EXCALIBUR

SVELARE I SEGRETI DELLA NATURA:
I microrganismi benefici possono trasformare la produzione vegetale

Il progetto è finanziato dal Programma quadro dell'Unione europea per la ricercar e l'innovazione Horizon 2020, convenzione N. 817946.

Contenuti

Introduzione 4
Capitolo 1. Funghi micorrizici per migliorare l'efficienza di assorbimento e la crescita delle colture orticole. 6
1. Tipi di funghi micorrizici e la loro capacità di colonizzare le piante 6
2. Effetto delle AMF su crescita, resa e tolleranza agli stress delle piante 10
3. 1. Formulazioni e linee guida per l'applicazione a diversi sistemi colturali orticoli 13
4. Gestione delle colture per sfruttare meglio l'attività degli AMF proponendo pratiche di gestione che aumentano l'efficienza degli AMF nella coltivazione e nella resa delle colture 14
Capitolo 2. Prodotti microbici per la protezionedelle colture orticole 18
1. Uso dei microrganismi per la lotta biologica 18
2. Lotta biologica a parassiti e patogeni presenti nel suolo: fattori da considerare per ottenere un'elevata efficacia 20
3. Lotta ai fitofagi e patogeni che colpiscono le parti aeree: aspetti pratici 24
4. Capacità multifunzionale dei microrganismi: un'opportunità per la gestione integrata dei parassiti.... 29
Capitolo 3. Microrganismi per la promozione della crescita delle piante 34
1. Microrganismi in grado di promuovere la crescita delle piante 34
1.1. Modalità d'azione: come i microrganismi promuovono la crescita delle piante? 35
1.2. Ceppi commerciali di PGPM: tradurre la ricerca in applicazione 37
2. Sfruttare i pre, pro e postbiotici per la promozione della crescita delle piante e il miglioramento della fertilità e della salute del suolo 39
2.1. Come selezionare un prebiotico, un probiotico o un postbiotico benefico per le piante? 40
3. Aspetti pratici per la corretta applicazione dei microrganismi promotori della crescita delle piante.... 41
Capitolo 4. Tecnologia di produzione di prodotti microbiologici 47
1. Tipi di formulazione (in un contesto pratico - per cosa, quali usiamo e perché) 47
2. Tecnologia di produzione di prodotti microbici 48
2.1. Introduzione 48
2.2. Selezione e isolamento di microrganismi 49
2.3. Banking 51
2.4. Inoculo 52
2.5. Media 53
2.6. Componenti chiave della linea di produzione 54
2.7. Tecnologia di produzione dei biopreparati 55

2.8. Monitoraggio e controllo delle variabili che influenzano la crescita microbica e il controllo di qualità 57
2.9. Considerazioni igieniche per l'intera linea 59
3. Efficacia biologica e commercializzazione 59
3.1. Verifica dell'efficacia biologica in condizioni di laboratorio 59
3.2. Verifica dell'efficacia biologica in condizioni controllate 61
3.3. Verifica dell'efficacia biologica in condizioni di campo 61
3.4. Solubilità, miscibilità e stabilità delle biopreparazioni 62

Introduzione

I microrganismi e le loro comunità svolgono un importante ruolo nella diversificazione e nel funzionamento di tutti gli organismi viventi. L'interazione tra piante e microrganismi è nota per influenzare la capacità delle piante di affrontare stress abiotici e biotici, con importanti implicazioni per la produzione vegetale. Negli ultimi 20-30 anni, numerosi microrganismi sono stati isolati, caratterizzati e valutati come biofertilizzanti e agenti di biocontrollo. I risultati hanno confermato l'effetto benefico dei microrganismi selezionati sia sulla crescita che sulla salute delle piante, con un impatto positivo anche sulle proprietà del suolo.

L'applicazione di microrganismi benefici nella produzione delle colture agrarie sta diventando una pratica comune, poiché i prodotti a base microbica sono riconosciuti come potenziali alternative o complementi ai fertilizzanti e ai pesticidi sintetici, specialmente in un'agricoltura moderna e sostenibile, per mitigare gli effetti sull'ambiente ed il cambiamento climatico. A livello europeo, i prodotti a base microbica sono regolamentati dal Regolamento UE 2019/1009 sui prodotti fertilizzanti e dal Regolamento UE 1107/2009 sulla commercializzazione dei prodotti fitosanitari.

I prodotti a base di microrganismi utilizzati per la nutrizione delle piante, denominati "biostimolanti microbici" dalla legislazione europea, sono un mezzo efficace per promuovere la crescita e la produzione delle piante in un contesto di ridotto uso di fertilizzanti minerali o sintetici. I biostimolanti microbici stimolano i processi di nutrizione delle piante indipendentemente dal contenuto di nutrienti del prodotto, e permettono di migliorare una o più delle seguenti caratteristiche della pianta o della rizosfera: efficienza di utilizzo dei nutrienti, tolleranza agli stress abiotici, caratteristiche qualitative del prodotto della coltura, disponibilità di nutrienti nutritizi presenti nel suolo o nella rizosfera. Tra i biostimolanti microbici, quattro gruppi di microrganismi sono attualmente annoverati tra i prodotti fertilizzanti: tre gruppi riguardano i batteri azotofissatori (*Azotobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Azospirillum* spp.) ed uno relativo ai funghi micorrizici, che promuovono principalmente la nutrizione di fosfati, ma possono anche contribuire a migliorare la nutrizione di azoto e microelementi.

D'altra parte, i prodotti fitosanitari a base di microrganismi sono considerati alla stessa stregua di quelli di sintesi e, per essere registrati, devono permettere di controllare efficacemente il parassita bersaglio. Per il controllo degli insetti, i funghi entomopatogeni sono il gruppo di microrganismi che ha fornito le soluzioni più utili. Le principali specie utilizzate a questo scopo includono *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea*. Nel caso dei biofungicidi, sono disponibili formulazioni microbiche per usi sia in pre-raccolta che in post-raccolta. Tuttavia, una moltitudine di specie e ceppi che hanno evidenziato attività di biocontrollo non sono state ancora utilizzate per nouve formulazioni, per cui sono disponibili per gli agricoltori solo un numero limitato di microrganismi registrati come sostanze attive.

Anche se finora i prodotti a base microbica sono stati applicati con successo in agricoltura, gli agricoltori sono ancora riluttanti ad applicarli su larga scala. Ciò è dovuto alle limitate conoscenze sull'impatto che i metodi di applicazione e le pratiche di gestione delle colture possono avere sull'efficacia dei prodotti microbici. Le conoscenze per l'applicazione in campo sono limitate sia in termini di requisiti di dosaggio e modalità di applicazione che relativamente alle interazioni specifiche che intercorrono tra il bioinoculante ed il biota nativo del suolo. Inoltre, una recente analisi dei prodotti presenti sul mercato a livello globale ha sottolineato la necessità di uno sviluppo integrato dei prodotti a base microbica, che consideri i loro processi di produzione e formulazione, in particolare per l'eventuale uso di additivi che possono aumentare la durata di

conservazione o l'efficacia dei prodotti. Da questo punto di vista, la formulazione del biostimolante microbico è un fattore chiave per garantire l'efficacia del trattamento della coltura. Infatti, nonostante la formulazione di prodotti basati su un singolo ceppo o specie semplifichi il processo di produzione e registrazione per la commercializzazione, diversi studi indicano l'utilità di applicare consorzi di microrganismi composti da specie in grado di "collaborare" tra loro e possibilmente anche con il microbioma del suolo. A questo proposito, i consorzi di funghi micorrizici e batteri si sono dimostrati particolarmente efficaci in diverse colture, consentendo di ridurre l'applicazione di fertilizzanti minerali fino al 50% della dose.

Oltre alla ricerca della migliore formulazione da parte dell'industria, un contributo fondamentale al successo del trattamento con un biostimolante microbico o con un biopesticida può essere fornito dagli stessi agricoltori, attraverso l'adozione di pratiche agronomiche che non influiscano negativamente sull'azione del prodotto stesso. Infatti, la persistenza o l'efficacia dei biostimolanti e dei pesticidi microbici è generalmente influenzata dalle pratiche di gestione agricola: pratiche come la lavorazione del terreno, la gestione dei parassiti con altri mezzi, la concimazione minerale e organica o il regime idrico possono modificare pesantemente l'efficacia di un prodotto microbico. Nel caso della gestione della fertilizzazione, considerando che in generale il 60-90% dei fertilizzanti minerali applicati viene dilavato e che solo il 30-50% dei fertilizzanti azotati e il 10-45% dei fertilizzanti fosfatici applicati vengono assorbiti dalle colture, l'applicazione di biostimolanti microbici può favorire un sistema di gestione integrata della fertilizzazione, sostenendo la produttività agricola con un basso impatto ambientale. Nel caso dei pesticidi microbici, anche la dose e le condizioni ambientali al momento dell'applicazione del prodotto sono fattori importanti che ne influenzano l'efficacia.

Tutti gli aspetti sopra menzionati sono spiegati in dettaglio, ma con un approccio pratico e facilmente comprensibile, nei capitoli di questo libro. Il libro è stato concepito come uno sforzo per favorire il trasferimento delle conoscenze acquisite principalmente nell'ambito del progetto EXCALIBUR, finanziato dall'UE nell'ambito del programma di ricerca Horizon 2020, ma anche di altri progetti su questo tema. La speranza degli autori è che questo sforzo favorisca la riduzione dell'uso di input chimici attraverso un'applicazione ragionata di prodotti a base microbica tra gli agricoltori, per evitare l'occorrenza di un impatto negativo sulla produttività delle colture. Un uso così ponderato avrebbe anche un impatto positivo sull'ambiente, sulla salute degli animali e dell'uomo, che è stato dimostrato essere tutti collegati.

Prof. Dr hab. Eligio Malusà e Dott. Krzysztof Ambroziak

Capitolo 1. Funghi micorrizici per migliorare l'efficienza di assorbimento e la crescita delle colture orticole

Lidia Sas-Paszt[1], Sławomir Głuszek[1], Beata Sumorok[1], Edyta Derkowska[1], Anna Lisek[1], Louisa Robinson Boyer[2], Maria Grazia Tommasini[3]

[1]Institut national de recherche horticole, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, POLONIA
[2]NIAB, East Malling, West Malling, Kent, ME19 6BD, REGNO UNITO
[3]RI.NOVA, via dell'Arrigoni 120, 47522 Cesena - FC, ITALIA

Questo capitolo si propone di fornire una panoramica approfondita sui funghi micorrizici, al fine di promuoverne una maggiore comprensione e di evidenziare il loro potenziale nell'ottimizzazione dei sistemi di produzione ortofrutticola. Verranno analizzati i contesti e le modalità più efficaci per il loro impiego, insieme a una riflessione sulle condizioni e sulle pratiche agronomiche che possono influenzarne o limitarne i benefici.

1. Tipi di funghi micorrizici e la loro capacità di colonizzare le piante

Esistono quattro principali tipologie di funghi micorrizici: le ectomicorrize, le micorrize arbuscolari, le micorrize ericoidi e le micorrize orchidee (le ultime 3 includibili nelle endomicorrize). Le ectomicorrize sono associate a numerose specie arboree, formano strutture che avvolgono gli apici radicali e sono spesso specifiche per determinati ospiti. A differenza delle ectomicorrize, le endomicorrize penetrano all'interno delle cellule delle radici delle piante ospiti, stabilendo una simbiosi diretta con le cellule parenchimatiche del cilindro corticale.

Le micorrize ericoidi sono associate solo alla famiglia delle Ericacee, come il mirtillo e il mirtillo rosso, mentre le micorrize orchidee sono associate alle orchidee.

In questo capitolo ci concentreremo sui funghi micorrizici arbuscolari (AMF). Questi finghi sono ubiquitari e si trovano in ogni angolo del pianeta e in tutti gli ambienti terrestri.

I funghi micorrizici arbuscolari sono rappresentati da circa duecentocinquanta specie della divisione Glomeromycota, suddivisa in quattro ordini (Archaeosporales, Diversisporales, Glomerales e Paraglomerales), che comprendono un totale di 11 famiglie. Le AMF sono considerate uno dei principali fattori responsabili che hanno permesso alle piante terrestri di colonizzare la Terra, con una documentazione fossile che risale a 450 milioni di anni fa. Questi funghi entrano in simbiosi con quasi l'80% delle specie di piante terrestri, incluse molte delle colture alimentari globali, ad eccezione delle Brassicacee.

I funghi micorrizici sono considerati organismi asessuati e si riproducono formando spore di grandi dimensioni all'estremità di ife, le quali si diffondono nel terreno. In presenza di una pianta viva, le spore germinano e il micelio colonizza le radici delle piante, trasferendo acqua e nutrienti alla pianta ospite in cambio di carbonio. Poiché sia il fingo che la pianta traggono vantaggio da questa relazione, si tratta di una simbiosi mutualistica (Smith e Read 2008).

Quando le ife di AMF entrano in contatto con la radice di una pianta, formano appressori sulla sua superficie, dove i funghi rilasciano segnali chimici alla pianta per consentire loro di penetrare nel rizoderma, ossia la parete esterna della radice. Una volta all'interno della radice, il micelio forma solitamente delle spire

intracellulari e si diffonde crescendo all'interno del cilindro corticale dove, all'interno delle cellule parenchimatiche della radice, le ife miceliari danno origine a strutture chiamate arbuscoli (Fig. 1.1). È attraverso questi arbuscoli, da cui deriva il nome di questo tipo di micorriza, che avviene il trasferimento di acqua e nutrienti tra la pianta e il fungo. In alcune specie, le ife possono anche formare nelle radici vescicole che svolgono funzioni di riserva, in quanto le sostanze organiche in esse contenute vengono utilizzate dai funghi durante periodi di bassa attività metabolica dell'ospite.

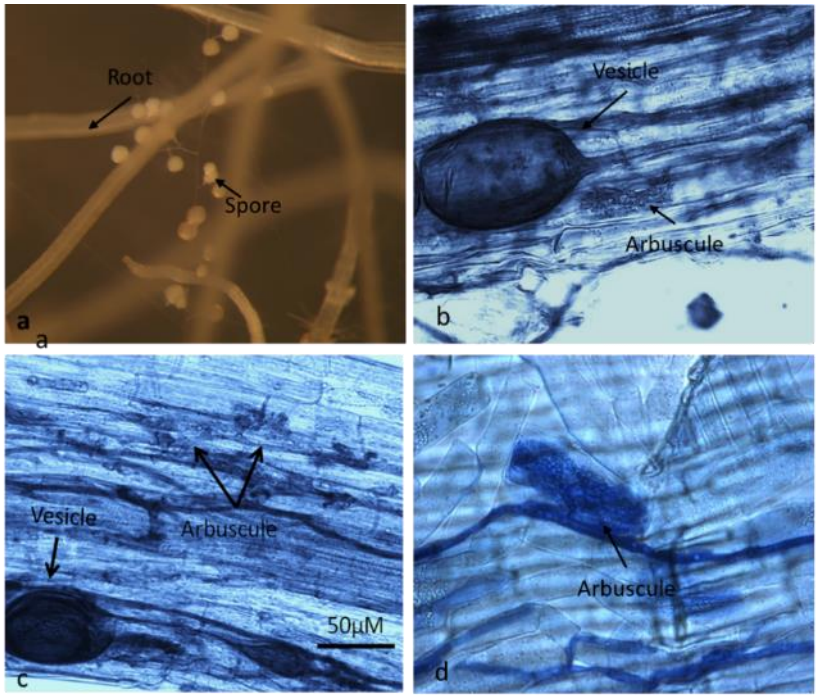

Fig. 1.1. Foto di AMF. Coltura di organi radicali che mostra ife e spore nelle radici, radici di fragola colorate con blu di tripano dove si vedono cellule radicali, ife, vescicole e arbuscoli.
Autore: Louisa Robinson Boyer

A causa della necessità di ridurre gli input chimici in agricoltura, dovuta sia alle restrizioni sul loro uso che all'aumento dei costi, gli agricoltori sono sempre più orientati a cercare soluzioni alternative sostenibili per mantenere le rese delle colture. Le AMF (micorrize arbuscolari) offrono un grande potenziale come soluzione per molte specie di piante coltivate di rilevante importanza in agricoltura. Tra queste ci sono numerose specie di alberi da frutto, vite, piccoli frutti, fragole, colture orticole, insalate e piante ornamentali. Negli ultimi anni è cresciuto notevolmente l'interesse per l'uso di AMF in agricoltura, anche grazie alla disponibilità di inoculi micorrizici commerciali e all'adozione di buone pratiche di gestione agricola che mirano a stimolare lo sviluppo delle popolazioni autoctone microbiche del suolo.

Alcune specie di piante da frutto della famiglia delle Ericaceae, come il mirtillo nero, il mirtillo medio, il mirtillo rosso, formano micorrize ericoidi, molto diverse dalle AMF, in cui le ife del fungo micorrizico penetrano sia negli spazi intercellulari sia all'interno delle cellule radicali, creando strutture a forma di spire. Per queste colture è disponibile anche un inoculo commerciale di micorrize ericoidi.

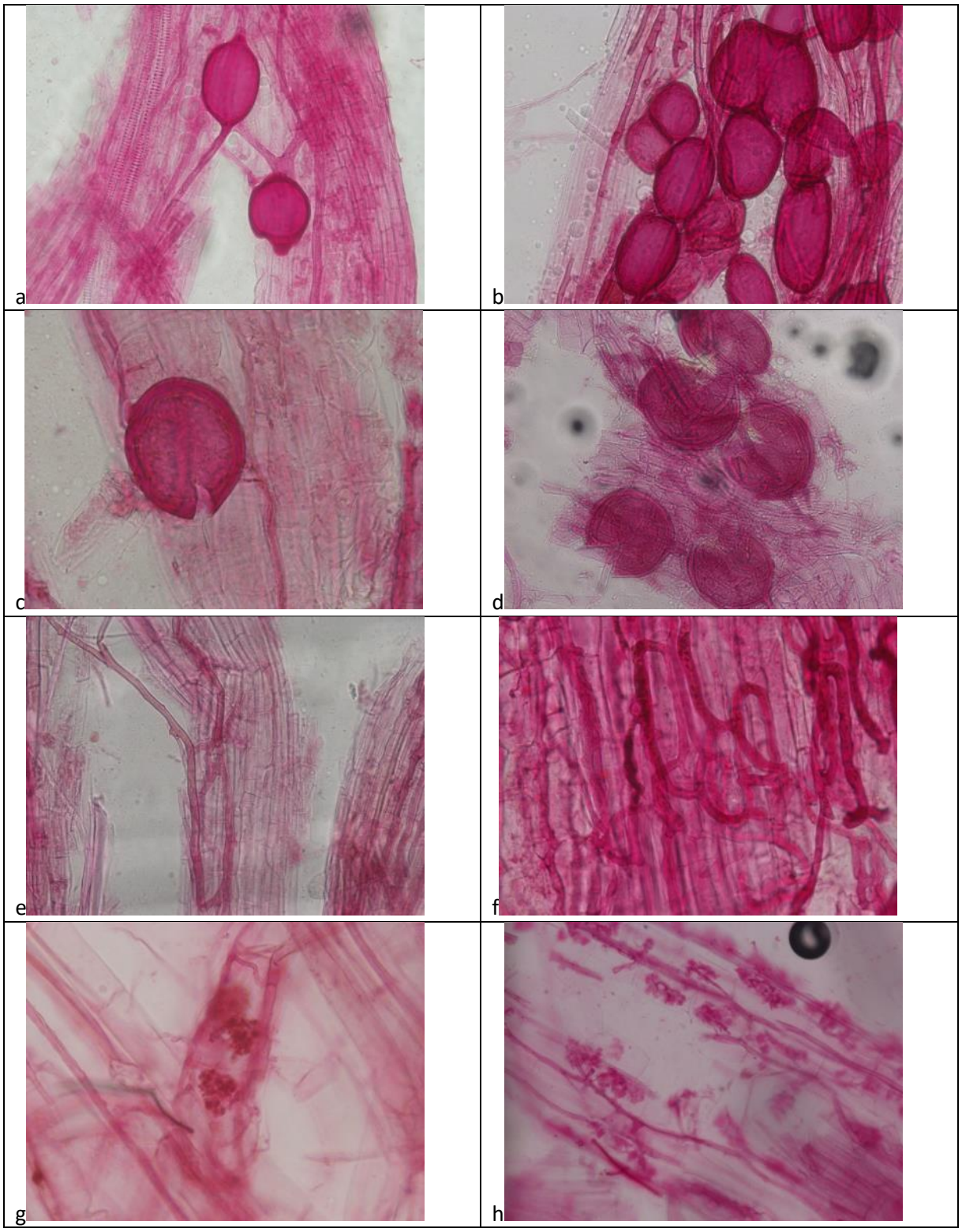

Fig. 1.2. Strutture dei funghi micorrizici nelle radici. (a) Vescicole nella radice di una pianta di fragola di controllo, (b) Vescicole nella radice di fragola dopo l'inoculazione con microrganismi benefici, (c) Spore nella radice di una pianta di fragola di controllo, (d) Spore nella radice di fragola dopo l'inoculazione con microrganismi benefici, (e) Micelio di un fungo micorrizico arbuscolare nella radice di una pianta di fragola di controllo, (f) Micelio di un fungo micorrizico arbuscolare nella radice di piante di fragola dopo l'inoculazione con microrganismi benefici, (g) Arbuscoli nella radice di una pianta di fragola di controllo, (h) Arbuscoli nella radice di piante di fragola dopo l'inoculazione con microrganismi benefici.
Fonte: Dipartimento di microbiologia e rizosfera dell'Istituto nazionale di ricerca orticola (Inhort, PL)

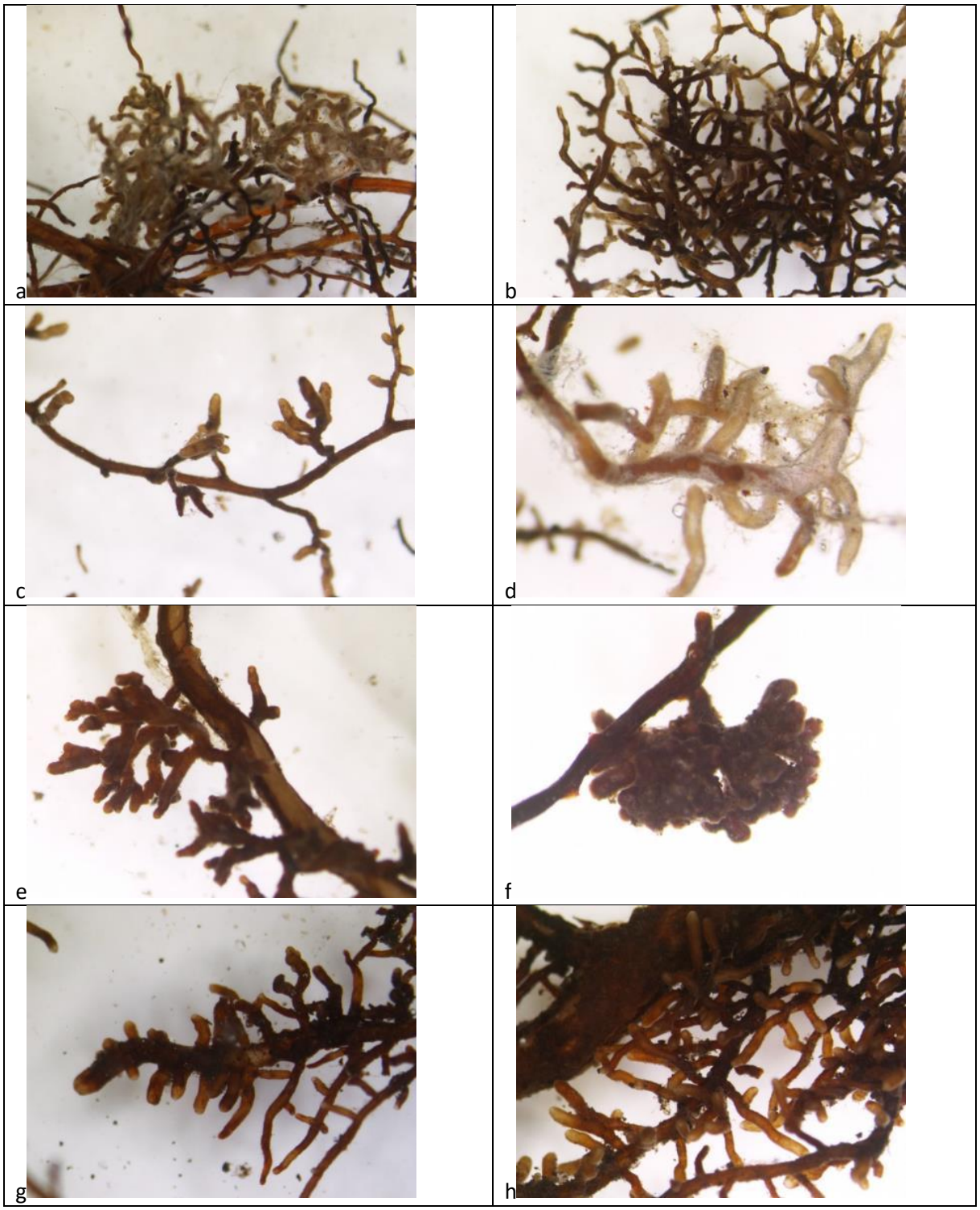

Fig. 1.3. Funghi ectomicorrizici nelle radici delle piante forestali. (a) Ectomicorrize sulle radici del faggio europeo che cresce nel vivaio forestale di Podanin, (b) Ectomicorrize sulle radici della betulla bianca che cresce nel vivaio forestale di Radom, (c) Ectomicorrize sulle radici del carpino europeo che cresce nel vivaio forestale di Białogard, (d) Ectomicorrize sulle radici di una farnia che cresce nel vivaio forestale di Białogard, (e) Ectomicorrize sulle radici del pino silvestre che cresce nel vivaio forestale di Gościniec, (f) Ectomicorrize sulle radici del pino silvestre che cresce nel vivaio forestale di Gościniec, (g) Ectomicorrize sulle radici dell'abete rosso che cresce nel vivaio forestale di Białogard, (h) Ectomicorrize sulle radici dell'abete rosso che cresce nel vivaio forestale di Wałcz.

