

ALLEGATO D

- *Test agronomici sui fertilizzanti*

“Laboratorio di Fisiologia Vegetale e Micropropagazione *in vitro*” SPERIMENTAZIONE FERTILIZZANTI PRODOTTI DALLA LISCIVIAZIONE DEL CARBONE:

AGGIORNAMENTO DEL 16/10/2018

1 – INTRODUZIONE

I risultati ottenuti dal test di tossicità hanno permesso, sulla base del quantitativo di acido umico per pianta e della diluizione per specie, di stimare l'ammendante necessario per la sperimentazione.

In questa seconda fase sono state propagate e utilizzate 5 specie vegetali, ciascuna composta da 2 popolazioni clonali distinte, non appartenenti alla stessa famiglia e scelte sulla base della loro destinazione d'uso. E' stato utilizzato un substrato di base (Sx) come testimone a cui è stato addizionato, grazie al rilevamento nella fase precedente della concentrazione massima tollerabile, il fertilizzante a base di acidi umici e fulvici in 3 diverse concentrazioni.

Di seguito viene riportata la matrice del test sperimentale:

MATRICE TEST SPERIMENTALE					
CULTIVAR	SPECIE	SUBSTRATO			
		Sx (TESTIMONE)	SKU α	SKU β	SKU γ
1	Salix	10	10	10	10
2		10	10	10	10
1	Scrophularia ramosissima L.	10	10	10	10
2		10	10	10	10
1	Bougainvillea	10	10	10	10
2		10	10	10	10
1	Limbaria crithmoides L.	10	10	10	10
2		10	10	10	10
1	Hibiscus rosa-sinensis L.	10	10	10	10
2		10	10	10	10
Piante totali					600

2 – MATERIALI E METODI

La prima parte della sperimentazione si è articolata in tre fasi distinte:

- Propagazione delle popolazioni clonali, tramite tecnica di taleaggio e di micropropagazione;
- Fase di I° trapianto delle talee radicate in vasi 7 x 7 cm;
- Fase di II° trapianto delle plantule in vasi 9 x 9 cm;

Le fasi di propagazione e di I° trapianto sono state condotte in appositi Box, mentre quella di II° trapianto è stata attuata lungo le linee di irrigazione della Serra Sperimentale.

La seconda parte della sperimentazione riguarderà la rilevazione dei dati biometrici, composizione delle Matrici Dati Grezzi (MDG) e l'elaborazione statistica dei valori contenuti nelle MDG.

3 – FASE DI PROPAGAZIONE - RADICAZIONE

La fase della propagazione ha preso avvio dall'individuazione delle Piante Madri ed il loro prelievo in campo. Nella tabella 3.1 viene riportata la numerosità campionaria delle talee ricavate da ogni PM. Assieme al substrato di radicazione, scelto in modo da evitare problemi di eccessiva compattazione e ritenzione idrica, ogni singola plantula è stata posta in Plateaux da 40 alveoli troncoconici.

Descrizione cultivar	Numero plantule
Limbarda crithmoides (L.) Dumort. 1	120
Limbarda crithmoides (L.) Dumort. 2	120
Hibiscus rosa-sinensis L. 1	200
Hibiscus rosa-sinensis L. 2	160
Salix 1	160
Salix 2	160
Scrophularia ramosissima 1	400
Scrophularia ramosissima 2	440
Bougainvillea spectabilis Willd. 1	280
Bougainvillea spectabilis Willd. 2	245

Tabella 3.1 – Scheda propagazione



4 – FASE POST RADICAZIONE – I TRAPIANTO

Alla fase di propagazione, della durata di un mese e mezzo e necessaria per attivare il processo di radicazione, segue quella di I trapianto.

Le talee radicate sono state ripicchettate, assieme al substrato più idoneo per questo stadio, in vasetti della capacità di circa 350 cc. Questa fase, anch'essa della durata di un mese e mezzo, serve per favorire il processo di riequilibrio tra apparato radicale e quello tronco-fogliare.

In questo periodo, alcune talee radicate non sono sopravvissute e in altre, come ad esempio per la *Scrophularia ramosissima* L., non si è attivato il processo di radicazione. Dalla Tabella 4.1 si evincono le perdite di carico registrate.

