



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

REPORT Progetto sottomisura 16.2 PSR 2014-2020 della Regione Toscana PIF 100 IMPRESE 3S ECO-NURSERY

**DISPAA – DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLE PRODUZIONI AGROALIMENTARI E
DELL'AMBIENTE**

2016-2018

Responsabile dell'attività del DiSPAA: Prof. PIERO BRUSCHI

Gruppo di lavoro: Prof. Piero Bruschi, Prof. Luca Calamai, Prof. Paolo Capretti, Dott.ssa Luna Maria Exana, Prof.ssa Luciana Giovannetti, Dott. Alessandro Gnesini, Dott. Nicola Luchi, Dott. Marco Michelozzi, Dott. Jacopo Mori, Prof. Francesco Paolo Nicese, Dott.ssa Aida Raio

Adozione di substrati alternativi alla torba

Francesco Paolo Nicese, Alessandro Gnesini e Jacopo Mori

1. PROVA IN CAMPO DI UN SUBSTRATO ALTERNATIVO

Obiettivi sperimentazione

Durante lo svolgimento del PIF è emersa la possibilità di testare un prodotto di risulta proveniente da un'altra filiera produttiva. Lo scopo della prova è stato quello di valutare la possibilità di impiegare nel vivaismo ornamentale da esterno un prodotto di scarto di un'altra filiera produttiva (caffè, produzione funghi). A tale scopo, in collaborazione con l'azienda Masetti di Pistoia e con l'azienda Funghi Espresso, è stata effettuata una comparazione tra il substrato "classico" a base di torba e pomice e altri substrati, costituiti anche da cocco, aggiunti di un ammendante organico compostato derivato da sottoprodotti di precedenti cicli di produzione. È stato quindi possibile verificare gli effetti dell'aggiunta di questo ammendante in diversa proporzione al substrato, nell'ottica di valutarne le prestazioni, e di individuare una miscela di componenti di riciclo (cocco, ammendante) che possano rappresentare una opzione alternativa, ecologicamente sostenibile, ai classici substrati vivaistici fondati sull'impiego di materiale di estrazione (torba, pomice).

Metodo

Sono state impiegate piante di due specie ornamentali da esterno, *Photinia x fraseri* e *Prunus lusitanica*, entrambi di 2 anni di età allevate in vaso 16Ø. All'avvio della sperimentazione, sono state rinvasate in un contenitore medio (24Ø) con i substrati preparati secondo la tabella sotto riportata. I substrati sono stati arricchiti con un fertilizzante a rilascio controllato, aggiunto secondo le quantità indicate dai protocolli standard di impiego (Nutricote 5g/l).

Per quanto riguarda il cocco, è stata usata una miscela di fibra e mallo di cocco, nella percentuale oggi comunemente usata nei vivai (70:30fibra:mallo).

Sono state messe a dimora 15 piante per ogni tesi a confronto.

Tesi	Torba	Pomice	Cocco	Ammendante
A	50	50	--	--
B	30	50	--	20
C	--	50	30	20
D	--	50	50	--
E	--	50	--	50
F			50	50

I valori sono espressi in percentuale sul volume

Le piante sono state collocate nello spazio a loro dedicato in azienda, secondo un disegno sperimentale a blocchi allo scopo di minimizzare eventuali errori sperimentali.

Oltre a un monitoraggio continuo del layout sperimentale ad opera del personale aziendale e del personale universitario, sono stati programmati alcuni rilievi utili alla definizione degli obiettivi. In particolare si è proceduto a:

1. Misure periodiche della crescita in altezza sulla totalità delle piante allevate;
2. Analisi di crescita sulle piante in contenitore; sono stati effettuati, all'inizio e alla fine del ciclo vegetativo, dei rilievi distruttivi su campioni di piante per misurare la sostanza secca accumulata, la sua ripartizione tra chioma e radici e il rapporto tra peso secco e peso fresco.

Tesi a confronto: rilievo fotografico

Solo una piccola percentuale di esemplari di *prunus* è morta nel corso della sperimentazione, in seguito a un attacco da parte di funghi patogeni. Nessuna perdita per quanto riguarda le fotinie.

Le piante non mostrano differenze di crescita tra le varie tesi, osservazione rafforzata dai mesi di osservazioni continue in vivaio: il colpo d'occhio del quadro di piante ha evidenziato l'omogeneità delle stesse per tutta la durata della stagione. Stando a questi rilievi si può affermare che tutti i substrati testati presentano buone caratteristiche ai fini della coltivazione di queste specie in vaso.

Si può quindi pensare non solo di intraprendere un percorso di graduale sostituzione del classico mix torba:pomice, ma anche cercare alternative ai mix di cocco, adesso il maggior competitor della torba nel mercato del vivaismo ornamentale.

Le piante che sono arrivate alla fine della prova non hanno differenze sostanziali dal punto di vista ornamentale, possiamo quindi considerare questo substrato, alle percentuali da noi testate, capace di far sviluppare piante vendibili e di buon valore estetico.

In special modo *prunus lusitanica* ha mostrato una capacità migliore di adattarsi alle percentuali crescenti del substrato di caffè, non solo sopportandole ma mostrando ad un esame visivo, con tutti i limiti del caso, un certo beneficio dall'introduzione del terriccio in prova.

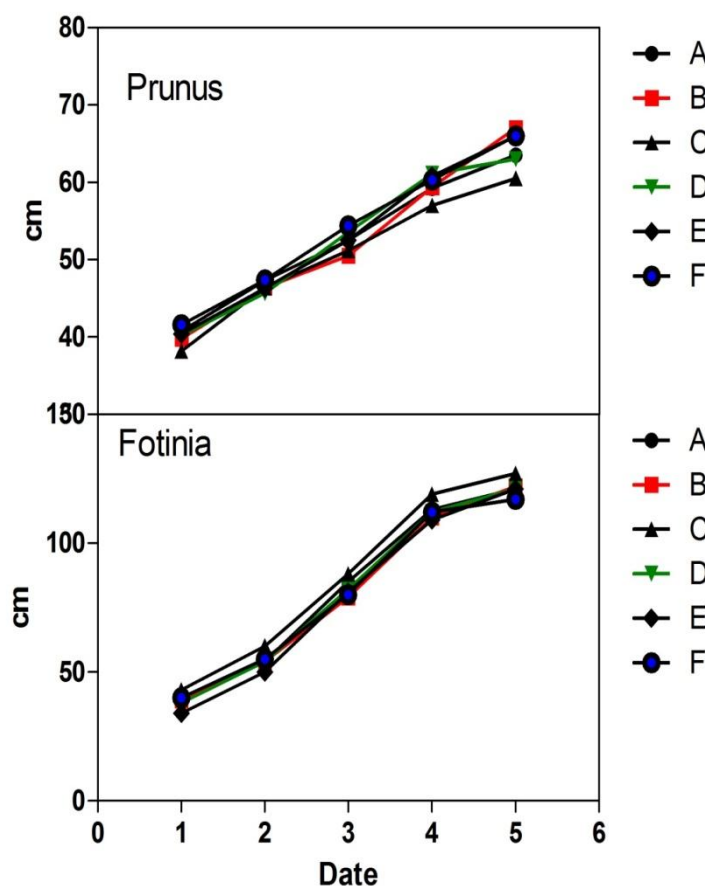


Tesi a confronto: altezza delle piante

Osservando questi grafici si nota come tutte le tesi si siano sviluppate in maniera analoga durante il corso della stagione. Dall'ultimo rilievo emerge come le piante di fotinia si apprestino fermare la loro crescita in autunno, mentre le piante di prunus (di origine nord europea) continuino il loro trend in salita, dopo aver risentito in maniera leggermente maggiore rispetto all'altra specie, del caldo estivo. A fine stagione non si evidenziano differenze significative tra le varie tesi oggetto della prova.

Per quanto concerne le altezze si può dire che tutti i substrati hanno dimostrato di poter far sviluppare piante egualmente alte, quindi collocabili commercialmente nella medesima categoria di prezzo.

Anche se le misure di altezza durante la stagione non garantiscono la formulazione di idee attendibili sul risultato finale della sperimentazione, rappresentano comunque uno strumento di supporto per la validazione dei risultati, andando a mettere in evidenza possibili periodi di crescita estiva eccezionalmente rallentata sempre più frequenti in questi ultimi anni, a causa, per esempio, di estremi termici anomali.



Tesi a confronto: risultati dei rilievi distruttivi

Fotinia	Media PS (g)	Media PS/PF	Media C/R
Rilievi iniziali	63.41	0.4	1.2
A	625.2	0.4	1.1
B	427.1	0.3	1.5
C	603.2	0.4	1.2
D	523.9	0.4	1.4
E	436.3	0.4	1.4
F	561.7	0.4	1.5

Prunus	Media PS (g)	Media PS/PF	Media C/R
Rilievi iniziali	119.2	0.4	0.7
A	441.9	0.3	0.8
B	334.7	0.3	0.9
C	350.5	0.3	1.0
D	423.2	0.3	0.8
E	510.1	0.3	0.9
F	449.7	0.3	0.8

Osservazioni e considerazioni finali

Possiamo concludere affermando che per quanto riguarda la fase di coltivazione, alle concentrazioni da noi testate, il substrato oggetto della prova può essere considerato adatto a consentire la crescita di piante in vaso.

Alcune osservazioni sono però doverose.

Prima della messa a dimora delle piante il substrato a base di caffè è stato stoccato per qualche giorno presso il vivaio: questo ha portato il terriccio a perdere inevitabilmente una grande quantità di acqua. La diretta conseguenza è stata un forte compattamento del substrato e la formazione di numerosi macro-aggregati molto difficili da disassemblare. L'operazione di miscelazione è stata condotta a mano, questo ha garantito una buona omogeneità del prodotto finale. Considerando però una ipotetica applicazione su larga scala di questo terriccio a base di caffè è necessario prendere atto che le normali macchine invasatrici potrebbero incontrare non poche difficoltà a lavorare il prodotto tal quale, proprio a causa dell'eccessivo compattamento dello stesso. Per ovviare a questa problematica è necessario prevedere ulteriori raffinazioni della matrice come ad esempio processi di compostaggio più lunghi, passaggi in macchine tritiatrici, percentuali di miscelazione tra polvere e scarti di torrefazione diverse.

La compattezza del substrato ha avuto conseguenze, ad alte percentuali, anche sullo sviluppo radicale. Questa problematica è emersa nella fase preliminare dei rilievi distruttivi, ovvero durante la pulizia delle piante di fotinia, ed è stata confermata poi in laboratorio nella fase di pesa.

Le piante allevate con alte percentuali del substrato a base di caffè hanno mostrato uno sviluppo radicale più stentato, presentando un numero minore di radici assorbenti e in linea di massima un aspetto generale del pane di radici nettamente peggiore rispetto a quello delle piante allevate nel substrato classico.

I prunus hanno sopportato meglio rispetto le alte percentuali di substrato di caffè dimostrandosi una specie più adatta all'utilizzo in queste condizioni di coltivazione.

La natura dello scarto utilizzato è molto particolare perché esso deriva dal riciclo di un substrato esausto della funghicoltura, a sua volta ottenuto da rifiuti della filiera del caffè. Il suo utilizzo in un ciclo di coltivazione rappresenta quindi la sua "terza vita" come fattore produttivo, e questo è senz'altro il suo principale punto di forza. Alcune applicazioni alternative, come ad esempio l'utilizzo quale ammendante in pieno campo potrebbero fornire sicuramente spunti per nuove ricerche. Allo stato attuale, se si vuole ripetere sperimentazioni di coltivazione in contenitore, è necessario ottenere un prodotto più lavorato oppure è possibile pensare un suo utilizzo in vasi di elevato volume, dove vengono di solito ricoltivate piante provenienti dalla piena terra.

2. VALUTAZIONE DI SCARTI VERDI AI FINI DI UN LORO IMPIEGO NEI SUBSTRATI VIVAISTICI

Introduzione

Le aziende vivaistiche, svolgendo la loro attività, naturalmente producono una serie di rifiuti, scarti e/o sottoprodotti che vengono gestiti in diversi modi. Una di queste categorie di scarti/sottoprodotti è rappresentata dagli "scarti verdi", definizione con la quale si intende una varietà di materiali, tra cui le piante seccate o non vendibili, le svasature e le potature. La prevalenza di uno o più di questi materiali è legata alla tipologia di azienda vivaistica (Recchia *et al.*, 2013); infatti nelle aziende che hanno prevalentemente coltivazioni di pieno campo, la matrice degli scarti è rappresentata per lo più da piante secche e da potature, mentre per quelle invece in cui prevale la coltura in contenitore

assume grande rilevanza il terriccio e le svasature. Parlando del Distretto vivaistico pistoiese, le dimensioni del problema possono essere quantificate intorno ai 20.000 tonnellate di scarti prodotti (Marzialetti, 2008). Le aziende vivaistiche nei riguardi di questi materiali, si sono trovate di fronte alla necessità di una loro gestione in alternativa allo smaltimento oneroso come rifiuti aziendali (D.Lgs n° 205/2010). A partire dal Protocollo di Intesa della Provincia di Pistoia, del 13 luglio 2012 (“Riempiego ed utilizzo, come sottoprodotti, di alcune tipologie di residui derivati dalla produzione del settore vivaistico”), il riutilizzo di questi materiali è stato regolamentato nel distretto vivaistico pistoiese. Lo scopo del presente lavoro è stato quindi quello di ottenere un materiale compostato a partire da diverse matrici, riutilizzabile come componente di substrati nelle aziende, valutando nel contempo le implicazioni ambientali di detta operazione. A tal fine si è deciso di utilizzare un approccio LCA (Life Cycle Analysis), in modo da quantificare le emissioni di CO₂e derivanti dalla produzione di questo materiale riciclato in confronto ad altri componenti di substrati vivaistici.