Fonte: Dipartimento di microbiologia e rizosfera dell'Istituto nazionale di ricerca orticola (Inhort, PL)

2. Effetto delle AMF su crescita, resa e tolleranza agli stress delle piante

La ricerca sull'applicazione pratica dei prodotti micorrizici è stata condotta per anni in numerosi centri di ricerca a livello globale. Numerosi studi hanno dimostrato gli effetti positivi dell'inoculazione di AMF sulla crescita di diverse colture orticole e piante modello. I funghi AMF influenzanopositivamente la crescita, la morfologia e il numero di radici dell'apparato radicale, in molti casi accrescendo il numero di radici laterali. Questo effetto favorisce la pianta nell'assorbimento di acqua ed elementi nutritivi dal suolo.

Il micelio esterno delle AMF si estende ben oltre la zona di esplorazione delle radici, formando una rete ifale che fornisce una superficie di assorbimento maggiore. Questo permette alle piante di accedere a nutrienti e acqua che sarebbero altrimenti difficilmente raggiungibili. I sottili filamenti ifali sono in grado di penetrare nelle zone più fini del suolo, consentendo l'accesso a nutrienti altrimenti inaccessibili e migliorando l'assorbimento idrico (Helgason and Fitter 2005).

In generale, la simbiosi mutualistica delle AMF con la pianta determina quindi diversi benefici molto importanti per gli agricoltori, oltre a facilitare l'assorbimento di acqua e nutrienti, infatti, stimola la resistenza delle piante a diversi stress ambientali, sia biotici (a fitofagi e malattie) che abiotici come siccità, colpi di calore e innondazioni. La micorrizazione aumenta inoltre l'area fogliare e l'attività fotosintetica della pianta, facilitandone la crescita.Le AMF sono particolarmente importanti per favorire l'assorbimento di fosforo, azoto, potassio, magnesio e microelementi essenziali per la salute delle piante, soprattutto in condizioni di scarsa disponibilità di nutrienti. Questi minerali e microelementi sono trasportati alle piante dalle AMF, contribuendo significativamente al miglioramento della crescita e della produttività. E' noto come una carenza di fosfato sia molto limitante per a crescita delle piante, anche a causa del fatto che gli ioni fosfato non sono molto mobili nel suolo, in quanto formano complessi insolubili che ne rallentano la diffusione. In terreni poveri di fosforo, le AMF svolgono un ruolo cruciale nel favorire l'assorbimento di questo nutriente, mobilizzando le sue forme insolubili attraverso la secrezione di enzimi che idrolizzano i legami fosfatici. A livello radicale il micelio dell'AMF converte il fosforo assorbito dal suolo in polifosfati traslocandoli con il movimento del citoplasma all'interno della radice dove sono polimerizzati liberando fosforo alle cellule della pianta ospite. Questo meccanismo permette alla pianta di accedere al fosforo in una forma altamente disponibile, ottimizzando l'assimilazione del nutriente.È stato dimostrato che su terreni poveri di fosforo, la micorriza nelle piante di melo ne aumenta l'efficienza di assorbimento, mentre su terreni ricchi di fosforo la micorriza facilita l'assorbimento di ioni zinco e rame. Si è visto ad esempio che susini e ciliegi inoculati con una specie di AMF, Glomus intraradices, hanno avuto un effetto benefico sull'aumento del contenuto di micronutrienti nei tessuti vegetali e sulla crescita delle piante che crescono su terreni a basso contenuto di fosforo. Marschner e Dell (1994) hanno rilevato che fino all'80% del fosforo contenuto nelle piante può essere fornito da funghi della divisione Glomeromycota.

Similmente, le piante di vite di diverse varietà sottoposte a micorrizazione beneficiano della simbiosi, in quanto il loro sviluppo è strettamente legato all'assorbimento dei seguenti minerali dal suolo: fosforo, azoto, ferro, rame e zinco.

Tuttavia, diversi studi evidenziato che in condizioni di abbondanza di fosforo, la dipendenza delle piante dalle AMF diminuisce poiché elevati livelli di questo elemento nel suolo possono ridurre l'efficacia della simbiosi micorrizica, portando a una minore interazione tra le piante e i funghi.

Anche altri minerali e microelementi e sono trasportati alla pianta da AMF, come potassio, zinco, calcio, magnesio e rame. Oggi si sa che le AMF svolgono un ruolo importante anche nel trasferimento dell'azoto alle piante, facilitando il suo assorbimento dal suolo. Negli arbuscoli delle AMF sono stati identificati trasportatori specifici per questo e altri nutrienti, che ne favoriscono il passaggio dal micelio alle radici delle piante. Sempre in queste strutture sono presenti acquaporine, proteine che regolando il flusso d'acqua attraverso le membrane cellular.. In questo modo, le acquaporine facilitando il trasporto dell'acqua dal suolo alla pianta, migliorano la gestione idrica e contribuiscono al trasporto di nutrienti essenziali. Alcune specie di AMF sono anche in grado di trasportare aminoacidi, come la glicina e la glutamminadal suolo alle radici, supportando ulteriormente la nutrizione della pianta.

li . Si veda l'immagine sottostante per lo scambio di nutrienti.

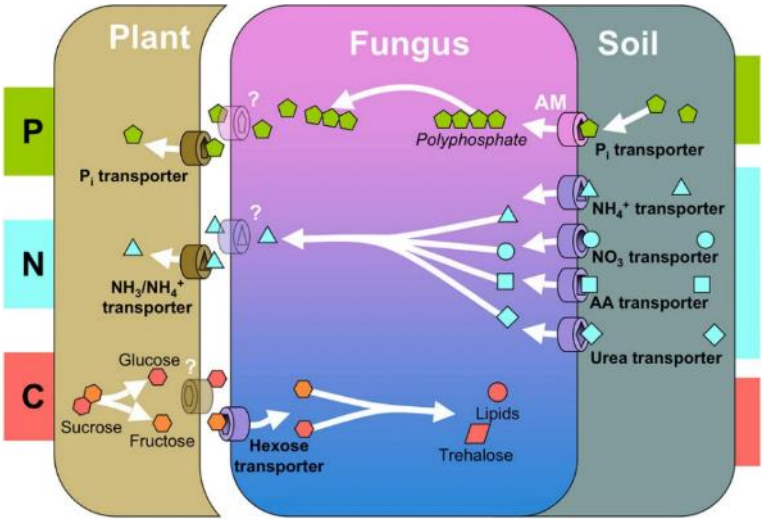

Fig. 1.4. Lo scambio dei principali nutrient nell'AMF (Bonfante and Genre, 2010)

In generale, i microrganismi benefici influenzano direttamente la crescita delle piante sintetizzando regolatori di crescita, acidi organici, siderofori, formazione di biofilm e svolgendo azione antagonista contro i patogeni del suolo e delle piante. Sperimentazioni agronomiche con batteri e funghi benefici indicano un elevato potenziale in questo senso, con un conseguente aumento della quantità e qualità della produzione, rispetto a quella di piante concimate con fertilizzanti minerali standard.

Con il cambiamento climatico globale e l'aumento degli eventi meteorologici estremi, è fondamentale sviluppare soluzioni che rafforzino la resilienza delle piante coltivate a questi stress. È stato dimostrato che gli AMF svolgono un ruolo importante nella regolazione dell'acqua nelle piante e nell'aumentare, ad esempio, la tolleranza delle piante alla siccità. In ambienti aridi, dove le radici delle piante sono fortemente colonizzate da micorrize, questa colonizzazione amplia la superficie di assorbimento, facilitando un accesso più efficiente all'acqua e ai nutrienti, anche in suoli poco umidi (Al-Karaki et al., 2004). In uno scenario opposto, caratterizzato da ristagni idrici causati da eventi piovosi intensi, le AMF si rivelano altrettanto utili, poiché contribuiscono a una gestione più efficiente dell'acqua nel suolo, riducendo i danni alle radici provocati dall'eccesso d'acqua. Le AMF sono state associate a una maggiore tolleranza allo stress termico, aiutando le piante a resistere a temperature elevate, migliorando la gestione dell'acqua e ottimizzando la salute complessiva della pianta. Un esempio di come le dinamiche ambientali influenzano la colonizzazione delle radici da parte dei funghi micorrizici è fornito da un caso studio condotto su viti di Pinot nero di 20 anni. In

questo studio, il grado di colonizzazione radicale delle piante ha mostrato fluttuazioni significative nel corso dell'anno: durante la fase di germogliamento, la colonizzazione era al 20%, ma è aumentata fino al 50% verso la fine di giugno/inizio luglio. Tuttavia, durante il periodo di piogge intense, a fine ottobre/inizio novembre, il grado di colonizzazione è sceso quasi a zero. Questo esempio evidenzia come le AMF si adattino dinamicamente alle condizioni ambientali, rispondendo alle variazioni di umidità e stress idrico. Inoltre, l'inoculazione delle radici della vite con il fungo micorrizico *Glomus iranicum* ha dimostrato di ridurre gli effetti dello stress idrico, migliorando il tasso di fotosintesi, e la resa dell'uva, accelerando anche la maturazione dell'uva da tavola.

Le AMF possono anche migliorare la tolleranza delle piante non alofile che crescono su terreni salini, aumentando la loro capacità di adattarsi a condizioni di stress. Esperimenti condotti da Martins et al. (1997) hanno mostrato ad esempio, effetti positivi della micorrizazione del castagno (*Castanea sativa*) sulla crescita vegetativa e sull'attività fotosintetica delle piante in suoli con salinità elevata.

Oltre ai benefici diretti sulla crescita delle piante, le AMF hanno effetti positivi anche sulla qualità del suolo. Un beneficio significativo delle AMF è la produzione di glomalina, una proteina che lega le particelle del suolo aumentandone l'aggregazione, con un effetto stabilizzante del terreno, contribuendo così a prevenire l'erosione e la lisciviazione, migliorando la struttura e la fertilità del suolo, creando quindi un ambiente favorevole alla crescita dei vegetali. Le AMF favoriscono, inoltre, i processi di formazione del suolo, aumentando la biodiversità della copertura vegetale, in particolare su terreni erosi e contaminati.

I funghi micorrizici rivestono un ruolo importante anche sulla resilienza delle piante agli stress biotici, come la tolleranza a parassiti e patogeni, attraverso vari meccanismi. La colonizzazione delle radici da parte degli AMF può infatti stimolare i meccanismi di difesa naturali della pianta, inducendo una risposta sistemica che attiva le difese endogene, come la produzione di metaboliti secondari e proteine defensive, potenziando così la resistenza della pianta a parassiti e patogeni. Inoltre, il miglioramento dello stato di salute e del vigore delle piante, dovuto ad una miglior nutrizione e assunzione di acqua, le rende meno vulnerabili agli attacchi esterni. Gli AMF possono inoltre competere con i patogeni per le risorse vitali, come spazio e nutrienti, limitando così la colonizzazione e proliferazione dei patogeni nella zona radicale della pianta. Un esempio significativo di questi meccanismi si osserva nell'interazione tra gli AMF e i nematodi parassiti. In alcune varietà di vite, ad esempio, gli AMF attuano un meccanismo di ostacolazione fisica, la rete di micelio delle AMF impedisce il corretto ingresso del nematode nelle radici, oltre ad aumentare la loro tolleranza alla siccità.

Tuttavia, questa interazione simbiotica comporta un costo per la pianta ospite, in quanto una parte del carbonio prodotto dalla pianta viene trasferita al fungo. Ciò può comportare una crescita ridotta delle piante più giovani, soprattutto nelle fasi iniziali di impianto o quando le piante non soddisfano completamente le proprie esigenze nutrizionali. In generale, il rapporto tra benefici e costi migliora con la crescita della pianta o in presenza di stress ambientali, quando i vantaggi della simbiosi diventano più evidenti.

In alcuni casi, le micorrize giocano anche un ruolo cruciale nel fito-risanamento di aree contaminate, rendendo possibile l'uso agricolo o ambientale di terreni precedentemente compromessi. I funghi micorrizici aumentano infatti, l'efficienza delle piante nell'assorbire e accumulare metalli pesanti come rame, zinco, cadmio, piombo e cobalto, nonché ioni cloruro e solfato, riducendo la loro concentrazione nel suolo. Inoltre, migliorano la resistenza delle piante agli effetti tossici derivanti dall'eccesso di metalli pesanti e da altre sostanze nocive nel terreno, come gli idrocarburi aromatici policiclici (PAH) e i fenoli. Questi composti

organici vengono sequestrati o degradati dalle micorrize, riducendo la loro disponibilità per le piante, che così vedono potenziata la loro tolleranza rispetto a suoli contaminati.

3. 1. Formulazioni e linee guida per l'applicazione a diversi sistemi colturali orticoli

Negli ultimi anni si è assistito a un aumento della domanda e della produzione di prodotti a base di inoculi micorrizici per l'agricoltura e l'orticoltura, con molti coltivatori che ne vedono il potenziale per l'utilizzo in colture sostenibili. Le formulazioni sono disponibili in diversi formati, tra cui granuli e polveri secche, liquidi, conce per sementi e medicazioni. La maggior parte delle formulazioni contiene una miscela di specie di AMF o singole specie selezionate a seconda dell'uso. La produzione di prodotti a base di inoculi micorrizici può essere impegnativa, in quanto possono essere coltivati solo in presenza di piante ospiti, essendo simbionti obbligati.

In Europa i prodotti a base di funghi micorrizici sono regolamentati nell'ambito del regolamento sui fertilizzanti e biostimolanti vegetali Allegato II (https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021R1768). Sono classificati come prodotti fertilizzanti in quanto destinati a migliorare la nutrizione delle piante e la fertilità del suolo. I prodotti a base di funghi micorrizici non rientrano quindi nella normativa degli agenti di biocontrollo, poiché non sono classificati come prodotti fitosanitari. Le legislazioni nazionali variano da un Paese all'altro dell'Unione Europea, pertanto per la registrazione dei prodotti fungini micorrizici è necessario seguire le linee guida e le politiche locali per ciascun Paese in cui il prodotto è destinato alla vendita Di conseguenza, i produttori devono registrare il prodotto in ogni Stato membro dell'UE in cui intendono venderlo.

Molti prodotti contengono specie di AMF che si trovano comunemente in molti ambienti agricoli e orticoli, in particolare specie di Rhizophagus e Funneliformis (precedentemente noto come Glomus). Con l'aumentare della tecnologia di produzione, aumenta anche il numero di specie di AMF incluse nei prodotti, così come la personalizzazione degli inoculi per adattarsi a diversi ambienti. Anche se le AMF sono considerate non specifiche nel loro potenziale di colonizzazione di specie diverse, è importante classificare il variegato pool di specie di AMF in base alle loro preferenze per l'ospite e l'ambiente. Ciò permette di ottimizzare la formulazione, la produzione dell'inoculo e le modalità di applicazione, rendendole più adatte a condizioni diverse, come coltivazioni in campo aperto, serre, fasi di trapianto, propagazione in vitro o inverdimento urbano, ecc. Pertanto è fondamentale valersi di tecnologia appropriata per la produzione degli inoculi e dei mezzi di formulazione per una loro efficace applicazione.

Sebbene l'inoculazione di piante con funghi micorrizici sia una pratica ben nota, il loro utilizzo su larga scala è ancora ostacolato in alcuni casi dalla formulazione di inoculi in grado di assicurare un effetto affidabile e costante nelle condizioni di campo. Tuttavia, è fondamentale sensibilizzare la comunità di coltivatori sull'uso di questi prodotti e su come la loro applicazione differisca dagli approcci chimici standard. In particolare, i singoli prodotti variano nelle dosi e tecniche di applicazione, per cui è fondamentale seguire le specifiche linee guida del produttore per un impiego corretto ed efficace.

In generale, quando si applica l'AMF negli ambienti di coltivazione, occorre considerare una serie di fattori chiave:

- Applicazione - Qualsiasi inoculo di AMF deve essere applicato direttamente alle radici delle piante: con immersione radicale, applicato durante il trapianto in una buca vicino alla giovane pianta o

sotto/adiacente al seme al momento della germinazione. È preferibile inoculare le piante nelle prime fasi di sviluppo per un miglior risultato.

- Ambiente - L'ambiente può influenzare l'AMF e alcune formulazioni possono essere più adatte in alcune condizioni ambientali che ad altre. In particolare, il tipo di coltura, le condizioni del suolo e i metodi di impianto possono giocare un ruolo importante nell'effetto dell'applicazione di AMF. Ad esempio, bisogna sapere che un'elevata applicazione di sostanze chimiche, come elevati livelli di nutrienti (soprattutto di fosforo) possono compromettere l'efficacia dell'AMF. Condizioni ambientali estreme come calore eccessivo, pH basso, elevati quantitativi di acqua possono suggerire di scegliere specie specifiche di AMF che si adattano meglio a tali condizioni. È importante anche monitorare il pH del suolo, poiché un pH inferiore a 5,5 limita la colonizzazione delle radici da parte dei funghi micorrizici arbuscolari.
- Trattamento post-impianto – Le pratiche del post-impianto possono influire sul successo dell'associazione con le AMF. Un'applicazione molto elevata di fungicidi subito dopo l'impianto potrebbe ridurre notevolmente le possibilità di colonizzazione. Sebbena molti fungicidi ed erbicidi sono compatibili con le AMF, è opportuno selezionarli attentamente e applicarli nei tempi più appropriati. Le AMF hanno bisogno di una pianta ospite vivente per sopravvivere; i processi che lasciano il suolo privo di piante vive, come la lavorazione del terreno, l'estirpazione dei frutteti, il controllo delle erbe infestanti o i periodi di maggese, portano a esaurire rapidamente la vitalità delle AMF nel suolo.
- Considerazioni sul rapporto costi-benefici - Il costo per l'agricoltore dell'applicazione dell'inoculo deve essere considerato ragionevole ed economicamente sostenibile. La valutazione dei benefici per le colture a ciclo breve (ad esempio, erbe e insalate) rispetto alle colture perenni (alberi da frutto e foreste) dovrebbe essere analizzata insieme ai benefici per le colture, soprattutto per quelle molto esigenti in fatto di nutrienti. Alcuni sistemi colturali potrebbero essere più adatti all'applicazione di AMF rispetto ad altri.
- Interazioni con altri organismi - L'interazione tra AMF e altri microbi benefici sembra aumentarne le potenzialità. Ad esempio, in molti studi, le comunità personalizzate che comprendono specie diverse di AMF e altri funghi benefici come Trichoderma e batteri benefici mostrano un aumento dei benefici e un livello maggiore di colonizzazione delle radici dalle AMF.

4. Gestione delle colture per sfruttare meglio l'attività degli AMF proponendo pratiche di gestione che aumentano l'efficienza degli AMF nella coltivazione e nella resa delle colture

Molti aspetti delle pratiche di gestione agricola convenzionale influenzano la diversità e l'abbondanza di AMF. L'aumento della monocoltura, che riduce la biodiversità in superficie, diminuisce anche la microbiologia sotterranea del suolo, comprese le AMF. Gli alti livelli di prodotti chimici utilizzati in agricoltura, i tassi di fertilizzanti (con livelli eccessivi di fosfati) necessari per sostenere le rese delle colture moderne e le applicazioni di pesticidi e fungicidi riducono le popolazioni di questi importanti microbi. Nel corso degli ultimi decenni le colture sono state sempre più addomesticate e la maggior parte dei programmi di selezione non considera il modo in cui i nuovi genotipi interagiscono con i microbi del suolo. Molte varietà più recenti hanno infatti ridotti requisiti per l'assorbimento di AMF. Così come terreni coltivati con bassi livelli di sostanza organica, una debole struttura del suolo ed alti input possono offrire condizioni meno favorevoli per ospitare

i microbi. Molte colture sono attualmente coltivate su substrati privi di suolo, come la fibra di cocco. Questi substrati sono privi di microbi e quindi i preparati disponibili in commercio possono essere fondamentali. Tutte queste pratiche moderne stanno riducendo la biologia del suolo nei terreni agricoli e orticoli.

Per sfruttare meglio i microrganismi benefici e le AMF in orticoltura, dobbiamo considerare le pratiche che incoraggiano lo sviluppo delle AMF. Se i preparati commerciali di micorrize vengono applicati ai sistemi agricoli, dobbiamo considerare quale sia il modo migliore per garantirne la loro sopravvivenza e longevità. Molti agricoltori stanno anche valutando come incentivare lo sviluppo di popolazioni autoctone di AMF adottando metodi e interventi sostenibili.

Sono stati condotti molti studi che esaminano gli effetti delle tecniche di gestione delle colture in diverse condizioni pedoclimatiche. Sebbene l'ambiente, il tipo di suolo e il luogo aggiungano variabilità ai dati raccolti in questi studi, emergono modelli universali:

- Lavorazioni del suolo: Lelavorazioni e le operazioni che perturbano la stabilità del suolo (inclusa l'estirpazione di piante nei frutteti) hanno un grande effetto sulle popolazioni di AMF nel suolo. L'eccessiva lavorazione del suolo interrompe le reti ifali delle micorrize consolidate nel terreno, riducendo gli effetti benefici delle AMF. La lavorazione meccanica del suolo influisce sulle comunità di AMF e porta a un minor numero di spore, a una minore colonizzazione delle radici, a una minore diversità tassonomica delle AMF e a una diminuzione del micelio extra-radicale rispetto al suolo indisturbato. Oehl et al. (2003) hanno riscontrato che la coltivazione intensiva del suolo riduce la diversità dei funghi micorrizici. Sebbene questo lavoro è stato condotto su seminativi e pascoli, i risultati possono essere applicati anche alle colture intensive di frutteti. Per mantenere e incoraggiare lo sviluppo dellepopolazioni di AMF nei terreni, i coltivatori dovrebbero ridurre al minimo il disturbo del suolo.
- Applicazione di prodotti chimici: Sebbene molti fungicidi siano compatibili con le AMF, è necessario limitarne l'applicazione e consultare i produttori di micorrize per garantire una corretta applicazione dei mezzi chimici. Anche la tempistica di applicazione dei fungicidi è importante, così come è sconsigliata una eccessiva bagnatura nelle fasi iniziali di insediamento delle AMF. Negli ultimi anni la compatibilità del glifosato con le AMF è stata oggetto di dibattito e non è ancora del tutto chiaro come le popolazioni di AMF siano influenzate da questa sostanza chimica.
- Applicazione di fertilizzanti: Un apporto molto elevato di fertilizzanti riduce chiaramente la necessità per le piante di impiegare le proprie risorse per formare associazioni con le AMF. Per garantire una produzione sufficiente, è necessario che i coltivatori applichino fertilizzanti alle colture, ma questi dovrebbero essere ridotti se si vuole incoraggiare la colonizzazione delle AMF, facendo risparmiare ai coltivatori denaro in prodotti chimici costosi e contribuendo alla sostenibilità in agricoltura. Livelli molto elevati di fosforo prontamente disponibile causano gli effetti più dannosi alle micorrize. E' importante anche il mantenimento di livelli adeguati di sostanza organica nel suolo per fornire risorse nutritive alle AMF, oltre che per migliorare la struttura e il drenaggio del suolo.
- Diversità delle colture: La biodiversità in superficie è importante per favorire la diversità delle specie di AMF. Nelle aziende agricole ciò può essere ottenuto aumentando la diversità delle piante non coltivate, come strisce di fiori selvatici, colture di copertura, interpiantamenti e rotazioni. A causa della natura simbiotica obbligata delle AMF, la presenza di terreni nudi per lunghi periodi senza radici vive ne riduce notevolmente le popolazioni.

L'implementazione di strategie di gestione adeguate nelle aziende agricole può garantire la creazione di ambienti favorevoli alle AMF. Comprendendo che è necessario prendere in considerazione strategie diverse quando si adottano tecniche biologica piuttosto che la chimica tradizionale, l'uso delle AMF potrebbe comunque essere un fattore chiave per ottenere colture sostenibili. Tuttavia sono necessarie ulteriori ricerche per progettare prove di campo semplici e affidabili in colture orticole commerciali per quantificare l'impatto delle comunità di AMF sulla crescita delle colture, sulle rese e sulla sostenibilità dell'agroecosistema.

Gli studi mostrano una differenza tra la composizione delle comunità di AMF a livello di generi tra i sistemi di agricoltura biologica e convenzionale. Le pratiche di agricoltura biologica tendono ad aumentare la ricchezza delle famiglie di AMF nel suolo, sebbene, spesso, i generi più abbondanti sono presenti in entrambi i sistemi. Le pratiche agricole diagricoltura biologica possono avere un effetto positivo o neutro sulle comunità di AMF nel suolo (Manoharan et al. 2017). Ad esempio, le pratiche di agricoltura biologica possono aumentare la ricchezza della famiglia di AMF Gigasporaceae nel suolo. Nell'agricoltura convenzionale il fattore principaleche causa il declino della ricchezza di AMF è legato alle alte concentrazioni di C e N nel suolo (Wadhan et al. 2021). Inoltre, i fattori del suolo come il contenuto di N, P, K e i rapporti C/P e N/P hanno influenzato la comunità totale di AMF.

Alcuni studi dimostrano che le comunità di AMF nei suoli agricoli rispondono ai sistemi agricoli a lungo termine e sono resistenti alle siccità estive di breve durata. Non è noto se la capacità delle comunità di AMF di tollerare la siccità dipenda dalle proprietà del suolo, dalla diversità e dalla composizione delle comunità di AMF o dalle comunità vegetali associate. Resta chiaro che, dato l'aumento delle temperature globali e la frequenza di eventi meteorologici estremi, tra cui il caldo e le precipitazioni, dobbiamo capire come questo influisca sulle popolazioni di AMF e come possiamo utilizzare al meglio questi funghi per aumentare la resilienza delle principali colture orticole di fronte a queste sfide.

La mancanza di valide pratiche di inoculazione e di studi su larga scala con analisi costi-benefici dell'applicazione di AMF rappresenta ancora un ostacolo importante per l'impliego stabile di micorrize nei protocolli di coltivazione.

Riferimenti

Al-Karaki G., McMichael B., Zak J. 2004. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. Mycorrhiza, 14, 263-269.

