeutiche, ritrovamenti archeologici dell'epoca Romana ne attestano tali virtù (Statuti A, Atti Accademia Pontificia Nuovi Lincei, 1879,1886,1897) Personaggi illustri quali Bonifacio VIII e Michelangelo Buonarroti apprezzarono le sue proprietà anti-litiasiche e depurative. La lettera del 1549 scritta da Michelangelo Buonarroti, sofferente di calcoli renali, è una delle più antiche e illustri testimonianze dei benefici ottenuti bevendo l'acqua Fiuggi. La storia racconta che dalla miracolosa acqua trassero giovamento i dolori di re, nobili e ambasciatori. Anche Papa Bonifacio VIII, che era nato in Ciociaria e conosceva bene la fonte, fece ricorso a questa salutare acqua. I registri contabili pontifici dell'epoca annotano infatti ben 187 ordini di pagamento per il trasporto dell'acqua da Fiuggi a Roma. Altri personaggi famosi in epoca più recente si sono curati con successo bevendo Acqua Fiuggi: da Papa Pio X a Giovanni Giolitti, da Benedetto Croce ad Alcide De Gasperi. Nella Regione Lazio l'analisi delle sorgenti idrominerali ricadenti nel territorio di appartenenza al Distretto ha condotto all'individuazione di 10 sorgenti idrominerali e 12 sorgenti termali tra queste è riconosciuta l'acqua minerale di Fiuggi. Secondo l'attuale disciplina igienico-sanitaria (Regio Decreto 28 settembre 1919 n° 1924 *“Regolamento per l'esecuzione del capo IV° della Legge 16/07/1916, n° 1947 concernenti disposizioni circa le acque minerali naturali e gli stabilimenti termali, idroterapici, di cure fisiche ed affini”*; D.M. 20/01/1927 *“Istruzioni per l'utilizzazione ed il consumo delle acque minerali naturali”*; D.Lgs 25/01/1992, n° 105 *“Attuazione della direttiva 80/777/CEE relativa alla utilizzazione ed alla commercializzazione della acque minerali naturali”*), e la disciplina delle acque minerali e termali nel Lazio, regolata dalla Legge Regionale n. 90/1980 e s.mi. e dell'art. 7 della L.R. n. 15 del 6.08.2007, il Ministero della Salute e la Regione Lazio, hanno riconosciuto l'acqua di Fiuggi come acqua minerale naturale. La

composizione chimica dell'acqua minerale di Fiuggi (Tabella 1), ne ha successivamente permesso la sua classificazione come acqua oligominerale: secondo il Decreto Lgs. 25/01/1992 n. 105, l'Acqua di Fiuggi può essere definita "oligominerale" in quanto il suo residuo fisso a 180° (145 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>) risulta al di sotto del limite di soglia di 500 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>. L'acqua di Fiuggi ha un pH di 7.2.

*Tabella 1* Caratteristiche dell'acqua di Fiuggi (Davydova, 2014)

<b>PARAMETRO</b>	<b>mg<sup>l</sup><sup>-1</sup></b>
<b>Calcio</b>	15-25
<b>Magnesio</b>	5-10
<b>Sodio</b>	5-10
<b>Potassio</b>	5-10
<b>Bicarbonato</b>	90-100
<b>Solfato</b>	<5
<b>Cloruro</b>	7-10
<b>Nitrato</b>	7
<b>Silice</b>	12-48

Alcuni studi della fine degli anni '90 hanno riconosciuto l'ecosistema dei castagneti della Valle Anticolana come direttamente responsabile dell'arricchimento delle acque con composti organici di importanza terapeutica. La responsabilità è definita diretta, perché l'esteso castagneto della Valle Anticolana insiste sui bacini idro-minerali delle acque di Fiuggi.

In conseguenza dei processi chimico-fisici, l'acqua acquisisce la sua composizione (Davydova, 2014): l'analisi delle caratteristiche idrogeochimiche dell'acqua della Valle Anticolana mostra una salinità estremamente bassa (basso contenuto di sali di Ca, Mg e K) e una durezza tipica delle acque a circolazione

rapida con una breve vita sotterranea. La sua composizione chimica è caratterizzata da un basso livello di mineralizzazione (142-200 mg/l<sup>-1</sup>), dalla presenza di biossido di silicio (12-48 mg/l<sup>-1</sup>) e da sostanze umiche.

Si attesta largamente l'utilizzo di Acqua Fiuggi nel trattamento di:

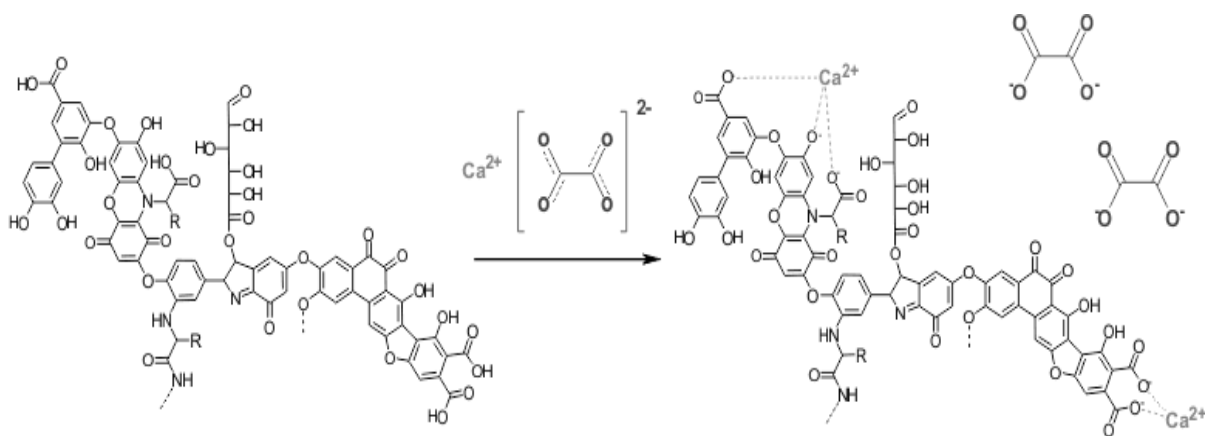
- gotta;
- glomerulonefrite cronica;
- diatesi urica e ossalica;
- calcolosi delle vie urinarie;
- flogosi
- spasticità delle vie urinarie.

Fin dalla seconda metà del 900, la scienza moderna ha iniziato a studiare quest'acqua per approfondirne le conoscenze sulle sue proprietà diuretiche, depurative e di stimolo alla funzionalità renale, nonché sul suo meccanismo d'azione

La configurazione idrogeologica del bacino di Fiuggi è tale che l'acqua scorre in un letto relativamente poco profondo, situato ad una profondità compresa tra 8 e 20 m in un terreno con una ricca copertura di boschi e di altra flora risalente ad epoche remote. Le sostanze umiche e fulviche si formano per condensazione, polimerizzazione, ossidazione e riduzione di molecole di peso molecolare relativamente basso, che derivano dalla degradazione di biopolimeri come proteine, polisaccaridi, cellulosa, lignina, ecc. specifici di questo particolare ecosistema.

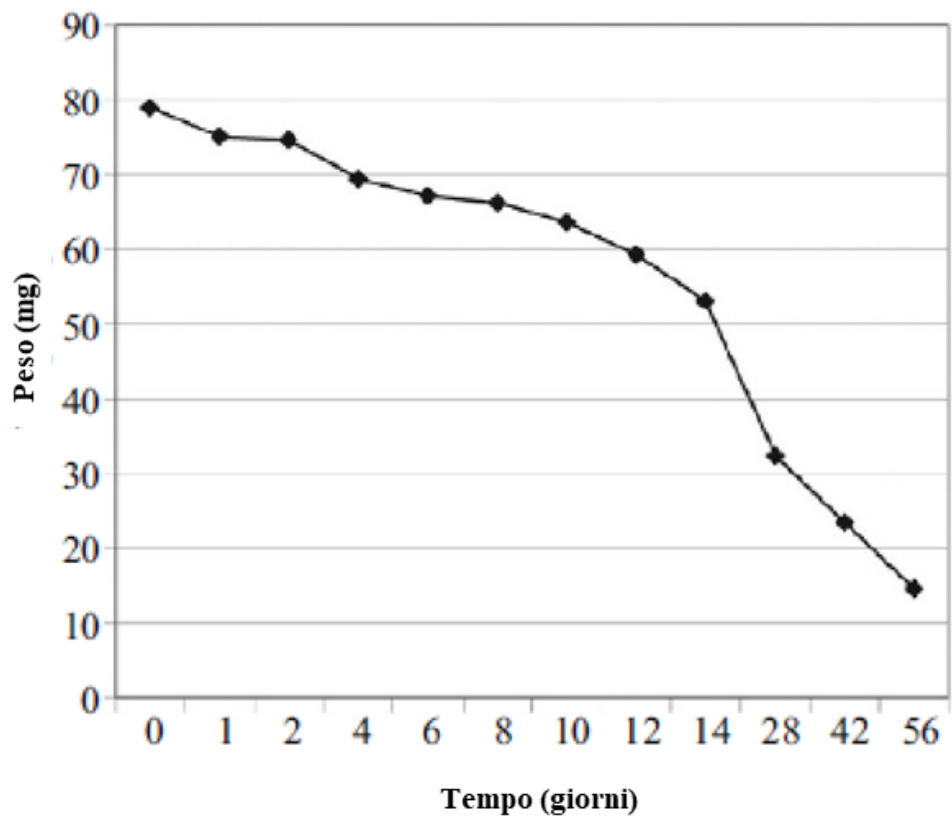
A causa della loro struttura (gruppi funzionali come carbossili, ossidrili, fenolici e alcolici, funzioni azotate, ecc.) le sostanze umiche, in particolare gli FA danno origine ad interazioni chimiche che portano alla formazione di composti di coordinazione con ioni metallici (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup>).

È stata condotta un'indagine per accertare l'effetto dell'assunzione di acqua di sulla struttura microcristallina dell'ossalato di calcio monoidrato presente nei sedimenti urinari di pazienti affetti da calcolosi ossalica idiopatica ricorrente (Fraiola, 2001). I dati riscontrati mostrano che l'assunzione di acqua di Fiuggi porta ad una forte riduzione, e a volte, anche all'eliminazione, del calcio ossalato monoidrato presente nei sedimenti urinari riducendo il rischio di calcolosi ossalica. L'acqua di Fiuggi contiene molecole organiche appartenenti alla famiglia degli acidi fulvici. Questi acidi sono in grado di complessare gli ioni calcio e di interagire preferibilmente con il reticolo cristallino dell'ossalato di calcio monoidrato attraverso la formazione di una pellicola e si comportano come sistemi di pompaggio legando lo ione calcio, demolendo il reticolo cristallino e solubilizzando l'ossalato di calcio. In Figura 3 viene raffigurata l'interazione tra le sostanze umiche e l'ossalato di calcio.



**Figura 3** Interazione tra le sostanze umiche e l'ossalato di calcio (Davydova, 2014)

Sono stati studiati gli effetti dell'acqua di Fiuggi sulla dissoluzione dei calcoli renali costituiti da ossalato di calcio. In Figura 4 è riportato il grafico che illustra, le variazioni di peso delle pietre di ossalato di calcio poste in acqua di Fiuggi per circa 60 giorni (De Angelis Curtis, 1999).



*Figura 4* Interazione tra le sostanze umiche e l'ossalato di calcio (Davydova, 2014)

## **INTRODUZIONE**

### **LE SOSTANZE UMICHE**

#### **La sostanza organica**

La materia organica del suolo (SOM) è comunemente definita come la frazione organica del terreno al netto dei residui vegetali e animali non decomposti. A volte, in una definizione più ampia, SOM comprende l'insieme di materiale organico (vivente e non vivente) presente in terreni, compresi quindi i microrganismi viventi e i residui non decomposti. La materia organica del suolo (SOM) è un sistema dinamico complesso i cui componenti chimici, microbici e biochimici cambiano nel tempo e nello spazio, a seconda di diversi fattori abiotici e biotici, degli input di residui organici e di il loro grado di associazione con componenti inorganici (Schnitzer & Monreal, 2011).

L'importanza ecologica della materia organica del suolo (SOM) è fondamentale per la sostenibilità a lungo termine della vita su questo pianeta. La SOM risulta essere uno dei più grandi bacini di stoccaggio del carbonio sulla terra, è in grado di “sequestrare” l’anidride carbonica e ridurne la quantità che viene immessa nell’atmosfera: il suolo presenta il doppio di carbonio rispetto a quello esistente attualmente nell’atmosfera. Il destino del carbonio del suolo immagazzinato con processi sia antropogenici che naturali è in parte dipendente dall'intricato equilibrio che esiste tra il carbonio immagazzinato e quello mineralizzato a CO<sub>2</sub> da microbiota che vive nel terreno (Simpson & Simpson, 2017).

Lo studio della SOM è iniziato due secoli fa per il riconoscimento del fatto che influenza la qualità del suolo e la crescita delle piante. Infatti, è proprio dalla quantità di sostanza organica in un suolo che ne dipendono le sue proprietà quali la capacità tamponante, la capacità di ritenzione idrica, la capacità di legare i

metalli, la stabilità degli aggregati delle particelle di suolo e l'assorbimento di composti organici idrofobici. Ad eccezione dell'ultima, tali proprietà, controllano la fertilità dei suoli, di fondamentale importanza per la sopravvivenza del genere umano.

La SOM contribuisce direttamente alla crescita della pianta e crescita microbica attraverso i suoi effetti sulle proprietà chimiche, fisiche e biologiche del suolo. La sostanza organica del suolo è la fonte principale degli elementi nutritivi essenziali N, P, e S. L'associazione della SOM con i minerali secondari come l'argilla e gli ossidi amorfi a formare complessi organo-minerali creano la struttura del suolo attraverso la formazione di aggregati. La formazione di aggregati migliora la struttura fisica del suolo organizzando i grani minerali del suolo e promuovendo l'aerazione e l'infiltrazione e lo stoccaggio dell'acqua. Una buona struttura del suolo favorisce la crescita delle piante e crea un labirinto di habitat per l'attività microbica (Horwath, 2007).

La trasformazione della sostanza organica del suolo dipende dall'insieme dei processi a cui i residui biologici sono soggetti: mineralizzazione, umificazione e interazione con i costituenti minerali.

La mineralizzazione è il principale processo di conversione della materia organica, in cui le sostanze organiche sono decomposte per degradazione microbica, e trasformate in CO<sub>2</sub> e in forme di azoto (N), fosforo (P) e zolfo (S) disponibili per le piante (Guo, 2019). Questo processo è favorito in ambienti aerati, con un'accentuata attività biologica e si verifica in presenza di microrganismi eterotrofi che necessitano di energia e di fonti di azoto per lo svolgimento delle proprie funzioni e la sintesi dei propri composti.

L'umificazione, d'altro canto, prevede una serie complessa di reazioni che portano alla formazione di macromolecole con una struttura sempre più lontana da quella d'origine, man mano che l'umificazione procede. Inoltre, la velocità di degradazione, oltre ad essere influenzata dalla resistenza intrinseca delle molecole, dipende anche dalla loro interazione con la componente minerale: si

possono formare, infatti, dei complessi molto stabili che aumentano lo stato di aggregazione e la stabilità del suolo rallentando i processi di degradazione microbica della sostanza organica: l'interazione con le argille o l'intrappolamento nei micropori degli aggregati del suolo possono agire come una vera e propria protezione fisica contro l'attacco microbico.

La sostenibilità a lungo termine delle risorse da cui deriva la SOM è fondamentale per il mantenimento e il miglioramento della qualità del suolo e della sua funzione ecosistemica, soprattutto negli agroecosistemi (Simpson & Simpson, 2017).

La comprensione dei cambiamenti qualitativi e quantitativi della SOM è fondamentale per gli aspetti agronomici che riguardano il suolo, come la dinamica dei nutrienti, la struttura, e la capacità di stoccaggio dell'acqua, così come per l'ambiente le questioni come la biodiversità, la lisciviazione dei nitrati e il carbonio stoccaggio (Schnitzer, 2006).

La SOM è uno dei materiali chimicamente più complessi che si trova in natura, in quanto sono fortemente eterogenee le classi dei composti organici presenti nel suolo e di conseguenza la loro composizione, così come sono profondamente eterogenei i processi di trasformazione che si svolgono nel suolo a carico di questi composti (Saiz-Jimenez, 1996).

Pertanto è chiaro il motivo per cui la struttura di SOM continua a essere un'area di ricerca attiva, è proprio questa complessità che ne determina l'importanza dell'azione svolta: le strade seguite dall'attività di studio di questa complessa rete di interrelazioni comprendono sia lo studio della dinamica della sostanza organica nel suolo (Zech & Guggenberger, 1996) sia la caratterizzazione e la definizione del ruolo dei diversi composti che ne entrano a far parte e ne determinano il tipo di interazione con le componenti inorganiche del suolo e con l'ecosistema in generale (Piccolo, 1996).

La SOM si differenzia in gruppi eterogenei di sostanze in relazione alla diversa stabilità biochimica, che vengono individuate attraverso i loro tempi di permanenza e residenza nel suolo; i gruppi si identificano in: residui organici

indecomposti che giungono al terreno; prodotti semplici della decomposizione, che costituiscono la componente labile della SOM; parte attiva, temporalmente intermedia, che è il substrato dell'attività biologica del suolo, e agglomeri più complessi di sostanze recalcitranti, che rappresentano i costituenti stabili della SOM, cioè la parte principale dell'accumulo del carbonio organico nel suolo (Andreux, 1996).

In sostanza possono essere definiti tre tipi distinti di sostanza organica (Stevenson 1994; Six e Jastrow 2002, Kwiatkowska-Malina, 2018):

(i) residui vegetali in decomposizione, ife fungine, radici di piante fini e biomassa associata che di solito è instabile e ha un breve tempo di turnover (< 1-2 anni);

(ii) una parte attiva o componente stabilizzata che include materiali organici parzialmente stabili e metaboliti microbici - di solito indicati come la frazione di humus (tempo di turnover di 5-25 anni);

(iii) la componente resistente o recalcitrante, fortemente stabilizzata chimicamente o fisicamente (tempo di turnover di 250-2500 anni).

Il materiale organico, in particolare il materiale vegetale nell'iniziale fase di trasformazione, è composto da carboidrati complessi (cellulose, polisaccaridi), proteine vegetali (alto contenuto di azoto), cere cuticolari, lipidi e lignina. I diversi componenti resistono alla trasformazione iniziale della sostanza organica materiali (dal più labile al più stabile) secondo il seguente ordine: zuccheri semplici < aminoacidi < proteine < cellulosa < emicellulosa < grassi, amidi e cere < lignina e tannini. La decomposizione di questi composti determina il rilascio di CO<sub>2</sub>.

Sebbene siano stati individuati una serie di composti presenti nella SOM, ne risulta ancora complesso il riconoscimento del ruolo e dell'attività specifica (Stevenson, 1994), ciò è dovuto alla rilevante variabilità e tipicità legate all'origine e ai processi di formazione e delle diverse interazioni con i fattori climatici e con la componente inorganica del suolo.

La sostanza organica del suolo è un'entità dinamica ed eterogenea composta da piante, animali, e componenti microbiche a diversi stadi di decomposizione combinati con una varietà di prodotti di decomposizione di diverse età e livelli di complessità.

Così, il turnover di questi componenti varia continuamente. La quantità di sostanza organica in un determinato suolo può aumentare o diminuire in relazione a molteplici fattori tra cui il clima, il tipo di vegetazione, la disponibilità di nutrienti, il tipo di microflora presente, l'uso del suolo e le pratiche di gestione (Six e Jastrow 2002).

Dal punto di vista chimico, la componente labile della SOM è costituita da biopolimeri cellulari come carboidrati, amminoacidi, peptidi, amminozuccheri, lipidi e da strutture più difficilmente metabolizzabili come cere, grassi, resine, lignine ed emicellulose (Piccolo, 1996). Tali biopolimeri, che derivano dalla degradazione chimica e biochimica dei residui degli organismi vegetali e animali, e, che giungono al suolo in seguito a morte o a senescenza e dalla ri-sintesi operata dalla flora microbica (Cheshire & Hayes, 1990), costituiscono la lettiera o l'orizzonte più superficiale nei suoli indisturbati; le sostanze più semplici (amminoacidi, zuccheri, acidi organici mono e di-carbossilici), solubili nella soluzione del suolo, sono velocemente disponibili come fonte di energia per la biomassa microbica e pertanto possiedono un tempo di residenza nel suolo molto breve. Le sostanze a peso molecolare più alto (proteine, acidi nucleici e polisaccaridi), vengono idrolizzate dai microrganismi a composti semplici e in seguito impiegati come fonte di energia, mentre, cere, grassi, resine e lignine sono difficilmente degradabili dai microrganismi e per questo motivo persistono nel suolo per periodi molto lunghi. In particolare, i carboidrati del suolo sono i costituenti più importanti della componente labile e rappresentano fino al 25% della sostanza organica totale (Cambardella & Elliot, 1992; Stevenson, 1994).

Le componenti umificate rappresentano i costituenti più stabili e recalcitranti della sostanza organica, possono costituire fino al 65% e il loro tempo di

residenza medio varia nei diversi ecosistemi da alcune decine a diverse centinaia d'anni; le sostanze umificate sono fortemente correlate con le componenti labili della SOM, essendo coinvolte in maniera diretta nei processi di accumulo e stabilizzazione della sostanza organica stessa (Piccolo, 1996).

## **Definizione e origine delle sostanze umiche**

Le sostanze umiche (HS) sono una categoria di composti organici naturali prodotti dai processi di umificazione del suolo, originati quindi dai processi di decomposizione e dalle trasformazioni chimiche e biologiche delle molecole provenienti dai resti e dalle emissioni di organismi vegetali e animali. (MacCarthy, 2001).

Le sostanze umiche sono miscele complesse ed eterogenee di materiali polidispersi formati da reazioni biochimiche e chimiche durante il degradazione e la trasformazione di resti vegetali e microbici (un processo chiamato umificazione); la lignina vegetale e i suoi prodotti di trasformazione, così come i polisaccaridi, la melanina, la cutina, le proteine, i lipidi, gli acidi nucleici, le particelle di carbone sottile, ecc. sono componenti importanti che partecipano a questo processo (Muscolo, 2013). Le sostanze umiche sono chimicamente altamente reattive ma recalcitranti rispetto alla biodegradazione. Le sostanze umiche rappresentano la componente più stabile e recalcitrante della sostanza organica e sono costituite dai prodotti della degradazione chimica e biologica dei residui provenienti dai tessuti vegetali ed animali e dell'attività di sintesi dei microrganismi, che tendono ad associarsi in strutture organiche complesse le quali risultano essere più stabili e resistenti alla degradazione rispetto al materiale di partenza (Dou, 2008; Ghabbour & Davies, 2014). L'elevatissimo grado di resistenza all'ulteriore degradazione microbica delle HS è attribuibile alle auto-associazioni delle molecole, alla protezione attraverso associazioni con i colloidali minerali del suolo, e all'intrappolamento negli aggregati del suolo (Ghabbour & Davies, 2014). La componente umica ha un tempo di residenza medio che varia nei diversi ecosistemi da alcune decine a diverse centinaia d'anni.

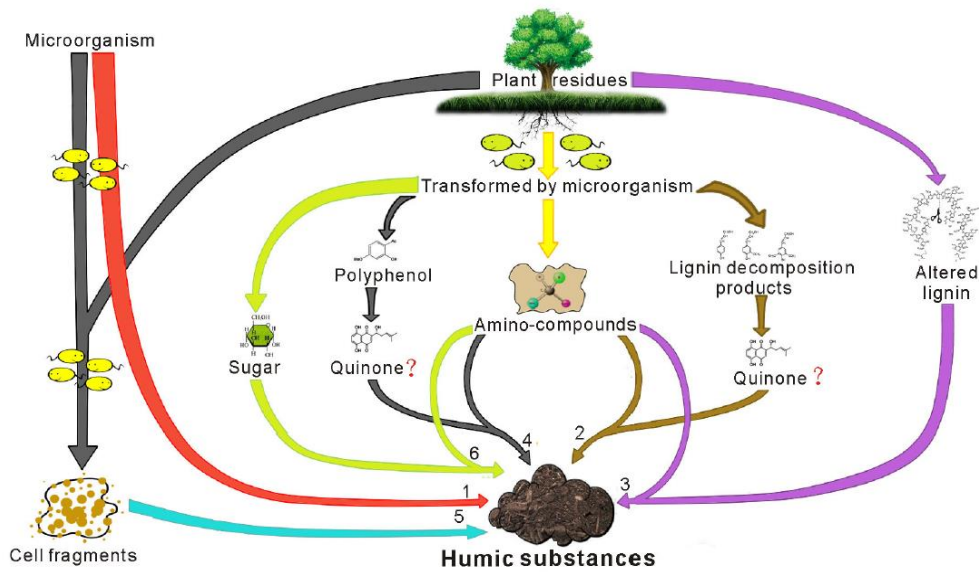
Dopo la morte, i residui organici di piante e animali, così come la biomassa microbica, si rivelano essere chimicamente modificati da una varietà di processi di decomposizione e di sintesi. Molte delle reazioni sono facilitate dalla presenza

di microrganismi viventi nel suolo o nell'acqua. Questi processi possono verificarsi in condizioni aerobiche e anaerobiche.

