I microrganismi utili in agricoltura

a cura di

Vincenzo Michele Sellitto

edagricole

1ª edizione: gennaio 2020

© Copyright 2020 by "Edagricole - Edizioni Agricole di New Business Media Srl.", via Eritrea, 21 - 20157 Milano
Redazione: p.zza G. Galilei, 6 - 40123 Bologna
Vendite: tel. 051 6575833; fax: 051 6575999 email: libri.edagricole@newbusinessmedia.it - www.edagricole.it

Proprietà letteraria riservata - printed in Italy

La riproduzione con qualsiasi processo di duplicazione delle pubblicazioni tutelate dal diritto d'autore è vietata e penalmente perseguibile (art. 171 della legge 22 aprile 1941, n. 633). Quest'opera è protetta ai sensi della legge sul diritto d'autore e delle Convenzioni internazionali per la protezione del diritto d'autore (Convenzione di Berna, Convenzione di Ginevra). Nessuna parte di questa pubblicazione può quindi essere riprodotta, memorizzata o trasmessa con qualsiasi mezzo e in qualsiasi forma (fotomeccanica, fotocopia, elettronica, ecc.) senza l'autorizzazione scritta dell'editore. In ogni caso di riproduzione abusiva si procederà d'ufficio a norme di legge.

5588

Realizzazione grafica: Exegi snc, Via Pelagio Palagi, 3/2 - 40138 Bologna
Impianti e stampa: Rotolito S.p.A., via Sondrio 3 - 20096 Seggiano di Pioltello (MI)

Finito di stampare nel gennaio 2020

ISBN-978-88-506-5588-5

Premessa

Mi sia d'aiuto nella prefazione a questo volume l'attingere agli ormai lontani ricordi universitari, quando mi capitò di leggere l'incipit di un testo, squisitamente tecnico, che poneva serie basi di analisi per la ricerca di cui mi sono occupato negli anni a venire, e che trova sviluppo in queste pagine.
Il testo, parlando di come la ricerca abbia sempre connaturato la pulsione ad avanzare tipica dell'uomo moderno, da Ulisse in poi, recitava «[...] *Di certo l'uomo delle palafitte, aduso a cibarsi di brani di carne sanguinolenta strappata coi denti dalla carogna ancor palpitante dell'animale ucciso, non avrebbe mai potuto determinarsi a supporre che i suoi pronipoti si sarebbero avventurati a discutere sulla varietà del carbone o di legna, sulla viridezza dell'essenza, atta a rendere più gustoso e profumato l'arrosto da apprestare*».
All'epoca, da studente, queste parole suscitarono in me più che altro ilarità ma, col tempo, le ho sapute guardare sotto un'altra luce e di certo ne ho colto, e ne colgo ancora, nuovi significati, come spero accada a coloro che si accingono a leggere questo libro.
Oggi l'agricoltura, i cui confini sfuggono vivacemente ad una chiara definizione, raccoglie in sé vari elementi distintivi, tra cui spiccano l'evoluzione, la tecnologia e certamente l'innovazione continua. Lo scenario che si prospetta nel prossimo ventennio descrive un cambiamento radicale nel concepire le modalità di sfruttamento e di utilizzo del suolo.
Un'evoluzione che si basa sulle recenti scoperte, che vedono sempre più l'affermarsi in ambito scientifico di discipline come la **microbiologia**, legata all'utilizzo dei microrganismi in grado di abitare il suolo, proteggerlo e fortificarlo dagli attacchi di funghi o batteri patogeni per le coltivazioni, con la finalità di tutelarne e preservarne il capitale a favore del suo utilizzo per le future generazioni.
Queste fondamentali considerazioni sono la base, l'idea su cui si articola questo volume, che raccoglie le più recenti considerazioni sull'utilizzo dei microrganismi in agricoltura, avendo come obiettivo la volontà di arricchirne e ridefinirne le proprietà microbiologiche, fino ad arrivare all'utilizzo pratico nell'agricoltura alla luce delle recenti scoperte scientifiche: è proprio la ricerca scientifica che attribuisce un ruolo fondamentale alla microbiologia del suolo.
Grazie all'avvento delle tecniche molecolari, prevalentemente basate sull'analisi degli acidi nucleici, combinate con tecniche di microscopia e di riassociazione del DNA, si è confermata la consapevolezza della complessità del suolo. Esso infatti

non è più considerato come collettore passivo di sostanze ma più come un sistema finemente interconnesso all'interno del quale la comunicazione e lo scambio di sostanze tra pianta e microrganismi contribuiscono, secondo le esigenze della pianta, ad agire sul biocontrollo o sulla biostimolazione.
Ormai è noto che i microrganismi siano i dominatori assoluti del biota terrestre. Basti pensare che ci sono più microrganismi in terra che stelle nel cielo e che nel nostro corpo abbiamo più batteri che cellule umane. La sempre maggior consapevolezza dell'importanza agroambientale dei microrganismi del suolo è sottolineata anche dal recente incremento del numero di articoli scientifici che riguardano il microbioma del suolo.
È in questo contesto che il concetto di suolo viene reinterpretato in una rinnovata, migliore e adeguata definizione che ne definisce stavolta il ruolo, considerandolo come organismo vivente al pari della pianta da esso ospitata: una nuova visione apre a nuove tecnologie in grado di tutelarlo e preservarlo.
La desertificazione incalzante e l'incapacità di fronteggiare la domanda alimentare globale con risorse rinnovabili in grado di sostentare le popolazioni sempre più numerose del nostro pianeta pongono altresì allo scienziato numerosi ed urgenti quesiti che spingono alla necessità di integrare etica e tecnologia.
È così che la conferma di numerose evidenze scientifiche – tra cui quelle della relazione endofitica e simbiontica tra microrganismo e pianta – diventa essenziale per spiegare fino a che punto il cambiamento nella visione e nella descrizione della vita nel suolo sottenda una **rivoluzione** per l'intero sistema della produzione agricola moderna.
Come si diceva, la caratteristica essenziale ed estremamente innovativa dei microrganismi è quella di creare delle vere e proprie reti di interscambio di elementi nutrizionali, che in taluni casi riescono ad evolversi ulteriormente, realizzando una relazione endofitica con la pianta: una sinergia che premetterà alla pianta stessa di fronteggiare i maggiori stress biotici e abiotici tipici del ciclo vitale. Grazie a tali interconnessioni, il parallelismo tra la necessità e la capacità di interazione sociale dell'individuo e della pianta si fa sempre più evidente: al pari dell'uomo, anche le piante necessitano di relazionarsi del tutto peculiarmente, utilizzando segnali chimici per comunicare all'interno di un habitat dalla frequentazione microbiologica "selezionata" appositamente per favorire il loro sviluppo e la loro sopravvivenza all'interno della "comunità" vegetale. La comunicazione tra le piante evidenzia un sistema strettamente interconnesso che fa dello scambio di segnali chimici un elemento essenziale alla comprensione ed allo studio della relazione suolo-pianta. In questo *organismo interconnesso* molecole e recettori sono pronti, secondo le istruzioni che si scambiano, ad ostacolare o a favorire il ciclo di vita della pianta. Tutto ciò si traduce in un bassissimo impatto ambientale realizzato grazie alla sensibile riduzione dei pesticidi che non hanno più ragione di essere in un equilibrio microbiologicamente funzionale a tale relazione.
È in questo "suolo fertile" di scoperte ed innovazione scientifica che si scriverà il futuro delle scienze agrarie e della nutrizione umana. Allo scienziato, all'agronomo, al tecnico, e a tutti coloro che si affacciano al mondo dell'agricoltura e della

nutrizione è affidato un compito di grande responsabilità e di grande prestigio: fare sì che tutte le parti possano interagire per valorizzare e trarre le migliori risorse da queste scoperte, con la consapevolezza che soltanto se considereremo la pianta come il prodotto dell'interazione con il suolo e coi suoi abitanti potremo realizzare il grande progetto di sostentamento ecologico ed economicamente valido della vita degli esseri umani sul pianeta.
Il volume descrive i temi del multitrofismo e dei rapporti endofitici come funzioni essenziali per consentire alla pianta di difendersi dal suo interno evitando il ricorso massivo ai pesticidi che, anche se di ultima generazione, sono purtroppo in grado di distruggere e/o disorientare il microbiota, impoverendolo e negandogli la possibilità di rigenerarsi.
È compito di questa nuova agricoltura ritornare ad utilizzare strategie nutrizionali dedicate in maniera adeguata e rispettosa della vita all'interno del suolo.
Testimonianze sempre più frequenti dell'esistenza di un vero e proprio scambio comunicativo ci impongono di illustrare come questi processi risultino essenziali per poter controllare funghi, batteri nocivi e insetti dannosi alle coltivazioni, rivelando così l'importanza del ruolo dei microrganismi anche all'interno dei biopreparati in commercio formulati per l'agricoltura convenzionale.
La microbiologia applicata ai processi agricoli è ormai una scienza depositaria di un ricco patrimonio di dati scientifici e di esperienze pratiche relative alle diverse colture in diversi sistemi pedoclimatici.
L'obiettivo di questo volume, che nasce dalla collaborazione di docenti e ricercatori Italiani, è proprio quello di cominciare a fare il punto della situazione in un ambito che vede da una parte una forte componente scientifica che senza sosta produce dati e teorie e, dall'altra, il mondo dell'impresa e dell'agricoltura pratica che necessitano e già applicano questa nuova filosofia.
Nel libro sono trattati più di trecento microrganismi diversi; dopo un capitolo di introduzione generale, vengono approfonditi temi come la rizosfera, il microbioma del suolo e la biodiversità con un approccio moderno e supportato dalle più recenti ricerche scientifiche. Il tema conduttore, il suolo, sarà approfondito nella parte centrale e ci si concentrerà poi sui tempi più specifici e applicativi legati al biocontrollo delle patologie fungine, al controllo degli insetti e dei nematodi.
Saranno anche fornite informazioni sull'effetto biostimolante dei microrganismi e dei loro rapporti simbiotici ed edofitici con le colture agrarie e trattati i temi legati alla produzione dei metaboliti secondari in agricoltura e all'uso di questi nel post raccolta.
Oltre alla parte tecnico-scientifica, il volume raccoglie le linee guida essenziali sulla legislazione e le nuove modalità di definizione dei prodotti a base di microrganismi.