Bonfante P., Genre A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. Nature communications, 1(1), 48.

Helgason T., Fitter A. 2005. The ecology and evolution of the arbuscular mycorrhizal fungi. Mycologist, 19(3), 96–101.

Manoharan L., Rosenstock N. P., Williams A., Hedlund K. 2017. Agricultural management practices influence AMF diversity and community composition with cascading effects on plant productivity. Applied Soil Ecology, 115, 53-59.

Marschner H., Dell B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. Plant and Soil, 159, 89–102.

Martins A., Casimiro A., Pais M.S. 1997. Influence of mycorrhization on physiological parameters of micropropagated *Castanea sativa* Mill. plants. Mycorrhiza, 7, 161-165.

Oehl F., Sieverding E., Ineichen K., Mäder P., Boller T., Wiemken A., 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of central Europe. Applied Environmental Microbiology 69, 2816–2824.

Smith S. E., Read D. J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. Academic Press, San Diego.

Wadhan S.F.M., Reitz T., Heintz-Buschart A., Schädler M., Roscher R., Breitkreuz C., Schnabel B., Purahong W., Buscot F. 2021. Organic agricultural practice enhances arbuscular mycorrhizal symbiosis in correspondence to soil warming and altered precipitation patterns. Environmental Microbiology, 23(10), 6163–6176.

Capitolo 2. Prodotti microbici per la protezionedelle colture orticole

Magdalena Ptaszek[1], Małgorzata Tartanus[1], Massimo Pugliese[2]

[1]Institut national de recherche horticole, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, POLONIA
[2]Université de Turin - Agroinnova, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO), ITALIA

La protezione delle piante è una delle sfide principali dell'orticoltura moderna. Pertanto, si stanno sviluppando nuovi approcci, tra cui l'uso di microrganismi come mezzi di lotta sostenibili ed efficaci. L'obiettivo di questo capitolo è dimostrare le possibilità di utilizzare microrganismi antagonisti nella protezione delle piante contro patogeni e parassiti sia fogliari che del suolo. Inoltre, viene presentata la multifunzionalità dei microrganismi nella produzione vegetale, nonché i vantaggi e gli svantaggi del loro utilizzo. Viene prestata molta attenzione alle condizioni che dovrebbero essere soddisfatte nell'applicazione dei prodotti microbici e ai fattori che influenzano il raggiungimento della loro elevata efficacia, nonché agli aspetti pratici dell'uso di mezzi biologici di lotta contenenti vari microrganismi. Infine, viene discussa anche la questione delle norme legali per la commercializzazione dei prodotti a base di microrganismi.

1. Uso dei microrganismi per la lotta biologica

I microrganismi e le loro comunità (microbioma) svolgono un ruolo fondamentale nella biodiversità e nel funzionamento di tutti gli altri organismi viventi, guidando l'evoluzione e l'adattamento ecologico fin dall'inizio della vita sulla Terra. La relazione ospite-microbioma, indipendentemente dall'organismo - pianta, animale o uomo - influisce sulla capacità dell'ospite di far fronte a stress abiotici e biotici e ha implicazioni biologiche (ad esempio nella fisiologia o nel metabolismo) ed ecologiche (ad esempio nelle interazioni pianta-parassita) rilevanti per le attività economiche e sociali umane. È quindi sempre più evidente che una corretta gestione del microbioma nei sistemi agricoli può promuovere una produzione sostenibile nel rispetto dell'ambiente. I prodotti a base di o derivati da microrganismi possono quindi essere uno strumento efficace per la gestione del microbioma del suolo e/o delle piante.

La storia dell'uso di microrganismi benefici in agricoltura è iniziata nel XIX secolo. Da allora sono stati condotti molti studi importanti sull'isolamento di singoli ceppi batterici e fungini, sulla loro caratterizzazione e sul loro potenziale utilizzo come mezzi biologici di lotta o biofertilizzanti. I mezzi biologici di lotta sono definiti come prodotti fitosanitari che contengono gruppi di microrganismi come virus, batteri e funghi, nonché nematodi. L'elenco delle "sostanze attive microbiologiche" attualmente autorizzate dall'Unione Europea è disponibile su: EU Pesticides Database. Considerando le disposizioni della Strategia dell'Unione Europea per la Biodiversità, che prevedono la riduzione del 50% dell'uso di prodotti fitosanitari di sintesi entro il 2030, i mezzi biologici di lotta svolgeranno un ruolo fondamentale nelle pratiche agricole a livello europeo. Per questo motivo, l'uso di prodotti microbici sta diventando una valida alternativa ai prodotti fitosanitari di sintesi, come conferma il numero crescente di prodotti a base microbica che appaiono sul mercato nel contesto della gestione integrata delle malattie e dei parassiti. Va anche detto che molti prodotti contenenti inoculi microbici e che mostrano anche un'attività di contenimento dei patogeni e dei parassiti non sono registrati come prodotti fitosanitari, ma come preparati microbici che stimolano l'attività microbica nel suolo o hanno un effetto benefico sulla crescita e sulla resa delle piante. Ciò è dovuto al fatto che nell'Unione Europea il processo di registrazione, i requisiti e i costi per i mezzi biologici di lotta sono simili a quelli necessari per le sostanze di sintesi(Regolamento CE 1107/2009).

Tuttavia, il paradigma chimico, in cui un prodotto viene utilizzato per eliminare in modo efficace, facile e veloce i parassiti dannosi, persiste ancora e l'uso dei mezzi di lotta biologica è troppo spesso visto come un semplice sostituto dei mezzi chimici. Questo approccio non è certamente appropriato, poiché non tiene conto dei vari fattori che influenzano l'efficacia dei mezzi biologici di lotta, costituiti da "materiale vivente". Un approccio alternativo e forse meglio complementare all'uso dei mezzi di lotta biologica consiste nel modificare le condizioni ambientali di coltivazione per aumentare la popolazione del microbioma autoctono e potenziare la presenza di nemici naturali e organismi benefici, in modo da fornire una certa protezione da parassiti o malattie (lotta biologica conservativa). Se si considera la lotta ai fitofagi (insetti e altri artropodi), i funghi entomopatogeni sono il gruppo di microrganismi che ha fornito le soluzioni più utili. Una recente indagine a livello mondiale ha mostrato che sono disponibili 129 prodotti insetticidi a base di microrganismi (de Faria e Wraight 2007). Le specie principalmente utilizzate a questo scopo appartengono agli ascomiceti e comprendono *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea*. Queste specie sono spesso generaliste, cioè parassitizzano diverse specie di insetti dannosi, ma alcune sono specializzate (ad esempio *B. brongniartii* parassitizza solo specie del genere Melolontha) (Zimmermann 2007). Anche i virus patogeni per gli insetti sono di crescente interesse, tuttavia lo sviluppo della resistenza a un ceppo insetticida da parte di un insetto dannoso sembra essere un fattore importante nel determinare il corretto uso di tali prodotti, come evidenziato nel caso del virus della granulosi della carpocapsa.

L'approccio all'irrorazione delle colture con un agente di lotta biologica, cioè la distribuzione di formulazioni di microrganismi, è analogo a quello utilizzato per i prodotti di sintesi: il contenimento degli insetti avviene esclusivamente per mezzo dell'organismo utilizzato (Jaroński 2010). Le ragioni tecniche per l'uso dell'irrorazione sono legate alla biologia delle specie entomopatogene, ma anche al fatto che la maggior parte dei sistemi colturali e dei parassiti ad essi associati sono transitori, e si verificano solo per una stagione di crescita, a volte solo per poche settimane. L'interruzione temporanea dell'habitat colturale non solo elimina i parassiti, ma in molti casi elimina anche l'agente di lotta biologica che può limitarli. Sono quindi necessarie applicazioni ripetute, adattando così ai mezzi biologici di lotta un paradigma chimico familiare all'agricoltore, che si limita ad applicare funghi benefici come fa con i mezzi chimici. Nel caso dei biofungicidi, utilizzati per limitare le malattie delle piante, sono disponibili formulazioni che possono essere applicate sia in pre-raccolta sia in post-raccolta. Tuttavia, anche in questo caso, la varietà di specie e ceppi noti per la loro attività di protezione non corrisponde al numero di microrganismi registrati come sostanze attive. Inoltre, la maggior parte dei ceppi autorizzati (ad esempio *Trichoderma sp.*) riguarda il contenimento dei patogeni presenti nel suolo (Ptaszek et al. 2023). Recentemente, tuttavia, è cresciuto l'interesse per i biofungicidi che offrono la possibilità di contenere le infezioni che si verificano in campo, ma anche durante la conservazione (ad esempio causate da *Botrytis cinerea*, *Penicillium sp.*, *Alternaria sp.* ecc.) (Sellitto et al. 2021). L'uso di biofungicidi prima del raccolto evita i rischi derivanti dalla presenza di residui di agrofarmaci non conformi ai limiti stabiliti dalla legislazione europea. A questo proposito, va notato che nell'ultimo aggiornamento del Regolamento (CE) 1107/2009 sulle sostanze attive che non richiedono la fissazione di livelli massimi di residui, 21 su 39 sono sostanze attive a base microbica. Tuttavia, oltre ai fattori che influenzano l'efficacia dei microrganismi utilizzati durante la coltivazione, è importante considerare che la fase di post-raccolta è caratterizzata da interventi fisico-chimici (ad esempio il lavaggio o la modifica dell'atmosfera di conservazione), utilizzati per preservare o prolungare la shelf-life dei prodotti, che rappresentano quindi un altro fattore di variabilità.

Inoltre, l'uso di prodotti a base microbica riduce il rischio di resistenza dei patogeni, che spesso si verifica con l'applicazione di mezzi chimici. L'azione dei microrganismi nella protezione delle piante può basarsi su diversi meccanismi, sia diretti che indiretti. Gli effetti diretti sul patogeno si basano sull'antagonismo microbico attraverso l'antibiosi, la competizione per i nutrienti o lo spazio ed il parassitismo. I microrganismi possono anche alterare le condizioni di crescita necessarie allo sviluppo dei patogeni. Il meccanismo indiretto invece prevede l'induzione di resistenza nella pianta, che può portare a una riduzione della proliferazione, dell'aggressività o del danno causato dal patogeno.

I microrganismi utilizzati nella protezione biologica delle piante devono soddisfare determinati requisiti per contribuire efficacemente alla protezione delle piante da parassiti o patogeni:

- Devono essere sicuri per la salute umana.
- Devono essere geneticamente stabili e avere un'elevata vitalità e resistenza alle fluttuazioni ambientali.
- Devono avere un fabbisogno nutrizionale moderato e tassi di crescita rapidi.
- Devono essere specifici per il parassita o l'agente patogeno in questione, per evitare effetti negativi sugli organismi utili e per evitare effetti collaterali indesiderati.
- Devono essere compatibili con diversi sistemi di coltivazione, compreso l'uso di fertilizzanti e altri prodotti fitosanitari.
- Devono essere efficaci nel contenimento di parassiti o agenti patogeni. La loro capacità di colonizzare e competere con i patogeni è un fattore chiave.

2. Lotta biologica a parassiti e patogeni presenti nel suolo: fattori da considerare per ottenere un'elevata efficacia

Attualmente la maggior parte dei prodotti fitosanitari biologici a base di microrganismi contiene ceppi singoli e solo pochi sono registrati anche come consorzio (*Trichoderma spp.*). Mentre l'efficacia di isolati batterici o fungini selezionati in test di laboratorio o in serra è soddisfacente, in condizioni di campo l'efficacia dei mezzi biologici è ancora una delle principali sfide dell'agricoltura moderna (Kowalska et al. 2020; Michev et al. 2021). I fattori che limitano il raggiungimento di un'elevata efficacia di tali formulazioni a base di microrganismi possono essere dovuti a fattori biotici e abiotici, come la competizione con microrganismi autoctoni, la suscettibilità a condizioni ambientali variabili, ma anche alle condizioni climatiche e meteorologiche, ai metodi di applicazione e alle pratiche di gestione delle colture (Trivedi et al. 2020; Malusà et al. 2021). A fini pratici, i fattori sopra citati possono essere suddivisi in quattro categorie: dipendenti dalla coltura (Plant), dalle proprietà del suolo (Soil), dal processo di produzione e formulazione (Product) e dalle pratiche agricole (Farmer).

Lo stato fisiologico della pianta è importante nelle interazioni con i mezzi biologici di lotta. Le componenti delle foglie possono influenzare la durata della persistenza delle spore dei microrganismi entomopatogenie la suscettibilità degli insetti alle infezioni. Anche il livello nutrizionale della pianta influenza lo stato di salute generale degli insetti fitofagi e quindi può mediare l'effetto degli entomopatogeni fungini. Inoltre, è stato osservato che la presenza di fitopatogeni può influenzare la suscettibilità dell'insetto ai funghi entomopatogeni: ad esempio, è stato riscontrato che M. anisopliae causa il 100% di mortalità dell'insetto

quando l'insetto si trova su foglie infetteda patogeni, ma solo il 50% di mortalità quando l'insetto si nutre di foglie sane (Rostas e Hilker 2003).

La difficoltà di garantire un'efficacia costante contro patogeni e fitofagi delle piante aumenta le complicazioni e le difficoltà nell'uso dei mezzi biologici, nonostante la loro sicurezza. In pratica, il livello di efficacia raggiungibile è sicuramente un "gioco di numeri": è necessario applicare un numero sufficiente di spore per ridurre la popolazione di insetti dannosi o prevenire l'infezione da parte di agenti patogeni. Nel caso dei microrganismi entomopatogeni, la modalità d'azione con cui il ceppo parassitizza (tramite infezione cutanea o attraverso l'apparato digerente), il comportamento dell'insetto (sulla pianta o nel terreno) e la morfologia della pianta determinano il metodo di applicazione migliore per garantire un contenimento efficace. Analogamente, per i microrganismi antagonisti, il ciclo biologico del patogeno e il sito di infezione determinano il momento e il metodo di applicazione per consentire la colonizzazione preventiva con un agente di lotta biologica contro il patogeno.

Le proprietà chimiche (pH, sostanza organica e contenuto di nutrienti) e fisiche (tessitura) del suolo influenzano le comunità batteriche e fungine e quindi il potenziale di colonizzazione e l'efficacia dei mezzi biologici applicati al suolo. La concorrenza del microbioma autoctono, anch'essa influenzata dalle proprietà del suolo, aumenta la variabilità dell'adattabilità e della persistenza degli inoculi. Tuttavia, le condizioni ottimali per la crescita microbica (umidità, temperatura, contenuto di sostanza organica, ecc.) favoriscono generalmente la persistenza e la colonizzazione delle radici da parte degli inoculi.

Il processo di produzione dell'inoculo è cruciale per ottenere una formulazione di alta qualità, poiché esiste una correlazione diretta tra l'abbondanza di microrganismi e la qualità del prodotto finale. Poiché l'agente attivo nelle formulazioni microbiche è costituito da batteri o funghi vitali, un problema fondamentale è quello di sviluppare una formulazione con una lunga conservabilità. Gli additivi (adesivanti, emulsionanti, composti tampone) vengono utilizzati per migliorare i parametri fisici e chimici dell'inoculo e per prolungare la vita dei microrganismi. La formulazione ottimale protegge le cellule microbiche durante lo stoccaggio e il trasporto, aumentando potenzialmente la durata di conservazione dell'inoculo nel terreno o sulla pianta, pur essendo inerte per l'ambiente. Esistono due forme fondamentali di preparati microbici: secchi o granulari e liquidi. In generale, le formulazioni granulari mostrano una migliore efficacia nel suolo, mentre le formulazioni liquide, sebbene più facili da applicare, hanno una durata di conservazione più breve. Un altro fattore importante che influisce sull'efficacia dei prodotti a base di microrganismi sono le condizioni di conservazione. Conservare i prodotti a temperature estreme o lasciare che una formulazione secca diventi umida porta a una più rapida diminuzione del numero di microrganismi attivi. Gli agricoltori che utilizzano preparati contenenti batteri o funghi devono essere consapevoli dei fattori che influenzano la durata di conservazione della formulazione.

La definizione di standard legali minimi per la registrazione e la commercializzazione dei prodotti a base di microrganismi è importante per garantire uno standard minimo di qualità, che è un altro fattore che influenza l'efficacia dei mezzi biologici in campo. Nel caso dei microrganismi antagonisti, la loro qualità è garantita da un lungo e costoso processo di registrazione e dal monitoraggio della qualità del prodotto a livello di mercato, che deve essere rispettato da ogni Stato membro dell'UE.

La comprensione dei fattori che influenzano l'attività benefica dei microrganismi è essenziale affinché gli agricoltori possano incorporare con successo tali prodotti nella pratica. La struttura del microbioma del suolo,

e di conseguenza la sostenibilità o l'efficacia dei microrganismi inoculati, è fondamentalmente influenzata dalle pratiche di gestione agricola, con effetti contrastanti quando si confrontano sistemi intensivi e sistemi più rispettosi dell'ambiente: pratiche come la lavorazione del terreno, la protezione delle colture, la fertilizzazione minerale e organica o il regime idrico possono alterare l'efficacia dei microrganismi antagonisti applicati al suolo.

Per i mezzi di lotta biologica, la pratica che può avere il maggiore impatto sulla loro efficacia è sicuramente la resistenza ai prodotti di sintesi (Karpouzas et al. 2022). Il sito di interazione chimica tra microrganismi entomopatogeni e residui di agrofarmaci è la superficie fogliare, dove la spora fungina è dormiente nella maggior parte delle condizioni fino a quando non entra in contatto con l'epidermide dell'insetto. Alcuni agrofarmaci vengono assorbiti rapidamente dalla foglia dopo l'applicazione: ad esempio, i fungicidi a base di strobilurine sono tossici in vitro per gli entomopatogeni fungini e per un'ampia gamma di funghi, ma vengono assorbiti dalla foglia entro 15 minuti dall'applicazione, rendendo il contatto tra spore fungine già presenti o applicate contemporaneamente molto breve e quindi non particolarmente problematico per i mezzi biologici di lotta. Ovviamente, i microrganismi applicati dopo i fungicidi di sintesi non devono entrare in contatto con i loro residui, quindi prima di applicare un mezzo biologico è necessario tenere conto del periodo di sospensione dei prodotti precedentemente applicati.

Un'altra limitazione all'uso dei mezzi biologici su scala commerciale è la loro corretta applicazione e dose. L'effetto della dose è particolarmente importante per i microrganismi. In generale, quando si applicano funghi ad azione insetticida alle colture in campo o in serra, si dovrebbero applicare almeno (10^{10}) propaguli per ettaro per garantire un buon livello di efficacia (Jaroński 2010). Questo corrisponde a (10^5) propaguli per cm^2 su una superficie piana o, teoricamente, a (10^4) propaguli per cm^2 su una coltura con un indice di area fogliare normale. Dosi simili sono necessarie anche per gli altri microrganismi antagonisti. La situazione si complica per i trattamenti di lotta nel suolo, dove, oltre alla dose appropriata, è necessario facilitare il contatto tra il mezzo biologico e il parassita o il patogeno. La tecnica di applicazione gioca quindi un ruolo fondamentale nel garantire l'azione difensiva. Concentrando i propaguli del mezzo biologico su una piccola area mirata, si può ottenere un aumento della loro concentrazione di 6-30 volte. Tuttavia, va ricordato che dopo l'applicazione sulle foglie, la concentrazione dei propaguli diminuisce a seconda di vari fattori, come la luce solare, la pioggia, la temperatura, l'umidità, la composizione chimica della superficie fogliare e il microbiota associato alla pianta. Una situazione simile si verifica nel suolo: in molti casi, soprattutto per i preparati batterici, la persistenza degli inoculi nel suolo o nella rizosfera delle radici è generalmente limitata a 30-40 giorni dopo l'inoculazione (Bashan et al. 1995). È quindi necessario garantire applicazioni multiple (2-4) per stagione di crescita, con una frequenza che dipende dalle condizioni climatiche e dallo sviluppo di parassiti/patogeni nel caso dei mezzi biologici. Questo non è considerato uno svantaggio per i preparati a base di microrganismi antagonisti, poiché anche per i mezzi chimici vengono effettuati più trattamenti per stagione di crescita.

Anche il metodo di applicazione può influire sull'efficacia dei mezzi biologici di lotta. Per la loro distribuzione, soprattutto per le formulazioni granulari, di solito sono già disponibili dei macchinari. L'applicazione di inoculi alla semina o al suolo in forma liquida fornisce un'efficacia comparabile nella produzione di diverse specie vegetali (Deaker et al., 2004). L'applicazione di formulazioni liquide mediante irroratrice influisce solo leggermente sulla vitalità dei batteri utilizzati per la protezione delle colture, ma il tempo di lavoro prolungato riduce fino al 50% il numero di cellule vitali che raggiungono la superficie fogliare (Świechowski et al. 2012).

Anche il volume d'acqua utilizzato per l'applicazione e la presenza di coadiuvanti possono influire sull'efficacia dei microrganismi antagonisti. Particolare attenzione va prestata ai tempi di distribuzione del prodotto: la sovraesposizione alla luce (in particolare ai raggi UV) o a condizioni di bassa umidità può ridurre la vitalità e la longevità dei microrganismi e di conseguenza la loro efficacia.

È inoltre importante garantire che i microrganismi introdotti nell'ambiente abbiano le condizioni adeguate per la loro proliferazione. Importante sarà anche l'aspetto della corretta conservazione dei mezzi biologici, che dipende dalla loro composizione. Per questi motivi, nell'ambito del progetto Excalibur (Horizon 2020), sono state condotte prove sperimentali in campo volte a studiare nuovi inoculi microbici multifunzionali del suolo su tre colture modello in diverse regioni pedoclimatiche.

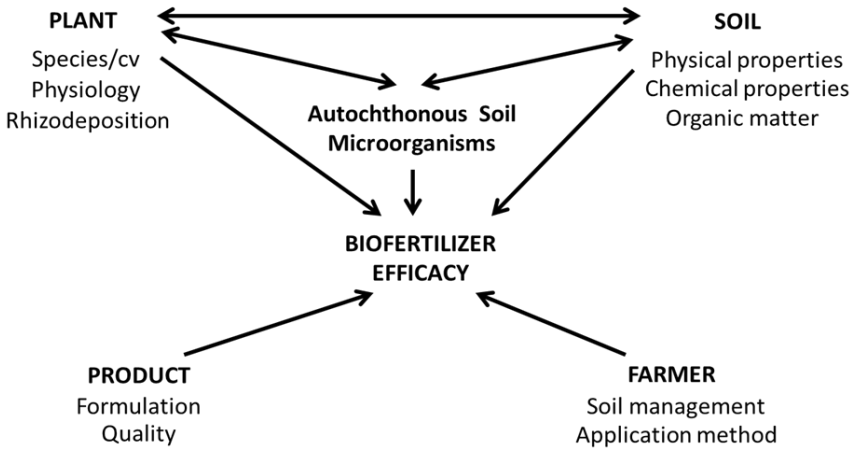

Fig. 2.2. Fattori che influenzano l'efficacia dei bioprodotti.

Lotta biologica ai patogeni terricoli: esempi pratici

La lotta biologica dei patogeni terricoli prevede l'uso di microrganismi antagonisti per limitare la crescita di organismi patogeni nel suolo. Questi mezzi biologici impiegano diversi meccanismi d'azione, tra cui l'antibiosi, l'iperparassitismo, l'induzione di resistenza e la competizione per lo spazio e i nutrienti. Ad esempio, alcuni ceppi batterici, come gli Pseudomonas fluorescens, producono metaboliti secondari extracellulari che inibiscono la crescita dei patogeni presenti nel suolo. Inoltre, alcuni antagonisti inducono una resistenza sistemica nelle piante ospiti, mentre altri interferiscono specificamente con i fattori di patogenicità fungina. L'efficacia dei prodotti a base di microrganismi nel contenimento dei patogeni terricoli è influenzata da vari fattori, come la diversità e l'abbondanza dei taxa patogeni, il microbioma del suolo e le condizioni ambientali. La comprensione delle interazioni tra suolo, piante, patogeni e agenti di lotta biologica è fondamentale per l'applicazione pratica delle strategie di difesa biologica. Pertanto, le ricerche in corso mirano a migliorare l'efficacia dei prodotti a base di microrganismi ed a valutare il loro impatto sul microbioma del suolo (Haas e Défago 2005; Ptaszek et al. 2023; Handelsman e Stabb 1996).

Esempi di microrganismi utilizzati per la lotta biologica ai patogeni terricoli

- *Pseudomonas spp.*: I membri del genere Pseudomonas, come quelli fluorescenti, sono noti per la loro capacità di produrre sostanze antifungine, di suscitare una resistenza sistemica indotta nelle piante ospiti e di interferire con i fattori di patogenicità fungina (Haas e Défago 2005).

- *Bacillus spp.*: Alcuni ceppi di batteri Bacillus, come il Bacillus amyloliquefaciens, sono utilizzati come mezzi di lotta per il contenimento di patogeni terricoli. Possono produrre una varietà di composti antifungini e indurre una resistenza sistemica nelle piante (Bonaterra et al. 2002).
- *Streptomyces spp.*: Alcune specie di batteri Streptomyces sono state studiate per il loro potenziale impiego nella lotta biologica. Sono noti per la produzione di un'ampia gamma di composti bioattivi, tra cui antibiotici e agenti antifungini (Bonaterra et al. 2002).
- *Trichoderma spp.*: Il Trichoderma è un noto genere di funghi antagonistautilizzati per contenere i patogeni terricoli. Agiscono attraverso vari meccanismi, come il micoparassitismo, l'antibiosi e la competizione, e sono stati ampiamente studiati per il loro potenziale nel contenimento di una serie di funghi patogeni, tra cui Fusarium, Pythium e Rhizoctonia (Graham e Strauss 2021).
- *Fusarium sp.*: L'uso di ceppi di Fusarium antagonisti per limitare i patogeni presenti nel suolo è stato studiato nel contesto della lotta biologica. Ad esempio, il ceppo Fusarium K5 ha dimostrato una riduzionedella tracheofusariosi del 69% e un aumento della produzione di biomassa di basilico rispetto al testimone non trattato (Pugliese et al. 2008), e il ceppo Fusarium MSA35 è noto per la produzione di composti volatili attivi nel contenimento di fusariosi (Gilardi et al. 2005).