Descrizione cultivar	Numero plantule decedute durante la fase di propagazione	Numero plantule trapiantate
Limbaria crithmoides (L.) Dumort. 1	60	60
Limbaria crithmoides (L.) Dumort. 2	45	75
Hibiscus rosa-sinensis L. 1	64	136
Hibiscus rosa-sinensis L. 2	45	115
Salix 1	108	52
Salix 2	48	112
Scrophularia ramosissima 1	400	0
Scrophularia ramosissima 2	440	0
Bougainvillea spectabilis Willd. 1	226	54
Bougainvillea spectabilis Willd. 2	198	47

Tabella 4.1 – Scheda I trapiant



5 – II TRAPIANTO

Una volta completato il ciclo di crescita, le plantule, ormai divenute piante, sono state messe a dimora con relativi substrati in vasetti della capacità di circa 1000 cc. Ciascun vaso è stato codificato e, a seguito delle fallanze registrate, è stata ridisegnata la matrice sperimentale (tabella 5.1).

MATRICE TEST SPERIMENTALE					
SPECIE	CULTIVAR	SUBSTRATO			
		Sx (TESTIMONE)	SXUF10	SXUF20	SXUF30
Salix	1	10	10	10	10
	2	10	10	10	10
Bougainvillea	1	10	10	10	10
	2	10	10	10	10
Limbaria crithmoides L.	1	10	10	10	10
	2	10	10	10	10
Hibiscus rosa-sinensis L.	1	10	10	10	10
	2	10	10	10	10
Piante totali					520

Tabella 5.1 – Matrice Disegno Sperimentale

Il periodo di crescita seguita al secondo trapianto ha coinciso con l'avvio della fase di rilevazione periodica, ogni sette giorni, della variabile ALTEZZA ISTANTANEA, scelta per valutare le capacità nutrizionali dei fertilizzanti prodotti dalla lisciviazione del carbone.

I diversi tentativi fatti sulla *Scrophularia ramosissima* L., per avere una numerosità necessaria e sufficiente per il test, hanno comportato uno slittamento del cronoprogramma di circa due mesi. La consegna del report finale, che comprenderà la raccolta dei dati di crescita e le elaborazioni statistiche, avverrà entro la seconda settimana di Dicembre.

ECOSERDIANA S.p.A.
AMMINISTRATORE UNICO
(Ing. Biagio Caschiti)

[Handwritten signature]

Cronoprogramma Sperimentazione Carbosulcis

POSIZIONE	DESCRIZIONE ATTIVITA'	2018											
		GEN	FEB	MAR	APR	MAG	GIU	LUG	AGO	SET	OTT	NOV	DIC
1.1*	TEST DI TOSSEGITA'	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1.2*	Preparazione substrato madre Preparazione substrato Se e diluente												
1.3*	Miscelazione fertilizzante nel substrato fino a completo assorbimento												
1.4*	Stabilizzazione substrato												
1.5*	Messa a dimora piantule												
1.6*	Misurazione altezza iniziale												
1.7*	Sviluppo piantule e misurazioni biometriche												
1.8*	REPORT Sperimentazione (Report finale test tossicità)												
2.1*	PROPAGAZIONE SPECIE VEGETALI PER Sperimentazione												
	Definizione cloni e ricerca bibliografica												
	Campagna prelievi piante madri												
	Selezione frammenti piante madri												
	Preparazione substrato e messa a dimora piantule												
2.2*	Prima radiazione												
	Preparazione substrato per l'impianto												
	Impianto piantule												
	Sviluppo componente radicale e acquilino (campo - tecnica radice)												
	Preparazione substrati Se, S0.0a, S0.0p e S0.0y per il trapianto e primo test di crescita												
2.3*	Il trapianto piantule												
	Misurazione altezza iniziale												
	REPORT Sperimentazione (allarme piante in fase di radiazione e post primo trapianto)												
	Sviluppo piantule e misurazioni biometriche												
	Elaborazione dati statistici/modelli di crescita												
2.4*	REPORT FINALE												

nuovo taleggio Scrophularia ramosissima

L.

[Signature]

"Laboratorio di Fisiologia Vegetale e Micropropagazione *in vitro*"

TEST DI TOSSICITA' CARBOSULCIS: RELAZIONE FINALE

1 - INTRODUZIONE

Gli acidi umici e gli acidi fulvici sono essenziali per la corretta crescita di piante sane e forti. Sono sostanze che contribuiscono ad aumentare l'assorbimento di sostanze nutritive da parte delle piante e possono agire sul terreno rendendolo più efficiente dal punto di vista dei processi concimanti. Aiutano lo sviluppo di radici più sane, contribuiscono ad aumentare le rese e migliorano la crescita delle piante.