Materiali e Metodi

La sperimentazione si è svolta in collaborazione con alcune aziende vivaistiche, di piccole dimensioni (da 1-2 ha fino ai 6-7ha), che si sono rese disponibili a fornire i propri scarti verdi per la costituzione di cumuli caratterizzati da matrici e preparazioni diverse, come riportato in tabella 1.

Al fine di poter descrivere con la dovuta ampiezza di dettaglio i risultati, verranno qui riportati i risultati completi riferiti a soli 2 cumuli, ben distinti per tipologia di lavorazione.

Creazione e gestione dei cumuli

La sperimentazione è stata gestita tenendo conto delle aziende coinvolte, quindi sono stati impiegati cantieri di lavorazione compatibili con vivai di piccole dimensioni. La triturazione dei materiali di partenza è stata eseguita con due tipologie di macchinari, un biotrituratore di potenza min. 15hp alimentato da una trattrice da 65 CV e un cippatore a disco di potenza min. 28 hp con motore diesel. Durante la prova il biotrituratore si è dimostrato maggiormente idoneo a tritare materiale di calibro contenuto, ricco di foglie e non totalmente secco; il cippatore ha dato invece un buon risultato con matrici legnose di grosso calibro, tipo i resti di alberature non troppo ricca di foglie e componenti umide.

Il materiale vegetale di scarto dopo essere stato ridotto in particelle di 3-6 cm, mediante l'impiego di biotrituratori o cippatrici, è stato “attivato” con 1 kg/m³ di azoto (sotto forma di urea) ed è stato sistemato in cumuli. Ciò ha consentito l'attivazione del processo di compostaggio. Per entrambi i cumuli presi in considerazione, è stata mantenuta una temperatura di almeno 50 °C per 15 giorni, condizione necessaria alla biosterilizzazione. Il materiale in compostaggio è stato periodicamente arieggiato tramite ribaltamenti, come indicato in tab.2. L'andamento delle temperature ha dimostrato la buona riuscita sia della fase ossidativa sia di quella di maturazione.

Risultati e Discussione

Monitoraggio parametri chimico-fisici

Nella Tab.4 sono descritti i risultati del monitoraggio dei parametri chimici durante il processo di compostaggio dei cumuli B1 e C1.

Il pH è aumentato in entrambi i casi durante il processo di compostaggio, raggiungendo valori finali tipici dei compost e rispettanti i valori limite previsti dalla normativa di riferimento (d.lgs. 75/2010). Il pH ottenuto è più alto rispetto ai substrati convenzionalmente utilizzati nel vivaismo ornamentale (pH 4.5-6 Marzialetti, 2008).

Le due matrici nella fase iniziale avevano una conducibilità elettrica molto diversa (2795,5 $\mu\text{S/cm}$ per B1 e 963,0 $\mu\text{S/cm}$ per C1), ciò nonostante è stata osservata una sensibile riduzione di questo parametro durante il processo di compostaggio. Nella fase finale è stata rilevata una conducibilità elettrica leggermente più alta rispetto alla fase intermedia; il valore del materiale maturo è comunque molto più basso rispetto ai limiti di legge, ed è paragonabile in entrambi i casi a quello riscontrabile nelle torbe di sfagno (200-600 $\mu\text{S/cm}$ Marzioletti, 2008).

Il C organico è nettamente più alto rispetto al limite del 20% SS imposto dalla normativa. Tali valori sono stati raggiunti a causa dell'abbondante componente legnosa delle matrici di partenza. Per quanto riguarda l'N, la frazione organica è ben più alta dell'80% previsto dai limiti di legge. Il rapporto C/N di B1 è leggermente più alto rispetto al valore massimo del 25%.

Tab. 4 – Parametri chimici riscontrati in B1 e C1 nelle diverse fasi di compostaggio

Parametro	Unità di misura	Valori limite	Fase iniziale	Fase intermedia	Fase finale	Fase iniziale	Fase intermedia	Fase finale
			B1			C1		
pH		6-8,5 ^a	5,4	7,2	7,4	6,1	7,9	7,8
Conducibilità elettrica (EC)	$\mu\text{S/cm}$	1500-3000 ^b	2795,5	128,5	150,5	963	208,5	363,5
Carbonio organico (TOC)	% su ss	>20% ^a	-	-	44,46	-	-	39,13
Azoto totale (N)	% su ss	da dichiarare ^a	-	-	1,67	-	-	2,12
Azoto organico (Norg)	% su ss	>80% del totale ^a	-	-	1,66	-	-	2,11
Rapporto C/N		<25% ^a	-	-	26,62	-	-	18,46

(^a d.lgs. 75/2010; ^bMarzioletti, 2008)

In tabella 5 sono mostrati i parametri fisici riscontrati sul materiale finale di B1 e C1, confrontati con le caratteristiche di un substrato convenzionalmente utilizzato nel vivaismo ornamentale. La densità apparente ottenuta è più bassa rispetto al substrato tipico, caratteristica apprezzata sia sotto il profilo tecnico che sotto quello commerciale. La porosità totale è in linea con il substrato torba-pomice. Sia B1 che C1 hanno porosità libera sensibilmente più alta rispetto al substrato di riferimento, di conseguenza hanno capacità di ritenzione idrica, volume di acqua facilmente disponibile e di riserva più bassi.

I parametri fisici riscontrati dimostrano la natura “drenante” dei materiali ottenuti, questo rende necessaria la miscelazione con materiali con maggiore ritenzione per la creazione di un substrato ottimale per le diverse colture.

Tab. 5 – Parametri fisici del materiale finale riscontrati nei compost B1 e C1

Parametro	Unità di misura	Valore torba-pomice (40%-60%)	B1	C1
Densità apparente	g/cm^3	0,21	0,14	0,12
Porosità totale	% V/V	89,3	91,3	92,8
Porosità libera (vol. aria a pF1)	% V/V	36,6	60,5	57,3

Capacità ritenzione idrica(vol.acqua a pF1)	% V/V	52,6	30,8	35,5
Volume d'acqua facilmente disponibile	% V/V	16,7	5,0	3,8
Volume di acqua di riserva	% V/V	4,9	0,4	1,9

LCA

Per l'analisi LCA si è deciso di calcolare le emissioni non soltanto dei compost oggetto di studio, ma anche di due substrati comunemente utilizzati nel vivaismo ornamentale, una miscela torba-pomice (50-50 v/v) e una fibra di cocco al 100%. I risultati relativi ai cumuli B1 e C1 indicano una emissione di CO₂e che va da poco più di 14 fino a oltre 17 kg/m³ di materiale compostato (Tab.6), con differenze tra i due campioni dovute sia a una diversa preparazione preliminare del materiale vegetale, sia a una diversa efficienza di lavorazione del biotrituratore rispetto al cippatore. I risultati relativi alla analisi dei substrati vivaistici ha evidenziato un livello di emissioni di CO₂e mediamente molto più elevato rispetto ai compost, con valori totali variabili tra più di 35 fino a quasi 50 kg/m³ di prodotto. Da notare l'elevato costo in termini di emissioni del trasporto del substrato torba:pomice, rispetto al cocco, dovuto al fatto che i primi viaggiano su camion, mentre il trasporto del cocco avviene per lo più via nave (Lazzerini et al, 2014).

Tab. 6 – Emissione di CO₂e (kg/m³) nei compost B1 e C1, e nei substrati a base di torba/pomice e di fibra di cocco

Fasi del ciclo	Compost		Substrati	
	B1	C1	Torba:Pomice	Cocco
Processo produttivo	-	-	2,98	27,6
Preparazione	0,54	2,14	-	-
Biotrit./Cippat.	9,78	5,74	-	-
Attivazione con N	6,82	6,82	-	-
Trasporto	0	0	46,8	7,85
Totale	17,14	14,70	49,78	35,45

Conclusioni

Dall'insieme dei risultati ottenuti, emerge innanzitutto un giudizio positivo sulla qualità dei materiali compostati, con caratteristiche chimico-fisiche tali da poter senz'altro definire tali materiali idonei ad essere utilizzati, anche solo parzialmente, in substrati vivaistici per la coltura in contenitore. L'analisi LCA ha evidenziato un basso livello di emissioni dei processi produttivi di questo materiale compostato, con valori sensibilmente inferiori rispetto alle emissioni legate ai substrati vivaistici standard. Ciò suggerisce che l'impiego di questi materiali compostati nei substrati vivaistici, attualmente in fase di sperimentazione, oltre a rappresentare una alternativa al fatto di considerare questi materiali come rifiuti da smaltire, porterebbe a una globale riduzione del livello di emissioni di CO₂ del processo produttivo.

- Applicazione dell' analisi del Ciclo di Vita (LCA)

ANALISI LCA E VALUTAZIONE DI SCENARI DI MIGLIORAMENTO

Francesco Paolo Nicese e Alessandro Gnesini

Introduzione

Il settore agricolo è responsabile di una serie importante di impatti sull'ambiente. Primo fra tutti il *land use*, ovvero l'utilizzo delle superfici: si stima che negli ultimi 300 anni si siano persi circa 11 milioni di km² di foresta, trasformati in aree coltivate¹.

Il secondo importante impatto generato dall'agricoltura riguarda la *water footprint*, che è un indicatore del consumo idrico che un determinato ciclo di produzione (agricolo, in questo caso) richiede. Stime affermano che siano necessari circa 3000 l di acqua per produrre 1 kg di riso e circa 1300 l per 1 kg di grano². È anche vero che il calcolo dell'impronta idrica deve tener conto della provenienza dell'acqua utilizzata: per l'agricoltura si parla in media del 10% di acqua proveniente da falde (quindi potenzialmente utilizzabile per l'approvvigionamento umano) e per il 90 % di acqua meteorica.

Il terzo fattore di impatto è rappresentato dal *carbon footprint*, l'impronta di carbonio. Sia l'allevamento che l'agricoltura sono fonti importanti di gas serra. Si stima che entrambi i settori, congiuntamente, siano responsabili del 14% circa dell'attuale riscaldamento globale, in particolare del 47% delle emissioni antropogeniche di metano e del 57% delle emissioni di N₂O₃. Per quantificare questo genere di emissioni si ricorre a una specifica categoria d'impatto: il *global warming potential*. Questa categoria permette di ridurre tutte le emissioni di gas serra a un'unica unità di misura, ovvero una massa in equivalenti di CO₂, garantendo un dato attendibile e confrontabile.

L'aumento delle emissioni di CO₂ (e degli altri gas serra) crea un forte impatto sull'ambiente andando a contribuire al cambiamento climatico, generando a cascata svariate conseguenze su tutti gli ecosistemi del pianeta.

Il vivaismo ornamentale rientra di diritto nella categoria agricola e rappresenta probabilmente uno dei settori agricoli con il più alto numero di input funzionali alla produzione⁴. È questo infatti un settore altamente specializzato che ha sviluppato negli anni una metodologia di coltivazione fuori suolo, che permette una maggiore flessibilità agronomica e commerciale, a fronte di un notevole incremento degli input di processo e, di conseguenza, delle emissioni in atmosfera. Proprio per questi motivi si rende necessario operare un'analisi conoscitiva dei vari processi produttivi al fine di individuare quali siano i più importanti in termini di emissioni⁵, individuando conseguentemente delle strategie atte alla mitigazione dell'impatto ambientale della coltivazione delle piante ornamentali in contenitore.

Metodo di analisi

¹Ramankutty, N., Foley, J. A. (1999). Estimating historical changes in global land cover: Croplands from 1700 to 1992. *Global biogeochemical cycles*, 13(4), 997-1027.

²Mekonnen, M. M., & Hoekstra, A. Y. (2010). The green, blue and grey water footprint of crops and derived crop products.

³IPCC report 2007, Chapter 8.

⁴Gestione sostenibile dei vivai (2013). Pubblicazione CeSpeVi.

⁵Lazzerini, G., Lucchetti, S., & Nicese, F. P. (2016). Green House Gases (GHG) emissions from the ornamental plant nursery industry: a Life Cycle Assessment (LCA) approach in a nursery district in central Italy. *Journal of Cleaner Production*, 112, 4022-4030.

Per calcolare l'impatto ambientale in termini di CO₂e di un determinato prodotto agricolo è necessario ricorrere alla tecnica LCA (*Life Cycle Assessment*), che permette di effettuare un'accurata analisi dei singoli processi che concorrono all'emissione finale dell'oggetto preso in esame.