Sebbene il processo di formazione dell'HS sia stato studiato rigorosamente e per lungo tempo, la loro formazione è ancora oggetto di una lunga e continua ricerca. Alcune teorie sono state utilizzate per anni, come la teoria della condensazione zucchero-amminica, la teoria della lignina o la teoria dei polifenoli (Davis & Ghabbour, 1999). Attualmente, la gran parte dei ricercatori sostengono che l'HS abbia avuto origine dalla lignina. I polifenoli provengono principalmente dalla lignina durante la sua biodegradazione e probabilmente svolgono un ruolo chiave nel processo di formazione: sono caratterizzati dalla presenza di numerosi siti reattivi da permettere ulteriori trasformazioni, per esempio reazioni di condensazione. Possono essere considerati come precursori dell'HA.

È difficile dire quale sia il percorso corretto di genesi delle HS, risulta però generalmente accettata l'idea che l'origine delle HS sia diversa in ambienti diversi, ma nonostante i molteplici studi ancora non è possibile rappresentare uno schema del tutto soddisfacente per spiegare la natura e la presenza di HA e FA. In Figura 5 sono riportati i possibili pathway di formazione delle HS.

Le sostanze umiche, componenti principali della materia organica naturale, hanno un ruolo ecologico significativo nell'ambiente naturale (Stevenson, 1994). Le sostanze umiche (HS) sono una miscela di composti organici che possono costituire fino al 65% della sostanza organica del suolo.



**Figura.5** Possibili percorsi per la genesi delle sostanze umiche (Dou, 2001): Sono stati proposti diversi percorsi per la formazione delle HS durante la degradazione di residui vegetali, animali e microbici nel suolo

Riconosciute come i maggiori costituenti della SOM, le HS sono ubiquitarie nell'ambiente e svolgono un ruolo importante nel mantenere servizi ecosistemici del suolo poiché ne influenzano profondamente le proprietà e i processi fisici, chimici e biologici (Senesi, 2010). Le sostanze umiche sono fonte di energia e nutrienti per il biota del suolo. Sono carrier di carica, ligandi complessanti naturali ampiamente diffusi nell'ambiente, e svolgono un ruolo importante nell'adsorbimento di una varietà di inquinanti controllandone così la tossicità, il trasporto e il destino. Le sostanze umiche sono coinvolte nella formazione del suolo, influenzano la stabilità degli aggregati, la ritenzione idrica e le proprietà idrauliche del suolo (Ahamadou, 2013).

La loro natura refrattaria contribuisce alla loro persistenza, così come al loro ruolo essenziale nel flusso dei nutrienti attraverso il sistema ecologico nel suolo (Ukalska-Jaruga, 2019). Le HS sono considerate il più importante pool di carbonio organico transitorio refrattario nella sfera geologica (Rupiasih, 2005).

Le proprietà e la struttura di un dato campione di HS dipendono dalla fonte dell'acqua o del suolo, dalla vegetazione e dalle specifiche condizioni di estrazione. La maggior parte delle informazioni si riferisce a proprietà e struttura medie di un grande insieme di componenti di diversa struttura e peso molecolare.

### **Proprietà chimiche delle sostanze umiche**

L'ambiente in cui si svolgono i processi di umificazione influenza fortemente la composizione strutturale dei composti umici che si differenziano per struttura e composizione elementare. La complessità delle sostanze umiche e le loro importanti proprietà nelle applicazioni agricole (Peña-Méndez, 2005; Fahramand, 2014) hanno attratto e continuano ad attirare l'attenzione di molti ricercatori, portando negli anni nuove conoscenze sulla loro struttura, sulle proprietà fisico-chimiche e biologiche. Tuttavia, a causa dell'elevata eterogeneità di tali composti, non è ancora possibile individuare e definire con precisione una relazione tra la struttura e l'attività di queste sostanze

Per facilitare la loro separazione e permetterne una classificazione, le HS sono separate in tre diversi gruppi in base alla loro solubilità in un ampio intervallo di pH da acido ad alcalino: umina (H) è la componente insolubile delle sostanze umiche; acido umico (HA) è la componente solubile in condizioni alcaline ma che precipita in soluzioni acide ( $\text{pH} < 3$ ); acido fulvico (FA) è la componente solubile in condizioni sia alcaline che acide (Stevenson, 1994; Sutton e Sposito, 2005).

Questa classificazione, basata solo su criteri superficiali, non permette di estrapolarne le caratteristiche chimico fisiche e/o le loro strutture.

La composizione elementare e l'analisi quali-quantitativa dei gruppi funzionali delle diverse gruppi delle HS sono sensibilmente differenti.

La composizione elementare delle diverse componenti che costituiscono le HS mostra che gli elementi principali nella loro composizione sono C, H, O, N e S.

Questi elementi sono sempre presenti indipendentemente dalla loro origine e provenienza geografica (Tan, 2003; Kurkov, 2004).

L'analisi di un'ampia varietà di HS ha mostrato che la composizione percentuale di C, O, H e N varia nell'intervallo come segue: C (45-60); O (25-45); H (4-7); N (2-5) ed elementi inorganici (cenere) 0.5-5 (Ghabbour & Davies, 2014). In generale, acidi umici ed umina hanno dimensioni molecolari superiori a quelle degli acidi fulvici ed un minor contenuto in ossigeno, normalmente associato ad un più alto contenuto di carbonio. Il contenuto di carbonio del materiale di una data fonte di solito aumenta nell'ordine FA<HA<H e il contenuto di ossigeno segue l'andamento inverso.

Lo studio quali-quantitativo della composizione dei gruppi funzionali viene condotto in modo complementare all'analisi elementare-per caratterizzare l'HS in quanto permette di avere informazioni relative alle proprietà chimiche e strutturali dell'HS (Rupiasih, 2005).

Studi NMR hanno rivelato che l'HS contiene quattro tipi di gruppi funzionali, alchilici (lipidi, cere e idrocarburi alifatici), O-alchil (carboidrati), aromatici (lignina e polifenoli) e carbossilici (peptidi e acidi organici), che possono essere collegati alla stabilità dell'HS (Hopkins, 1997 A, 1997 B).

Lo scheletro degli FA è composto da idrocarburi alifatici; la struttura molecolare degli FA contiene una maggiore quantità di funzioni di natura acida, in particolare -COOH, -OH (Liu, 2019).

L'HA è composto per lo più da idrocarburi alifatici come componente fisso e pochissimi componenti aromatici (Hopkins, 1997 A; Liu, 2019). La struttura molecolare dei HA e FA isolati dai suoli è caratterizzata dalla presenza di nuclei aromatici, maggiori nelle strutture degli FA rispetto a quelle degli HA che viene riportato essere tra il 30-45% e il 10-20% rispettivamente (Liu, 2019). Ai fini della caratterizzazione delle proprietà chimiche delle HS è fondamentale la determinazione dell'acidità totale, questa risulta essere di molto maggiore per le sostanze costituenti gli FA (600-1400 mmol/100g) di quelle costituenti gli HA

(400-870 mmol/100g) (Stevenson, 1994). Indagini spettroscopiche permettono di individuare negli FA la presenza di ossigeno come elemento coinvolto in gruppi carbossilici, carbonilici ed alcolici (Rupiasih, 2005; Ahamadou, 2013) e l'acidità e il grado di polimerizzazione cambiano sistematicamente con l'aumento del peso molecolare. Mentre negli HA l'ossigeno è presente come componente strutturale del nucleo (Peña-Méndez, 2005).

Il rapporto C/O viene utilizzato come indicatore per esprimere il grado di acidità delle strutture costituenti gli FA, in particolare questo rapporto risulta essere maggiore nei componenti degli FA rispetto a quello degli HA (rispettivamente 0.70 e 0.50). Tale differenza è espressione di un più alto contenuto di gruppi carbossilici negli acidi fulvici rispetto agli acidi umici ed all'umina (Stevenson, 1994).

Il grado di aromaticità delle HS è evidenziabile attraverso il rapporto idrogeno/carbonio (H/C); in particolare tale rapporto riflette il grado di insaturazione di acidi umici, fulvici ed umina. Il valore di H/C risulta essere approssimativamente 1.0 per FA e HA mentre 1.5 per l'H, mostrando, un maggiore grado di aromaticità per gli acidi umici e rispetto all'umina, che invece presenta un maggiore contenuto di componenti alifatiche.

Tutte le componenti delle sostanze umiche si comportano come polielettroliti la cui caratteristica è una polidispersione sempre maggiore dell'unità (Stevenson, 1994), hanno proprietà anfifiliche e surfattanti e contengono funzioni radicaliche. I gruppi funzionali, che conferiscono tali caratteristiche sono gruppi carbossilici ed alcolici, sistemi amminici, ammidici, chetonici, cheto-acidi, chinonici, idrochinonici, imminici, alifatici, esterei ed eteri (Stevenson, 1994). Il loro insieme riflette la grande varietà di molecole che intervengono nella sintesi delle sostanze umiche.

## Struttura delle sostanze umiche

Gli HS sono molecole molto complesse e diversificate, ad oggi la loro struttura è oggetto di dibattito e di studi. Il problema principale nel definire una struttura per queste molecole è la grande varietà di reazioni chimiche e biologiche coinvolte nella loro genesi e la conseguente mancanza di sequenze ripetitive.

La comunità scientifica e in particolare coloro che si occupano di studiare le HS, hanno tentato di rivelare la struttura delle HS fin dal XVIII secolo, quando Achard (1786) isolò e frazionò le HS dalla torba per la prima volta. Le difficoltà incontrate nel descrivere con precisione le strutture e la reattività delle HS, a causa della complessità chimica e dell'eterogeneità delle HS, sono continuate anche quando si sono rese disponibili tecniche analitiche molto sensibili e potenti. Infatti, dato che le HS hanno origine dalla degradazione dei tessuti vegetali e dei metaboliti microbici, la loro eterogeneità molecolare è difficile da spiegare.

I lavori iniziali con cui si provava ad elaborare un modello strutturale delle sostanze umiche ipotizzavano che si trattasse di molecole ad alto peso molecolare prodotte da reazioni di polimerizzazione di precursori aromatici o chinonici a formare sistemi aromatici policiclici, intervallati da leganti di tipo alifatico, il cosiddetto “Modello Polimerico” (Kleinhempel, 1970), o polimeri eterogenei formati da subunità a struttura benzenica leganti, in modo covalente, strutture polipeptidiche, polisaccaridiche o alifatiche, con interazioni non covalenti intercatena a stabilizzare il tutto (Schnitzer, 1972).

Per queste ipotesi è stata elaborato un modello conformazionale definito a “gomitolo ripiegato” (Gosh e Schnitzer, 1980), che descrivere le variazioni conformazionali subite dalle macromolecole a seconda delle proprietà della soluzione; in questo modello le sostanze umiche sono descritte come fittamente raggomitolate ad alte concentrazioni, pH bassi ed alta forza ionica, mentre come colloidali lineari e flessibili a basse concentrazioni, pH neutri e bassa forza ionica.

Solo alla fine del secolo scorso si è cominciato a chiarire la vera natura delle HS, e conseguentemente la struttura (Piccolo 2001, 2002). È stato evidenziato che le sostanze umiche sono composte dai prodotti della parziale degradazione delle macromolecole vegetali (Baldok e al., 1992; Hatcher e Spiker, 1988; Piccolo, 2001; Wershaw, 1994; Hayes, 1990) tenute insieme da legami non covalenti (Piccolo, 2002). I modelli elaborati a partire da queste considerazioni sono riportati in letteratura come modello degli aggregati supramolecolari (Piccolo 2001). Questo modello sembra essere più rappresentativo della struttura delle HS negli estratti di suolo rispetto al modello dei polimeri umici. Numerosi studi (Piccolo, 2001, 2002; Nuzzo e Piccolo, 2013) hanno presentato le HS come sovrastrutture di grandi dimensioni apparenti e auto-assemblati da molecole eterogenee relativamente piccole tenute insieme principalmente da forze dispersive idrofobiche, contestando le ipotesi di polimeri macromolecolari che si sono succedute nel tempo. Pertanto le sostanze umiche risultavano essere aggregazioni a peso molecolare solo apparentemente grande, e le sue molecole costitutive, con un peso molecolare effettivo verosimilmente inferiore ai 1000 Da, erano tenute insieme in associazioni supramolecolari da forze deboli che potevano essere facilmente rotte dall'azione dell'acido acetico (Piccolo, 1996 b; Piccolo e Conte, 2000; Piccolo, 2001 a, b; Piccolo, 2002; Piccolo e Spitteller, 2003). Le HS da un punto di vista chimico, sono aggregati molecolari composti da zucchero, acidi grassi, polipeptidi, catene alifatiche e anelli aromatici, tenuti insieme da interazioni idrofobiche (es. Van der Waals) e legami a idrogeno (Stevenson, 1994; Simpson, 2002; Guimarães, 2013). In soluzione tali conformazioni sono ritenute termodinamicamente stabili, con la tendenza ad escludere molecole d'acqua dalle associazioni umiche e con una diminuzione dell'energia molecolare totale (Piccolo, 2002).

La comprensione della composizione molecolare di HS è cambiata in modo significativo negli ultimi decenni, con la proposta di una visione delle HS come aggregati di macromolecole o associazioni supramolecolari di piccole molecole

eterogenee auto-assemblanti derivate da materiali vegetali, animali e microbici definiti e i loro prodotti di decomposizione (Piccolo, 2001; Sutton e Sposito, 2005; Kelleher e Simpson, 2006; Baigorri, 2007; Wells, 2019). Il concetto supramolecolare sviluppato da Piccolo e collaboratori (Piccolo, 2001, 2002; Nuzzo e Piccolo, 2013) e il concetto di macromolecole polimerizzate e policondensate (Stevenson, 1994), secondo alcuni autori, possono entrambi essere giustificati come estremi tra l'effettivo comportamento HS (Baigorri et al., 2007).

### **Caratteristiche delle sostanze umiche acquatiche**

Nelle acque naturali si trova una serie di composti organici, dagli acidi idrofili a basso peso molecolare (MW), carboidrati, proteine e amminoacidi, fino ai composti di MW più elevati come le sostanze umiche (acidi fulvici e umici) (Choudry 1984). La maggior parte della materia organica acquatica è presente in forma disciolta [carbonio organico disciolto (DOC)] mentre una piccola quantità dei composti organici (generalmente circa il 10%) è in forma di particelle colloidali (Thurman, 1985). Le sostanze umiche acquatiche (AHS) sono macromolecole organiche complesse ed eterogenee che sono chimicamente o biologicamente sintetizzate da sostanze biogeniche (ad es. plancton, microrganismi, ecc.) o i loro prodotti di degradazione (Aiken, 1985), si verificano in tutti i tipi di acque naturali (fiumi, laghi, mari, o acque sotterranee) nel mondo (Stevenson, 1994), e forma complessi con inquinanti organici, metalli pesanti, radionuclidi, e nutrienti minerali (Aiken, 1985; Steinberg, 2003; Tipping, 2002). Le proprietà chimiche intrinseche delle AHS sono determinate dal loro luogo di origine e dalla natura del materiale da cui provengono (Malcolm, 1990; McKnight, 1998). Le sostanze umiche costituiscono una componente importante (50-80%) del pool di materia organica negli ecosistemi d'acqua dolce (Thurman, 1985; Wetzel, 2001) e a causa della loro ubiquità e della varietà dei gruppi

funzionali, le AHS hanno il potenziale di influenzare quasi tutte le vie biochimiche e biogeochimiche sia negli organismi d'acqua dolce che negli ecosistemi. Le sostanze umiche giocano un ruolo diretto nella formazione dell'ambiente fisico e chimico di un corpo idrico che, in ultima analisi, determina la sua comunità biologica. La concentrazione di materia organica è solitamente bassa nelle acque sotterranee e marine [circa  $1 \text{ mg l}^{-1}$  di carbonio organico totale (TOC)] (Williams, 1971), variabile nelle acque superficiali (circa pochi  $\text{mg l}^{-1}$  TOC, con una media nell'intervallo  $5\text{-}6 \text{ mg l}^{-1}$  TOC) e può essere relativamente alta in alcuni casi specifici, come alcuni laghi eutrofici ( $30 \text{ mg l}^{-1}$  TOC e oltre) (Langlais, 1991).

## **OBIETTIVO**

La crescente attenzione al Capitale Naturale, in quanto matrice da cui derivano i numerosi servizi ecosistemici, include la comprensione della natura dei processi ospitati, il tipo di servizi offerti e da cui derivano le politiche e le azioni per la loro salvaguardia e valorizzazione. L'ecosistema forestale, attraverso le proprie componenti ed i relativi processi che lo governano, genera servizi ecosistemici di rilevante interesse pubblico generale concorrendo ad accrescere il livello di benessere della collettività. Un ambiente forestale sviluppa, numerose e insostituibili funzioni raggruppabili all'interno della sfera ecologico-ambientale, sociale e produttiva. In particolare, le funzioni ecologiche ed ambientali comprendono il controllo dell'erosione e della perdita di suolo, la regolazione del deflusso idrico, l'approvvigionamento e conservazione delle falde acquifere, la depurazione delle acque, la regolazione dell'equilibrio O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Gli ecosistemi forestali sono una componente chiave per garantire la depurazione e l'approvvigionamento idrico sostenibile, così come evidenziato nel Millennium Ecosystem Assessment pubblicato dalle NU nel corso del 2005. Le foreste svolgono un ruolo essenziale in riferimento alla tutela del suolo e delle acque. L'efficacia della protezione idrogeologica di un bosco è fortemente correlata con le condizioni ecologiche locali e varia al variare delle caratteristiche del soprassuolo forestale (composizione specifica, età, densità, grado di copertura, profilo verticale, forma di governo e trattamento selvicolturale), delle precipitazioni (intensità e durata) e delle caratteristiche idrologiche dei suoli. Nonostante sia largamente riconosciuto il ruolo della copertura forestale sui meccanismi di attuazione dei processi idrologici, meno noti sono gli effetti che il bosco, attraverso la sua lettiera, determina sulle caratteristiche idrologiche del suolo e sulla qualità delle acque (Santolini, 2010; Cullotta, 2013). La qualità dell'acqua è strettamente legata alla capacità del suolo di funzionare e di favorire la produttività di piante e animali.

Con l'obiettivo di evidenziare l'importanza della copertura forestale e dell'uso del suolo nei confronti della regolazione dei processi legati alla dinamica del sistema acqua-suolo, il presente lavoro studia un servizio ecosistemico "non convenzionale" fornito dal castagneto di Fiuggi (Valle Anticolana, Fiuggi, Lazio, Italia) e prodotto dal complesso "acqua-castagneto-lettiera-suolo".

L'acqua di Fiuggi da lungo tempo è nota per le qualità terapeutiche. Rispetto all'empirismo con cui è stata riconosciuta questa proprietà in passato, dalla fine degli anni '90 sono stati avviati degli studi per approfondire i meccanismi ed i caratteri che la tipicizzano, considerando anche l'evidenza che nel corso degli anni è divenuta una componente tipicizzante dell'economia locale. La natura di queste proprietà terapeutiche è stata attribuita agli acidi fulvici fin dagli studi degli anni '90. Tuttavia, non era noto il bio-processo con cui avveniva questo arricchimento, da cui l'obiettivo della tesi di individuare quale fosse la componente rilevante in questo processo di arricchimento.

Il castagneto di Fiuggi è un'area di 212 ettari di bosco ceduo di castagno che interessa la Valle Anticolana. Quest'area è stata inserita nella Rete Natura 2000 dell'UE per i valori ecologici rilevanti dell'habitat del castagno e di altre specie minori importanti per la flora e la fauna (Delibera del Consiglio Regionale 158/2016). In quest'area l'acqua piovana intercettata dalla chioma del castagneto, nei suoi continui flussi verticali, passa dalla lettiera del castagno e poi negli strati piroclastici che caratterizzano quest'area. L'acqua minerale migliora la sua qualità durante i corsi sotterranei.

Il bacino di Fiuggi e il suo delicato equilibrio idrogeologico sono estremamente sensibili alle caratteristiche geologiche, idrogeologiche ed ecologiche della zona. La particolare sensibilità e fragilità del sistema naturale è dovuta all'elevata variabilità dei tipi di copertura vegetale. Inoltre, il diverso uso del suolo può influenzare la qualità dell'acqua di falda attraverso la variazione delle caratteristiche delle sostanze umiche (acidi fulvici) a causa dei diversi pathway

del processo di umificazione. Nel caso specifico l'ecosistema complesso coinvolto non ospita soltanto boschi di castagno: l'ecosistema complesso che insiste sugli acquiferi si caratterizza per la presenza di una estesa area forestale castanicola sovrastante gli acquiferi, dei prati naturali contermini, e un prato gestito per attività ludiche.

Il progetto di tesi di dottorato, nell'ottica di valorizzare il contributo dell'ecosistema del castagno, studia i prodotti dell'umificazione (acido fulvico, FA) che hanno origine dal suolo del castagneto sopra le sorgenti minerali delle acque minerali di Fiuggi, al fine di confrontarli con la sostanza organica isolata dalle acque minerali di Fiuggi. Le sostanze umiche sono presenti nella falda acquifera a seconda della geologia e della chimica della falda. Inoltre, l'ambiente in cui avvengono i processi di umificazione influenza fortemente la composizione strutturale dei composti umici che si differenziano per struttura e composizione elementare.

Poiché l'FA è una molecola prodotta naturalmente a valle dei processi di umificazione della componente organica del suolo, con il fine di valorizzare, tutelare e migliorare i processi che naturalmente avvengono nell'ecosistema anticolano questo studio è stato indirizzato ad individuare l'origine delle sostanze naturali che sono presenti nelle acque, e quindi identificare l'esistenza di un nesso causale tra gli FA nelle acque e il suolo sovrastante

Considerando che, il diverso uso del suolo può determinare la variazione delle caratteristiche delle sostanze umiche (acidi fulvici) a causa del diverso percorso del processo di umificazione, e quindi come conseguenza nel caso specifico può influenzare la qualità delle acque, in questo progetto di tesi di dottorato si è inteso:

1. approfondire il contributo fornito dall'ecosistema castanicolo al processo di arricchimento delle acque con l'obiettivo di verificare la distribuzione spaziale e le similarità strutturali delle sostanze umiche lungo il gradiente verticale *castagneti-falda acquifera*;

2. approfondire il contributo fornito dall'ecosistema complesso (bosco di castagno, prato naturale e prato gestito) al processo di arricchimento delle acque, con l'obiettivo di studiare come le diverse coperture e gli usi del suolo ne influenzano le proprietà chimiche, fisiche e biochimiche.

In entrambe le fasi del progetto si è provveduto a isolare la componente degli FA dai campioni di suolo e dell'acqua minerale del bacino idrotermale di Fiuggi. L'estrazione e la purificazione degli FA, sono state eseguite secondo il metodo standardizzato dall'IHSS (International Humic Substances Society) dove questa componente viene purificata utilizzando HCl. Parallelamente, al fine di isolare la parte fulvica, 280 litri di acqua minerale, prelevati dallo stabilimento di Fiuggi, sono stati sottoposti a: concentrazione con resina DAX8, acidificazione con amberlite, liofilizzazione. Seguendo il metodo proposto da Thurman e Malcom 1982, successivamente standardizzato dall'IHSS.

La prima fase del progetto, volta a caratterizzare gli acidi fulvici nelle acque minerali di Fiuggi, e confrontarli con gli FA isolati e caratterizzati dai suoli provenienti da castagneti della Valle Anticolana, ha previsto l'analisi comparativa degli FA mediante:

1. spettroscopia IR a trasformata di Fourier (FT-IR)
2. pirolisi accoppiata con gas cromatografia e spettrometria di massa (Py-GC/MS)
3. spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)

Durante la seconda fase, in cui si è voluto valutare l'effetto dei diversi tipi di copertura sui processi di umificazione del suolo e sulle sostanze umiche da un punto di vista qualitativo e quantitativo, è stata effettuata:

1. L'analisi comparativa delle sostanze umiche estratte dai suoli e dall'acqua mediante FT-IR
2. La valutazione dell'attività enzimatica della popolazione microbica dei suoli.

3. La determinazione del profilo dei fosfolipidi di membrana (Fatty Acid Methyl Ester) per la caratterizzazione della comunità microbica del suolo.

Lo studio, nella sua più ampia visione, incontra alcune delle grandi tematiche rilevanti del Sustainable Development Goals, fissate nel 2015 dall'Assemblea Generale delle Nazioni Unite. Partendo dall'Obiettivo 6 (*Clean water and sanitation*), relativo alla gestione sostenibile dell'acqua, l'acquifero coinvolto nello studio è ben noto per le sue capacità terapeutiche che consentono un miglioramento della qualità della vita (Obiettivo 3, *Good health and well-being for people*) degli individui che soffrono di problematiche renali. Nel caso specifico l'ecosistema complesso coinvolto ospita boschi, prati naturali e prati artificiali rispetto ai quali occorre assicurare una gestione sostenibile (Obiettivo 15, *Life on land*) in grado di salvaguardare le proprietà organolettiche e terapeutiche dell'acqua sottostanti.

Conoscere l'arricchimento che il soprassuolo conferisce alle acque che attraversano il suolo vulcanico ospitante un ecosistema complesso in cui è presente un'estesa area boschiva, è estremamente prezioso ai fini della definizione di strategie finalizzate alla valorizzazione delle acque, alla corretta gestione del suolo, alla gestione sostenibile del capitale naturale forestale coinvolto e in definitiva per assicurare continuità di disponibilità nel tempo di questa importante risorsa per la sopravvivenza dell'uomo. Il mantenimento e la promozione della qualità del suolo, l'adozione di moduli e schemi selvicolturali, e di gestione forestale volti a conseguire una maggiore efficienza biologica dei soprassuoli, è quindi un requisito fondamentale per garantire la sostenibilità dell'ecosistema e consentire l'esaltazione delle molteplici funzioni ecosistemiche, con particolare riguardo per l'acqua.