Metodi di applicazione dei microrganismi antagonisti

- Trattamento dei semi: I microrganismi antagonisti possono essere applicati ai semi prima della semina. Questo metodo assicura che i microrganismi siano presenti nella rizosfera, dove possono stabilirsi e fornire protezione alle piantine emergenti.
- Applicazione al suolo: I microrganismi possono essere applicati direttamente al suolo, sia in forma localizzata (drench) che attraverso i sistemi di irrigazione. In questo modo i microrganismi colonizzano la rizosfera e forniscono una protezione a lungo termine contro gli agenti patogeni presenti nel suolo.
- Incorporazione nei substrati di coltivazione: Per la produzione di colture in serra o in contenitore, i microrganismi antagonisti possono essere incorporati nei substrati di coltivazione per fornire protezione contro i patogeni presenti nel suolo (Panth et al. 2020; Pandit et al. 2022).

Questi metodi mirano a garantire l'insediamento e l'attività dei microrganismi antagonisti nella rizosfera, dove possono limitare efficacemente i patogeni terricoli e contribuire alla salute delle piante.

3. Lotta ai fitofagi e patogeni che colpiscono le parti aeree: aspetti pratici

Attualmente, i biopreparati a base di microrganismi come virus, batteri e funghi sono utilizzati per la protezione delle piante da malattie e parassiti.

I virus

I virus costituiscono un vasto gruppo di patogeni per gli insetti, il più numeroso dei quali è la famiglia Baculoviridae. I rappresentanti di questo gruppo sono virus con un'elevata selettività per i loro ospiti - gli insetti. Il più delle volte vengono attaccati i lepidotteri (larve della mosca americana delle mele, di ricamatori fogliari, ecc.), molto meno frequentemente gli imenotteri e i coleotteri. La loro virulenza è spesso limitata a una famiglia, a un genere o addirittura a una particolare specie di insetto. Inoltre, non si moltiplicano nelle cellule dei vertebrati e delle piante, rappresentando un agente di lotta biologica sicuro per l'ambiente. Gli

effetti della loro presenza negli insetti sono stati osservati già nel XIX secolo, ma il loro uso pratico è diventato possibile solo con una più approfondita comprensione della biologia degli ospiti, nonché del meccanismo di infezione e del ciclo di sviluppo dei virus stessi. I baculovirus sono virus di grandi dimensioni contenenti acido desossiribonucleico (DNA) impacchettato in capsidi proteici a forma di bastoncino, che si formano principalmente nei nuclei delle cellule ospiti. I capsidi sono fusi in una matrice, costituita da proteine, chiamata corpo d' inclusione. Questa matrice proteica, chiamata poliedrina nei virus della poliedrosi nucleare (NPV) e granulina nei virus della granulosi (GV), li protegge dai fattori ambientali avversi e consente loro di sopravvivere al di fuori dell'organismo ospite. La loro esclusiva capacità di infettare gli artropodi e la loro presenza in corpi di inclusione protettivi li rendono agenti biologici preziosi e di grande importanza pratica. I corpi di inclusione, trasportati dal vento e dalla pioggia e da alcuni fitofagi vertebrati e invertebrati che fungono da trasportatori (vettori), possono persistere in natura per molti anni e costituire una fonte di infezione per gli insetti sensibili. Ingeriti dall'insetto con il cibo, si dissolvono nell'intestino e, infettando la maggior parte dei tessuti dell'ospite, lo portano alla morte. I baculovirus sono presenti in quasi tutte le popolazioni naturali di insetti in diversi Paesi, tra cui la Polonia. Tuttavia, la loro introduzione aggiuntiva sotto forma di biopreparati aumenta la frequenza di infezione o, con l'introduzione di preparati virali altamente concentrati, consente una rapida riduzione della popolazione di fitofagi. Tuttavia, va ricordato che la temperatura gioca un ruolo importante nell'azione efficace dei preparati virali in quanto ha un'influenza sul decorso dell'infezione virale. Temperature inferiori a 20°C rallentano il tasso di moltiplicazione del virus, mentre temperature più elevate (25-30°C) accelerano il processo di malattia virale. Esiste anche una diversa sensibilità dei diversi stadi del fitofago all'infezione virale: gli stadi più giovani sono più sensibili.

Batteri

Tra il vasto gruppo di batteri presenti in natura ed efficaci contro insetti, il più importante per la protezione delle piante dai fitofagi è la specie *Bacillus thuringiensis*, che produce un cristallo proteico contenente la cosiddetta delta-endotossina, responsabile della morte dell'insetto. Le spore (endospore) sono la forma di sopravvivenza di questo batterio, che gli permette di sopravvivere anche in condizioni ambientali avverse. I cristalli di endotossina e le spore delle varie sottospecie e ceppi di *B. thuringiensis* sono di solito gli ingredienti di base dei biopreparati a base di batteri. Vengono utilizzati contro diverse specie di fitofagi importanti: contro larve di lepidotteri siutilizza un isolato di *B. thuringiensis var. kurstaki*, contro le larve di ditteri si applica *B. thuringiensis var. israelensis* e contro le larve di coleottero il *B. thuringiensis var. tenebrionis*. Il cristallo in questione è un composto proteico che deve essere attivato prima di poter agire. In condizioni normali, questa proteina presenta una solubilità molto bassa, che la rende completamente sicura per l'uomo, gli animali superiori e la maggior parte degli insetti. Tuttavia, si dissolve facilmente in un ambiente alcalino (pH > 9,5), come quello che si trova nell'intestino medio, ad esempio, delle larve di lepidotteri. Pertanto, il B. thuringiensis è un agente di lotta a fitofagi molto specifico. La delta-endotossina danneggia l'epitelio intestinale dell'insetto e gli impedisce di assorbire il cibo. L'insetto smette di nutrirsi e nel suo corpo si sviluppano generazioni successive di batteri che lo portano alla morte nei giorni successivi. L'inibizione dell'alimentazione e la morte ritardata dell'insetto sono una caratteristica dell'infezione da questo batterio.

L'uso di batteri è stato studiato anche per il contenimento di malattie fogliari ed alcuni batteri antagonisti hanno mostrato un potenziale a questo scopo. Ad esempio, in uno studio sulla lotta biologicaalle malattie radicali e fogliari del pomodoro, è stato rilevato che consorzi microbici contenenti *Pseudomonas chlororaphis* e *Pseudomonas azotoformans* hanno dimostrato effetti antagonisti contro il patogeno fogliare *Botrytis*

cinerea quando sono stati applicati come spray fogliare. Questi trattamenti hanno ridotto l'area delle lesioni necrotiche causate da *B. cinerea*, con i consorzi microbici che hanno ottenuto una riduzione fino al 70% dell'area delle lesioni (Minchev et al. 2021).

Inoltre, anche i batteri del genere Bacillus (ad esempio *B. subtilis, B. amyloliquefaciens*) sono comunemente utilizzati nella protezione delle piante dalle malattie. Questi batteri svolgono un'attività antifungina producendo vari composti (sostanze biocide, enzimi, sostanze chimiche) che inibiscono la crescita dei patogeni, competono con questi ultimi per il cibo e lo spazio vitale e inducono resistenza nelle piante. L'uso dei batteri Bacillus nella protezione delle piante è spesso parte di strategie di coltivazione sostenibili, poiché questi batteri sono sicuri per l'ambiente e non hanno effetti negativi su altri organismi. Inoltre, la ricerca ha dimostrato il potenziale degli agenti batterici di di lotta, come i ceppi di Bacillus e Pseudomonas, nel ridurre l'incidenza e la gravità delle comuni malattie batteriche quando vengono applicati come spray fogliari (Minchev et al. 2021).

Lieviti

I lieviti più comunemente utilizzati per il contenimento delle malattie delle piante nell'UE sono *Candida oleophila, Aureobasidium pullulans, Metschnikowia fructicola, Cryptococcus albidus* e *Saccharomyces cerevisiae* (Freimoser et al. 2019). Queste specie di lieviti sono state riconosciute per il loro potenziale come agenti di lotta biologica contro vari patogeni vegetali, evidenziando la loro importanza nelle pratiche di agricoltura sostenibile. *Candida oleophila*, ad esempio, è nota per la sua forte attività antagonista contro i marciumi e le infezioni post-raccolta delle pomacee. *Aureobasidium pullulans* è stato utilizzato per il contenimento di vari patogeni vegetali, tra cui funghi e batteri, ed è stato registrato per l'uso nell'UE come mezzo di lotta contro *B. cinerea* su uva, pomodoro e fragola. *Metschnikowia fructicola* è risultato efficace nel contenimento delle malattie post-raccolta della frutta, come mele e pere. È stato dimostrato che *Cryptococcus albidus* ha un'attività antagonista nei confronti di vari patogeni vegetali. *Saccharomyces cerevisiae*, comunemente noto come lievito di birra, è stato utilizzato per il contenimento di vari patogeni vegetali, tra cui funghi e batteri, e diversi formulati contenenti cellule essiccate di lievito sono anche utilizzati come elicitori induttori di resistenza. Queste specie di lievito sono state registrate per l'uso nell'UE come mezzi biologici di lotta grazie alla loro attività antagonista nei confronti di vari patogeni vegetali, alle esigenze di coltivazione poco impegnative ed in quanto destano limitate preoccupazioni in materia di biosicurezza. L'uso di queste specie di lievito come agenti di lotta biologica può contribuire a ridurre l'uso di mezzi chimici, che possono avere effetti negativi sulla salute umana e sull'ambiente (Kowalska et al. 2022). Pertanto, l'uso di lieviti in lotta biologica rappresenta un approccio promettente per lo sviluppo di pratiche agricole sostenibili (Kowalska et al. 2022).

Funghi

Oltre ai funghi che causano malattie pericolose alle piante, esiste un ampio gruppo di funghi che agiscono come antagonisti e parassiti di insetti dannosi e nematodi. Le infezioni fungine sono facilmente riconoscibili dall'aspetto caratteristico dell'insetto malato o morto, poiché molte specie producono micelio e spore all'esterno del corpo dell'ospite dopo la morte, ricoprendolo con un rivestimento spesso di colore caratteristico, ad esempio verdastro per *Metarhizium anisopliae* e bianco per *Beauveria bassiana*.

Il ciclo di sviluppo della maggior parte dei funghi entomopatogeni è simile: lo stadio infettivo è di solito la spora che, dopo aver raggiunto la cuticola dell'insetto, germina ed entra nell'insetto attraverso il tubulo germinativo . Dopo essere entrato nel corpo dell'ospite, il fungo si moltiplica nell'emolinfa portando alla paralisi dell'insetto, che muore dopo qualche tempo. Dopo la morte dell'insetto, un abbondante micelio si sviluppa sulla superficie dell'insetto, dando origine a nuove spore che possono essere trasportate dal vento, dall'acqua, da insetti e altri animali.

Delle quasi 100.000 specie di funghi attualmente conosciute, circa 800 sono funghi entomopatogeni, di cui circa 12-15 specie sono utilizzate per la lotta biologica contro gli insetti dannosi per le piante, soprattutto nelle colture in serra, ma anche in campo. I funghi entomopatogeni sono molto comuni nell'ambiente e svolgono un ruolo cruciale riducendo le popolazioni di insetti. Le specie più comuni sono Beauveria bassiana, Beauveria brongniartii, Metarhizium anisopliae, Paecilomyces farinosus, Isaria fumosorosea e *Verticillium lecanii*, utilizzate in misura maggiore o minore nei preparati biologici. I funghi entomopatogeni sono molto sensibili alla temperatura e all'umidità. Agiscono per contatto e devono trovarsi sulla superficie del corpo dell'insetto per germinare e penetrare nell'insetto per causarne la morte. A causa del requisito di avere un microclima adeguato, nella pratica i preparati fungini sono utilizzati principalmente nelle serre, anche se ci sono molte segnalazioni della loro buona efficacia in condizioni di campo, come ad esempio l'impiego di *B. brongniartii* per ridurre le popolazioni di larve di coleottero. Nelle colture di copertura vengono utilizzati per ridurre le popolazioni di aleurodidi e nelle colture in pieno campo anche di dorifora della patata, fitofagi e batteriosi su cavolo. È stato rilevato che ogni anno circa il 30% delle popolazioni di afidi dei cereali sono infettate da funghi entomopatogeni. Epizoozie causate da questo gruppo di funghi sono state osservate anche in popolazioni di falena del melo, coleottero degli alveari, cimice dei cavoli e altri fitofagi.

Nella lotta biologica delle piante contro i patogeni, i più utilizzati sono i ceppi di Trichoderma. Ad esempio, le ricerche condotte da vari centri scientifici in tutto il mondo hanno dimostrato che i ceppi di Trichoderma o i loro metaboliti secondari presentano una forte attività antagonista nei confronti di vari funghi patogeni per le piante, competono con gli organismi patogeni e ne riducono la crescita attraverso meccanismi quali la produzione di sostanze biocide ed enzimi che degradano le pareti cellulari di altri funghi, migliorano la crescita delle piante e promuovono lo sviluppo dell'apparato radicale. Il Trichoderma può anche indurre una resistenza sistemica innescando meccanismi di difesa della pianta. Ciò include l'attivazione di vie di segnalazione che portano alla produzione di composti legati alla difesa, rendendo le piante più resistenti alle infezioni da parte di microrganismi patogeni. Questo genere è noto anche per la sua capacità di produrre una varietà di enzimi come chitinasi, glucanasi e proteasi, che svolgono un ruolo cruciale nella rottura delle pareti cellulari dei funghi patogeni, contribuendo al contenimento delle malattie (Waghunde et al. 2016; Zin e Badaluddin 2020).

Ampelomyces quisqualis è un altro esempio di fungo antagonista che si è dimostrato efficace contro patogeni fogliari come i mal bianchi. Agisce come iperparassita, infettando e parassitando altri funghi, contenendo così un'ampia gamma di malattie delle pianteche colpiscono le foglie. *Clonostachys rosea* è stata studiata anche per il suo potenziale effetto di lotta biologica contro vari patogeni fogliari. Utilizza molteplici meccanismi, tra cui il micoparassitismo, l'antibiosi e la resistenza indotta, per limitare malattie fogliari in diverse colture (Elad 2003).

Sfide associate all'utilizzo di funghi antagonistiper il contenimento delle malattie fogliari

- Variabilità e incoerenza: L'uso su larga scala dei funghi antagonistiè limitato dalla variabilità e dall'incoerenza della loro attività di contenimento, che può essere influenzata da fattori ambientali. Questa variabilità ostacola la loro applicazione su larga scala.
- Sensibilità alle influenze ambientali: Alcuni funghi antagonisti sono sensibili alle condizioni ambientali, che possono influire sulla loro efficacia. Questa sensibilità può rappresentare una sfida per mantenere un effetto costante sulla malattia in condizioni ambientali variabili.
- Integrazione con i mezzi chimici: L'integrazione del mezzo biologico con quelli chimici in base al calendario o ai requisiti ecologici può essere impegnativa. Sebbene questa integrazione possa migliorare il contenimento della malattia, richiede una gestione attenta per garantire la compatibilità e l'efficacia di entrambi i metodi di lotta.

Fig. 2.3. Foto di adulto di Otiorhynchus sulcatus *infettato da* Beauveria bassiana
Autore: Małgorzata Tartanus

Fig. 2.4. Foto di larve di Melolontha melolontha *infettate da* Beauveria bassiana
Autore: Małgorzata Tartanus

4. Capacità multifunzionale dei microrganismi: un'opportunità per la gestione integrata dei parassiti

In passato, la lotta biologica con microrganismi consisteva generalmente nell'utilizzo di un singolo ceppo di batteri o funghi, anche a seguito di normative che consideravano i prodotti a base di microrganismi simili ai mezzi chimici di lotta. L'efficacia degli inoculi microbici, soprattutto quelli applicati come singoli ceppi nell'ambiente, varia notevolmente. Pertanto, attualmente, la tendenza principale nella protezione delle piante è l'uso di inoculi costituiti da più microrganismi con diverse modalità d'azione per aumentare l'efficacia dei prodotti microbici ed estendere lo spettro di attività verso varie specie di patogeni. I consorzi possono essere progettati come una miscela di diversi ceppi appartenenti alla stessa specie o composti da specie di generi diversi (Sarma et al. 2015; Minchev et al. 2021; Ptaszek et al. 2023).

I consorzi basati sulla complessità di microrganismi utili potrebbero potenzialmente potenziare gli effetti della lotta biologica, perché batteri e funghi diversi hanno meccanismi d'azione distinti. Inoltre, i diversi microrganismi occupano nicchie distinte nella zona radicale, riducendo così la competizione tra loro (Sarma et al. 2015; Minchev et al. 2021). I consorzi sono superiori alla formulazione di un singolo ceppo a molti livelli. Possono indurre diversi meccanismi d'azione in base ai vari microrganismi presenti, che a volte possono includere anche meccanismi di protezione delle piante (ad esempio, antagonismo verso i patogeni o induzione di processi metabolici che aumentano la tolleranza ai patogeni o rendono la pianta meno "appetibile" ai parassiti), e possono quindi essere considerati prodotti "multifunzionali" (Kowalska et al. 2020; Minchev et al. 2021).

Diversi mezzi biologici di lotta, tra cui alcuni funghi entomopatogeni (ad esempio *Beauveria spp.*) e batteri (ad esempio *Bacillus thuringiensis*), attualmente utilizzati nella protezione delle colture, hanno mostrato effetti di stimolazione della crescita delle piante (Kowalska et al. 2020). Il duplice effetto di protezione delle piante e di promozione dell'assorbimento dei nutrienti è stato osservato in alcuni studi con ceppi di Trichoderma. Tra i batteri utilizzati per la protezione dai patogeni, i batteri del genere *Bacillus hanno*, in generale, un'applicazione commerciale come antagonisti, ma sono anche attivi nel promuovere la crescita delle piante.

La capacità multifunzionale dei microrganismi offre una strada promettente per lo sviluppo di alternative innocue e sostenibili nell'ambito della difesa integrata. L'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO) ritiene che la difesa integrata sia la migliore combinazione di strategie di lotta ai patogeni ed ai fitofagi, tenendo conto della resa, del profitto e del profilo di sicurezza. Numerose prove sul campo e applicazioni pratiche dimostrano il successo dell'integrazione dei microrganismi nei programmi di lotta integrata. Questi studi dimostrano la fattibilità e l'efficacia dell'uso dei microrganismi in diversi contesti agricoli. I microrganismi sono un elemento chiave nel mantenimento dell'equilibrio biologico dell'agroecosistema. Sfruttando i diversi meccanismi d'azione dei microrganismi, è possibile sviluppare strategie sostenibili per il contenimento di fitofagi e patogeni, promuovendo la salute dell'ambiente e garantendo la sostenibilità a lungo termine dell'agricoltura. La multifunzionalità dei microrganismi si estende al ciclo dei nutrienti e alla salute del suolo. Tuttavia, la produzione e la commercializzazione di consorzi microbici presenta alcuni problemi tecnici per i produttori e, soprattutto, aspetti normativi da risolvere.

I microrganismi benefici della rizosfera svolgono un ruolo importante nell'alleviare gli stress biotici delle piante, rendendo interessante il loro utilizzo come inoculi per ridurre l'uso di mezzi chimici di lotta in agricoltura. I meccanismi di riduzione dei patogeni da parte dei microrganismi nella rizosfera sono diversi (Ptaszek et al. 2023). Alcuni si basano sull'interferenza diretta dei microrganismi benefici con la proliferazione dei patogeni nella rizosfera attraverso vari meccanismi di competizione, ad esempio per i nutrienti o lo spazio, o la produzione di sostanze biocide. I meccanismi indiretti si basano sull'induzione di cambiamenti nella pianta ospite che alterano la suscettibilità della pianta al patogeno, ad esempio inducendo una resistenza sistemica nella pianta.

D'altra parte, molti microrganismi che favoriscono la crescita delle piante svolgono anche funzioni di protezione. L'osservazione che la colonizzazione delle radici da parte dei funghi micorrizici non è sempre associata a un miglioramento della nutrizione e della crescita delle piante ha portato a concludere che una maggiore tolleranza agli stress biotici è un altro importante beneficio della simbiosi. L'aumento della resistenza delle piante micorrizate all'infezione da parte di patogeni del suolo è stato collegato all'accumulo di fitoalessine, flavonoidi e isoflavonoidi nei tessuti radicali colonizzati da questi funghi. La difesa biologica con funghi micorrizici è stata dimostrata anche sui nematodi parassiti delle piante, ad esempio riducendo le popolazioni di *Meloidogyne incognita* o *Pratylenchus penetrans* (45% e 87%) nelle radici micorrizate rispetto a quelle non micorrizate. La complessità o multifunzionalità della relazione tra pianta ospite e funghi micorrizici è stata dimostrata, ad esempio, in uno studio in cui le piante di pomodoro micorrizate in presenza del patogeno *Alternaria solani* hanno mostrato livelli di malattia significativamente inferiori rispetto alle piante non micorrizate. Al contempo l'aumento delle dosi di fertilizzante fosfatico, parallelamente alla riduzione della formazione di micorrize, ha portato a un aumento della gravità della malattia anche nelle piante micorrizate. L'induzione di risposte di difesa nelle piante da parte dei funghi micorrizici è stata

dimostrata anche negli organi epigei: ad esempio, le larve di tignola del pomodoro (*Helicoverpa armigera*) allevate sulle foglie di piante micorrizate erano significativamente più piccole (riduzione del peso del 62,3%) rispetto a quelle allevate su piante non micorrizate.

In questo quadro, che comprende aspetti scientifici, commerciali e normativi, lo sviluppo di strumenti per il monitoraggio dei microrganismi introdotti diventa estremamente importante, soprattutto per garantire la corretta valutazione dei rischi per l'ambiente e la salute umana, ma anche per valutarne la sostenibilità, aspetto utile per determinare il metodo di applicazione ottimale (tempi e dosi) che consenta la massima efficacia. La ricerca a questo scopo, che si avvale anche di metodi innovativi, è in corso e si può quindi prevedere che i sistemi di supporto alle decisioni (DSS) saranno messi a disposizione di tecnici e agricoltori per migliorare l'applicazione e l'efficacia dei mezzi biologici di lotta.

In sintesi, i problemi associati all'insufficiente efficacia dei microrganismi antagonisti possono essere dovuti alla tecnologia di produzione (scelta dei ceppi, formulazione, applicazione e sopravvivenza) che non è stata completamente sviluppata. La pressione per ridurre l'uso di mezzi chimici di lotta e di fertilizzanti da fonti non rinnovabili porterà a un ulteriore sviluppo e miglioramento dei prodotti a base di microrganismi, nonostante le loro attuali limitazioni, e questi diventeranno una valida alternativa ai prodotti di sintesi. Si prevede inoltre che con il progresso tecnologico e la crescente conoscenza della vitalità dei microrganismi introdotti nell'ambiente, le attuali barriere all'uso di inoculi di microrganismi utili saranno superate.

Riferimenti

Bashan Y., Puente M.E., Rodriguez-Mendoza M.N., Toledo G., Holguin G., Ferrera-Cerrato R., Pedrin S. 1995. Survival of Azospirillum brasilense in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. Applied and Environmental Microbiology, 61(5), 1938-1945.

Bonaterra A., Badosa E., Daranas N., Francés J., Roselló G., Montesinos E. 2022. Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. Microorganisms, 10(9), 1759.

Deaker R., Roughley R.J., Kennedy I.R. 2004. Legume seed inoculation technology-a review. Soil biology and biochemistry, 36(8), 1275-1288.

de Faria M. R., Wraight S. P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological control, 43(3), 237–256.

Elad Y. 2003. Biocontrol of foliar pathogens: mechanisms and application. Communications in agricultural and applied biological sciences, 68(4, PART A), 17–24.

Food and Agriculture Organization for the United Nations. NSP—Integrated Pest Management. Available online: http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/ipm/en/ (accessed on 15 July 2024)

Freimoser F. M., Rueda-Mejia M. P., Tilocca B., Migheli Q. 2019. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 35 (10), 154.

Gilardi G., Tinivella F., Gullino M. L., Garibaldi A. 2005. Seed dressing to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* / Entwicklung eines Saatgutbehandlungsverfahrens zur Kontrolle von *Fusarium oxysporum* f. sp.

lactucae. Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection, 112(3), 240–246.

Graham J.H., Strauss S.L. 2021. Biological control of soilborne plant pathogens and nematodes. In: Gentry T.J., Fuhrmann J.J., Zuberer D.A. (eds.) Principles and applications of soil microbiology. Third Edition. Elsevier, pp 633-654.

Haas D., Défago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature reviews microbiology, 3(4), 307-319.

Handelsman J., Stabb E.V. 1996. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. The Plant Cell, 8(10), 1855.

Jaroński S.T. 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. BioControl, 55,159–185.

Karpouzas D.K., Vryzas Z., Martin-Laurent F. 2021. Pesticide soil microbial toxicity: setting the scene for a new pesticide risk assessment for soil microorganisms. (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, 94(10), 1161-1194.

Kowalska J., Tyburski J., Matysiak K., Tylkowski B., Malusà E. 2020. Field exploitation of multiple functions of beneficial microorganisms for plant nutrition and protection: real possibility or just a hope? Frontiers in Microbiology, 11, 1904.

Kowalska J. Krzymińska J. Tyburski J. 2022. Yeasts as a Potential Biological Agent in Plant Disease Protection and Yield Improvement—A Short Review. Agriculture, 12(9), 1404.

Malusà E., Berg G., Biere A., Bohr A., Canfora L., Jungblut A.D., Kępka W., Kinzle J., Kusstatscher P., Masquelier S., Pugliese M., Razinger J., Tommasini M.G., Vassilev N., Mayling N.V., Xu X., Mocali S. 2021. A holistic approach for enhancing the efficacy of soil microbial inoculants in agriculture: from lab to field scale. Global Journal of Agricultural Innovation, Research & Development, 8, 176-190.

Minchev Z., Kostenko O., Soler R., Pozo M.J. 2021. Microbial consortia for effective biocontrol of root and foliar diseases in tomato. Frontiers in Plant Science, 12, 756368.