Il termine LCA viene coniato durante il congresso SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) di Smuggler Notch del 1990⁶.

L'oggettività è un aspetto fondamentale di questa metodologia, in quanto è essenziale che il procedimento sia scandito da passaggi precisi e che la valutazione finale derivi da dati scientificamente verificabili e confrontabili.

Con questo tipo di analisi si riesce a comprendere quelle che sono le conseguenze ambientali, direttamente o indirettamente causate dal processo preso in esame e soprattutto a raccogliere le informazioni necessarie per identificare, nel complesso dello studio, quali siano gli impatti più rilevanti, sui quali eventualmente agire in un'ottica di miglioramento delle performance ambientali. A livello nazionale nel 2006, su iniziativa dell'ENEA (Energia Nucleare ed Energie Alternative), si è costituita la "Rete Italiana LCA", che ha come obiettivo principale quello di favorire la diffusione della metodologia, attraverso lo scambio di informazioni e buone pratiche a livello nazionale⁷.

Il riferimento normativo internazionale per l'esecuzione degli studi di LCA è rappresentato dalle norme ISO 14040:2006 e 14044:2006.

L'ossatura fondamentale di una LCA vede coinvolti 4 momenti consequenziali:

- Definizione degli obiettivi e del campo di applicazione, è la pianificazione iniziale di uno studio LCA (Goal and Scope Definition);
- Analisi d'Inventario, è la parte contabile di una LCA e rappresenta la parte più delicata ed impegnativa (Life Cycle Inventory, LCI);
- Valutazione degli impatti, ovvero le informazioni ottenute nella LCI vengono convertite in misure di impatto ambientale;
- Interpretazione e miglioramento, fase nella quale avviene la vera e propria lettura dei risultati di una LCA.

Metodologia

Questo progetto si propone di evidenziare le criticità ambientali, di proporre e, conseguentemente, testare, tramite scenari virtuali e prove in campo, alcune alternative.

Di seguito vengono schematizzate le varie fasi del processo.

- FASE 1

In questa parte preliminare è stata condotta un'indagine che ha cercato di individuare quali sono le maggiori componenti del sistema produttivo vivaistico che concorrono a generare l'impatto ambientale. Sono state effettuate misure in campo in diverse situazioni di coltivazione andando a quantificare: superfici, numero di vasi, dotazione impiantistica, presenza o meno di telo antialga, quantità e tipologia di substrato, numero e tipo di lavorazioni e ogni altro input presente nel quadro di vasetteria scelto. I fattori sono stati successivamente ordinati andando a formare l'inventario per l'analisi LCA.

- FASE 2

Punto centrale dell'indagine è l'analisi LCA, effettuata con il software Gabi® che utilizza come database principale Ecoinvent® v. 3.3. Dove possibile si è cercato di affidare in pieno il lavoro di calcolo al software, con alcune eccezioni che hanno fatto sopraggiungere la necessità di rivolgersi a

⁶Badino, V.; Baldo, G.L (1998). *LCA: istruzioni per l'uso*. Progetto Leonardo.

⁷Cappellaro, F., Scalbi, S., & Masoni, P. (2008). The Italian network on LCA.

dati di letteratura. È stato possibile ottenere un quadro sufficientemente chiaro di quello che rappresenta in termini di impatto ambientale la coltivazione vivaistica in vasetteria, evidenziando inoltre quali sono le voci più pesanti per quanto riguarda le emissioni. Successivamente si è proceduto a calcolare il bilancio totale del carbonio, utilizzando dati precedentemente ottenuti sugli assorbimenti da parte delle piante in contenitore.

- FASE 3

Dopo avere individuato le componenti a maggior impatto ambientale si è proceduto al test delle alternative, già precedentemente individuate negli obiettivi del PIF. Sono state quindi costruite ulteriori LCA che hanno utilizzato, in parte, le misure reali rilevate in campo. Sono state operate delle sostituzioni negli input che hanno generato risultati diversi di emissione. Come per la fase precedente sono stati poi effettuati dei bilanci di carbonio.

- FASE 4

Durante quest'ultima fase sono state messe a confronto le emissioni e i bilanci dei diversi scenari, fra loro e con la situazione di partenza. È quindi stato possibile ottenere un set di informazioni sulle variazioni di emissioni, e di come sia possibile andare a diminuire l'impatto ambientale, intervenendo direttamente sui fattori produttivi. Sono state poi tratte delle conclusioni sulla fattibilità delle sostituzioni e su varie ipotesi di utilizzo dei fattori alternativi nel vivaismo ornamentale.

Analisi LCA e bilancio del Carbonio

Per semplicità di lettura vengono riportati in tabella i risultati riguardanti le analisi LCA di partenza, ovvero i risultati ottenuti dai soli rilievi in campo di reali situazioni vivaistiche. È stato scelto di dividere le analisi per dimensione di vaso utilizzato: ø 13, ø 24, mastello da 130 l. Particolare attenzione è stata dedicata al vaso 24, del quale sono stati rilevati più quadri, per l'importanza che riveste questo formato per la produzione pistoiese.

	DIMENSIONE VASO	EMISSIONI kg di CO ₂ eq/ha/an no	CARATTERISTICHE
AZIENDA A	ø 13	<u>68030</u>	Vasi utilizzati per la produzione; elevato livello di input.
AZIENDA B	ø 24	<u>28020</u>	Utilizzo di materiali alternativi; densità di coltivazione bassa; presenza di camminamenti in cemento.
AZIENDA C	ø 24	<u>76188</u>	Alta intensità di coltivazione; elevato impiego di input; presenza di supporti antivento.
AZIENDA D	ø 24	<u>62786</u>	Numerosi input di produzione; utilizzo consistente di torba; elevato numero di vasi al m ² .
AZIENDA E	130 l	<u>41120</u>	Azienda di medie dimensioni in cui sono state considerate delle piante allevate in piena terra e poi ricoltivate.

Come si può facilmente notare le emissioni si discostano molto fra loro, in base alla tipologia di vaso ma anche al metodo di coltivazione.

Dall'analisi delle ripartizioni percentuali, qui per brevità non riportata, emerge la plastica dei vasi (HDPE) è responsabile del 49,8% delle emissioni totali, il 32,8% è invece da imputare al

substrato. Questi due fattori insieme coprono quindi più del 80% del totale di impatto ambientale in termini di CO₂, dato che sale fino al 91% in alcuni casi.

Per effettuare però un calcolo che dia una misura reale della situazione vivaistica è necessario effettuare un bilancio del carbonio. Si deve quindi considerare anche la parte positiva, ovvero l'assorbimento di CO₂ da parte delle piante coltivate. Sono stati utilizzati dati di assorbimento provenienti da precedenti ricerche svolte dal Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente riferiti alla crescita in contenitore di *Photinia x fraseri*, × *Cupressocyparisleylei*, *Eleagnus x Ebbingei*, *Viburnum bodnense*, *Thuja occidentalis*.

Sono state selezionate queste specie per avere un campione rappresentativo della produzione vivaistica e per le loro peculiari caratteristiche: si distinguono infatti piante a crescita lenta e veloce, sempreverdi e spoglianti. Dalla media degli accrescimenti in contenitore di questo set di varietà è stato derivato il dato.

Si riportano nella tabella seguente i risultati dei bilanci (emissione-assorbimento).

	DIMENSIONE VASO	BILANCIO in kg di CO ₂ eq/ha/anno
AZIENDA A	ø 13	<u>44374,96</u>
AZIENDA B	ø 24	<u>15275,35</u>
AZIENDA C	ø 24	<u>10540,52</u>
AZIENDA D	ø 24	<u>7526,614</u>
AZIENDA E	130 l	<u>-8149</u>

Si nota come solamente la coltivazione delle piante nel mastello da 130 litri sia l'unica situazione che permette un bilancio negativo, ovvero si ha un assorbimento dovuto alla crescita delle piante maggiore rispetto alle emissioni derivate dal ciclo di produzione.

Evidente quindi, alla luce di questi dati, la necessità di cercare di rinnovare la metodologia di coltivazione per ridurre le emissioni di anidride carbonica andando a intervenire sulle voci a maggior impatto, che sono, allo stesso tempo, i principali fattori di produzione dell'attività vivaistica ornamentale: contenitori e substrato.

Scenari alternativi

Considerando l'elevato impatto ambientale derivato dall'utilizzo dei substrati classici e della plastica HDPE nella produzione vivaistica, è stato ritenuto opportuno andare a verificare come e quanto è possibile ridurre le emissioni, andando a sostituire questi fattori di produzione.

Per tutte le situazioni vivaistiche precedentemente osservate è stato scelto di verificare le performance di due plastiche alternative (riciclata e biodegradabile) in tutte le aziende, e, per ogni situazione di coltivazione, di immaginare 5 substrati diversi.

Di seguito si riporta la legenda con le composizioni dei substrati utilizzati per i vari scenari.

Sigla	AZIENDA A	AZIENDA B	AZIENDA C	AZIENDA D	AZIENDA E
S0	Cocco 30% - Pomice 30% - Torba 40%	Cocco 30% - Pomice 30% - Torba 40%	Cocco 20% - Pomice 40% - Torba 40%	Torba 50% - Pomice 50%	Torba 30% - Pomice 30% - lolla di riso 40%

S1	Compost 30% - Cocco 40% - Torba 30%	Compost 30% - Cocco 40% - Torba 30%	Compost 15% - Cocco 40% - Torba 20% - Pomice 25%	Compost 15% - Torba 35% - Pomice 50%	Torba 20% - Lolla di riso 40% - Cocco 40%
S2	Compost 15% - Cocco 40% - Torba 20% - Pomice 25%	Compost 15% - Cocco 40% - Torba 20% - Pomice 25%	Compost 30% - Cocco 40% - Torba 30%	Cocco 40% - Torba 20% - Pomice 40%	Cocco 100%
S3	Cocco 70% - Pomice 30%	Cocco 70% - Pomice 30%	Cocco 70% - Pomice 30%	Compost 30% - Cocco 40% - Torba 30%	Cocco 85% - Compost 15%
S4	Cocco 100%	Cocco 100%	Cocco 100%	Cocco 100%	Cocco 30% - Pomice 30% - Lolla di riso 40%
S5	Cocco 85% - Compost 15%	Cocco 85% - Compost 15%	Cocco 85% - Compost 15%	Cocco 85% - Compost 15%	Cocco 30% - Lolla di riso 40% - Compost 30%

Di seguito i risultati ottenuti in kg di CO₂eq./ha/anno divisi per azienda. Le sigle RP e BP indicano rispettivamente la plastica riciclata e quella biodegradabile.

AZIENDA A	S0	S1	S2	S3	S4	S5
HDPE	<u>68030</u>	61691	61152	56609	54906	54054
RP	60854	54515	53976	49433	47730	46878
BP	59706	53280	52671	48186	46495	<u>45650</u>
AZIENDA B	S0	S1	S2	S3	S4	S5
HDPE	<u>28020</u>	25663	25448	23734	23091	22770
RP	23118	20761	20547	18832	18189	17868
BP	22334	19977	19437	18048	17405	<u>17084</u>
AZIENDA C	S0	S1	S2	S3	S4	S5
HDPE	<u>76188</u>	68522,9	67884	62774	60857,7	59899,5
RP	61576	53911	53272,4	48162,2	46245,9	45287,8
BP	59238	51573,2	50934,5	45824	43908	<u>42949</u>
AZIENDA D	S0	S1	S2	S3	S4	S5
HDPE	<u>62786</u>	58176	54590	49468	47419	46650
RP	50452	45842	42256	37134	35085	34316
BP	48478	43868	40282	39258	33111	<u>32343</u>
AZIENDA E	S0	S1	S2	S3	S4	S5
HDPE	<u>41120</u>	39287	38718	38375	37682	36307
RP	29484	27651	27082	26738	26046	24671
BP	27622	25789	25220	24877	24184	<u>22809</u>

A fronte di questi dati è possibile effettuare un calcolo percentuale sui due valori limite delle emissioni. Partendo cioè dal valore iniziale di ciascuna azienda e considerando come valore finale di comparazione quello più eco-sostenibile, ottenendo i seguenti risultati in termini di riduzione delle emissioni.