Questo libro si propone come un ideale crocevia in cui Scienza, Agricoltura e Impresa si incontrano per proporre insieme un nuovo modo di vedere il suolo e il futuro dell'agricoltura.

Vincenzo Michele Sellitto

Indice

1. Introduzione ai microrganismi benefici del suolo
(*Marina Basaglia, V. Michele Sellitto, Lorenzo Favaro, Sergio Casella*) 1
1.1 Introduzione 1
1.2 I microrganismi benefici dei suoli
(BSM: *Beneficial Soil Microorganisms*) 2
1.2.1 I batteri promotori della crescita delle piante
(PGPR: *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) 3
1.2.2 I funghi promotori della crescita delle piante
(PGPF: *Plant Growth Promoting Fungi*) 5
1.2.3 I cianobatteri 7
1.3 Il ruolo dei BMS in agricoltura sostenibile: dalla ricerca di base
al prodotto commerciale 8
1.3.1 I principali bio-fertilizzanti 10
1.3.2 I bio-pesticidi 12
1.4 Altre applicazioni dei microrganismi dei suoli: il biorisanamento
e la biodegradazione 13
1.5 Considerazioni conclusive 15
Bibliografia 16

2. Le interazioni molecolari pianta-microrganismo all'interfaccia suolo-radice ed il loro ruolo nei programmi di selezione vegetale
(*Laura Pietrangelo, Davide Bulgarelli*) 23
2.1 Introduzione 23
2.2 Il microbioma della rizosfera: composizione tassonomica
e funzionale 24
2.3 Il ruolo del terreno agrario nel plasmare il microbioma
delle piante 27
2.4 La pianta come determinante del microbioma proliferante
all'interfaccia suolo-radice 27
2.5 Il microbioma radicale nei programmi di miglioramento
genetico delle piante: ritorno al futuro? 33
Bibliografia 34

3. La biodiversità del suolo e nuove tecnologie per lo studio del microbiota
(*Stefano Mocali, Loredana Canfora*) 37
3.1 Il suolo come "organismo vivente" 37
3.2 La biodiversità microbica 38
3.3 I microrganismi e i processi del suolo 41
3.4 Le nuove tecnologie per lo studio della biodiversità microbica 42
3.4.1 Tecnologie a formato aperto 44
3.4.2 Tecnologie a formato chiuso 44
3.5 Le tecnologie disponibili per il sequenziamento massivo (NGS) 46
3.6 Dal campo al laboratorio: le tecnologie disponibili per la valutazione del rischio ambientale ed il monitoraggio dei bioinoculi nel suolo 48
3.6.1 Persistenza e tracciabilità degli inoculi microbici nel suolo: esempi di screening 50
3.6.2 Valutazione dell'impatto sulla comunità microbica nativa del suolo "ospite" 51
3.7 Conclusioni e prospettive future 51
Bibliografia 52

4. Il suolo e le sue funzioni
(*Antonello Bonfante, Piero Manna*) 55
4.1 Il suolo e le sue funzioni 55
4.2 Suolo e gestione dell'acqua 63
4.3 Suolo ed organismi viventi 65
Bibliografia 69

5. I batteri promotori della crescita delle piante (PGPR) e i batteri agenti di biocontrollo (BCA)
(*Massimo Zaccardelli*) 71
5.1 Introduzione 71
5.2 Definizione di PGPR e BCA e generalità 71
5.3 Meccanismi di promozione della crescita vegetale 74
5.3.1 La fissazione biologica dell'azoto 75
5.3.2 La solubilizzazione del fosforo 75
5.3.3 La produzione di fitormoni 76
5.4 Meccanismi di biocontrollo dei patogeni vegetali 77
5.4.1 L'antibiosi 78
5.4.2 La produzione di siderofori 79
5.4.3 Il parassitismo e la predazione 80
5.4.4 La competizione per lo spazio e i nutrienti 80
5.4.5 L'induzione di resistenza sistemica nelle piante 80
5.5 I principali PGPR e BCA batterici 81

5.6 Impiego dei formulati a base di PGPR e BCA 84
Bibliografia 86

6. La simbiosi tra rizobi e Leguminose
(*Andrea Squartini*) 93
6.1 La fissazione biologica dell'azoto e la fotosintesi: una retrospettiva 93
6.2. Le simbiosi azotofissatrici: perché solo con angiosperme dicotiledoni e perché tipicamente in ambiente terrestre? 94
6.3 Il nodulo radicale: un fusto senza foglie nato sopra una radice 96
6.4 Il compromesso delle simbiosi azotofissatrici: un passaggio necessario o un bene superfluo? 97
6.5 Perché i cereali non hanno ancora sviluppato simbiosi azotofissatrici strette? 98
6.6 Trasgressioni rizobiche nelle graminacee propiziate dall'ecosistema 101
6.7 Vivere nel suolo da batteri 101
6.8 Entrare in una leguminosa: il corteggiamento molecolare 103
6.9 Eso-polisaccaridi batterici: un abito multiuso 106
6.10 Specificità e promiscuità di ospite 106
6.11 Avventurarsi in una pianta leguminosa: il paradosso di un apparente vicolo cieco 108
6.12 La genetica della simbiosi: plasmidi e trasposoni 109
6.13 Maggioranze silenziose: i rizobi non-nodulanti 112
6.14 Ecologia inter-specie: sopravvivenza e colonizzazione in differenti rizosfere e suoli 114
6.15 Ecologia intra-specie: selezione e concorrenza tra rizobi nella stessa rizosfera 117
6.16 Dall'ecologia all'applicazione pratica: inoculanti azotofissatori per l'agricoltura 118
Bibliografia 120

7. Funghi agenti di biocontrollo, biostimolazione e biofertilizzazione
(*Catello Pane, Loredana Sigillo, Mariateresa Cardarelli*) 127
7.1 I Funghi del suolo 127
7.2 Antagonisti per la difesa delle piante e promotori della crescita 127
7.3 Uso combinato in consorzi microbici 132
7.4 Applicazione pratica 134
Bibliografia 134

8. I funghi entomopatogeni nella protezione delle piante
(*Rosario Nicoletti*) 137
8.1 Introduzione 137

8.2 Cenni storici e tassonomici 138
8.3 Aspetti ecologici 140
8.4 Impiego dei funghi entomopatogeni 146
8.5 Prospettive nella difesa integrata delle colture 151
Bibliografia 154

9. Biologia e applicazioni in agricoltura dei funghi appartenenti al genere *Trichoderma*
(*Michelina Ruocco, Liberata Gualtieri, Maurilia Maria Monti*) 161
9.1 Generalità su *Trichoderma* 161
9.2 Tassonomia 162
9.3 Meccanismi d'azione 162
9.4 Rizocompetenza e induzione di resistenza 165
9.5 Interazioni con altri organismi 166
9.6 Applicazioni in agricoltura 167
Bibliografia 169

10. Biocontrollo dei nematodi fitoparassiti
(*Vincenzo Michele Sellitto, Laura Pietrantonio*) 171
10.1 Introduzione 171
10.2 I nematodi fitoparassiti 172
10.3 Controllo dei nematodi fitoparassiti 175
10.4 Principali antagonisti 176
10.4.1 Funghi 176
10.4.2 Batteri 182
Bibliografia 184

11. Le micorrize: dallo studio dei meccanismi molecolari dell'interazione alle applicazioni in agricoltura
(*Raffaella Balestrini, Valeria Bianciotto*) 189
11.1 Introduzione 189
11.2 La diversità morfologica e funzionale delle simbiosi micorriziche 190
11.2.1 Le simbiosi micorriziche arbuscolari (AM) 190
11.2.2 Le ectomicorrize (ECM) 193
11.2.3 Altre simbiosi micorriziche 197
11.3 Gli aspetti funzionali della simbiosi AM: lo scambio di nutrienti 200
11.4 I funghi AM: quali sono i vantaggi dell'introduzione nel suolo di microrganismi biostimolanti/biofertilizzanti? 203
11.5 Conclusioni 206
Bibliografia 206

12. Stato dell'arte e prospettive nell'impiego di metaboliti microbici in agricoltura
(*Claudio Altomare*) 215
12.1 Introduzione 215
12.2 Insetticidi, acaricidi e nematocidi 217
12.2.1 Tossine Bt 217
12.2.2 Spinosine 220
12.2.3 Avermectine e milbemicine 220
12.2.4 Altri metaboliti con attività insetticida prodotti da batteri 221
12.2.5 Metaboliti con attività insetticida prodotti da funghi 221
12.2.6 Metaboliti con attività nematocida prodotti da funghi 223
12.3 Sostanze antimicrobiche (fungicidi e battericidi) 224
12.3.1 Strobilurine 224
12.3.2 Sostanze prodotte da funghi endofitici 224
12.3.3 Sostanze prodotte da batteri 225
12.4 Erbicidi 226
12.5 Metaboliti bioattivi di *Trichoderma* spp. 228
12.5.1 Peptaiboli 229
12.5.2 Gliotossina e gliovirina 233
12.5.3 Pironi 233
12.5.4 Altri metaboliti con azione antimicrobica 234
12.5.5 Sostanze di crescita 235
12.5.6 Siderofori e sostanze chelanti 237
12.5.7 Sostanze con attività insetticida e nematocida 238
12.5.8 Sostanze con azione erbicida 239
12.6 Conclusioni e prospettive 240
Bibliografia 241