L'acido umico è una sostanza naturale di color marrone o nero solubile nell'acqua a livelli di pH più alcalini. Si forma a seguito della decomposizione organica del suolo, come humus o torba, ed è prodotto da microrganismi capaci di degradare la materia organica morta. Con acido fulvico si indica un materiale umico con colorazioni che possono variare da giallo a giallo-marrone, ma è solubile a tutti i livelli di pH. Per la scienza è il risultato della deframmentazione di piccoli frammenti di DNA prodotto dalla morte di organismi vivi, il che significa che si interpone tra il mondo organico e quello minerale.

Gli acidi umici e fulvici possono chelare i metalli, rendendoli molto più disponibili e facili da assorbire dalle piante. Un effetto secondario di questa proprietà chelante è che le sostanze tossiche e nocive presenti nel substrato diventano meglio tollerate. L'aggiunta di acido umico e fulvico aumenta la ritenzione idrica e la capacità di filtrazione del substrato, migliorando la tolleranza alla siccità e alla carenza d'acqua delle piante. Il risultato sono piante meno stressate e tassi di germinazione più elevati. Inoltre, gli stessi effetti benefici si possono osservare anche a livello radicale, sul metabolismo delle piante e sulla divisione cellulare.

2 - SCOPO DEL TEST

Il test di tossicità ha le seguenti finalità:

- individuare il limite di tollerabilità per le singole specie;
- individuare il range di concentrazione che offre i migliori benefici in termini di crescita;
- stabilire il quantitativo di ammendante necessario per svolgere la successiva fase di sperimentazione (vd. tabella 5.2);



ECOSERDIANA S.p.A.

Capitale Sociale € 517.000,00 - P. IVA 01643170929 - Iscr. CCIAA Cagliari REA n. 135234

3 - TEST DI TOSSICITA'

Il test è stato condotto a partire dal 10/12/2017 per valutare l'influenza degli acidi umici e fulvici, forniti dalla Carbosulcis Spa e addizionati ad un substrato Sx di formulazione nota di nostra produzione, sulla crescita di 30 piante appartenenti a 5 specie diverse.

Le specie selezionate e sotto elencate, propagate e coltivate negli impianti di proprietà della Nuova Cem.Ar. Granulati Srl, fanno parte dell'areale Mediterraneo e sono comunemente presenti in Sardegna;

- *Salix taxifolia* L.
- *Bougainvillea spectabilis* L.
- *Scrophularia ramnosissima* K. Koch
- *Limbarda crithmoides* (L.) Dumort
- *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Le specifiche sulla conduzione del test sono contenute nell'*Allegato A*.

4 - RISULTATI: MISURAZIONI E CURVE DI CRESCITA

Allo stato attuale, dopo circa 4 mesi e 6 misurazioni riguardanti lo sviluppo in altezza delle piante (*Allegato B*), possiamo affermare che le specie erbacee *Scrophularia ramnosissima* e *Limbarda crithmoides* sono quelle che riescono a trarre migliore beneficio dall'aggiunta degli acidi anche ad alte concentrazioni. Lo sviluppo medio in altezza risulta incrementato del 10% e formazione di nuovi germogli.

La *Bougainvillea* è risultata molto sensibile in quanto incrementa la sua crescita solo con alte diluizioni di miscela ammendante (Dil. 6) mentre per tutte le altre diluizioni prevale un effetto tossico che porta alla morte della pianta. In ogni caso la crescita in altezza si attesta a un valore $\leq 10\%$.

Per quanto riguarda il *Salix*, specie legnosa rinomata per il suo profondo apparato radicale e le proprietà fitodepuratrici, non ha mostrato un chiaro aumento in altezza ma riesce a tollerare anche la miscela di ammendante più concentrata senza mostrare evidenti segni di stress.

Per quanto riguarda l'*Hibiscus*, quinta specie presa in considerazione, i cloni ottenuti dal taleaggio non hanno sviluppato un apparato radicale maturo tale da permetterci di fornire risultati attendibili. Aln ogni caso, da un controllo puramente visivo, sembrerebbe che anche questa specie segua l'andamento della *Bougainvillea*, mostrando dei benefici solo per un ristretto range di ammendante ad alte diluizioni.