	Emissione partenza dell'azienda	di	Emissione scenario impattante	dello meno	Differenza %
AZIENDA A (vaso 13)	68030		45650		-33
AZIENDA B (vaso 24)	28020		17084		-40
AZIENDA C (vaso 24)	76188		42949		-44
AZIENDA D (vaso 24)	62786		32343		-48,5
AZIENDA E (mastello da 130 litri)	41120		22809		-44,5

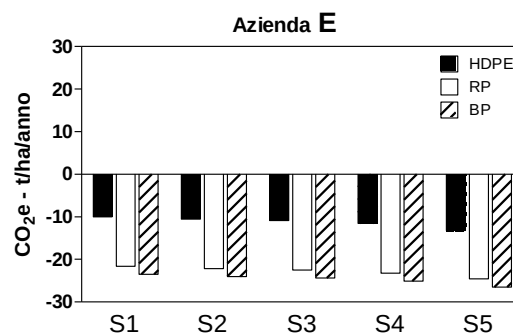
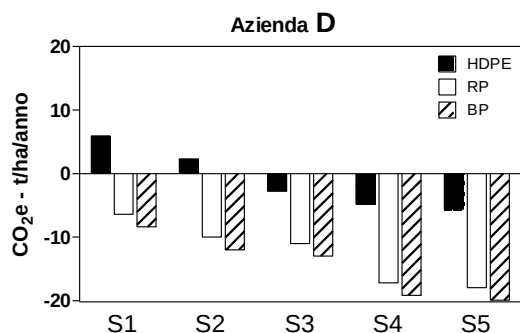
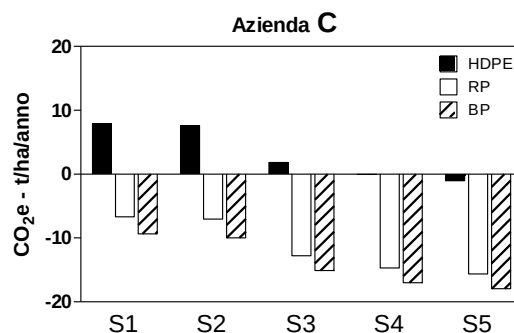
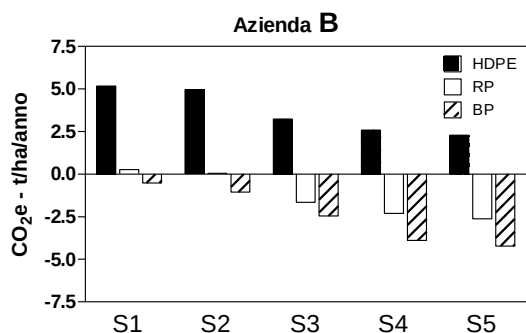
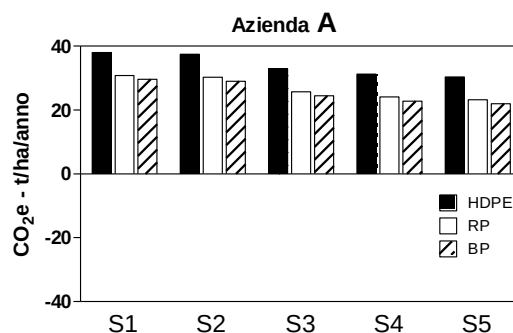
I risultati ottenuti mostrano chiaramente come sia possibile diminuire le emissioni di CO₂eq. dell'attività vivaistica andando ad agire sui fattori di impatto più importanti ovvero i contenitori plastici e il substrato.

CONCLUSIONI

Con i dati adesso ottenuti è possibile andare a osservare come variano i bilanci del carbonio, vera misura della sostenibilità nelle varie situazioni.

In linea generale è possibile affermare che applicando delle sostituzioni di fattori produttivi, si riesce a portare i bilanci del carbonio sempre di più verso un'area negativa, ovvero dove gli assorbimenti derivati dalla crescita delle piante superano le emissioni del processo produttivo. Questa prima analisi si è occupata esclusivamente di scenari ipotetici e non è ancora affiancata a prove agronomiche e studi sulla fattibilità economica delle sostituzioni. È necessario completare e integrare questi dati provenienti da analisi LCA per ottenere un quadro esaustivo della possibilità effettiva del rinnovamento del processo produttivo di coltivazione di specie ornamentali in contenitore, ma questi primi dati rivelano prospettive interessanti per il futuro del settore

Azienda A = 13 Ø
 Azienda B = 24 Ø
 Azienda C = 24 Ø
 Azienda D = 24 Ø
 Azienda E = 130 l



Impiego di bio-pesticidi

Piero Bruschi, Piero Battista (CNR – IBIMET), Luca Calamai, Paolo Capretti, Nicola Luchi (CNR – IPSP), Marco Michelozzi (CNR – IBBR), Bernardo Rapi (CNR – IBIMET), Maurizio Romani (CNR – IBIMET), Aida Raio (CNR – IPSP), Francesco Sabatini (CNR – IBIMET)

1. DIAGNOSI DELLE FITOPATIE

Le indagini diagnostiche su materiale presumibilmente infetto proveniente da vivaio sono state condotte seguendo una procedura standardizzata. Per prima cosa il materiale campionato è stato sottoposto a una serie di procedure al fine di estrarre in purezza e caratterizzare morfologicamente gli inoculi dei diversi patogeni in esso contenuti.

Il genere *Phytophthora* può essere isolato in piastra su substrati agarizzati. Questa operazione non è esente da problemi per la comparsa di contaminanti, si deve perciò far ricorso all'aggiunta di antibiotici e metodi per eliminare la concorrenza della microflora saprofitaria o inquinante.

Gli isolamenti hanno riguardato parti aeree della pianta, radici e suolo dell'invasatura, campioni di suolo e di acqua delle aree circostanti. Le radici delle piante in vaso sono state ulteriormente ripulite sotto il getto d'acqua del rubinetto e sterilizzate con alcol etilico. Per mezzo di un bisturi sono state recise le piccole radici in corrispondenza di porzioni necrotiche, in senso radiale all'asse di crescita, così da ottenere campioni cilindrici di pochi millimetri di lunghezza da destinare all'isolamento su piastra, costituiti da tessuti per metà vivi e per metà morti. I tessuti sono stati poi piastrati su substrati selettivi contenenti antibiotici (PDAS e PARNPH) dove i patogeni fungini sono stati isolati in purezza.

Per isolare il patogeno dal suolo e dalle acque di irrigazione, le tecniche possono prevedere in molti casi l'uso di foglie, piantine o frutti che fungono da "esca", dai quali poi ottenere il patogeno in purezza. Per l'isolamento è stata utilizzata la tecnica del Baiting (dall'inglese "Bait": Esca) come descritta da Erwin e Ribeiro (1996). Il Baiting è un metodologia finalizzata all'ottenimento in purezza del microrganismo da vari substrati naturali, nel nostro caso acqua e suolo, attraverso l'utilizzo di substrati di crescita con buona selettività che funzionano da vere e proprie esche nei confronti del microrganismo. In questo lavoro sono state impiegate giovani foglie di farnia, ancora in fase di crescita ed a consistenza erbacea e mele di qualità Granny Smith, avendo cura di scegliere frutti sani e non ancora maturi. Qui di seguito sono riportate le due procedure di baiting utilizzate per il suolo e per le acque di irrigazione del vivaio:

- a) Baiting con mele (suolo). La superficie della mela è stata sterilizzata con alcol etilico e forata in quattro punti equidistanti lungo la linea equatoriale del frutto. Il foro è stato eseguito con un foratappi, del diametro di 1,5 cm e profondità di 2 cm. Il suolo raccolto dai vasi delle piante è stato inserito all'interno tramite l'utilizzo di una spatola sterilizzata, avendo cura di saturarlo con acqua distillata; le aperture contenenti l'inoculo sono state chiuse con nastro isolante trasparente, fissato a croce sulla superficie in modo da creare un ambiente simile ad una camera umida, ma non completamente isolato dall'esterno. Dopo circa 7 sono stati effettuati gli isolamenti su substrato selettivo (PARNPH) dalle aree necrotiche delle mele.
- b) Baiting con foglie di farnia (acque irrigazione). Sono state utilizzate foglie di farnia di alcuni giorni (dimensioni di 1-3 cm di lunghezza, larghezza 0,5-1,5 cm). Ognuna è stata lavata manualmente per alcuni secondi sotto il getto d'acqua fredda del rubinetto e posta con la faccia superiore rivolta verso l'alto nella bacinella contenente acqua campionata. Sono state realizzate cinque bacinelle contenenti ciascuna dieci foglie-esca e mantenute a temperatura ambiente per cinque giorni, avendo cura di coprire il tutto non ermeticamente con fogli di carta bibula.

All'isolamento segue la seconda fase mirata a caratterizzare il patogeno dal punto di vista morfologico o, sempre più spesso negli ultimi anni, sotto il profilo molecolare, tramite l'utilizzo di tecniche di amplificazione del DNA mediante PCR. Il DNA dalle colonie dei microrganismi è stato estratto per mezzo del kit E.Z.N.A. Plant Mini Kit (OMEGA bio-tek), utilizzando circa 80mg di materiale. La concentrazione del DNA e l'assorbanza (260/280) sono state misurate attraverso uno spettrofotometro (Nanodrop).

In questo lavoro si è scelto di condurre un'analisi genetica mirata al riconoscimento degli isolati di *Phytophthora* a livello di specie, riguardo all'amplificazione della regione di RNA nucleare ribosomale (rRNA) che comprende le regioni 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 e 28S, utilizzando i primer di amplificazione ITS6 e ITS4. Gli amplificati sono stati purificati tramite il kit mi-PCR Purification kit (Metabion) e sequenziati alla MWG (M-Medical).

Le sequenze ottenute sono state aggiustate manualmente e sottomesse al National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) al fine di determinare la specie tassonomica. I risultati hanno mostrato la presenza di tre specie appartenente al genere *Pythium* (*Pythium perplexum*, *P. vexans* e *P. undulatum*), una al genere *Mortariella* e sei specie di *Phytophthora* (*Phytophthora cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. palmivora*, *P. nicotianae*).

Gli isolati ottenuti sono stati inseriti nella collezione micologica dell'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP-CNR).

Quattro di queste, elencate di seguito, sono state isolate sia su radici che su suolo del medesimo campione di vivaio, dimostrando di essere ben diffuse sia su apparato radicale che nel terriccio di crescita :

a) *Viburnum tinus* e *Buxus sempervirens* (*P. cactorum*);

b) *Ceanothus thyrsiflorus* (*P. criptogea*)

c) *Pittosporum tobira* (*P. palmivora*)

d) *Myrtus communis* (*P. nicotianae*).

e) *P. cactorum* è stata maggiormente isolata da suolo.

Infine, dalle acque di irrigazione non è stato isolato alcun patogeno.

E' indubbio che nei vivai analizzati il genere *Phytophthora* trovi un ambiente estremamente adatto alla crescita e che , estendendo il problema a tutto il settore produttivo, i protocolli di biosicurezza debbano mantenere massima attenzione sul materiale vivaistico. L'attività economica umana viene confermata come attore principale di diffusione delle malattie in accordo con quanto pubblicato da Pysèk et al (2010), i quali riportano come le variabili economiche e demografiche riflettano l'intensità delle attività umane ed integrino gli effetti dei fattori che determinano l'insorgenza delle specie invasive. Ulteriori sviluppi delle tecniche di diagnostica precoce basati su analisi molecolari quali real time PCR e sequenziamento di seconda generazione, dovranno essere indirizzati al miglioramento delle indagini sulle matrici come acqua e terriccio vergine che, non avendo organi vegetali come, ad esempio, le radici su cui *Phytophthora* può trovarsi in forma attiva ed in via di diffusione, presentano maggiori difficoltà di isolamento con le tecniche tradizionali.

2. IMPIEGO DI PRODOTTI NATURALI COME BIOPESTICIDI

Sono stati impiegati **prodotti naturali diversi con attività antimicrobica** quali ad esempio l'acqua di distillazione dell'olio essenziale di balsamite (*Balsamita major* Desf.), rosmarino (*Rosmarinus officinalis* L) e olio essenziale di Ximenia (*Ximenia americana* L.).

Per l'estrazione dell'acqua di rosmarino e di balsamite è stata utilizzata la tecnica della "distillazione in corrente di vapore" la quale consente l'estrazione di oli essenziali e idrolati dalle erbe aromatiche e dalle piante officinali. Per la produzione dell'acqua di balsamite e di quella di rosmarino, sono stati ottenuti circa 3 l di prodotto con 500 g di biomassa, rappresentata quasi totalmente da foglie. L'olio di Ximenia è stato invece ottenuto attraverso la macinazione dei frutti e dopo bollitura viene pressata la pasta così ottenuta dalla quale fuoriesce l'olio.

L'efficacia di questi prodotti è stata saggiata su alcuni patogeni fungini (*Phytophthora* spp., *Ceratocystis platani*, *Heterobasidion* spp., *Diplodia pinea*, *Botrytis cinerea*) e batterici (*Pseudomonas syringae*) provenienti dalle collezioni dell'IPSP-CNR (Sesto Fiorentino). Qui di seguito sono riportate le caratteristiche dei patogeni utilizzati in queste prove.