13. Lotta biologica contro le malattie postraccolta degli ortofrutticoli
(*Giuseppe Lima, Simona Marianna Sanzani, Filippo De Curtis e Antonio Ippolito*) 243
13.1 Introduzione 243
13.2 Microrganismi antagonisti come agenti di biocontrollo (BCA) 244
13.3 Ruolo dell'ecologia microbica nel contenimento delle malattie postraccolta 246
13.4 Influenza dei prodotti fitosanitari di sintesi sulle popolazioni microbiche utili di fillosfera e carposfera 247
13.5 Integrazione di microrganismi antagonisti con altri sistemi di controllo 248
13.5.1 BCA e mezzi fisici 248
13.5.2 BCA e composti di origine naturale 250
13.5.3 BCA e dosi ridotte di fungicidi di sintesi 252
13.5.4 Applicazione preraccolta di BCA 253
13.5.5 Approccio multi-strategico 255

13.6 Formulazione dei BCA 256
13.7 Approcci genomici per lo studio delle interazioni BCA-Ospite-Patogeno 257
13.8 Considerazioni conclusive 260
Bibliografia 261

14. I biopreparati a base di microrganismi (BBM)
(*Vincenzo Michele Sellitto*) 269
14.1 Introduzione 269
14.2 Cosa sono i biopreparati a base di microrganismi (BBM) 270
14.3 Dinamica di un biopreparato a base di microrganismi 273
14.4 Formulazioni 276
Bibliografia 278

15. Il ruolo dei microrganismi nell'economia agricola: riferimenti normativi, impiego e prospettive
(*Valerio Battaglia, Raffaella Pergamo*) 281
15.1 Introduzione 281
15.2 L'utilizzo dei microrganismi per le piante 283
15.3 I microrganismi nel Reg (CE) N. 1107/2009 284
15.4 I microrganismi nel Reg (UE) N. 2019/1009 287
15.5 Prospettive 290
Bibliografia 291
Sitografia 291

Indice analitico 293

Gli Autori

Claudio Altomare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Bari.

Raffaella Balestrini, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (CNR-IPSP).

Marina Basaglia, Università degli Studi di Padova.

Valerio Battaglia, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di Ricerca di Cerealicoltura e Colture Industriali.

Valeria Bianciotto, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (CNR-IPSP).

Antonello Bonfante, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Istituto per i Sistemi Agricoli e Forestali del Mediterraneo (ISAFOM)

Davide Bulgarelli, University of Dundee at The James Hutton Institute, Invergowrie (Regno Unito).

Loredana Canfora, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria – Centro di ricerca Agricoltura e Ambiente (CREA – AA), Roma.

Mariateresa Cardarelli, CREA-Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Pontecagnano Faiano (Salerno).

Sergio Casella, Università degli Studi di Padova.

Filippo De Curtis, Università degli Studi del Molise.

Lorenzo Favaro, Università degli Studi di Padova.

Liberata Gualtieri, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Portici (NA).

Antonio Ippolito, Università di Bari Aldo Moro.

Giuseppe Lima, Università degli Studi del Molise.

Piero Manna, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Istituto per i Sistemi Agricoli e Forestali del Mediterraneo (ISAFOM), Ercolano (NA), Italia.

Stefano Mocali, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria – Centro di ricerca Agricoltura e Ambiente (CREA – AA), Firenze.

Maurilia Maria Monti, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Portici (NA).

Rosario Nicoletti, Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria, Centro di Ricerca per l'Olivicoltura, la Frutticoltura e l'Agrumicoltura, Caserta, e Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Portici (NA).

Catello Pane, CREA-Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Pontecagnano Faiano (Salerno).

Raffaella Pergamo, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria – Centro di Ricerca di Cerealicoltura e Colture Industriali - Laboratorio di Caserta (CREA-CI), Caserta, IT.

Laura Pietrangelo, University of Dundee at The James Hutton Institute, Invergowrie (Regno Unito).

Laura Pietrantonio, MS BIOTECH SPA, Roma.

Michelina Ruocco, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Portci (NA).

Simona Marianna Sanzani, Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari (CIHEAM-IAMB), Valenzano (BA).

Vincenzo Michele Sellitto, MS BIOTECH SPA, Roma.

Loredana Sigillo, CREA-Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Pontecagnano Faiano (Salerno).

Andrea Squartini, Università degli Studi di Padova.

Massimo Zaccardelli, CREA-Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Pontecagnano Faiano (Salerno).

Definire un suolo "vivo" significa
percepire la vita al suo interno
e la sua immensa potenzialità
di trasformarsi nel nutrimento
ideale per la pianta che ospita.

V.M. Sellitto

1. Introduzione ai microrganismi benefici del suolo

Marina Basaglia, Vincenzo Michele Sellitto, Lorenzo Favaro, Sergio Casella

1.1 Introduzione

Il rapido aumento della popolazione mondiale si accompagna da un lato allo sfruttamento eccessivo dei suoli agricoli esistenti, dall'altro alla necessità di estendere le aree geografiche assegnate alla produzione di alimenti, carburanti e prodotti destinati alla trasformazione. Per soddisfare la domanda, vengono utilizzate pratiche agricole sempre più intensive che prevedono l'impiego di fertilizzanti chimici e pesticidi, portano alla degradazione dei suoli e determinano quindi una drastica perdita di biodiversità.
La degradazione dei suoli, di cui le attività antropogeniche sono le principali responsabili, ha come conseguenza fenomeni quali l'erosione, l'aumento di salinità o la desertificazione, causando una ulteriore riduzione della disponibilità di aree coltivabili. Una possibile soluzione potrebbe essere l'aumento della produttività delle aree destinate all'agricoltura, ma anche a fronte dei notevoli sviluppi tecnologici degli ultimi decenni, non è ancora possibile soddisfare la domanda globale di cibo (Lal, 1993; Bruce *et al.*, 1995; Girardin *et al.*, 2000; Lal, 2001; Rosengrand *et al.*, 2002; Zalidis *et al.*, 2002; Oldeman *et al.*, 2017).
Un importante contributo alla soluzione del problema è fornito dai microrganismi, capaci di proliferare in quasi tutti gli ecosistemi conosciuti e, complessivamente, in tutti gli habitat presenti sulla Terra (Madigan *et al.*, 1997; Biavati & Sorlini, 2008).
I suoli, in particolare, sono caratterizzati da un'elevata biodiversità: contengono infatti numerosi organismi che hanno complesse e intime relazioni tra loro e con le piante (Wagg *et al.*, 2014). Per semplicità, gli organismi del suolo sono spesso suddivisi in gruppi in base alle loro dimensioni o ruoli funzionali all'interno delle reti alimentari. I gruppi includono comunemente la macrofauna (ad esempio lombrichi e termiti), la mesofauna (tra cui i microartropodi quali gli acari), la microfauna (che comprende nematodi e protozoi) e la microflora (eubatteri, archaea, funghi e alghe) (Fitzpatrick & Fitzpatrick, 1993; Delgado-Baquerizo *et al.*, 2018).
La microflora svolge un ruolo chiave nella decomposizione dei substrati organici derivati dalle piante e nella mineralizzazione della sostanza organica. L'energia derivata dalla pianta fluisce dalla microflora alla microfauna o mesofauna i cui

membri sono spesso predatori della microflora: per esempio i batteri possono essere preda delle amebe, prede a loro volta dei nematodi, nutrimento per gli acari (Madigan *et al.*, 1997).
I suoli sono costituiti da tre componenti, intimamente connesse: una componente solida (materiale inorganico e materiale biologico morto), una componente liquida acquosa e una componente gassosa (Bronick & Lal, 2005). In questa complessa matrice vivono e interagiscono i microrganismi, organizzati generalmente in micro-colonie che si localizzano nelle microscopiche nicchie del suolo più adatte alle loro necessità fisiologiche; sono generalmente più presenti nella parte superficiale perché le fonti alimentari sono più abbondanti, ma si trovano anche nelle zone più profonde del sottosuolo. L' area immediatamente adiacente alle radici delle piante (chiamata rizosfera), dove le sostanze chimiche liberate dalle radici forniscono fonti carboniose e non, prontamente disponibili per la crescita microbica, è in genere la zona numericamente più ricca di microrganismi. Infatti, gli essudati rilasciati dalle radici delle piante sono una preziosa fonte alimentare che richiama molti organismi. Tra di essi ve ne saranno moltissimi con effetto neutro nei confronti della pianta, ma anche altri che esercitano o potrebbero esercitare effetti deleteri o benefici e che la pianta è talvolta in grado di selezionare (Foster, 1988; Raaijmakers *et al.*, 2009; Kowalchuk *et al.*, 2002; Baudoin *et al.*, 2003).