## **CAPITOLO 2**

### **MATERIALI & METODI**

#### **AREA DI STUDIO E CAMPIONAMENTO DI ACQUA E SUOLO**

L'area di studio è la Valle Anticolana, nella regione Lazio in Italia centrale (Figura. 1A), dove il comune di Fiuggi è la città più importante (Latitudine: 41° 47' 52.08" N, Longitudine: 13° 13' 25.90" E). L'area compresa tra il Comune di Fiuggi (coordinate geografiche: 41°48' N e 13°13' E) e il comune di Acuto (coordinate geografiche: 41°47' 30.94 N e 13°10' 23.94 E) è coperta da 212 ettari bosco ceduo di castagno (Figura 6).

Quest'area è stata inserita nella Rete Natura 2000 dell'UE per i valori ecologici rilevanti dell'habitat del castagno e di altre specie minori importanti per la flora e la fauna (Delibera del Consiglio Regionale 158/2016).

La Valle Anticolana è caratterizzata da estesi castagneti che insistono sui bacini idrominerali delle acque di Fiuggi; la presenza di estese aree boscate di castagno in questa zona ha permesso alle acque del bacino idrotermale di arricchirsi in sostanze organiche.

#### **Sito sperimentale 1**

Le aree forestali del comune di Fiuggi, al di sopra delle falde delle acque minerali, che sono state oggetto dello studio sono state le seguenti (Figura. 6):

Bosco d'Anagni (Lat: 41°47.2454- Long: 13°13.0799- quota: 50.010266)

Bosco Le Prata (Lat: 41°47.1595- Long: 13°13.4982- mt quota: 50.006155)

Bosco Le Cese (Lat: 41°46.5775- Long: 13°13.0414- mt quota: 50.032194)

Sono stati scelti tre appezzamenti omogenei (150 x 150 m) rappresentativi delle tre aree. Le aree boschive oggetto del campionamento si trovano posizionate al

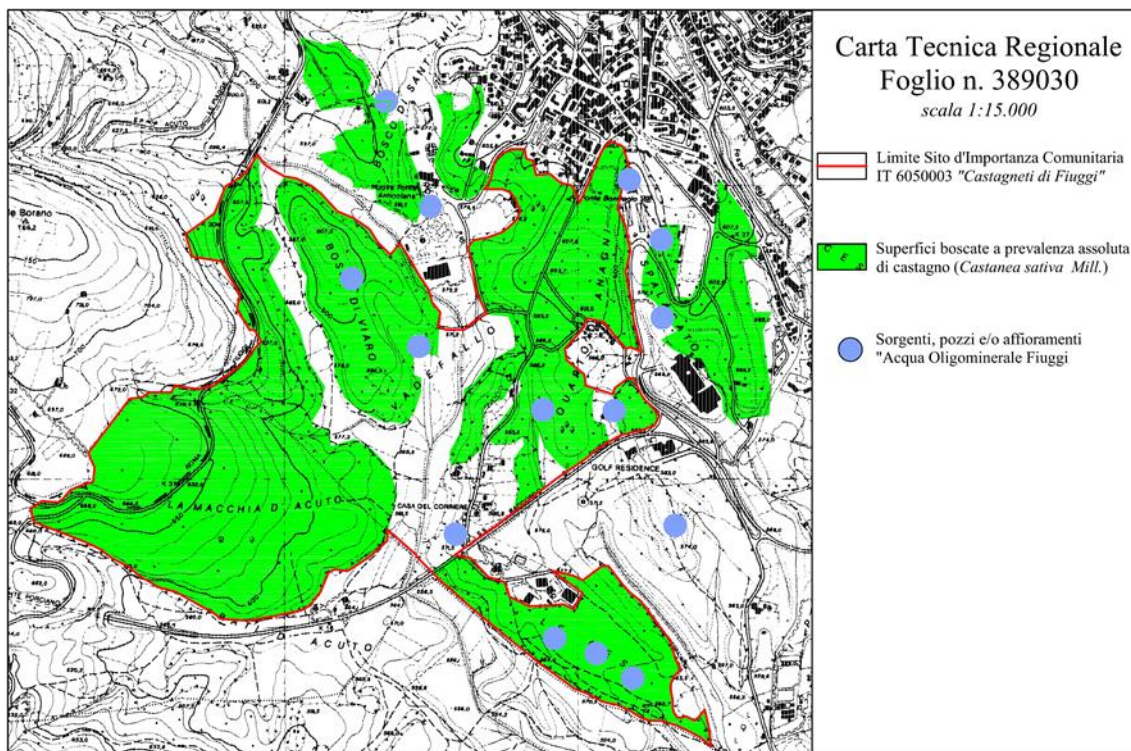
di sopra delle sorgenti di approvvigionamento delle acque oligominerali di Fiuggi come mostrato in Figura 7.

I campioni di suolo sono stati prelevati, nella primavera del 2018 con un campionatore a 20 cm di profondità, secondo un disegno a blocchi randomizzato, prendendo 4 campioni di suolo per appezzamento, ogni campione di terreno era un composto di 3 tesi. Tutti i 12 campioni sono stati analizzati separatamente.



**Figura 6** Posizione geografica dell'area di studio e indicazione dei siti di studio

● Quarto d'Anagni, ● Quarto Le Prata, ● Le Cese



**Figura 7** Carta tecnica della regione Lazio, in cui sono evidenziate le aree boschive della zona e le sorgenti di approvvigionamento delle Acque Oligominerali di Fiuggi

Nel giugno 2018 sono stati prelevati 280 litri di acque minerali imbottigliate di Fiuggi, fornite dallo stabilimento delle acque minerali di Fiuggi (Acqua e Terme di Fiuggi spa, Fiuggi-Lazio-Italia), e processati per estrarre la sostanza organica presente.

## Sito sperimentale 2

Per sottolineare il servizio ecosistemico svolto dalla copertura di castagno sulla qualità delle acque sorgive, questa ricerca focalizza la sua attenzione su un'area rappresentativa del bacino di Fiuggi: Le Cese. Quest'area, derivata dal tufo vulcanico, comprende, da Nord-Est a Sud-Ovest, tre diversi tipi di suolo a destinazione d'uso: prato gestito (golf green) - bosco di castagno Le Cese – prato naturale.

Il castagneto Le Cese è un'area boschiva di ceduo di castagno.

Per quel che riguarda il prato, questo è un ecosistema naturale che insiste sulla superficie da anni, sottoposto periodicamente ad una gestione conservativa, finalizzata al mero taglio superficiale delle erbe ed arbusti. Il mantenimento della copertura erbacea-arbustiva e la conservazione degli apparati radicali, assicurano le medesime funzioni di regimazione dell'acqua meteorica assicurata dal bosco, mentre non si hanno indicazioni precise sulla natura dei caratteri idrologiche del suolo e sugli effetti nelle acque.

L'area destinata ad uso ricreativo-sportivo (golf-green) è sottoposta ad una manutenzione frequente, con la formazione di un cotico erboso selezionato, soggetto ad un continuo controllo della crescita e della copertura del green, senza comunque uso di farmaci o altri prodotti di sintesi.

Il campionamento del suolo è stato effettuato secondo un disegno a blocchi randomizzato, sono stati identificati 3 transetti paralleli e su ogni transetto sono stati prelevati 9 campioni diversi (Figura 8).



*Figura 8 Area di studio e siti di campionamento*

## **CARATTERIZZAZIONE FISICO-CHIMICA DEI CAMPIONI DI SUOLO**

Le analisi chimiche, eseguite in triplicato, sono eseguite secondo quanto previsto dai “Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo” (MUACS) D.M. del 13/09/99 - riportati in Gazzetta Ufficiale n. 185 del 21 ottobre 1999.

I campioni di terreno sono stati setacciati (<2 mm), essiccati in stufa ad una temperatura inferiore a 40 °C.

Per la determinazione delle caratteristiche chimico-fisiche del suolo dei tre siti di prelievo sono state svolte le seguenti analisi:

### ***Granulometria***

Per la determinazione della granulometria, sono stati prelevati 10 gr. di campione passante a 2 mm non quartato, a cui sono stati aggiunti 200 ml di acqua deionizzata e 10 ml di una soluzione di esametafosfato di sodio. La sospensione è stata successivamente posta in agitazione meccanica per 2h, al fine di ottenere la completa disgregazione del materiale. La sospensione ottenuta dall'agitazione viene portata nel cilindro del levigatore di Andreasen (cilindro con capacità 500 ml), portata a volume con acqua deionizzata e omogeneizzata agitando il cilindro. Terminata l'agitazione, dalla sospensione di suolo presente nel levigatore si prelevano, ad opportuni intervalli di tempo, 2 aliquote da 10 ml ciascuna: il primo dopo 9 minuti e 36 secondi (tempo di sedimentazione del limo), e il secondo dopo 16 ore (tempo di sedimentazione dell'argilla).

I campioni prelevati sono stati successivamente posti in stufa a 105°C per essere seccati.

### ***pH (in H<sub>2</sub>O e KCl 1M)***

Per la determinazione del pH nei suoli, sono stati prelevati 10 g di campione di terra fine a cui sono stati aggiunti 25 ml di acqua o di soluzione salina (KCl). I campioni sono stati agitati per 2h e lasciati sedimentare per alcuni minuti. Il valore di pH è stato rilevato mediante l'introduzione del sistema elettrodico (pHmetro Hanna Instrument):

### ***Capacità di scambio cationico (CSC)***

Per la determinazione della CSC sono stati prelevati 2 g di suolo e posti in un tubo da centrifuga con tappo a vite da 50 ml, in cui sono stati poi aggiunti 25 ml di una soluzione di bario cloruro a pH 8.2. I campioni sono stati posti in agitazione per 15 minuti, e successivamente centrifugati a 3000 giri al minuto per 15 minuti. Il surnatante è stato eliminato. Successivamente il campione è stato lavato con 30 ml di acqua, agitato e centrifugato ed il surnatante eliminato. Con una buretta di precisione sono stati prelevati 25 ml di magnesio solfato 0.005M e trasferiti nel tubo contenenti il campione. Il campione è stato agitato fino a dispersione completa e poi centrifugato.

10 ml della soluzione limpida sono state trasferiti in matraccio conico di Erlenmeyer da 250 ml a cui sono stati aggiunti 100 ml di acqua, 10 ml della soluzione tampone pH 10 ed una punta di spatola di indicatore.

È stata preparata anche una prova in bianco sostituendo i 10 ml di campione con il magnesio solfato. Le soluzioni sono state titolate con la soluzione di (2.5 cmoli•l<sup>-1</sup>) di EDTA fino a colorazione azzurra. La capacità di scambio cationico (CSC) viene espressa in centimoli per kg di suolo (cmol • kg<sup>-1</sup>) o in milleivalenti per 100 g di suolo (meq • 100 g<sup>-1</sup>)

Per il calcolo viene utilizzata l'espressione:

$$CSC = 2 * [(V_b - V_a) * 0.25 * (25 + \text{peso } B - \text{peso } A)] / \text{peso campione}$$

dove:

CSC = capacità di scambio cationico, espressa in  $\text{cmol}(+) \cdot \text{kg}^{-1}$

$V_A$  = volume della soluzione di EDTA utilizzato per la titolazione della soluzione del campione, espresso in millilitri

$V_B$  = volume della soluzione di EDTA utilizzato per la titolazione della soluzione della prova in bianco, espresso in millilitri

A = massa del tubo da centrifuga + il campione, espressa in grammi

B = massa del tubo da centrifuga + il campione dopo saturazione con soluzione di bario cloruro, centrifugazione e lavaggio con  $\text{H}_2\text{O}$  25 ml/10 ml = rapporto volumetrico

M = concentrazione della soluzione di EDTA, espressa in  $\text{cmol} \cdot \text{l}^{-1}$

m = massa del campione utilizzata, espressa in grammi.

2 = fattore di conversione

### ***Carbonio organico totale (TOC) ed Azoto totale (TN)***

Il carbonio organico totale è stato determinato utilizzando analizzatore elementare Thermo.

Il metodo si basa sulla completa ed istantanea ossidazione del ( $680^\circ\text{C}$ ) con conseguente conversione di tutte le sostanze organiche e inorganiche in prodotti gassosi.

Per la determinazione del carbonio organico il  $\text{CaCO}_3$  eventualmente presente nel campione è stato rimosso previo trattamento con HCl 10%.

Circa 15/ 20 mg di campioni di suolo seccati all'aria, sono stati introdotti in capsule di argento. A ciascun campione è stata aggiunta 40  $\mu\text{l}$  di una soluzione di HCl 10%, e lasciato riposare over-night. Successivamente sono stati aggiunti ulteriori 40  $\mu\text{l}$  di HCl 10%. Le capsule sono state lasciate a riposo per 4h e sistemate su un supporto di alluminio sistemato su piastra riscaldante a  $65^\circ\text{C}$ . Il campione è stato così essiccato per circa 3h. Dopo raffreddamento le capsule sono state chiuse e sistemate nell'autocampionatore dell'analizzatore elementare.

Per la determinazione della quantità di C e N totale nel campione, sono state utilizzate rette di calibrazione specifiche.

### ***Conducibilità elettrica***

Il metodo consiste nella determinazione diretta della conducibilità elettrica in estratti acquosi di suolo.

Per la determinazione della conducibilità elettrica sono stati prelevati 15g di suolo acui sono stati aggiunti 75 ml di H<sub>2</sub>O (rapporto di estrazione 1:5). La soluzione è stata posta in agitazione per 2h e lasciato poi a riposo per 2h. successivamente i campioni sono stati filtrati su carta whatman n°42. Alla soluzione limpida è stata aggiunta una gocci di soluzione (0.1%) di sodio esametafosfto (NaPO<sub>3</sub>)<sub>6</sub> ad ogni 25ml di estratto. I valori di conducibilità sono espressi in  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$

### ***Carbonati totali***

Per la determinazione dei carbonati totali, 1 g di suolo è stato inserito in una beuta da 250 ml nella quale è stato inserito un Becker contenente 5 ml di HCl dil 1:1. Tale beuta è stata collegata, mediante tubo, al calcimetro di De Astis previamente riempito di H<sub>2</sub>O. La beuta è stata successivamente agitata, in modo che l'acido bagnasse il terreno. Lo sviluppo di CO<sub>2</sub> dal suolo, per mezzo dell'HCl, sposta acqua dal tubo di collegamento, facendo così variare il volume di acqua all'interno del cilindro graduato. Lo spostamento dell'acqua all'interno del sistema permette di effettuare lettura diretta del CaCO<sub>3</sub>, esprimendo i valori in percentuali.

## **ISOLAMENTO DEGLI ACIDI FULVICI DAL SUOLO E DALL'ACQUA SECONDO IL METODO IHSS**

Gli FA sono stati estratti dai campioni di suolo utilizzando il metodo IHSS (International Humic Substance Society) (Hayes 1985; Swift 1985). I campioni di suolo (1:10 w/v rapporto suolo/soluzione) sono stati acidificati da 0.1M HCl a pH 1-2, agitati per 1 ora in uno shaker da laboratorio e poi centrifugati (10 min,

3000 rpm). Il supernatante contenente il primo estratto, chiamato FA1, è stato rimosso dal residuo per decantazione. Il residuo è stato risciacquato 2-3 volte con acqua distillata agitando e centrifugando. Il campione di suolo rimanente è stato neutralizzato con 0.1M NaOH ed estratto con 1M NaOH (1:10 w/v rapporto terra/soluzione) a pH > 12 per garantire un'elevata solubilità HA. La sospensione è stata equilibrata durante la notte mediante continua agitazione, e il supernatante contenente l'estratto FA2 + HA è stato decantato. La soluzione alcalina è stata acidificata con 6M HCl per precipitare gravimetricamente l'HA. La soluzione globale di FA è stata purificata con resina acrilica macroporosa non ionica estere-Supelite DAX-8. Dopo che la soluzione di FA è stata aggiunta alla resina DAX-8 in una colonna di vetro, i materiali non adsorbiti sono stati scartati, mentre gli FAs adsorbiti sono stati eluiti con soluzione di NaOH 0.1 M. L'eluato raccolto è stato acidificato a pH 1.0 con 6 M HCl, e dopo 5 h, la soluzione è stata rieluita da 0.1 M NaOH. L'eluato desorbito è stato acidificato utilizzando una resina a scambio cationico saturo di H<sup>+</sup> (Amberlite IR120-B, Organo Co., Tokyo, Giappone) usando tre volte la mole di ioni Na<sup>+</sup> in soluzione. L'eluato è stato congelato e liofilizzato per recuperare l'acido fulvico. I campioni di FA purificati sono stati raccolti e conservati in congelatore per ulteriori analisi.

L'FA nei campioni di acqua sono stati isolati e purificati secondo il metodo per l'isolamento degli HA e FA dalle soluzioni acquose standardizzato dall'IHSS (Aiken, 198; Thurman e Malcolm, 1981). Per l'isolamento e la successiva purificazione dell'acido fulvico dall'acqua, 280 litri di acqua di Fiuggi sono stati acidificati con HCl fino a pH 2 (Aiken, 1985). Successivamente, l'acqua è stata concentrata con l'ausilio di flash cromatografo (EasiFlash Alphatech), mediante colonna cromatografica impaccata con resina DAX-8 (Sigma Aldrich). L'acido fulvico adsorbito sulla resina è stato desorbito utilizzando una soluzione di NaOH a 0.1 M. L'eluato desorbito è stato acidificato utilizzando una resina a scambio cationico saturo di H<sup>+</sup> (Amberlite IR120-B, Organo Co., Tokyo, Giappone) usando tre volte la mole di ioni Na<sup>+</sup> in soluzione. L'eluato è stato congelato e

liofilizzato per recuperare l'acido fulvico. Infine, il campione di FA in polvere è stato ottenuto per liofilizzazione. Le frazioni di FA estratte dal suolo e dall'acqua sono state entrambe sottoposte a pirolisi-GC-MS, NMR e FT-IR, analisi elementare.

## **CARATTERIZZAZIONE DELL'ACIDO FULVICO ESTRATTO DAL SUOLO E DALL'ACQUA MINERALE DI FIUGGI CON SPETTROSCOPIA IR A TRASFORMATA DI FOURIER (FT-IR)**

Gli spettri FT-IR dell'acido fulvico isolato dal suolo e dall'acqua sono stati registrati utilizzando uno spettrometro a infrarossi a trasformata di Fourier (FT-IR-4100 Jasco Corporation, MD, USA). Dopo aver eseguito in un mortaio di agata una macinazione fine dei campioni, sono stati preparati dischi di bromuro di potassio (KBr) con una concentrazione di acido fulvico del 2% (wt.), utilizzando una pressa idraulica da laboratorio portatile (Specac Inc., Fort Washington, Nanomaterials 2019, 9, 281 4 of 18 MD, USA). Gli spettri sono stati acquisiti in modalità di assorbimento nell'intervallo spettrale 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  con una risoluzione di 4  $\text{cm}^{-1}$  su sfondo puro di KBr.

## **CARATTERIZZAZIONE DELL'ACIDO FULVICO ESTRATTO DAL SUOLO E DALL'ACQUA MINERALE DI FIUGGI CON (PIROLISI) GAS CROMATOGRAFIA-SPETTROMETRIA DI MASSA (PY-GC-MS)**

Circa 4 mg di acido fulvico liofilizzato sono stati miscelati con 10  $\mu\text{l}$  di idrossido di tetrametilammonio (TMAH, 50% in metanolo, Sigma-Aldrich) e sottoposti a riscaldamento a 40°C fino a completa essiccazione. Circa 2 mg di solido sono stati posti in un'apposita siringa ed introdotti in un pirolizzatore Pyrojector II (SGE) posto a 600°C e direttamente connesso all'iniettore split/splitless (280°C)

del gas cromatografo. Le separazioni GC sono state effettuate con un gascromatografo Shimadzu QP5050, utilizzando una colonna capillare BPX (SGE) (30 m x 0.25 mm). La temperatura della colonna è stata programmata da 60 a 300°C ad una velocità di 5°C min<sup>-1</sup> e tenuto per 30 min a 300°C. I composti sono stati identificati sulla base dei tempi di ritenzione e di confronti dei loro spettri di massa con librerie (NIST 107 e NIST 21)

## **CARATTERIZZAZIONE DELL'ACIDO FULVICO ESTRATTO DAI TERRENI E DALL'ACQUA MINERALE CON ANALISI <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR**

Gli spettri NMR per <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C sono stati registrati utilizzando gli spettrometri Bruker DRX (Bruker, Karlsruhe, Germania) con tetrametilsilano (TMS) come standard. Circa 100 mg di campione liofilizzato è stato sciolto in 1 ml di 0.1M NaOD/D<sub>2</sub>O sotto N<sub>2</sub>. I campioni così preparati sono stati portati a pH 13. Dopo la filtrazione, con filtro in lana di vetro, circa 0.5 ml di campione sono stati messi in una provetta NMR per l'analisi.

## **DETERMINAZIONE DELLE ATTIVITÀ ENZIMATICHE**

La funzione delle comunità microbiche nei suoli è stata valutata analizzando le attività potenziali di sei enzimi microbici extracellulari.

Le attività enzimatiche sono state misurate con il metodo fluorimetrico secondo Marx et al. (2001) e Vepsäläinen et al. (2001), utilizzando il metodo dei substrati di metilumbelliferil fluorogenico (MUF).

Gli enzimi studiati sono coinvolti nei cicli biogeochimici C e N: β-glucosidasi (BG; EC 3.2.1.21), α-glucosidasi (AG; EC 3.2.1.20), β-ossidasi = xilosidasi (Xylo; EC 3.2.2. 27), β-cellobioidrolasi = cellulasi (CELL; EC 3.2.1.91), N-acetil-βglucosaminidasi = chitinasi (CH; EC 3.2.1.30), leucina aminopeptidasi (LAP;

EC 3.4.11.1). I substrati sono stati preparati con tampone Na-acetato 0.5M pH 5,5. 100µl di soluzione di substrato 1 mM sono stati aggiunti raggiungendo una concentrazione di 500µM. Il substrato di leucina aminopeptidasi è stato preparato utilizzando Trizma HCl 0.05 M pH 7.5.

Prima di iniziare l'analisi, tutti i campioni di terreno sono stati regolati al 60% di capacità di tenuta dell'acqua e mantenuti a 25 ° C per 3 giorni al buio.

2 g di massa secca di terreno fresco sono stati aggiunti in un becker da 100 ml ed è stato omogeneizzato con 50 ml di acqua. Un agitatore magnetico è stato utilizzato per mantenere una sospensione uniforme, a 120 rpm; poi 50µl sono stati prelevati e dispensati in una micropiastra nera a 96 pozzetti (3 campioni analitici replica X campioni X substrato). Le micropiastre sono state coperte e incubate al buio a 25°C per 3 h, e la fluorescenza è stata quantificata utilizzando un fluorimetro micropiastra (Fluoroskan Ascent) con eccitazione a 360 nm, filtri di emissione a 450 nm. Le letture sono state eseguite dopo 0, 30, 60, 60, 120, 180 minuti.

I risultati sono stati espressi come nmoli di prodotto (MUF o AMC) di ogni reazione enzimatica rilasciata per g di terreno per unità di tempo in relazione ad una curva standard preparata con concentrazioni crescenti di MUF o AMC e incubata alle stesse condizioni sperimentali.

Il SEI (Synthetic Enzymatic Index), è stato calcolato sommando i valori di tutte le attività enzimatiche ( $\beta$ -glucosidasi,  $\alpha$ -glucosidasi,  $\beta$ -xilosidasi,  $\beta$ -cellobioidrolasi, N-acetil- $\beta$ glucosaminidasi, leucina aminopeptidasi).

L'Indice Enzimatico Sintetico per il ciclo C (SEIc) è stato calcolato sommando il valore delle attività enzimatiche di  $\beta$ -glucosidasi,  $\alpha$ -glucosidasi,  $\beta$ -xylosidasi,  $\beta$ -cellobioidrolasi, N-acetil- $\beta$ glucosaminidasi. Il rapporto SEIc/Corg esprime specifiche attività enzimatiche rispetto al totale organico C (Marinari et al., 2020). L'indice di diversità di Shannon ( $H' = \sum p_i \ln p_i$ ), che misura la diversità in termini di ricchezza in specie, è stato calcolato a partire dalle attività enzimatiche come

misura della diversità funzionale (Bending et al., 2004), dove pi greco è il rapporto tra l'attività di un enzima e la somma di tutte le attività enzimatiche.

## **DETERMINAZIONE DEI FOSFOLIPIDI DI MEMBRANA**

La struttura della comunità microbica è stata caratterizzata attraverso l'analisi degli esteri metilici degli acidi grassi (EL-FAME), utilizzando il metodo della transesterificazione. La metanolisi alcalina permette di estrarre gli acidi grassi esterificati (EL) ma in queste condizioni non è in grado di esterificare gli acidi grassi liberi (Schutter e Dick, 2000). Per l'estrazione sono stati aggiunti 16,6 ml di idrossido di potassio 0.2 M in metanolo e 5 µl di soluzione di standard interno (0.023 mg ml<sup>-1</sup> metilnonadecanoato 19:0) in una provetta da centrifuga da 50 ml contenente 5 g di terreno congelato. Le provette sono state poi incubate a 37 °C per 1 h in agitatore orbitale. Poi, 6,6 ml di acido acetico 1.0 M sono stati aggiunti per neutralizzare il pH del contenuto della provetta. Gli EL-FAME sono stati estratti aggiungendo 10 ml di esano. La miscela è stata mescolata vigorosamente e centrifugata a 4500 rpm (2037.55 G) per 15 min. Lo strato di esano è stato trasferito in un tubo di vetro pulito, disidratato con solfato di sodio, filtrato ed evaporato sotto un vapore di N<sub>2</sub>. Alla fine, i FAME sono stati sciolti in 200 µl di dicloremetano e quantificati in GC-MS. Gli spettri di massa sono stati registrati, con l'uso di uno spettrometro QP-5050 (Shimadzu, Giappone) dotato di una colonna capillare AT 20 (0.25 mm d.i., 25 m) (Alltech, Deerfield). Gli acidi grassi metilati sono stati identificati in base al loro spettro di massa e utilizzando BAME 24 (47080 U) e 37 FAME Mix (47885-U, Sigma-Aldrich) come standard chimici. I dati sono stati espressi come quantità relativa, calcolata come l'area di ciascun picco EL-FAME rispetto all'area sommata di tutti i picchi EL-FAME. Il metilnonadecanoato, C19:0, a concentrazioni note, è stato usato come standard interno. Sono stati estratti tre repliche analitiche di ogni campione. Nomenclatura standard è usato per descrivere i FAMEs, che sono designati dal numero totale di

atomi di carbonio/numero di doppi legami, seguita dalla posizione del doppio legame dall'estremità metil (alifatico) ( $\omega$ ) della molecola. I prefissi "a" e "i" si riferiscono ai FAMES anteiso- e iso- rappresentati. Il prefisso "10Me" indica un gruppo metilico sul decimo atomo di carbonio dall'estremità carbossilica della molecola e "cy" indica i FAMES ciclopropano. I gruppi microbici sono stati assegnati agli acidi grassi legati all'estere (EL-FAME) secondo Fiererer et al., (2003) e Frostegård et al., (1993 A, B).