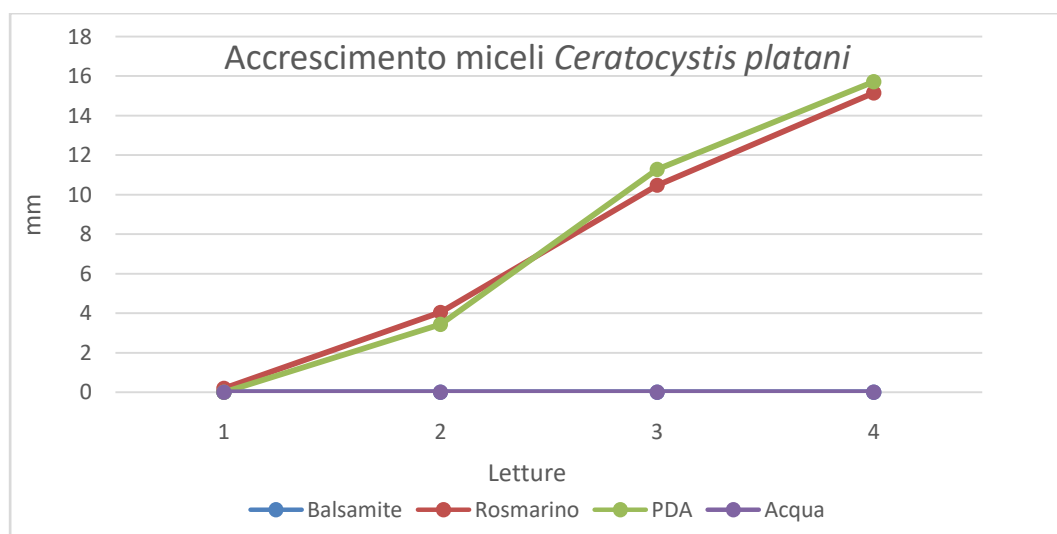
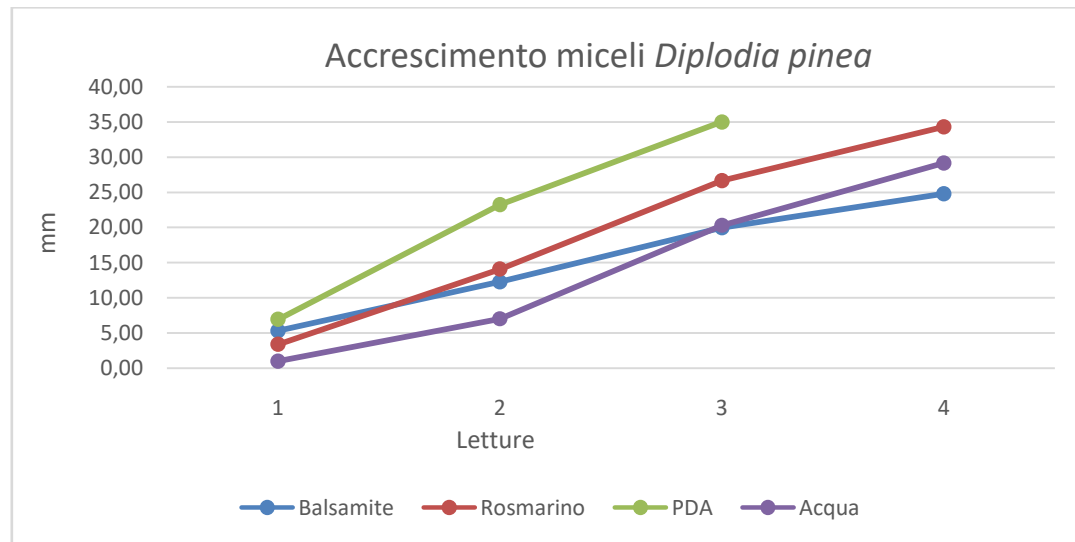
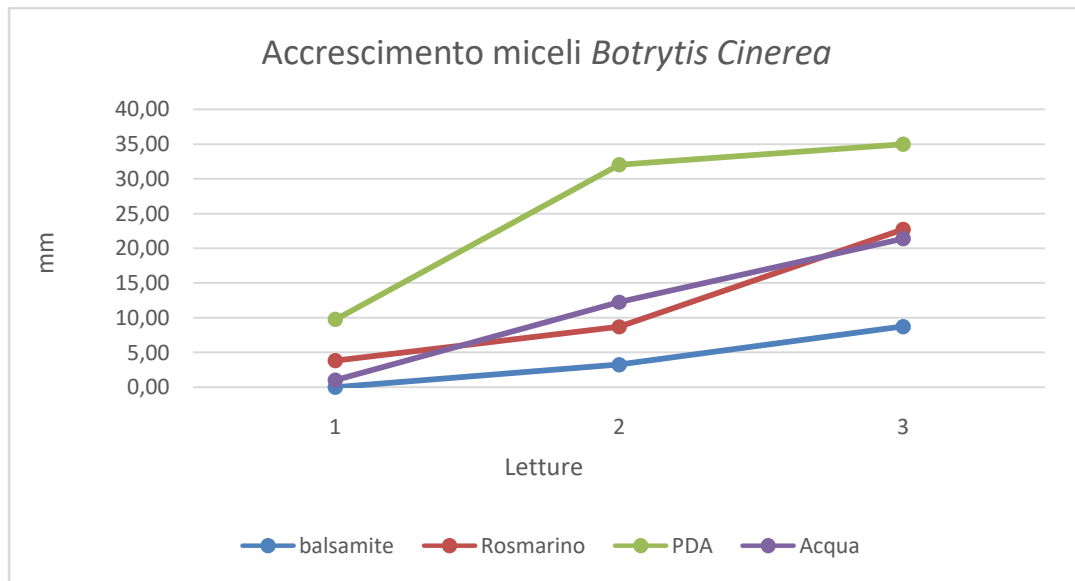
- ***Heterobasidion annosum*** è un attivo agente di marciume radicale e carie interna del fusto di conifere, considerato uno dei patogeni più dannosi in campo forestale.

- ***Heterobasidion irregulare*** è un patogeno fungino causa di marciume radicale su molte specie di pini, originario del nord America ed introdotto in Italia durante la seconda guerra mondiale. È molto pericoloso perché ha la capacità di ibridarsi con *H. annosum*, accelerando la loro evoluzione e facilitando l'adattamento di queste specie invasive anche in altri ambienti.
- ***Ceratocystis platani*** è un fungo che causa una malattia mortale nel genere *Platanus*, chiamata "Cancro Colorato del Platano", e attacca specificatamente il genere *Platanus acerifolia*, *P. orientalis* e *P. occidentalis* e i loro incroci.
- ***Diplodia pinea*** è un fungo che causa il disseccamento dei getti e degli strobili del pino. La malattia è diffusa in molte parti del mondo, su oltre 30 specie di conifere, in Italia causa infezioni su *Pinus pinea*, *P. pinaster*, *P. nigra*, *P. sylvestris*, dove il fungo colonizza i tessuti anche in una forma latente (Luchi et al. 2015).
- ***Botrytis cinerea*** fungo agente della muffa grigia, attacca molte varietà di piante agrarie come fragola, pomodoro e vite, causando notevoli danni anche da un punto di vista economico.
- ***Phytophthora* spp.** Oomicete responsabile di marciume radicale in vivaio e in ambiente naturale. La sua azione patogenica è legata all'acqua, infatti le zoospore sono dotate di flagelli che permettono di diffondersi nell'acqua e di infettare piante sane.
- ***Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*** è un batterio agente del cancro batterico dell'Actinidia. È stato descritto la prima volta in Giappone nel 1989, e ad oggi è presente sia in Europa che nel Sud America. Il batterio può arrecare gravi danni a tutti gli organi vegetativi della pianta.

Le prove sono state condotte allevando i patogeni in vitro su substrati di crescita a cui erano aggiunti i prodotti naturali ad azione antimicrobica. L'efficacia dei trattamenti è stata valutata attraverso il diverso tasso di crescita del micelio in piastra. Come controllo sono state utilizzate delle piastre contenenti PDA (Potato Destrosio Agar) o Agar-Acqua (AA).

I risultati mostrano che l'acqua di balsamite ha un'azione fungistatica più efficace su tutte le specie fungine. Qui di seguito sono riportati, come esempio, la riduzione di accrescimento di *Botrytis cinerea*, *Diplodia pinea* e *Ceratocystis platani* con acqua di balsamite (blu). Nell'ultimo grafico (*C. platani*) l'andamento della crescita su balsamite è nascosto da quello dell'Agar-acqua (viola), mostrando come il micelio del fungo non si sia sviluppato. Per quanto riguarda le piastre trattate con acque di distillazione di rosmarino si nota un maggiore effetto nella riduzione di accrescimento di *D. pinea* e *B. cinerea*.

Tuttavia, tra i due prodotti (acqua di rosmarino e di balsamite) l'acqua di Balsamite risulta essere quella che più ha svolto azione inibente nei confronti dello sviluppo dei miceli fungini.



L'effetto inibente dell'acqua di balsamite è stato osservato anche per gli isolati di *Phytophthora* (Figura 1).

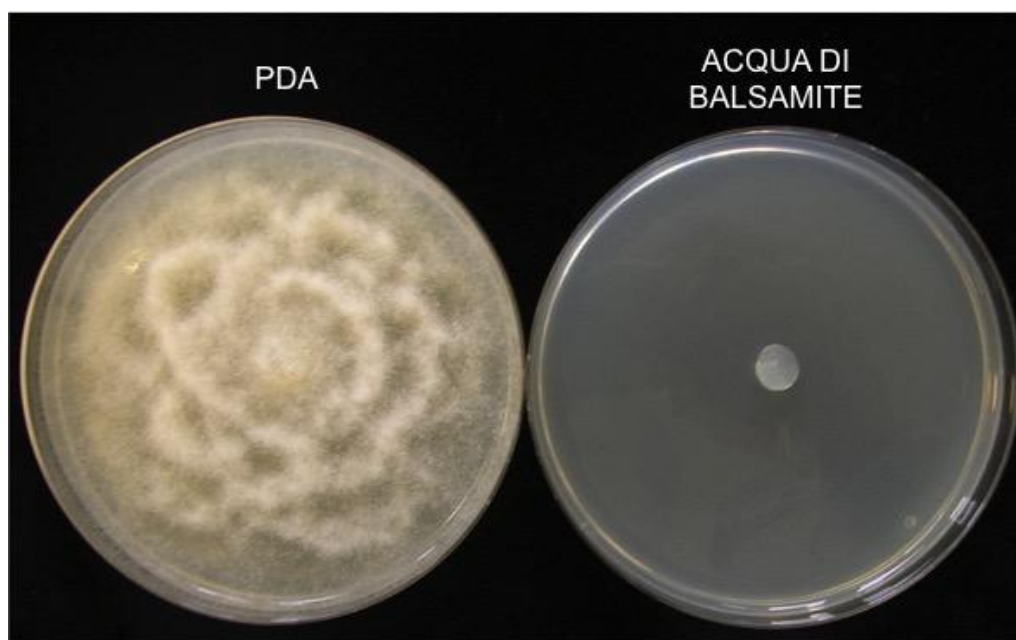


Figura 1. Accrescimento di *Phytophthora* su PDA e su acqua di balsamite dopo 17 giorni a 20°C.

Per valutare il possibile effetto inibitorio dell'olio di *Ximenia*, sono state scelte 4 specie di patogeni fungini (*Heterobasidionannosum*, *Heterobasidionirregulare*, *Ceratocystis platani*, *Diplodia pinea*) e una specie batterica (*Pseudomonassyringae*).

Per ciascuna delle sette diverse specie fungine sono stati utilizzati da uno a quattro isolati, per ogni isolato sono state preparate 6 piastre: 3 repliche per l'olio di *Ximenia* da testare come agente fungicida e 3 per l'acqua, considerata come controllo della prova. Dopo il 5° giorno sono stati praticati, 3 pozzetti (0,9 mm Ø) in ciascuna delle piastre di crescita. Gli inoculi fungini sono stati aggiunti al 7° giorno con un tassello di micelio (0,5mm Ø) posto nella parte opposta rispetto ai pozzetti. Dopo 2 giorni di attesa, ancora necessari per evidenziare un eventuale agente inquinante, sono stati aggiunti 200 µl di olio in ciascuno dei tre pozzetti di metà delle piastre e 200 µl di acqua distillata e sterilizzata in ciascuno dei tre pozzetti dell'altra metà. Le piastre così preparate sono state riposte in termostato a 20°C e nei giorni seguenti sono stati effettuate 6 letture, a distanza di 2/3 giorni ciascuna, durante le quali è stata misurata la crescita diametrica dei miceli fungini. Dopo le letture sono stati calcolati gli incrementi giornalieri e quelli totali.

La minor crescita degli inoculi di *Heterobasidionirregulare* nelle piastre con olio viene confermato alla 3^a lettura, come si evince dalle Figura 2. L'olio di *Ximenia* ha avuto un'azione fungistatica più efficace su questa specie, verificato anche dalla Figura 3 con i dati dell'accrescimento giornaliero. Non è stato osservato alcun effetto inibente dell'olio di *Ximenia* sui ceppi batterici di *Pseudomonassyringae*.