1.2 I microrganismi benefici dei suoli (BSM: *Beneficial Soil Microorganisms*)

Da più di un secolo, ormai, la comunità scientifica ha studiato e dimostrato che i microrganismi del suolo (eubatteri, archaea, funghi e alghe) svolgono nell'ecosistema sia ruoli positivi che negativi. Ad oggi, non è ancora dato sapere quanti ne esistano sul nostro pianeta. Recentemente, nel tentativo di rispondere a questa difficile domanda, ha preso il via la *Earth Microbiome Project* (EMP), una gigantesca ricerca partecipata da 160 istituti di ricerca e oltre 500 scienziati di tutto il mondo (Thompson *et al.*, 2017).
Al momento, si stima che in un grammo di suolo convivano alcuni miliardi di batteri, appartenenti a diverse migliaia di specie diverse, e più di 200 metri di ife fungine (Jackson, 1965; Hansenn *et al.*, 1974; Paul, 2014). Solo una minoranza di essi è all'origine di malattie per l'uomo, gli animali o le piante, mentre la maggioranza è da considerarsi composta da microbi benefici. Infatti, sebbene costituiscano meno dell'1% della massa totale di un suolo, nella maggior parte dei casi i microrganismi svolgono funzioni vitali nel supportare la vita. Essi sono ormai definiti BSM (*Beneficial Soil Microorganisms*) e svolgono numerose funzioni, tra cui

- a. aumentare la fertilità dei suoli,
- b. promuovere la crescita delle piante migliorando l'assorbimento dei nutrienti e i sistemi di difesa attraverso la secrezione di metaboliti,

- c. ridurre gli stress biotici e abiotici delle piante,
- d. contribuire alla detossificazione dei suoli da sostanze inquinanti (es. pesticidi, erbicidi, altri fitofarmaci, ecc.),
- e. contribuire alla formazione della complessa matrice del suolo sia tramite l'ampia rete di ife fungine che tengono insieme le particelle di suolo, sia tramite la secrezione di materiale polisaccaridico, gomme e glicoproteine, che fanno da collante di tutte le componenti minerali del suolo (Miller & Jastrow, 2000; Ritz & Young, 2004; Sylvia *et al.*, 2005; Gamalero *et al.*, 2009); Hallett *et al.*, 2009; Hayat *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2016; Vejan *et al.*, 2016).

I microrganismi del suolo svolgono inoltre un ruolo cruciale nella decomposizione e mineralizzazione della materia organica fornendo così i nutrienti fondamentali per le piante (Bot, 2005; Dou & Wang, 2011). Una volta degradato quanto è possibile, ciò che rimane è trasformato in humus, un materiale in lentissima evoluzione chimico-fisica che può permanere nel suolo anche per millenni (Stevenson, 1994; Lu *et al.*, 2006). L'humus rappresenta una base fisica importante sulla quale le radici delle piante possono ancorarsi e contribuisce alla formazione degli aggregati e micro-aggregati del suolo e a trattenere l'umidità, rappresentando così una componente importante della capacità di scambio cationico del suolo.
I BSM possono inoltre indurre nelle piante una maggiore tolleranza nei confronti di condizioni ambientali avverse quali lo stress salino, la mancanza d'acqua, la presenza di piante infestanti, la carenza di nutrienti o la presenza di metalli pesanti. Contribuiscono anche alla soppressione dei patogeni: come sopra anticipato, i suoli contengono anche microrganismi dannosi che possono colonizzare le piante, riducendone così la produttività. Nel complesso quindi, la presenza di BSM contribuisce a rendere i suoli più sani, a migliorare la crescita delle piante e a ostacolare il proliferare dei patogeni. I vari meccanismi d'azione che i BSM mettono in atto saranno ampiamente descritti e discussi nei capitoli successivi

1.2.1 I batteri promotori della crescita delle piante (PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

La rizosfera è definita come la porzione di suolo influenzata in modo specifico dal sistema radicale della pianta. Se confrontata con il suolo non-rizosferico questa parte di suolo così a stretto contatto con la radice risulta essere più ricca in sostanze nutritive, a seguito dell'accumulo di essudati radicali, un complesso di sostanze quali amminoacidi e zuccheri, fonte di energia e nutrienti per i microrganismi (Kuzyakov & Domanski, 2000). Negli essudati radicali sono contenute una grande varietà di sostanze che provengono da cellule e tessuti vegetali sgretolati, mucillagini, sostanze volatili ed essudati solubili rilasciati da cellule danneggiate e intatte (Curl & Truelove, 1986; Uren, 2001; Dakora & Phillips, 2002; Dennis *et al.*, 2010). Questa condizione si riflette sul numero e la tipologia di batteri che si trovano attorno alle radici delle piante; nonostante il numero di

microrganismi del suolo rizosferico sia generalmente da 10 a 100 volte più elevato di quello del suolo nudo e privo di radici (Lynch & Whipps, 1990; Semenov *et al.*, 1999), l'effetto selettivo della pianta sulle comunità microbiche rizosferiche è spesso ben marcato e la biodiversità ne risulta generalmente ridotta (Marilley *et al.*, 1998; Marilley & Aragno, 1999).
Come sopra accennato, i batteri associati alle piante possono essere classificati in benefici, deleteri o neutrali sulla base dei loro effetti sul loro ospite. I batteri benefici a vita libera sono generalmente indicati come rizobatteri promotori della crescita delle piante (PGPR: *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) e, indipendentemente dai meccanismi con i quali ne favoriscono la crescita, colonizzano la rizosfera, il rizoplano (la superficie della radice) o l'interno dei tessuti radicali stessi. Le loro caratteristiche sono piuttosto differenziate e comprendono batteri attivi in numerosi processi chiave, quali il controllo biologico dei fitopatogeni o i cicli della materia. Alcuni compiono l'intero ciclo di vita nel suolo rizosferico mentre altri hanno vita libera ma possono instaurare complesse interazioni cenobiotiche e/o simbiotiche con i tessuti radicali. In figura 1.1 è riportata la microfotografia di una radice di mais che mostra le conseguenze della colonizzazione da parte di *Azospirillum brasilense.* Si tratta di un batterio a vita libera del suolo tra i più noti PGPR che, oltre a fissare discrete quantità di azoto di cui la pianta si nutre, produce composti auxinici che inducono lo sviluppo dei peli radicali, aumentando così la capacità di assorbimento.
I PGPR appartengono a diversi generi tra cui i principali sono *Pseudomonas*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Serratia* ed altri ancora. Negli ultimi decenni essi sono sta-

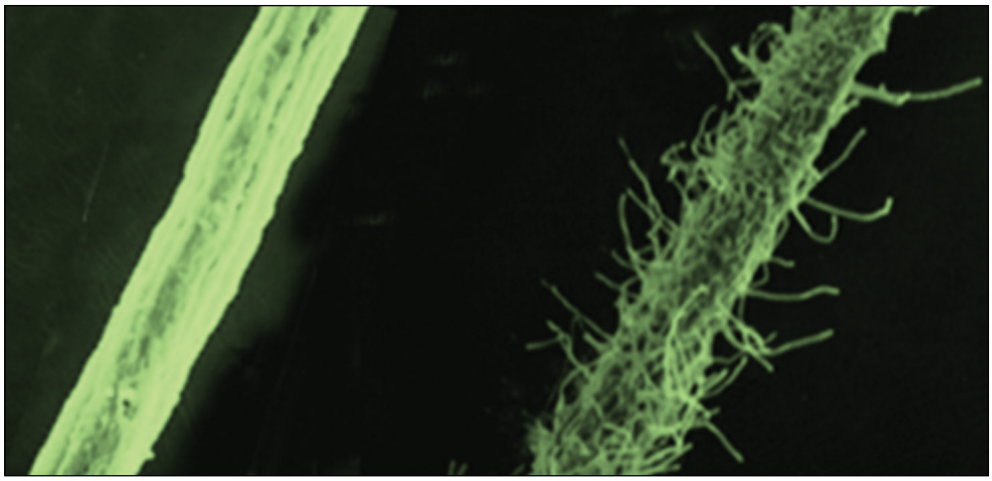


Figura 1.1 – *Effetto dei composti auxinici (acido indolacetico) sullo sviluppo di peli radicali su una radice di mais inoculato (a destra) con* Azospirillum*; sulla sinistra la radice di una piantina non inoculata e trattata con azoto combinato.*

ti oggetto di numerose ricerche mirate a chiarire i meccanismi molecolari che stanno alla base delle loro interazioni con le piante. È ormai chiaro che possono influenzare la crescita e la salute di molte specie vegetali diverse in modo diretto o indiretto (Nelson, 2004; Van Wees *et al.*, 2008; Berg, 2009; Hayat *et al.*, 2010; Glick, 2012; Gaiero, *et al.*, 2013. Farrar, 2014; Pii, 2015; Vejan, 2016; Meena, 2017). La promozione diretta della crescita implica che siano forniti alla pianta composti sintetizzati dagli stessi batteri che ne colonizzano le radici, oppure che essi facilitino, con vari meccanismi, l'assorbimento dei nutrienti dall'ambiente. Ne sono validi esempi alcuni ceppi batterici che producono fitoormoni, siderofori (molecole che trasportano gli ioni ferro) e altri che fissano l'azoto atmosferico ($N_2 \rightarrow NH_3$) o solubilizzano composti inorganici contenenti il fosforo, il potassio o lo zinco, rendendo così tutti questi nutrienti maggiormente biodisponibili per le piante. La promozione indiretta si verifica invece quando i PGPR riducono o prevengono gli effetti deleteri di uno o più organismi fitopatogeni (agiscono cioè come agenti di bio-controllo) tramite azioni quali il sequestro del ferro in rizosfera, la sintesi di sostanze antagoniste (es. antibiotici) o di enzimi che lisano le pareti fungine, la competizione sui siti di legame sulla superficie delle radici o tramite l'induzione della resistenza sistemica (ISR: *Induced Systemic Resistance*).
L'azione dei PGPR non è necessariamente unica. Ad esempio, alcuni di essi già noti come efficaci agenti di bio-controllo, hanno mostrato di poter svolgere anche un ruolo diretto nella promozione della crescita grazie alla concomitante capacità di fissare l'azoto atmosferico o tramite la produzione di auxine, fitormoni che causano l'estensione dei tessuti vegetali.
È disponibile un'ampia letteratura scientifica che descrive il ruolo dei PGPR nell'agricoltura sostenibile sono consultabili numerose reviews o articoli scientifici che ne chiariscono le funzioni (ad esempio Singh, 2011; Lichtfouse, 2009; Singh *et al.*, 2011; Vejan *et al.*, 2016; Toju *et al.*, 2018). Sebbene inizialmente il loro ruolo sia stato esplorato solo in relazione all'aumento della produttività, numerosi studi stanno oggi confermando che i PGPR svolgono un ruolo fondamentale più generale nel regolare il funzionamento degli agro-ecosistemio nel ripristinare suoli degradati migliorandone la qualità, nel ridurre gli inquinanti ambientali e nell'attenuare l'effetto dei cambiamenti climatici chiaramente in corso.
I PGPR e le loro interazioni rappresentano quindi una grande potenzialità per l'agricoltura sostenibile.