Pandit M.A., Kumar J., Gulati S., Bhandari N., Mehta P., Katyal R., Rawat, C.D., Mishra, V., Kaur J. 2022. Major biological bontrol strategies for plant pathogens. Pathogens, 11(2): 273.

Panth M., Hassler S.C., Baysal-Gurel F. (2020). Methods for management of soilborne diseases in crop production. Agriculture, 10(1), 16.

Ptaszek M., Canfora L., Pugliese M., Pinzari F., Gilardi G., Trzciński P., Malusà E. 2023. Microbial-Based Products to Control Soil-Borne Pathogens: Methods to Improve Efficacy and to Assess Impacts on Microbiome. Microorganisms, 11(1), 224.

Pugliese M., Liu B.P., Gullino M.L., Garibaldi A. 2008. Selection of antagonists from compost to control soil-borne pathogens. Journal of Plant Diseases and Protection, 115, 220–228.

Regulation (EC) No 1107/2009 concerning the placing of plant protection products on the market. Available online: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1107/oj (accessed on 15 July 2024).

Regulation (EC) No 396/2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin. Available online: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/396/oj (accessed on 15 July 2024).

Rostas M., Hilker M. 2003. Indirect interactions between a phytopathogenic and an entomopathogenic fungus. Naturwissenschaften, 90, 63–67

Sarma B.K., Yadav S.K, Singh S., Singh H.B. 2015. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. Soil Biology & Biochemistry 87, 25-33.

Sellitto V.M., Zara S., Fracchetti F., Capozzi V., Nardi T. 2021. Microbial biocontrol as an alternative to synthetic fungicides: boundaries between pre- and postharvest applications on vegetables and fruits. Fermentation 7(2), 60.

Świechowski W., Doruchowski G., Trzciński P. 2012. Effect of spray application parameters on viability of bacterium Pseudomonas fluorescens used as bio-pesticide in organic fruit production. In: Granatstein D., Andrews P. (eds.) Proc. II Int. Congress on Organic Fruit Research Symposium. ISHS, Leavenworth WA, USA, pp. 18-21.

Trivedi P., Leach J.E., Tringe S.G., Sa T., Singh B.K., 2020. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. Nature reviews microbiology, 18(11), 607–621.

Waghunde R.R., Shelake R.M., Sabalpara A.N. 2016. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. African Journal of Agricultural Research, 11(22): 1952-1965.

Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Science and Technology, 17(6),533–596.

Zin N.A., Badaluddin N.A. 2020. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. Annals of Agricultural Sciences 65(2), 168-178.

Capitolo 3. Microrganismi per la promozione della crescita delle piante

Samuel Bickel[1], Paweł Trzciński[2], Stefano Mocali[3]

[1]Université de technologie de Graz, Petersgasse 12, 8010 Graz, AUSTRIA
[2]Institut d'horticulture - Institut national de recherche, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, POLONIA
[3]Council for Agricultural Research and Economics, Centre de recherche sur l'agriculture et l'environnement, Via di Lanciola 12/A, 50125 Cascine del Riccio, ITALIA

I microrganismi del suolo, della rizosfera e delle piante svolgono un ruolo cruciale nel promuovere la crescita delle piante e l'agricoltura. In questo capitolo spieghiamo come i microrganismi e i ceppi commerciali comunemente utilizzati possono promuovere la crescita delle piante. Si affronta lo sfruttamento e la selezione di pre-, pro- e postbiotici per la promozione della crescita delle piante e il miglioramento della fertilità e della salute del suolo. Infine, vengono discussi gli aspetti pratici per una corretta applicazione dei microrganismi promotori della crescita delle piante.

1. Microrganismi in grado di promuovere la crescita delle piante

I microrganismi promotori della crescita delle piante (PGPM) sono un gruppo chiave di batteri e funghi che contribuiscono in modo significativo a migliorare la crescita delle piante (Glick 2012). L'utilizzo di ceppi commerciali di PGPM e la ricerca in corso su nuovi microrganismi possono migliorare la nostra comprensione di come questi microbi benefici possano essere sfruttati per migliorare la sostenibilità agricola e la produttività delle colture. I tre gruppi principali di PGPM sono:

1. Rizobatteri promotori della crescita delle piante che colonizzano la superficie delle radici delle piante.
2. Batteri endofiti che vivono all'interno della pianta ospite.
3. Funghi micorrizici che formano relazioni simbiotiche con le radici delle piante.

Inoltre, la diversità microbica del suolo e delle piante svolge un ruolo cruciale nel promuovere la crescita delle piante attraverso vari meccanismi che ne favoriscono la salute e lo sviluppo. Una comunità microbica diversificata nella rizosfera può aumentare la disponibilità di nutrienti per le piante. Questa comunità diversificata comprende microrganismi in grado di promuovere la crescita delle piante facilitando l'assorbimento e la ciclicità dei nutrienti. Un'elevata diversità microbica tassonomica e funzionale nella rizosfera è associata alla soppressione delle malattie causate da patogeni presenti nel suolo e può promuovere la crescita delle piante. La diversità e l'attività delle comunità microbiche possono contribuire a migliorare le prestazioni delle piante e a ridurre l'incidenza delle malattie, favorendo in ultima analisi la crescita e la salute delle piante. L'abbondanza di microbi benefici nel suolo è correlata positivamente con la qualità del suolo, che porta a una migliore crescita delle piante, a una minore incidenza di malattie e a un migliore contenuto di nutrienti. La presenza di comunità microbiche diverse influenza le proprietà biologiche e chimiche del suolo e contribuisce a migliorare la salute delle piante e il funzionamento generale dell'ecosistema. Inoltre, la comunità microbica del suolo può avere un impatto sulle dinamiche della comunità vegetale e sui processi dell'ecosistema. Le interazioni tra le piante e una comunità microbica diversificata possono modellare i tratti delle piante e influenzarne l'adattamento nel tempo.

Le intricate interazioni tra le piante e le diverse comunità microbiche sottolineano l'importanza della diversità microbica nel sostenere la salute delle piante e il funzionamento dell'ecosistema.

1.1. Modalità d'azione: come i microrganismi promuovono la crescita delle piante?

Come già accennato, i microrganismi svolgono un ruolo cruciale nel promuovere la crescita delle piante attraverso vari meccanismi. Questi meccanismi comprendono la produzione di fitormoni, l'aiuto nell'acquisizione dei nutrienti, la resistenza sistemica contro gli agenti patogeni e la protezione dalle sollecitazioni.

Fitormoni

Uno dei modi principali con cui i microrganismi promuovono la crescita delle piante è la produzione di fitormoni. I fitormoni sono molecole di segnalazione che regolano vari aspetti della crescita e dello sviluppo delle piante. Molti PGPM possono sintetizzare fitormoni come auxine, citochinine e gibberelline, che influenzano i processi di crescita delle piante. Ad esempio, *Azotobacter spp., Rhizobium spp., Pantoea agglomerans, Rhodospirillum rubrum, Pseudomonas fluorescens, Bacillus subtilis* e *Paenibacillus polymyxa* sono stati segnalati per sintetizzare citochinine, che sono fitoormoni essenziali che influenzano i processi di crescita delle piante, come la divisione, l'allungamento e la differenziazione delle cellule (Glick 2012). Diverse specie batteriche sono in grado di produrre composti indolici, come il fitormone auxina, l'acido indolo-3-acetico (IAA), che svolge un ruolo importante nelle interazioni batterio-pianta e può stimolare la crescita delle piante (Souza et al. 2015). La produzione di IAA da parte di Pseudomonas putida è stata associata a un aumento significativo dei parametri di crescita e della resa delle piante di pomodoro. Altri taxa, come le specie di bacilli associate alla rizosfera del grano (tra cui *Bacillus endophyticus, Paenibacillus xylanexedens, Planococcus citreus, Planomicrobium okeanokoites, Sporosarcina sp.* e *Staphylococcus succinus*) presentano attributi multifunzionali di promozione della crescita delle piante, tra cui potenzialmente la produzione di fitormoni. Le PGPM in grado di sintetizzare fitormoni possono contribuire a migliorare la crescita e lo sviluppo delle piante attraverso molteplici meccanismi.

Acquisizione di sostanze nutritive

Un'altra modalità d'azione essenziale con cui i microrganismi migliorano la crescita delle piante è la promozione dell'acquisizione dei nutrienti da parte delle piante. Ad esempio, i PGPM possono solubilizzare i minerali contenenti fosforo, fissare l'azoto atmosferico e produrre siderofori che chelano il ferro per renderlo più accessibile alle radici delle piante. Migliorando la disponibilità dei nutrienti, questi microrganismi favoriscono così la crescita e lo sviluppo generale delle piante. Gli inoculanti microbici con proprietà di promozione della crescita radicale e di mobilizzazione dei nutrienti sono stati proposti come strategia per migliorare l'acquisizione dei nutrienti da parte delle piante. Interagendo con i fertilizzanti organici e inorganici, questi inoculanti possono facilitare l'assorbimento dei nutrienti da parte delle piante e contribuire a migliorare la crescita e lo sviluppo.

È stato riportato che alcuni rizobatteri benefici aumentano l'assorbimento dei nutrienti da parte delle piante migliorando l'efficienza dell'assorbimento dell'azoto dai fertilizzanti, come dimostrato da studi che utilizzano tecniche isotopiche (15N) per tracciare il movimento dell'azoto nei tessuti vegetali. È interessante notare che gli inoculanti microbici contenenti *Bacillus spp.* e funghi micorrizici arbuscolari (AMF) possono migliorare la crescita e la resa delle piante, portando a una maggiore efficienza di assorbimento dei nutrienti. Questi PGPM

possono aiutare le piante a estrarre più nutrienti, tra cui azoto, fosforo e potassio, dal terreno, migliorando così l'acquisizione dei nutrienti. D'altra parte, *Sphingomonas spp.* che produce auxine e siderofori può migliorare la crescita delle piante e l'assorbimento dei nutrienti stimolando lo sviluppo dei peli radicali e delle radici laterali. Le diverse interazioni dei PGPM svolgono perciò un ruolo significativo nel migliorare l'assorbimento dei nutrienti da parte delle piante, favorendo in ultima analisi una migliore crescita, l'efficienza di assorbimento dei nutrienti e la salute generale delle piante.

Protezione dagli stress biotici e resistenza sistemica

I microrganismi possono anche contribuire alla crescita delle piante inducendo una resistenza sistemica nelle piante. Infatti, i PGPM possono attivare i meccanismi di difesa della pianta, rendendola più resistente a patogeni e malattie. Questa risposta di resistenza sistemica aiuta le piante a combattere varie tipologie di stress e a mantenere la loro salute e il loro vigore (Vacheron et al. 2013). I PGPM promuovono la resistenza sistemica nelle piante attraverso vari meccanismi, tra cui la produzione di siderofori, la secrezione di antibiotici, la generazione di fitormoni e l'attivazione di vie di resistenza sistemica. La capacità delle PGPM di produrre siderofori contribuisce ai loro effetti antagonisti contro i patogeni e supporta ulteriormente l'induzione della resistenza sistemica nelle piante. La resistenza sistemica indotta dai batteri della rizosfera conferisce una resistenza ad ampio spettro, migliorando la capacità delle piante di difendersi da diversi tipi di patogeni ed è stata osservata in una serie di specie vegetali tra cui arabidopsis, fagiolo, garofano, cetriolo, ravanello, tabacco e pomodoro. In questo caso, anche la diversità microbica a contatto con la pianta gioca un ruolo chiave, perché offre una variabilità per "allenare" il sistema immunitario della pianta. Innescando una resistenza sistemica indotta, la PGPM può potenziare i meccanismi di difesa della pianta e migliorare la sua resilienza contro gli attacchi dei patogeni.

Protezione dallo stress abiotico

Inoltre, i microrganismi proteggono le piante dallo stress abiotico, soprattutto in condizioni ambientali avverse. Colonizzando la rizosfera e interagendo con le radici delle piante, i PGPM possono aiutare le piante a tollerare gli stress abiotici come la siccità, la salinità e la tossicità dei metalli pesanti. Questa capacità di protezione dagli stress aumenta la resilienza delle piante e ne garantisce la sopravvivenza in ambienti difficili. È stato dimostrato che i batteri della rizosfera isolati da ambienti difficili migliorano la tolleranza alla siccità nel grano. Questi batteri aumentano la produzione di biomassa e riducono le emissioni di volatili da stress, contribuendo ad aumentare la resilienza alla siccità delle piante. Il biofilm dei batteri della rizosfera, insieme alla pacciamatura del suolo, svolge un ruolo protettivo contro lo stress da siccità (Timmusk et al. 2014). Ad esempio, *Paenibacillus polymyxa* isolato dal microbioma della rizosfera di orzo selvatico nel nord di Israele ha dimostrato la capacità di migliorare la resilienza delle piante alle condizioni di siccità, evidenziando il suo potenziale per promuovere la resistenza alla siccità nelle colture. Allo stesso modo, *Stenotrophomonas rhizophila* e altri microbi benefici dimostrano una forte capacità di colonizzare i tessuti radicali, permettendo ai batteri di interagire strettamente con la pianta ospite, potenzialmente facilitando lo scambio di composti benefici e migliorando la tolleranza allo stress della pianta. È stato dimostrato che *S. rhizophila* presenta una spiccata tolleranza alla salinità, producendo osmo-protettori molto efficaci come il glucosil-glicerolo, il trealosio e la spermidina, che aiutano la sopravvivenza delle piante in condizioni ambientali difficili. Questi agenti di protezione dallo stress promuovono la crescita della pianta e aiutano la protezione delle radici, contribuendo a migliorare la resilienza della pianta di fronte a vari fattori di stress (Alavi et al. 2013). In sintesi,

i PGPM utilizzano una combinazione di meccanismi, tra cui la produzione di osmo-protettori, per una maggiore adattabilità ambientale, la protezione delle radici dagli stress e la colonizzazione dei tessuti radicali, per proteggere le piante dallo stress e promuoverne la crescita e la sopravvivenza in ambienti difficili.

1.2. Ceppi commerciali di PGPM: tradurre la ricerca in applicazione

In ambito di ricerca, gli scienziati esplorano continuamente nuovi ceppi di microrganismi con capacità di promuovere la crescita delle piante. Questi ceppi "di ricerca" sono sottoposti a valutazioni rigorose per comprenderne i meccanismi d'azione, l'efficacia nel migliorare la crescita delle piante e le potenziali applicazioni in agricoltura. Studiando questi ceppi, i ricercatori mirano ad ampliare le conoscenze sulle interazioni pianta-microbo e a sviluppare strategie innovative per una produzione vegetale sostenibile. Gli inoculanti a base di PGPM hanno mostrato risultati promettenti per ridurre i tassi di applicazione di fertilizzanti chimici e sono in corso di ulteriore valutazione come componenti di strategie di gestione integrata dei nutrienti (Adesemoye et al. 2009).

In agricoltura, l'uso di ceppi specifici di PGPM sta acquisendo sempre maggiore importanza. Questi ceppi commerciali sono selezionati per la loro efficacia nel promuovere la crescita delle piante e migliorare la resa dei raccolti. Sfruttando gli effetti benefici di questi microrganismi, gli agricoltori possono aumentare la produttività e la sostenibilità delle loro pratiche agricole. Tra i PGPM più popolari utilizzati a livello commerciale vi sono *Rhizobia, Pseudomonas spp., Azotobacter spp., Bacillus spp., Trichoderma spp*. Questi inoculanti microbici disponibili in commercio sono comunemente usati come biofertilizzanti o prodotti "bioenhancer" che contengono specie singole o ceppi multipli di microrganismi benefici, ampiamente studiati per la loro capacità di promuovere la crescita delle piante, migliorare l'assorbimento dei nutrienti, aumentare la tolleranza delle piante agli stress e contribuire alla produzione sostenibile di colture in piccoli agroecosistemi. La Tabella 1 fornisce una panoramica dei più comuni PGPM, dei loro meccanismi d'azione e dei benefici che offrono alle piante.

Tab. 1. Microrganismi comuni promotori della crescita delle piante (PGPM).

Microrganismi	Meccanismi d'azione	Benefici per le piante	Esempio
Rizobatteri	• Produzione di fitormoni • Solubilizzazione dei nutrienti (ad es. fosforo) • Induzione della resistenza sistemica	• Miglioramento della crescita e dello sviluppo delle piante • Migliore assorbimento dei nutrienti • Maggiore resistenza agli agenti patogeni	*Il Bacillus subtilis produce fitormoni come le auxine, solubilizza nutrienti come il fosforo e induce una resistenza sistemica nelle piante.*
Batteri endofiti	• Stabilire strette associazioni con le piante • Produzione di sostanze stimolanti la crescita	• Miglioramento della crescita delle piante • Protezione da malattie e stress	*Pseudomonas fluorescens* stabilisce relazioni simbiotiche con le piante, secerne sostanze che favoriscono la crescita come l'acido indolo-acetico (IAA) e contribuisce all'assorbimento dei nutrienti.
Funghi micorrizici (arbuscoli)	• Facilita l'assorbimento dei nutrienti, in particolare del fosforo • Migliora la tolleranza delle piante agli stress	• Migliore acquisizione dei nutrienti • Maggiore resistenza delle piante alle sfide ambientali	*Rhizophagus irregularis* (ex *Glomus intraradices*) forma associazioni micorriziche arbuscole con le radici delle piante, facilitando l'assorbimento del fosforo e migliorando la tolleranza agli stress.

2. Sfruttare i pre, pro e postbiotici per la promozione della crescita delle piante e il miglioramento della fertilità e della salute del suolo

Negli ultimi 20-30 anni, un gran numero di PGPM sono stati isolati, caratterizzati e testati come biofertilizzanti e agenti di biocontrollo in condizioni controllate e naturali. I risultati hanno confermato l'effetto benefico dei microrganismi selezionati sulla crescita e sulla salute delle piante, sull'aumento del contenuto di nutrienti e sul miglioramento delle proprietà del suolo, come riportato nella sezione precedente. Attualmente, l'attività scientifica nel campo degli inoculanti microbici si concentra sullo sviluppo di formulazioni microbiche efficienti e rispettose dell'ambiente e sull'analisi di come i microrganismi introdotti nell'ambiente possano influenzare la comunità microbica, la biodiversità e le interazioni specifiche pianta-microrganismo.

In questo contesto, le attività del progetto Excalibur hanno affrontato la biodiversità da diversi punti di vista, concentrandosi sulla salute del suolo nell'orticoltura, rafforzando così i settori trasversali per integrare l'uomo, il suolo, le piante e gli ecosistemi verso un approccio "One Health". Considerando la complessità del sistema suolo, abbiamo superato la visione semplificata delle singole interazioni pianta-microbo o suolo-pianta e abbiamo considerato i fattori chiave che influenzano questo complesso ecosistema, tra cui la pianta, il suolo e gli organismi del suolo come un unico "meta-organismo" in grado di mediare e influenzare i vari scambi (flussi) che contribuiscono alla salute e alla produttività delle piante. Una combinazione di pre, pro e postbiotici è stata quindi applicata per gestire e stimolare il microbioma benefico nativo del suolo. In breve, abbiamo promosso "artificialmente" le funzioni biologiche e la diversità del suolo integrando le pratiche di gestione con formulazioni di nuova concezione contenenti bio-inoculi microbici benefici ("approccio probiotico") e bio-effettori ("approccio prebiotico"), per capire come influenzano la produttività delle colture, la biodiversità e la fertilità del suolo. L'"approccio prebiotico" si riferisce al miglioramento delle capacità delle piante di sfruttare la biodiversità circostante stimolando il microbiota del suolo e gli endofiti, mentre l'"approccio probiotico" introduce microrganismi benefici nel suolo/coltura per migliorare la nutrizione o la protezione delle piante. Excalibur ha affrontato questa sfida con un approccio sistemico, valutando: (i) come i sistemi di coltivazione influenzino la biodiversità del suolo e le sue dinamiche; (ii) come la biodiversità autoctona influenzi l'efficacia dei nuovi bioprodotti, soprattutto in termini di nutrizione e protezione delle piante; (iii) come le strategie di gestione delle colture che prevedono l'uso di bioinoculi possano essere migliorate per assicurare benefici costanti ai coltivatori a livello di azienda agricola e una rilevante protezione della biodiversità a livello regionale/territoriale.

L'attuazione di una strategia che integri prebiotici, probiotici e postbiotici può portare a diversi benefici per la crescita delle piante e la fertilità del suolo. I prebiotici e i postbiotici migliorano la disponibilità di nutrienti per le piante, sopprimono le malattie, migliorano la struttura del suolo e la tolleranza allo stress. Nel complesso, contribuiscono a un'agricoltura sostenibile promuovendo un microbioma del suolo sano, riducendo la dipendenza da fertilizzanti chimici e pesticidi e aumentando la resilienza delle piante agli stress ambientali. Tuttavia, è essenziale considerare fattori quali la compatibilità microbica, i metodi di applicazione e le condizioni ambientali quando si implementano strategie prebiotiche, probiotiche e postbiotiche in agricoltura. La ricerca continua è necessaria per ottimizzare questi approcci e comprendere i loro effetti a lungo termine sulla salute del suolo e sulla produttività delle piante.

2.1. Come selezionare un prebiotico, un probiotico o un postbiotico benefico per le piante?

Sulla base di queste considerazioni, si possono selezionare tre strategie per la gestione microbica dei sistemi suolo-pianta basate su prebiotici, probiotici e postbiotici (Fig. 3.2.).

Prebiotici

I prebiotici sono prodotti che migliorano la diversità microbica e la salute del suolo promuovendo la crescita dei microrganismi del suolo già presenti nel sistema suolo-pianta. I prebiotici sono prodotti naturali, normalmente rifiuti agroindustriali, tra cui biochar, fanghi di depurazione, compost, humus, letame animale e rifiuti contenenti chitina, che migliorano (soprattutto nei terreni degradati) la struttura del suolo, l'attività biochimica e aumentano la popolazione e la diversità microbica. Il compost e il letame animale, tuttavia, possono essere considerati prodotti "simbiotici", poiché contengono microrganismi (alcuni dei quali con proprietà benefiche). Anche gli inoculanti basati sulla fermentazione allo stato solido possono essere definiti simbionti, in quanto sono miscele multifunzionali di sostanza organica mineralizzata (con funzioni sia prebiotiche che di vettore) e microrganismi benefici per le piante (con funzioni probiotiche di promozione della crescita delle piante o di biocontrollo) (Vassileva et al. 2020). Ad esempio, quando il microrganismo probiotico è un agente solubilizzante del fosforo, la miscela simbiotica potrebbe essere ulteriormente arricchita con fosforo disponibile per le piante. Caratteristiche simbiotiche simili sono state osservate in inoculanti microbici incapsulati in gel naturali in presenza di additivi con azione stimolante per i microbi benefici.

Probiotici

I probiotici sono comunemente considerati microrganismi benefici che esercitano proprietà di promozione della salute e di mobilizzazione dei nutrienti. Una volta introdotti nel suolo, i probiotici devono sviluppare un livello critico di biomassa per esercitare le loro caratteristiche benefiche per le piante. Particolarmente interessanti sono i batteri con un'elevata attività enzimatica (ACC-deaminasi), produzione di fitormoni (auxine, citochinine, gibberelline) e metaboliti osmotici (ad esempio, trealosio, glicina betaina). Poiché la crescita microbica dipende dalle caratteristiche della pianta e dalle condizioni ambientali, sembra difficile che un singolo microrganismo o un consorzio microbico raggiunga il numero critico di cellule necessario. Pertanto, dopo un lungo periodo di studi sull'isolamento, la selezione e la caratterizzazione dei PGPM, i ricercatori si sono concentrati sullo sviluppo di processi biotecnologici economici per la produzione e la formulazione di biomasse/spore che garantiscano la sopravvivenza e la crescita dell'inoculo. Una delle tecniche di formulazione più promettenti è l'incapsulamento in macro e microsfere di polisaccaridi, che garantisce un rilascio continuo dell'inoculante nel suolo, prevenendo l'effetto dei fattori di stress del suolo e dell'ambiente, compresa la comunità microbica indigena. Dovrebbero essere sviluppati inoculanti doppi/multipli combinati con biostimolanti e altri additivi, compresi i semi (bioformulati intelligenti all-in-one), per completare i fertilizzanti chimici tradizionali. Un'altra opzione, per evitare problemi durante ogni fase di produzione, formulazione, stoccaggio e insediamento/azione delle PGPM nel suolo, è quella di utilizzare i loro metaboliti benefici per le piante (postbiotici).

Postbiotici

I postbiotici sono sottoprodotti metabolici o sostanze prodotte dai PGPM, che esercitano effetti specifici di promozione della crescita e/o di biocontrollo sulle piante, evitando così i rischi associati all'applicazione di

cellule microbiche. Esempi specifici di tali metaboliti sono i fitormoni, i volatili e i composti quorum-sensing. Quali sono i rischi dell'uso di microrganismi nei sistemi suolo-pianta? Procedure di formulazione errate, senza osmo-protettori, protettori dai raggi UV, riempitivi con valore nutritivo e altri additivi utili alle piante, possono provocare risultati incoerenti in condizioni di campo. Ulteriori rischi sono rappresentati da vari fattori abiotici e biotici, che influenzano il tasso di colonizzazione microbica, la presenza di altri componenti più competenti della popolazione microbica, il livello di fabbisogno della pianta e la capacità di attrarre e nutrire i microrganismi benefici. È importante notare che i protocolli per le applicazioni in campo dei PBM non assicurano che essi troveranno la loro nicchia di insediamento e funzione. Inoltre, non è ancora chiaro quale tipo di metaboliti i microrganismi introdotti rilasceranno nel sistema suolo-pianta. Questo complesso insieme di condizioni determina il tasso di sopravvivenza degli inoculanti e lo svolgimento delle loro funzioni obiettivo (Kaminsky et al. 2019). Analizzando tutti questi aspetti, sembra che i microrganismi endofiti siano più protetti dalle condizioni ambientali avverse e, inoltre, più efficienti dal punto di vista funzionale.