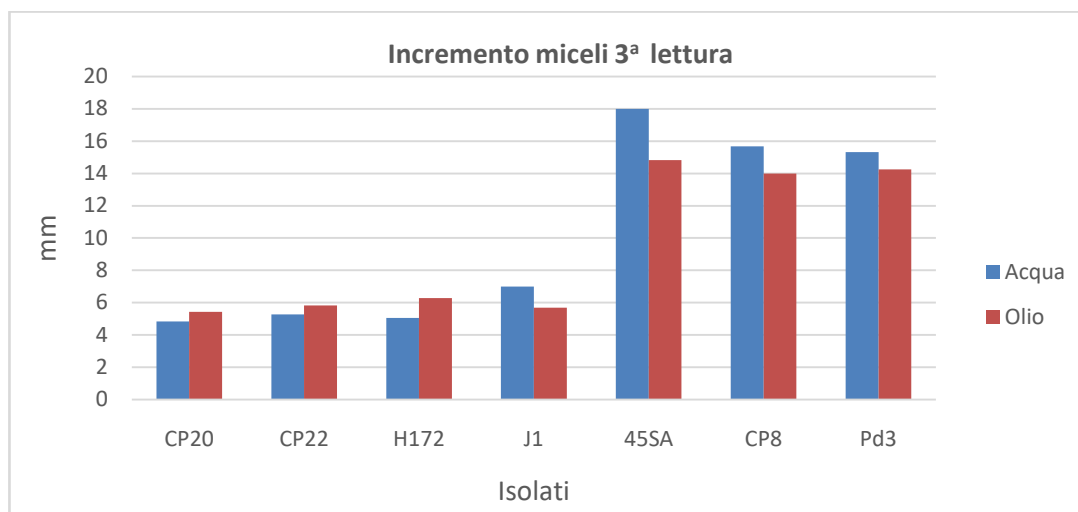


Figura 2: Confronto tra gli accrescimenti nei pozzetti con olio di Ximenia e quelli con acqua delle specie fungine *Ceratocystis platani* (CP20, CP22), *Ophiostoma novo ulmi* (H172), *Heterobasidionirregulare* (45SA, CP8), *Heterobasidionannosum* (Pd3).

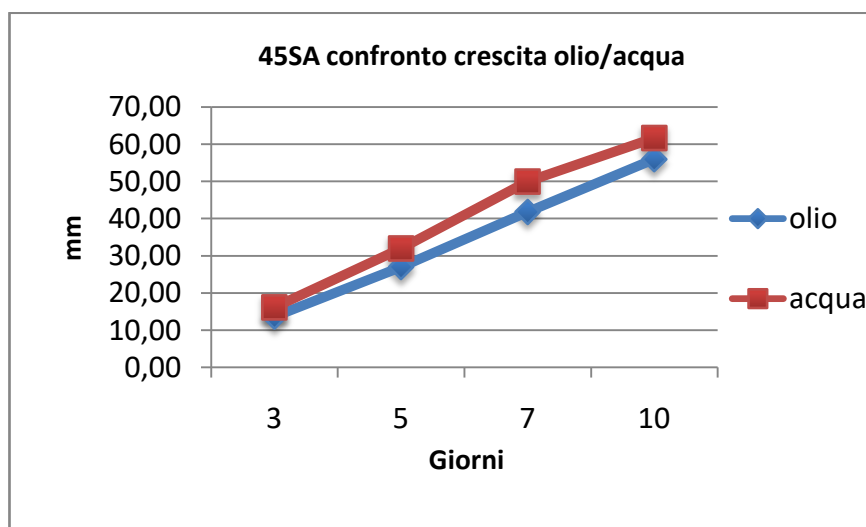


Figura 3: Confronto tra gli accrescimenti giornalieri nei pozzetti con olio di Ximenia e quelli con acqua della specie *Heterobasidionirregulare*(45SA).

Sono stati inoltre sviluppati **nanovettori lipidici e co-cristalli** di derivazione biologica che contengono terpeni volatili. La natura volatile di questi composti (mono- e sesquiterpeni) limita la loro azione biocida a medio e lungo termine e quindi l'inclusione di questi composti in nanovettori ne determinerebbe il rilascio graduale nel tempo.

Le formulazioni contenenti terpeni volatili (carvacrolo, eugenolo e timolo) sono state utilizzate in test in vitro per studiare la loro azione nei confronti di diversi organismi fitopatogeni appartenenti ai Generi batterici *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Clavibacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Xanthomonas* e ai generi fungini *Alternaria*, *Fusarium* e *Pythium*. Le inclusioni dei tre terpeni hanno evidenziato tutte un'azione antibatterica e antifungina, in particolare quelle contenenti timolo sono risultate le più efficaci contro tutte le specie microbiche saggiate.

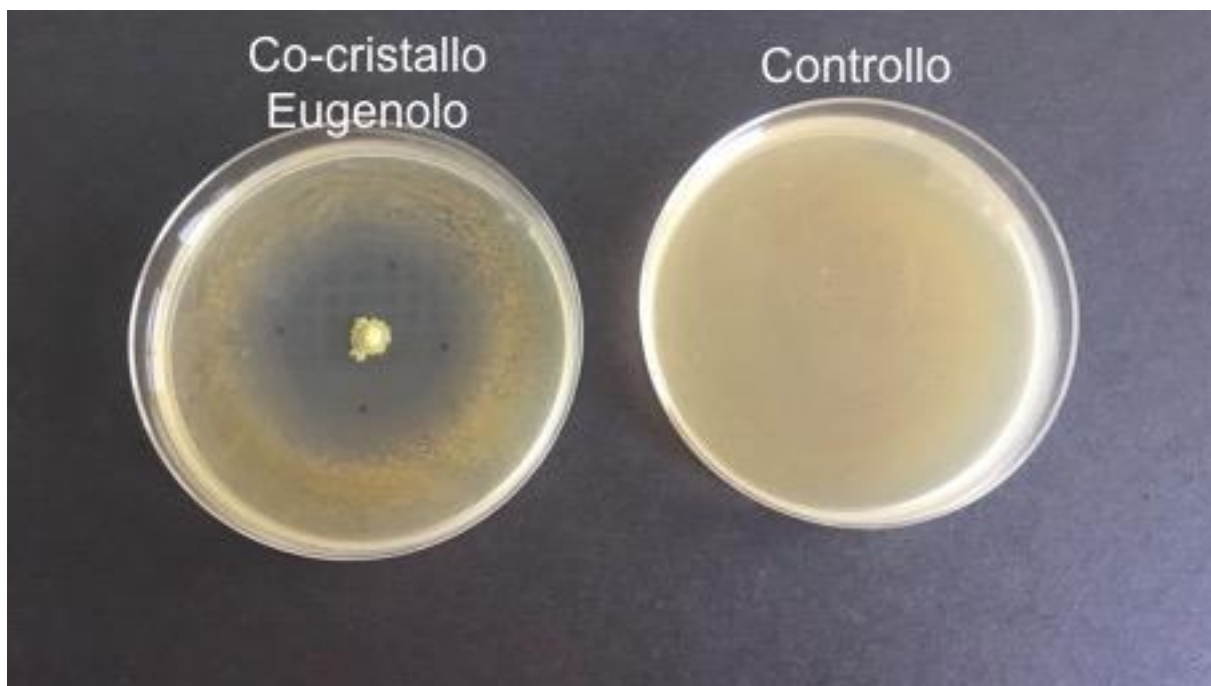


Figura 4: Sensibilità del ceppo batterico *Rhodococcus fascians* a co-cristallo contenente Eugenolo

Presso le parcelle sperimentali dell'Area di Ricerca di Firenze (CNR) è stata allestita una prova avente lo scopo di **valutare l'efficacia di due prodotti a base di estratti naturali** nel controllo dell'oidio e ticchiolatura della rosa e della rogna dell'oleandro. Le piante sono disposte in gruppi di 20 in tunnel di plastica e irrigate con il metodo a goccia (Figura 5). Il monitoraggio delle condizioni di temperatura e umidità è effettuato regolarmente dai ricercatori dell'IBIMET. Sono stati utilizzati due prodotti: uno a base di oli essenziali di arancio dolce e l'altro a base di una miscela di terpeni. Come controllo chimico è stato impiegato un prodotto commerciale a base di ossicloruro di rame e penconazolo. Nei mesi di giugno-luglio 2018 sono stati effettuati i trattamenti a cadenza settimanale. L'incidenza delle fitopatie è risultata finora bassa, senza sostanziali differenze tra i trattamenti..



Figura 5. Allestimento della prova per valutare l'efficacia di biopesticidi su oleandro (*Nerium oleander*) e su rose (*Rosa* sp.) presso la parcella sperimentale del CN

Vaso biodegradabile e miglioramento del processo di biodegradazione.

Luciana Giovannetti, Luna Maria Exana

1. SINTETICA BASE SCIENTIFICA ED ARTICOLAZIONE DELL'ATTIVITA'

La possibilità di sostituire i tradizionali vasi con vasi costituiti da biopolimeri ecocompatibili rappresenta uno degli aspetti fondamentali per presentare il vivaismo pistoiese come un'attività sempre più attenta alla tutela dell'ambiente. Il biopolimero scelto per la produzione di vasi ecocompatibili è il poli acido lattico (PLA), un poliestere alifatico prodotto da fonti rinnovabili, facile da sintetizzare, non tossico, dotato di buone caratteristiche meccaniche e biodegradabile (Satti et al., 2018). Il PLA può essere idrolizzato abioticamente e/o degradato da microrganismi tramite enzimi extracellulari, quali proteasi e lipasi (Penkhrue et al., 2015), in molecole a basso peso molecolare (oligomeri e monomeri) e, successivamente, mineralizzato a anidride carbonica e acqua da microrganismi aerobi capaci di utilizzare il PLA come fonte di energia (Kim et al., 2017). La degradazione microbica del PLA può avvenire anche in condizioni di anaerobiosi con produzione di metano (Karamanlioglu&Robson, 2013). Comunque la degradazione nell'ambiente del PLA è più lenta di quella di altri poliesteri alifatici come, per esempio, il poli-idrossibutirrato (PHB) o il policaprolattone (PCL) (Li et al., 2008). I microrganismi degradatori del PLA non sono molto diffusi in natura e egualmente distribuiti nei suoli (Kim& Park, 2010), quindi i ricercatori, considerando che nell'ambiente non ci siano condizioni favorevoli a una rapida degradazione del PLA, ritengono fondamentale l'isolamento dall'ambiente di ceppi batterici e fungini capaci di degradare a tassi elevati il PLA. In questa problematica si è inserita la presente attività che ha avuto come principale obiettivo quello di isolare e caratterizzare batteri in grado di aumentare la velocità della

degradazione del PLA per sviluppare un sistema biologico, a basso impatto ambientale e accettabile dal punto di vista economico, in grado di portare a un'efficiente degradazione del PLA utilizzato per la produzione dei vasi da impiegare nell'attività vivaistica.

Risultati conseguiti in relazione a quelli attesi e agli obiettivi previsti nel programma iniziale. Eventuali difficoltà incontrate.

2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI CEPPI BATTERICI DEGRADATORI DI PLA

Per l'isolamento di ceppi batterici in grado di utilizzare il PLA come fonte di carbonio e/o di energia e quindi di essere capaci di degradare il PLA sono stati usati 37 campioni di suolo (Tabella 1).

Tabella 1. Origine e luogo di campionamento dei suoli impiegati per l'isolamento di batteri potenzialmente capaci di degradare il PLA.

CODICE CAMPIONE SUOLO	ORIGINE	LUOGO CAMPIONAMENTO
SCM1	Compost	Non conosciuto
SGN1	Prato	Polo Scientifico Sesto (FI)
SFV1	Vivaio	Pistoia
STG1	Vivaio	Pistoia
STG2	Vivaio	Pistoia
STG3	Vivaio o	Pistoia
STG4	Vivaio,	Pistoia
STV1	Vivaio, suolo da pianta in vaso	Pistoia
STNT1	Vivaio, suolo da pianta in vaso	Pistoia
STS1	Suolo di scolo della acque	Pistoia
STC1	Suolo di campo	Pistoia
SV1	Suolo di vaso	Sesto Fiorentino (FI)
SGF1	Suolo di giardino	Comeana (PO)
STM1	Suolo di sottobosco superficiale	Garfagnana (LU)
STM2	Suolo di sottobosco superficiale	Garfagnana (LU)
STM3	Suolo di sottobosco superficiale	Garfagnana (LU)
SO1	Suolo lungo canale	Osmannoro (FI)
SCA1	Campo arato	Lecore (Signa)
SL1	Ciglio sentiero	Lentula (PT)
SL2	Sottobosco castagno e nocciolo	Lentula (PT)
SL3	Tronco in decomposizione	Lentula (PT)
SL4	Sedimenti di fiume	Lentula (PT)
SL5	Suolo nei pressi di fiume	Lentula (PT)
SL6	Suolo dentro tronco albero degradato	Lentula (PT)
SNC1	Bordo strada	Gambassi (FI)

SNC2	Substrato commerciale per piante	Non conosciuto
SNC3	Compost	Firenze
SNC4	Compost	Firenze
SNC5	Compost	Montespertoli (FI)
SPRG	Suolo rizosferico	Pistoia
SCEV	Suolo rizosferico	Pistoia
SPVG	Suolo rizosfera	Pistoia
SST1	Suolo agrario	Non conosciuto
SST2	Suolo di giardino	Non conosciuto
SPO1	Suolo di campo	Polo Scientifico Sesto (FI)
SO2	Suolo lungo canale	Osmannoro (FI)
SMI	Miniera	Campiglia Marittima (LI)

La scelta di utilizzare suoli diversi per procedere all'isolamento dei ceppi d'interesse si è resa necessaria perché microrganismi degradatori del PLA possono non essere presenti in tutti i suoli e la loro percentuale è generalmente molto bassa rispetto alla comunità microbica totale (Apinya et al., 2015).