Le misurazioni sono state utilizzate per elaborare delle curve di crescita (*Allegato C*) che riflettono l'andamento del parametro altezza nel tempo delle specie, in funzione delle concentrazioni di ammendante a base di acidi umici e fulvici addizionato al substrato di partenza.



5 - CONCLUSIONI

In base ai dati ottenuti si evince che il range di concentrazione di ammendante, tale da evitare fallanze e allo stesso tempo tale da promuovere la crescita, è variabile in funzione della specie.

Per le specie *Scrophularia ramnosissima* e *Limbarda crithmoides* l'intervallo di diluizioni utili è più ampio (la tolleranza è compresa tra la diluizione 2 e la diluizione 5). Per le restanti tre specie la diluizione più utile ai fini del test sperimentale che si andrà ad eseguire risulta essere la 5.

Sulla base del quantitativo di acido umico per pianta e della diluizione per specie (vd. tabella 5.1), considerando eventuali errori e fallanze (50%), l'ammendante necessario per la successiva fase di sperimentazione (vd. tabella 5.2) è stimato in 4.400 grammi.

HAs per Dil1 [g]	HAs per Dil2 [g]	HAs per Dil3 [g]	HAs per Dil4 [g]	HAs per Dil5 [g]	HAs per Dil6 [g]
12,5	10,0	7,5	5,0	2,5	0,625

Tabella 5.1

MATRICE TEST SPERIMENTALE					
CULTIVAR	SPECIE	SUBSTRATO			
		S ₀ (TESTIMONE)	SXU _α	SXU _β	SXU _γ
1	Salix	10	10	10	10
2		10	10	10	10
1	Scrophularia ramnosissima L.	10	10	10	10
2		10	10	10	10
1	Rougarvillea	10	10	10	10
2		10	10	10	10
1	Limbarda crithmoides L.	10	10	10	10
2		10	10	10	10
1	Hibiscus rosa-sinensis L.	10	10	10	10
2		10	10	10	10

Piante totali

400

Tabella 5.2

CA 30/03/2018





FASE 1 - TEST DI TOSSICITA'



- 1.1* Stabilire il livello massimo di concentrazione di acido umico (HaS) idoneo nel promuovere la crescita del materiale vegetale
- 1.2* Verranno utilizzate 6 plantule per specie, precedentemente propagate in azienda, ciascuna con diversa diluizione di HaS addizionato al substrato di base (%)
- | Diluizioni | Dil1 (%) | Dil2 | Dil3 | Dil4 | Dil5 | Dil6 |
|-----------------------------|----------|------|------|------|------|------|
| Specie ↓ | 0% | 20% | 40% | 60% | 80% | 95% |
| Sofia | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Scrophularia ramosissima L. | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Olauganvillea | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Limbaria crithmoides L. | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Mibiscus rosa-sinensis L. | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
- (*) Soluzione madre 0,25 g/ml
- 1.3* L'addizione di HaS nelle diverse diluizioni avverrà sul substrato secco sino a completo assorbimento
- 1.4* Prima della messa a dimora delle plantule il substrato verrà tenuto in serra per la sua stabilizzazione a temperatura controllata
- 1.5* Messa a dimora delle plantule già radicate e misurazione altezza iniziale
- 1.6* Controlli settimanali della crescita delle plantule
- 1.7* Il risultato del test di tossicità, stimato in 2/3 mesi, verrà giustificato con un report finale

Cronoprogramma Sperimentazione Carbosulcis		2023				2024				2025				2026			
POSSIBILI	DESCRIZIONE ATTIVITA'	GEN	FEB	MAR	APR	MAG	GIU	LUG	AUG	SET	OCT	NOV	DIC	GEN	FEB	MAR	APR
1.1*	TEST DI TOSSICITA'																
1.2*	Preparazione soluzioni madre																
1.2*	Preparazione soluzioni di diluizioni																
1.3*	Miscelazione e fertilizzamento del substrato fino a completo assorbimento																
1.4*	Stabilizzazione substrato																
1.5*	Messa a dimora plantule																
1.5*	Misurazione altezza iniziale																
1.6*	Sviluppo plantule e misurazioni biometriche																
1.7*	REPORT Sperimentazione (Report finale, semi-estivi)																

Handwritten signature or mark.