## **ANALISI STATISTICA**

Gli effetti delle diverse variabili determinate con le analisi chimiche e biochimiche sono stati esaminati attraverso l'analisi della varianza (ANOVA), seguita dal test dei confronti multipli di Tukey.

## **CAPITOLO 3**

### **RISULTATI & DISCUSSIONI**

#### **IL RUOLO DELLE SOSTANZE UMICHE DI CASTAGNO NELLA VALORIZZAZIONE DELLE ACQUE MINERALI: ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE NELLE ACQUE DI FIUGGI**

Nell'ottica di valorizzare il contributo ecosistemico castanicolo, questa ricerca studia i prodotti di umificazione (acido fulvico, FA) che si originano dai suoli dei castagneti sovrastanti le sorgenti delle acque minerali di Fiuggi. Con il fine di individuare nel castagneto l'origine dell'acido fulvico presente nelle acque, questa ricerca procede ad un confronto delle componenti fulviche isolate dal suolo e dall'acqua, mediante un confronto delle caratterizzazioni strumentali ottenute con ausilio pirolisi-GC-MS, NMR, FT-IR, IRMS.

#### **Caratteristiche fisico-chimiche dei suoli**

I campioni prelevati nelle aree oggetto di studio sono stati caratterizzati per definire le caratteristiche fisico-chimiche.

In Tabella 2 sono riportati i parametri per ognuna aree oggetto di studio. Dall'analisi tissutale è emerso che i suoli presentano una tessitura che va da franco argilloso ad argilloso (Classificazione USDA). Le analisi svolte per la determinazione del pH hanno suggerito un carattere moderatamente acido. Quarto d'Anagni 1 (5.8), fortemente acido nel sito quarto Le Prata (pH 5.2) e molto fortemente acido in Le Cese (pH 4.9).

Ognuna delle aree caratterizzate non presenta  $\text{CaCO}_3$  totale. I valori di conducibilità sono compresi tra 545 e 995  $\mu\text{S C m}^{-1}$ , tra i quali il più elevato è stato registrato nel sito quarto Le Prata.

Dalla Tabella 2 si evince che tutti i suoli sono caratterizzati da un elevato potere tamponante, con valori elevati di capacità di scambio cationico (C.S.C.) che variano tra circa 34 e 44  $\text{Cmol}^{(+)}\text{kg}^{-1}$ .

L'elevato contenuto di sostanza organica riscontrato in tutti i siti di prelievo porta ad elevati valori del rapporto C/N nonostante tutti i siti si presentano ricchi di azoto.

*Tabella 2 Proprietà chimico-fisiche dei 3 siti oggetto di studio*

PARAMETRI	QUARTO D'ANAGNI	QUARTO LE PRATA	LE CESE
<b>Argilla (%)</b>	28	30	42
<b>Limo (%)</b>	40	38	36
<b>Sabbia (%)</b>	32	32	22
<b>Classe Di Tessitura (USDA)</b>	Franco Argilloso	Franco Argilloso	Argilloso
<b>Conducibilità Elettrica (<math>\mu\text{S Cm}^{-1}</math>)</b>	858.75 $\pm$ 5.047	995.00 $\pm$ 20.21	545.00 $\pm$ 55.15
<b>Calcare Totale (%)</b>	< LD	< LD	< LD
<b>pH (H<sub>2</sub>O)</b>	5.8 $\pm$ 0.3	5.2 $\pm$ 0.1	4.9 $\pm$ 0.1
<b>pH (KCl)</b>	5.4 $\pm$ 0.3	4.6 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.1
<b>TOC (%)</b>	4.64 $\pm$ 0.87	3.92 $\pm$ 0.26	3.72 $\pm$ 0.39
<b>N Totale (g kg<sup>-1</sup>)</b>	3.61 $\pm$ 0.36	3.02 $\pm$ 0.18	3.13 $\pm$ 0.53
<b>Rapporto C/N</b>	12.80 $\pm$ 1.14	13.00 $\pm$ 0.10	11.96 $\pm$ 0.76
<b>C.S.C. (Cmol<sub>(+)</sub>kg<sup>-1</sup>)</b>	44.69 $\pm$ 0.57	34.22 $\pm$ 0.78	39.38 $\pm$ 1.31

In Tabella 3 sono riportate le quantità di acido fulvico, espresse in  $\text{mg kg}^{-1}$ , ottenute dai suoli oggetto di studio secondo il metodo IHSS.

Il processamento di 280 l di acqua di Fiuggi come descritto nella sezione precedente, ha portato all'isolamento di una quantità di 154 mg di acido fulvico pari a  $0.55 \text{ mg l}^{-1}$ .

*Tabella 3* Quantità di FA, espresse in  $\text{mg kg}^{-1}$ , estratte dai campioni di suolo prelevati nei siti oggetto dello studio (I dati sono medie di 4 campioni, analizzati in triplicato;  $n=12$ )

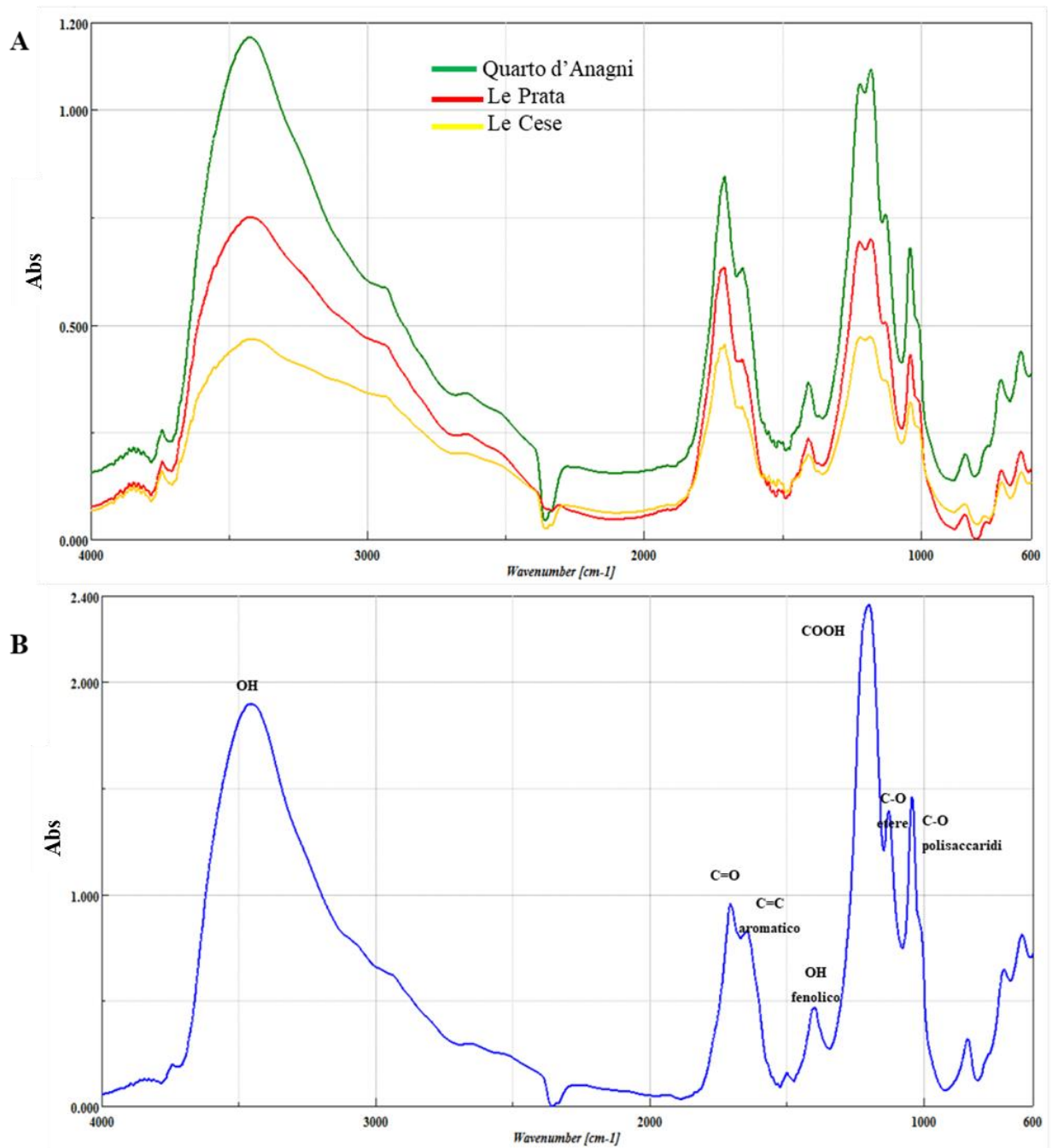
<b>SUOLI</b>	<b>FA (<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b>
<b>Quarto d'Anagni</b>	$5.2 \pm 0.02$
<b>Quarto le Prata</b>	$6.2 \pm 0.04$
<b>Le Cese</b>	$5.6 \pm 0.04$

## **Caratterizzazione dell'acido fulvico estratto dal suolo e dall'acqua minerale con spettroscopia IR a trasformata di Fourier (FT-IR)**

Le Figura 9 riporta gli spettri FT-IR degli acidi fulvici estratti dai campioni di suolo dei boschi di castagno (A) e dell'acqua minerale (B).

Negli spettri generati dagli acidi fulvici i principali picchi distinti sono: la banda larga compresa tra 3400 e 3300  $\text{cm}^{-1}$  associabile ai gruppi di OH con legame H. I picchi nell'intervallo 2940-2920 e 2850  $\text{cm}^{-1}$  sono attribuiti allo stiramento C-H alifatico asimmetrico e simmetrico dei gruppi  $\text{CH}_2$ . Un picco intenso a 1725-1710  $\text{cm}^{-1}$  è attribuito allo stretching del carbossile C=O del COOH. Le bande dell'intervallo 1628-1650  $\text{cm}^{-1}$  sono attribuite a vibrazioni scheletriche C = C aromatiche e stiramento C=O di chinone.

Il picco a 1450-1456  $\text{cm}^{-1}$  è causato dalla deformazione C-H alifatica. Una banda a 1420-1411  $\text{cm}^{-1}$  è assegnata alla deformazione O-H e all'allungamento di C-O di OH fenolica. Un picco compreso tra 1384-1376  $\text{cm}^{-1}$  può essere attribuito alla deformazione C-H dei gruppi  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  e/o allo stiramento antisimmetrico dei gruppi COO. La banda a 1227-1224  $\text{cm}^{-1}$  è assegnata allo stiramento C-O e alla deformazione O-H dei gruppi COOH e allo stiramento C-O di eteri arilici e fenoli. Un picco a 1130-1126  $\text{cm}^{-1}$  è attribuito allo stiramento C-O di vari gruppi alcolici ed eteri. Una banda a circa 1040-1030  $\text{cm}^{-1}$  è attribuita allo stiramento C-O di polisaccaridi e sostanze simili a polisaccaridi e/o Si-O di impurezze di silicato.



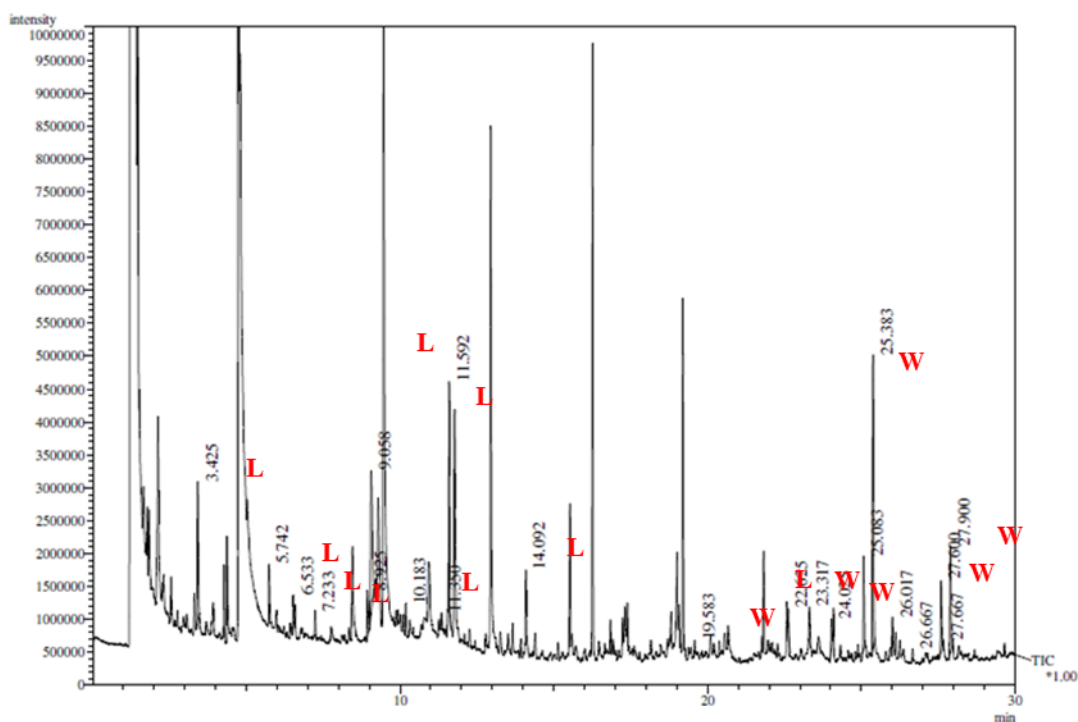
**Figura 9** Analisi comparativa degli spettri FT-IR dell'acido fulvico isolato dai suoli (A) e dall'acqua minerale (B) e dei gruppi funzionali caratteristici dell'area spettrale della banda specifica

## Caratterizzazione dell'acido fulvico estratto dal suolo e dall'acqua minerale con pirolisi-GC-MS

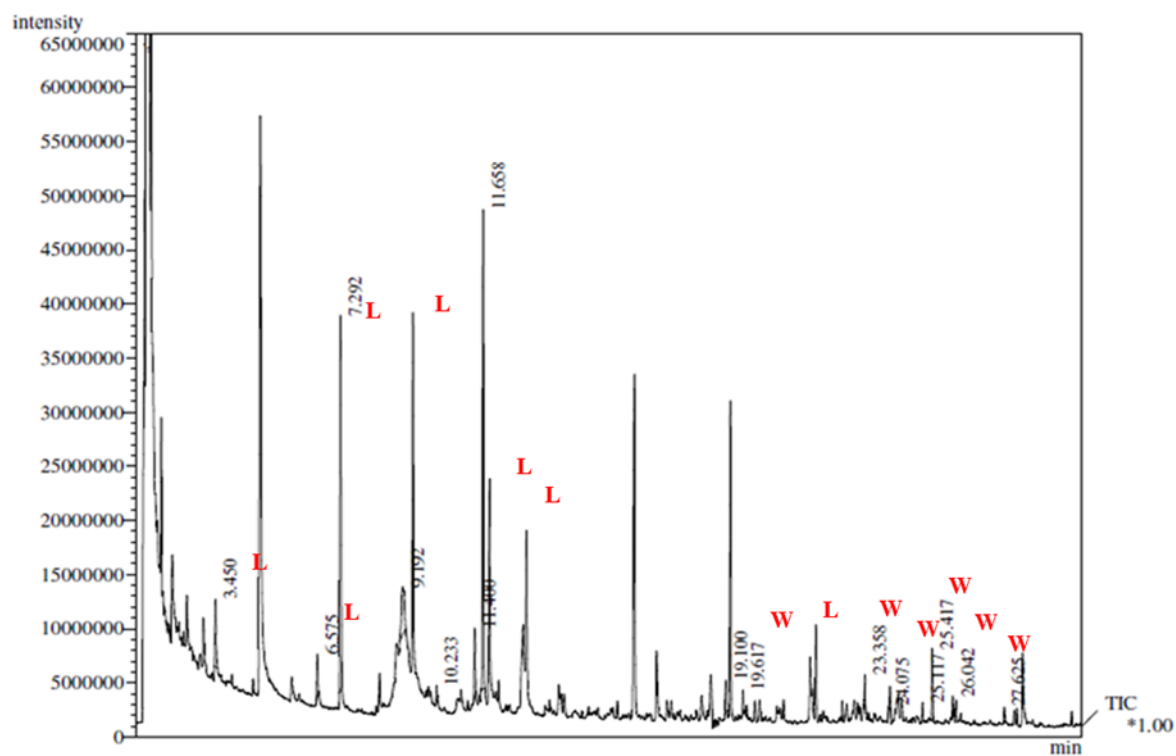
In Figura 10 e 11 sono mostrati i pirogrammi ottenuti, dopo pretrattamento del campione con TMHA, rispettivamente dal suolo e dall'acqua di Fiuggi.

I campioni analizzati sono caratterizzati dalla presenza di composti alifatici, metil esteri di acidi monocarbossilici (C7–C18, sia saturi che insaturi) e di acidi dicarbossilici (C4–C9, di cui una piccola parte insaturi), di composti aromatici, solforati ed azotati, dello stesso tipo rilevato per le frazioni acquose.

I composti corrispondenti ai picchi principali sono suggeriti sulla base di analisi comparativa con spettri di massa registrato nella libreria Nist (Nist 107, Nist 21) solo quando la somiglianza era superiore al 90% e il percorso di frammentazione era coerente con l'attribuzione strutturale. In tabella 4 sono riportati alcuni dei composti rilevati nei campioni pirolizzati.



**Figura 10** Pirogramma ottenuto dal processo di Py-GC-MS dall'FA estratto dal suolo con indicazione dei loro possibili precursori, cioè la lignina (L) e lipidi (W).



*Figura 11* Pirogramma ottenuto dal processo di Py-GC-MS dell'FA estratto dall'acqua di Fiuggi con indicazione dei loro possibili precursori, cioè la lignina (L) e lipidi (W).

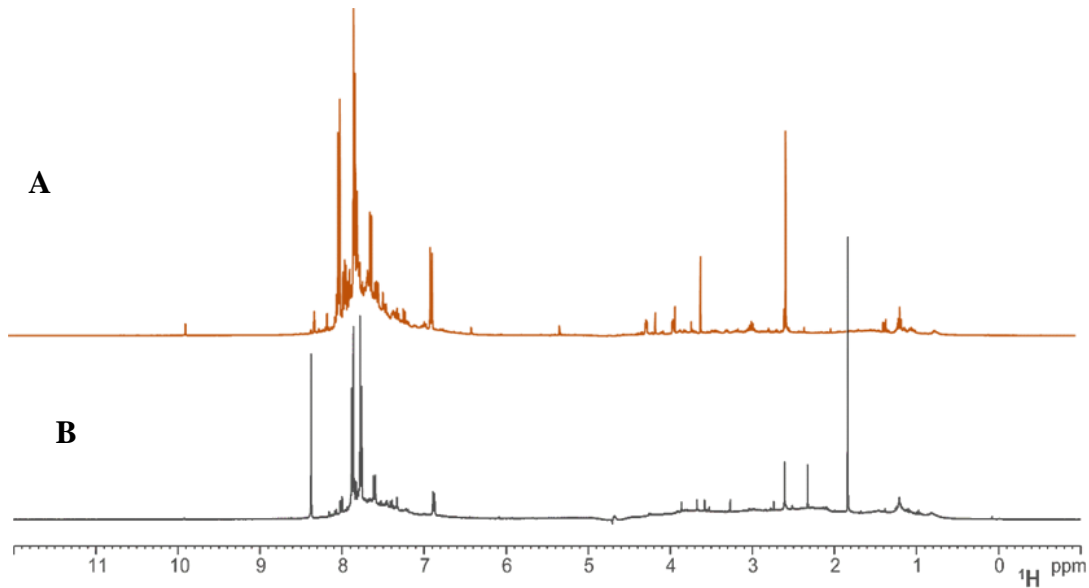
**Tabella 4** Riconoscimento qualitativo della matrice processata con pirolisi-GC-MS: in tabella sono riportati alcuni dei composti riconosciuti nelle matrici analizzate.

TEMPI DI RITENZIONE	COMPOSTO	AREA %				COMPOSTO DERIVATO DA	ORIGINE
		Quarto di Anagni	Quarto Le Prata	Le Cese	Acqua di Fuuggi		
3.367	toluene	9.23	-	-	5.25	aromatico	lignina
5.772	etilbenzene	3.9	-	2.27	-	aromatico	lignina
6.559	stirene	2.09	4.62	1.06	2.63	aromatico	lignina
7.261	Benzene, metossi-	1.69	0.41	1.02	25.38	aromatico	lignina
8.917	esaidro-1,3,5-trimetil-s-triazine	3.16	-	4.88	-	eterociclo	proteina
9.101	fenolo	9.45	8.99	2.73	9.62	aromatico	lignina
10.111	2-etil-4-metilfenolo	-	-	1.21	-	alcool	
10.191	butandioico acido, dimetil estere	2.11	-	0.87	0.74	acido dicarbossilico	lipidi
11.358	Benzene, (metiltio)-	1.15	2.38	0.27	5.13	aromatico	lignina
11.608	benzoico acido, metil estere	15.05	26.55	6.17	37.52	acido carbossilico aromatico	lignina

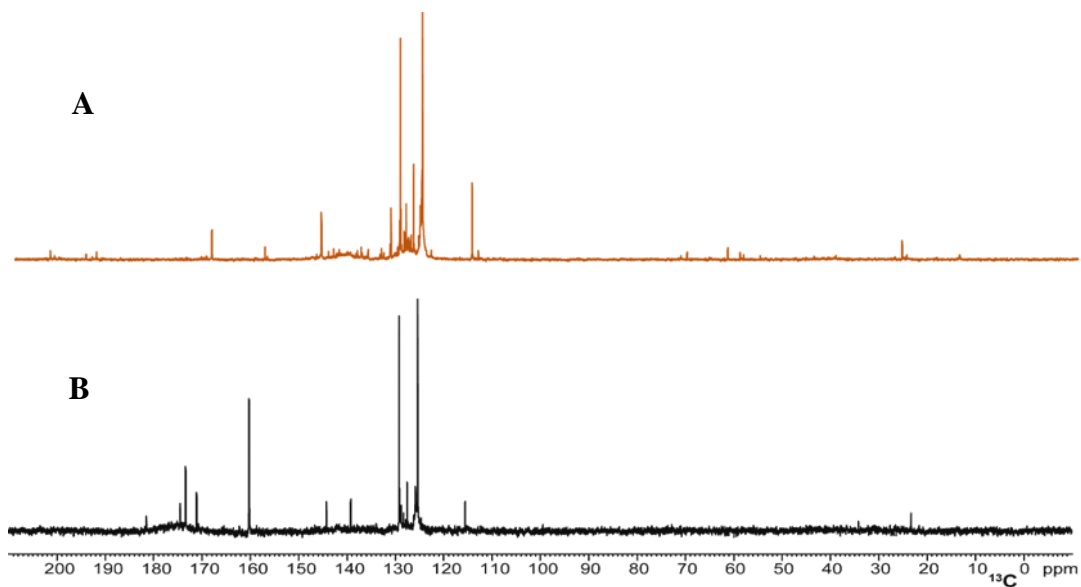
TEMPI DI RITENZIONE	COMPOSTO	AREA%				COMPOSTO DERIVATO DA	ORIGINE
		Quarto di Anagni	Quarto Le Prata	Le Cese	Acqua di Fiuggi		
11.809	metantioammide	-	-	31.41	-	Tioammide	-
14.096	acido benzoico,4-metil-metil estere	4.83	-	0.84	-	acido carbossilico aromatico	-
19.580	acido dodecanoico, metil estere	0.89	-	0.74	2.53	acido carbossilico	lipidi
20.690	acido benzoico,3,4-dimetossi-metil estere	-	-	0.92	1.17	acido carbossilico aromatico	lignina
22.333	10-acido undecenoico, metil estere	-	-	0.56	-	acido carbossilico monoinsaturo	lipidi
22.628	metil tetradecanoato	1.48	6.13	3.3	-	acido carbossilico	lipidi
23.326	2-propenoic acid	2.43	2.41	1.67	-	acido carbossilico	lipidi
23.644	acido octadecanoico, metil estere	-	-	0.74	1.67	acido carbossilico	lipidi
24.040	acido pentadecanoici, metil estere	2.04	2.45	2.18	0.24	acido carbossilico	lipidi
25.088	9-acido esadecenoico,metil estere	6.08	7.32	6.34	-	acido carbossilico	lipidi
25.391	acido esadecanoico, metil estere	19.49	23.12	14.99	1.23	acido carbossilico	lipidi
26.018	13-acido docosenoico, metil estere	1.99	-	1.78	4.62	acido carbossilico	lipidi

## Caratterizzazione dell'acido fulvico estratto dal suolo e dall'acqua minerale con spettroscopia NMR

Nelle Figure 12 – 13 sono riportati gli spettri NMR relativi all'  $^1\text{H}$  e al  $^{13}\text{C}$ , relativi ai campioni di FA estratti dal suolo e dall' acqua. Le 3 aree boschive considerate presentano spettri molto simili tra loro, per cui si è scelto di mostrarne solo uno.