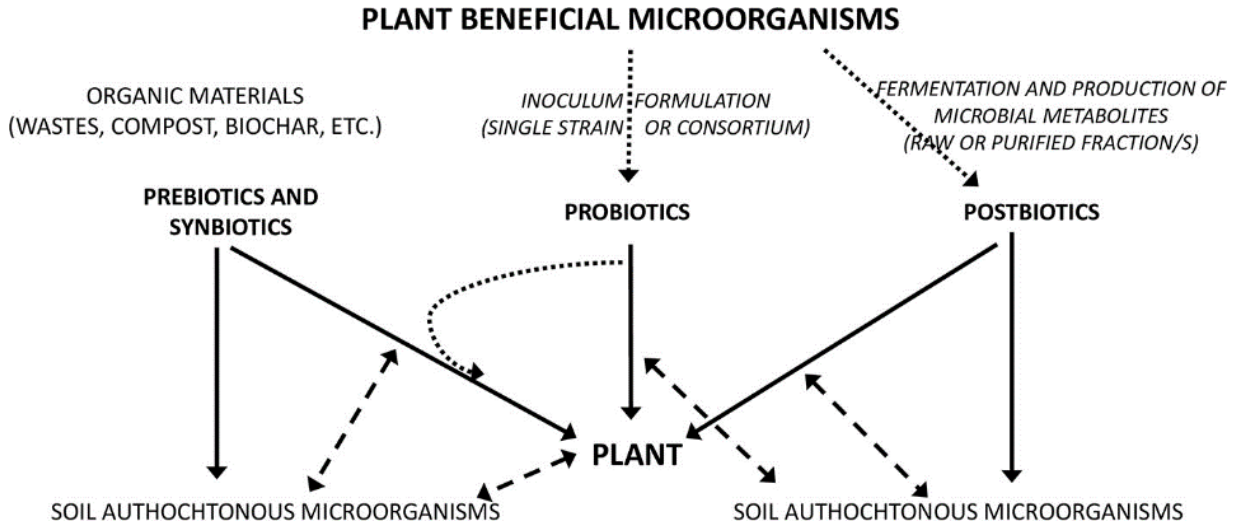

Fig. 3.2. Diagramma che mostra le tre strategie di gestione microbica del suolo e delle piante basate su approcci prebiotici, probiotici e postbiotici. Le linee solide indicano l'effetto diretto, quelle tratteggiate le interazioni, quelle tratteggiate i processi di formulazione/produzione (fonte: Vassileva et al. 2020).

3. Aspetti pratici per la corretta applicazione dei microrganismi promotori della crescita delle piante

Poiché i microrganismi sono esseri viventi, è fondamentale applicare correttamente i prodotti a base di essi per mantenerli vitali. Ci sono molti aspetti cruciali che influenzano la sopravvivenza e l'efficacia degli inoculi batterici e fungini, ma ci sono alcune regole generali:

1. Condizioni di conservazione corrette: l'esposizione dei preparati a temperature estreme, luce intensa o umidità può ridurre rapidamente il numero di cellule vitali nel prodotto.
2. Corretta applicazione di ciascun tipo di microrganismo: alcuni microrganismi benefici, come i funghi micorrizici arbuscolari (AMF), devono essere applicati direttamente nel terreno, preferibilmente vicino alla zona radicale. Altri, che agiscono come agenti di controllo biologico a contatto diretto o endofiti, possono essere spruzzati sulle foglie o su altre parti delle piante.
3. Condizioni climatiche adeguate: l'applicazione dei prodotti contenenti microbi deve essere simile all'uso dei prodotti fitosanitari, evitando temperature estreme, pioggia, ecc.

4. Pratiche agrotecniche: alcune pratiche possono diminuire l'efficacia degli inoculi microbici. Ad esempio, la concimazione, soprattutto con fosforo, inibisce la crescita delle AMF; l'applicazione contemporanea di prodotti fitosanitari e microrganismi benefici potrebbe distruggere parte o tutti i microbi.
5. Prevenzione: a differenza dei prodotti chimici di protezione o dei fertilizzanti, i prodotti a base di microrganismi non hanno un'azione rapida e devono essere utilizzati per la prevenzione. Inoltre, gli agenti di controllo biologico non agiscono come fungicidi sistemici e non possono essere utilizzati per "rimuovere" i patogeni dalle piante.

I metodi di trattamento possono essere suddivisi in base allo scopo: applicazione a spruzzo, trattamento del suolo o trattamento delle sementi. Inoltre, in alcuni casi, il trattamento differisce tra coltivazione in campo e in serra.

Applicazione a spruzzo

L'applicazione spray viene utilizzata principalmente per trattare le parti fuori terra delle piante. A causa delle condizioni difficili dovute all'esposizione alla luce solare, alla mancanza di fonti nutritive e all'essiccazione, i trattamenti devono essere ripetuti più volte durante la stagione vegetativa. Fanno eccezione i batteri endofiti, come quelli del genere Methylobacterium. Esiste anche la possibilità di applicare un inoculo sulla superficie del terreno per arricchirlo di microrganismi benefici. Tuttavia, questo metodo rischia di essere inefficace, poiché i microbi hanno difficoltà a penetrare nel terreno e/o a raggiungere la zona radicale. Il vantaggio del metodo di irrorazione è che è facile da eseguire con l'uso di comuni macchine agricole. Tuttavia, esistono delle limitazioni nell'uso di questo metodo. Una circolazione prolungata e intensa del liquido nel sistema di spruzzatura può causare la morte delle cellule batteriche a causa di danni meccanici (Doruchowski et al. 2015). Inoltre, le dimensioni delle gocce (la sopravvivenza più bassa è stata collegata alle gocce più piccole), la temperatura (la sopravvivenza più alta è stata notata a 12°C) e l'umidità relativa (il livello ottimale di umidità è stato del 70-80%) possono influenzare la sopravvivenza delle cellule batteriche (Marthi et al. 1990).

Trattamento delle sementi

Il trattamento delle sementi viene eseguito per inoculare le piante con microrganismi simbiotici, proteggerle da agenti patogeni o accelerare la germinazione dei semi. Esistono diversi metodi di trattamento dei semi, ma in generale questo metodo si basa sul rivestimento dei semi con l'inoculo mescolato con agenti leganti e, facoltativamente, con protettori cellulari. È comunemente usato per inoculare le piante con funghi micorrizici arbuscolari o legumi con batteri simbiotici azotofissatori come Rhizobium e Bradyrhizobium. Inoltre, i semi possono essere trattati con agenti di controllo biologico come *Trichoderma spp*. o *Bacillus spp*. per ridurre la possibilità di infestazione da parte di patogeni vegetali. Oltre all'inoculazione dei semi, la stessa tecnica può essere utilizzata per trattare le piantine durante il rinvaso o prima della messa a dimora. Il vantaggio del trattamento dei semi o delle piantine con batteri o funghi simbionti è che l'inoculazione viene effettuata per lo più una sola volta e, nella maggior parte dei casi, il trattamento dei semi può essere effettuato con l'uso di semplici macchinari. Al contrario, il trattamento delle piantine è più complicato, poiché le giovani piante sono fragili e richiedono lavoro umano o attrezzature specializzate.

Applicazione al suolo

L'applicazione al suolo viene utilizzata per applicare i microbi benefici direttamente nella zona radicale delle piante. Un altro metodo consiste nel mescolare i microrganismi al substrato di coltivazione per arricchirlo di batteri o funghi benefici (più comunemente eseguito in serra) prima di piantare le piante o i semi. L'applicazione dei microrganismi nel terreno (con fertilizzanti speciali o come preparazione microbica) può essere effettuata facilmente con l'uso di comuni macchinari agricoli. Tuttavia, a causa di limitazioni economiche, il dosaggio dei preparati commerciali, a seconda della formulazione, ammonta solitamente a diversi chilogrammi o litri per ettaro. Pertanto, il rapporto di microrganismi applicati per cm^3 di terreno è basso, poiché l'inoculo viene distribuito sull'intera superficie del campo (quindi, nei luoghi dove ci sono le piante e in quelli dove non ci sono). Al contrario, l'incorporazione diretta dell'inoculo nella zona radicale consente una maggiore concentrazione di microbi nel luogo in cui possono influenzare le radici o il microbioma della rizosfera. Con una maggiore concentrazione, i microrganismi introdotti hanno maggiori possibilità di successo nel suolo. Ad esempio, nel progetto Excalibur, l'agente di biocontrollo a base di Trichoderma è stato applicato alle buche di impianto poco prima di piantare le piantine. Dopo la stagione vegetativa, la popolazione di funghi nel terreno trattato era dominata dal fungo introdotto (Fig. 3.3.). Tuttavia, questo metodo è difficile da eseguire su piante già in crescita e richiede molto tempo e lavoro quando si applicano microrganismi a piantine trapiantate. I microrganismi più comunemente utilizzati nell'applicazione al suolo sono AMF, batteri azotofissatori, solubilizzatori del fosforo e agenti di controllo biologico.

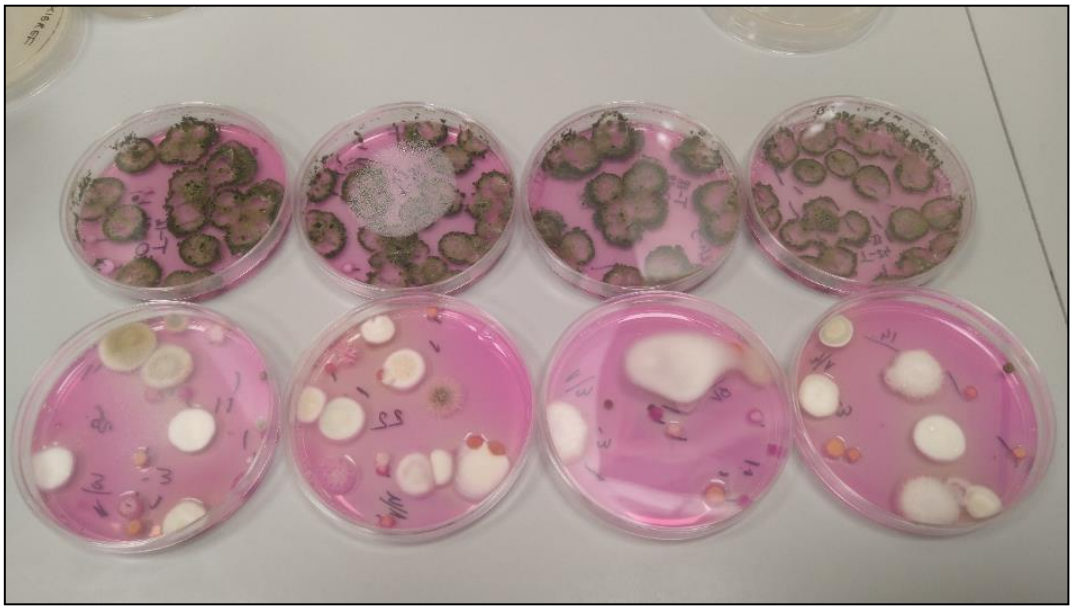

Fig. 3.3. Confronto delle popolazioni fungine nel terreno trattato con Trichoderma (fila superiore di capsule Petri) e nel terreno di controllo non trattato (fila inferiore di capsule Petri). Le colonie verdi appartengono al genere Trichoderma. Autore: Paweł Trzciński.

Un altro tipo di applicazione al suolo è l'introduzione di microrganismi attraverso i sistemi di fertirrigazione. Questo metodo è facile da eseguire, poiché i microrganismi vengono introdotti nelle piante con l'acqua di irrigazione. Tuttavia, lo svantaggio di questo metodo è che si possono usare solo formulazioni idrosolubili e, dopo ogni applicazione, tutti gli elementi del sistema di irrigazione devono essere risciacquati con acqua per

ripulirli dai residui dell'inoculo. I prodotti microbici, oltre ai batteri o ai funghi, contengono vettori o agenti di carica che spesso potrebbero essere utilizzati dai microrganismi come fonte di cibo e di energia. Di conseguenza, alcune parti del sistema di irrigazione, in particolare i gocciolatori, potrebbero essere intasate dalla biomassa. I microrganismi più comuni trovati negli erogatori a goccia intasati sono funghi del genere Trichoderma (Boari et al. 2008; Trzcinski et al. 2013).

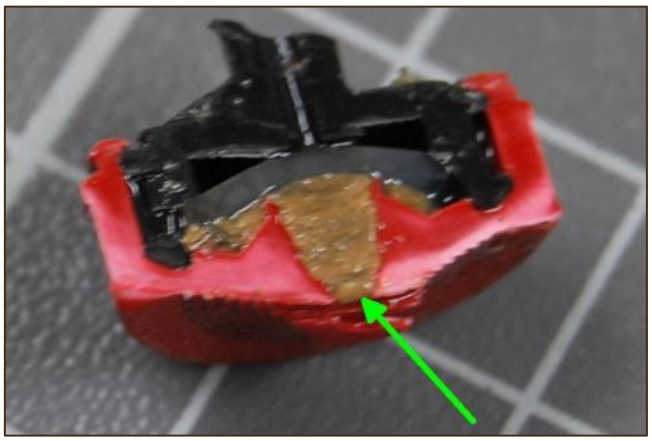

Fig 3.4. Gocciolatore intasato da biomassa fungina.
Autore: Paweł Trzciński.

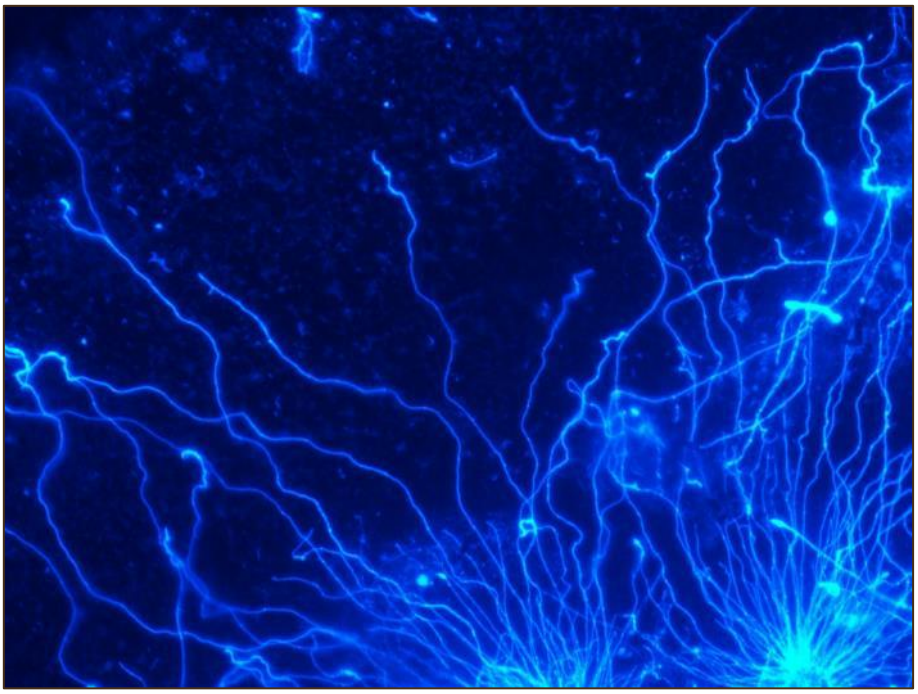

Fig 3.5a. Funghi che crescono sulla superficie interna del gocciolatore. Il preparato è stato colorato con KOH e calcofluor bianco e osservato al microscopio con luce UV.
Autore: Paweł Trzciński.

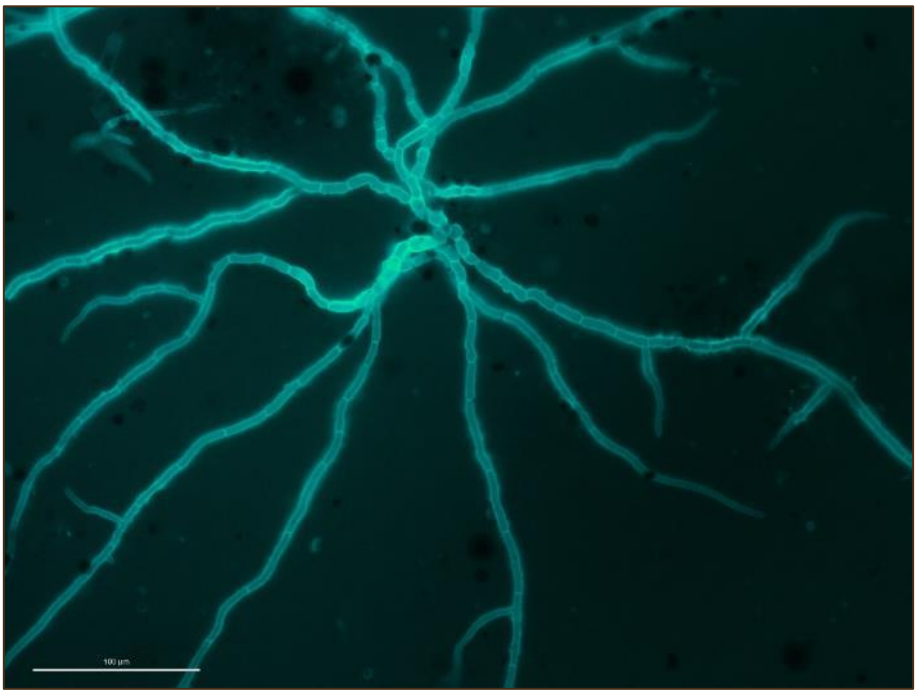

Fig 3.5b. Funghi che crescono sulla membrana del gocciolatore. Il preparato è stato colorato con KOH e calcofluor bianco e osservato al microscopio con luce UV.
Autore: Paweł Trzciński.

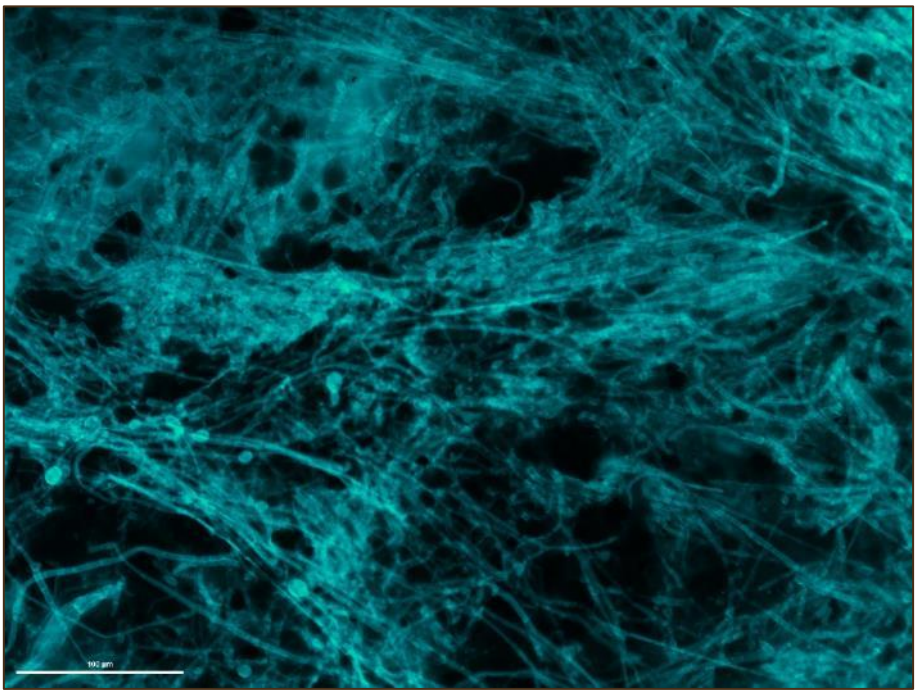

Fig. 3.6. Struttura della biomassa fungina raccolta dal gocciolatore intasato. Il preparato è stato colorato con KOH e calcofluor bianco e osservato al microscopio con luce UV.
Autore: Paweł Trzciński.

Riferimenti

Adesemoye A.O., Torbert H.A., Kloepper J.W. 2009. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. Microbial Ecology, 58(4), 921–929.

Alavi P., Starcher M. R., Zachow C., Müller H., Berg G. 2013. Root-microbe systems: the effect and mode of interaction of stress protecting agent (SPA) Stenotrophomonas rhizophila DSM14405T. Frontiers in plant science, 4, 141.

Boari A., Zuccari D., Vurro M. 2008. 'Microbigation': Delivery of biological control agents through drip irrigation systems. Irrigation Science, 26(2), 101–107.

Doruchowski G., Świechowski W., Trzciński P., Sas-Paszt L., Hołownicki R. 2015. Effect of spray application parameters on viability of rhizobacteria used as bio-pesticides in organic fruit production. 448, 60–61.

Glick B.R. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica, 2012, 1–15.

Kaminsky L. M., Trexler R. V., Malik R. J., Hockett K. L., Bell, T. H. 2019. The inherent conflicts in developing soil microbial inoculants. Trends in Biotechnology, 37(2), 140-151.

Marthi B., Fieland V. P., Walter M., Seidler R. J. 1990. Survival of bacteria during aerosolization. Applied and Environmental Microbiology, 56(11), 3463–3467.

Souza R.D., Ambrosini, A., Passaglia L.M.P. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Genetics and Molecular Biology, 38(4), 401–419.

Timmusk S., Abd El-Daim I. A., Copolovici L., Tanilas T., Kännaste A., Behers L., Nevo E., Seisenbaeva G., Stenström E., Niinemets Ü. 2014. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. PLOS ONE, 9(5), e96086.

Trzcinski P., Sas-Paszt L., Treder W. 2013. Mikrobiologiczne przyczyny zapychania się kroplowników. Hasło Ogrodnicze, 02.

Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.L., Touraine B., Moënne-Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dyé F., Prigent-Combaret C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. Frontiers in Plant Science, 4, 356.

Vassileva M., Flor-Peregrin E., Malusá E., Vassilev N. 2020. Towards Better Understanding of the Interactions and Efficient Application of Plant Beneficial Prebiotics, Probiotics, Postbiotics and Synbiotics. Frontiers in Plant Science, 11, 1068.

Capitolo 4. Tecnologia di produzione di prodotti microbiologici

Katarzyna Góralska[1], Magdalena Jopek[1], Anna Gierut-Kot[1], Jakub Drewniak[1], Roksana Rakoczy-Lelek[1], Maria Bylica[1], Radosław Wilk[1]

[1]INTERMAG sp. z o.o., Al. 1000-lecia 15G, 32-300 Olkusz, POLONIA

Questo capitolo presenta l'affascinante campo della tecnologia microbica, che non solo trasforma il modo in cui guardiamo ai microrganismi, ma ha anche il potenziale per avere un impatto rivoluzionario sulla nostra realtà quotidiana. Comprendendo e facendo progredire questo campo, possiamo aprire le porte a scoperte, prodotti innovativi e sostenibilità su scala globale.

1. Tipi di formulazione (in un contesto pratico - per cosa, quali usiamo e perché)

Nella progettazione e nello sviluppo di prodotti microbiologici con proprietà benefiche per le piante, i punti chiave per ottenere un buon prodotto finale sono (Vassileva et al. 2021):

1. Isolamento e caratterizzazione di un ceppo microbico efficiente.
2. Sviluppo di un processo di fermentazione efficiente per la produzione di biomassa e/o spore.
3. Una procedura di formulazione efficiente.

L'aspetto meno studiato, ma di impatto decisivo, è la selezione della tecnica di formulazione adeguata per garantire la massima efficienza e stabilità del prodotto nei sistemi suolo-pianta. Tra le formulazioni disponibili sul mercato, dominano i prodotti liquidi e solidi (Ibañez et al., 2023). La scelta della procedura di formulazione è interconnessa con la modalità di fermentazione: è il processo tecnologico, che alla fine produce le biomasse/spore, che deve essere formulato. Ad esempio, alcune aziende producono prodotti di biocontrollo contenenti spore basati sulla fermentazione allo stato solido, mentre altre aziende preferiscono prodotti contenenti cellule liquide basati sulla fermentazione liquida sommersa.

Le formulazioni liquide si basano su soluzioni acquose, soluzioni oleose o emulsioni olio-acqua, con un uso meno frequente di polimeri. I microrganismi in soluzioni liquide spesso richiedono additivi come soluzioni nutritive contenenti nutrienti di base o sostanze che stabilizzano l'intera formulazione (Chaudhary et al. 2020). Al contrario, è necessario utilizzare materiali di supporto per favorire la persistenza dei microrganismi nel caso di prodotti a flusso libero. Questi materiali devono essere neutri dal punto di vista ambientale e caratterizzati da una struttura porosa specifica che trattenga cellule e spore. Materiali come torba, talco, lignite, caolinite e zeolite sono supporti comunemente utilizzati. In INTERMAG, utilizziamo i batteri per formare formulazioni sfuse, ottenute mediante essiccazione della biomassa a basse temperature e pressione (liofilizzazione). Va detto che i vettori utilizzati nelle formulazioni sfuse aumentano il tasso di sopravvivenza dei batteri, proteggendoli dalle variazioni del contenuto di umidità e aumentando il volume del prodotto, con conseguente dispersione uniforme dei microrganismi durante l'applicazione (Singleton et al. 2022), aumentandone così lo sviluppo e l'efficacia nei sistemi suolo-pianta.

Le formulazioni liquide e a flusso libero hanno caratteristiche uniche che devono essere considerate quando si produce un prodotto microbico. Ciò che non viene discusso nei lavori scientifici è che la forma liquida dei prodotti consente una preparazione più accessibile e rapida del liquido di lavoro per l'applicazione. Inoltre, non richiede la preparazione preventiva di uno slurry, come nel caso delle formule a flusso libero. Un altro

importante vantaggio è che le formulazioni liquide presentano una migliore miscibilità con altri agrofarmaci, riducendo il rischio di intasamento degli ugelli durante l'irrorazione. Dal punto di vista pratico, il minor rischio di intasamento degli ugelli e la possibilità di miscelare con altre formulazioni aumentano la flessibilità e l'efficienza applicativa. Vale la pena notare che le formulazioni liquide possono essere più suscettibili alle condizioni di stoccaggio che possono influenzare la degradazione o l'ossidazione dei componenti della formulazione.