PRIMA MISURAZIONE						11/12/2017	
Specie	Dil1 [cm]	Dil2 [cm]	Dil3 [cm]	Dil4 [cm]	Dil5 [cm]	Dil6 [cm]	
Salix	6,5	5,5	10,2	7,5	6,5	7,5	
Bouganvillea	10,5	6,0	11,0	9,0	9,0	10,5	
Scrophularia	3,0	3,0	4,6	4,0	4,2	2,5	
Limbaria	3,0	3,0	6,0	3,1	3,0	3,0	
Hibiscus	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

SECONDA MISURAZIONE						20/12/2017	
Specie	Dil1 [cm]	Dil2 [cm]	Dil3 [cm]	Dil4 [cm]	Dil5 [cm]	Dil6 [cm]	
Salix	6,8	5,5	10,7	7,7	7,0	7,5	
Bouganvillea	11,6	6,5	11,2	10,0	9,0	13,5	
Scrophularia	4,2	4,0	4,9	4,5	4,5	3,3	
Limbaria	3,2	3,9	6,0	3,2	3,6	3,2	
Hibiscus	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

TERZA MISURAZIONE						10/01/2018	
Specie	Dil1 [cm]	Dil2 [cm]	Dil3 [cm]	Dil4 [cm]	Dil5 [cm]	Dil6 [cm]	
Salix	6,8	5,6	10,7	D	7,0	D	
Bouganvillea	D	6,5	11,5	10,0	9,0	14,5	
Scrophularia	4,2	4,0	4,9	4,5	4,5	3,3	
Limbaria	3,5	4,3	6,0	3,3	4,0	3,6	
Hibiscus	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

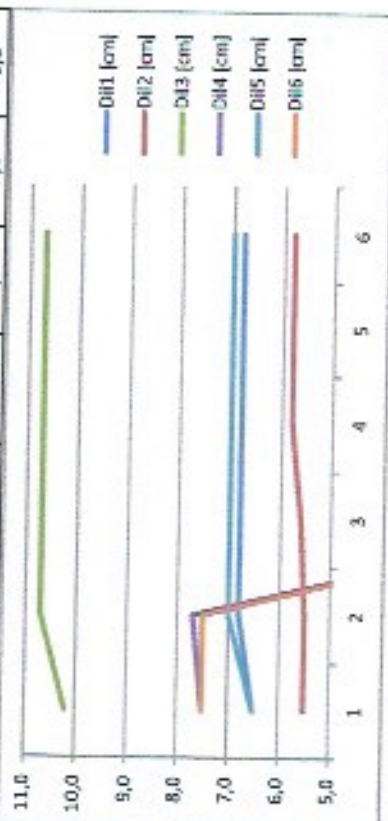
QUARTA MISURAZIONE						22/01/2018	
Specie	Dil1 [cm]	Dil2 [cm]	Dil3 [cm]	Dil4 [cm]	Dil5 [cm]	Dil6 [cm]	
Salix	6,8	5,8	10,7	D	7,0	D	
Bouganvillea	D	6,5	11,7	10,2	9,2	15,5	
Scrophularia	4,4	4,5	5,0	4,5	4,7	3,5	
Limbaria	3,7	5,0	6,0	3,6	4,8	4,8	
Hibiscus	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

QUINTA MISURAZIONE						12/02/2018	
Specie	Dil1 [cm]	Dil2 [cm]	Dil3 [cm]	Dil4 [cm]	Dil5 [cm]	Dil6 [cm]	
Salix	6,8	5,8	10,7	D	7,0	D	
Bouganvillea	D	6,5	11,7	10,3	9,2	16,4	
Scrophularia	4,6	4,9	5,1	4,7	4,9	3,5	
Limbaria	3,8	5,3	6,0	3,8	5,2	5,2	
Hibiscus	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

SESTA MISURAZIONE						26/02/2018	
Specie	Dil1 [cm]	Dil2 [cm]	Dil3 [cm]	Dil4 [cm]	Dil5 [cm]	Dil6 [cm]	
Salix	6,8	5,8	10,7	D	7,0	D	
Bouganvillea	D	6,5	11,9	10,3	9,2	16,5	
Scrophularia	4,7	5,0	5,5	4,9	5,0	3,9	
Limbaria	4,0	5,5	6,0	4,0	5,3	5,5	
Hibiscus	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