*Figura 12 Spettri  $^1\text{H}$ -NMR degli FA estratti dall'acqua (A) e dal suolo (B)*



*Figura 13 Spettri  $^{13}\text{C}$ -NMR degli FA estratti dall'acqua (A) e dal suolo (B)*

Gli spettri  $^1\text{H}$ -NMR sono stati suddivisi in 6 regioni di spostamento chimico a cui possono essere associati segnali di accoppiamenti da protoni appartenenti a specifici carboni:

da 0 a 1.7 ppm, in questa zona sono caratteristici gli accoppiamenti degli idrogeni dei gruppi metilici terminali, dei radicali metilenici delle catene carboniose alifatiche, metileni di strutture alifatiche cicliche, e segnali di idrogeni appartenenti a C distanti almeno due carboni da gruppi funzionali aromatici o polari;

da 1.7 a 3.0 ppm, corrispondenti a protoni di gruppi metilici e metilenici in posizione  $\alpha$  a gruppi funzionali aromatico o ad acidi carbossilici;

da 3.0 a 5.0 ppm, corrispondenti a protoni in posizione  $\alpha$  a carboni legati ad un atomo di ossigeno (in strutture polisaccaridiche o di carboidrati);

da 5.0 a 6.5 ppm, corrispondenti a protoni di idrocarburi insaturi;

da 6.5 a 9.0 ppm, corrispondenti a protoni di nuclei aromatici;

da 9.0 a 12 caratteristica per segnali da idrogeni aldeidici.

Le aree delle regioni di shift chimico sono state determinate dall'integrazione e sono state espresse in percentuale della superficie totale (intensità relativa) (Tabella 5).

**Tabella 5**  $^1\text{H}$  NMR (intervalli di integrazione in ppm; rapporti relativi in %)

MATRICE	INTERVALLO DI INTEGRAZIONE					
	0-1.7	1.7-3.0	3.0-5.0	5.0-6.5	6.5-9.0	9.0-12.0
ESTRATTI DA ACQUA	8	10	8	1.5	72	0.5
ESTRATTI DA SUOLO	13.5	25	18.5	3	39.5	0.5

Gli spettri relativi al  $^{13}\text{C}$  sono stati suddivisi in 5 regioni di spostamento chimico (valore riportato in ppm) in cui si registrano segnali corrispondenti carboni specifici (come indicato in Tabella 5): da 0 a 50 ppm - C alchilici;

da 50 a 110 ppm – carbonio alchilico legato ad un atomo di ossigeno;

da 110 a 165 ppm – carboni aromatici;

da 165 a 190 ppm – carboni carbossilici

Le aree delle regioni di shift chimico sono state determinate dall'integrazione e sono state espresse in percentuale della superficie totale (intensità relativa) (Tabella. 6).

**Tabella 6**  $^{13}\text{C}$  NMR (intervalli di integrazione in ppm; rapporti relativi in %)

MATRICE	INTERVALLO DI INTEGRAZIONE				
	0-50	50-110	110-165	165-190	190-210
ESTRATTI DA ACQUA	14	14	61	6	6
ESTRATTI DA SUOLO	23	24	37	16	-

Dagli spettri  $^1\text{H}$  NMR e  $^{13}\text{C}$  NMR registrati si evince una elevata quantità di segnali associati a nuclei aromatici, maggiore rispetto a quelli che interessano la zona dei gruppi alifatici. Questo risultato si ottiene sia dagli estratti provenienti dall'acqua che da quelli provenienti dal suolo.

La presenza di acidi carbossilici viene confermata da  $^1\text{H}$  NMR e da  $^{13}\text{C}$  NMR per gli estratti provenienti dalle due diverse matrici.

Segnali della presenza di gruppi alifatici sono evidenti tra 1 e 3 ppm nello spettro dell' $^1\text{H}$  NMR, sia per gli estratti da acqua che da suolo, lo stesso non si può dire per lo spettro del  $^{13}\text{C}$  NMR ma dalla tabella 6, relativa ai rapporti percentuali, se ne registra la presenza, in % anche abbastanza rilevanti.

Per i carbossilici si evidenzia lo stesso comportamento, risultano presenti in acqua e nel suolo nello spettro relativo al  $^{13}\text{C}$ -NMR, ma non nello spettro dell' $^1\text{H}$  NMR. La Tabella 6 dei rapporti percentuali ne conferma, seppur in minima quantità, la presenza.

L'integrazione dello spettro  $^1\text{H}$  NMR attesta che l'estratto dall'acqua è caratterizzato dal 10% di idrogeni aromatici e l'8% di idrogeni alifatici.

Lo spettro  $^{13}\text{C}$  NMR mostra invece il 61% di carboni aromatici e il 14% di carboni alifatici (Tabella 6).

Vale la pena sottolineare che questi risultati mostrano la presenza di un'elevata aromaticità con pochi sostituenti e una piccola quantità di carbonio carbossilico (6%).

## DISCUSSIONI

Lo scopo di questo studio è stato di isolare e purificare gli FA della sostanza unica dalle acque minerali di Fiuggi le cui sorgenti si trovano nella parte sottostante di boschi di castagno, e di metterla a confronto con gli FA isolati e caratterizzati da suoli provenienti dai castagneti oggetto di studio. Gli FA isolati dai campioni di suolo e dall'acqua minerale di Fiuggi sono stati sottoposti a caratterizzazione con pirolisi-GCMS, FT-IR,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -NMR.

I suoli sottoposti a processo di frazionamento hanno portato alla determinazione quantitativa dell'acido fulvico (FA). Dai risultati ottenuti è stata rilevata una quantità di FA significativamente differente tra i tre siti oggetto di studio: Quarto le Prata presenta la quantità maggiore, seguito da Le Cese e Quarto d'Anagni.

Le acque di Fiuggi, processate come descritto nella sezione precedente, hanno portato all'isolamento di una quantità di FA di  $0.55 \text{ mg l}^{-1}$ : 154 mg di FA sono stati isolati in 280 l di acqua, corrispondenti ad una concentrazione di  $0.55 \text{ mg l}^{-1}$ . La concentrazione di FA rilevata nell'acqua minerale di Fiuggi rientra nei parametri stabiliti dalla legislazione italiana per le acque destinate a consumo umano: la normativa italiana in vigore (D.lgs. 31/01) che recepisce quella europea stabilisce che nelle acque superficiali e nelle acque destinate al consumo umano o all'uso domestico la concentrazione di TOC dovrebbe essere dell'ordine di  $0,1-10 \text{ mg l}^{-1}$ .

Gli spettri di assorbimento all' FT-IR ottenuti dagli FA estratti dal suolo, di tutti i siti presi in esame, mostrano similarità spettrale tra di loro e una similarità sovrapponibile con lo spettro ottenuto dall'FA estratto dall'acqua. L'analisi dei dati spettrali FT-IR ha permesso di assegnare picchi ai gruppi funzionali caratteristici della zona spettrale osservata come riportato da Wu et al. (2016).

Le distribuzioni delle assorbanze ottenute dagli FA non mostrano difformità significative rispetto agli assorbimenti riportati in letteratura (Stevenson, 1994),

con una intensa banda a  $1720\text{ cm}^{-1}$  dovuta alla presenza di elevate quantità di gruppi carbossilici.

I picchi a  $1720\text{-}1630\text{-}1120\text{ cm}^{-1}$  sono ben visibili sia negli FA estratti dai suoli che dall'acqua minerale. Una banda molto intensa è presente nell'intervallo  $1227\text{-}1224\text{ cm}^{-1}$  (allungamento C-O e deformazione O-H dei gruppi COOH), il che indica la presenza di un'importante componente acida nella struttura degli FA

Le assorbanze spettrali acquisite per l'FA non mostrano difformità significative rispetto a quelle riportate in letteratura (Stevenson, 1994), con una intensa banda a  $1720\text{ cm}^{-1}$  per la presenza di elevate quantità di gruppi carbossilici.

Non sono state rilevate particolare differenza tra le tesi esaminate.

Gli FA sono molto ricchi in gruppi idrofili COOH e OH a cui devono la loro solubilità e con componente aromatica. I principali gruppi riscontrati sono:

- $3400\text{ cm}^{-1}$  (stretching del legame O-H di fenoli,  $\text{H}_2\text{O}$ , OH alifatici)
- $2920\text{ cm}^{-1}$  (dovuti a stretching del legame C-H di gruppi  $\text{CH}_2$ )
- $1720$  e  $1220\text{ cm}^{-1}$  (rispettivamente dovuti a stretching del legame  $\text{-C=O}$  e a stretching del legame  $\text{-C-O}$  e deformazione del legame O-H dei gruppi COOH)
- $1620\text{ cm}^{-1}$  (rispettivamente dovuti a stretching del legame C=C di anelli aromatici ma anche ad ammidi I e dovuto ancora a stretching del legame C=C di anelli aromatici e alla presenza di ammidi II)
- $1400\text{ cm}^{-1}$  dovuto a OH fenolici e/o OH di COOH
- $1050\text{ cm}^{-1}$  dovuto stretching del legame C-O di polisaccaridi e/o vibrazione del legame Si-O di composti minerali (ceneri).

Assorbimenti con stessi numeri d'onda, ma molto più intensi sono stati ottenuti dallo spettro dell'FA estratto dall'acqua. Questo risultato attesta la presenza nella struttura di una componente funzionale molto più ricca, rispetto a quella estratta dai suoli. In particolare, viene identificata una intensa e larga banda a  $3400$  dovuta stretching del legame O-H dell' $\text{H}_2\text{O}$ , una banda molto intensa nell'intervallo  $1227\text{-}1224\text{ cm}^{-1}$  dovuta all'allungamento C-O e alla deformazione O-H dei gruppi COOH ed un picco intenso relativo allo stretching del legame C-O di

polisaccaridi a  $1040\text{ cm}^{-1}$ . La tendenza alla similarità delle strutture degli FA estratti dai suoli e dall'acqua si evince anche attraverso i risultati ottenuti dalle analisi con py-GC-MS.

Se l'analisi FT-IR ha permesso di individuare quali fossero i gruppi funzionali caratterizzanti la molecola di FA, l'uso della py-GC-MS si è dimostrata utile per ottenere informazioni strutturali dettagliate sui componenti delle molecole organiche.

La pirolisi con metilazione in situ consente l'analisi strutturale delle macromolecole. Il metodo si basa sulla scomposizione termica delle macromolecole umiche in una varietà di sottounità, che possono poi essere separate dalla gascromatografia e identificate secondo frammentazioni caratteristiche della spettrometria di massa. In questo processo vengono prodotti metil esteri di acidi carbossilici e metil eteri di composti ossidrilici. La presenza di idrossido di tetrametilammonio evita la decarbossilazione degli acidi aromatici e la deidratazione dei prodotti alcolici, in modo da prevenire la perdita di importanti informazioni strutturali: i composti polari come i fenoli e gli acidi carbossilici negli HS sono difficili da rilevare, usando l'idrossido di tetrametilammonio (TMAH) vengono separati e identificati i derivati metilici di acidi e fenoli.

Gli FA estratti dai campioni di suolo dei diversi castagneti presentano un profilo pirolitico simile alla componente fulvica estratta dall'acqua di Fiuggi: sono caratterizzati dalla presenza di composti alifatici, metil esteri di acidi monocarbossilici (C7 – C18, sia saturi che insaturi) e di acidi dicarbossilici (C4 – C9, di cui una piccola parte insaturi), di composti aromatici, solforati ed azotati, dello stesso tipo rilevato per le frazioni acquose.

I prodotti di pirolisi riconosciuti comprendono diverse classi di composti, in linea con quanto riportato in letteratura (Martín et al., 1995; del Rio & Hatcher, 1998; Santos Bento et al., 2001; Nierop, 1998; Nierop et al., 2001; Quénéa, 2005).

I cromatogrammi di TMAH-GC/MS degli acidi fulvici (FA) isolati in diversi suoli sono illustrati nella Figura 10 nella sezione precedente. In generale, la distribuzione dei prodotti è simile a quella ottenuta da Hatcher e Clifford (1994); la prima porzione del cromatogramma contiene soprattutto i picchi dei composti aromatici. La seconda porzione è costituita da picchi che rappresentano i composti alifatici, costituiti per la maggior parte da esteri metilici degli acidi grassi (Hatcher e Clifford, 1994; Amir, 2006)

I quattro campioni considerati sono caratterizzati dalla presenza di una grande abbondanza di composti alifatici: metil esteri di acidi monocarbossilici (C7 – C18, sia saturi che insaturi) e di acidi dicarbossilici (C4 – C9, di cui una piccola parte insaturi), coppie di alcheni ed alcani (C12 – C23) ed alcheni a catena corta. Parte dei prodotti di pirolisi sono identificati come composti aromatici, quali alchilbenzeni, fenoli ed alchilfenoli, acidi benzoici, mono e di-metossibenzoici, idrocarburi ad anelli benzenici condensati, composti contenenti azoto, quali amminoacidi, ammine eterocicliche (imidazoli, pirroli, pirimidine, piridine, pirrolidine) ed altri composti aromatici contenenti azoto (indoli, benzonitrili, benzendiammine, chinoline) e loro derivati.

La Tabella 4, nella sezione precedente, elenca alcuni dei principali composti aromatici riscontrati nei campioni analizzati. I risultati mostrano che vari composti aromatici vengono rilasciati termicamente dagli FA, che sono composti principalmente da esteri metilici di acidi mono-, di- e tri-metossi (alchil)-bezencarbossilici. I composti aromatici identificati nei pirogrammi delle frazioni analizzate mostrano il contributo di tutti i blocchi costituenti della lignina, dai risultati ottenuti queste entità sembrano presentare prodotti di degradazione ossidati derivati dalla lignina (Saiz-Jimenez, 1988).

Proprio una degradazione ossidativa a carico della lignina suggerisce la possibilità di spiegare la presenza di composti derivanti da questo polimero, relativamente insolubile, nelle sostanze umiche disciolte (Guggenberger, 1994), nel caso specifico negli FA estratti dall'acqua: anche se modificate, queste

sostanze umiche mantengono incorporata una firma di lignina sufficiente per indicare genericamente il materiale vegetale vascolare di origine.

Un altro gruppo di prodotti identificati nei pirogrammi delle frazioni analizzate è rappresentato dai composti contenenti azoto. Pirroli, piridine, indoli, benzonitrili ed altri composti N-eterociclici, più che prodotti di degradazione pirolitica di altre molecole, sono stati considerati come componenti costitutive della sostanza organica del suolo (Schulten & Schnitzer, 1998). Si può affermare che questi composti derivano da aminoacidi, proteine ed altri polipeptidi (van Bergen, 1998; Schulten & Schnitzer, 1998).

Benzeni e fenoli, gruppi dominanti nei campioni sottoposti ad analisi, sono prodotti di pirolisi piuttosto aspecifici che possono avere molteplici fonti tra cui lignina e proteine. La distribuzione dei prodotti alifatici identificati nei vari campioni umici qui esaminati riflette il contributo da parte delle piante superiori. I prodotti alifatici della pirolisi (n-alcani, n-alcheni, n-metilchetoni e n-acidi grassi), possono provenire da cere fogliari, da biopolimeri come cutina/cutani, suberina/ suberani, e algeenan: la cutina è associata con la maggior parte dei tessuti presenti nelle parti aeree (foglie, fiori, frutti) delle piante superiori e si trova negli strati sia esteriori che interiori delle cuticole vegetali e nelle lamelle che supportano lo strato protettivo epicuticolare fatto di cera (Tulloch, 1976; Walton, 1990). La suberina, invece, è una complessa rete polimerica che forma lo strato protettivo delle cortecce, dei tronchi lignei e delle parti sotterranee delle piante, quali le radici (Kolattukudy, 1984; Walton, 1990). Sebbene questi biopoliesteri siano componenti minori della biomassa originale, il loro contributo è così alto in quanto risultano più refrattari alla biodegradazione di altri componenti vegetali più importanti, inclusa la lignina (Martín, 1995).

Tradizionalmente, la spettroscopia NMR è stata una delle tecniche comunemente utilizzate per la caratterizzazione dell'acido fulvico. La NMR è una tecnica non distruttiva che consente lo studio della matrice complessa della materia organica naturale per la presenza di specifici gruppi funzionali e del loro ambiente

circostante. Tuttavia, a causa dell'eterogeneità delle sostanze umiche si sovrappongono le risonanze negli spettri NMR e di conseguenza si osservano segnali ampi che diminuiscono la sensibilità dell'analisi.

Nonostante le difficoltà associate, i risultati della NMR, hanno fornito informazioni preziose per la caratterizzazione degli acidi fulvici estratti dai campioni di suolo provenienti dai castagneti di Fiuggi e dall'acqua minerale.

Gli spettri NMR degli FA estratti dai suoli e dall'acqua di fiuggi mostrano alcune piccole ma distinte variazioni nei valori di integrazione

In linea con quanto riportato in letteratura e in linea con i risultati ottenuti mediante le analisi FT-IR e py-GCMS, sono stati rilevati gruppi fenolici, carbossilici e alifatici.

Dai risultati ottenuti, è possibile effettuare delle assegnazioni strutturali generiche tra gli spettri ottenuti e le componenti della SOM da cui provengono gli FA. In linea generale è possibile associare la presenza negli spettri del  $^{13}\text{C}$ -NMR, di C aromatici e carbossilici nella struttura degli FA, a componenti della SOM quali lignina, suberina, aminoacidi/proteine, acidi grassi e lipidi esterificati (González-Vila, 2001; Simpson, 2002).

## **CAPITOLO 4**

### **RISULTATI & DISCUSSIONI**

#### **IL CAMBIAMENTO DI DESTINAZIONE D'USO DEL SUOLO NEL BACINO DI FIUGGI INFLUISCE SUL PROCESSO DI UMIFICAZIONE, PORTANDO A DIVERSE CARATTERISTICHE DEGLI ACIDI FULVICI: IMPLICAZIONI SULLA QUALITÀ DEL TERRENO/ACQUA DI FALDA**

Il bacino di Fiuggi e il suo delicato equilibrio idrogeologico sono estremamente sensibili alle caratteristiche geologiche, idrogeologiche ed ecologiche della zona. La particolare sensibilità e fragilità del sistema naturale è dovuta all'elevata variabilità dei tipi di copertura vegetale. Inoltre, il diverso uso del suolo può influenzare la qualità dell'acqua di falda attraverso la variazione delle caratteristiche delle sostanze umiche (acidi fulvici) a causa dei diversi pathway del processo di umificazione. Nel caso specifico l'ecosistema complesso coinvolto non ospita soltanto boschi di castagno: l'ecosistema complesso che insiste sugli acquiferi si caratterizza per la presenza di una estesa area boscata sovrastante gli acquiferi dei prati naturali contermini, e un prato gestito per attività ludiche. Considerando che, il diverso uso del suolo può determinare la variazione delle caratteristiche delle sostanze umiche (acidi fulvici) a causa del diverso percorso del processo di umificazione, e quindi come conseguenza nel caso specifico può influenzare la qualità delle acque, questa ricerca vuole studiare come le diverse coperture e gli usi del suolo influenzano le proprietà chimiche, fisiche e biochimiche del suolo. In particolare, studia l'effetto dei diversi tipi di copertura (prato naturale- bosco di castagno- prato gestito) sui processi di umificazione del suolo e sulle sostanze umiche da un punto di vista qualitativo e quantitativo.

## Caratteristiche fisico-chimiche dei suoli

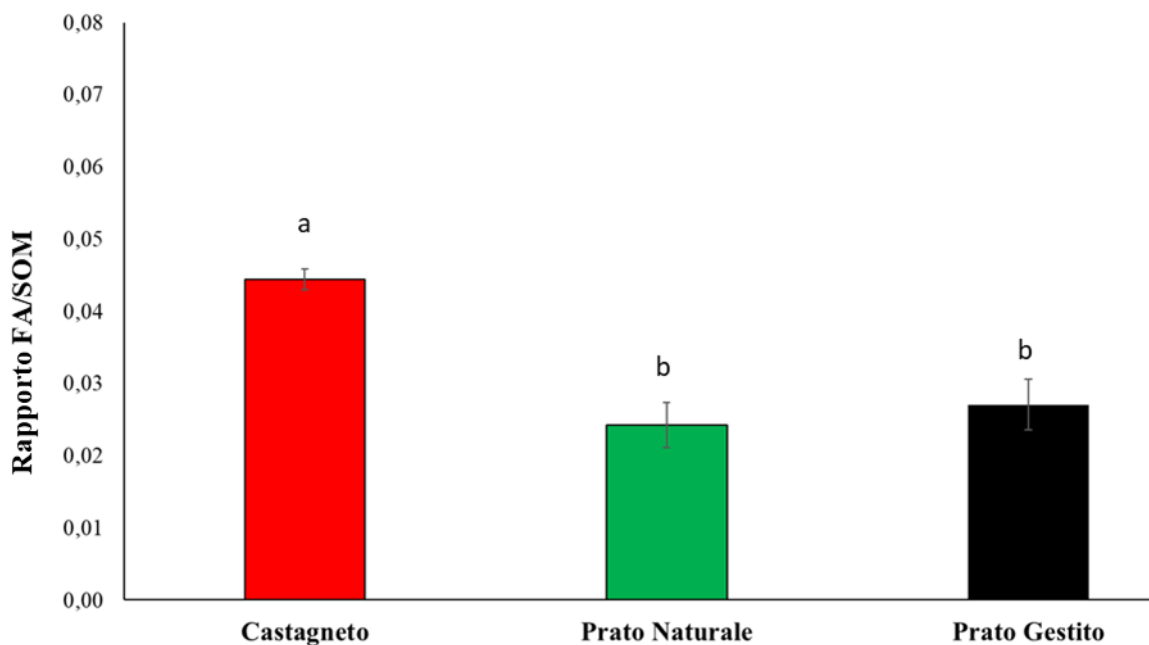
Le caratteristiche chimico-fisiche dei suoli prelevati nelle 3 aree a diversa gestione sono riportate in Tabella 7.

*Tabella 7 Proprietà chimico-fisiche delle 3 aree siti oggetto di studio*

	<b>CASTAGNETO</b>	<b>PRATO NATURALE</b>	<b>PRATO GESTITO</b>
<b>TESSITURA</b>		Franco Argilloso	
<b>pH (H<sub>2</sub>O)</b>	5.5±0.1	5.6±0.0	5.8±0.1
<b>pH (KCl)</b>	4.4±0.2	4.1±0.1	4.6±0.2
<b>CEC</b>	35.7±2.5	41.9±1.5	37.3±1.7
<b>C<sub>org</sub></b>	46.5±2.9	55.1±2.4	28.8±2.7
<b>N<sub>org</sub></b>	3.8±0.2	5.2±0.2	3.1±0.3
<b>C/N</b>	12.2±0.2	10.6±0.1	9.2±0.3
<b>FA</b>	3.26±0.3	2.75±0.3	1.40±0.2
<b>SOM</b>	80.0±5.0	95.4±4.2	49.5±4.6

I suoli presentano un pH compreso tra 5.5 e 5.8 più alto nel prato gestito rispetto al prato naturale e al castagneto.

Il suolo del prato naturale presenta un  $C_{org}$ ,  $N_{tot}$ , SOM e CEC significativamente più elevati rispetto ai suoli provenienti dalle altre due aree, mentre nel suolo dei boschi di castagno è stato rilevato il più alto contenuto di FA e il più alto valore del rapporto C/N. Con i risultati ottenuti è stata calcolata la proporzione di acido fulvico rispetto alla SOM (Hwang, 2019) (Figura.14), ed è stato riscontrato che il castagneto ha un valore di rapporto significativamente più alto rispetto ad altre aree.