Le confezioni tendono ad essere più grandi e la concentrazione di microrganismi in soluzione è inferiore a quella delle formulazioni sfuse. L'elevata concentrazione di microrganismi nei prodotti a flusso libero consente di utilizzare imballaggi più piccoli, rendendoli più leggeri e facili da trasportare e conservare. Tuttavia, l'applicazione di questi prodotti è potenzialmente più impegnativa. La necessità di disperdere uniformemente la polvere nel liquido di lavoro e il rischio di precipitazione di frazioni insolubili durante l'applicazione comportano un maggiore coinvolgimento nella preparazione della soluzione. Vale la pena ricordare che le formulazioni a scorrimento libero mostrano una maggiore stabilità per un periodo di stoccaggio più lungo, garantendo una maggiore durata di conservazione.

Tutti i tipi di formulazioni contenenti microrganismi destinati alla commercializzazione devono essere testati per verificarne la stabilità nel tempo, la temperatura e la compatibilità con altri agrofarmaci quando si raccomanda l'uso combinato. Dal punto di vista industriale, l'introduzione di diversi tipi di agrofarmaci in un'unica miscela di serbatoi che non è stata precedentemente testata per l'uso combinato può portare a interazioni avverse tra i microrganismi e gli ingredienti attivi contenuti nei diversi tipi di formulazioni, con conseguente perdita di efficacia biologica di tale miscela di serbatoi. La miscela del serbatoio preparata per il test con la formulazione microbica in esame deve inoltre essere stabile per almeno 4 ore. Nei test di miscelabilità, l'abbondanza e la sopravvivenza dei microrganismi vengono determinate a intervalli.

Nel nostro lavoro, quando sviluppiamo un nuovo prodotto, cerchiamo di stabilire un rigoroso controllo di qualità per quanto riguarda la formulazione e i test di efficacia in una determinata specie di coltura, nonché l'impatto ambientale e la possibile fitotossicità di dosi superiori alla norma. Di conseguenza, la nostra intenzione è quella di sviluppare nuovi prodotti formulati, che dovrebbero essere stabili e adatti allo stoccaggio per almeno 12 mesi.

2. Tecnologia di produzione di prodotti microbici

2.1. Introduzione

Nel mondo dinamico di oggi, la tecnologia di produzione dei prodotti microbici è un'industria affascinante che sta rivoluzionando molti campi, dall'agricoltura e la medicina alla protezione dell'ambiente. I microrganismi, come i batteri e i funghi, stanno diventando oggetto di intense ricerche e fonte di soluzioni innovative e prodotti moderni.

La tecnologia microbica si basa sull'uso di microrganismi per produrre una varietà di sostanze, da enzimi e antibiotici a preparati agricoli specializzati (Kuila e Sharma 2018). Esiste una stretta interazione tra scienza biologica, chimica, ingegneria di processo e aspetti pratici della produzione industriale. I microrganismi svolgono un ruolo chiave in questa tecnologia, agendo come fabbriche biologiche in grado di sintetizzare vari composti chimici. I microrganismi vengono adattati per produrre le sostanze desiderate attraverso la

fermentazione o la modificazione genetica, introducendo nuove possibilità di produzione industriale e agricola.

La tecnologia per la produzione di prodotti microbici è applicabile in un'ampia gamma di settori. In agricoltura, i microrganismi producono metaboliti che migliorano la resa delle colture, la resistenza delle piante e la struttura del suolo. In medicina, sono una fonte di antibiotici e farmaci biotecnologici. Nell'industria alimentare, producono prodotti fermentati. Nella protezione dell'ambiente, invece, sono utilizzati per trattare le acque reflue e il suolo.

Nonostante i numerosi vantaggi, la tecnologia presenta anche delle sfide. L'introduzione di soluzioni innovative, la gestione di processi complessi e il mantenimento di pratiche sostenibili sono alcune delle questioni che richiedono la nostra attenzione. Lo sviluppo delle moderne tecniche di ingegneria genetica microbica apre contemporaneamente nuove prospettive e solleva questioni etiche e normative.

2.2. Selezione e isolamento di microrganismi

I microbi hanno colonizzato gli ambienti in cui c'è una possibilità di sopravvivenza, creando una vasta gamma di luoghi, da quelli in cui ci sono condizioni ottimali per la maggior parte dei batteri a quelli estremi in cui vivono batteri altamente specializzati. I microrganismi svolgono un ruolo enorme nell'ambiente. Sono responsabili della circolazione degli elementi biogenici nella biosfera (carbonio, azoto e fosforo) e della distribuzione di gran parte degli elementi biogenici negli organismi viventi. L'azoto molecolare è uno dei principali componenti dell'aria, ma è inaccessibile agli organismi superiori. Grazie all'attività dei microrganismi, viene convertito in composti disponibili per le piante.

Il numero di specie batteriche in un grammo di suolo varia da alcune centinaia a più di undicimila (Elander e Chang 1979). La composizione quantitativa e qualitativa della comunità batterica dipende da diversi fattori fisico-chimici, oltre che dal tipo di suolo e dalle specie vegetali che lo abitano, dalle pratiche agricole, dalla zona geografica, dal contenuto di nutrienti, dalla salinità e dalla contaminazione ambientale. Influenzano la degradazione dei minerali, contribuendo così a modificare i processi di formazione del suolo (Bednarski e Fiedurek 2012). Inoltre, decompongono e mineralizzano la materia organica. Rinnovando i composti umici, modellano e migliorano la struttura del suolo. Prevengono l'erosione e proteggono il suolo dall'essiccazione. Facilitano la pulizia del suolo partecipando alla decomposizione di pesticidi, idrocarburi e antibiotici.

La selezione di microrganismi per prodotti agricoli come fertilizzanti, biostimolanti e prodotti per la protezione delle colture è un processo che mira a selezionare ceppi di microrganismi con proprietà benefiche. Il primo passo consiste nel definire gli obiettivi che il microrganismo deve raggiungere. Questi possono includere, ad esempio, la capacità di fissare l'azoto, di produrre sostanze che promuovono la crescita delle piante o di sopprimere gli agenti patogeni.

Le fasi utilizzate per selezionare i microrganismi benefici sono le seguenti:

- **Selezione primaria e isolamento di una coltura pura:** L'isolamento primario di microrganismi da ambienti specifici comporta la selezione di microrganismi che presentano le proprietà desiderate. La caratterizzazione approfondita segue l'isolamento dei microrganismi. Vengono studiate le loro proprietà fisiologiche, biochimiche e genetiche. In questo modo è possibile determinare se i microrganismi presentano le caratteristiche desiderate

- **Selezione secondaria:** La selezione secondaria coinvolge gli isolati con la massima espressione del tratto scelto (Steele e Stowers 1991).

Fig. 4.1. Colonie di isolati batterici cresciuti su terreno Tryptone-Soy-Agar (TSA) che confermano la diversità microbica durante l'isolamento e la selezione di microrganismi benefici per le piante.
Fonte: Intermag sp. z o.o.

I test di screening dell'attività specifica svolgono un ruolo fondamentale nella selezione di microrganismi specifici. I test di laboratorio per confermare le proprietà dei microrganismi includono una varietà di metodi e tecniche che consentono un'analisi approfondita della loro morfologia, fisiologia, genetica e altre caratteristiche.

Fig. 4.2. Esempio di isolamento selettivo di microrganismi del genere Bacillus su terreni solidi. Immagine a sinistra - terreno cromogenico per la differenziazione dei microrganismi acidificanti. Immagine a destra - terreno agar mannitolo per la diversificazione delle fonti di carboidrati per i batteri gram-positivi.
Fonte: Intermag sp. z o.o.

La tecnica di selezione di base è il metodo dell'arricchimento del terreno. Questo metodo consiste nel fornire un ambiente adatto alla crescita di specifici microrganismi e contemporaneamente inibitorio o letale per quelli non bersaglio. Ad esempio, i microrganismi anaerobi non sopravvivono in presenza di ossigeno. Anche la resistenza a metalli pesanti, antibiotici, ossidanti e solventi organici può essere utilizzata per creare ambienti selettivi per microrganismi con proprietà specifiche.

I progressi significativi nello sviluppo di strumenti analitici hanno migliorato notevolmente la capacità di screening di composti specifici. L'analisi strumentale è utile sia nello screening secondario che in quello primario, quando non sono disponibili tecniche più semplici. Strumenti come la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), la gascromatografia (GC), la spettrometria di massa (MS), la spettrometria a risonanza magnetica nucleare (NMR) e altri consentono un rilevamento più rapido, selettivo e altamente sensibile dei

prodotti metabolici. Sempre più importante è l'uso di strumenti di biologia molecolare e bioinformatica per verificare rapidamente il potenziale genetico dei microrganismi. La serie specifica di test dipende dal tipo di microrganismo e dallo scopo dello studio (Olicón-Hernández et al. 2022).

I microrganismi che si dimostrano promettenti in condizioni di laboratorio vengono poi testati in condizioni di campo. In questo modo è possibile valutare la loro efficacia in condizioni agricole realistiche. Sulla base dei risultati dei test, i migliori microrganismi vengono selezionati per un ulteriore allevamento. Questo processo prevede la selezione di genotipi con caratteristiche desiderabili e la loro riproduzione in massa in condizioni controllate.

2.3. Banking

Una volta che il microrganismo è stato identificato e caratterizzato, deve essere conservato in una condizione che ne garantisca la stabilità fisiologica, biotecnologica e genetica. Questo processo è chiamato "banking" e prevede il mantenimento dei ceppi isolati selezionati per ulteriori esperimenti e la loro caratterizzazione.

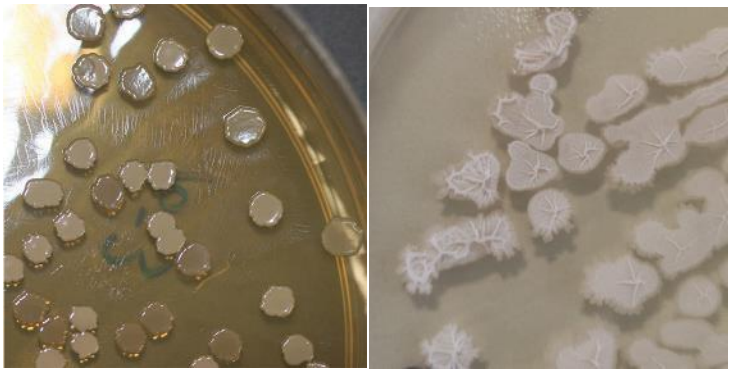

Fig. 4.3. Colture batteriche pure isolate da ambienti. Immagine a sinistra Bacillus pumilus*, immagine a destra* Bacillus subtilis*.*
Fonte: Intermag sp. z o.o.

Gli isolati selezionati sono conservati nelle nostre risorse e/o in istituzioni esterne, come le collezioni (banche) di microrganismi. Le banche di microrganismi sono uno strumento importante per la scienza, la medicina, l'industria e l'agricoltura. Nuove specie o ceppi con caratteristiche precedentemente sconosciute, descritti in pubblicazioni scientifiche, devono essere a disposizione di tutte le parti interessate. Per motivi di sicurezza, gli isolati devono essere conservati con diversi mezzi alternativi. I microrganismi sono conservati nella collezione in uno stato liofilizzato, in uno stato surgelato a -80°C, in azoto liquido a temperature fino a -195°C, o in contenitori speciali con un conservante (Stackebrandt et al. 2014).

Fig. 4.4. Sistemi di contenitori per la conservazione di microrganismi a basse temperature.

Ogni coltura è accuratamente documentata e contiene informazioni sulla specie, il ceppo, le condizioni di coltura, le caratteristiche fisiologiche e altri dati importanti. La banca microbica svolge un ruolo cruciale nella conservazione delle risorse biologiche, contribuendo al progresso scientifico e tecnologico e garantendo la continuità e la riproducibilità della produzione di preparati a base di microrganismi attivi.

2.4. Inoculo

Un inoculo microbico è una coltura microbica coltivata in condizioni specifiche, utilizzata per avviare un processo di coltivazione su larga scala. Nel contesto della tecnologia di formulazione microbica per l'agricoltura, l'inoculo svolge un ruolo chiave come fonte di microrganismi che, dopo un processo di fermentazione, saranno introdotti in formulazioni che agiscono sul suolo e sulle piante. Serve come punto di partenza, fornendo il numero necessario di microrganismi attivi e sani per avere un impatto positivo sull'ambiente agrotecnico.

Il processo di produzione dell'inoculo microbico è una fase attentamente controllata. Inizia con la raccolta di un ceppo attivo di microrganismi, poi coltivato su scala ridotta per formare un inoculo. In questo processo, ci si preoccupa di garantire le giuste condizioni di coltura, come la composizione del terreno, la temperatura e l'umidità, per assicurare la capacità dei microrganismi di moltiplicarsi efficacemente. La qualità dell'inoculo è un fattore chiave per l'efficacia dei preparati microbici. I microrganismi presenti nell'inoculo devono essere attivi, in grado di competere con i patogeni del suolo, migliorare la disponibilità di nutrienti e promuovere una crescita sana delle piante. I produttori si preoccupano di controllare i parametri della coltura monitorando la qualità microbiologica e genetica.

L'efficacia dell'inoculo microbico in agricoltura dipende principalmente dalla sua capacità di adattarsi alle condizioni del suolo. I produttori devono adattare il processo di coltivazione dei microrganismi per abituarli alle specifiche condizioni ambientali in cui verranno applicati. Questo adattamento permette ai microrganismi di colonizzare meglio il suolo e di influire positivamente sulle piante.

Una volta ottenuto l'inoculo ottimale su scala ridotta, il processo viene scalato per produrre quantità maggiori. I bioreattori e i fermentatori coltivano i microrganismi in condizioni controllate per produrre grandi quantità di microrganismi attivi pronti per essere utilizzati nelle formulazioni agricole.

L'efficacia finale dei preparati microbici in agricoltura è direttamente correlata alla qualità dell'inoculo. Un inoculo adeguatamente preparato garantisce l'apporto di un numero adeguato di microrganismi attivi al

campo, che si traduce in una maggiore biostimolazione delle piante, nella riduzione dei patogeni del suolo e in un miglioramento della salute complessiva del terreno. Il monitoraggio del processo di produzione dell'inoculo e della sua composizione microbica è fondamentale per mantenere elevati standard di qualità ed efficienza nella tecnologia di produzione dei preparati microbici per l'agricoltura.

2.5. Media

I terreni nutrizionali sono un elemento di base nella tecnologia dei preparati microbici per l'agricoltura. Si tratta di sostanze nutritive appositamente composte per fornire ai microrganismi gli ingredienti giusti per la crescita e l'attivazione. Un terreno di coltura è una combinazione solida, liquida o semisolida di sostanze destinate a sostenere la crescita dei microrganismi. Nella produzione di formulazioni microbiche, un terreno di coltura adeguatamente selezionato è fondamentale per la qualità e la produttività dei microrganismi introdotti nell'ambiente agricolo.

La composizione dei terreni di coltura microbici è adattata ai requisiti dei singoli microrganismi in coltura. Di solito contengono fonti di carbonio, azoto, fosforo, macro e micronutrienti e altri nutrienti. A seconda del tipo di microrganismi, le soluzioni nutritive possono essere regolate per massimizzare la loro crescita e attività. La composizione ottimale della soluzione nutritiva è fondamentale per ottenere elevate quantità di colture microbiche attive. In alcuni casi, potrebbe essere economicamente interessante utilizzare gli scarti agroindustriali come terreno di produzione (Vassilev et al. 1998).

Fig. 4.5. Supporti microbiologici comunemente utilizzati in laboratorio.
Fonte: Intermag sp. z o.o.

I terreni microbiologici svolgono un ruolo fondamentale nel processo di coltivazione dei microrganismi su larga scala. I produttori di preparati microbiologici adattano accuratamente i terreni di coltura alle caratteristiche dei ceppi coltivati, consentendo una crescita rapida e sana dei microrganismi. Forniscono nutrienti, stabilità e uniformità delle condizioni di coltura, importanti per ottenere preparati efficaci. La composizione dei terreni di coltura influenza le caratteristiche dei microrganismi coltivati nella produzione di preparati microbiologici. I terreni di coltura opportunamente regolati possono influenzare la produzione di metaboliti, l'attività enzimatica o la capacità di competere con gli agenti patogeni. Un controllo accurato della composizione delle soluzioni nutritive consente di adattare i microrganismi a specifiche applicazioni agricole, aumentando l'efficacia delle formulazioni.

La produzione di terreni microbici comporta un'attenta miscelazione e un apporto controllato di sostanze nutritive. In questa fase, i produttori devono fare attenzione a mantenere le corrette proporzioni degli

ingredienti per soddisfare i requisiti dei microrganismi in coltura. Il controllo di parametri come il pH, la temperatura e la concentrazione di nutrienti è fondamentale per ottenere condizioni di coltura ottimali.

La qualità finale dei preparati microbici in agricoltura è strettamente correlata alla qualità dei terreni microbici utilizzati. La composizione efficace del terreno di coltura influisce positivamente sulla riproduzione, l'attività e la vitalità dei microrganismi, che si traduce nell'efficacia della formulazione. I produttori controllano con precisione questo elemento del processo, assicurando che il terreno di coltura supporti le caratteristiche previste dei microrganismi e garantisca la consistenza del prodotto finale. Per ottenere risultati ottimali in questo campo, è fondamentale adattare il terreno di coltura alle esigenze dei microrganismi coltivati.

2.6. Componenti chiave della linea di produzione

L'elemento chiave di qualsiasi impianto di biotecnologia è il bioreattore, attorno al quale viene costruito l'intero impianto per produrre il prodotto finito. A seconda delle esigenze, questo può includere miscelatori, centrifughe, sistemi di filtrazione, essiccatori, liofilizzatori, chiarificatori e decantatori.

La maggior parte dei processi biotecnologici che utilizzano microrganismi cercano di spostarli dal loro habitat naturale attraverso una piastra di Petri in bioreattori, altrimenti noti come fermentatori. I bioreattori e i loro processi sono di solito il fulcro di qualsiasi biotecnologia. È in essi che avviene la crescita del microrganismo e la produzione o la lavorazione del prodotto desiderato. In termini strettamente tecnici, un bioreattore è considerato: "Uno spazio chiuso di qualsiasi dimensione e forma in cui esiste la possibilità di scambiare quantità di moto, calore e massa con l'ambiente e la possibilità di una reazione chimica". Il bioreattore dovrebbe contenere qualsiasi biocatalizzatore al quale vengono create tali condizioni di funzionamento per ottenere l'effetto desiderato sotto forma di un corso predeterminato di una reazione biochimica o di crescita di cellule di un organismo vivente." (Olicón-Hernández et al. 2022).

Come già detto, la definizione di bioreattore è molto generica, quindi i bioreattori sono soggetti a numerose classificazioni basate su diversi elementi strutturali, modalità di funzionamento o biocatalizzatori. La divisione più generale riguarda la loro differenziazione in termini di modalità di svolgimento del processo:

- Bioreattori per coltura sommersa.
- Bioreattori per la coltura su terreni solidi.
- Bioreattori per colture con un biocatalizzatore immobilizzato.

Il tipo di bioreattore utilizzato per il processo dipende principalmente dai requisiti di crescita del microrganismo. I fermentatori più comunemente utilizzati sono quelli per i processi aerobici sommersi. In questo tipo di fermentatore, il mezzo è allo stato liquido e il biocatalizzatore vi è sospeso.

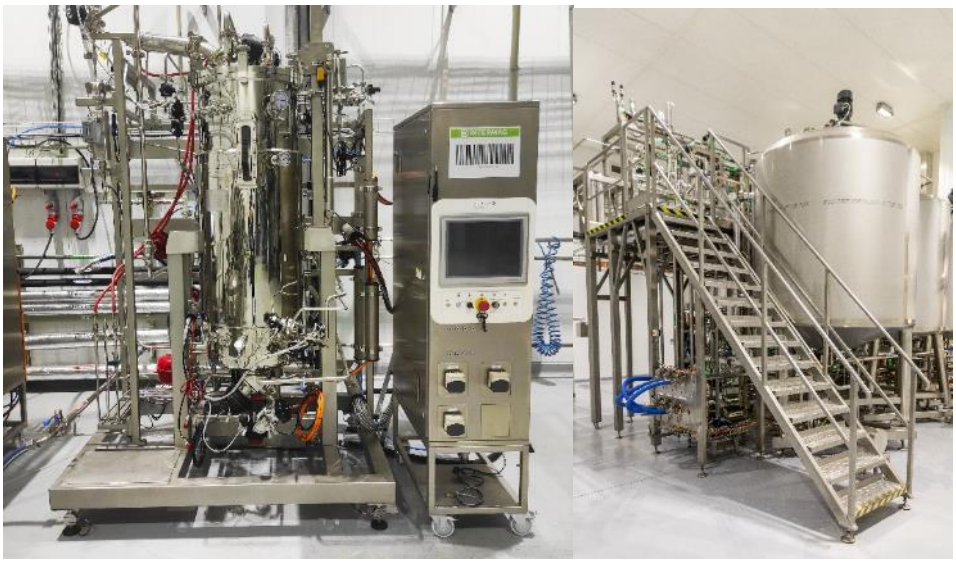

Fig. 4.6. Bioreattori per la produzione di prodotti microbici a INTERMAG.
Fonte: Intermag sp. z o.o.

Come indicato in precedenza, il bioreattore è un punto essenziale della maggior parte dei processi di produzione biotecnologica e ogni componente successivo viene selezionato di conseguenza in base al funzionamento di un particolare bioreattore o dei suoi gruppi. Tale impianto può includere miscelatori per combinare la biomassa con i componenti della formulazione, membrane di filtrazione o centrifughe in grado di separare la biomassa dal liquido di coltura, essiccatori o liofilizzatori per ottenere un prodotto sfuso, omogeneizzatori per rilasciare il bioprodotto dall'interno delle cellule e molte altre apparecchiature spesso sviluppate e costruite appositamente per la produzione di un particolare prodotto.

Fig. 4.7. Linea di produzione per prodotti microbici a INTERMAG.
Fonte: Intermag sp. z o.o.

2.7. Tecnologia di produzione dei biopreparati

Un biopreparato può essere costituito da un microrganismo in varie forme, un metabolita, un mezzo di post-digestione o una miscela dei tre. In teoria, la più facile da ottenere è una miscela post-digestione contenente sia il microrganismo sia il terreno di post-digestione con tutti i metaboliti. Tale produzione si basa sulla moltiplicazione del microrganismo in coltura discontinua, cioè sulla preparazione del terreno di coltura,

sull'inoculazione, sulla coltura e sulla raccolta della biomassa prodotta. In pratica, sorgono diversi problemi legati alla vitalità del microrganismo nel prodotto finito, alla stabilità dei metaboliti secondari che costituiscono le proprietà del prodotto, alla conservazione della biomassa stessa e del prodotto e, soprattutto, all'imballaggio appropriato per eliminare il rischio di contaminazione con microflora indesiderata, per la quale la biomassa stessa può fungere da terreno di coltura.

Per preservare il più a lungo possibile le proprietà del bioprodotto, si utilizza una temperatura di conservazione ridotta, che funziona bene per i prodotti a base di batteri come Rhizobium spp. o *Azotobacter spp.* I prodotti contenenti batteri che formano spore, ad esempio Bacillus spp., sono caratterizzati da una maggiore conservabilità proprio per la stabilità delle forme di spore.

Le formulazioni solide richiedono un'ulteriore lavorazione della biomassa post-coltura, cioè un'adeguata compattazione e l'aggiunta di sostanze protettive e di supporto. I metodi più comuni per ottenere formulazioni secche sono la nebulizzazione e la liofilizzazione. Entrambi i processi mirano a rimuovere l'acqua dalla biomassa, ma lo fanno in modo diverso.

La liofilizzazione, altrimenti nota come essiccazione per sublimazione, è un processo che avviene a basse temperature e in condizioni di vuoto. La preparazione del microrganismo per il processo di liofilizzazione prevede la massima concentrazione della biomassa, cioè la rimozione dell'acqua inizialmente mediante filtrazione o centrifugazione. La biomassa concentrata viene poi mescolata con un crioprotettore, ossia una sostanza che dovrebbe proteggere le cellule del microrganismo dalla rottura dei cristalli di ghiaccio durante la prima fase di liofilizzazione, ossia il congelamento fino a -80°C. Gli agenti protettivi più diffusi sono la maltodestrina, il saccarosio, il latte scremato in polvere, il trealosio e il glicerolo. Il vantaggio principale della liofilizzazione è l'elevata concentrazione del prodotto, che elimina quasi completamente l'acqua e ne prolunga la durata di conservazione. Tuttavia, si tratta di un processo costoso, che si traduce in un prezzo più elevato del prodotto commerciale.

Fig. 4.8. Il liofilizzatore di produzione INTERMAG
Fonte: Intermag sp. z o.o.

L'essiccazione a spruzzo è un processo ad alta temperatura in cui la biomassa viene polverizzata in aria calda. La preparazione della biomassa, come nel caso della liofilizzazione, prevede la sua compattazione per ottenere la massima quantità di sostanza secca possibile, che produrrà i grani appropriati del prodotto finito nell'essiccatore. L'essiccazione a spruzzo viene utilizzata con microrganismi esposti ad alte temperature (principalmente batteri che formano spore, come *Bacillus spp.*) o con sostanze stabilizzanti appropriate, come proteine del siero di latte, maltodestrina, amido e polisaccaridi.

Per i prodotti basati su un metabolita specifico, come i fattori NOD o gli enzimi specifici, la coltura dei microrganismi deve essere effettuata in condizioni che indirizzino il metabolismo del microbo per la produzione. Ciò può essere ottenuto modificando le condizioni fisiche della coltura o la composizione appropriata del terreno di coltura.

