

## Nuove metodologie di riutilizzo della sansa per applicazioni agricole

Baronti S.<sup>1</sup>, Albanese L.<sup>1</sup>, Di Lonardo S.<sup>1</sup>, Vaccari F.P.<sup>1,3</sup>, Cantini C.<sup>2</sup>, Sani G.<sup>2</sup>, Giovannelli A.<sup>2</sup>, Bacci L.<sup>1</sup> e Miglietta F.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> IBIMET-CNR, Istituto di Biometeorologia, Firenze (FI)

<sup>2</sup> IVALSALSA-CNR, Istituto per la valorizzazione del legno e delle specie arboree, Sesto Fiorentino (FI)

<sup>3</sup> FoxLab (Fondazione E. Mach - CNR), San Michele all'Adige (TN)

### New methods for reuse of olive residues in agriculture

**Abstract.** Olive residues, resulting from the olive fruits and fragments of olive stones, contain a variable quantity of water in function of used milling process. The implementation of olive oil extraction systems generates an increase of the water content of olive residues, with the necessity of special disposal for the food industries that extract chemically olive oil from such olive residues. Olive residues have a low pH and a high polyphenols contents which may negatively interact with the soil microflora determining phytotoxic effects on crops. The biochar is traditionally produced in charcoal kiln, or is a product of pyrolysis and pyro-gasification process, where biomasses are subjected to heat treatment under oxygen deficiency. The aim of this research was to investigate the use of biochar associated to olive oil residues as a possible amendment in agriculture. The experiment was performed using perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) growing in pot on a sandy soil added with biochar and/or olive residues. The experimental design was a randomized block with 7 theses replicated 5 times (addition of only olive oil residues, olive oil residues combined with biochar in two different concentrations [1:1 and 1:2 by weight], only biochar and control). Results demonstrated that the inclusion of olive oil residues combined with biochar into the soil increased plant growth compared to the control and to the theses with the addition of only olive oil residues or only biochar. Moreover, the inclusion of mix (biochar and olive oil residues) increased the weight of roots without substantially affecting their number and length.

**Key words:** Olive oil residues, biochar, pot experiment, *Lolium perenne* L.

### Introduzione

L'Italia vanta un considerevole primato nella produzione di olio di oliva, in quanto è il secondo produttore europeo con oltre 5 milioni di quintali, di cui circa 3,5 di olio extravergine. I sottoprodotti dell'industria olearia sono tipicamente rappresentati da due matrici, una liquida, le acque di vegetazione, ed una solida, le sanse. A causa dell'elevato contenuto in acqua delle sanse, l'estrazione dell'olio residuo diventa difficile e costosa, richiedendo un preliminare processo di essiccamento o l'uso di macchine centrifughe, tanto che i sansifici sempre più frequentemente rifiutano di usarle. L'utilizzazione delle sanse come ammendante su terreni agrari sembra offrire ottime prospettive, ma è necessario valutare tutte le implicazioni sul piano colturale e sul terreno per ottimizzarne l'uso ed evitare rischi ambientali. Infatti, le sanse hanno un pH acido e un elevato contenuto in polifenoli. L'utilizzo del biochar o carbone vegetale in agricoltura è ben conosciuto e studiato. In particolare, le numerose evidenze scientifiche pubblicate recentemente attribuiscono all'uso del biochar i seguenti vantaggi: aumenta il pH del terreno (Yamato *et al.*, 2006); migliora la capacità di ritenzione idrica del terreno; aumenta la quantità di elementi minerali disponibili (Chan *et al.*, 2007) e diminuisce l'impiego dei fertilizzanti e la lisciviazione dei nutrienti (Liang *et al.*, 2006). Oltre a questi effetti sulle proprietà fisico-chimiche del terreno, il biochar ha una azione fertilizzante anche sulle colture agricole nei nostri ambienti (Baronti *et al.*, 2010; Vaccari *et al.*, 2011). L'obiettivo del lavoro è stato di valutare gli effetti dell'uso del composto biochar-sansa su di una specie erbacea a rapido accrescimento, il *Lolium perenne* L. (loietto).

### Materiali e metodi

La prova sperimentale è stata realizzata presso il CNR-IBIMET (Istituto di Biometeorologia) di Firenze da Maggio ad Agosto 2011 utilizzando una specie

\* s.baronti@ibimet.cnr.it

erbacea a rapida crescita (*Lolium perenne* L.) coltivata in vaso. E' stato allestito un disegno sperimentale completamente randomizzato costituito da 7 tesi replicate 5 volte. Il loietto è stato seminato a mano in vasi di diametro di 18 cm (3 l). Le tesi prese in considerazione sono state: C: controllo, solo terreno; S1: terreno + sansa 30 t ha<sup>-1</sup>; S2: terreno + sansa 60 t ha<sup>-1</sup>; B1: terreno + biochar 30 t ha<sup>-1</sup>; B2: terreno + biochar 60 t ha<sup>-1</sup>; BS1 terreno + biochar + sansa (1:1 in peso) 30 t ha<sup>-1</sup>; BS2: terreno + biochar + sansa (2:1 in peso) 30 t ha<sup>-1</sup>. La composizione granulometrica del terreno utilizzato per la prova era: sabbia 75,5%, limo 11,7% e argilla 12,8%, con un pH di 5.8. Il biochar utilizzato è stato ottenuto da un impianto di pirolisi ad una temperatura di 500 °C. Il pH del biochar era 8.2. La sansa utilizzata per la sperimentazione (pH 5.2) proveniva da un impianto a due fasi dell'azienda agricola sperimentale Santa Paolina gestita dall'CNIR-IVALSA (Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree). Il contenuto in carbonio (C) e in azoto (N) del biochar e della sansa è stato determinato tramite il CHN Elemental Analyzer (Carlo Erba Instruments, mod 1500 series 2) mentre il contenuto totale degli elementi è stato determinato tramite ICP Optical Spectrometer (Varian Inc., Vista MPX). Durante la prova sono stati eseguiti tre tagli della biomassa epigea (22 Giugno, 14 Luglio, 3 Agosto). Al campionamento finale (3 Agosto) sono state determinate anche la lunghezza delle radici e la biomassa radicale. Tutti i campioni sono stati posti in stufa a 80 °C per 48 h per determinarne il peso secco. Il contenuto idrico (%) a capacità di campo (c.c.) dei diversi substrati è stato calcolato come: (peso a c.c. - peso secco) / peso secco × 100. Il peso secco dei substrati è stato ottenuto ponendo i campioni in stufa a 80 °C per 72 h. Il pH dei substrati è stato misurato su una miscela di substrato e acqua distillata in rapporto 1:2.5.

## Risultati e discussione

Le principali caratteristiche del biochar e della sansa utilizzata sono riportate nella tabella 1.

Per quanto riguarda gli effetti ammendanti sul terreno, si evidenzia come il contenuto idrico a c.c. sia stato maggiore nei substrati BS1 e BS2 rispetto a B1, B2 ed S1 e S2 (fig. 1). Il contenuto idrico delle tesi BS1 e BS2 era infatti il 50 % in più rispetto al controllo. Per quanto riguarda il pH del suolo, esso passava da valori di 5.7 per il terreno addizionato con la sola sansa a valori di 6.5 per quello con il mix sansa e biochar (fig. 1). Considerando la produzione media di biomassa secca durante la stagione (fig. 2) si evince che nelle tesi S1 e S2 si è avuta una riduzione della

Tab. 1 - Caratteristiche del biochar e della sansa utilizzata nell'esperimento.

Tab. 1 - Characteristics of the biochar and olive residues used in this study.

Elemento	Unità	Sansa	Biochar
Umidità	%	70	-
S.O.	%	94	-
C/N	-	46,6	85,5
Ca	g kg <sup>-1</sup>	0,40	25,0
K	mg kg <sup>-1</sup>	13,9	25,0
Mg	mg kg <sup>-1</sup>	0,40	28,7
Na	mg kg <sup>-1</sup>	0,05	11,9
P	g kg <sup>-1</sup>	0,35	23,3
pH	-	5,2	8,2

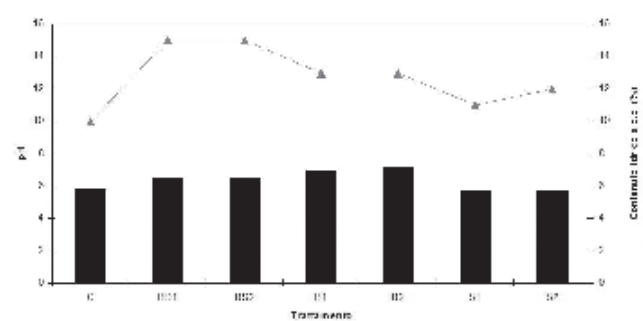


Fig. 1 - pH (barre) e contenuto idrico alla c.c. (linea).

Fig. 1 - pH (bars) and water content at field capacity (continuous line) of all treatments.

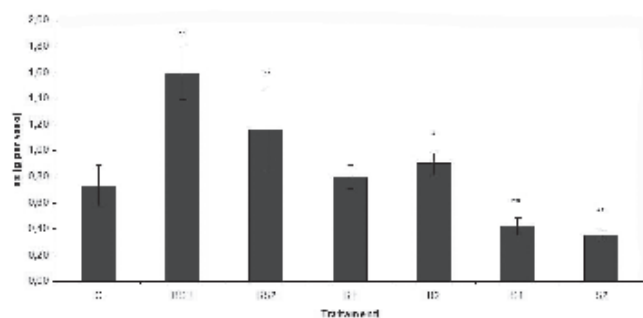


Fig. 2 - Biomassa epigea del *Lolium perenne* L. Ogni valore è la media di 5 repliche e tre tagli. Le barre verticali sono +/- la deviazione standard. Le differenze significative comparate con il controllo sono indicate con \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ).

Fig. 2 - Aboveground dry biomass of *Lolium perenne* L. Each value represents the mean of 5 replicates and tree cuts. Vertical bars indicate +/- deviation standard. Significant differences compared to control are indicated by \* ( $p < 0.05$ ) and \*\* ( $p < 0.01$ ).

biomassa del 41% e del 52%, rispettivamente, in confronto al controllo. Le tesi B1 e B2 hanno invece presentato un aumento della biomassa epigea rispettivamente del 9% e del 23% in confronto al controllo. I risultati migliori, in termini di resa in biomassa sono stati osservati nelle BS1 e BS2. In queste tesi è stato osservato un incremento medio di biomassa del 87% (fig. 2). Lo stesso effetto è stato osservato anche per quanto riguarda la biomassa ipogea (fig. 3). Infatti,

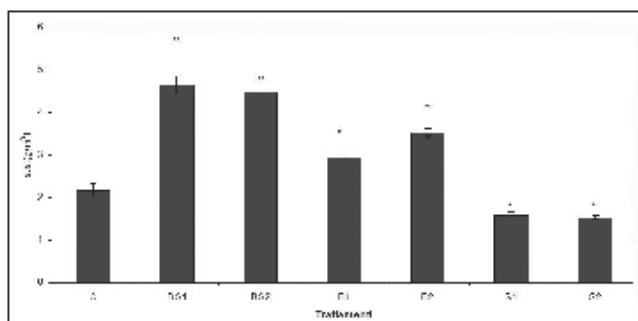


Fig. 3. Biomassa radicale del *Lolium perenne* L. Ogni valore è la media di 5 repliche. Le barre verticali sono +/- la deviazione standard. Le differenze significative comparate con il controllo sono indicate con \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,01$ ).

Figure 3. Root dry biomass of *Lolium perenne* L.. Each value represents the mean of 5 replicates. Vertical bars indicate +/- deviation standard. Significant differences compared to control are indicated by \* ( $p < 0.05$ ) and \*\* ( $p < 0.01$ ).

nelle tesi BS1 e BS2 si evidenzia un aumento della biomassa radicale rispetto a tutte le altre tesi, senza però avere un effetto sulla lunghezza media delle radici (dati non mostrati).

L'aggiunta della sola sansa al terreno ha avuto un effetto deprimente sulla biomassa radicale con un'azione crescente all'aumentare della percentuale di sansa applicata (fig. 3), come rilevato anche da Nasini *et al.* (2011) e da Del Buono *et al.* (2011).

## Conclusioni

I risultati presentati dimostrano come l'aggiunta al terreno di un mix sansa e biochar possa avere effetti positivi sulle proprietà fisiche e chimiche del terreno e, quindi, sulla produttività del loietto. I risultati sono incoraggianti, ma saranno necessarie ulteriori sperimentazioni per una valutazione delle potenzialità applicative e della sostenibilità ambientale del composto ottenuto dalla miscelazione del biochar con le sansa umide.

## Riassunto

Le sansa derivano dalla parte fibrosa dell'oliva e dai frammenti del nocciolo e contengono una quantità molto variabile di acqua di vegetazione in funzione del sistema di estrazione applicato. L'uso delle sansa come ammendante in agricoltura sembra offrire ottime prospettive, ma è necessario valutare, in relazione alle caratteristiche del tipo di refluo, tutte le implicazioni per evitare rischi ambientali. Infatti, le sansa hanno generalmente un pH acido ed un elevato contenuto in polifenoli che influenzano negativamente l'attività della microflora del terreno e possono determinare effetti fitotossici per le colture. Il carbone vege-

tale o biochar è prodotto tradizionalmente nelle carbonaie, oppure deriva dagli impianti di pirolisi e pirogassificazione dove la biomassa è sottoposta ad un trattamento termico in carenza di ossigeno. Il biochar ha una lunga permanenza nel terreno ed un pH basico. L'obiettivo della ricerca è stato quello di indagare l'uso della sansa unita al biochar come possibile ammendante in campo agricolo. La sperimentazione è stata condotta in vaso, su loietto (*Lolium perenne* L.), utilizzando come substrato di base del terreno sabbioso, al quale sono stati aggiunti sansa e/o biochar in diversa combinazione. È stato allestito un disegno sperimentale completamente randomizzato costituito da 7 tesi replicate 5 volte (controllo, solo sansa, sansa unita al biochar in due diverse concentrazioni [1:1 in peso e 1:2 in peso], solo biochar). Dai risultati della sperimentazione risulta che la produzione di biomassa epigea di loietto è aumentata in tutte e due le tesi dove erano contemporaneamente stati aggiunti sansa e biochar rispetto al controllo e alle tesi alle quali era stata aggiunta o solo sansa o solo biochar. L'inclusione del mix (sansa e biochar) al terreno ha determinato un incremento del peso dell'apparato radicale, senza influire sostanzialmente sul numero e sulla lunghezza delle radici.