1.2.2 I funghi promotori della crescita delle piante (PGPF: Plant Growth Promoting Fungi)

Il suolo contiene un'ampia varietà di funghi benefici e patogeni che colonizzano le piante in tutte le fasi della loro crescita. Si stima che negli ecosistemi naturali esistano ben 1, 5 milioni di specie fungine sebbene solo il 5-10% sia stato formalmente descritto (Horwitz *et al.*, 2013).
I funghi del suolo costituiscono generalmente la maggiore percentuale di biomassa delle comunità microbiche e sono considerati tra gli attori più importanti nei

processi di mineralizzazione, immobilizzazione e trasformazione di vari elementi, specialmente azoto e fosforo (Burgers, 2012; Paul, 2014).
Essi possono interagire con le piante a seguito del rilascio di composti chimici specifici da parte delle radici, il cui effetto può essere bidirezionale: per esempio, composti derivati dalle cellule corticali ed epidermiche stimolano la proliferazione di funghi benefici sulla superficie e all'interno delle radici, mentre il rilascio di altri composti fenolici inibisce la crescita di funghi patogeni (George, 1995; Hallmann & Sikora, 1996; Broeckling *et al.*, 2008; Bücking & Kafle, 2015).
I funghi benefici appartenenti ai generi *Trichoderma*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Phoma*, *Penicillium*, *Sporobolomyces* e altri ancora, sono naturalmente presenti.
Un caso particolare riguarda le interazioni micorriziche, associazioni simbiontiche tra funghi benefici del suolo e le radici della grande maggioranza delle piante. I funghi micorrizzici vescicolari-arbuscolari (VAM) in particolare, hanno una grande importanza per le colture agrarie e verranno descritte in dettaglio in un capitolo specifico. Sono simbionti obbligati e penetrano all'interno dei tessuti e delle cellule dell'ospite; si insediano nella radice delle piante riempiendone gli spazi intercellulari, formando strutture ovoidali chiamate **vescicole** e strutture ramificate dette **arbuscoli** (*Fig. 1.2*).

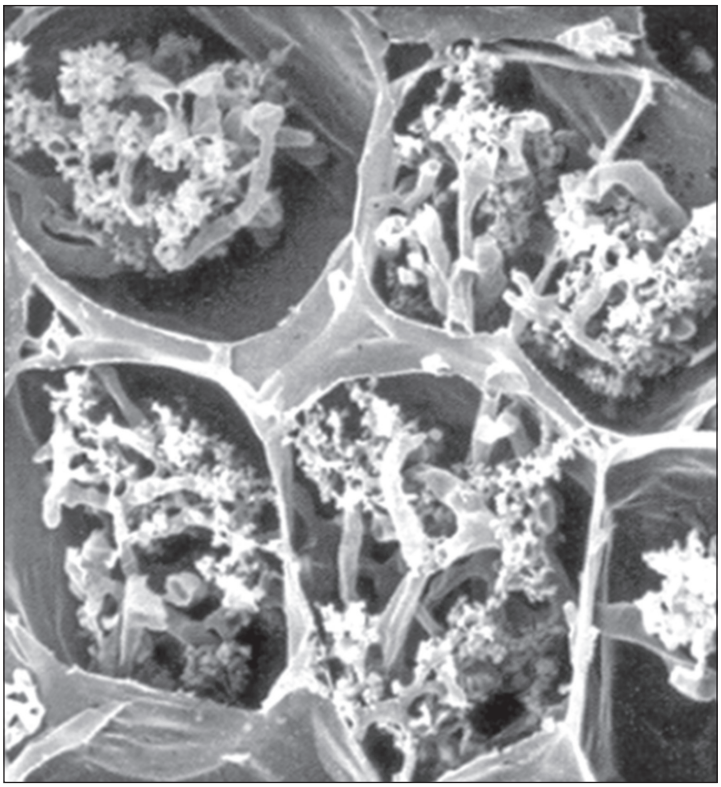


Figura 1.2 – *Arbuscoli intracellulari di funghi VAM (immagine al microscopio elettronico a scansione).*

La componente fungina, avendo un metabolismo decisamente eterotrofo, riceve i composti del carbonio necessari per il suo sostentamento derivanti dalla fotosintesi clorofilliana del partner vegetale. In cambio, le piante ricevono acqua e sali minerali, con particolare riguardo ai fosfati, che il fungo è capace di reperire solubilizzando composti insolubili che lo contengono, e alle forme ridotte di azoto, che il fungo strappa ai colloidi argillosi del suolo e che la pianta farebbe fatica ad assorbire. Le minori dimensioni delle ife fungine rispetto alle radici consentono alle micorrize di aumentare notevolmente l'area di assorbimento di una pianta, assumendo praticamente il ruolo di estensioni del sistema radicale (Gianinazzi *et al.*, 2010; Ferlian, 2018; Powell, & Bagyaraj, 2018; Verlinden, 2018). Infine, è da ricordare che vari funghi micorrizici interagiscono sinergicamente con batteri azotofissatori apportando alla pianta ulteriori vantaggi (Barbieri *et al.*, 2010; Minerdi *et al.*, 2010; Balestrini *et al.*, 2012).

1.2.3 I cianobatteri

I cianobatteri sono procarioti fotosintetizzanti, onnipresenti in natura e considerati organismi pionieri. Si trovano comunemente in laghi, stagni, sorgenti, zone umide, ruscelli, fiumi e suoli, possono vivere liberi o instaurare simbiosi specifiche con diversi organismi come spugne, amebe, diatomee, funghi e piante (briofite, felci, gimnosperme e angiosperme).
Se si escludono le specie che possono produrre sostanze tossiche, moltissimi studi ne hanno dimostrato l'importanza nella coltivazione del riso perché sono capaci di fissare l'N_2 nel difficile ambiente "risaia" e non dipendono dalla pianta per l'approvvigionamento del carbonio (Mishra *et al.*, 2018; Tsygankov, 2007).
Tra i cianobatteri simbionti (detti cianobionti) più comuni è da ricordare *Anabaena*, che instaura simbiosi con la felce d'acqua *Azolla* e che è in grado di fissare l'azoto atmosferico grazie ad alcune cellule specializzate (chiamate eterocisti). Dalla simbiosi, entrambi i partner traggono beneficio: il microrganismo si approvvigiona di nutrienti ed è protetto dai predatori e dall'essiccamento, mentre l'ospite riceve, in forma ammoniacale, tutto o quasi tutto l'azoto necessario per il suo sviluppo, consentendo la colonizzazione di ambienti poveri di azoto combinato (Pereira, 2017). In Asia, *Azolla* viene generalmente fatta crescere nelle risaie prima di piantare il riso consentendo così la parziale o totale sostituzione dei fertilizzanti chimici azotati: il complesso *Anabaena-Azolla* può infatti accumulare fino a 2-3 kg N / ha / giorno (Talley & Rains, 1980). Poi le piante di riso prendono il sopravvento, la felce muore e libera l'azoto fissato che viene infine utilizzato dal riso.
Numerosi cianobatteri appartenenti ai generi *Nostoc*, *Anabaena*, *Aulosira*, *Calothrix*, *Tolypothrix*, *Scytonema* isolati dai campi di riso in varie regioni del mondo e capaci di relazioni simbiotiche potrebbero essere utilizzati per migliorare la fertilità del suolo (Jha *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2016). Oltre al riso, anche altre colture come grano, sorgo, mais e la canna da zucchero hanno dato buoni risultati quando fertilizzate con i cianobatteri. Ad esempio, si è dimostrato che

l'inoculo di *Nostoc* e *Anabaena* nel grano causa l'aumento del contenuto di azoto, della lunghezza dei germogli e delle radici delle piante (Obreht *et al.*, 1993; Rai *et al.*, 2002).
I cianobatteri non solo contribuiscono a fornire azoto combinato alle piante, ma possono produrre fitormoni sia a vita libera che in associazione simbiotica. Per esempio, ceppi appartenenti ai generi *Nostoc*, *Gloeothece*, *Calothrix*, *Plectonema e Anabaena*, producono, nella rizosfera del riso e del frumento, acido indolacetico (IAA), fitormone del gruppo delle auxine che promuove la crescita dei germogli (Sergeeva *et al.*, 2002; Spaepen *et al.*, 2007; Prasanna *et al.*, 2009).
I cianobatteri contribuiscono anche al processo di formazione del suolo liberando polisaccaridi extracellulari, peptidi e lipidi durante il loro accrescimento (Büdel *et al.*, 2016). Alcune ricerche hanno inoltre dimostrato la loro capacità di crescere con successo in terreni salini, contribuendo quindi ad aumentare la fertilità di tali suoli (Apte, 1997).