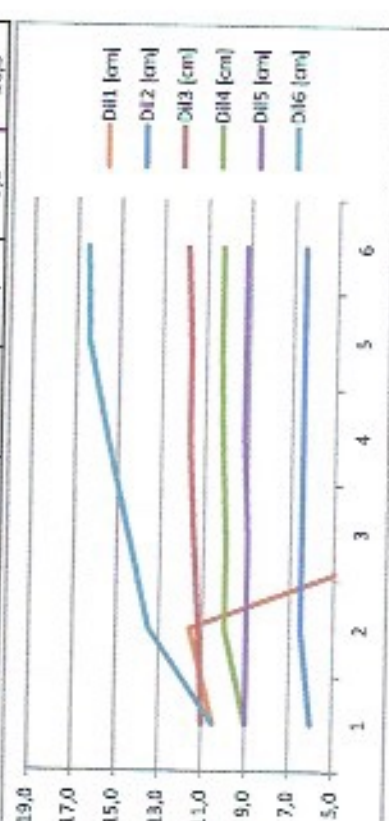
Salix

Misurazione	Dil1 [cm]	Dil2 [cm]	Dil3 [cm]	Dil4 [cm]	Dil5 [cm]	Dil6 [cm]
1	6,5	5,5	10,2	7,5	6,5	7,5
2	6,8	5,5	10,7	7,7	7,0	7,5
3	6,8	5,6	10,7	0,0	7,0	0,0
4	6,8	5,8	10,7	0,0	7,0	0,0
5	6,8	5,8	10,7	0,0	7,0	0,0
6	6,8	5,8	10,7	0,0	7,0	0,0



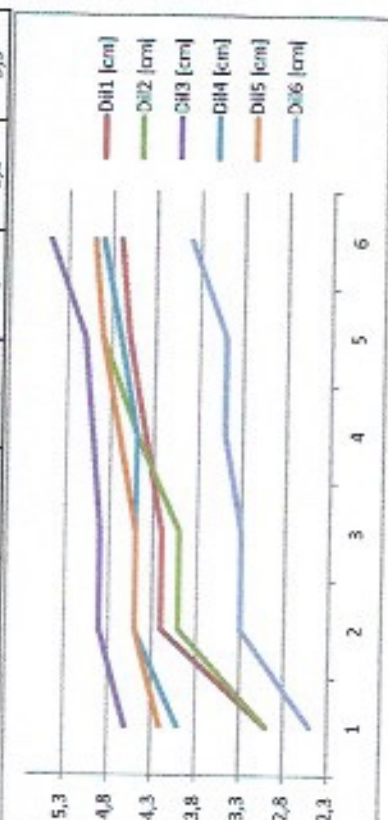
Bougainvillea

Misurazione	Dil1 [cm]	Dil2 [cm]	Dil3 [cm]	Dil4 [cm]	Dil5 [cm]	Dil6 [cm]
1	10,5	6,0	11,0	9,0	9,0	10,5
2	11,6	6,5	11,2	10,0	9,0	13,5
3	0,0	6,5	11,5	10,0	9,0	14,5
4	0,0	6,5	11,7	10,2	9,2	15,5
5	0,0	6,5	11,7	10,3	9,2	16,4
6	0,0	6,5	11,9	10,3	9,2	16,5



Scrophularia

Misurazione	Dil1 [cm]	Dil2 [cm]	Dil3 [cm]	Dil4 [cm]	Dil5 [cm]	Dil6 [cm]
1	3,0	3,0	4,6	4,0	4,2	2,5
2	4,2	4,0	4,9	4,5	4,5	3,3
3	4,2	4,0	4,9	4,5	4,5	3,3
4	4,4	4,5	5,0	4,5	4,7	3,5
5	4,6	4,9	5,1	4,7	4,9	3,5
6	4,7	5,0	5,5	4,9	5,0	3,9



Limbaria

Misurazione	Dil1 [cm]	Dil2 [cm]	Dil3 [cm]	Dil4 [cm]	Dil5 [cm]	Dil6 [cm]
1	3,0	3,0	6,0	3,1	3,0	3,0
2	3,2	3,9	6,0	3,2	3,6	3,2
3	3,5	4,3	6,0	3,3	4,0	3,6
4	3,7	5,0	6,0	3,6	4,8	4,8
5	3,8	5,3	6,0	3,8	5,2	5,2
6	4,0	5,5	6,0	4,0	5,3	5,5