**Parole chiave:** sansa, biochar, esperimento in vaso, *Lolium perenne* L.

## Bibliografia

- BARONTI S., ALBERTI G., DELLE VEDOVE G., DI GENNARO F., FELLET G., GENESIO L., MIGLIETTA F., PERESSOTTI A., VACCARI F.P. 2010. *The biochar option to improve plant yields: first results from some field and pot experiments in Italy*. Italian Journal of Agronomy 5: 3-11.
- CHAN K.Y., VAN ZWIETEN L., MESZAROS I., DOWNIE A., JOSEPH S. 2007. *Agronomic values of greenwaste biochar as a soil amendment*. Australian Journal of Soil Research 45: 629-634.
- DEL BUONO D., SAID-PULLICINO D., PROIETTI P., NASINI L., GIGLIOTTI G. 2011. *Utilization of olive husks as plant growing substrates: phytotoxicity and plant biochemical responses*. Compost Science and Utilization 19 (1): 52-60.
- LIANG B., LEHMANN J., SOLOMON D., KINYANGI J., GROSSMAN J., O'NEILL B., SKJEMSTAD J. O., THIES J., LUIZÃO F. J., PETERSEN J., NEVES E. G. 2006. *Black carbon increases cation exchange capacity in soils*. Soil Science Soc. Am. J. 70: 1719-1730.
- NASINI L., PROIETTI P., BALDUCCINI M.A., DEL BUONO D., GIGLIOTTI G. 2011. *Compostaggio dei sottoprodotti della filiera olivicola-olearia ed effetti della fertilizzazione degli oliveti con il compost ottenuto*. Acta Italus Hortus 1: 42-46.
- VACCARI F.P., BARONTI S., LUGATO E., GENESIO L., CASTALDI S., FORNASIER F., MIGLIETTA F. 2011. *Biochar as a strategy to sequester carbon and increase yield in durum wheat*. European Journal of Agronomy 34: 231-238.
- YAMATO M., OKIMORI Y., WIBOWO I. F., ANSHORI S., OGAWA M. 2006. *Effects of the application of charred bark of Acacia mangium on the yield of maize, cowpea and peanut, and soil chemical properties in South Sumatra, Indonesia*. Soil Science and Plant Nutrition 52: 489-495.

## Utilizzo di compost di reflui oleari nella preparazione dei substrati nel vivaismo olivicolo

Santilli E.<sup>1</sup>, Toscano P.<sup>1</sup>, Casacchia T.<sup>1</sup>, Lombardo L.<sup>2</sup> e Briccoli Bati C.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura, Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia, Rende (CS)*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Scienze dei Sistemi Colturali, Forestali e dell'Ambiente, Università della Basilicata*

### Use of olive mill waste compost for the preparation of substrates in olive nursery

**Abstract.** Aim of this study was to evaluate the compatibility and effectiveness of composts prepared with olive mill wastes in partial or total replacement of peat in growth substrates for olive nursery. Variable proportions of peat and / or two different olive waste composts deriving from the continuous two or three phases extraction systems, were added to a basis of river sand, used as control, for a total of six thesis for each of the three cultivars under observation (Carolea, Nocellara messinese and Tondina). The plantlets were kept for 28 months in greenhouse, making periodic measurements of linear accretion (cm) and number of internodes. At the end of the experimentation, dry weights of leaves, branches and roots were detected. The results show a greater nutritional effectiveness of the substrates containing composts derived from the three phases olive mill wastes with highly significant differences both in the linear growths and in the number of internodes, while the composted two phases olive mill wastes gave similar results to peat, even when in association with it, and to sand.

**Key words:** Olive mill wastes, Olive nursery, Compost.

### Introduzione

Attualmente sul mercato sono disponibili diverse matrici organiche (torbe, letami, rifiuti urbani, cortecce, segature, ecc.) e inorganiche (sabbia, pomice, argilla, residui di cave, perlite, vermiculite, ecc.) che possono essere utilizzati per la preparazione di substrati da impiegare nel vivaismo. Tutti, in genere, presentano alcuni vantaggi quali la non necessità della sterilizzazione e la possibilità di fertilizzazione con

tutti i concimi commerciali oggi disponibili. Come materiale organico, la torba è quella al momento più utilizzata nelle miscele. Negli anni sono stati saggiati diversi materiali in grado di sostituire, anche solo in parte la torba, fra cui le biomasse reflue dei frantoi oleari ed in generale tutti i residui della filiera olivico-olearia.

Nelle regioni a vocazione olivicola, questi sottoprodotti generati in grande quantità ed in un periodo limitato dell'anno, pongono non pochi problemi al loro smaltimento ecocompatibile. Numerose pubblicazioni hanno dimostrato la possibilità di riutilizzarli, sia tal quali sia compostati con diverse matrici agroindustriali e/o rifiuti urbani, al fine di migliorare le caratteristiche fisico-chimiche dei suoli ed, in particolare negli oliveti, è stata osservata una loro efficace azione ammendante (Toscano *et al.*, 2007, 2009; Moreno *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda la produzione vivaistica olivicola svariati studi hanno dimostrato la possibilità di poter parzialmente sostituire la torba con diversi materiali compostati o meno tra cui anche i residui della filiera olivicola olearia (AA.VV., 2008; Toscano *et al.* 2010; Nasini *et al.*, 2011).

Scopo di questo lavoro è stato quello di monitorare l'efficacia di due diversi compost derivati dai residui aziendali della filiera olivicola-olearia sulla capacità di crescita di talee autoradicate di tre cultivar di olivo, in parziale o totale sostituzione della torba.

### Materiali e metodi

La prova, iniziata nel Novembre 2008, è stata condotta allevando in serra per 28 mesi piantine di olivo delle cultivar Carolea, Nocellara messinese e Tondina, utilizzando barbatelle trapiantate in vasi di plastica da 3 l dopo la prima fase di indurimento in vivaio (circa un mese).

Sono stati messi a confronto 6 diversi substrati ottenuti mescolando sabbia di fiume, torba e due compost aziendali in diverse proporzioni come indicato nel seguente schema:

\* caterina.briccolibati@entecra.it



- S: Sabbia di fiume 100%;
- ST: Sabbia di fiume 60% + Torba 40%;
- SC1: Sabbia di fiume 60% + Compost 3 fasi 40%;
- SC2: Sabbia di fiume 60% + Compost 2 fasi 40%;
- STC1: Sabbia di fiume 60% + Torba 20% + Compost1 20%;
- STC2: Sabbia di fiume 60% + Torba 20% + Compost2 20%.

La matrice organica base del primo compost (C1) era costituita dai reflui oleari prodotti da un sistema di estrazione continuo a tre fasi e residui della potatura degli olivi (rami e foglie) opportunamente trinciati (Toscano *et al.*, 2009), mentre il secondo compost (C2) è stato ottenuto dai reflui di un frantoio a due fasi, dalle foglie di olivo derivanti dal lavaggio prima della molitura delle drupe e da una percentuale di paglia di cereali (circa 20%), come frazione strutturante e assorbente (Toscano *et al.*, 2007). I principali parametri fisico-chimici della torba e dei compost utilizzati per la preparazione dei substrati sono riportati in tabella 1.

Tutte le matrici utilizzate singolarmente (sabbia, torba, compost 1 e compost 2) sono state sottoposte, prima della costituzione dei substrati, ad analisi microbiologica per escludere la presenza di ceppi patogeni o potenzialmente nocivi.

Le piante in osservazione, 22 per trattamento e cultivar, sono state irrigate settimanalmente con sola

Tab. 1 - Parametri qualitativi dei componenti dei substrati.  
Tab. 1- *Qualitative parameters of the components of the substrates.*

Parametri	Torba (T)	Compost 3 fasi (C1)	Compost 2 fasi (C2)
% U	-	17,90	26,35
pH	5,0	6,63	6,63
% S.O.	85,0	-	-
% C org	49,0	-	-
C/N	-	21,60	32,60
% N	0,8	1,23	1,37
% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-	0,68	0,62
% K <sub>2</sub> O	-	1,0,2	1,12

Tab. 2 - Accrescimento medio(n=66) in cm e numero di palchi, media (n=9) dei pesi secchi (g) della biomassa e rapporto (A/R) tra parte aerea e radicale rilevati a fine prova. Lettere diverse, tra le tesi, indicano significatività per p<0,01.

Tab. 2 - *Average growth (n = 66) in cm and number of internodes, average (n = 9) biomass dry weight (g) and shoot/root ratio(A/R) detected at the end of the trial. Different letters between the thesis indicate significance with p <0.01.*

Substrato	Accrescimento		Peso secco (g)				
	cm	Numero palchi	Foglie	Astane e rametti	Radici	Totale	A/R
S	76 B	44,36 B	7,58 B	5,69 B	5,51 B	18,78 B	2,43 B
ST	104 B	60,53 B	9,01 B	7,12 B	6,13 AB	22,26 B	2,68 B
SC1	246 A	136,84 A	15,97 A	15,79 A	6,87 AB	38,63 A	4,83 A
SC2	93 B	55,16 B	8,02 B	5,70 B	5,23 B	18,95 B	2,79 B
STC1	266 A	134,05 A	17,75 A	17,98 A	8,43 A	44,16 A	4,53 A
STC2	108 B	60,13 B	8,14 B	6,48 B	5,74 B	20,37 B	2,75 B

acqua di pozzo senza alcun tipo di fertilizzazione; i rilievi della crescita vegetativa sono stati effettuati all'inizio della prova e periodicamente durante l'arco dei 28 mesi, con la misurazione della lunghezza dei germogli e del numero di palchi fogliari. All'inizio (T0) ed alla fine (T1) della prova è stata rilevata per ciascun substrato la carica microbica totale (batteri e funghi) secondo la metodologia messa a punto da Casacchia *et al.* (2011). Inoltre, su 3 piante per cultivar e trattamento, rappresentative dell'accrescimento medio di ciascuna tesi, sono stati effettuati rilievi distruttivi per determinare i pesi freschi e secchi delle radici e della parte aerea.

Tutti i dati rilevati sono stati sottoposti ad analisi statistica della varianza (ANOVA), secondo lo schema fattoriale 3x6 ed ad una via per la conta dei microrganismi presenti nei substrati, mediante software Statgraphics Plus 5.1. Il confronto fra le medie è stato effettuato con il Tukey test per p<0,01.

### Risultati e discussione

L'analisi statistica dell' accrescimento lineare ed della biomassa a fine prova (tab. 2), ha evidenziato come il substrato con solo compost C1 abbia fornito i valori significativamente maggiori, anche quando associato alla torba (STC1), la cui presenza apporta solo marginali miglioramenti. Tale condizione è particolarmente evidente se si considera che l'accrescimento lineare nel substrato SC1 è risultato oltre il doppio di quanto ottenuto con il substrato ST, sia in cm (245,89 vs 103,69) che in numero di palchi (136,84 vs 60,53); andamento simile si rileva anche per quanto riguarda la biomassa totale prodotta (38,63 vs 22,26 g).

La presenza nei substrati del compost C2, invece, non ha apportato alcun beneficio significativo né rispetto alla torba (T), né rispetto al controllo di sola sabbia (S) sui parametri osservati. Questo comporta-

mento può essere presumibilmente imputato all'elevato rapporto C/N del compost C2 (tab. 1), indice di una non adeguata stabilizzazione della matrice iniziale.

Anche il rapporto tra il peso secco della parte aerea e delle radici presenta valori significativamente più alti nei substrati contenenti il compost C1. Tale rapporto, in accordo con la letteratura (Marangoni *et al.*, 2000) è un indice direttamente correlabile alla fertilità del suolo.

Di conseguenza si può affermare che il compost C1 ha fornito elementi nutritivi adeguati a sostenere lo sviluppo delle piantine di olivo anche in assenza, come nel nostro caso, di fertilizzazione. La diversità statistica tra i risultati dei due compost saggiati è da imputare, non tanto alla carenza nutrizionale del C2, quanto al suo non ottimale processo di maturazione.

Le differenze nella carica batterica e fungina riscontrate ad inizio e fine sperimentazione nei substrati (tab. 3) possono essere spiegate dalla diversa composizione delle matrici. Al termine della prova sperimentale (T1), l'analisi microbiologica conferma come il compost C1, migliori, dal punto di vista microbico, la fertilità dei substrati SC1 e STC1, a causa probabilmente della sinergia dei microrganismi autoctoni che riescono a stabilizzare e degradare ulteriormente la sostanza organica presente.

Il compost C2 invece, presenta inizialmente una elevata carica fungina, dovuta quasi certamente alla maggiore umidità del substrato, che arreca, inevitabilmente, una condizione di 'squilibrio' microbico sfavorendo la sinergia tra i ceppi. Lo stesso, mescolato con sabbia e torba, ha mostrato al T1 di raggiungere una stabilità microbica (evidenziabile dal notevole contenimento fungino) con i ceppi autoctoni delle altre due matrici. Diversamente si può dire dei substrati S e ST che mostrano, durante l'esperimento, un notevole impoverimento microbico, dovuto alla scarsità di elementi nutritivi presenti.

## Conclusioni

La prova dimostra come l'impiego in fase di allevamento di compost a base dei residui della filiera olivicolo-olearia, possa essere un valido ed efficace sostituto della torba, consentendo alle giovani piantine di olivo un buon sviluppo vegetativo anche in assenza di fertilizzazioni con relativo abbattimento dei costi gestionali vivaistici. E' però necessario sottolineare il ruolo cruciale che riveste la fase di compostaggio, sia nella scelta dei materiali che durante il processo di maturazione del cumulo. Infatti, le diverse risposte delle piante ai due compost utilizzati, rispecchiano le qualità delle matrici di partenza: dal punto di vista fisico-chimico il compost C1, mostra una migliore stabilizzazione della sostanza organica e un basso rapporto C/N, dovuto al maggiore contenuto in lignina che caratterizza questa matrice (Casacchia *et al.*, 2011). Ne consegue che le piantine cresciute nei substrati contenenti questo compost hanno presentato tutti i parametri biometrici misurati (peso secco della parte aerea e delle radici, accrescimento in cm e numero di palchi) significativamente superiori rispetto a quelle cresciute negli altri substrati, mentre l'utilizzo del compost ottenuto con reflui oleari e paglia (C2) ha fatto rilevare valori di crescita equiparabili a quanto evidenziato con le piante del substrato ST. Il migliore apporto nutritivo è testimoniato anche dal maggiore rapporto tra la parte aerea e quella radicale.

In base a quanto osservato in questa sperimentazione è consigliabile la sostituzione della torba nella composizione dei substrati per il vivaismo olivicolo con compost derivanti dai residui della filiera olivicolo-olearia, ad ulteriore contributo per la risoluzione del problema dello smaltimento dei reflui, per le strategie di recupero e valorizzazione dei sottoprodotti e per la sostenibilità economica ed ambientale dei processi produttivi agroindustriali.