1.3 Il ruolo dei BMS in agricoltura sostenibile: dalla ricerca di base al prodotto commerciale

Le pratiche agricole convenzionali richiedono l'apporto di numerose molecole chimiche da utilizzare come fertilizzanti, pesticidi, erbicidi, ecc. Tali prodotti, se usati in eccesso o in modo improprio, possono causare effetti deleteri sia sul valore nutrizionale dei prodotti agricoli che sulla salute dei lavoratori e dei consumatori. L'uso eccessivo e indiscriminato di queste sostanze ha provocato contaminazioni degli alimenti, acquisizione di resistenze da parte delle erbe infestanti e di agenti patogeni, nonché deleteri effetti ambientali. I principi chimici applicati durante le pratiche agricole tendono ad accumularsi nei suoli ed essere assorbiti dalla maggior parte delle colture, potendo entrare così nella catena alimentare e incidendo negativamente sulla salute umana (Boobis *et al.*, 2008; González-Rodríguez *et al.*, 2008; Jardim & Caldas, 2012; Bajwa & Sandhu, 2014; Lozowicka, 2015). Un'alternativa affidabile all'uso di composti chimici sono proprio i microrganismi che, sottoforma di appropriati inoculanti, fungono da bio-fertilizzanti, bio-erbicidi, bio-pesticidi e agenti di bio-controllo. Gli inoculanti microbici sono dunque prodotti commerciali. Essi contengono microrganismi benefici da applicare al suolo o alla pianta al fine di migliorare la produttività e la salute delle colture. Si tratta di un'alternativa economica e più sostenibile dal punto di vista ambientale rispetto all'uso dei prodotti chimici di sintesi. I microrganismi utilizzati nelle formulazioni sono di origine ambientale, opportunamente selezionati, per i quali sono state individuate specifiche potenzialità benefiche.
Per lo sviluppo commerciale, i ceppi di neo-isolamento, individuati come benefici, sottostanno a lunghi processi di selezione che tengono conto delle diverse aree geografiche, della loro stabilità genetica, della facilità di coltivazione su larga scala, delle interazioni che essi effettuano con gli altri microrganismi del suolo e della rizosfera, valutando inoltre con precisione i costi in confronto alle molecole

di sintesi. Questi studi devono essere condotti prima in condizioni di laboratorio, successivamente in microcosmo e in serra e, solo in una fase successiva, in pieno campo. Sul mercato sono già presenti oggi numerosi prodotti commerciali utilizzati nei vari protocolli di difesa e nutrizione su diverse colture, che, hanno mostrato risultati positivi in condizioni di laboratorio, successivamente hanno mostrato la loro efficacia anche in campo considerando che l'efficacia e la costanza del risultato di questo tipo di prodotto è influenzata dalle caratteristiche dei diversi tipi di suolo, dal clima, e dalla coltura. La sola efficacia in condizioni di laboratorio di un determinato ceppo microbico non è infatti sufficiente a garantirne il successo in pieno campo. Occorre quindi studiarne le prestazioni in condizioni reali, in ambiente aperto, e individuare formulazioni nuove o più efficaci (Xavier *et al.*, 2004; Malusà, 2012; Souza *et al.*, 2015; Kaminsky, 2019). Lo sviluppo di un prodotto contenente BSM, dalla scoperta alla commercializzazione, è un lungo e difficile viaggio che può richiedere dai 10 ai 15 anni e un approccio multidisciplinare. In parallelo a studi approfonditi complessi relativi alla fisiologia dei microrganismi benefici, alla loro interazione con le popolazioni microbiche dell'ambiente e con le piante, sarà perseguito un adeguato e regolare sviluppo del prodotto, valutando nel contempo eventuali aspetti tossicologici e non trascurando certo le dovute valutazioni aziendali, di mercato e l'adeguamento alle varie normative (Malusá *et al.*, 2012; Timmusk *et al.*, 2017).
Tenendo conto che a numerose specie microbiche possono appartenere ceppi benefici ma anche altri dotati di caratteri di patogenicità, dopo aver individuato un ceppo efficace in laboratorio occorrerà in primo luogo soddisfare vari criteri di sicurezza di base, al fine di escluderne l'eventuale pericolosità e i possibili effetti collaterali nei confronti dell'uomo, degli animali e delle piante. Infatti, i microrganismi selezionati e presenti nei prodotti commerciali, affinché abbiano effetto in situazioni reali, sono introdotti nell'ambiente in numero molto elevato aumentando così anche l'eventuale rischio per la salute dei lavoratori, dei consumatori e dell'ambiente stesso. L'identificazione dei microrganismi a livello di ceppo basata solo su criteri fenotipici o fisiologici non è sempre in grado di distinguere ceppi diversi. È stato quindi necessario sviluppare metodi in grado di identificare inequivocabilmente i ceppi "commerciali" da tutti gli altri, inclusi quelli appartenenti alla stessa specie. Questi sistemi hanno anche un significato dal punto di vista legislativo poiché offrono strumenti adeguati per controllare che i prodotti contengano esclusivamente il/i ceppo/i dichiarato/i in etichetta ed eventualmente approvati dal legislatore. Sono oggi disponibili numerosi metodi molecolari, basati su specifiche sequenze geniche, che possono essere usati routinariamente per l'identificazione e la caratterizzazione microbica. Un esempio interessante ed emblematico riguarda alcuni batteri usati come agenti di bio-controllo per i quali queste tecniche hanno consentito di sciogliere i numerosi dubbi sorti in relazione alla loro capacità di causare anche malattia nell'uomo. Un caso specifico riguarda *Pantoea agglomerans*, specie batterica che annovera numerosi ceppi considerati tra i più promettenti agenti di biocontrollo di varie malattie delle piante. Sebbene alcuni di essi siano alla

base di prodotti registrati in USA e Canada, la loro commercializzazione in Europa non è consentita poiché *P. agglomerans* può causare infezioni opportunistiche nell'uomo ed è quindi inserito nella lista dei microrganismi patogeni di Gruppo 2. Tuttavia, studi recenti hanno consentito di identificare markers molecolari presenti solo negli agenti di bio-controllo. In un futuro non troppo lontano ciò potrebbe permettere l'identificazione di agenti di bio-controllo non patogeni per l'uomo, rendendone quindi possibile la commercializzazione anche in Europa (Rezzonico *et al.*, 2009).
Oltre alla necessità di distinguere i microrganismi patogeni da quelli benefici, l'identificazione a livello di ceppo rappresenta anche una forma di protezione delle aziende produttrici. In Europa, infatti, i microrganismi isolati dall'ambiente non sono brevettabili e la registrazione di prodotti contenenti ceppi ben identificati diventa strumento di protezione del *knowhow* dei produttori. Ad esempio, nel caso della registrazione dei prodotti commerciali contenenti microrganismi agenti di bio-controllo, i dati che debbono essere forniti all'autorità competente sono proprietà degli *applicants* e risultano protetti per 10 anni: in questo modo le aziende *competitor* o interessate a commercializzare prodotti contenenti i ceppi registrati sono costrette a negoziare con le aziende che hanno condotto la procedura di deposito o a farsi carico dei costosi studi necessari a produrre il dossier tecnico-scientifico per la registrazione.
Le formulazioni dei prodotti costituiscono un punto critico e spesso sottovalutato dello sviluppo commerciale. È infatti necessario individuare i *carriers*, specifici per ciascun microrganismo, e gli agenti stabilizzanti, organici o inorganici, capaci di supportare la vitalità microbica estendendo al massimo la *shelf life* dei prodotti. Occorre comunque che i *carriers* e gli agenti stabilizzanti non producano effetti fitotossici, siano solubili in acqua, compatibili con altri prodotti utilizzati in agricoltura e capaci di tollerare eventuali condizioni ambientali avverse mantenendo intatte le caratteristiche del/dei microrganismo/i in termini divitalità, stabilità genetica, capacità di colonizzare l'ambiente e/o la radice, ecc. (Bashan, 1998; Legget *et al.*, 2011; Bashan *et al.*, 2014; O'Callaghan, 2016).
Inoltre, un prodotto commerciale a base di microrganismi dovrebbe essere esente da contaminanti la cui presenza è indice di processi produttivi scadenti. Ciò pone numerosi problemi relativi non solo alle performance dei prodotti commercializzati (i microrganismi contaminanti potrebbero competere con il microrganismo selezionato) ma anche in relazione alla loro eventuale fitopatogenicità e patogenicità nei confronti dell'uomo e di organismi non target.

1.3.1 I principali bio-fertilizzanti

I bio-fertilizzanti sono prodotti che contengono microrganismi viventi capaci di colonizzare la rizosfera delle piante aumentando la disponibilità di nutrienti primari e/o stimolandone la crescita.
Sono applicati nelle pratiche agricole in sostituzione ai fertilizzanti chimici convenzionali. Il loro utilizzo è destinato ad aumentare perché contribuiscono al