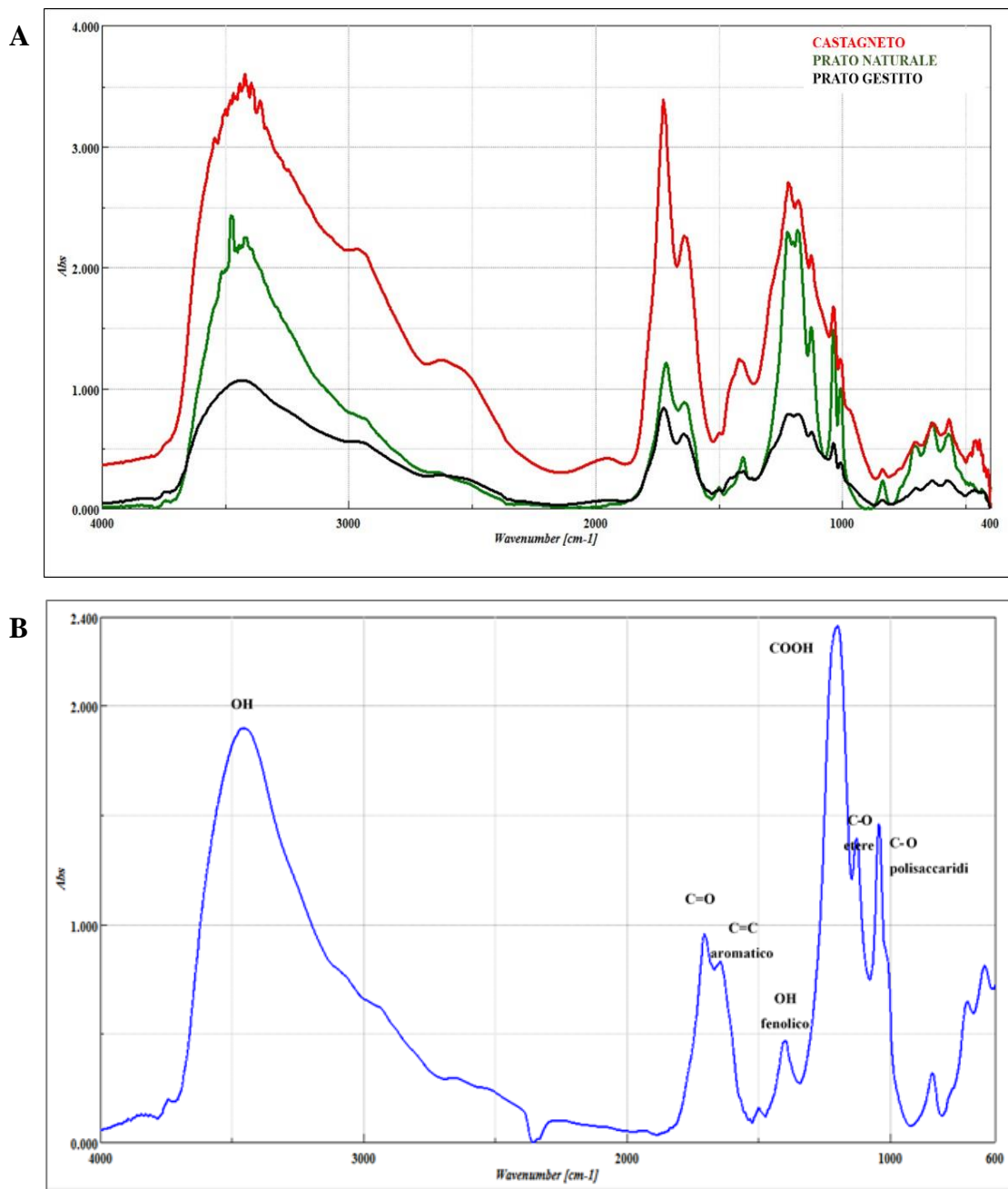
**Figura 14** Rapporto FA/SOM. In rosso sono riportati i dati relativi ai campioni provenienti dal castagneto, in verde e in nero quelli rilevati per i campioni provenienti dal prato naturale e dal prato gestito. (I dati sono medie di 9 campioni, analizzati in triplicato; le barre indicano l'errore standard,  $n=27$ ).

## **Caratterizzazione dell'acido fulvico estratto dal suolo e dall'acqua minerale con analisi FT-IR**

I grafici riportati in Figura 15 riportano gli spettri FT-IR relativi agli FA estratti da campioni di suolo prelevati nelle 3 aree a diversa gestione (Castagneto- prato naturale- prato gestito) (A) e all'FA estratto dall'acqua minerale di Fiuggi.

Negli spettri generati dagli acidi fulvici i principali picchi distinti sono: la banda larga compresa tra 3400 e 3300  $\text{cm}^{-1}$  associabile ai gruppi di OH con legame H. I picchi nell'intervallo 2940-2920 e 2850  $\text{cm}^{-1}$  sono attribuiti allo stiramento C-H alifatico asimmetrico e simmetrico dei gruppi  $\text{CH}_2$ . Un picco intenso a 1725-1710  $\text{cm}^{-1}$  è attribuito allo stretching del carbossile C = O del COOH. Le bande dell'intervallo 1628-1650  $\text{cm}^{-1}$  sono attribuite a vibrazioni scheletriche C = C aromatiche e stiramento C = O di chinone.

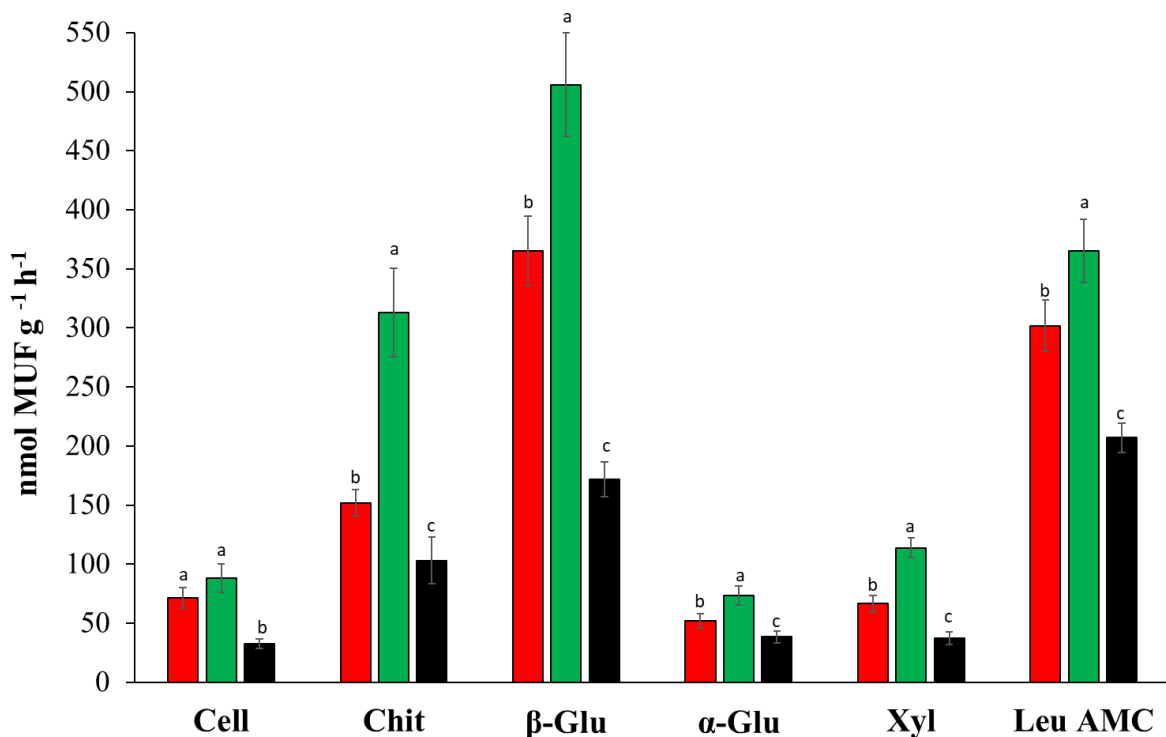
Il picco a 1450-1456  $\text{cm}^{-1}$  è causato dalla deformazione C-H alifatica. Una banda a 1420-1411  $\text{cm}^{-1}$  è assegnata alla deformazione O-H e all'allungamento di C-O di OH fenolica. Un picco compreso tra 1384-1376  $\text{cm}^{-1}$  può essere attribuito alla deformazione C-H dei gruppi  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  e/o allo stiramento antisimmetrico dei gruppi COO. La banda a 1227-1224  $\text{cm}^{-1}$  è assegnata allo stiramento C-O e alla deformazione O-H dei gruppi COOH e allo stiramento C-O di eteri arilici e fenoli. Un picco a 1130-1126  $\text{cm}^{-1}$  è attribuito allo stiramento C-O di vari gruppi alcolici ed eteri. Una banda a circa 1040-1030  $\text{cm}^{-1}$  è attribuita allo stiramento C-O di polisaccaridi e sostanze simili a polisaccaridi.



**Figura 15** Spettri FT-IR relativi agli FA estratti da campioni di suolo da Castagneto, Prato naturale e Prato gestito (A) e all'FA estratto dall'acqua minerale di Fiuggi (B).

## Attività enzimatica e biochimica della comunità microbica del suolo

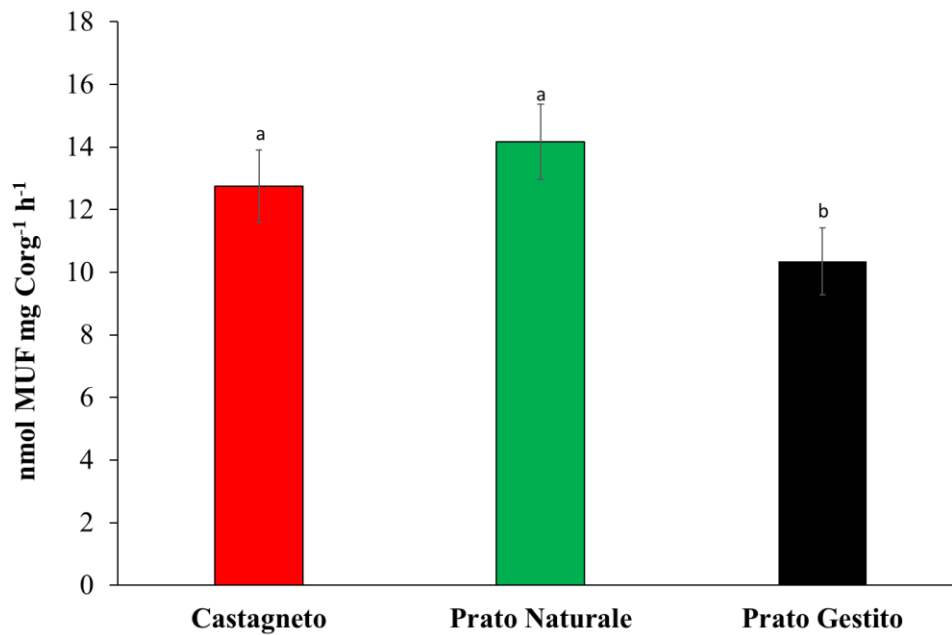
Le attività degli enzimi studiati, coinvolti nei cicli biogeochimici C e N,  $\beta$ -glucosidasi ( **$\beta$ -glu**; EC 3.2.1.21),  $\alpha$ -glucosidasi ( **$\alpha$ -Glu**; EC 3.2.1.20),  $\beta$ -xylosidase = xilosidasi (**Xyl**; EC 3.2.2. 27),  $\beta$ -cellobioidrolasi = cellulasi (**Cell**; EC 3.2.1.91), N-acetil- $\beta$ glucosaminidasi = chitinasi (**Chit**; EC 3.2.1.30) e leucina aminopeptidasi (**Leu AMC**; EC 3.4.11.1), sono riportate in Figura 16.



**Figura 16** Attività enzimatica dei suoli delle 3 aree. In rosso sono riportati i dati relativi alle attività enzimatiche rilevate nei campioni provenienti dal castagneto, in verde le attività enzimatiche rilevate nei campioni provenienti dal prato naturale e in nero quelle rilevate nei campioni provenienti dal prato gestito. (I dati sono medie di 9 campioni, analizzati in triplicato; Le barre indicano l'errore standard,  $n=27$ ).

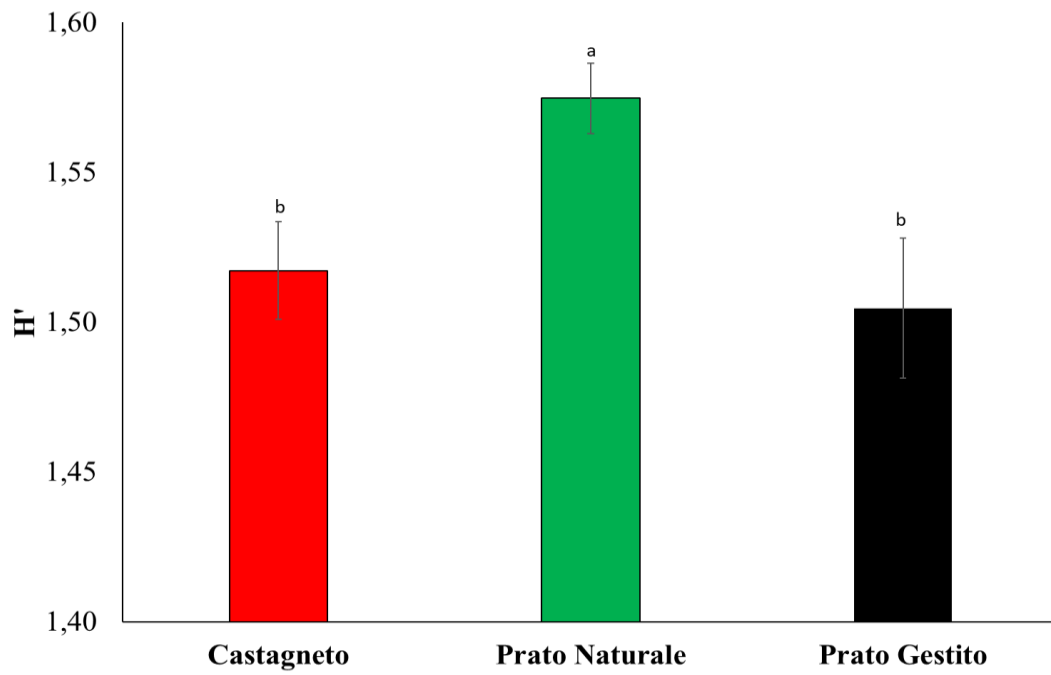
Come si evince dal grafico in Figura 16, i risultati ottenuti mostrano che le attività enzimatiche riscontrate nel prato naturale sono significativamente più alte rispetto al castagneto e al prato gestito, ad eccezione dell'attività dell'enzima cellulasi, per cui non risultano differenze significative tra il castagneto e il prato

naturale. Così come per le attività enzimatiche, l'attività enzimatica specifica, espressa come  $SEIc/C_{org}$  (Figura17) risulta significativamente più basse per il prato gestito. Non si evidenziano variazioni significative per l'attività enzimatica specifica tra prato naturale e castagneto.



**Figura 17** Attività enzimatica specifica rispetto al C organico ( $SEIc/C_{org}$ ). In rosso sono riportati i dati relativi ai campioni provenienti dal castagneto, in verde e in nero quelli rilevati per i campioni proveniente dal prato naturale e dal prato gestito. (I dati sono medie di 9 campioni, analizzati in triplicato; le barre indicano l'errore standard,  $n=27$ ).

Per la stima della diversità, sulla base delle attività enzimatiche, è stato calcolato l'indice di Shannon (Figura 18), significativamente più elevato nel prato naturale rispetto sia al castagneto che al prato gestito. Non si rilevano, invece, significative differenze tra il castagneto e il prato gestito

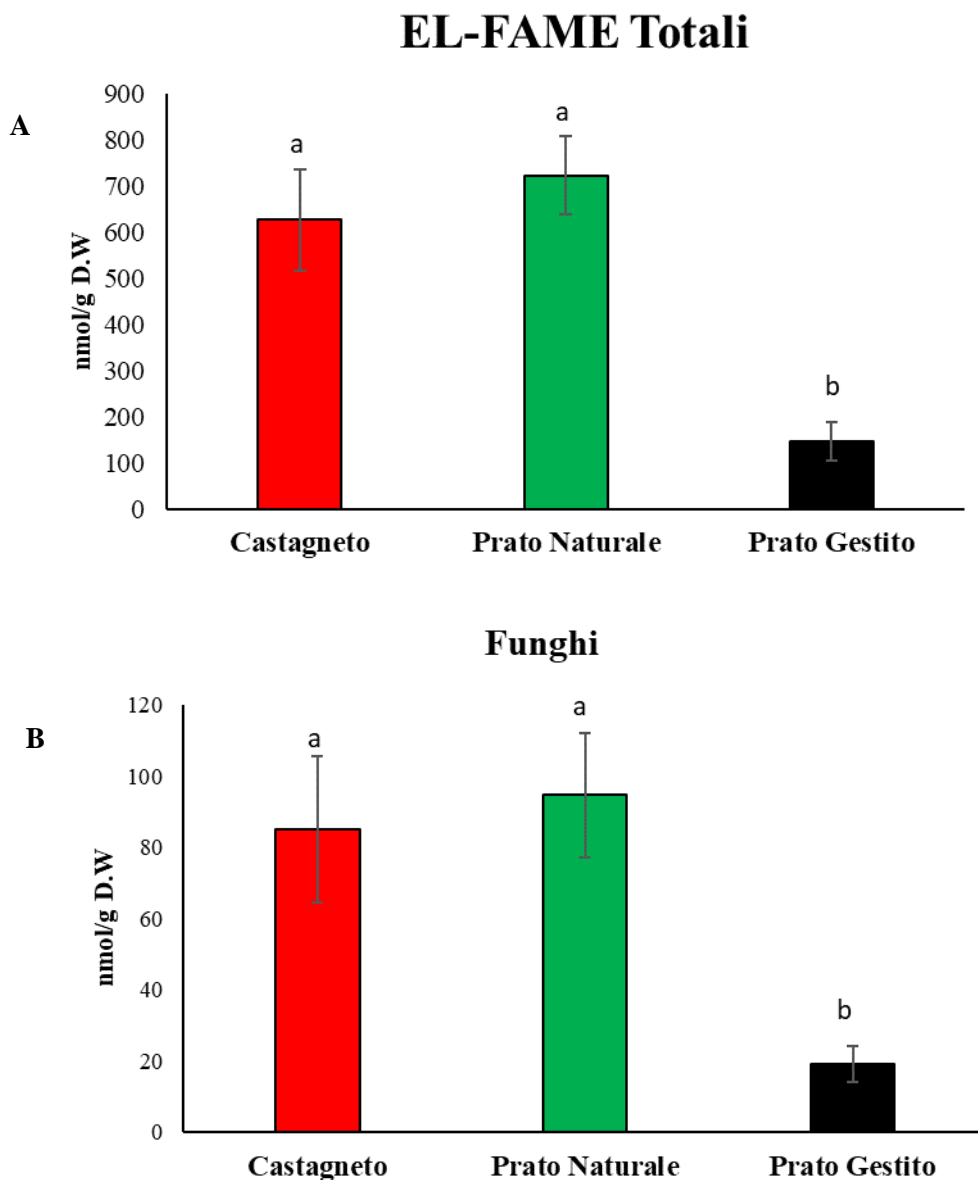


**Figura 18** *Indice di Shannon. In rosso sono riportati i dati relativi ai campioni provenienti dal castagneto, in verde e in nero quelli rilevati per i campioni provenienti dal prato naturale e dal prato gestito. (I dati sono medie di 9 campioni, analizzati in triplicato; le barre indicano l'errore standard, n=27)*

## I fosfolipidi di membrana

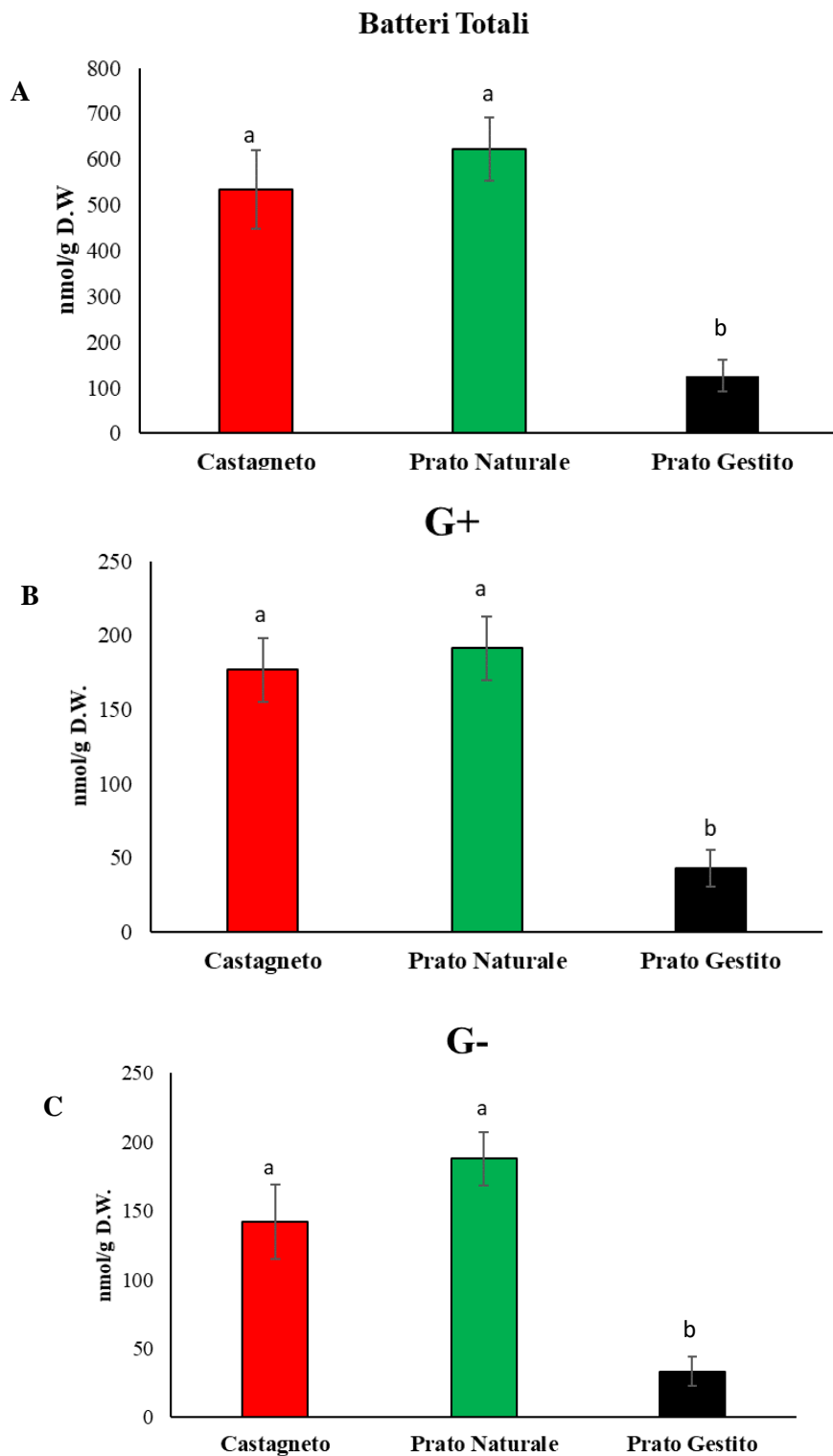
Le Figure 19, 20 e 21 mostrano i risultati relativi alla struttura della comunità microbica dei suoli oggetto dello studio.

Gli EL-FAME totali (Figura. 19 A) risultano significativamente più bassi nel prato gestito rispetto al prato naturale e al castagneto, tra i quali non si evidenziano variazioni significative.



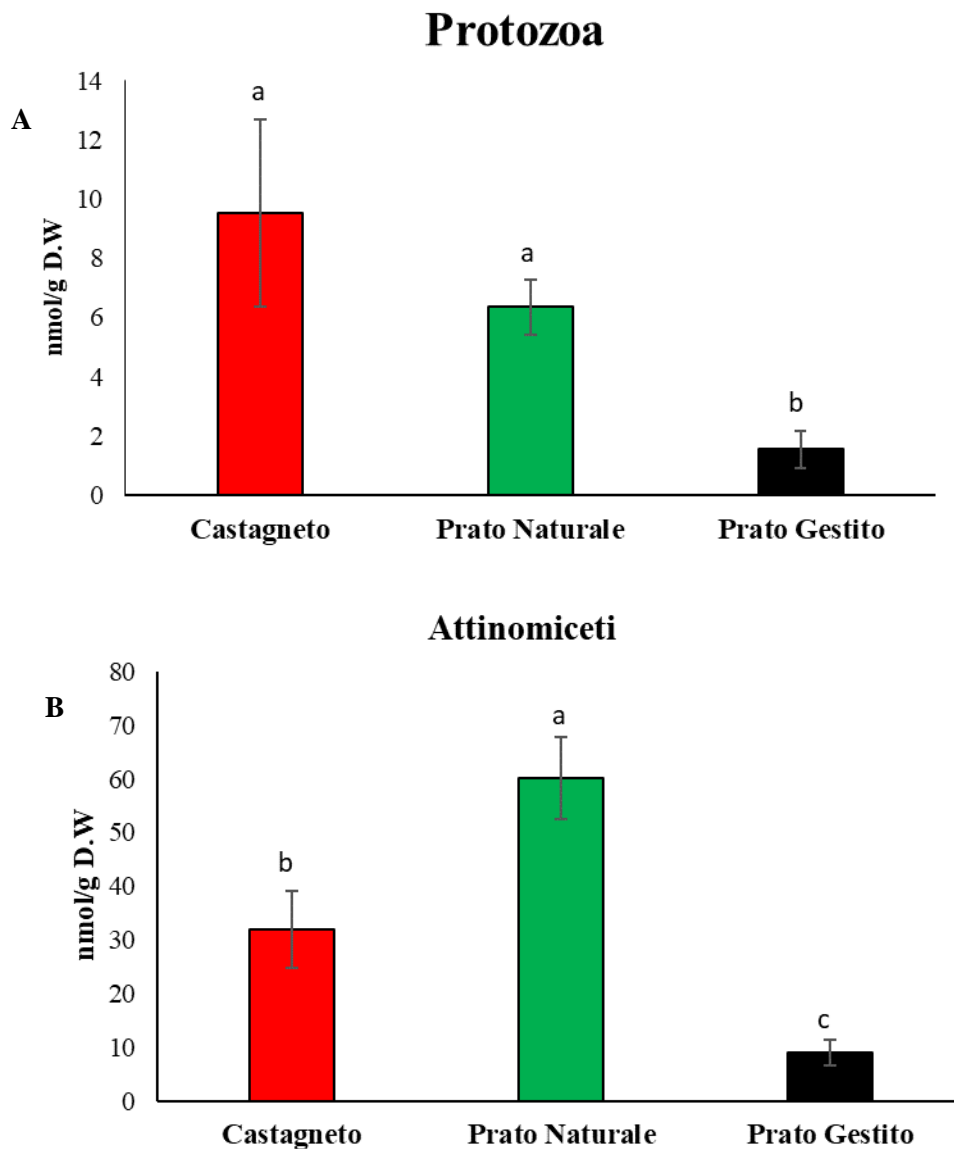
**Figura 19** Rappresentazione degli EL-FAME: (A) EL-FAME totali; (B) Funghi. In rosso sono riportati i dati relativi ai campioni provenienti dal castagneto, in verde e in nero quelli rilevati per i campioni provenienti dal prato naturale e dal prato gestito. (I dati sono medie di 9 campioni, analizzati in triplicato; le barre indicano l'errore standard,  $n=27$ ).