Tab. 3 - Valori medi della carica batterica totale e fungina dei substrati ad inizio e fine prova (n=9). Lettere diverse, tra le tesi, indicano significatività per  $p < 0,01$ .

Tab. 3 - Average values of total bacterial and fungal charges in the substrates at the beginning and at the end of the trial (n = 9). Different letters between the thesis indicate significance with  $p < 0.01$ .

Substrato	Inizio prova (T0)		Fine prova (T1)	
	CBT (log10 UFC/g)	Funghi (log10 UFC/g)	CBT (log10 UFC/g)	Funghi (log10 UFC/g)
S	6,0 D	5,1 F	4,1 F	4,3 E
ST	6,1 D	6,0 E	6,2 E	5,6 D
SC1	7,1 C	6,6 D	8,2 C	7,2 C
SC2	7,0 C	9,3 C	7,0 D	7,1 C
STC1	9,9 A	9,4 B	10,8 A	9,8 A
STC2	9,0 B	10,8 A	9,9 B	9,3 B

## Riassunto

Scopo della prova è stato valutare la compatibilità e l'efficacia dei composti di reflui oleari in parziale o totale sostituzione della torba nei substrati di accrescimento del vivaismo olivicolo. Ad una base di sabbia di fiume, utilizzata come controllo, sono state aggiunte in proporzioni variabili, torba e/o due diversi composti di reflui oleari, provenienti da frantoi continui a tre e due fasi, per un totale di sei tesi per ciascuna delle tre cultivar in osservazione (Carolea, Nocellara messinese, Tondina). Le piantine sono state tenute per 28 mesi in serra effettuando rilievi periodici degli accrescimenti lineari (cm) e del numero di palchi fogliari. A fine prova, sono stati rilevati i pesi totali secchi di foglie, rami e radici. I risultati mostrano una maggiore efficacia nutrizionale dei substrati contenenti il compost derivato da frantoio a tre fasi con differenze altamente significative sia negli accrescimenti lineari che nel numero di palchi, mentre il compost di reflui da frantoio a due fasi, ha dato risultati analoghi alla sola torba, anche quando in associazione con questa, e simili alla sola sabbia.

**Parole chiave:** reflui oleari, vivaismo olivicolo, compost.

Lavoro svolto nell'ambito del Progetto RIOM-risorse aggiuntive

## Bibliografia

- A.A.V.V., 2008. *Soluzioni alternative allo spandimento in campo dei sottoprodotti dei frantoi. Risultati dell'attività sperimentale anni 2005-2007*. A cura di Altieri e Esposito, ed. Edizioni Cantagalli S.r.l. Siena: 1-66.
- CASACCHIA T., TOSCANO P., SOFO A., PERRI E., 2011. *Assessment of microbial pools by an innovative microbiological technique during the co-composting of olive mill by-products*. Agricultural Sciences, Vol.2, No.2, 104-110.
- MARANGONI B., TOSELLI M., AMATO M., 2000. *Accrescimento ponderale e rapporto 'parte aerea/parte radicale'*. Eds. Mosca G., Vamerali T., In Obiettivo Radice Metodi di Studio e Risultati Ottenuti in Ambiente Mediterraneo.: 73-75.
- MORENO B., GARCIA-Rodriguez S., CAÑIZARES R., CASTRO J., BENÍTEZ E., 2009. *Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality*. Agriculture, Ecosystems and Environment, 131(3-4): 333-339.
- NASINI L., FAMIANI F., BALDICCHI A., PROIETTI P., 2011. *Effetti delle sanse e dei compost sui substrati da invasatura*. Conv. "ricerca e trasferimento delle innovazioni tecnologiche nel vivaismo olivicolo. 6-7 Giugno, Bari. Abstract III-8: 36.
- TOSCANO P., CASACCHIA T., ZAFFINA F., 2007. *The "in farm" composting of olive mill residuals: eco-compatible spreading and valorisation of renewable biomass to recover soil fertility*. 1° Convegno SIBA, Salerno 22-24 Ottobre. Agroindustria, Speciale Convegno SIBA, Vol 6 n 1/2 2007: 79.
- TOSCANO P., CASACCHIA T., ZAFFINA F., 2009. *The "in farm" olive mill residual composting for by-products sustainable reuse in the soils organic fertility restoration*. Proc. 18<sup>th</sup> Symp. Int. Scientific Centre of Fertilizers. More Sustainability in Agriculture: New Fertilizers And Fertilization Management, 8-12 November, Rome:116-121.
- TOSCANO P., TURCO D., BRICCOLI BATTI C., 2010. *Utilizzo di compost di reflui oleari nella preparazione dei substrati di coltura nel vivaismo olivicolo*. Atti Conv. Inter. e finale del Progetto "Ricerca ed Innovazione per l'Olivicoltura Meridionale" (Progetto Riom), 11-12 Giugno 2009, Rende (CS): 149-152.

## Produzione di un compost di qualità utilizzando sansa e raspi

Gigliotti G.<sup>1</sup>, De Luca G.<sup>2</sup>, Nasini L.<sup>1</sup>, Ilarioni L.<sup>1</sup>, Massaccesi L.<sup>1</sup>, Pezzolla D.<sup>1</sup>, Pilli M.<sup>1</sup> e Proietti P.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università di Perugia

<sup>2</sup> Arpa Umbria Unità Operativa Laboratorio Multisito, Servizio Campionamento Emissioni, Terni

### High quality compost production by processing olive husk and grape wine stalks

**Abstract.** The aim of the present trial was to investigate the composting of by-products from olive oil and wine chains (i.e. wine grape stalks and olive husk) and monitoring gas emission during the process. Composting was carried out in a static outdoor pile, naturally aerated by convection. The results showed the attitude of olive husk derived from three-phases plants as biodegradable component of a mixture in which grape wine stalks were used as bulking agent. During the composting the main parameters of the process (temperature, pH, moisture, C/N ratio) positively evolved and, at the end of the process, both agronomical and environmental compost characteristics were in accordance with Italian law for compost commercialization. In particular, total organic matter, humic-like substances and elements of plant nutrition showed a high concentration.

Gas emissions during composting were compatible with Italian law.

**Key words:** *Olea europaea* L., olive husk, wine grape stalks, composting, by-products valorization, gas emissions.

### Introduzione

Obiettivo del presente lavoro è stato di mettere a punto un sistema di compostaggio dei rifiuti organici provenienti dalla filiera vitivinicola e olearia (raspi e sansa) al fine di ottenere un compost di qualità idoneo ad impieghi agronomici come ammendante e come substrato vivaistico in sostituzione totale o parziale alla torba. La sostituzione della torba con compost consentirebbe di ridurre i crescenti problemi tecnico-economici nell'approvvigionamento della torba e anche di diminuire l'apporto di concimi chimici.

Il sistema di compostaggio è stato progettato nell'intento di renderlo facilmente implementabile a livello aziendale come opportunità di valorizzazione dei propri sottoprodotti.

Altro importante obiettivo è stato la determinazione delle emissioni in atmosfera durante il compostaggio, onde valutare possibili rischi ambientali connessi a tale pratica.

### Materiali e metodi

In base ai risultati ottenuti in prove preliminari con un bioreattore da laboratorio, la miscela da compostare è stata costituita con sansa e raspi ben mescolati nel rapporto 100:8 p/p. Il rapporto C/N della miscela iniziale era pari a 58 e quindi compatibile con i valori ritenuti ottimali per l'evolvere del processo (ANPA, 2002). Il cumulo per il compostaggio, realizzato con una pala gommata su una piattaforma scoperta presso l'Azienda Vivaistica Umbraflor di Spello (PG), era lungo 3 m e alto 1,5 m, a sezione trapezoidale con base inferiore di 2 m e superiore di 1,5 m.

Durante il compostaggio, al tempo 0, 20, 40, 100 e 140 giorni di processo, sono state eseguite analisi chimico-fisiche sul materiale, secondo i metodi ufficiali di analisi (Trincherà *et al.*, 2006), per determinare: umidità, rapporto C/N, solidi volatili (SV), pH e conducibilità elettrica specifica (CE) degli estratti acquosi, carbonio organico totale (TOC), azoto totale (NTK), azoto ammoniacale, sostanze umosimili, potassio totale (K), fosforo totale (P) e metalli totali (Cu, Ni, Pb, Zn, As, Cr e Cd).

Al fine di determinare la perdita di massa organica nel corso del processo, nel presente lavoro si è utilizzata l'equazione proposta da Viel *et al.* (1987) e recentemente ripresa da Gigliotti *et al.* (2012) in una prova di compostaggio di sansa provenienti da impianti a due vie:

$$\text{OM-loss (\%)} = 100 - 100[X1(100-X2)]/[X2(100-X1)]$$

dove X1 ed X2 rappresentano rispettivamente il contenuto di ceneri iniziale ed al tempo t.

\* first@unipg.it



Un'equazione molto simile alla precedente è stata inoltre utilizzata per operare il calcolo della perdita di TOC nel corso del processo (Said-pullicino *et al.*, 2007):

$$\text{TOC}_{(\text{corretto})} (\text{g kg}^{-1}) = \text{TOC} (X1/X2)$$

dove X1 ed X2 rappresentano rispettivamente il contenuto di ceneri iniziale ed al tempo t.

Durante il compostaggio, sono state monitorate sia le emissioni dal cumulo di inquinanti sia la qualità dell'aria in prossimità dello stesso per valutare eventuali impatti ambientali del processo. I quattro campionamenti effettuati per le emissioni dal cumulo sono stati temporalmente stabiliti anche in base al rilievo della temperatura nel cumulo grazie a una sonda inserita nello stesso che ha consentito di individuare la fase di bio-ossidazione accelerata, cioè la fase calda del processo, nella quale i fenomeni emissivi sono più intensi e pertanto a tale condizione si riferiscono eventuali atti autorizzativi. Per la determinazione delle emissioni dal cumulo è stato ideato un sistema di campionamento "stazionario", costituito da una camera cilindrica chiusa dal volume di circa 250 l in cui l'aria era agitata meccanicamente. A questa camera sono stati collegati i vari dispositivi di campionamento e analisi, che si attivavano allorché le concentrazioni dei macro componenti (Ossigeno, Anidride carbonica, Monossido di carbonio e Ossidi di Azoto) mostravano un valore costante nel tempo. Tali campionamenti hanno coperto un intervallo di tempo di 3 ore ed hanno riguardato: Sostanze Organiche Volatili; Ammoniaca e Aldeidi. In parallelo sono stati monitorati in continuo: SOV (TOC), Ossigeno, Biossido di Carbonio, Monossido di Carbonio e Ossidi di Azoto.

Per valutare la qualità dell'aria in prossimità del cumulo sono state installate due centraline di campionamento passivo a circa cinque metri dal cumulo in direzione Est-Ovest, che è quella dei venti prevalenti nella zona. Nelle due centraline sono stati installati campionatori passivi per SOV, Ammoniaca e Aldeidi nonché un termometro per il monitoraggio della temperatura ambiente. I campioni sono stati prelevati con cadenza mensile.

## Risultati e discussione

Come si può rilevare dalla figura 1, quasi immediatamente la temperatura del cumulo si è differenziata dalla temperatura dell'ambiente, raggiungendo e superando i 50 °C dopo 14 giorni di processo e mantenendosi al di sopra di questa soglia fino ad oltre 100 giorni. Le condizioni di sanificazione della biomassa

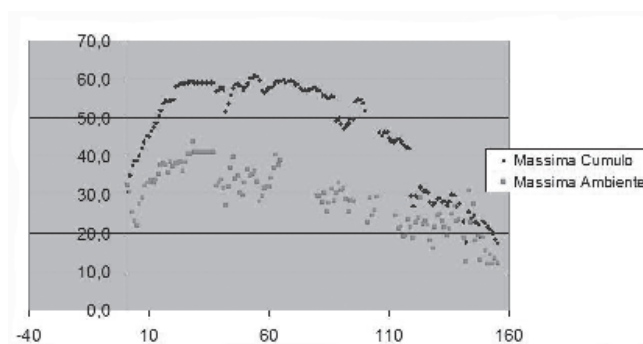


Fig. 1 - Evoluzione della temperatura massima giornaliera nel cumulo e ambientale.

*Fig. 1 - Evolution of daily maximum temperature of air and inside the pile.*

sono state così assicurate da temperature superiori a 55 °C per un elevato numero di giorni. Solo dopo 120 giorni di processo la temperatura del cumulo si è allineata a quella dell'ambiente circostante.

Dal profilo delle temperature si deduce che la fase attiva del processo si è protratta per circa 100 giorni, tempo compatibile con le condizioni di un cumulo statico areato per semplice convezione contenente in miscela un materiale piuttosto recalcitrante quale è la sansa.

Come prevedibile, nel corso del processo è stata osservata una progressiva diminuzione dell'umidità della massa che, da un picco massimo del 52%, è scesa al 32% al termine della fase di maturazione, nonostante tutto il processo sia stato condotto all'esterno e senza nessuna protezione dalle piogge. Il rapporto C/N, dal valore iniziale di 58 si è infine attestato a 30, valore ancora eccessivo se ci si riferisce all'ammendante compostato misto (25 secondo il D.lgs 75/2010), ma abbondantemente in linea con quanto previsto dalla medesima legge per l'ammendante compostato verde (50).

C organico totale e N totale sono evoluti in maniera opposta: infatti, per effetto dei fenomeni ossidativi tipici di un processo aerobico che porta a perdita di acqua e CO<sub>2</sub>, il TOC è diminuito, mentre l'N totale è aumentato come conseguenza della diminuzione della massa totale del materiale in compostaggio. Al termine del processo la percentuale di N organico rispetto al totale era superiore a quella minima (80%) stabilita dalla legislazione italiana.