mantenimento della salute del suolo, minimizzano l'inquinamento ambientale e riducono l'uso di sostanze chimiche in agricoltura (Mohammadi e Sohrabi, 2012; Al Abboud *et al.*, 2014).
Batteri del genere *Bacillus* sono i microrganismi più comunemente impiegati nei bio-fertilizzanti poiché crescono rapidamente e possono produrre spore resistenti al calore e allo stress. Possono essere utilizzati in varie forme, miscelati con pesticidi chimici senza che le spore siano inattivate, il processo di produzione su larga scala è semplice e i costi contenuti.
I principali meccanismi d'azione di *Bacillus* verranno discussi nei capitoli successivi ma si può anticipare che possono moltiplicarsi e colonizzare rapidamente e massicciamente la rizosfera e il suolo, interferendo con la colonizzazione e l'infezione di microrganismi patogeni, prevenendo quindi le malattie (Kloepper *et al.*, 2004; Omer, 2010). Alcuni promuovono la crescita e lo sviluppo di una serie di piante, riducendo indirettamente l'insorgenza di fitopatie e stimolando nel contempo lo sviluppo delle radici tramite la produzione di composti auxinici. Ad esempio, ceppi di *Bacillus subtilis* oltre a produrre un'ampia varietà di sostanze come la subtilina o gli acidi organici, che hanno attività antibatteriche e batteriostatiche nei confronti di batteri patogeni agenti di marciumi radicali, producono enzimi idrolitici e acido indolacetico e possono essere quindi usati anche come bio-fertilizzanti oltre che agenti di bio-controllo (Jeong, 2010).
Per quanto riguarda i BMS azotofissatori, il loro utilizzo in agricoltura come bio-fertilizzanti è altamente raccomandato perché costituiscono una soluzione eco-sostenibile. Si stima infatti che le pratiche agricole richiedano in media almeno 100 kg di azoto per ettaro mentre purtroppo l'efficienza delle concimazioni chimiche è generalmente inferiore al 40% (Fageria e Baligar, 2005). Il che significa che la maggior parte del fertilizzante utilizzato viene dilavato e finisce nelle falde freatiche, oppure si disperde nell'atmosfera sottoforma di gas azotati. La fissazione biologica dell'azoto (BNF) supera di gran lunga i 100 milioni di tonnellate di N_2 fissato/anno (Herridge *et al.*, 2008) e fornisce azoto combinato in forma ammoniacale agli ecosistemi terrestri. Di tutto l'azoto fissato, circa 45 milioni di tonnellate / anno sono fissati dai microrganismi presenti nei terreni coltivati e di questi, almeno la metà riguarda le piante leguminose. È infatti noto da più di un secolo che le leguminose instaurano rapporti di simbiosi con alcune specie di batteri (chiamati volgarmente rizobi) che fissano l'azoto con elevatissima efficienza, assicurando alla pianta ospite la totalità del proprio fabbisogno azotato. I cereali, di contro, possono ottenere al massimo fino al 30% dall'azoto necessario attraverso l'azione dei microrganismi.
Gli inoculanti a base di rizobi per le leguminose sono forse i più comuni e sono entrati ormai nelle normali pratiche agronomiche da oltre 120 anni come bio-fertilizzanti perché formano simbiosi azotofissatrici specifiche con le leguminose. In figura 1.3 è visibile una radice di soia con i caratteristici noduli in cui avviene l'azotofissazione. Per alcuni ceppi è stata dimostrata anche una concomitante azione di bio-controllo nei confronti di funghi fitopatogeni (Deshwal *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2017).

Figura 1.3 – *Radice di soia (*Glycine max*) inoculata con ceppi batterici di* Bradyrhizobium japonicum. *La freccia indica i noduli radicali all'interno dei quali i batteri fissano l'azoto atmosferico (N_2) in ammoniaca (NH_3).*

L'uso degli inoculanti a base di rizobi è comune in molti paesi principalmente perché fornisce azoto combinato alle colture riducendo l'utilizzo di fertilizzanti chimici e i costi sostenuti dagli agricoltori (Smith e Hume, 1987; Tairo e Ndakidemi, 2013).
Tra gli azotofissatori non-simbionti, forse i più studiati e commercializzati sono i batteri appartenenti al genere *Azospirillum*. Oltre ad aumentare l'azoto disponibile, migliorano anche la crescita delle piante tramite la produzione di fitormoni come auxine, citochinine e gibberelline (Saikia *et al.*, 2012; Sivasakthivelan *et al.*, 2013; Compant *et al.*, 2019).
Recentemente sono state valutate con successo anche associazioni a più attori quali quelle tra alcune specie di leguminose, rizobi e funghi micorrizici: questa associazione non solo migliora l'assorbimento del fosforo e dell'azoto, ma sembra supportare la crescita delle piante anche in condizioni di stress alcalino. Effetti benefici sono stati ottenuti inoculando piante di pomodoro, grano, insalata ecc., con miscele di PGPR e funghi micorrizici (Abd-Alla, *et al.*, 2014; Nadeem *et al.*, 2014).

1.3.2 I bio-pesticidi

Si stima che nel mondo circa il 40% dei prodotti agricoli sia distrutto, prima ancora della raccolta, da parassiti (invertebrati, patogeni delle piante o erbe infestanti) e un altro 20% subisca lo stesso destino dopo la raccolta (Bailey *et al.*, 2010). L'uso di prodotti chimici di sintesi tra cui i pesticidi ha ridotto notevolmente queste perdite ma tuttavia, il loro uso eccessivo ha causato un impatto negativo sull'ambiente e sull'uomo. Di conseguenza l'uso di pesticidi chimici deve necessariamente essere limitato, se non addirittura abbandonato, a favore di pratiche più ecosostenibili e meno pericolose per la salute. Ecco che allora, negli ultimi anni, sono stati sviluppati strumenti alternativi e attualmente, sul

mercato mondiale, sono presenti circa 1400 prodotti definiti "bio-pesticidi". Il termine bio-pesticida, nella sua definizione più ampia, indica gli organismi viventi, o prodotti naturali derivati da tali organismi, in grado di limitare lo sviluppo dei fitopatogeni (Thakore, 2006; Minarelli *et al.*, 2015).
Possono essere distinti in tre categorie sulla base degli agenti microbici che ne rappresentano la componente biologica: batteri, funghi o virus.
I bio-pesticidi microbici più comunemente usati sono bio-fungicidi a base di *Trichoderma*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, mentre i bio-insetticidi si basano principalmente su *Bacillus thuringensis*. I formulati batterici costituiscono circa il 74% del mercato dei bio-pesticidi, quelli fungini il 10%, e i preparati a base virale il 5% (Thakore, 2006; Arora, 2015).
Essi sono noti come agenti di bio-controllo (BCA: *Bio-Control Agent*), offrono il vantaggio di una maggiore selettività e di una scarsa o nulla tossicità se confrontati con i pesticidi chimici convenzionali.
Tra i pesticidi batterici, i più comuni sono quelli che contengono ceppi di *Bacillus thuringiensis* (Bt), e rappresentano circa il 90% del mercato dei bio-pesticidi negli Stati Uniti. Altri prodotti di uso comune contengono specie di *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas syringae*) che hanno azione di bio-controllo contro vari agenti fitopatogeni (Arora, 2015).
I pesticidi fungini includono *Trichoderma harzianum*, antagonista di vari funghi patogeni del suolo tra cui *Rhizoctonia*, *Pythium* e *Fusarium*. Mentre *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sono invece funghi entomopatogeni; usati come bio-insetticidi e oggi già presenti in numerosi prodotti sul mercato mondiale.
I Baculovirus (famiglia: Baculoviridae) costituiscono i principali agenti di bio-controllo a base di virus. Sono un gruppo di virus a DNA che hanno la peculiare caratteristica di poter sopravvivere anche al di fuori dell'ospite, contrariamente alla maggior parte delle specie virali, e sono noti per produrre infezioni su una certa gamma di insetti. Numerosi studi dimostrano che i Baculovirus offrono sostanziali benefici per la protezione delle colture controllando gli insetti parassiti allo stadio larvale. Accettati favorevolmente dall'opinione pubblica, sono particolarmente utili in condizioni in cui gli insetticidi chimici tradizionali risultano inefficaci o eccessivamente costosi. A partire dal 2010, è stata presentata richiesta di registrazione per oltre 24 specie di Baculovirus in tutto il mondo (Kabaluk *et al.*, 2010).

1.4 Altre applicazioni dei microrganismi dei suoli: il biorisanamento e la biodegradazione

Tutto il mondo è alle prese con i numerosi problemi ambientali di difficile gestione che sono per lo più legati a attività antropiche. Le attività industriali, l'uso eccessivo di combustibili fossili o la generazione di enormi quantità di rifiuti sono infatti alla base di un diffuso inquinamento ambientale, del degrado del suolo e contribuiscono persino ai cambiamenti climatici con le enormi emissioni di gas serra. La ricerca ha chiaramente indicato che per una corretta gestione

ambientale, in particolare nella bonifica degli inquinanti, i microrganismi possono svolgere un ruolo centrale. Il biorisanamento (*bioremediation*) è un processo finalizzato alla bonifica di siti inquinati tramite l'applicazione di agenti biologici, inclusi microrganismi, piante (*phytoremediation*) o entrambi (*rhizoremediation*). L'interesse per queste tecniche deriva, oltre che dalla necessità di salvaguardare l'ambiente, anche dai costi che risultano notevolmente ridotti rispetto alle convenzionali metodologie non biologiche. A seconda del tipo di inquinante possono essere applicate diverse strategie (Azubuike *et al.*, 2016). Il biorisanamento *in situ* prevede la degradazione degli inquinanti ad opera delle popolazioni microbiche indigene opportunamente stimolate. I batteri del suolo e quelli associati alle piante, inclusi gli endofiti e i PGPR, possono infatti utilizzare i contaminanti come fonti di nutrimento o produrre una vasta gamma di prodotti naturali che contribuiscono alla loro trasformazione chimica in molecole non inquinanti. È stato riportato che BSM come *Azospirillum lipoferum*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida* e *P. fluorescens* abbiano la capacità di decontaminare i suoli da inquinanti organici tossici quali gli idrocarburi policiclici aromatici (PHAs), gli idrocarburi del petrolio (TPHs) o il tricloroetilene (Zhuang *et al.*, 2007; Myresiotis *et al.*, 2012).
Se nel terreno non sono presenti i microrganismi capaci di degradare una certa molecola, o se le popolazioni microbiche sono state ridotte a causa della tossicità dei contaminanti, è possibile aggiungere microrganismi specifici a integrazione delle popolazioni esistenti. Questo processo è noto come *bioaugmentation*. Gli scienziati sono oggi in grado di creare "superbatteri", che possono degradare gli inquinanti a velocità estremamente rapide (*Fig. 1.4*).