Il PLA utilizzato per la valutazione dei batteri degradatori è stato fornito, in forma di granuli, dall'Unità del DIFARMA-Università di Salerno (per le informazioni sulla natura e caratteristiche del PLA fare riferimento all'Unità del DIFARMA).

Per l'isolamento, selezione e coltivazione dei ceppi batterici capaci di degradare il PLA è stato formulato un terreno minimo (TM), sulla base di quanto indicato da Kim e Park (2010), così modificato: K_2HPO_4 , 2,34 g/L; KH_2PO_4 , 1,33 g/L; $MgSO_4$, 0,2 g/L (NH_4) $_2SO_4$, 1 g/L; NaCl, 0,5 g/L; estratto di lievito 0,03 g/L più 1 mL di soluzione contenente microelementi in tracce ($CoCl_2$, 11,9 mg/L; $NiCl_2$, 11,8 mg/L; $CuSO_4$, 15,7 mg/L; $FeCl_3$, 0,97 mg/L; $CaCl_2$, 0,78 mg/L; $MnCl_2$, 10 mg/L). Al TM è stato aggiunto, come fonte di carbonio e d'energia il PLA in quantità diverse in base alle necessità sperimentali. Considerando che il PLA è insolubile in acqua è stato necessario usare PLA emulsionato in diclorometano (Pranamuda&Tokiwa, 1999).

La messa a punto dei protocolli per l'isolamento di ceppi batterici degradatori del PLA ha previsto i seguenti approcci metodologici:

- arricchimento dei batteri utilizzando microcosmi di suolo contenenti granuli di PLA tenuti per 30 giorni in condizioni ambientali standard;
- arricchimento in liquido utilizzando 5 g di suolo e 25 g di granuli PLA sospesi in 75 mL di TM liquido e incubati a 27°C per 10 giorni. Dopo i granuli di PLA sono stati trasferiti in 75 mL di mezzo di coltura fresco. Trascorsi altri 10 giorni di incubazione i granuli di PLA sono stati lavati con una soluzione tampone (pH 7) e risospesi nel TM senza estratto di lievito. Le colture sono state incubate per 10 giorni. Al termine dell'incubazione i granuli di PLA sono stati trattati con un sonicatore (Branson 1200) per 10 minuti a 60 Hz al fine di rimuovere le cellule batteriche adese ai granuli, quindi sono state preparate diluizioni seriali (da 10^{-2} a 10^{-4}) e un'aliquota nota di ciascuna diluizione è stata seminata su mezzo solido TM contenente PLA emulsionato.
- Arricchimento per attinomiceti tramite pretrattamento dei campioni di suolo con elevate temperature (Subramani&Aalbersberg, 2013) o con irraggiamento a microonde (Wang et al., 2013), successiva preparazione di diluizioni seriali (da 10^{-1} a 10^{-4}) e piastramento di un'aliquota nota di ogni diluizione sul terreno selettivo per attinomiceti International Streptomyces Project SyntheticSalts-Starch Medium (ISP4). Le piastre sono state incubate a 28 °C per una settimana. La procedura applicata è riportata schematicamente in Figura 1.



FIG.1. Schema della procedura impiegata per l'arricchimento di attinomiceti dal suolo.

Applicando gli approcci sopra riportati sono state ottenute decine di migliaia di colonie batteriche, tra queste 4000 sono state isolate in modo da ottenere delle colture pure che sono state saggiate per la loro capacità di solubilizzare il PLA, evidenziata dalla formazione di un alone di chiarificazione su mezzo solido contenente il PLA emulsionato. Il metodo dell'alone di chiarificazione su piastra è largamente usato per selezionare microrganismi potenzialmente capaci di degradare polimeri e per la valutazione della potenziale capacità degradativa di differenti microrganismi (Prema et al., 2013). L'alone di chiarificazione intorno alla colonia microbica si forma quando i microrganismi secernono enzimi che diffondono attraverso l'agar e degradano il polimero rendendolo solubile in acqua (Penkhrue et al., 2015).

Sono stati sottoposti, come previsto dal progetto, al saggio di produzione dell'alone di chiarificazione anche i seguenti ceppi provenienti da collezioni, scelti sulla base della loro capacità di utilizzare sostanze organiche complesse: *Amycolatopsisistolypomycina*, *Amycolatopsis ippodromi*, *Amycolatopsisbartoniae*, *Amycolatopsisbahlimiceticus*, *Amycolatopsis circi*, *Amycolatopsisissamaneae*, *Amycolatopsisirubida*, *Amycolatopsisalbidoflavus*, *Amycolatopsisminnesotensis*, *Amycolatopsis granulosa*, *Amycolatopsisviridis*, *Amycolatopsis mediterranei* e *Kibdelosporangiumaridum*; *Saccharothrixwaywayandensis* DSM 44232, conosciuto come degradatore del PLA, è stato usato come controllo positivo.

I risultati ottenuti confermano quanto riportato in letteratura, ossia la scarsa presenza nel suolo di batteri degradatori del PLA; infatti, solamente 4 ceppi, denominati SO1.1, SO1.2, SNC e SST, hanno formato un alone di chiarificazione intorno alla colonia, dopo incubazione di alcuni giorni a 28 °C (Figura 2).

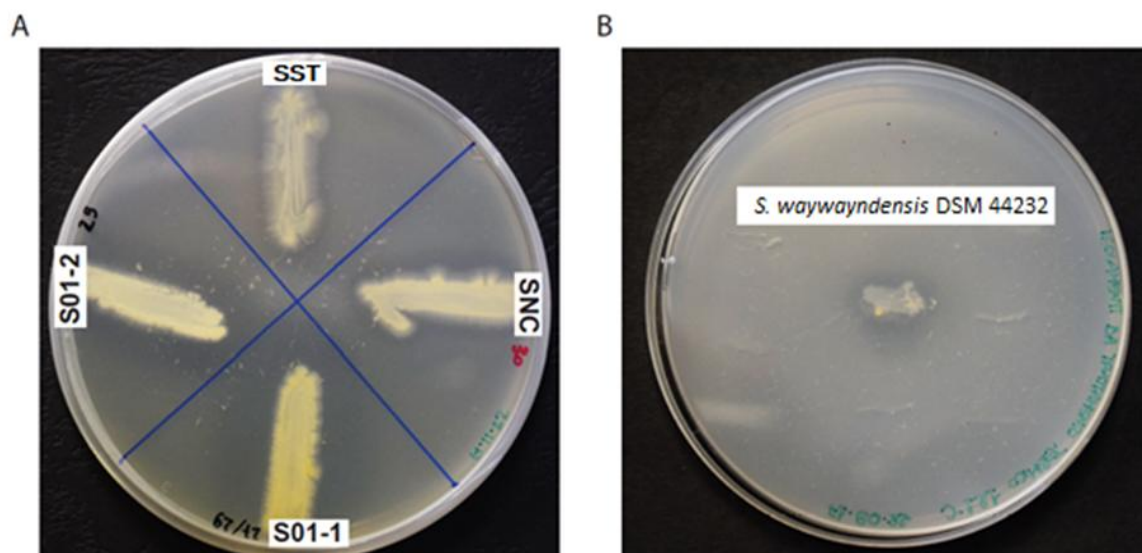


FIG. 2. Aloni di chiarificazione intorno alle colonie, cresciute su TM solido contenente come fonte di energia e di carbonio PLA emulsionato, dei ceppi S01.1, S01.2, SNC e SST (A) e di *Saccharothrix waywayandensis* DSM44232 (controllo positivo) (B). Lo stesso comportamento è stato riscontrato nel ceppo di *Amycolatopsis mediterranei* DSM 433304. Tutti i ceppi sono stati incubati a 28 °C per 7 giorni.

La selezione di ceppi batterici in grado di utilizzare il PLA si è dimostrata più complessa di quanto previsto e ha richiesto un tempo maggiore di quello ipotizzato in fase di progetto. Gli esperimenti per l'isolamento di ceppi da campioni di suolo sono continuati fino a febbraio 2018, poiché la possibilità di avere ceppi capaci di degradare efficacemente il PLA riveste un ruolo essenziale per la messa a punto di un sistema che consenta un'efficiente degradazione del PLA nell'ambiente.

I ceppi S01.1, S01.2, SNC e SST sono stati identificati tramite sequenziamento e analisi del 16S rDNA. Per l'amplificazione del 16S rDNA sono stati usati i *primer* universali per batteri 63f (5'-CAGGCCTAACACATGAAGTC-3') e 1387r (5'-GGGCGGWTGTCAAGGC-3') (Marchesi et al., 1998). L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando il metodo Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). La distanza evolutiva è stata calcolata tramite l'applicazione della Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2004). Le analisi evolutive sono state eseguite impiegando il software MEGA7 (Kumar et al., 2016).

I quattro isolati sono stati identificati come membri del genere *Amycolatopsis*.

3. SAGGI DI DEGRADAZIONE DEL PLA DA PARTE DEI CEPPI SELEZIONATI

Considerando che i ceppi S01.1, S01.2, SST e SNC sulla base dell'alone di chiarificazione prodotto in mezzo solido contenente PLA emulsionato (Figura 2) potrebbero avere tassi diversi di degradazione del PLA e che ceppi che producono l'alone di chiarificazione potrebbero non essere capaci di degradare il PLA in film (Penkhrue et al., 2015), sono state condotte prove in mezzo liquido con PLA emulsionato e prove con PLA in film. I film di PLA sono stati ottenuti applicando il protocollo di Kim et al. (2017) sostituendo il cloroformio con il diclorometano. Le prove in liquido con PLA emulsionato sono state effettuate su mezzo MT senza e con gelatina (0,1% p/v). Come controllo positivo è stato impiegato il ceppo *Saccharothrix waywayandensis* DSM44232 e come controllo negativo campioni non inoculati con batteri. Tutti i campioni sono stati incubati in agitazione a 28 °C per sette giorni. La degradazione del PLA è stata valutata mediante la determinazione della densità ottica (OD₆₀₀) dopo rimozione delle cellule per centrifugazione.

I risultati ottenuti (Figura 3) mostrano che tutti i ceppi hanno degradato il PLA emulsionato in presenza di gelatina ($P<0,01$, T-test), il ceppo SNC è stato capace di degradare il PLA anche senza gelatina ($P<0,05$, T-test).

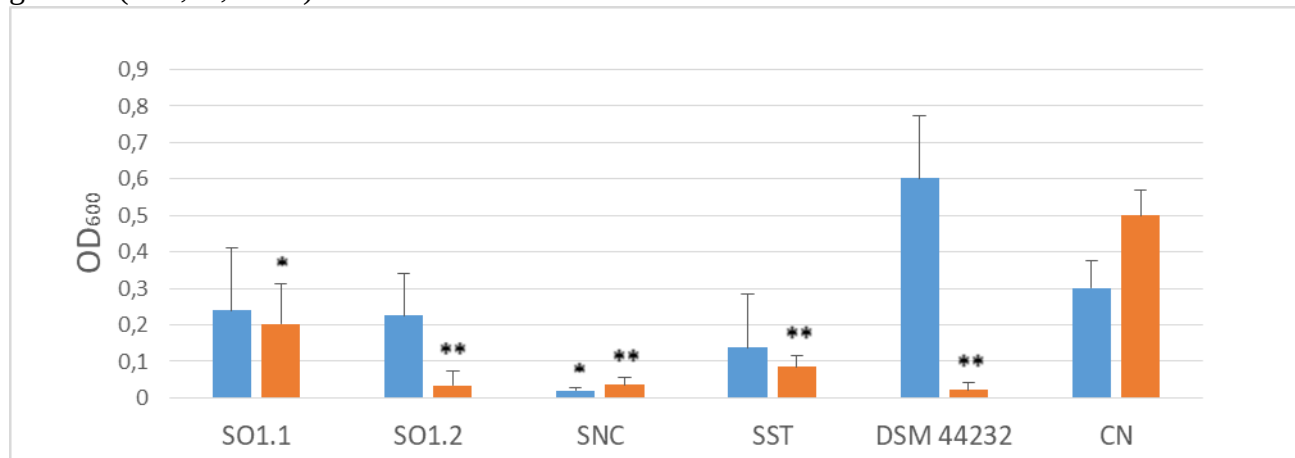


FIG. 3. Degradazione del PLA emulsionato da parte dei ceppi SO1.1, SO1.2, SNC, SST e DSM 44232 (controllo positivo). CN indica i campioni non inoculati con batteri (controllo negativo); mezzo MT senza gelatina, mezzo MT più gelatina 0,1% (p/v). Le barre indicano la deviazione standard dei valori dell'OD₆₀₀ misurata (n=3), il singolo e il doppio asterisco indicano rispettivamente differenze statisticamente significative per $P<0,05$ (T-test) e per $P<0,01$ (T-test) rispetto al controllo negativo (NC). I campioni sono stati incubati in agitazione a 28°C per 7 giorni.