Nel corso del processo circa il 24% di sostanza organica è stata ossidata con conseguente perdita di C in atmosfera sotto forma di CO<sub>2</sub> (tab. 1). Se da una parte il C più labile è stato utilizzato nel processo quale fonte di energia dai microrganismi deputati al processo stesso, d'altro canto nel corso della fase di maturazione è stato coinvolto nella formazione di composti umosimili. Nel corso del processo, infatti, la

Tab. 1 - Evoluzione delle caratteristiche del materiale in compostaggio.  
 Tab. 1 - Evolution of characteristics of composting material

Tempo campionamento	Umidità %	C*/N	NTK %	TOC** %	TEC % ss	DH %	HA+FA %	Solidi volatili %	GI %
0	25,8	58	0,70	40,5	27,1	53,5	-	89,0	59
20	43,6	56	0,72	36,6	-	-	-	87,9	-
40	52,4	48	0,82	32,6	-	-	-	86,7	-
100	48,8	38	1,05	32,0	-	-	-	86,4	-
140	32,4	30	1,34	31,3	36,2	84,2	17,7	86,0	114
	pH	Conduc. elettr. specifica ms/cm	Cu mg/kg	Ni mg/kg	Zn mg/kg	Pb mg/kg	Cr mg/kg	As mg/kg	Cd mg/kg
0	6,6	2,7	36,1	-	-	-	-	-	0,40
20	6,8	2,1	36,0	-	-	-	-	-	0,46
40	-	-	41,5	-	-	-	-	-	0,40
100	-	-	41,5	-	-	-	-	-	0,42
140	8,1	1,0	41,5	<0,5	63,9	<0,5	34,0	0,73	0,31

\* Dato ottenuto senza l'applicazione dell'equazione riportata in Materiali e metodi

\*\* Dato ottenuto applicando l'equazione riportata in Materiali e metodi.

percentuale di C estraibile in alcali (TEC) è passata dal 26 al 36%, così come il grado di umificazione (DH%) che dal 54% iniziale è giunto all'84%. Compatibile con il valore limite stabilito dalla legislazione nazionale anche il dato di acidi umici + acidi fulvici (HA+FA), che è risultato pari al 17% contro il 7% previsto dal Decreto 75/2010.

Altro parametro che nel corso del processo ha dimostrato un netto miglioramento della qualità della biomassa trattata è l'indice di germinazione. Al termine della fase di maturazione ha assunto addirittura un valore maggiore al 100%, a testimonianza che le sostanze fitotossiche presenti nella miscela iniziale (GI = 59%) sono state metabolizzate. Tale risultato non era del tutto scontato in considerazione del fatto che tra le matrici presenti nella miscela iniziale era presente la sansa, matrice ricca in composti ad accertata azione fitotossica quali fenoli e acidi grassi a basso peso molecolare (Gigliotti *et al.*, 2012).

Infine, il contenuto in metalli pesanti (tab. 1) è risultato estremamente limitato, come prevedibile in considerazione delle matrici utilizzate. Unica preoccupazione poteva essere a carico del rame, visto che entrambe le matrici (sansa e raspi) provengono dalla lavorazione di materie prime che in campo subiscono trattamenti antiparassitari a base di composti rameici. Nonostante ciò, la concentrazione di rame nel compost finale è risultata di 41 mg kg<sup>-1</sup>, cioè circa 6 volte inferiore al limite massimo stabilito per gli ammendanti (230 mg kg<sup>-1</sup>).

Relativamente alle emissioni in atmosfera, i dati emissivi sono stati comparati con processi analoghi sottoposti ad autorizzazione alle emissioni. Il processo preso a riferimento è stato l'emissione da biofiltro

nella produzione di compost, per il quale le autorizzazioni prescrivono limiti per i seguenti parametri: Ammoniaca (10 mg N m<sup>-3</sup>), Ammine (5 mg N m<sup>-3</sup>), SOV(COT) (50 mg N m<sup>-3</sup>). Nel confronto il solo inquinante che supera i suddetti limiti è stato il SOV(COT) in due campioni prelevati nella fase di bioossidazione accelerata nei primi quaranta giorni del processo (103 mgNm<sup>-3</sup> in maggio e 59 mgNm<sup>-3</sup> in giugno). Per quanto riguarda i risultati dei campioni di immissioni non sono emersi particolari problemi.

## Conclusioni

I risultati della sperimentazione dimostrano un'evoluzione ottimale del processo di compostaggio della miscela sansa-raspi (100:8 p/p) e quindi la buona attitudine al compostaggio di tali matrici nel rispetto della normativa vigente (D.Lgs 75/2010). Tale opportunità costituisce un'ottima soluzione per lo smaltimento/valorizzazione dei sottoprodotti considerati.

In particolare, riguardo alle emissioni in atmosfera, considerando che in Umbria il legislatore, in mancanza di dati sperimentali specifici, ha vietato il compostaggio all'aperto, i risultati appaiono di estremo interesse poiché dimostrano che, comparando i dati emissivi del cumulo con quelli ammessi per processi analoghi, per il primo anno di sperimentazione non si evidenziano emissioni in atmosfera di particolare rilevanza.

Per quanto riguarda gli effetti agronomici del compost ottenuto, essendo la sperimentazione solo al primo anno, i risultati (solo indicativi) non hanno evidenziato effetti fitotossici conseguenti al trattamento.

## Riassunto

Obiettivo del lavoro è lo studio di un sistema di compostaggio dei rifiuti organici provenienti dalle filiere vitivinicola e olearia (raspi e sanse) monitorando anche le emissioni in atmosfera. Il processo di compostaggio è stato condotto in un cumulo all'aperto (cumulo statico con areazione per convezione). I risultati della sperimentazione hanno dimostrato la buona attitudine al compostaggio delle sanse provenienti da un sistema di estrazione dell'olio a tre fasi miscelate con raspi. L'evoluzione del processo di compostaggio è risultata estremamente positiva, in quanto tutti i parametri sono evoluti in maniera ottimale; le caratteristiche del compost ottenuto hanno soddisfatto i requisiti imposti dalla legislazione vigente (D.L. 75/2010). Il contenuto in sostanza organica e in acidi umici e fulvici, il rapporto C/N e le concentrazioni degli elementi nutritivi sono risultati ad ottimi livelli; la quasi totalità dell'azoto è risultato essere in forma organica. In merito alle emissioni in atmosfera, è emerso che non ci sono emissioni rischiose.

**Parole chiave:** *Olea europaea* L., sansa, raspi, compostaggio, valorizzazione sottoprodotti, emissioni in atmosfera.

Ricerca finanziata dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (MIPAF) - Progetto "Ottenimento di substrati da invasatura e di ammendanti nell'azienda florovivaistica utilizzando residui vegetali, urbani".

## Bibliografia

- AGRICOLA DI TRIESTE SOC. COOP., UNIVERZA NA PPRIMORSKEM, 2008. *Relazione finale progetto: l'impostazione della collaborazione transfrontaliera per il compostaggio dei prodotti secondari dell'olivicoltura. Prova e presentazione delle nuove metodologie e tecnologie per il compostaggio dei residui dei frantoi e la normativa di riferimento.*
- ALTIERI R., ESPOSITO A., 2008. *Soluzioni alternative allo spandimento in campo dei sottoprodotti dei frantoi. Risultati dell'attività sperimentale, anni 2005-2007.*
- AGENZIA NAZIONALE PER LA PROTEZIONE DELL'AMBIENTE, 2002. *Il recupero di sostanza organica da rifiuti per la produzione di ammendanti di qualità. Manuali e Linee Guida ANPA n. 7.*
- ARSIA, 2007. *L'impiego di compost di qualità in agricoltura. Risultati del progetto di ricerca "Iniziativa di collaudo e trasferimento di tecniche idonee per l'impiego di compost di qualità in agricoltura".*
- BOSCHI C., 2007. *Il ruolo del compost di qualità nella strategia di gestione integrata dei rifiuti. L'impiego di compost di qualità in agricoltura.* ARSIA (Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione nel settore Agricolo-forestale).
- GIGLIOTTI G., PROIETTI P., SAID-PULLICINO D., NASINI L., PEZZOLLA D., ROSATI L., PORCEDDU P.R., 2012. *Co-composting of olive husks with high moisture contents: organic matter dynamics and compost quality.* International Biodeterioration and Biodegradation, 67: 8-14.
- JOURNAL OF THE WOODS END RESEARCH LABORATORY, 2000. *Interpretation of waste & compost tests.* 1(4).
- SAID-PULLICINO D., ERRIQUENS F.G., GIGLIOTTI G., 2007. *Changes in the chemical characteristics of water extractable organic matter during composting and their influence on compost stability and maturity.* Bioresource Technology 98, 1822-1831.
- TRINCHERA A., LEITA L., SEQUI P., 2006. *Metodi di analisi per i fertilizzanti.* Ministero delle Politiche Agricole e Forestali – Osservatorio Nazionale Pedologico e per la Qualità del suolo agricolo e forestale.

## Evoluzione del profilo chimico e microbiologico di un cumulo di sansa stoccato all'aperto

Simone N.<sup>1\*</sup>, Girardi F.<sup>1</sup>, Perri E.<sup>2</sup>, Lanza B.<sup>1</sup>, Muzzalupo I.<sup>2</sup> e Casacchia T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura, Centro di ricerca per l'olivicoltura e l'industria olearia, Città Sant'Angelo (PE)

<sup>2</sup> Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura, Centro di ricerca per l'olivicoltura e l'industria olearia, Rende (CS)

### Evolution of chemical and microbiological characteristics of a pomace pile stored outdoor

**Abstract.** Pomace produced by a 3-phases "water-saving" olive mill was stored outdoors as usually happens in Italy. The pomace pile resulted was 6,00 m length, 1,60 m width, 0,90 m height. The pile was left exposed to atmospheric events for almost ten months, while we took samples of pomace at 30 cm depth from the top of the pile during the whole period of outdoor storage. We carried out chemical and microbiological analysis from each pomace sample, to determinate the content of the following parameters: oil content, water content, total phenols content, lactic bacteria, enterobacteria, yeasts and mold content. The results obtained seems to show some kind of trend related to climatic variations and time of outdoor storage but, due to the small amount of samples, the nature and origin of pomace used, the lack of research using same conditions, does not verify the thesis supposed. Anyway, the results obtained strongly suggests further and wider investigations.

**Key words:** olives, pomace, storage, polyphenols.

### Introduzione

Di solito, in quasi tutti i frantoi italiani, la sansa prodotta dai processi di estrazione dell'olio di oliva vergine viene accumulata all'aperto fino a formare grossi cumuli nei piazzali di cemento adiacenti all'oleificio. Prima che tali cumuli possano essere smaltiti attraverso le vie consentite dalla legge, a volte passano anche mesi e dunque il contenuto in fenoli, il contenuto in olio residuo e in acqua variano notevolmente con il passare del tempo e l'esposizione della sansa agli eventi atmosferici. Anche la flora microbica che

abita questo cumulo dovrà essere, per forza di cose, soggetta a variazioni dovute sia a fattori propri della matrice (contenuto in acqua e in fenoli), sia a fattori ambientali (temperatura, piovosità, umidità relativa). Ci si è chiesto cosa accadesse nel corso dei mesi in questi cumuli, ovvero quali cambiamenti avvenissero e se questi cambiamenti fossero correlati all'andamento climatico oppure no. La bibliografia non ci è stata di nessun aiuto in quanto tutti i lavori tesi ad analizzare i parametri chimico-fisici e microbiologici delle sanses provenivano da ricerche fatte su campioni "freschi". Si è dovuto ripiegare perciò su una ricerca di tipo esplorativo che aprisse la strada a nuove linee di indagine. Lo scopo originario dello studio era di poter riuscire ad identificare quale fosse il momento temporale più adatto per il conferimento della sansa "matura" ad una centrale di produzione biogas.

### Materiali e metodi

Il cumulo di sansa (tab. 1) è stato ottenuto dal frantoio sperimentale del CRA-OLI di Città Sant'Angelo, a ciclo continuo 3 fasi per gentile concessione della Rapanelli Fioravante SpA. La cultivar maggiormente lavorata è stata il Leccino, da cui deriva un contenuto fenolico iniziale non altissimo rispetto ai dati trovati in bibliografia.

I prelievi di aliquote sono stati effettuati come indicato in tabella 2.

I dati meteorologici della zona relativamente a umidità relativa, mm di pioggia, temperature medie,

Tab. 1 - Terreni utilizzati e relative condizioni di coltivazione dei microrganismi isolati dalla sansa.

Tab. 1 - Soil and condition of storage of pomace

Microorganismo	Terreno	Condizioni di coltivazione
Lattobacilli	MRS Agar	30°C per 2 gg; anaerobiosi
Lieviti	Malt Extract Agar	30°C per 2 gg
Muffe	Malt Extract Agar	30°C per 5 gg
Enterobatteri	MacConkey Agar	37°C per 1 g

\*nicola.simone@entecra.it



Tab. 2 - Giorni trascorsi tra un prelievo e il successivo e dati meteo Città Sant'Angelo dal 1 ottobre 2010 al 30 agosto 2011.  
 Tab. 2 - Days between sample tacking and meterological condition in Città S. Angelo.

Mese	Prelievi (gg)	T media (°C)	Umidità relativa media (%)	Media pioggia (mm)
ottobre	-	14,8	76	53,1
novembre	0	11,7	78	72,4
novembre	2	11,7	78	72,4
novembre	10	11,7	78	72,4
dicembre	30	7,4	71	48,3
gennaio	60	6,0	81	99,3
febbraio	90	7,7	68	27,7
marzo	120	9,4	71	124,0
aprile	150	16,9	50	5,16
maggio	180	18,0	61	44,7
giugno	-	22,1	67	51,1
luglio	-	23,8	66	80
agosto	294	25,5	58	0

sono stati ottenuti da Internet su rilevamenti annuali di stazioni meteo locali. Per il prelievo delle aliquote sono state usate palette di materiale plastico debitamente lavate con ipoclorito di sodio e poi asciugate. Le aliquote di sansa sono state prelevate a 30 cm di profondità dalla cima del cumulo, sempre nella stessa area, delimitata da un quadrato di spago di dimensioni 50x50 cm, scavando delicatamente fino a raggiungere la profondità desiderata, misurata con un metro professionale. La profondità di prelievo è stata scelta per ridurre gli effetti del dilavamento da parte delle piogge agli strati superficiali del cumulo di sansa. A fine prelievo, il buco è stato richiuso con l'accortezza di non mischiare la sansa superficiale con quella più profonda. Le aliquote prelevate (circa 1 kg) sono state poste in sacchetti di polietilene del tipo per alimenti da congelare, in modo da avere contenitori "salubri" dal punto di vista microbiologico senza avere la necessità di sterilizzarli in autoclave prima del prelievo.

L'aliquote di sansa è stata divisa in due parti, di cui una è stata impiegata per le analisi chimiche e chimico-fisiche e l'altra per le analisi microbiologiche.

Per l'analisi del contenuto di acqua, le aliquote pesate esattamente in capsule preventivamente tarate sono state poste in stufa a 110 °C per 24 ore e successivamente pesate fino a stabilizzazione del peso.