2.8. Monitoraggio e controllo delle variabili che influenzano la crescita microbica e il controllo di qualità

Il monitoraggio della coltura dei microrganismi è un processo fondamentale nei laboratori, nell'industria biotecnologica, nella produzione farmaceutica e nella ricerca scientifica. Ciò include il controllo delle condizioni di coltura, la valutazione della crescita microbica, il monitoraggio della produzione di metaboliti e il mantenimento della purezza e della qualità della coltura. Il monitoraggio della coltura microbica è essenziale nella ricerca e nell'industria per garantire il controllo del processo, ottimizzare le prestazioni e produrre risultati coerenti. Nel campo delle biotecnologie industriali, la coltura microbica è una fase fondamentale nella produzione di una varietà di sostanze, dai farmaci ai prodotti agricoli. Per garantire condizioni di crescita ottimali, è necessario monitorare attentamente le variabili che influenzano i microrganismi. Questo processo comporta il controllo dei parametri ambientali, della densità della coltura, della produzione di metaboliti e della purezza della coltura.

Un noto schema di crescita dei microrganismi durante la coltura stazionaria è noto come coltura batch. La curva di crescita di un microrganismo, così come la produzione di un prodotto biotecnologico, presenta quattro fasi caratteristiche:

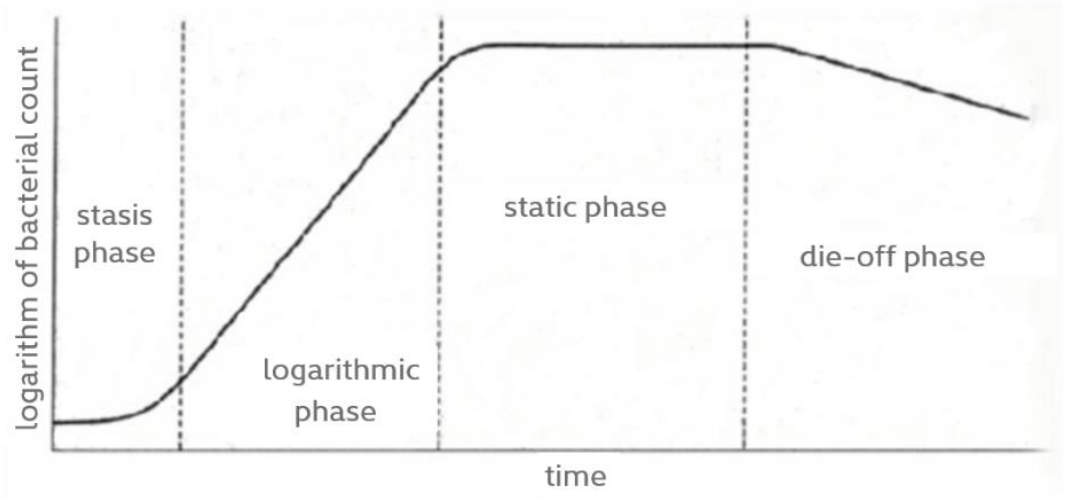

Fig. 4.9. Curva di crescita per coltura batch.
Fonte: Schlegel 2004

1. **Stasi o pre-stasi:** il periodo in cui il microrganismo si adatta al nuovo ambiente di coltura e inizia la sua crescita.
2. **Fase logaritmica o di crescita rapida:** dipende dalla disponibilità di nutrienti e dall'accumulo di metaboliti che limitano la crescita della coltura, come nel caso della fermentazione alcolica.
3. **Fase stazionaria:** altrimenti nota come fase di ritardo, in cui il numero di divisioni cellulari è pari al numero di cellule morenti.
4. **Fase di morte:** inizia quando le cellule cominciano a morire rapidamente.

Questo grafico è importante per il monitoraggio del processo di produzione, in quanto è necessario posizionare correttamente i momenti rilevanti del processo di produzione sulla curva di cui sopra. Un controllo sapiente del processo basato sulla conoscenza delle condizioni della coltura e dei requisiti del microrganismo nelle varie fasi di crescita consente un controllo efficiente del processo e un'elevata efficienza produttiva. Il controllo del processo e delle colture è influenzato da fattori fisici e chimici come la temperatura, il pH, le concentrazioni di ossigeno e anidride carbonica.

La temperatura ha un effetto decisivo sull'attività enzimatica e sul metabolismo microbico. Il controllo della temperatura nelle colture in bioreattore viene effettuato riscaldando e raffreddando la camicia d'acqua del bioreattore (utilizzata più spesso nei grandi fermentatori industriali) o gli scambiatori di calore situati nel recipiente di coltura (molto diffusi nei piccoli reattori da laboratorio). Il controllo della temperatura nei bioreattori è a più stadi e comprende il controllo della temperatura del recipiente di coltura, della temperatura della camicia di riscaldamento o dello scambiatore di calore e del mezzo di riscaldamento e raffreddamento.

Un pH adeguato è essenziale per la corretta struttura delle proteine e la funzione degli enzimi. Ogni microrganismo ha uno specifico intervallo di tolleranza del pH della soluzione in cui può sopravvivere e uno specifico intervallo ottimale ristretto che gli consente di crescere in modo più efficiente. Il pH viene controllato in base alle letture degli elettrodi di pH posizionati nel bioreattore.

Livelli adeguati di ossigeno sono fondamentali per i microrganismi aerobi, mentre gli anaerobi richiedono un ambiente povero di ossigeno. La distribuzione del gas è la questione più critica quando si coltivano microrganismi aerobi come il Bacillus spp. La forma del reattore, l'agitatore utilizzato e la sua potenza, la forma del dispositivo di aerazione e la sua posizione nel recipiente di coltura sono fattori importanti per la distribuzione del gas. Il controllo della saturazione relativa del terreno di coltura con l'ossigeno viene effettuato mediante elettrodi di ossigeno. Nel caso di organismi anaerobi, l'ossigeno deve essere rimosso dal terreno di coltura saturandolo con un gas inerte, come l'azoto, perché per molti organismi è dannoso, come i batteri metanogeni. Nei bioreattori con agitatore meccanico, il mantenimento delle condizioni di ossigenazione desiderate della coltura comporta l'intensificazione dell'agitazione durante la fase di maggiore richiesta di ossigeno, che può comportare elevate forze di taglio all'interno dell'agitatore.

Oltre alle variabili fisico-chimiche del bioreattore, è molto importante controllare la crescita del microrganismo e la qualità del terreno di coltura. A seconda del prodotto target, si misura l'utilizzo dei componenti del substrato da parte del microrganismo, ad esempio il glucosio, utilizzando test a striscia o, in sistemi più avanzati, la spettroscopia nel vicino infrarosso per monitorare la crescita di un metabolita nel tempo, come la produzione di antibiotici da parte di Streptomyces. È anche possibile controllare la crescita dei microaggregati contando i batteri in situ utilizzando sonde di densità ottica OD 600 o soluzioni più

sofisticate che eseguono misurazioni citometriche e della capacità elettrica della coltura, correlate al numero di cellule vitali in soluzione.

2.9. Considerazioni igieniche per l'intera linea

In un ambiente ideale, tutta la produzione biotecnologica dovrebbe avvenire in condizioni di sterilità, dall'inoculazione della prima fiasca alla confezione del prodotto finito. Garantire la sterilità delle colture è il processo chiave e più dispendioso in termini di risorse nella microbiologia industriale, poiché inizia nella fase di progettazione dei locali, delle linee di produzione e dei prodotti target. Gli standard qualitativi di base che definiscono le linee di produzione nel settore delle biotecnologie sono i requisiti stabiliti dalla FDA statunitense e dalla 3A, che specificano diversi requisiti, come superfici di saldatura perfettamente lisce ed elettrolucidate che entrano in contatto con il prodotto. Questa procedura si traduce in un ulteriore utilizzo dell'impianto, in quanto la fine rugosità può intrappolare il biofilm, portando alla contaminazione della porosità del materiale, che può impedire il degassamento del recipiente durante la sterilizzazione, con conseguente non sterilità del bioreattore o di altri recipienti. Il passo successivo è la selezione di materiali appropriati per la produzione prevista, cioè resistenti alle alte temperature durante la sterilizzazione a vapore e alla chimica aggressiva durante i processi di pulizia e disinfezione.

3. Efficacia biologica e commercializzazione

3.1. Verifica dell'efficacia biologica in condizioni di laboratorio

La verifica dell'efficacia biologica delle formulazioni microbiche è una fase fondamentale del processo di sviluppo e valutazione. Comporta una serie di test di laboratorio per confermare se i microrganismi contenuti nelle formulazioni presentano l'attività biologica e fisico-chimica prevista. In questo contesto, l'efficacia può includere la capacità di solubilizzare il fosforo, assimilare l'azoto, controllare i patogeni, migliorare la salute delle piante o influenzare la struttura microbica del suolo.

Per valutare l'efficacia biologica dei preparati microbici si utilizzano diversi metodi di laboratorio. Possono essere test in vitro, analisi microscopiche, tecniche di biologia molecolare o studi sulla produzione di metaboliti da parte dei microrganismi. A seconda dello scopo e del tipo di preparato, si utilizzano procedure specifiche per ottenere un quadro completo dell'efficacia biologica. Un test comunemente utilizzato è l'analisi antagonistica, che verifica la capacità dei microrganismi in una formulazione di competere con gli agenti patogeni. Ad esempio, i test antimicrobici possono mostrare se una formulazione microbica inibisce la crescita e lo sviluppo di microrganismi patogeni, il che è un importante indicatore di efficacia.

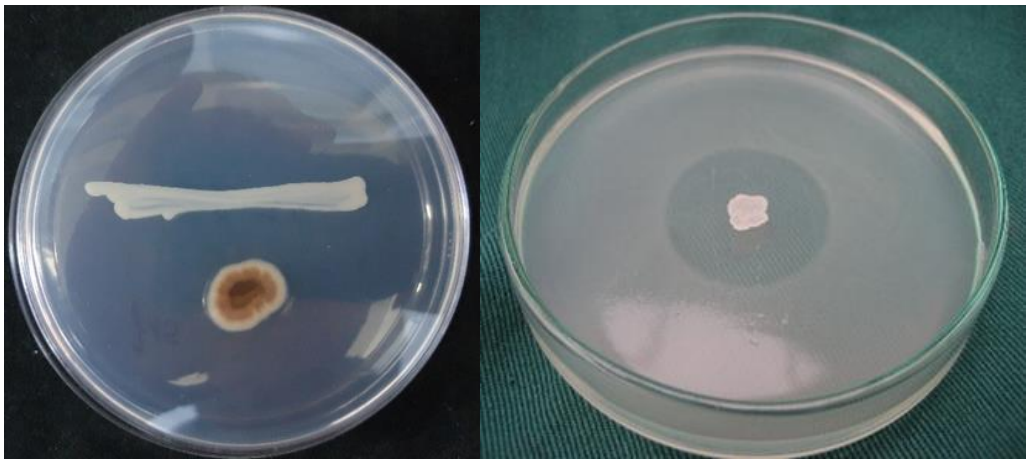

Fig. 4.10. Esempio di verifica delle proprietà dei microrganismi in termini di attività di biocontrollo - Bacillus amyloliquefaciens *contro* Botrytis cinerea *(sinistra) e solubilizzazione del silicio da parte di* Paenibacillus polymyxa *(destra).*
Fonte: Intermag sp. z o.o.

Un altro test delle proprietà dei microrganismi è la loro capacità di solubilizzare elementi nutritivi come il fosforo o di assimilare l'azoto. Le analisi genetiche e molecolari consentono di identificare i microrganismi nei preparati e di monitorarne l'attività biologica; l'analisi accurata delle quantità di espressione genica del DNA o dell'RNA può fornire informazioni sulla risposta dei microrganismi alle condizioni di laboratorio, contribuendo a valutarne le prestazioni. Il monitoraggio della crescita e dell'attività dei microrganismi nei preparati microbiologici è fondamentale per valutare la loro capacità di colonizzare e riprodursi in condizioni specifiche. La misurazione di parametri quali il numero di cellule, la quantità di sostanze chimiche secrete o il tasso di divisione cellulare fornisce informazioni importanti sull'efficacia biologica (Sana et al. 2023).

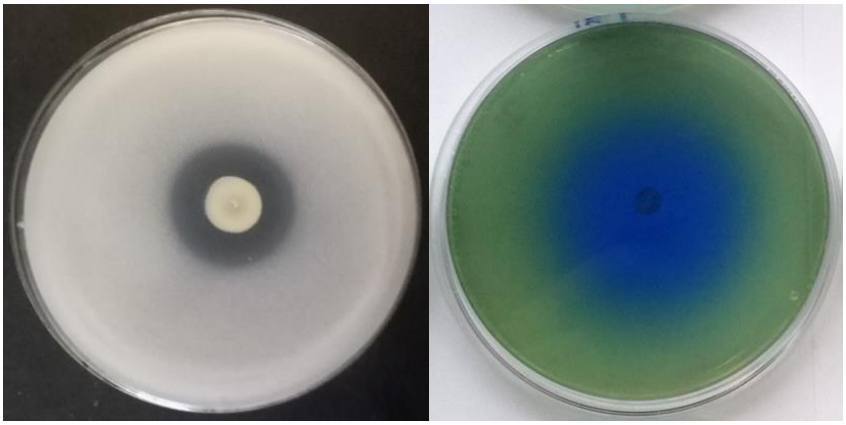

Fig. 4.11. Test sulle proprietà - (a sinistra) solubilizzazione del fosforo da parte del Bacillus pumilus *- la decolorazione intorno ai microrganismi indica che il processo procede correttamente; (a destra) fissazione dell'azoto da parte del* Paenibacillus polymyxa *- la comparsa del blu intorno alla colonia batterica indica una fissazione attiva dell'azoto.*
Fonte: Intermag sp. z o.o.

La verifica finale dell'efficacia biologica dei formulati microbici prevede test condotti in condizioni che simulano gli ambienti naturali, come il suolo o l'acqua. In questo modo si verifica che i microrganismi mantengano le proprietà desiderate anche in condizioni più complesse, il che è fondamentale per valutarne l'idoneità in condizioni agricole reali.

3.2. Verifica dell'efficacia biologica in condizioni controllate

La verifica dell'efficacia biologica in condizioni controllate è il processo di valutazione dell'efficacia di un ceppo o di una formulazione in condizioni controllate, cioè in fitotrone, in serra, nella coltivazione di una pianta. Questo processo mira a comprendere le prestazioni di una sostanza o di un prodotto in esame in un contesto biologico, cioè l'effetto sulla crescita e sullo sviluppo delle piante.

Fasi di verifica dell'efficacia biologica (nella coltivazione delle piante) in condizioni controllate:

1. **Progettazione dell'esperimento:** definire lo scopo dell'esperimento e la sua metodologia, definire i risultati attesi e selezionare i parametri appropriati.
2. **Preparazione di uno spazio controllato:** creazione di un ambiente sperimentale in cui sia possibile controllare fattori quali temperatura, umidità e illuminazione per garantire la riproducibilità e la comparabilità dei risultati.
3. **Applicazione della sostanza o del prodotto:** applicazione della sostanza o del prodotto come indicato.
4. **Monitoraggio dei parametri biologici durante la crescita:** studiare parametri biologici come l'altezza della pianta, il contenuto di clorofilla, il contenuto di macro e micronutrienti e altro ancora.
5. **Determinazione dei parametri biologici dopo il completamento della coltivazione:** studio dei parametri biometrici delle piante, come il peso vegetativo.
6. **Analisi statistica dei dati:** elaborazione e analisi dei dati raccolti, confronto dei risultati dell'esperimento con il gruppo di controllo e interpretazione dei risultati ottenuti.

La verifica dell'efficacia biologica è un passo fondamentale nella ricerca scientifica, soprattutto in campi come l'agricoltura, la biologia, le biotecnologie e la medicina. Consente a scienziati, ricercatori e aziende di formulazione agricola di valutare se un nuovo prodotto o sostanza ha l'effetto desiderato in condizioni controllate, il che è essenziale prima che possa essere utilizzato nella pratica agricola.

3.3. Verifica dell'efficacia biologica in condizioni di campo

La verifica dell'efficacia biologica in condizioni di campo si riferisce alla valutazione dell'efficacia di sostanze o prodotti nell'ambiente naturale. A differenza delle condizioni controllate che si trovano in un fitotrone, le condizioni di campo includono una varietà di fattori ambientali, come diverse condizioni meteorologiche, la composizione del suolo e gli effetti dei vari organismi in un ecosistema.

<u>Fasi di verifica dell'efficacia biologica in condizioni di campo</u>

1. **Progettazione dell'esperimento in condizioni di campo**: sviluppo di un piano di ricerca che tenga conto delle specifiche condizioni di campo in cui verrà condotto l'esperimento.
2. **Preparazione del sito**: selezione di un'area adatta per l'esperimento, preparazione del sito in termini di obiettivi di ricerca e applicazione delle garanzie necessarie, come le regole etiche o i permessi sperimentali.
3. **Applicazione della sostanza o del prodotto**: applicazione della sostanza o del prodotto in condizioni naturali, tenendo conto delle specificità della sostanza o del prodotto, del tipo di coltura e dell'ambiente.

4. **Monitoraggio dei parametri biologici della coltura in campo**: effettuare misurazioni di piante selezionate nelle parcelle, determinare l'emergenza, il vigore e la salute delle piante, misurare il contenuto di clorofilla e monitorare gli indici di vegetazione, come NDVI.
5. **Misurazione della quantità e della qualità della resa**.
6. **Raccolta dei dati e analisi statistica**: analisi dei dati raccolti nel contesto dell'effetto della sostanza o del prodotto sulla crescita, lo sviluppo e la resa della pianta e dell'influenza dei fattori esterni.

La verifica dell'efficacia biologica in condizioni di campo è importante perché fornisce informazioni su come i prodotti o le sostanze influiscono sulla pianta nell'ambiente reale. Questo approccio è fondamentale in agricoltura, conservazione ed ecologia, dove le interazioni tra le piante e il loro ambiente sono complesse e possono essere difficili da riflettere in condizioni di laboratorio.

In breve, il processo di verifica dell'efficacia biologica delle formulazioni microbiche è un processo a più fasi che combina una varietà di metodi di analisi. L'attenzione a test precisi, affidabili e rappresentativi consente ai produttori di fornire formulazioni microbiche che siano efficaci in condizioni controllate e che soddisfino le aspettative in un ambiente agricolo vario e dinamico.

3.4. Solubilità, miscibilità e stabilità delle biopreparazioni

La verifica della stabilità delle formulazioni microbiche è una fase importante della loro produzione e del loro utilizzo. La stabilità si riferisce alla capacità di un preparato di mantenere le sue proprietà biologiche, fisico-chimiche e microbiologiche per un periodo specifico e in varie condizioni di conservazione. I test di laboratorio valutano se i microrganismi presenti nella formulazione mantengono la loro attività di crescita e non si degradano quando sono esposti a vari fattori come temperatura, luce o umidità. I test di stabilità comprendono anche il monitoraggio di eventuali cambiamenti nella composizione chimica della formulazione e la valutazione dell'eventuale degradazione dei principi attivi. Questo è importante perché l'efficacia di una formulazione microbica in agricoltura dipende in larga misura dal mantenimento dell'integrità dei microrganismi durante la conservazione. Un'attenta verifica della stabilità consente ai produttori di determinare con precisione la durata di conservazione di una formulazione e di garantire agli agricoltori un prodotto di qualità ed efficacia costanti.

I test vengono utilizzati per valutare quanto a lungo un biopreparato mantiene la sua efficacia in condizioni di conservazione, che possono includere la conservazione del biopreparato a diverse temperature, la conduzione di analisi della composizione microbica, come la valutazione del numero di microrganismi vitali e l'analisi della diversità genetica dopo un certo periodo, e la valutazione dei cambiamenti fisici e chimici. La stabilità viene verificata su varie scale, da test di laboratorio a test su scala pilota a test di produzione su larga scala, per valutare se il prodotto mantiene le sue proprietà durante le varie fasi di produzione e conservazione.

La verifica della solubilità dei preparati microbiologici è un aspetto importante della loro efficacia e del loro utilizzo. In questo contesto, il processo mira a valutare quanto le formulazioni possano dissolversi e distribuirsi uniformemente in varie sostanze portanti, come l'acqua o altri agenti ausiliari. I test di solubilità sono essenziali perché influenzano l'uniformità dell'applicazione di un formulato nell'area di destinazione, determinando l'efficacia e l'efficienza dei microrganismi in campo. I produttori di solito conducono questi test in condizioni di laboratorio, simulando varie condizioni di applicazione. In pratica, i test di solubilità

comprendono la valutazione del tempo necessario al prodotto per dissolversi completamente, il grado di dissoluzione a diverse temperature o pH, nonché la valutazione di eventuali cambiamenti fisico-chimici. Un attento monitoraggio di questi parametri consente ai produttori di regolare le formulazioni microbiche per garantire metodi di applicazione ottimali.

Preparare efficacemente le formulazioni microbiche per l'applicazione è importante per un uso efficace in agricoltura, orticoltura e protezione ambientale. I test di solubilità valutano il modo in cui un bioprodotto si scioglie in acqua con diversi livelli di durezza o in altre sostanze. A tale scopo si possono preparare soluzioni di biopreparati in vari agenti solubilizzanti e valutare il grado di solubilità. I test di solubilità non sono richiesti per i prodotti solidi contenenti microrganismi attivi applicati direttamente su terreni solidi.

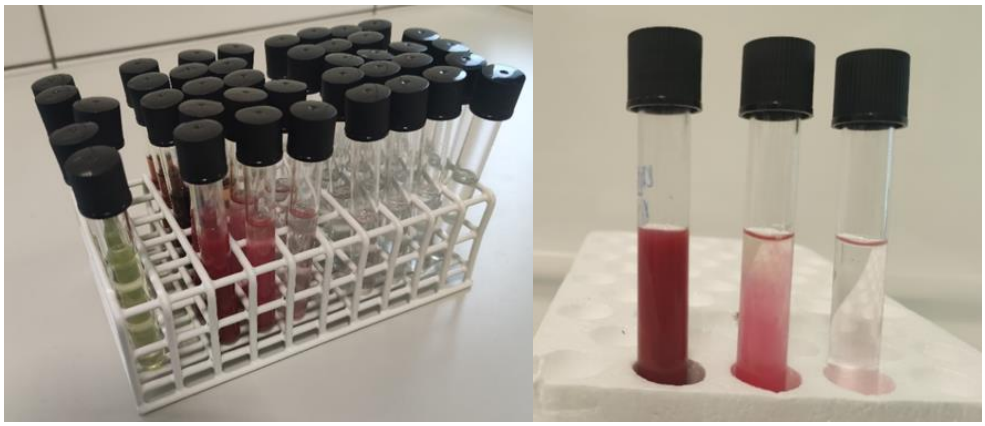

Fig. 4.12. Prove di miscelazione di prodotti agrochimici con prodotti microbici in uno spray multicomponente. Fonte: Intermag sp. z o.o.

La verifica della miscibilità e della compatibilità dei formulati microbici con altre sostanze è un passo fondamentale per la loro applicazione nella pratica agricola. La miscibilità si riferisce alla capacità di una formulazione di mescolarsi uniformemente con altre sostanze, come fertilizzanti o pesticidi, senza formare depositi indesiderati o cambiamenti nella struttura fisico-chimica. La compatibilità, invece, si riferisce alla capacità di una formulazione di interagire con diverse sostanze chimiche senza perdere la sua efficacia, ovvero, nel caso di formulazioni microbiologiche, mantenendo la vitalità dei microrganismi attivi. I test di miscelabilità e compatibilità vengono effettuati in condizioni di laboratorio, dove si valuta la stabilità della formulazione in diverse miscele e le possibili interazioni con altre sostanze. Di conseguenza, i produttori possono fornire agli agricoltori formulazioni microbiche facilmente miscibili con altri agenti utilizzati in agrotecnica, senza perdere la loro efficacia. Una ricerca meticolosa in questo settore aiuta a minimizzare il rischio di interazioni chimiche indesiderate, garantendo un uso efficace e sicuro dei preparati microbiologici nella pratica agricola (Ledakowicz 2012).

Riferimenti

Bednarski W., Fiedurek J. 2012. Podstawy biotechnologii przemysłowej. Wydawnictwo WNT.

Chaudhary T., Dixit M., Gera R., Shukla A.K., Prakash A., Gupta G., Shukla P. 2020. Techniques from improving formulation of bioinoculants. 3 Biotech, 10, 1-9.

Elander R.P., Chang L.T. 1979. Microbial Culture Selection. In: Peppler H.J., Perlman D. (eds.) Microbial Technology, Second Edition. Academic Press, 243-302.

Kuila A., Sharma V. (Eds.) 2018. Principles and Applications of Fermentation Technology. John Wiley & Sons.

Ledakowicz S. 2012. Inżynieria biochemiczna. Wydawnictwo WNT.

Olicón-Hernández D.R., Guerra-Sánchez G., Porta C.J., Santoyo-Tepole F., Hernández-Cortez C., Tapia-García E.Y., Chávez-Camarillo G.M. 2022. Fundaments and concepts on screening of microorganisms for biotechnological applications. Mini review. Current Microbiology, 79(12), 373.

Sana S., Sheikh A., Maheen Z., Mukhtar N., Ali S., Aftab M., Liaqat I. 2023. Fundamentals of Microbiology: A Laboratory Manual. Scintific Knowleadge Publisher.

Schlegel H.G. 2004. Mikrobiologia ogólna. Wydawnictwo Naukowe PWN.

Singleton P.W.; Keyser H.; Sande E. 2022. Development and Evaluation of Liquid Inoculants. In: Herridge D. (ed.) Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam. ACIAR Proceeding, 109e, 52-66.

Stackebrandt E., Smith D., Casaregola S., Varese G.C., Verkleij G., Lima N., Bridge P. 2014. Deposit of microbial strains in public service collections as part of the publication process to underpin good practice in science. SpringerPlus, 3, 1-4.

Steele D.B., Stowers M.D. 1991. Techniques for selection of industrially important microorganisms. Annual Review of microbiology, 45, 89-106.

Vassilev N., Vassileva M., Azcón R., Fenice M., Federici F., Barea J.M. 1998. Fertilizing effect of microbially treated olive mill wastewater on Trifolium plants. Bioresource technology, 66(2), 133-137.

Vassileva M., Malusà E., Sas-Paszt L., Trzcinski P., Galvez A., Flor-Peregrin E., Shilev S., Canfora L., Mocali S., Vassilev N. 2021. Fermentation Strategies to Improve Soil Bio-Inoculant Production and Quality. Microorganisms 9(6), 1254.