Lo stesso trend è rilevabile per i funghi (Figura. 19 B), per i batteri totali (FIGURA. 20 A), per i G+ (Figura. 20 B) e i per i G- (FIGURA. 20 C).



**Figura 20** Rappresentazione degli EL-FAME: (A) Batteri totali; (B) G+ (C) G-. In rosso sono riportati i dati relativi ai campioni provenienti dal castagneto, in verde e in nero quelli rilevati per i campioni provenienti dal prato naturale e dal prato gestito. (I dati sono medie di 9 campioni, analizzati in triplicato; le barre indicano l'errore standard, n=27).

Per i protozoa e gli attinomiceti si riscontrano evidenze differenti: i protozoa risultano significativamente più abbondanti nei suoli provenienti dal castagneto e dal prato naturale rispetto al prato gestito (Figura 21 A); gli attinomiceti (Figura 21 B) invece sono presenti in maggiori quantità nel prato naturale, seguiti nell'ordine da castagneto e prato gestito.



**Figura 21** Rappresentazione degli EL-FAME: (A) Protozoa e (B) Attinomiceti. In rosso sono riportati i dati relativi ai campioni provenienti dal castagneto, in verde e in nero quelli rilevati per i campioni provenienti dal prato naturale e dal prato gestito. (I dati sono medie di 9 campioni, analizzati in triplicato; le barre indicano l'errore standard, n=27)

## DISCUSSIONI

L'obiettivo di questo studio è stato quello di verificare come le diverse coperture e gli usi del suolo influenzano le proprietà chimiche, fisiche e biochimiche del suolo.

I tipi di vegetazione e i componenti del suolo sono fortemente legati alle attività microbiche attraverso una varietà di interazioni dirette e indirette (Kardol, 2010; Zhang, 2016). Le differenze nella composizione della comunità microbica in relazione ai diversi usi del suolo sono state attribuite sia alle differenze nelle proprietà del suolo stesso che alla copertura vegetale (Costa, 2006; Garcia-Franco, 2015). Inoltre i diversi usi del suolo e le diverse pratiche di gestione, possono dare luogo a variazioni nelle proprietà fisico-chimiche dei suoli, influenzandone anche la quantità e la qualità della SOM incorporata nel sistema (Galatini, 2014; Zalba, 2016).

Il pH dei suoli delle diverse aree variava tra 5,5 e 5,8. Il suolo del prato naturale presentava un  $C_{org}$ ,  $N_{tot}$  e CEC sostanzialmente più elevati rispetto ai terreni degli altri usi del suolo studiati: il  $C_{org}$  e  $N_{org}$  presenti nel prato naturale sono più alti di circa il 16% e il 27% rispetto al castagneto e di circa il 48% e il 40% rispetto al prato gestito; la quantità di SOM rilevata nel prato gestito è inferiore del 48% rispetto al prato naturale e del 38% rispetto al castagneto.

Il suolo dei boschi di castagno ha presentato più alto valore del rapporto di C/N e il più elevato contenuto di FA.

Il rapporto C/N, coerente con quanto riportato da altri autori (Saviozzi, 2001; Guimarães, 2013, Liu, 2016) è più elevato nel castagneto di circa il 13% rispetto al prato naturale e del 25% rispetto al prato gestito; da questo risultato si evince una maggiore tendenza all'umificazione della SOM nell'ambiente forestale (Stevenson, 1984; Rosa, 2005; Guimarães, 2013).

Un più alto valore del rapporto C/N del suolo può essere dovuto ad un aumento dell'assorbimento di N delle piante e al successivo stoccaggio a lungo termine

nella biomassa vegetale o ad un aumento del rapporto C/N della lettiera restituita al suolo dalla vegetazione legnosa.

La determinazione degli FA fornisce una stima dell'effetto dei differenti ecosistemi studiati su processo di umificazione della SOM. In linea con quanto riportato in letteratura (Moraes Tavares, 2014) e con i risultati del rapporto C/N, il suolo del castagneto presenta un maggiore contenuto di FA, circa il 16% in più rispetto al prato naturale e di circa il 57% rispetto al prato gestito.

La proporzione tra la quantità di acido fulvico (FA) estratto dal suolo e la sostanza organica (SOM), significativamente più elevata per i suoli del castagneto, rappresenta che i substrati organici si differenziano nelle fasi terminali del processo di umificazione. Il castagneto ha un valore di rapporto significativamente più alto rispetto ad altre aree.

La FT-IR fornisce preziose informazioni sui gruppi funzionali presenti nella FA estratti dai tre diversi suoli e negli FA estratti dall'acqua minerale dello stabilimento di Fiuggi. Gli spettri di assorbimento dei campioni di FA estratti dai diversi suoli indicano una struttura pressoché simile, che differiscono solo per l'intensità di assorbimento (Stevenson, 1994). Indipendentemente dalla loro origine, tutti gli FA presentano spettri infrarossi simili.

L'analisi dei dati FT-IR ha evidenziato un analogo schema spettroscopico tra gli FA estratti dal castagneto e dal prato naturale e gli FA estratti dall'acqua minerale. I picchi a 1720-1630-1120  $\text{cm}^{-1}$  sono prominenti sia nel suolo che nell'acqua minerale. Una banda molto intensa è presente nell'intervallo 1227-1224  $\text{cm}^{-1}$  (allungamento C-O e deformazione O-H dei gruppi COOH).

Gli spettri acquisiti per l'FA non mostrano difformità significative rispetto agli spettri riportati in letteratura (Stevenson, 1994), con una intensa banda a 1720  $\text{cm}^{-1}$  per la presenza di elevate quantità di gruppi carbossilici.

Non è stata rilevata nessuna particolare differenza tra le tesi. A variare è l'intensità del segnale che risulta, molto più basso per gli FA provenienti dal prato gestito: l'intensità di segnale più alta è riscontrata nei campioni provenienti dal

castagneto, a cui seguono quelli provenienti dal prato gestito e infine con un segnale molto basso, i campioni estratti dal prato gestito; l'assorbanza dei picchi, essendo questa proporzionale alla concentrazione della matrice che ha generato il segnale, attesta la presenza in concentrazioni minori dei diversi gruppi funzionali che caratterizzano la struttura della molecola di FA.

Gli FA sono molto ricchi in gruppi idrofili COOH e OH a cui devono la loro mobilità e con componente aromatica. I principali gruppi riscontrati sono:

- 3400  $\text{cm}^{-1}$  (stretching del legame O–H di fenoli, H<sub>2</sub>O, OH alifatici)
- 2920  $\text{cm}^{-1}$  (dovuti a stretching del legame C–H di gruppi CH<sub>2</sub>)
- 1720 e 1220  $\text{cm}^{-1}$  (rispettivamente dovuti a stretching del legame –C=O e a stretching del legame –C–O e deformazione del legame O–H dei gruppi COOH)
- 1620  $\text{cm}^{-1}$  (rispettivamente dovuti a stretching del legame C=C di anelli aromatici ma anche ad ammidi I e dovuto ancora a stretching del legame C=C di anelli aromatici e alla presenza di ammidi II)
- 1400  $\text{cm}^{-1}$  dovuto a OH fenolici e/o OH di COOH
- 1050  $\text{cm}^{-1}$  dovuto stretching del legame C–O di polisaccaridi e/o vibrazione del legame Si–O di composti minerali (ceneri).

Le stesse identificazioni possono essere effettuate per lo spettro dell'FA estratto dall'acqua, in cui i segnali dei diversi gruppi funzionali vengono registrati con una maggiore intensità rispetto ai suoli ad indicare la più semplice ma più ricca composizione strutturale della molecola, ovviamente viene identificata una intensa e larga banda a 3400 dovuta stretching del legame O–H dell'H<sub>2</sub>O, una banda molto intensa nell'intervallo 1227-1224  $\text{cm}^{-1}$  dovuta all'allungamento C–O e alla deformazione O–H dei gruppi COOH ed un picco intenso relativo allo stretching del legame C–O di polisaccaridi a 1040  $\text{cm}^{-1}$ .

La conoscenza delle variazioni naturali degli ecosistemi è essenziale per la sostenibilità degli ecosistemi stessi. Studi a livello paesaggistico hanno dimostrato le relazioni tra la composizione della comunità microbica del suolo e le condizioni ambientali biotiche e abiotiche (Waldrop, 2000; Myers, 2001;

Singh, 2009). I prati e i terreni coltivati rappresentano due tipi di uso del suolo che hanno effetti distinti sulle caratteristiche del suolo e microbiologia del suolo. I microrganismi del suolo contribuiscono alla qualità del suolo e giocano ruoli chiave nei processi che si svolgono nell'ecosistema del suolo, tra cui il ciclo dei nutrienti, la decomposizione della materia organica e biorisanamento. Variazioni nelle comunità microbiche del suolo, attribuite alla gestione dell'ecosistema e al cambiamento globale, possono significativamente influenzare l'equilibrio dell'ecosistema (Bossio e Scow 1995). I microrganismi del suolo sono strettamente correlati con l'ambiente circostante, rispondendo rapidamente ai cambiamenti e stress ambientale. Così, questi microrganismi sono utilizzati come indicatori sensibili delle sollecitazioni del suolo e di recupero del suolo (Winding, 2005).

L'attività biochimica del suolo gioca un ruolo importante nel processo di degradazione della SOM che rappresenta un processo di umificazione preliminare. Gli enzimi del suolo derivano da comunità microbiche simbiotiche e non simbiotiche che sono stimolate dalla necessità e dalla disponibilità di C e di altri nutrienti del suolo. Per questo motivo, la potenziale attività enzimatica può essere utilizzata per valutare l'impatto dei cambiamenti di utilizzo del suolo. L'attività enzimatica del suolo, utilizzata come altro indice di diversità funzionale microbica (Nannipieri et al. 2002), è stata suggerita come potenziale indicatore sensibile nel rilevare cambiamenti della qualità del suolo a causa della gestione del suolo e per il monitoraggio dell'attività dei microrganismi legato alla trasformazione dei nutrienti del suolo (Acosta-Martinez, 2007).

Il prato naturale presenta i più alti livelli di attività enzimatica sia rispetto al castagneto che al prato gestito, ad eccezione dell'attività enzimatiche della cellulasi che non presenta variazioni significative tra il prato naturale e il castagneto.

Tra tutti gli enzimi quello che presenta livelli di attività più elevato è la  $\beta$ -glucosidasi, questo è un enzima appartenente alla classe delle idrolasi, che

catalizza la fase finale della biodegradazione dei polisaccaridi (in particolare la cellulosa) e di conseguenza permette il rilascio di glucosio rendendolo disponibile per i microorganismi (Esen, 1993). La  $\beta$ -glucosidasi è principalmente prodotta dai funghi del terreno ma ci sono evidenze che suggeriscono che una frazione significativa della sua attività enzimatica nel suolo dipende da enzimi rilasciati nella soluzione circolante o fissati sulle superfici dei minerali argillosi e dei composti umici. La  $\beta$ -glucosidasi svolge quindi un ruolo fondamentale nel ciclo del carbonio, fungendo da fonte di energia per gli organismi presenti nel terreno ed è per questo apprezzata come potenziale indicatore della qualità dei suoli. Il nostro risultato ottenuto è coerente con altri ricercatori, che hanno trovato attività enzimatiche elevate nei pascoli a causa dell'esteso accumulo di biomassa di radici di erba cellulosica che erano significativamente superiori in un terreno coltivato. I fattori che contribuiscono alle attività più elevate di  $\beta$ -glucosidasi nei prati possono includere il pascolo del bestiame e la loro aggiunta di escrementi, l'elevato turnover delle radici dell'erba e l'assenza di aratura.

In linea con quanto riportato da altri autori (Cavalcante, 2020) ciò che è possibile evidenziare in questo studio, è che le attività degli enzimi nel suolo aumentano sensibilmente con la diminuzione del disturbo antropico, il prato gestito dedicato ad attività ludiche, presenta livelli di attività enzimatiche molto basse, rispetto al castagneto e al prato naturale. Le attività degli enzimi nel suolo aumentano sensibilmente all'incremento degli input di sostanza organica e alla disponibilità di substrati di varia natura e con la diminuzione del grado di disturbo antropico (Ciminelli, 2011).

L'esteso accumulo di biomassa radicalica di erba cellulosica, più elevate rispetto al castagneto e al prato gestito, potrebbero essere responsabili delle elevate attività enzimatiche riscontrate nel prato naturale (Frąc, 2020).

Il rapporto SEIc/Corg esprime specifiche attività enzimatiche rispetto al C totale organico. L'Indice Enzimatico Sintetico per il ciclo C (SEIc) è stato calcolato sommando il valore delle attività enzimatiche di  $\beta$ -glucosidasi,  $\alpha$ -glucosidasi,  $\beta$ -

xylosidase,  $\beta$ -cellobiohidrolase, N-acetil- $\beta$ glucosaminidasi. Il rapporto SEIc/Corg esprime specifiche attività enzimatiche rispetto al totale organico C. I terreni sottoposti a minore impatto antropico hanno mostrato un elevato contenuto di materia organica che di conseguenza porta ad una maggiore attività microbica. Tuttavia, quando l'attività enzimatica è espressa per unità di carbonio, si osserva sempre una maggiore attività nei suoli meno disturbati: castagneti e prati naturali. Ciò suggerisce una diversificazione della potenziale attività idrolitica per unità di substrato organico, che può essere utilizzata anche come indicatore della qualità SOM.

Per caratterizzare la diversità delle specie in una comunità è stato calcolato l'indice di Shannon che esprime la diversità funzionale del suolo utilizzando le attività dei 7 enzimi selezionati. Dai risultati ottenuti, si evince che da un punto di vista ecologico, le funzioni idrolitiche nel suolo del prato naturale sono più diversificate, mostrando una diversità funzionale significativamente maggiore rispetto sia al castagneto che al prato gestito.

I diversi usi del suolo influenzano in maniera significativa la qualità degli input vegetali restituiti al suolo, determinando una variazione della struttura della comunità microbica del suolo stesso: la biomassa microbica può differire tra suoli forestali ed agricoli, tra conifere e latifoglie, con l'età degli alberi (Bossio et al., 2005; Huygens et al., 2011; Xiao et al., 2016).

Indicati come biomarcatori della comunità microbica, gli EL-FAME sono ampiamente utilizzati per definire la struttura della comunità microbica del suolo. I fosfolipidi sono i principali costituenti delle membrane plasmatiche ed hanno un ruolo unicamente strutturale in quanto non si accumulano nelle cellule come materiale di riserva e, una volta liberati nel suolo dopo la morte della cellula, vengono rapidamente decomposti ad opera degli enzimi idrolitici (pertanto sono associati esclusivamente a cellule microbiche vive).

Specifici tipi di acidi grassi sono associati a gruppi microbici distinti come funghi, batteri gram positivi (G+) e gram negativi (G-), così come attinomiceti;

tutti possono fornire informazioni utili sulla composizione della comunità microbica (Zelles, 1999). Sebbene molti acidi grassi siano indicativi della presenza di vari gruppi di microrganismi, l'applicazione generale degli EL-FAME ha lo scopo di creare un profilo della composizione della comunità microbica, un'impronta digitale della comunità microbica.

È stato osservato che cambiamenti della struttura della comunità microbica del suolo si riflettono in cambiamenti del profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi, in quanto gruppi microbici differenti presentano una diversa composizione fosfolipidica delle membrane cellulari (Tunilid e White, 1992).

Per tale motivo, il profilo dei EL-FAME è stato utilizzato per studiare le differenze dei 3 ambienti a livello di struttura della comunità microbica.

La concentrazione di EL-FAME totale, che fornisce una visione quantitativa della biomassa microbica vitale/attiva del suolo perché i fosfolipidi sono rapidamente degradati dopo la morte delle cellule e non si trovano nel prodotto di stoccaggio (Zelles, 1997), risulta nettamente superiore nel castagneto e nel prato naturale rispetto al prato gestito.

Lo stesso trend si ritrova per quanto riguarda la concentrazione di G<sup>+</sup> e G<sup>-</sup>, batteri tot e funghi, questo indica che l'aumento del disturbo antropico incide negativamente sulla composizione tassonomica della comunità microbica.

Questo studio ha trovato che l'abbondanza degli actinomiceti nel prato naturale è significativamente superiore rispetto sia al castagneto che al prato gestito. Diversi studi hanno dimostrato che gli actinomiceti sono i più diffusi nei quattro terreni di vegetazione erbacea, e la loro relativa abbondanza è nettamente superiore a quella delle foreste e degli aratri; gli actinomiceti sono la classe di microrganismi dominanti nei terreni erbosi (Li, 2019; He 2020; Zhang, 2020). Gli actinomiceti possono degradare la cellulosa e la chitina, che è la principale fonte di approvvigionamento di nutrienti del suolo agendo sul carbonio organico più difficile da decomporre (Deng, 2017).

Dai risultati ottenuti si evidenzia che la diversa gestione dei suoli modifica la struttura della comunità microbica così come l'aumento del disturbo antropico incide negativamente sulla composizione tassonomica della comunità stessa.

La risposta della composizione della comunità microbica del suolo ai cambiamenti di destinazione d'uso del suolo o ai disturbi è comunemente valutata dai profili EL-FAME a livello di comunità.

Ad esempio, diversi autori hanno osservato che la comunità microbica del suolo ha mostrato alcune specificità in relazione alla copertura arborea (Guo, 2016). Coerente con i risultati di studi precedenti (Luo 2020; Lauber, 2008; Krashevskaja; 2015), in questo lavoro è stato riscontrato che il tipo di utilizzo del suolo ha un'influenza significativa sulle comunità microbiche del suolo e sulle attività enzimatiche extracellulari microbiche in grande parte, a causa delle diverse proprietà fisico-chimiche del suolo e della struttura della comunità vegetale.

## **CAPITOLO 5**

### **CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE**

Nell'ottica di valorizzare il contributo ecosistemico castanicolo, il progetto di tesi ha studiato, nella prima fase del progetto, i prodotti di umificazione (acido fulvico, FA) che si originano dai suoli dei castagneti sovrastanti le sorgenti minerali delle acque minerali di Fiuggi, con il fine di confrontarli con la sostanza organica isolata dalle acque minerali di Fiuggi per esaltare la similarità e individuare nel castagneto l'origine dell'acido fulvico presente nelle acque.

Il progetto di tesi di dottorato ha previsto studi di caratterizzazione (pirolisi-GC-MS, NMR, FT-IR, IRMS) svolti a carico della componente fulvica estratta dal suolo e dall'acqua minerale. I risultati analitici ottenuti mostrano che gli acidi fulvici presenti nell'acqua minerale di Fiuggi presentano delle analogie spettrali e similarità qualitative dei profili pirolitici con l'acido fulvico isolato dal suolo sovrastante l'acquifero ricoperto da un bosco di castagno.

Il bacino di Fiuggi e il suo delicato equilibrio idrogeologico sono estremamente sensibili alle caratteristiche geologiche, idrogeologiche ed ecologiche della zona. La particolare sensibilità e fragilità del sistema naturale è dovuta all'elevata variabilità dei tipi di copertura vegetale. Inoltre, il diverso uso del suolo può influenzare la qualità dell'acqua di falda attraverso la variazione delle caratteristiche delle sostanze umiche (acidi fulvici) a causa dei diversi pathway del processo di umificazione. Nel caso specifico l'ecosistema complesso coinvolto non si limita ad ospitare boschi di castagno ma si caratterizza per la presenza di una estesa area boscata, sovrastante gli acquiferi, dei prati naturali contermini, e un prato gestito per attività ludiche. Considerando che, il diverso uso del suolo può determinare la variazione delle caratteristiche delle sostanze umiche (acidi fulvici) a causa del diverso percorso del processo di umificazione,

e quindi come conseguenza nel caso specifico può influenzare la qualità delle acque.

Un secondo obiettivo della ricerca è stato quello di studiare come le diverse coperture e gli usi del suolo influenzano le proprietà chimiche, fisiche e biochimiche del suolo. In particolare, è stato studiato l'effetto dei diversi tipi di copertura sui processi di umificazione del suolo e sulle sostanze umiche da un punto di vista qualitativo e quantitativo, attraverso l'analisi comparativa delle sostanze umiche estratte dai suoli e dall'acqua mediante FT-IR, e caratterizzazione funzionale e strutturale della popolazione microbica del suolo, coinvolta nei processi di umificazione delle tre aree a diversa gestione oggetto di studio. I risultati ottenuti mostrano che i prati naturali presentano un migliore stato di salute del suolo e una maggiore quantità di SOM, rispetto al suolo di castagneto e al campo da golf. Nonostante ciò, in base alla quantità di FA trovato, si può dedurre che il castagneto ha una maggiore tendenza a produrre sostanze umiche ad alta solubilità. Dall'analisi comparativa degli spettri FT-IR degli FA isolati dai suoli e dall'acqua minerale, si può ipotizzare che FA nell'acqua minerale abbia origine dai processi di umificazione che avvengono nei suoli meno disturbati. Pertanto, questo studio suggerisce che nell'area di Fiuggi la qualità dell'acqua può essere influenzata dall'uso del suolo. L'arricchimento che il soprassuolo conferisce alle acque, che attraversano il suolo vulcanico che ospita il castagneto, è estremamente preziosa: ai fini della definizione di strategie finalizzate alla valorizzazione delle acque, alla corretta gestione del suolo, alla gestione sostenibile del capitale naturale forestale coinvolto e in definitiva per assicurare continuità di disponibilità nel tempo di questa importante risorsa per la sopravvivenza dell'uomo. Il mantenimento e la promozione della qualità del suolo, l'adozione di moduli e schemi selvicolturali, e di gestione forestale volti a conseguire una maggiore efficienza biologica dei soprassuoli, è quindi un requisito fondamentale per garantire la sostenibilità dell'ecosistema e consentire

l'esaltazione delle molteplici funzioni ecosistemiche, con particolare riguardo per l'acqua.

## **PROSPETTIVE FUTURE**

La pirolisi analitica è definita come la decomposizione termochimica di prodotti organici a temperature elevate in assenza di ossigeno. Il prodotto della pirolisi (pirolizzato) dalla maggior parte delle matrici naturali è costituito generalmente da miscele più o meno complesse di prodotti volatili con precursori specifici, come furani e pirani da carboidrati, metossifenoli da lignine, nitrili, pirroli e piperazine da proteine. Il pirolizzato è sottoposto a separazione cromatografica che, se combinata con uno spettrometro di massa, fornisce informazioni sulla struttura molecolare anche di miscele complesse di sostanze macromolecolari naturali e sintetiche.

Nell'ultimo decennio è emersa una strumentazione innovativa per ottenere informazioni analitiche sulla composizione e la chimica di campioni solidi complessi. La gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa con rapporto isotopico (GC-C-IRMS) è un metodo analitico che permette l'analisi isotopica specifica del composto (CSIA). L'analisi isotopica specifica del composto di pirolisi (Py-CSIA), è una tecnica relativamente nuova in cui i prodotti di pirolisi, dopo la separazione gascromatografica, sono diretti in una camera di combustione e successivamente in uno spettrometro di massa a rapporto isotopico (Py-GC-C-IRMS) che misura i rapporti percentuali degli isotopi stabili, cioè,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta\text{D}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  rispettivamente di composti specifici di pirolisi.

Il processo di pirolisi non produce un frazionamento apprezzabile di isotopi stabili pertanto tali prodotti sono considerati isotopicamente rappresentativi del materiale di origine. L'accoppiamento delle due tecniche, pirolisi analitica e analisi isotopica, può fornire preziose informazioni sui materiali naturali e sintetici, oltre la loro impronta molecolare, permette la tracciabilità dei loro processi di formazione e della loro origine, inoltre permette di ottenere preziose informazioni sull'origine biogenetica e geografica delle molecole organiche.

L'analisi degli isotopi specifici della pirolisi (Py-CSIA) combina i vantaggi della pirolisi analitica (Py-GC-MS) con l'IRMS per la caratterizzazione degli aggregati o composti organici a bassa solubilità. In questo caso, il pirolizzato è diretto ad uno spettrometro di massa a rapporto isotopico (Py-GC-C-IRMS) per misurare le proporzioni degli isotopi stabili ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) di specifici composti di pirolisi.