Per l'analisi del contenuto di olio sono stati usati estrattori Soxhlet® per 6 ore con etere di petrolio 40-60° su aliquote pesate esattamente di sansa asciugata derivante dall'analisi del contenuto in acqua. L'estratto è stato concentrato prima in Rotavapor® ed infine essiccato per 24 ore in stufa a 110 °C su capsu-

le preventivamente tarate, dopodiché le capsule sono state pesate più volte fino a stabilizzazione del peso. Per l'analisi del contenuto di fenoli totali è stato utilizzato il metodo colorimetrico dopo reazione con reattivo di Folin Ciocalteau. La costruzione della curva di taratura è stata effettuata utilizzando come standard di riferimento l'acido caffeico, per cui i polifenoli totali in Figural sono indicati come mg/kg equivalenti di acido caffeico. Una aliquota di 10g di sansa ben omogeneizzata è stata lavata con 10 ml di acqua distillata e poi filtrata: dal filtrato è stata effettuata l'analisi del contenuto fenolico come da metodo. A causa dell'elevato contenuto di fenoli nelle sanse, sono state effettuate opportune diluizioni 1:100 in acqua distillata. Per le analisi microbiologiche, dalla sansa di partenza (1 g) sono state preparate diluizioni seriali 1:10 in acqua sterile. Un'aliquote (1 ml) prelevata da ciascuna provetta è stata seminata in piastra per inclusione in terreno agarizzato. Dopo la semina e l'incubazione alle condizioni standard di crescita (vedi tabella), sono state individuate le piastre aventi dalle 50 alle 100 colonie ben distinte e sono state contate le colonie tenendo conto del fattore di diluizione. I risultati sono espressi in unità formanti colonia (UFC)/g di sansa.

Tutti i terreni utilizzati sono della Oxoid LTD (Basingstoke, Hampshire, England), e per le condizioni di anaerobiosi in giara è stato utilizzato un Atmosfere Generation System AnaeroGen® sempre della Oxoid.

## Risultati e discussione

I dati ottenuti in tabella 3 e successivamente rappresentati in figura 1 e 2 ci mostrano come vi sia un evidente diminuzione graduale sia del contenuto in olio che del contenuto fenolico, probabilmente dovuti

Tab. 3 - Parametri chimici e chimico-fisici dei campioni prelevati.  
 Tab. 3 - Chemio-physical parameters of samples.

Giorni	Fenoli totali (mg/kg)	Umidità (%)	Olio (g)	Tempo (giorni)
0	3.020	51,00%	3,5	0
2	2.950	55,00%	3,7	2
10	2.840	53,00%	3,1	10
30	2.407	61,00%	2,9	30
60	2.110	66,00%	2,5	60
90	1.880	68,00%	2,5	90
120	1.604	66,00%	2,3	120
150	1.080	60,00%	2,1	150
180	875	55,00%	1,9	180
294	320	41,00%	1,3	294

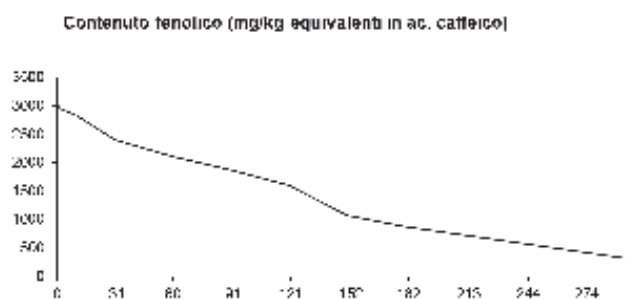


Fig. 1 - Evoluzione del contenuto fenolico nel corso dei prelievi.  
Fig. 1 - Evolution of phenols.

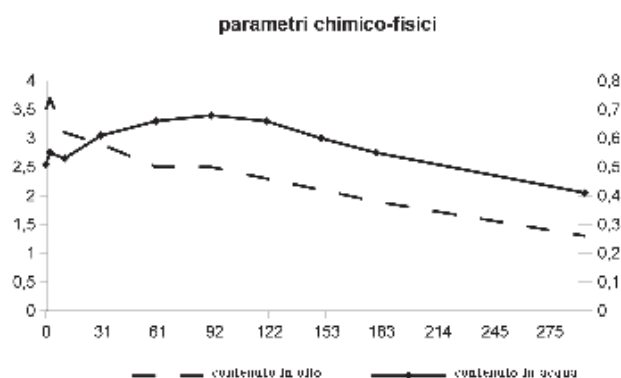


Fig. 2 - Evoluzione del contenuto di acqua e di olio nel corso dei prelievi.  
Fig. 2 - Evolution of oil and water content.

a fenomeni di digestione microbica dei lipidi, di dilavamento dei lipidi e dei fenoli, e di ossidazione dei fenoli, a fronte di una quantità di acqua nella sansa poco variabile ed apparentemente fortemente dipendente da temperatura dell'aria e precipitazioni.

Anche i risultati microbiologici appaiono interessanti come indicato in tabella 4, con i lieviti che aumentano di quantità nelle prime 48 ore per poi scomparire e ricomparire dopo 6 mesi, mentre il contenuto di muffe varia di poco a partire dal prelievo

effettuato il giorno 10 (l'assenza di muffe nei primi due prelievi indica che la sansa fresca è stata ottenuta da olive in buono stato). La presenza copiosa di batteri lattici fino al giorno 120 che poi decresce sensibilmente potrebbe essere spiegata nella diminuzione degli zuccheri disponibili all'interno della matrice, mentre l'andamento altalenante del contenuto di enterobatteri è di incerta interpretazione.

## Conclusioni

Questa piccola indagine esplorativa ha aperto un vasto campo di ipotesi e ricerca, correlato principalmente all'andamento della flora microbica presente, al probabile condizionamento climatico della stessa e all'incidenza dei fattori climatici sulla degradazione fenolica. Le tesi presupposte sono lungi dall'essere confermate, tuttavia i risultati ottenuti lasciano intuire più di una correlazione e auspichiamo di poter indagare in maniera più approfondita ed ampia nel prossimo futuro.

## Ringraziamenti

Si ringrazia il MiPAAF che ha consentito lo svolgimento di questo lavoro nell'ambito del progetto "OLIGAS".

## Riassunto

La sansa prodotta come scarto di lavorazione di un oleificio a ciclo continuo 3 fasi A.R.A., è stata stoccata all'aperto come avviene di solito sotto forma di un cumulo di lunghezza 6,00 m, larghezza 1,60 m e altezza 0,90 m. Questo cumulo è stato lasciato esposto alle intemperie atmosferiche per circa dieci mesi, e sono stati effettuati prelievi di aliquote di sansa a

Tab. 4 - Risultati analisi microbiologiche.  
Tab. 4 - Microbiological analysis.

Campione	Giorni	Lieviti	Muffe	Batteri lattici	Enterobatteri
o	0	0.00E+000	0.00E+000	2.50E+005	6.10E+005
a	2	2.60E+003	0.00E+000	9.60E+004	2.20E+004
b	10	0.00E+000	5.90E+003	1.10E+005	8.30E+003
c	30	0.00E+000	1.20E+002	5.40E+005	6.10E+004
d	60	0.00E+000	2.50E+003	1.30E+006	3.40E+005
e	90	0.00E+000	4.00E+003	1.90E+006	8.20E+005
f	120	0.00E+000	2.20E+003	1.60E+005	4.20E+006
g	150	0.00E+000	1.40E+003	2.80E+003	7.60E+007
h	180	4.70E+003	4.50E+004	1.80E+003	4.30E+004
i	294	2.90E+003	2.50E+004	8.40E+003	6.40E+006

cadenze periodiche alla profondità di circa 30 cm dalla superficie del cumulo. Sono stati analizzati i principali parametri chimico-fisici della sansa insieme alla valutazione microbiologica delle principali specie presenti ovvero: contenuto in acqua, contenuto in olio, contenuto in polifenoli totali, batteri lattici, enterobatteri, muffe e lieviti ad ogni prelievo di aliquota di sansa. I risultati ottenuti sembrano suggerire la presenza di tendenze correlate all'andamento climatico e al tempo di stoccaggio ma l'esiguità dei campioni ottenuti, la natura del campione, il tipo di processo da cui si è ottenuta la matrice e la mancanza di ricerche simili precedenti non ha consentito di verificare le

tesi. Tuttavia i risultati ottenuti suggeriscono indagini ulteriori e più vaste.

**Parole chiave:** olive, sansa, polifenoli, stoccaggio.

### **Bibliografia**

- <http://www.caputfrigoris.it/rete-meteo/csa/daily.htm>  
RANALLI A., 1992. *Microbiological treatment of oil mill waste waters*. Grasas y Aceites, 43: 16-19 .  
RANALLI A., DE MATTIA G., 1992. *Studies and researches on biological piloted processes of degradation and humification of olive oil waste waters*. Int. J. Agr. Sci, 78: 122-131.  
RANALLI A., DE MATTIA G., 1996. *Role of piloted biological processes in the purification of oil mill waste water*. Riv. It. Sostanze Grasse, 73: 61-66.

## La digestione anaerobica: produzione di biogas da sottoprodotti oleari

Casacchia T.<sup>1</sup>, Toscano P.<sup>1</sup>, Romano E.<sup>1</sup>, Benincasa C.<sup>1</sup>, Morini P.<sup>2</sup>, Perri E.<sup>1</sup> e Muzzalupo I.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura, Centro di ricerca per l'olivicoltura e l'industria olearia, Rende (CS)

<sup>2</sup> Bruker Optics Italia S.r.l., Milano

### The anaerobic fermentation: production of biogas from olive-mill by-products

**Abstract.** A lab scale trial of anaerobic fermentation was effected on a matrix composed by olive mill by-products and cattle fresh manure in a 25:25:50 mix. The aim of this work is the validation of olive mill by-products as energetic biomass, in the strategies of agroindustrial by-products valorization, and the optimization of by-products percentages in the mix, and parameters of anaerobic process, to maximize the biogas production. The microbiological analysis of matrix, was done in three times of fermentative period, and mean the evolution of anaerobic bacteria colony. In a 14-days fermentative period, from a 1 litres of matrix was produced approx. 74 litres of biogas (based on pump cycle), with a 33% of CH<sub>4</sub>

**Key words:** anaerobic fermentation, biogas, microbiologic pattern, olive-mill by-products.

### Introduzione

Negli ultimi anni, è progressivamente aumentata l'attenzione all'impiego delle energie rinnovabili ed a basso impatto ambientale come possibile soluzione per uno sviluppo ecosostenibile delle attività produttive. Ciò anche in accordo con il Protocollo attuativo della Convenzione Quadro delle Nazioni Unite sui Cambiamenti Climatici (Kyoto, JP), che impegnava i Paesi industrializzati a garantire una riduzione complessiva del 5,2% di emissioni di gas serra entro il 2012, anche attraverso una ottimizzazione del recupero energetico da fonti rinnovabili e lo sviluppo di tecnologie innovative. In quest'ottica rientra la valorizzazione di biomasse di scarto dell'agroindustria attraverso processi di fermentazione anaerobica per la produzione di biogas da matrici organiche, che con tale procedura originano digestati stabilizzati, con altissima riduzione dell'inquinamento dei gas serra, utilizzabili nella riorganizzazione dei suoli per le loro carat-

teristiche ammendanti e nutrizionali (Bogner et al, 2008; Clemens *et al.*, 2006; Monteny *et al.*, 2006; Loria *et al.*, 2007). Tali fermentazioni sono operate da diversi gruppi microbici (*idrolitici, acidificanti, acetogeni e metanigeni*), i quali operano sequenzialmente su substrati originati dalla catena trofica.

Le fasi prevalenti della produzione di biogas sono:

- Idrolisi, in cui dai substrati si formano acidi grassi volatili, alcoli e chetoni; i microrganismi che agiscono in questa fase sono prevalentemente di tipo aerobico.
- Acetogenesi, durante la quale gli acidi grassi vengono degradati ad acido acetico, acido formico, biossido di carbonio e idrogeno molecolare.
- Metanogenesi, con sintesi di metano a partire dall'acetato, ad opera di *batteri acetoclasti*, o dal biossido di carbonio da parte di *batteri idrogenofili* che utilizzano l'idrogeno come co-substrato.

I principali fattori che influenzano i processi di fermentazione anaerobica, e quindi l'ottimizzazione della attività microbica nella produzione di biogas, sono i seguenti.

- *Temperatura:* in anaerobiosi l'attività microbica è presente in un range di temperatura che varia da +5 a +70 °C, con diverse entità delle comunità batteriche attive. I batteri sono infatti classificati, in base alla loro ottimale temperatura di crescita, in: psicrofili, con optimum di temperatura <+20 °C; mesofili con optimum compreso tra +20 e +45 °C; e termofili con optimum >+45 °C. Temperature diverse comportano non solo una differente presenza delle popolazioni microbiche, ma anche una diversa attività nella fermentazione della matrice e nella produzione di metaboliti.
- *pH:* influenza la velocità di reazione incidendo sull'attività enzimatica che degrada il substrato; valori di pH più bassi di 6,3 o più alti di 7,8 rallentano la fase di metanogenesi, mentre i batteri acidogeni risultano essere meno sensibili alle oscillazioni di pH.
- *Matrice:* la composizione della matrice di partenza, ed in particolare la presenza di alcuni composti (es. fenoli), potrebbero rallentare o anche inibire totalmente l'attività microbica.

\* innocenzo.muzzalupo@entecra.it



Il presente lavoro riporta alcuni risultati ottenuti da preliminari prove di digestione anaerobica *lab-scale* di sottoprodotti oleari addizionati a reflui zootecnici.

**Materiali e metodi**

Campioni di reflui oleari (sansa e acqua di vegetazione) provenienti da un frantoio a ciclo continuo a tre fasi sono stati aggiunti a liquami bovini attivati in digestore a costituire matrici di 1 litro in proporzioni 25:25:50. Un'aliquota (10 ml) della miscela, omogeneizzata e filtrata, è stata sottoposta ad analisi chimica e messa a cultura per la valutazione della carica batterica mesofila (TBC), fungina (Fungi) e sporigena (Spo). Sulla sansa è stata collateralmente effettuata l'analisi microbiologica di attinomiceti (Act) e *Pseudomonas* spp. (Pse) seguendo le metodiche di coltura validate in precedenti lavori (Casacchia *et al.*, 2011). La matrice è stata posta in fermentatore anaerobico Sartorius Stedim, con agitazione a 100 rpm e monitoraggio della temperatura, del pH e della concentrazione di O<sub>2</sub>; campionamenti successivi sono stati eseguiti dopo 3 giorni di attività (T1) e al termine del processo (T2). Agli stessi tempi sono stati effettuati dei prelievi di matrice dal fermentatore di circa 50 ml per l'analisi del COD, BOD, del carbonio organico e dell'azoto totale presente nella matrice. Per il monitoraggio dei prodotti della digestione anidride carbonica e metano (CO<sub>2</sub>; CH<sub>4</sub>), il fermentatore è stato collegato ad un spettrofotometro infrarosso (Alpha fornito dalla Bruker Optics Italia) dotato di una cella a gas di 5 ml, con tempi di rilievo dei gas prodotti ogni 5 minuti.