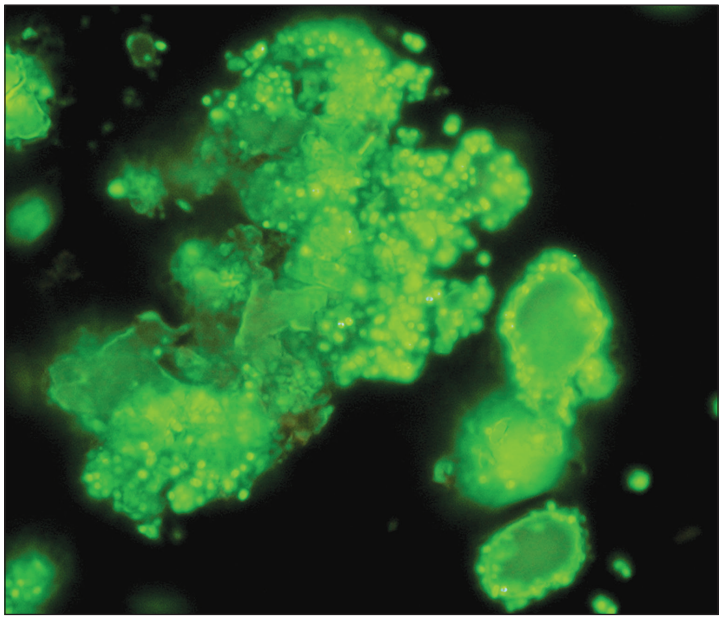


Figura 1.4 – *Batteri specificamente selezionati per la capacità di degradare il petrolio, adesi e operanti all'interfaccia acqua / idrocarburo, durante un intervento di biorisanamento (*bioaugmentation ex situ*)*.

Questi microrganismi, in genere di gran lunga superiori a quelli presenti nell'ambiente, possono essere ottenuti attraverso adattamenti successivi in laboratorio o tramite tecniche di ingegneria genetica. Un possibile modo per sfruttare i superbatteri è quello di usarli nei sistemi di bioreattori in condizioni controllate *in situ* o *ex-situ* (Baldan *et al.*, 2015). Una più recente strategia di *bioaugmentation* è quella di conferire alle popolazioni microbiche indigene una specifica capacità di degradazione tramite l'aggiunta di geni specifici. Questa tecnica si basa sulla capacità dei microrganismi indigeni di ricevere e integrare nel proprio genoma il materiale genetico preparato in laboratorio e poi rilasciato in pieno campo. Possono essere utilizzate le stesse cellule microbiche per veicolare il DNA ai batteri indigeni, tramite coniugazione. L'altra possibilità è l'aggiunta nel suolo di DNA "nudo" per consentirne l'assorbimento attraverso trasformazione. Purtroppo, queste tecniche sono ancora in fase sperimentale (Di Giovanni *et al.*, 1996; Abatenh *et al.*, 2017).
Nel caso dei metalli pesanti, il trattamento convenzionale dei rifiuti che li contengono prevede che siano applicati processi termici, fisici, elettrochimici, lavaggi, stabilizzazione/solidificazione. Vari studi hanno invece evidenziato come certe piante quali le Brassicacee, così come alcuni specifici microrganismi, abbiano sviluppato la peculiare capacità di tollerare prima, e poi anche di accumulare, metalli pesanti; piante e microrganismi possono essere utilizzati anche in maniera sinergica.
Altri microrganismi hanno elaborato strategie diverse: ceppi di *Alcaligenes* o di *Pseudomonas* sono capaci ad esempio di rimuovere metalli quali il cromo, il gallio o il torio, tramite la sintesi di siderofori che li intercettano e li rendono non più biodisponibili. Funghi AM quali *Glomus*, *Scutellospora*, *Acaulospora* e *Gigaspora*, ne riducono la tossicità nelle piante limitando la traslocazione del metallo dalle radici alle parti aeree. I funghi AM fungono infatti da filtro e riducono il trasferimento di metalli pesanti alla pianta potendo quindi essere utilizzati efficacemente, almeno in condizioni di inquinamento moderato (Agarwal *et al.*, 2017).

1.5 Considerazioni conclusive

L'aumento della popolazione mondiale, che si accompagna necessariamente all'incremento delle produzioni agrarie, la necessità di un'efficace protezione delle colture e, al contempo, il dovuto rispetto dell'ambiente associato anche al miglioramento della qualità e della fertilità dei suoli, costituiscono realtà del mondo di oggi che non possono essere ignorate. Gli inoculanti microbici, prodotti commerciali contenenti microrganismi benefici isolati dagli ambienti naturali, non sono altro che l'applicazione di una tecnologia per contribuire all'aumento della produzione primaria di alimenti, senza incidere negativamente sulla salute umana e ambientale, costituendo così una valida alternativa ai prodotti chimici di sintesi nelle pratiche agricole moderne. Tuttavia, sono ancora necessari approfonditi studi di ecologia microbica, una più approfondita conoscenza delle popo-

lazioni microbiche e delle loro dinamiche nei suoli e nella rizosfera, nonché delle capacità di azione e colonizzazione dei ceppi selezionati da utilizzare poi a fini commerciali. L'utilizzo combinato di strumenti della microbiologia classica con le più moderne tecniche molecolari consentirà di comprendere meglio la biologia della rizosfera.
Dal punto di vista prettamente commerciale occorrerà definire con maggiore puntualità gli aspetti connessi alla sicurezza, al rapporto costi/benefici, alle nuove prospettive e potenzialità, alle possibili modificazioni genetiche dei microbi utilizzati, alle normative in continua evoluzione, alla percezione pubblica in relazione al rilascio di microrganismi in ambiente aperto, ai controlli di qualità di cui questi prodotti necessitano e necessiteranno, alla loro brevettabilità, coinvolgendo quindi competenze diverse e non solo di microbiologia.

Bibliografia

Abatenh E., Gizaw B., Tsegaye Z. & Wassie M. (2017) – The role of microorganisms in bioremediation-A review. *Open Journal of Environmental Biology*, 2, 038-046.

Abd-Alla, M.H., El-Enany A.W.E., Nafady N.A., Khalaf D.M. & Morsy F.M. (2014) – Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiological Research*, 169(1), 49-58.

Agarwal A., Singh J., Singh A.P. (2017) – Arbuscular mycorrhizal fungi and its role in sequestration of heavy metals. *Trends in Biosciences*, 10(21), 4068-4077.

Al Abboud M.A., Ghany T.A. & Alawlaqi M.M. (2014) – Role of biofertilizers in agriculture: a brief review. *Mycopath*, *11*(2).

Arora N.K. (Ed.) (2015) – *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. DOI 10.1007/978-81-322-2068-8_2, © Springer India.

Azubuike C.C., Chikere C.B. & Okpokwasili G.C. (2016) – Bioremediation techniques-classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 180.

Bailey A., Grant W.P., Chandler D., Greaves J., Tatchell M. & Prince G. (2010) – *Biopesticides: pest management and regulation*. CABI.

Bajwa U. & Sandhu K.S. (2014) – Effect of handling and processing on pesticide residues in food-a review. *Journal of food science and technology*, 51(2), 201-220.

Baldan E., Basaglia M., Fontana F., Shapleigh J.P. & Casella S. (2015) – Development, assessment and evaluation of a biopile for hydrocarbons soil remediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 98, 66-72.

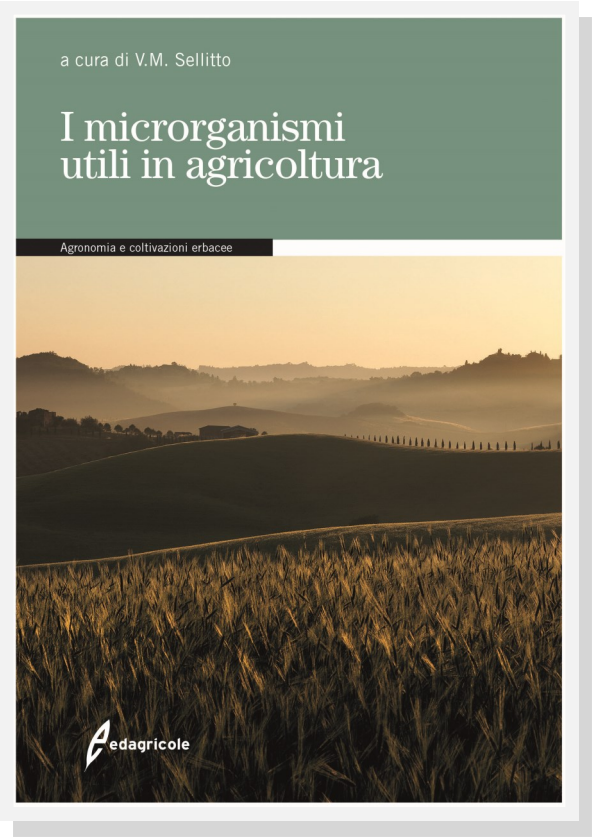
Balestrini R., Ott T., Güther M., Bonfante P., Udvardi M.K. & De Tullio M.C. (2012) – Ascorbate oxidase: the unexpected involvement of a 'wasteful enzyme'in the symbioses with nitrogen-fixing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology and Biochemistry*, 59, 71-79.

Barbieri E., Ceccaroli P., Saltarelli R., Guidi C., Potenza L., Basaglia M. & Zambonelli A. (2010) – New evidence for nitrogen fixation within the Italian white truffle *Tuber magnatum*. *Fungal Biology*, 114(11-12), 936-942.

Bashan Y. (1998) – Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology advances*, 16(4), 729-770.

edagricole

I microrganismi utili in agricoltura



Clicca QUI per ACQUISTARE il libro ONLINE

Clicca QUI per scoprire tutti i LIBRI del catalogo EDAGRICOLE

Clicca QUI per avere maggiori INFORMAZIONI

edagricole
www.edagricole.it

gruppo tecniche nuove
www.tecnichenuove.it

Servizio clienti libri:
libri.edagricole@newbusinessmedia.it
Tel. 051.6575833