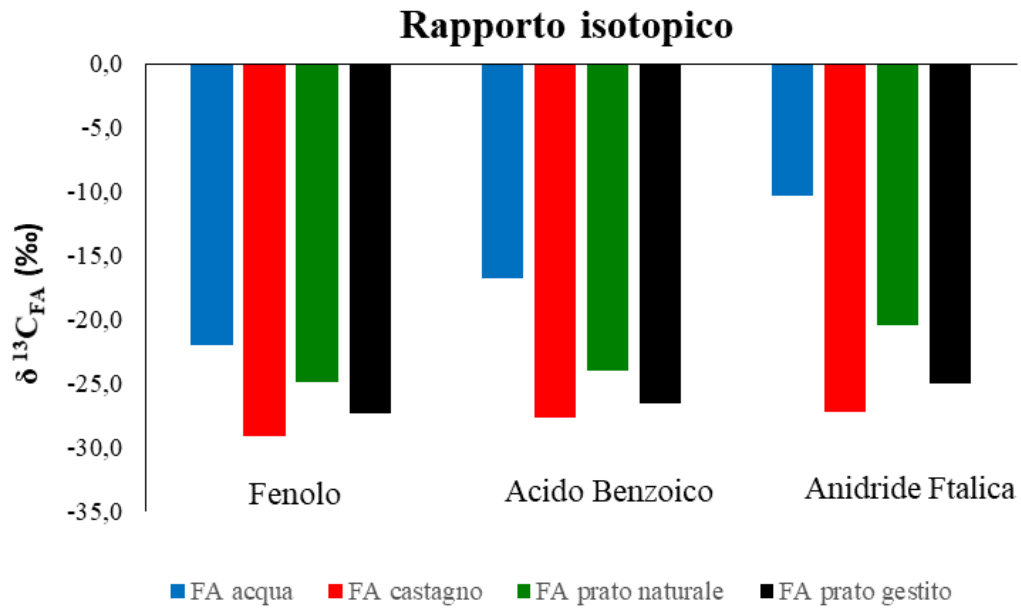
Nissenbaum e Schallinger (1974) hanno dimostrato che gli isotopi di carbonio degli FA del suolo sono l'equivalente isotopico della vegetazione che apporta materia organica al suolo entro cui cresce.

Con l'obiettivo di caratterizzare e identificare la provenienza degli FA presenti nell'acqua di Fiuggi, è stata condotta, sui campioni di FA estratti dall'acqua minerale di Fiuggi e dai suoli di entrambe le sperimentazioni, l'analisi isotopica specifica dei composti di pirolisi.

In Figura 22 sono mostrati i risultati preliminari dell'analisi diretta degli isotopi specifici dei composti di pirolisi (Py-CSIA) del carbonio ( $\delta^{13}\text{C}$ ) effettuata su alcuni campioni di FA (FA estratti dall'acqua e FA estratti da suoli provenienti da castagno, prato naturale e prato gestito).

Questo studio analitico, in svolgimento presso l'**Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (CSIC)**, che avrebbe potuto dare delle specifiche indicazioni sulla provenienza della sostanza umica nell'acqua minerale di Fiuggi, è stato però prematuramente interrotto a causa del lockdown imposto per il Covid-19.

I dati mostrati in questa sezione non possono essere al momento utilizzati per formulare delle ipotesi, ma possono essere utilizzati come punto di partenza per la continuazione di questo studio, certi del fatto che possa condurre ad interessanti e scientificamente valide risposte.



**Figura 22** Rappresentazione dei valori di  $\delta^{13}C$  di composti specifici (Fenolo, Acido benzoico, Anidride ftalica) degli FA estratti dai suoli (Castagneto, Prato naturale e Prato gestito) e dall'acqua naturale di Fiuggi rilasciati da pirolisi analitica

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Acosta-Martinez V, Cruz L, Sotomayor-Ramirez D, Pérez-Alegría L., 2007. Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. *Applied Soil Ecology*. 2007;35(1):35–45. doi: 10.1016/j.apsoil.2006.05.012.
2. Ahamadou, B., 2013. Composition and structure of humic substances in long-term fertilization experimental soils of southern China. *Journal of Soil Science and Environmental Management*, 4(4), 77–86. doi:10.5897/jssem2013.0407;
3. Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy, P., 1985. An introduction to humic substances in soil, sediment, and water. In: *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water: Geochemistry, Isolation and Characterization*, Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy, P., Eds., Wiley, New York, pp. 1-9.
4. Amir, S., Hafidi, M., Lemee, L., Bailly, J. R., Merlina, G., Kaemmerer, M., ... & Amblès, A., 2006. Structural characterization of fulvic acids, extracted from sewage sludge during composting, by thermochemolysis–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 77(2), 149-158.
5. Andreux F., 1996. “Humus in world soils” in: *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Piccolo A. ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 45-100.
6. Baigorri, R., Fuentes, M., González-Gaitano, G., & García-Mina, J. M., 2007. Analysis of molecular aggregation in humic substances in solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 302(1-3), 301-306.
7. Baldock, J.A., Oades, J.M., Waters, A.G., Ping, X., Vassallo, A.M., e Wilson, M.A., 1992. Aspects of the chemical structure of soil organic

- materials as revealed by solidstate<sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Biogeochemistry* 16: 1–42.
8. Bernoux, M., & Cerri, C. E. P., 2005. GEOCHEMISTRY | Soil, Organic Components. *Encyclopedia of Analytical Science*, 203–208. doi:10.1016/b0-12-369397-7/00245-4
  9. Bossio, D. A., & Scow, K. M., 1995. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11), 4043-4050.
  10. Brady, N.C., Weil, R.R. and Weil, R.R., 2008. *The nature and properties of soils* (Vol. 13, pp. 662-710). Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
  11. Calace N., Petronio B.M., de Angelis Curtis S., Fraioli A., Delfini M., D'Ascenzo G., 1999. Chemical analysis of water of the Anticolana Valley: Isolation of humic compounds. *Nephron*; 81(1):93–97.
  12. Cambardella C. A., Elliot E. T., 1992. Particulate soil organic matter changes across a grassland cultivation sequence. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56, 777-783
  13. Cavalcante, W. F., Silva, L. R. C. D., Silva, E. G. D., Oliveira, J. T. C., & Moreira, K. A., 2020. Enzymatic Activity Of Caatinga Biome With And Without Anthropic Action1. *Revista Caatinga*, 33(1), 142-150.
  14. Chatterjee, A., Ingram, L. J., Vance, G. F., & Stahl, P. D., 2009. Soil processes and microbial community structures in 45- and 135-year-old lodgepole pine stands. *Canadian journal of forest research*, 39(11), 2263-2271.
  15. Costa, R., Götz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G., & Smalla, K., 2006. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS microbiology ecology*, 56(2), 236-249.

16. Cullotta, S., La Mela Veca, D. S., Maetzke, F., Sferlazza, S., Baiamonte, G., Bagarello, V., Iovino, M., 2013. I servizi ecosistemici forestali connessi alla tutela del suolo e delle acque. *Gazzetta Ambiente*. 43-52.
17. D.Lgs 25/01/1992, n° 105 “Attuazione della direttiva 80/777/CEE relativa alla utilizzazione ed alla commercializzazione della acque minerali naturali”),
18. D.M. 20/01/1927 “Istruzioni per l’utilizzazione ed il consumo delle acque minerali naturali”;
19. Dang P, Yu X, Le H, Liu J, Zhao Z., 2017. Effects of stand age and soil properties on soil bacterial and fungal community composition in chinese pine plantations on the loess plateau. *Plos One*; 12(10), e0186501.
20. Davydova, N.K., Sergeev, V.N., Girbul, E., 2014. The Role of Humous Acids in Acqua di Fiuggi Mineral Water in Degrading Stones Formed in the Urinary Tract (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 48, 587–592. doi:10.1007/s11094-014-1155-y
21. De Angelis Curtis, S., Curuni, R., Fraioli, A. et al., 1999. *Nephron*, 81(1), 98 – 102
22. del Rio J. C., and Hatcher P. G., 1998. Analysis of aliphatic biopolymers using thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) and gas chromatography - mass spectrometry. *Organic Geochemistry*. 29, 1441-1451.
23. Deliberazione Giunta Regionale 158/2016. Adozione delle Misure di Conservazione finalizzate alla designazione delle zone speciali di conservazione (ZSC) ai sensi della Direttiva 92/43/CEE (Habitat) e del DPR 357/97 e s.m.i. - codice IT 60500 (Frosinone). Regione Lazio.
24. Dou, S., Zhang, J. J., & Li, K. (2008). Effect of organic matter applications on <sup>13</sup>C-NMR spectra of humic acids of soil. *European Journal of Soil Science*, 59(3), 532-539.

25. Esen A., 1993. b-Glucosidases: overview. *American Chemical Society*, 533, 1-14
26. Fahramand, M., Moradi, H., Noori, M., Sobhkhizi, A., Adibian, M., Abdollahi, S., & Rigi, K., 2014. Influence of humic acid on increase yield of plants and soil properties. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 3(3), 339-341.
27. Fierer, N., Schimel, J. P., & Holden, P. A. (2003). Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(1), 167-176.
28. Fraç, M., Lipiec, J., Usowicz, B., Oszust, K., & Brzezińska, M. (2020). Structural and functional microbial diversity of sandy soil under cropland and grassland. *PeerJ*, 8, e9501.
29. Fraioli A, De Angelis Curtis S, Ricciuti G, Serio A, D'Ascenzo G., 2001. Effect of water of Anticolana Valley on urinary sediment of renal stone formers. *La Clinica Terapeutica*.152(6):347-351.
30. Frostegård, Å., Bååth, E., & Tunlio, A., 1993 B. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 25(6), 723-730.
31. Frostegård, Å., Tunlid, A., & Bååth, E., 1993 A. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11), 3605-3617.
32. Galantini, J.A., M.E. Duval, J.O. Iglesias, and H. Kruger. 2014. Continuous wheat in semiarid regions: Long-term effects on stock and quality of soil organic carbon. *Soil Science* 179:284–292
33. Garcia-Franco, N., Martínez-Mena, M., Goberna, M., & Albaladejo, J., (2015). Changes in soil aggregation and microbial community structure control carbon sequestration after afforestation of semiarid shrublands. *Soil Biology and Biochemistry*, 87, 110-121.

34. Ghabbour, E. A., & Davies, G. (Eds.). (2014). Humic substances: structures, properties and uses. Woodhead Publishing.
35. González-Vila, F. J., Lankes, U., & Lüdemann, H. D., 2001. Comparison of the information gained by pyrolytic techniques and NMR spectroscopy on the structural features of aquatic humic substances. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 58, 349-359.
36. Gosh K., Schnitzer M., 1980. Macromolecular structures of humic substances. *Soil Science* 129, 266-276
37. Guggenberger, G., & Zech, W., 1994. Dissolved organic carbon in forest floor leachates: simple degradation products or humic substances?. *Science of the Total Environment*, 152(1), 37-47.
38. Guimarães, D. V., Gonzaga, M. I. S., da Silva, T. O., da Silva, T. L., da Silva Dias, N., & Matias, M. I. S., 2013. Soil organic matter pools and carbon fractions in soil under different land uses. *Soil and Tillage Research*, 126, 177-182
39. Guo, Z., Han, J., Xu, Y., Lu, Y., Shi, C., Ge, L., ... & Li, J., 2019. The mineralization characteristics of organic carbon and particle composition analysis in reconstructed soil with different proportions of soft rock and sand. *PeerJ*, 7, e7707.
40. Hatcher, P.G., Clifford, D.J., 1994. *Org. Geochem.* 21: 1081–1092
41. Hatcher, P.G., e Spiker, E.C. “Selective degradation of plant biomolecules” In:., Humic substances and their role in the environment. Frimmel, F.H. e Christman, R.F.,(editori) Chichester, U.K., John Wiley & Sons, (1988) 59–74
42. Hayes M.H.B., Swift R.S., 1990. Genesis, Isolation, Composition and Structures of Soil Humic Substances. In: De Boodt M.F., Hayes M.H.B., Herbillon A., De Strooper E.B.A., Tuck J.J. (eds) *Soil Colloids and Their Associations in Aggregates*. NATO ASI Series (Series B: Physics), vol

214. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2611-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2611-1_10)
43. He BY, Duan XW, Rong L, Zhang RH, Lu HJ, 2020. Land use controls soil bacterial diversity in the dry-hot valley region. Southwestern China. *Archives of Agronomy and Soil Science*; 66(5):694-705.
44. Hopkins, D. W., & Chudek, J. A., 1997 A. Solid-state NMR investigations of organic transformations during the decomposition of plant materials in soil. In G. Cadisch & K. E. Giller (Eds.), *Driven by nature: Plant litter quality and decomposition* (pp. 85–94). Wallingford: CAB International.
45. Hopkins, D. W., Chudek, J. A., Webster, E. A., & Barraclough, D., 1997 B. Following the decomposition of ryegrass labelled with <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N in soil by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *European Journal of Soil Science*, 48(4), 623-631.
46. Horwath, W., 2007. Carbon Cycling And Formation Of Soil Organic Matter. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*, 303–339.
47. Huygens, D., Roobroeck, D., Cosyn, L., Salazar, F., Godoy, R., & Boeckx, P., 2011. Microbial nitrogen dynamics in south central Chilean agricultural and forest ecosystems located on an Andisol. *Nutrient cycling in agroecosystems*, 89(2), 175-187.
48. Hwang, H. Y., Kim, S. H., Kim, M. S., Lee, D. W., Rim, J. E., Shim, J. H., & Park, S. J., 2019. Soil Organic Carbon Fractions and Stocks as Affected by Organic Fertilizers in Rice Paddy Soil. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*. 520-529.
49. Kardol, P. & Wardle, D. A., 2010. How understanding aboveground–belowground linkages can assist restoration ecology. *Trends Ecology. Evolution*. 25, 670–679.
50. Kelleher, B. P., & Simpson, A. J., 2006. Humic substances in soils: are they really chemically distinct? *Environmental science & technology*, 40(15), 4605-4611.

51. Kurkov M., Z. Klika, Ch. Klikov., J. Havel, 2004. Humic acids from oxidised coal I. Elemental composition, titration curves, heavy metals in HA symplex, nuclear magnetic resonance spectra of HAs and infrared spectroscopy. *Chemosphere* 54: 1237-1245.
52. Kwiatkowska-Malina, J., 2018. Qualitative and quantitative soil organic matter estimation for sustainable soil management. *Journal of Soils and Sediments*, 18(8), 2801-2812.
53. Langlais, B., Reckhow, D. A., & Brink, D. R. (Eds.). (2019). *Ozone in water treatment: application and engineering*. Routledge.
54. Legge Regionale n. 90/1980 e s.mi. e dell'art. 7 della L.R. n. 15 del 6.08.2007
55. Li, HY., Yao, T., Ma, Y.C., Zhang, H.R., Lu, X.W., Yang, X.L., Xia, D.H., Zhang JG, Gao YM, 2019. Soil bacterial community changes across a degradation gradient in alpine meadow grasslands in the central Qilian Mountains. *Acta Prataculturae Sinica*; 28(8):170-179
56. Liu, M., Ussiri, D. A., & Lal, R., 2016. Soil organic carbon and nitrogen fractions under different land uses and tillage practices. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 47(12), 1528-1541.
57. Liu, P., Zhou, W., Cui, H. et al., 2019. Structural characteristics of humic substances in buried ancient paddy soils as revealed by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Environmental Geochemistry and Health*, volume 41, 2459–2472.
58. MacCarthy, P., 2001. The principles of humic substances. *Soil Science*, 166(11), 738-751
59. Marx, M. C., Wood, M., & Jarvis, S. C., 2001. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil biology and biochemistry*, 33(12-13), 1633-1640.
60. McKnight D.M., Aiken G.R., 1998. Sources and Age of Aquatic Humus. In: Hessen D.O., Tranvik L.J. (eds) *Aquatic Humic Substances. Ecological*

Studies (Analysis and Synthesis), vol 133. Springer, Berlin, Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-662-03736-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-03736-2_2)

61. Muscolo, A., Sidari, M., & Nardi, S., 2013. Humic substance: relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical Exploration*, 129, 57-63.
62. Myers, R. T., Zak, D. R., White, D. C., & Peacock, A., 2001. Landscape-level patterns of microbial community composition and substrate use in upland forest ecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, 65(2), 359-367.
63. Nannipieri, P., Kandeler, E., & Ruggiero, P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. *Enzymes in the environment*. Marcel Dekker, New York, 1-33.
64. Neary, D. G., Ice, G. G., & Jackson, C. R., 2009. Linkages between forest soils and water quality and quantity. *Forest ecology and management*, 258(10), 2269-2281.
65. Nierop K. G. J., 1998. Origin of aliphatic compounds in a forest soil. *Organic Geochemistry* 29, 1009-1016.
66. Nierop K. G. J., Pulleman M. M., Marinissen J. C. Y., 2001. Management induced organic matter differentiation in grassland and arable soil: a study using pyrolysis techniques. *Soil Biology & Biochemistry* 33, 755-764
67. Nuzzo, A., & Piccolo, A., 2013. Oxidative and photooxidative polymerization of humic suprastructures by heterogeneous biomimetic catalysis. *Biomacromolecules*, 14(5), 1645-1652.
68. Peña-Méndez, E. M., Havel, J., & Patočka, J., 2005. Humic substances—compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine*, 3(1), 13-24.

69. Piccolo A. The Supramolecular structure of humic substances. A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy* 2002; 75:57-134.
70. Piccolo, A. S. Nardi, and G. Cancheri. 1996a. Macromolecular changes of soil humic substances induced by interactions with organic acids. *European Journal of Soil Science* 47:319–328.
71. Piccolo, A. S. Nardi, and G. Cancheri. 1996b. Micellelike conformation of humic substances as revealed by size-exclusion chromatography. *Chemosphere* 33:595–600.
72. Piccolo, A., & Spiteller, M., 2003. Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size fractions. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 377(6), 1047-1059.
73. Piccolo, A., 2001, The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science* 166: 810-832.
74. Prestininzi A, Ludovici G (1999) Ecosystem of the Anticolana Valley. *Nephron* 81(1):82-92.
75. Quéneá, K., Derenne, S., Largeau, C., Rumpel, C., & Mariotti, A., 2005. Spectroscopic and pyrolytic features and abundance of the macromolecular refractory fraction in a sandy acid forest soil (Landes de Gascogne, France). *Organic Geochemistry*, 36(3), 349-362.
76. Regio Decreto 28 settembre 1919 n° 1924 “Regolamento per l’esecuzione del capo IV° della Legge 16/07/1916, n° 1947 concernenti disposizioni circa le acque minerali naturali e gli stabilimenti termali, idroterapici, di cure fisiche ed affini”;
77. Rosa, A. H., Simões, M. L., de Oliveira, L. C., Rocha, J. C., Neto, L. M., & Milori, D. M., 2005. Multimethod study of the degree of humification of humic substances extracted from different tropical soil profiles in Brazil's Amazonian region. *Geoderma*, 127(1-2), 1-10.
- 78.

79. Rupiasih, N. N., & Vidyasagar, P., 2005. A Review: Compositions, Structures, Properties and Applications of Humic Substances. *Journal of Advances in Science and Technology*, 8, 16-25.
80. Saiz-Jimenez, C., 1988. Origin and chemical nature of soil organic matter.
81. Saiz-Jimenez, C., Hermosín, B., Guggenberger, G., & Zech, W., 1996. Land use effects on the composition of organic matter in soil particle size separates. III. Analytical pyrolysis. *European journal of soil science*, 47(1), 61-69.
82. Santolini, R., 2010. Servizi ecosistemici e sostenibilità.
83. Santos Bento M. F., Pereira H., Cunha M. Á., Moutinho A. M. C., van den Berg K. J., and Boon J. J., 2001. A study of variability of suberin composition in cork from *Quercus suber* L. using thermally assisted transmethylation GC – MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 57, 45-55.
84. Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Cardelli, R. & Riffaldi, R., 2001. A comparison of soil quality in adjacent cultivated, forest and native grassland soils. *Plant and soil*, 233(2), 251-259.
85. Schnitzer, M., & Monreal, C. M., 2011. Quo Vadis Soil Organic Matter Research? A Biological Link to the Chemistry of Humification. *Advances in Agronomy*, 143–217. doi:10.1016/b978-0-12-386473-4.00003-8
86. Schnitzer, M., McArthur, D. F. E., Schulten, H. R., Kozak, L. M., & Huang, P. M., 2006. Long-term cultivation effects on the quantity and quality of organic matter in selected Canadian prairie soils. *Geoderma*, 130(1-2), 141-156.
87. Schulten H.-R., Schnitzer M., 1998. The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biology and Fertility of Soils* 26, 1-15
88. Schutter, M. E., & Dick, R. P., 2000. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. *Soil Science Society of America Journal*, 64(5), 1659-1668.

89. Senesi, N., 2010. Humic substances as natural nanoparticles ubiquitous in the environment. In *Molecular Environmental Soil Science at the Interfaces in the Earth's Critical Zone* (pp. 249-250). Springer, Berlin, Heidelberg.
90. Simpson A. J., 2002. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 40, S72-S82;
91. Simpson, A. J., Kingery, W. L., Hayes, M. H., Spraul, M., Humpfer, E., Dvortsak, P., ... & Hofmann, M., 2002. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften*, 89(2), 84-88.
92. Simpson, M. J., & Simpson, A. J., 2017. NMR of Soil Organic Matter. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 170–174. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.12169-9
93. Singh, B. K., Dawson, L. A., Macdonald, C. A., & Buckland, S. M., 2009. Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. *applied soil ecology*, 41(3), 239-248.
94. Six, J., & Jastrow, J. D., 2002. Organic matter turnover. *Encyclopedia of soil science*, 936-942.
95. Statuti A: Alcune riflessioni sull'azione litonitrica dell'acqua di Fiuggi. *Atti Accad Pontificia Nuovi Lincei Rome* 1886:4–11.;
96. Statuti A: Sull'acqua antilitiaca in Anticoli di Campagna denominata di Fiuggi. *Memorie della Pontificia Accademia de' Nuovi Lincei*, 1897;
97. Statuti A: Sulla sorgente dell'acqua antilitiaca di Anticolo (di Campagna) denominata di Fiuggi. *Atti Accad Pontificia Nuovi Lincei Rome* 1879:3–10.;
98. Steinberg, C., 2003. *Ecology of Humic Substances in Fresh-waters*, Springer, Berlin, pp.177-219;

99. Stevenson, F. J. (1994). Humus chemistry: genesis, composition, reactions. John Wiley & Sons.
100. Sutton, R., & Sposito, G., 2005. Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environmental science & technology*, 39(23), 9009-9015.
101. Tan K.H.: Chemical composition of humic matter. In: Humic Matter in Soil and the Environment. Principles and Controversies. Marcel and Dekker, New York 2003.
102. Thurman E.M. (1985). Organic Geochemistry of Natural Waters. Dordrecht: Dr. W. Junk Publishers.
103. Tipping, E., 2002. Cation Binding by Humic Substances, Cambridge University Press, Cambridge.
104. Tunlid A., White D. C., 1992. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil, p. 229-262. In G. Stotzky and J.-M. Bollag (ed.), Soil biochemistry, vol. 7. Marcel Dekker, New York
105. Ukalska-Jaruga, A., Klimkiewicz-Pawlas, A., & Smreczak, B., 2019. Characterization of organic matter fractions in the top layer of soils under different land uses in Central-Eastern Europe. *Soil Use and Management*, 35(4), 595-606.
106. van Bergen P. F., Flannery M. B., Poulton P. R., Evershed R. P., 1998. "Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted Classical Experiments. III: Nitrogen-containing macromolecular moieties in soil organic matter from Geescroft Wilderness" in: Nitrogen-containing macromolecules in the bio- and geosphere. Stankiewicz B. A., van Bergen P. F. ed, ACS Symposium Series, 707, Oxford University Press, New York, pp. 321-338.

107. Vepsäläinen, M., Kukkonen, S., Vestberg, M., Sirviö, H., & Niemi, R. M., 2001. Application of soil enzyme activity test kit in a field experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12-13), 1665-1672.
108. Vilkienė, M., Ambrazaitienė, D., Karčauskienė, D., & Dabkevičius, Z., 2016. Assessment of soil organic matter mineralization under various management practices. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, 66(8), 641–646. doi:10.1080/09064710.2016.1162845
109. Waldrop, M. P., Balsler, T. C., & Firestone, M. K., 2000. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. *Soil biology and biochemistry*, 32(13), 1837-1846.
110. Wells, M.J.M., and H.A. Stretz. 2019. Supramolecular architectures of natural organic matter. *Science of the Total Environment*. 671:1125–1133. doi:10.1016/j. scitotenv.2019.03.406
111. Wershaw, R. L. A, 1986. New model for humic materials and their interactions with hydrophobic chemicals in soil water and sediment-water systems. *Journal of Contaminant Hydrology* 1:29-45
112. Wershaw, R.L., 1994. Membrane-micelle model for humus in soils and sediments and its relation to humification. U.S. Geological Survey Water-Supply Paper 2410: 48-55
113. Wetzel R.G., 2001. Limnology. Lake and River Ecosystems. 3rd ed. Academic Press, San Diego, CA.
114. Winding, A., Hund-Rinke, K., & Rutgers, M., 2005. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62(2), 230-248.
115. Wu, M., Song, M., Liu, M., Jiang, C., & Li, Z. (2016). Fungicidal activities of soil humic/fulvic acids as related to their chemical structures in greenhouse vegetable fields with cultivation chronosequence. *Scientific Reports*, 6, 1–10.

116. Xiao, L., Liu, G. B., & Xue, S., 2016. Effects of vegetational type and soil depth on soil microbial communities on the Loess Plateau of China. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62(12), 1665-1677.
117. Xu, E., Zhang, H., & Xu, Y., 2019. Effect of large-scale cultivated land expansion on the balance of soil carbon and nitrogen in the Tarim Basin. *Agronomy*, 9(2), 86.
118. Zalba, P., Amiotti, N. M., Galantini, J. A., & Pistola, S., 2016. Soil humic and fulvic acids from different land-use systems evaluated by E4/E6 ratios. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 47(13-14), 1675-1679.
119. Zech W., Guggenberger G., 1996. "Organic matter dynamics in forest soils of temperate and tropical ecosystems" in: Humic substances in terrestrial ecosystems. Piccolo A. ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 101-170.
120. Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and fertility of soils*, 29(2), 111-129.
121. Zhang, Q., Wu, J., Yang, F. et al., 2016. Alterations in soil microbial community composition and biomass following agricultural land use change. *Scientific Reports* 6, 36587. <https://doi.org/10.1038/srep36587>
122. Zhang, T., & Liu, Y., 2020. Effects of land conversion on soil microbial community structure and diversity.