**Risultati e discussioni**

Le analisi effettuate sulla matrice in fermentazione (tab. 1) mostrano una progressiva riduzione di tutti i parametri considerati, indice della positiva evoluzione del processo di degradazione della sostanza organica. L'analisi microbiologica della miscela (fig. 1) a T0 rileva la presenza di microrganismi sia aerobi che anaerobi, derivanti dalle biomasse componenti. Già al successivo rilievo, effettuato dopo 3 giorni di attività (T1), si nota l'incremento della CBT e degli Sporigeni

Tab.1 - Parametri della matrice in fermentazione.  
Tab. 1 - Parameters of matrix during fermentation.

Tempo	pH	C org (gr/kg)	N tot (mg/kg)	C/N	COD (g/kg)	BOD5 (g/kg)
T0	7,22	1,44	395	3,7	59,3	9,7
T1	6,81	1,05	312	3,4	43,1	7,2
T2	5,15	1,01	281	3,6	41,4	6,9

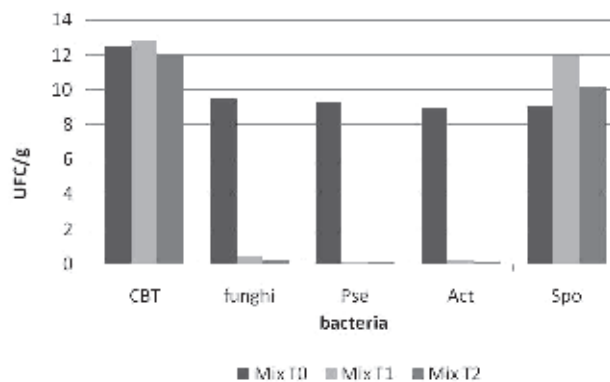


Fig. 1 - Analisi microbiologica.  
Fig. 1 - Microbiological analysis.

(Spo), mentre risulta un abbattimento di funghi, *Pseudomonas* spp. (Pse) e Attinomiceti (Act), causato dalla carenza di ossigeno. Al termine della prova (T2), si rileva infine un decremento sia della CBT che dei ceppi di Sporigeni (Spo).

In figura 2 sono riportati i flussi di gas prodotti dal fermentatore e analizzati in cella IR nel periodo di fermentazione (27/4 – 9/5), e i corrispondenti quantitativi di CH<sub>4</sub> rilevati in un totale di 3888 scansioni, pari ad un flusso in cella di 74,88 litri. L'andamento della fermentazione mostra un progressivo incremento della produzione di metano fino ad un max di 3,97 l al 14° giorno (9/5), data in cui la fermentazione è stata interrotta. Nel periodo di monitoraggio, sono stati prodotti 24,61 litri di CH<sub>4</sub>, corrispondenti al 33% del biogas prodotto.

**Conclusioni**

I risultati ottenuti dalle prime prove di digestione anaerobica di reflui oleari, finalizzate al recupero e valorizzazione energetica di tali biomasse tramite la produzione di biogas, forniscono utili indicazioni circa i loro possibili rendimenti. Il prosieguo della sperimentazione sarà pertanto focalizzato sull'ottimizzazione dei parametri di processo e sulla composizione delle matrici; mentre lo *screening* microbiologico e

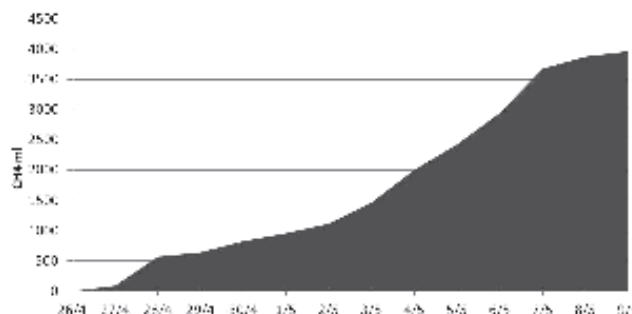


Fig. 2 - Metano (ml) prodotto dal digestore.  
Fig. 2 - Production of Methane (ml) during the fermentation.

la coltura di ceppi selezionati potranno costituire *starter* funzionali alla massimizzazione delle produzioni di biogas.

### Riassunto

Si espongono i risultati della digestione anaerobica *lab scale* di una matrice composta da reflui oleari di frantoio oleario a ciclo continuo “tre fasi” e liquami zootecnici. La sperimentazione ha lo scopo di verificare la compatibilità dei reflui oleari tra le biomasse utilizzabili nella produzione di biogas, nelle strategie di recupero e valorizzazione dei sottoprodotti agroindustriali, ovvero l’ottimizzazione delle miscele di reflui e dei parametri di processo per la massimizzazione dei rendimenti di conversione. L’analisi microbiologica della miscela evidenzia l’evoluzione dei ceppi batterici preposti alla digestione della matrice che ha prodotto 74 litri di biogas con il 33% di CH<sub>4</sub>

**Parole chiave:** biogas, colture microbiche, digestione anaerobica, reflui oleari.

Ricerca finanziata dal progetto OLIGAS.

### Bibliografia

- BOGNER J., DIAZ C., GAO Q., MARECKOVA K., ABDELRAFIE AHMED M., FAAJ A., HASHIMOTO S., PIPATTI R., ZHANG T., KJELDSSEN, P. DIAZ L., MONNI S., SUTAMIHARDJA R.T.M. , GREGORY R., 2008. *Mitigation of global greenhouse gas emissions from waste: Conclusions and strategies from the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) Fourth Assessment Report. Working Group III (Mitigation)*, Waste Management and Research, 26: 11-32.
- CASACCHIA T., TOSCANO P., SOFO A., PERRI E. 2011 *Assessment of microbial pools by an innovative microbiological technique during the co-composting of olive mill by-products*, Agricultural Sciences, 2: 104-110;
- CLEMENS J., TRIMBORN M., WEILAND P., AMON B. 2006. *Mitigation of Greenhouse Gas Emissions by Anaerobic Digestion of Cattle Slurry*, Agriculture, Ecosystems and Environment, 112: 171-177.
- LORIA E. R., SAWYER J. E., BARKER D. W., LUNDWALL J. P., LORIMOR J. C., 2007. *Use of anaerobically digested swine manure as a nitrogen source in corn production*. Agronomy Journal 99: 1119-1129;
- MONTENY G., BANNINK A., CHADWICK D. 2006. *Greenhouse gas abatement strategies for animal husbandry* , Agriculture Ecosystems and Environment, 112: 163-170.

## Estrazione di composti fenolici e di acidi triterpenici da foglie di olivo

Andreoni N.\*

Dipartimento di Biologia delle piante Agrarie, Università di Pisa

### Extraction of phenolic compounds and triterpenic acids from olive leaves

**Abstract.** Olive leaves are a material easily available, especially during the agronomic work of pruning of olive trees, which usually is left underutilized, whereas, due to various bioactive compounds it contains, it could be a resource. The aim of this work was to experiment an easily practicable method of extraction and separation of some of these compounds, in particular phenolic compounds and triterpenic acids. For the experiments, samples of 0.5 g of olive leaves (cv Leccino), dried and ground were extracted by maceration in ethanol and percolation. The alcoholic extract was then fractionated by simple chemical treatments obtaining various groups of compounds initially present in the leaves. In particular, it was possible to separate fractions containing solid and nearly pure compounds with chemical characteristics respectively similar to those of oleuropein and of oleanolic acid, which can be regarded as the main bioactive compounds of the olive leaves. Moreover, the experiments carried out showed that, by taking suitable precautions, both the dried leaves and their alcoholic extract could be preserved without any significant decay even for several days, that the ethyl alcohol employed for the extraction, practically non toxic, could be recovered and recycled and that, at last, the extracted solid material could be further utilized, for example as feed for livestock. These results allow to conclude that the processing of the olive leaves for the extraction of compounds with peculiar chemical and pharmacological properties could be planned so that it could be carried out, at least partly, also in small factories connected with the agricultural industries.

**Key words:** *Olea europaea*, maceration with ethanol, oleuropein, oleanolic acid.

### Introduzione

Le foglie di olivo contengono apprezzabili concentrazioni di vari composti di rilevante interesse nei set-

tori medico, alimentare e industriale. Tali composti sono principalmente: polifenoli (ampiamente studiati nell'olio di oliva), acidi triterpenici (in particolare l'acido oleanolico, presente nelle foglie come acido libero), zuccheri (in particolare mannitolo) e composti liposolubili come trigliceridi, cere, carotenoidi, tocoferoli (Capretti e Bonaconza, 1949; Bianchi *et al.* 1993; Servili *et al.*, 1999; Albi *et al.*, 2001; Guinda *et al.* 2002; Heimler *et al.*, 2002; Somova *et al.* 2003; Ranalli *et al.*, 2006; Fabbri *et al.*, 2008; Fu *et al.* 2010). L'estrazione di questi composti dalle foglie di olivo potrebbe costituire una integrazione economica per l'olivicultura, dal momento che queste, disponibili in notevoli quantità come sottoprodotto della lavorazione delle olive per l'estrazione dell'olio e della potatura degli olivi, sono spesso bruciate oppure utilizzate come mangime con basso contenuto di proteine (Delgado-Pertíñez *et al.*, 2000; García *et al.*, 2003; Guinda, 2006; Erbay and Icier, 2008). D'altra parte, i metodi di estrazione ed i brevetti riportati in letteratura per le foglie di olivo hanno in genere finalità analitiche oppure riguardano specifiche classi di composti, mentre la loro utilizzazione potrebbe essere più vantaggiosa con l'estrazione di tutte le varie classi di composti che esse contengono. Perché questa prospettiva possa essere realizzata non è sufficiente che questo materiale sia facilmente disponibile e ricco di sostanze bioattive, ma è necessario anche che si verifichino in modo concomitante varie condizioni come il contenimento dei costi di raccolta della materia prima, la stabilità durante la conservazione e la facilità di lavorazione. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di studiare un semplice metodo di estrazione e separazione dei principali composti presenti nelle foglie di olivo con possibilità di recupero di solventi e di sottoprodotti che potesse essere vantaggiosamente effettuato anche con il coinvolgimento diretto delle aziende agricole.

### Materiali e metodi

Per le prove sono state impiegate foglie di olivo della cv Leccino raccolte nel mese di luglio. Una parte di queste sono state sottoposte a blanching in un forno a microonde, mentre l'altra non è stata sottoposta ad alcun trattamento. Ambedue i campioni sono

\* nandre@agr.unipi.it

stati poi lasciati seccare all'aria a temperatura ambiente al buio in un posto asciutto. Dopo alcuni giorni, le foglie sono state ridotte in polvere con un macinacaffè elettrico e conservate in contenitori chiusi a temperatura ambiente e al riparo dalla luce.

Campioni di 0,5 g di foglie, rispettivamente trattate e non trattate con microonde e ridotte in polvere sono state estratte per macerazione dentro una colonnina di 1 cm di diametro con setto poroso e munita di un rubinetto. Dopo 3 ore sono state raccolte dalla miscela frazioni di 2 ml di soluzione fino ad un totale di 10 ml. Per semplicità, sono state considerate solo le prime due frazioni, che sono state riunite e portate quasi a secchezza mediante evaporazione a pressione ridotta. A questo residuo sono stati aggiunti 2 ml di acqua e 0,5 ml di n-esano. La miscela è stata agitata e centrifugata separando la fase acquosa. Questo trattamento è stato ripetuto, riunendo gli estratti acquosi, finché i composti fenolici, valutati mediante il reattivo di Folin-Ciocalteu, vi sono risultati presenti (Singleton e Rossi, 1965). La soluzione acquosa così ottenuta è stata eluita attraverso una colonna  $C_{18}$  per estrazione in fase solida (Isolute StepBio, Bologna), che è stata lavata con HCl 0,1 N e con  $H_2O$  e infine estratta con alcol raccogliendo l'eluato. Questo, portato a secchezza a pressione ridotta, ha lasciato un residuo oleoso leggermente giallo che, lavato con poco cloroformio, ha dato un prodotto solido bianco e igroscopico. La miscela di composti organici apolari non passati in fase acquosa, dopo aggiunta di una soluzione diluita di NaOH e di tracce di etanolo, è stata estratta con acetato di etile per separare i composti non polari e non acidi. La fase idroalcolica, separata per centrifugazione, è stata acidificata fino a formazione di abbondante solido fioccoso.

## Risultati e discussione

Dall'estratto alcolico preparato dalle foglie di olivo per macerazione sono stati ottenuti in forma solida due gruppi di composti: composti fenolici e acidi triterpenici, la cui separazione rispecchia le rispettive proprietà chimiche come la solubilità in acqua e in solventi organici. La frazione dei composti fenolici isolata a seguito della eluizione attraverso la colonnina  $C_{18}$  è risultata composta quasi esclusivamente da oleuropeina, come confermato dalla sua igroscopicità, dalla reazione con cloruro ferrico e dal confronto cromatografico con un campione di oleuropeina commerciale (Extrasynthèse, Francia), mentre la frazione degli acidi triterpenici, riconoscibili per le loro caratteristiche acide e per la loro apolarità, può essere considerata costituita quasi esclusivamente da

acido oleanolico, che è il principale composto terpenico presente in forma libera sulla cuticola esterna delle foglie di olivo, fino a costituirne il 3% della sostanza secca (Panizzi *et al.*, 1960; Sanchez-Avila *et al.* 2009).

In prove ancora in corso altri gruppi di composti come clorofilla e carotenoidi sono stati separati dall'estratto alcolico con l'uso di colonne impaccate con gel di silice, che è stato rigenerato e riutilizzato varie volte. Da un semplice esame visivo è stato riscontrato che dal campione di foglie trattate con microonde si sono ottenute maggiori quantità di oleuropeina rispetto a quello non trattato. Per quanto riguarda gli acidi triterpenici, invece, non si sono notati effetti di rilievo della inattivazione enzimatica delle foglie di olivo mediante microonde.

Dalle foglie di olivo, dopo l'estrazione con alcol, è rimasto un residuo chiaro nel caso delle foglie trattate con microonde e marrone chiaro nel caso delle foglie lasciate seccare senza alcun trattamento, presumibilmente dovuto alla ossidazione e polimerizzazione di sostanze fenoliche per effetto di enzimi endogeni. Questo residuo conteneva ancora composti estraibili come flavonoidi e zuccheri che non sono stati presi in considerazione in questo lavoro. Sebbene non siano state fatte determinazioni quantitative sui singoli composti presenti nelle frazioni separate, i prodotti solidi ottenuti e le modalità operative sono risultate sufficienti per fare delle valutazioni sulla possibilità pratica di valorizzazione delle foglie di olivo mediante l'estrazione di composti di pregio. Appare infatti evidente che per tale scopo è necessario disporre di adeguate colonne preparative per estrarre composti fenolici da soluzioni acquose, analoghe alla colonna  $C_{18}$  impiegata nelle prove di laboratorio, attualmente disponibili in commercio e spesso utilizzate nella depurazione delle acque. La parte più costosa dell'intero processo di estrazione studiato è certamente la raccolta della materia prima.

Questo lavoro potrebbe, tuttavia, essere fatto durante la pratica agronomica di potatura degli olivi, che, sebbene onerosa, deve pur essere fatta, come pure è necessario liberare il terreno dal materiale che ne deriva. Perché le foglie di olivo possano essere utilizzate per l'estrazione, è inoltre necessario separarle tempestivamente dai rami e "stabilizzarle", ad esempio mediante microonde, mentre la loro macinazione, resa possibile dalla fragilità che esse assumono a seguito dell'essiccamento, ed il successivo immagazzinamento non presentano scadenze di tempo immediate. Infatti il materiale così preparato e conservato in recipienti chiusi e al buio è risultato abbastanza stabile alle alterazioni.



Per quanto riguarda la fase di estrazione, le prove fatte hanno mostrato che l'impiego di etanolo ha diversi vantaggi. Infatti, questo solvente, oltre ad essere praticamente non tossico, può essere recuperato e riciclato, mentre il materiale solido che rimane dopo l'estrazione, non soggetto all'attacco di muffe, potrebbe essere utilizzato in vari modi: ad esempio come mangime (presumibilmente più accettato dagli animali per l'assenza del principio amaro oleuropeina). Nelle prove fatte, inoltre, i composti fenolici, finché sono rimasti nella miscela di estrazione o in soluzione alcolica in presenza degli altri composti estratti dalle foglie, sono risultati protetti da processi ossidativi. Perciò la fase di macerazione può essere fatta anche in tempi prolungati senza pericolo di alterazioni.

Da un punto di vista pratico, i tempi più lunghi richiesti nel metodo di estrazione sperimentato rispetto ad altri tipi di estrazione non rappresentano un limite, ma piuttosto un vantaggio, perché, una volta programmata la lavorazione, questa potrebbe essere ben compatibile con altre attività.

## Conclusioni

Dall'estratto alcolico preparato per macerazione e percolazione da foglie di olivo seccate e macinate sono state separate varie frazioni, tra cui due ottenute in forma solida e costituite rispettivamente quasi esclusivamente di oleuropeina e di acido oleanolico. Questo tipo di estrazione presenta aspetti interessanti come la bassa tossicità e la possibilità di recupero del solvente, l'assenza di muffe nel residuo di estrazione e l'assenza di apprezzabili alterazioni durante la macerazione. Perché questa utilizzazione delle foglie di olivo possa costituire una risorsa è tuttavia necessario che le foglie giungano nell'impianto di estrazione adeguatamente stabilizzate e preparate mediante trattamento con microonde, essiccazione e macinazione. Queste operazioni potrebbero essere effettuate presso le stesse aziende agricole in combinazione con la pratica agronomica di potatura dell'olivo.

## Riassunto

Le foglie di olivo sono un materiale facilmente disponibile, soprattutto durante la pratica agronomica di potatura, che di solito rimane sottoutilizzato, mentre, per il suo contenuto di vari composti bioattivi, potrebbe costituire una risorsa. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di sperimentare un metodo facilmente eseguibile per l'estrazione e l'isolamento di alcuni di tali composti, in particolare, i composti fenolici e gli acidi triterpenici. Per le prove, dei cam-

pioni di 0,5 g di foglie di olivo (cv Leccino), seccate e ridotte in polvere, sono stati estratti mediante macerazione in alcol e percolazione. L'estratto alcolico è stato poi frazionato con semplici passaggi ottenendo vari gruppi di composti inizialmente presenti nelle foglie. Sono stati in particolare isolati, in forma solida e pressoché puri, dei composti con comportamento chimico analogo rispettivamente a quello della oleuropeina e a quello dell'acido oleanolico, che si possono considerare i principali composti bioattivi delle foglie di olivo. Le prove hanno inoltre mostrato che, con appropriati accorgimenti, sia le foglie essiccate e macinate, che l'estratto alcolico ottenuto possono essere conservati senza apprezzabili alterazioni anche per vari giorni e che l'alcol etilico impiegato per l'estrazione, praticamente non tossico, può essere recuperato e riciclato e che, infine, il materiale solido estratto potrebbe essere ulteriormente utilizzato, ad esempio come mangime per animali. Questi dati consentono di concludere che la lavorazione delle foglie di olivo per l'estrazione di composti con peculiari proprietà farmacologiche potrebbe essere programmata in modo da poter essere effettuata, almeno in parte, anche in piccoli impianti connessi alle attività agricole.

**Parole chiave:** *Olea europaea*, macerazione con etanolo, oleuropeina, acido oleanolico.

Ricerca eseguita con fondi di Ateneo dell'Università di Pisa

## Bibliografia

- ALBI T., GUINDA A., LANZÓN A., 2001. *Procedimiento de obtención y derivación de ácidos triterpenicos de la hoja del olivo (Olea europaea)*. Grasas y Aceites 52: 275-278.
- BIANCHI G., VLAHOV G., ANGLANI C., MURELLI C., 1993. *Epicuticular wax of olive leaves*. Phytochemistry 32: 49-52.
- CAPRETTI G., BONACONZA E., 1949. *Effetti di infusioni o decotti di foglie di olivo (Olea europaea) su alcune costanti fisiche del sangue e componenti del metabolismo*. Giorn. Clin. Med. 30: 630-642.
- CIVANTOS L. 1982. *Recuperación de los ramos procedentes de la poda del olivar para su posterior utilización*. Comité de Aprovechamiento de los subproductos del olivo. FAO. September 1982. Madrid.
- DELGADO-PERTIÑEZ M., GOMEZ-CABRERA A., GARRIDO A., 2000. *Predicting the nutritive value of the olive leaf (Olea europaea): digestibility and chemical composition and in vitro studies*. Animal Feed Sci. Technol. 87: 187-201.
- ERBAY Z., ICIER F., 2009. *Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology*. J. Food Engin. 91: 533-541.
- GARCÍA M.A., MUMEN A., RUIZ Y., MOLINA ALCAIDE E., 2003. *Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves*. Animal Feed Sci. Technol. 107: 61-74.
- FABBRI A., GALAVERNA G., GANINO T., 2008. *Polyphenol composition of olive leaves with regard to cultivar, time of collection*

- and shot type. *Acta Horticulturae* 791: 459-464.
- FU S., ARRAÉZ-ROMAN D., SEGURA-CARRETERO A., MÉNENDEZ J.A., MÉNENDEZ-GUTIÉRREZ M.P., MICOL V., FERNANEZ-GUTIÉRREZ A., 2010. *Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hypophenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human cells*. *Anal. Bioanal. Chem.* 397: 643-654.
- GUINDA A., LANZÓN A., RIOS J.J., ALBI T., 2002. *Aislamiento y cuantificación de los componentes de la hoja del olivo*. *Grasas y Aceites* 53: 419-422.
- GUINDA A., 2006. *Use of solid residue from olive industry*. *Grasas y Aceites* 57: 107-111.
- HEIMLER D., PIERONI A., CIMATO A., SANI G., GALARDI C., ROMANI A., 2002. *Flavonoids from olive leaves (Olea europaea) as affected by light*. *J. Commodity Science (Italy)* 41: 31-39.
- PANIZZI L., SCARPATI M.L., ORIENTE G., 1960. *Costituzione dell'oleuropeina, glucoside amaro ad azione ipotensiva dell'olivo*. *Nota II. Gazz. Chim. Ital.* 90: 1449-1485.
- RANALLI A., CONTENTO S., LUCERA L., DI FEBBO M., ARCHEGIANI D., FONZO V., 2006. *Factors affecting the content of iridoid oleuropein in olive leaves (Olea europaea L.)*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 434-440.
- SANCHEZ-AVILA N., PRIEGO-CAPOTE F., RUIZ-GIMENEZ J., DE CASTRO M.D. 2009. *Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction*. *Talanta* 78: 40-48.
- SERVILI M., BALDIOLI M., SELVAGGINI R., MINIATI E., MACCHIONI A., MONTEDORO G.F. 1999. *High-Performance Liquid Chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters and pomace and 1D- and 2D-Nuclear Magnetic Resonance characterization*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76: 873-882.
- SINGLETON V.L., ROSSI JR. J.A., 1965. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagent*. *Amer. J. Enol. Vitic.* 16: 144-148.
- SOMOVA L.I., SHODE F.O., RAMNANAN P., NADAR A., 2003. *Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from Olea europaea, subspecies Africana, leaves*. *J. Ethnopharmacology* 84: 299-305.

## Utilizzo di *Lactobacillus plantarum* per la defenolizzazione di sottoprodotti oleari da utilizzare come biomasse per la produzione di biogas

Lanza B.<sup>1\*</sup>, Di Serio M.G.<sup>1</sup>, Russi F.<sup>1</sup>, Girardi F.<sup>1</sup>, Simone N.<sup>1</sup> e Perri E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura, Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia, Città Sant'Angelo (PE)

<sup>2</sup> Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura, Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia, Rende (CS)

### Use of *Lactobacillus plantarum* for phenol removal from olive by-products to utilize as biomasses in biogas production

**Abstract.** The aim of this work is the use of olive industry by-products (olive residues, wet pomace, olive mill wastewater and alkaline wastewater derived from debittering Seville method for table olives) to produce renewable energy sources (biogas), through the optimization of pre-digestion phase using biotechnology processes, where the main role is played by microorganisms. The addition of biomasses with a high content of simple and complex phenol compounds holds a high bacteriostatic action against many bacterial species especially the methanogenic bacteria, leading to reduce the production of methane. The contribution of not treated biomasses with a high content of cellulose, pectin and lignin leads to an increase of processing times. Biochemical and molecular tests were carried out to select bacterial strains to use in fermentation trials. A special attention has been focused on three bacterial strains isolated from olive fruits skin of different origin trees, present in the Collection of Microorganisms of the CRA OLI (*Lactobacillus plantarum* B28, *L. plantarum* B51 and *L. plantarum* B124). Oleuropeinolytic activity was assessed by inoculation of these strains in MRS Broth without glucose, added 1% of oleuropein (w/v). Products degradation analysis was performed by HPLC apparatus and adjusting to the specific case, method COI/T.20/Doc. n. 29. November 2009 "Determination of biophenols in olive oils by HPLC". Oleuropein demolition was followed checking up the formation of hydroxytyrosol. It was tested, besides, both the capacity of growing/fermentation of the bacterial strains in highly acid, in neutral and in strong basic environments that characterize the several starting matrices, and the tolerance at different temperature that could occur during the storage (T 4-15°C) or inside the digester (T>40°C).

**Key words:**  $\beta$ -glucosidase, *Lactobacillus plantarum*, oleuropein, olive mill wastewater, phenols.

### Introduzione

Con la Direttiva 2001/77/CE sulla promozione dell'energia elettrica prodotta da fonti energetiche rinnovabili e il DPCM 8 marzo 2002 inerente l'utilizzo delle sansi vergini per la produzione di energia elettrica, si sono avviate numerose ricerche sui sistemi di produzione basati sullo sfruttamento di fonti energetiche rinnovabili. Il biogas viene indicato dall'U.E. come fonte energetica non fossile in grado di poter coprire i fabbisogni energetici e ridurre gradualmente l'inquinamento dell'aria. L'obiettivo che il Parlamento Europeo ha proposto all'U.E per il 2010 è di coprire il 15% dell'energia complessiva con fonti energetiche rinnovabili. Il processo biologico per mezzo del quale, in assenza di ossigeno, la sostanza organica viene trasformata in biogas, costituito principalmente da metano e anidride carbonica, è detto fermentazione anaerobica. La percentuale di metano nel biogas varia a seconda del tipo di sostanza organica digerita e delle condizioni di processo, da un minimo del 50% fino all'80% circa. Affinché il processo abbia luogo è necessaria l'azione di diversi gruppi di microrganismi, in grado di trasformare la sostanza organica in composti intermedi, principalmente acido acetico, anidride carbonica ed idrogeno, utilizzabili dai microrganismi metanigeni che concludono il processo producendo il metano. Dalle olive, a seconda del tipo di lavorazione (fig. 1) si ottengono sottoprodotti inquinanti solidi (sansi), semi-solidi (sansi umide) e liquidi (acque di vegetazione). La sansa è il sottoprodotto solido ottenuto dall'estrazione meccanica dell'olio vergine di oliva. Attualmente, in Italia, la sansa ottenuta mediante il sistema per pressione viene utilizzata quasi esclusivamente per l'estrazione dell'olio di sansa, mentre non c'è grande richiesta da parte dei sansifici della sansa umida ottenuta mediante il

\* barbara.lanza@entecra.it

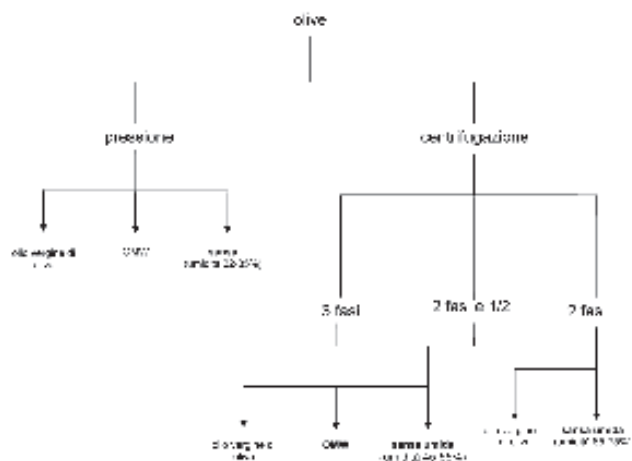


Fig. 1 - Schema della produzione di reflui derivanti dalle diverse tecnologie di estrazione.

Fig. 1 - Scheme of by-products deriving from different extraction systems.

sistema continuo per centrifugazione, e in particolare quella derivante dal decanter a 2 fasi e 2 fasi e 1/2. Per questa ragione, molti frantoi hanno provato a risolvere il problema separando la sansa umida nelle sue due frazioni (nocciolino e fibra), con lo scopo di utilizzare il nocciolino come combustibile (Di Serio *et al.*, 2011). Esistono, inoltre, delle criticità legate alla indisponibilità della sansa per l'intero arco dell'anno ed alle difficoltà di stoccaggio. Considerando che un piccolo impianto per la produzione di energia elettrica ha un limite di convenienza economica stimabile attorno alle 8.000 ore e che, l'esclusivo apporto di sansa, garantisce un funzionamento per non più di 4.000 ore appare evidente la necessità di integrare gli input dell'industria olearia con biomassa vegetale in modo da consentire un continuo funzionamento dell'impianto oltre che una maggiore resa energetica. Accanto alla necessità di immaginare una filiera con un basso impatto ambientale, si affianca l'esigenza di valorizzare i sottoprodotti di lavorazione per rendere l'industria olearia più remunerativa ed autosufficiente da un punto di vista energetico. Per quanto riguarda la produzione di acque di vegetazione (OMW), nel periodo di punta della lavorazione delle olive, che a seconda della zona di produzione varia da novembre a marzo, i frantoi hanno poco spazio per attuare moderni ed efficienti sistemi di smaltimento e riciclaggio, per cui ricorrono, in particolare per i rifiuti liquidi, allo sversamento sul terreno. Ciò determina, soprattutto se avviene in maniera incontrollata e non in ottemperanza delle disposizioni di legge in materia ambientale e di utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e degli scarti dei frantoi oleari (Legge n. 574/96 e D.lgs. 152/2006), la contaminazione dei terreni, delle

falde e delle acque superficiali a causa dell'elevata concentrazione di sostanze organiche che attribuiscono all'acqua di vegetazione un potenziale inquinante pari a 80 volte quello delle acque di scarico comunali. Fino ad oggi non è stata trovata una soluzione completamente soddisfacente dal punto di vista tecnologico, economico ed organizzativo per il loro smaltimento nel rispetto delle tematiche ambientali (Bronze *et al.*, 2008; Landete *et al.*, 2010; Sinigallia *et al.*, 2010; Tziotzios *et al.*, 2007). L'obiettivo che il Progetto OPERO si prefigge è l'utilizzo dei sottoprodotti della filiera olivicola (sansa e acqua di vegetazione) al fine di produrre fonti energetiche rinnovabili (biogas), attraverso l'ottimizzazione della fase di pre-digestione sfruttando processi biotecnologici dove il ruolo principale è svolto dai microrganismi. L'aggiunta di biomasse ad alto contenuto in fenoli semplici e complessi (Torrecilla, 2010), svolge un'elevata azione batteriostatica nei confronti di molte specie batteriche, soprattutto i metanigeni, con conseguente riduzione della produzione di metano. In questo studio, abbiamo valutato la possibilità di utilizzare batteri presenti sul frutto dell'oliva, quali *Lactobacillus plantarum*, per la rimozione dei composti fenolici dalle acque di vegetazione.

## Materiali e metodi

L'acqua di vegetazione (OMW) utilizzata in questo studio è stata ottenuta dalla lavorazione per centrifugazione (decanter a 2 fasi e 1/2) delle olive della cv Leccino miscelate con quelle della cv Carolea raccolte nella campagna 2010, presso il frantoio sperimentale del CRA-OLI di Città Sant'Angelo. Le caratteristiche chimico-fisiche sono riportate nella tabella 1.

Tab. 1 - Caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua di vegetazione.  
Tab. 1 - Chemical-physical characteristics of OMW.

Parametri misurati	Valori
Acidità libera (ac. citrico monoidrato g /100 ml OMW)	1
pH	5
Olio (g/L OMW)	4
Umidità (g di H <sub>2</sub> O/100 ml OMW)	88
Sostanza Secca o Residuo secco (g/L OMW)	115
Sostanza Inerte o Ceneri (g/100 g di sostanza secca)	5
Sostanza Organica (g/100g di sostanza secca)	95
Sostanza Volatile (80% S.O.)	76
C.O.D. (g O <sub>2</sub> /L)	120
B.O.D <sub>5</sub> (g O <sub>2</sub> /L)	65
Zuccheri riducenti (g/100 ml OMW)	2
Polifenoli (ac. caffeico mg/L OMW)	5667



I batteri lattici utilizzati in questa prova (*Lactobacillus plantarum* B28, *L. plantarum* B51 e *L. plantarum* B124), presenti nella Collezione di Microrganismi del CRA-OLI ([www.colmia.it](http://www.colmia.it)). Il gene *bgIH* che codifica per la fosfo- $\beta$ -glucosidasi, recentemente identificato in *Lactobacillus plantarum* (Marasco *et al.*, 1998; GeneBank N° Y15954), è stato utilizzato come marcatore per l'identificazione e la biotipizzazione di tali ceppi in funzione della loro attività oleuropeinolitica (Lanza *et al.*, 2009).

L'attività oleuropeinolitica è stata valutata attraverso l'inoculo di tali ceppi in M.R.S. broth senza glucosio addizionato all'1% di oleuropeina (Extrasynthèse, Genay, Francia) (Ciafardini *et al.*, 1994). L'analisi dei prodotti di degradazione è stata eseguita in HPLC serie 200 UV/Vis (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) seguendo e adattandola al caso specifico la metodica COI/T.20/Doc. n. 29. Novembre 2009 "Determinazione dei biofenoli degli oli di oliva mediante HPLC". Si è scelto di seguire la demolizione di oleuropeina in funzione della formazione di idrossitirosolo.

Dal punto di vista tecnologico, al fine di valutare la risposta alle diverse matrici di partenza, è stata saggiata la tolleranza e la capacità di crescita/fermentazione dei ceppi a diversi pH (pH 2, 4, 6, 8 e 10) e a diverse temperature (4, 15, 30 e 45 °C). La crescita batterica è stata valutata mediante lettura della densità ottica alla lunghezza d'onda di 600 nm (O.D.<sub>600</sub>).

## Risultati e discussione

La crescita dei ceppi B28, B51 e B124 era drasticamente ridotta solo a pH inferiore a 4 e a  $T < 30$  °C. Tutti i ceppi sono risultati potenzialmente oleuropeinolitici perché possiedono il gene che codifica per la  $\beta$ -glucosidasi. B51 è risultato il più attivo dei tre nel breve termine in quanto già dopo 24 ore degrada 82% dell'oleuropeina aggiunta come substrato fermentativo all'MRS broth, a differenza di B28 e B124 (circa 67%) (fig. 2). B51 è anche il ceppo che produce la quantità più importante di idrossitirosolo (fig. 3).

E' stata inoltre condotta una prova di fermentazione utilizzando *L. plantarum* B51 in presenza di OMW come substrato, al fine di valutarne l'effettiva attività oleuropeinolitica. La prova è stata effettuata in fermentatore LiFlus II GX Biotron da 10 l (fig. 4) a 30 °C per due settimane utilizzando come inoculo *L. plantarum* B51 ( $10^8$  UFC/ml). OMW non inoculata è stato utilizzata come test di controllo alle stesse condizioni.

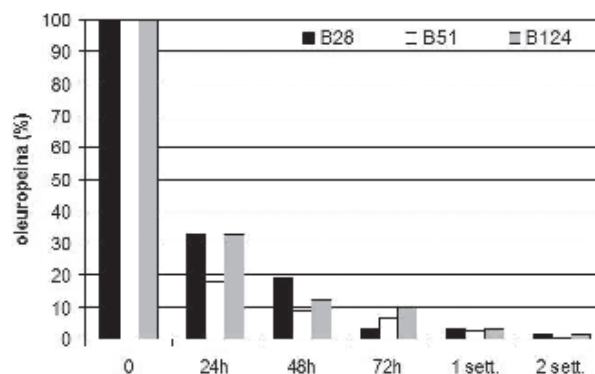


Fig. 2 - Degradazione dell'oleuropeina. I dati sono espressi come valori medi di 3 replicazioni e il coefficiente di variabilità è <5%.  
Fig. 2 - Degradation of oleuropein. Data are expressed as mean of 3 replications. The coefficient of variation is <5%..

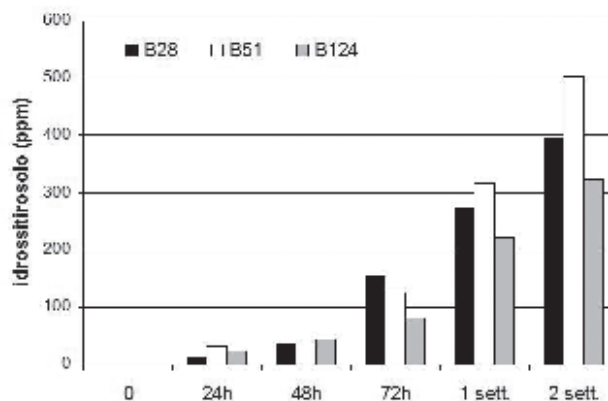


Fig. 3 - Produzione di idrossitirosolo. I dati sono espressi come valori medi di 3 replicazioni e il coefficiente di variabilità è <5%.  
Fig. 3 - Production of hydroxytyrosol. Data are expressed as mean of 3 replications. The coefficient of variation is <5%..

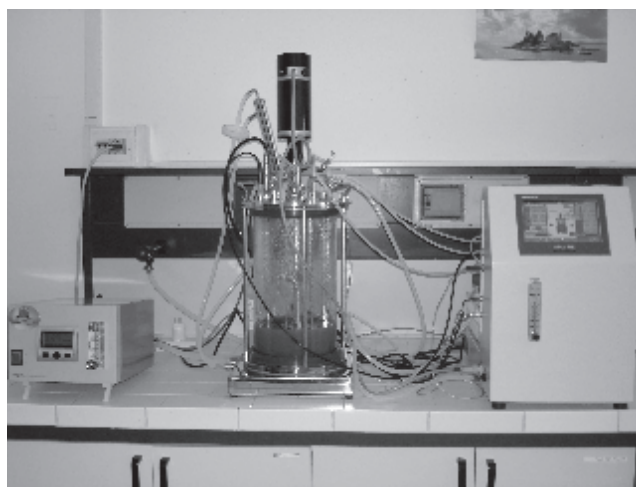


Fig. 4 - Fermentatore.  
Fig. 4 - Fermenter.

## Riassunto

Lo scopo del presente lavoro è l'utilizzo dei sottoprodotti della filiera olivicola (sanse, sanse umide,



acque di vegetazione e acque reflue alcaline derivanti dal processo di deamarizzazione con NaOH di olive da tavola con il Metodo Sivigliano) al fine di produrre fonti energetiche rinnovabili (biogas), attraverso l'ottimizzazione della fase di pre-digestione sfruttando processi biotecnologici dove il ruolo principale è svolto dai microrganismi. L'aggiunta di biomasse ad alto contenuto in fenoli semplici e complessi, svolge un'elevata azione batteriostatica nei confronti di molte specie batteriche, soprattutto i metanigeni, con conseguente riduzione della produzione di metano. L'apporto di biomasse ricche di cellulosa, pectina e lignina non degradate porta invece ad un allungamento dei tempi di processo. Sono stati effettuati saggi biochimico-molecolari per individuare il pool di ceppi da utilizzare nelle prove di fermentazione. In particolare è stata focalizzata l'attenzione su tre ceppi batterici, isolati dalla carposfera del frutto oliva di cv. di diversa origine, presenti nella Collezione di Microrganismi del CRA-OLI (*Lactobacillus plantarum* B28, *L. plantarum* B51 e *L. plantarum* B124). L'attività oleuropeinolitica è stata valutata attraverso l'inoculo di tali ceppi in M.R.S. broth senza glucosio addizionato all'1% di oleuropeina (w/v). L'analisi dei prodotti di degradazione è stata eseguita in HPLC seguendo, e adattandola al caso specifico, la metodica COI/T.20/Doc. n. 29. Nov. 2009 "Determinazione dei biofenoli degli oli di oliva mediante HPLC". Si è scelto di seguire la demolizione di oleuropeina in funzione della formazione di idrossitiroso. E' stata saggiata, inoltre, la tolleranza e la capacità di crescita/fermentazione dei ceppi in ambienti fortemente acidi, neutri fino a fortemente basici che caratterizzano le diverse matrici di partenza e alle diverse temperature che si possono verificare durante lo stoccaggio (T 4-15 °C) oppure all'interno del digestore (T > 40 °C).

**Parole chiave :**  $\beta$ -glucosidasi, *Lactobacillus plantarum*, oleuropeina, acqua di vegetazione, fenoli.

Ricerca finanziata dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali - Progetto OPERO "Ottimizzazione del processo di produzione di energia da reflui dell'industria olearia e della lavorazione delle olive da mensa".

## Bibliografia

- BRONZE M.R., VILAS-BOAS L., CATULO L., PERES C., 2008. *Use of Lactobacillus plantarum in treatments of olive mill wastewater*. Acta Hort. 791: 637- 644
- CIAFARDINI G., MARSILIO V., LANZA B., POZZI N., 1994. *Hydrolysis of oleuropein by Lactobacillus plantarum strains associated with olive fermentation*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 4142-4147
- DI SERIO M.G., LANZA B., IANNUCCI E., RUSSI F., DI GIOVACCHINO L., 2011. *Valorization of wet olive pomace produced by 2 and 3-phases centrifugal decanter*. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse. 88: 111- 117
- LANDETE J.M., RODRIGUEZ H., CURIEL J.A., DE LA RIVAS B., DE FELIPE F.L., MUNOZ R., 2010. *Degradation of phenolic compounds found in olive products by Lactobacillus plantarum strains*. In: Olives and Olive Oil Health and Disease Prevention, Elsevier, pp. 387-396
- LANZA B., ROSSETTI L., ZAGO M., CARMINATI D., RUSSI F., IANNUCCI E., DI SERIO M.G., MUZZALUPO I., GIRAFFA G., 2009. *Selezione di ceppi di Lactobacillus plantarum per la formulazione di starter nella produzione di olive da mensa fermentate*. Atti del: Incontro Ricercatori e Tecnologi del CRA sul "Miglioramento genetico di specie animali e vegetali", Roma, Italy, 15-17 luglio 2009
- MARASCO R., MUSCARIELLO L., VARCAMONTI M., DE FELICE M., SACCO M., 1998. *Expression of the bglH gene of Lactobacillus plantarum is controlled by carbon catabolite repression*. J. Bacteriol. 180: 3400-3404
- SINIGALLIA M., DI BENEDETTO N., BEVILACQUA A., CORBO M.R., CAPECE A., ROMANO P., 2010. *Yeast isolated from olive mill wastewaters from southern Italy: technological characterization and potential use for phenol removal*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87: 2345-2354
- TORRECILLA J.S., 2010. *Phenolic compounds in olive oil mill wastewater*. In: Olives and Olive Oil Health and Disease Prevention, Elsevier, pp.: 357-365
- TZIOTZIOS G., MICHAILAKIS S., VAYENAS D.V., 2007. *Aerobic biological treatment of olive mill wastewater by olive pulp bacteria*. Int. Biodet. Biodegr. 60: 209-214.