Tali risultati non sono sorprendenti perché è stato osservato che in alcuni batteri degradatori del PLA l'aggiunta al mezzo di coltura di sostanze proteiche aumenta il tasso di degradazione del biopolimero. La gelatina potrebbe funzionare da attivatore della sintesi di enzimi extracellulari (proteasi) necessari per iniziare l'idrolisi del PLA.

Essendo stati tutti gli isolati capaci di degradare PLA emulsionato in presenza di gelatina, prima di allestire prove per la determinazione quantitativa della degradazione di film di PLA, è stato condotto un esperimento, impiegando il mezzo TM più gelatina e PLA in film, per esaminare, tramite osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM), l'effetto del ceppo SST (preso come esempio degli isolati) e del ceppo *Saccharothrixwaywayandensis* DSM44232 (controllo positivo) sui film di PLA. Le fotografie al SEM dei campioni hanno messo in evidenza che entrambi i ceppi hanno esercitato una attività degradativa nei confronti dei film di PLA, caratterizzata da profondi cambiamenti morfologici e fisici dei film (Figura 4 B e C), mentre il film in assenza di batteri non ha subito cambiamenti (Figura 4 A).

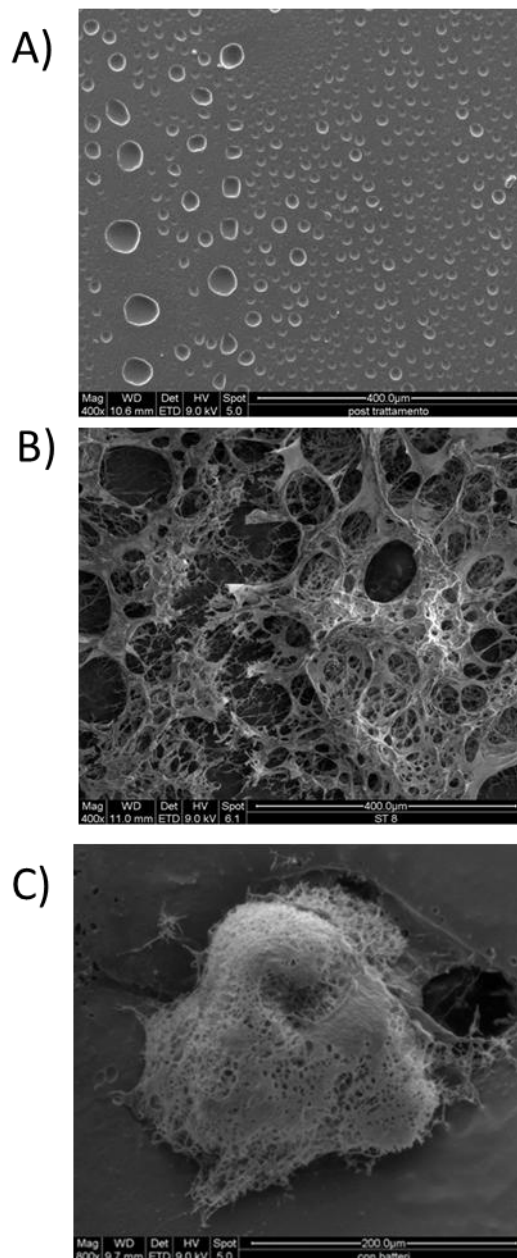


FIG. 4. Immagini ottenute al SEM di film di PLA dopo incubazione in agitazione a 28 °C per 10 giorni. A) film di PLA non inoculato con batteri, B) film di PLA inoculato con il ceppo SST, C) film di PLA inoculato con il ceppo *Saccharothrixwaywayandensis* DSM 44232.

Avendo verificato che il ceppo SST era in grado di attaccare il PLA in film, sono state condotte prove con tutti gli isolati per stabilirne l'attività degradativa a livello quantitativo utilizzando condizioni differenti. I ceppi sono stati inoculati in mezzo TM, TM più gelatina (0,1% p/v), estratto di suolo senza gelatina e con gelatina (0,1% p/v). La scelta di utilizzare come mezzo di coltura l'estratto di suolo è stata suggerita dal fatto che i ceppi potrebbero essere utilizzati per la degradazione del PLA nel suolo. Con ogni mezzo di coltura sono state allestite quattro repliche per ciascun ceppo. A tutti i campioni è stato aggiunto PLA in film. La quantificazione della capacità degradativa degli isolati dei film di PLA è stata valutata determinando la variazione del peso dei film alla fine dell'esperimento rispetto al peso iniziale (Cai et al., 2001).

Al termine dell'esperimento (30 giorni d'incubazione a 28 °C e in agitazione) si è avuta un'elevata

perdita di peso dei film di PLA ad opera del ceppo DSM 44232 ($45.6 \pm 12.0\%$), controllo positivo, su mezzo TM più gelatina e del ceppo SNC ($36.0 \pm 7.2\%$) su estratto di suolo più gelatina (dati non mostrati). I ceppi SO1.1, su mezzo TM senza e con gelatina, e SST, su estratto di suolo più gelatina, hanno dato luogo alla perdita di peso dei film di PLA rispettivamente del $6.8 \pm 1.8\%$, $8.4 \pm 1.0\%$ e $5.9 \pm 1.7\%$ (dati non mostrati). E' stato, inoltre, osservato che tutti i ceppi, in mezzo MT e MT più glicerina hanno ridotto i film di PLA in frammenti. I film di PLA, in tutti i mezzi di coltura, sono rimasti interi e non hanno subito diminuzioni di peso: tali risultati consentono di ipotizzare che i film di PLA, nelle condizioni impiegate, non vadano incontro a degradazione dovuta a fattori abiotici.

4. CARATTERIZZAZIONE DEI CEPPIS O1.1, S O1.2, SNC ESSTPERMICDI GLIFOSATE, CARATTERI CHE PROMUOVONA LA CRESCITA DELLE PIANTE (PGP) ED EFFETTO SULLA CRESCITA DI NANDINA DOMESTICA

In previsione di utilizzare i ceppi SO1.1, SO1.2, SNC e SST per favorire la degradazione del PLA in ambienti in cui vengono dispersi fitofarmaci è stato ritenuto fondamentale saggiare la resistenza dei ceppi isolati al glifosate, che è uno dei principali erbicidi usati nell'attività vivaistica. Nell'esperimento è stato incluso anche il ceppo *Saccharotrixwaywayndensis* DSM 44232. La resistenza dei ceppi al glifosate è stata stabilita tramite la minima concentrazione inibitoria (MIC, che è la più bassa concentrazione di una sostanza chimica che inibisce più del 99% di una popolazione batterica) di glifosate in mezzo di coltura GPHF dopo 14 giorni di crescita a 28°C. I risultati ottenuti (Tabella 2) indicano che la coppia di ceppi SO1.1 e SO1.2 e quella costituita dai ceppi SST e SNC hanno rispettivamente una MIC di circa 60 e 30 volte superiore a quella del ceppo di *Saccharotrixwaywayndensis* DSM 44232.

Tabella 2. MIC per il glifosate (MASTIFF) dei ceppi SO1.1, SO1.2, SNC, SST e *Saccharotrixwaywayndensis* DSM 44232.

Ceppo	MIC-Glifosate (g/L)*
SO1.1	4,5
SO1.2	4,5
SNC	2,25
SST	2,25
<i>Saccharotrixwaywayndensis</i> DSM 44232	0,070

*Mezzo di coltura GPHF (glucosio 10 g/L, peptone 5g/L, estratto di lievito 5 g/L, estratto di carne 5 g/L, CaCl₂ 2H₂O 0.74 g/L, pH 7,2). Tutti i campioni sono stati incubati a 28 °C per 14 giorni.

E' noto che nel suolo ci sono batteri in grado di esercitare un ruolo positivo sulla crescita delle piante tramite la produzione di acido indol-3-acetico (IAA), il miglioramento della fissazione dell'azoto atmosferico, la solubilizzazione del fosfato inorganico, la mineralizzazione del fosfato organico e / o di altri nutrienti e la produzione di siderofori (Ahmad et al., 2008). Pertanto i ceppi SO1.1, SO1.2, SNC e SST, come previsto nel programma, sono stati saggiati per le seguenti caratteristiche PGP: produzione di IAA, produzione di siderofori e solubilizzazione del fosfato. Le prove sono state condotte applicando protocolli presenti in letteratura (Wohler, 1997; Nautiyal, 1999; Pérez-Miranda et al., 2007). Dai risultati ottenuti è emerso che nessuno dei ceppi, nelle condizioni adottate, è stato in grado di produrre IAA, siderofori o solubilizzare il fosfato (dati non mostrati).

Per escludere la possibilità che i ceppi selezionati possano influenzare negativamente la crescita delle piante, è stato condotto un esperimento impiegando *Nandina domestica* come pianta modello. Le piante di *Nandina domestica* sono state fornite dall'Azienda Agricola Martini Giuseppe.

Ogni ceppo è stato inoculato, con una quantità di cellule note, a livello dell'apparato radicale di giovani piante di *Nandina domestica* (n=7). La crescita delle piantine è stata valutata dopo un mese e mezzo dall'inoculo e comparata rispetto a piantine non inoculate (n=7), impiegando come parametri il peso umido ed il peso secco delle piante intere (parte aerea ed apparato radicale).

Le piante inoculate non hanno mostrato differenze statisticamente significative rispetto alle piante non inoculate (sia come peso umido che come peso secco) per nessuno dei ceppi saggiati (Figura 5), quindi si può concludere che i ceppi SO1.1, SO1.2, SST e SNC non esercitano effetti negativi, nelle condizioni adottate, sullo sviluppo di *Nandina domestica*.

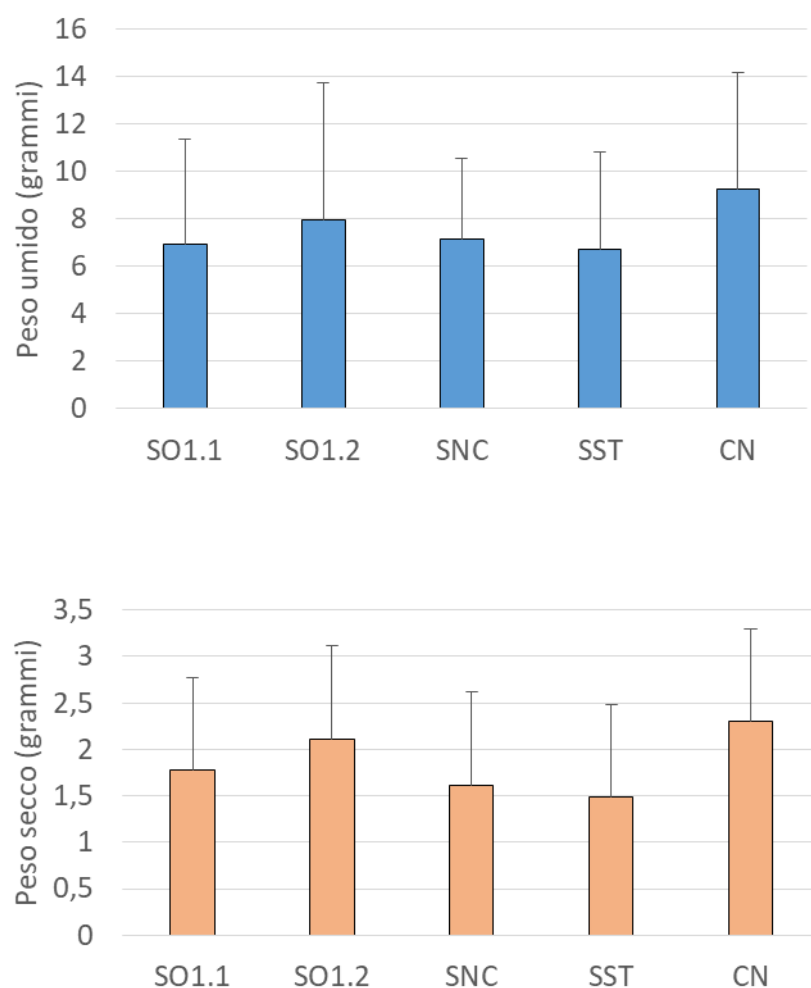


FIG. 5. Effetto dei ceppi SO1.1, SO1.2, SNC e SST sulla crescita di *Nandina domestica*. I campioni CN sono costituiti da piante non inoculate. ■ peso umido e ■ peso secco di *Nandina domestica* dopo un mese e mezzo dall'inoculo con ceppi e non inoculate (CN). I dati indicano la media del peso $\pm$ deviazione standard (n= 7).

5. CONCLUSIONI

Il PLA, polimero proposto per la stampa di vasi da utilizzare nei vivai, viene biodegradato lentamente in condizioni ambientali, pertanto la disponibilità di microrganismi degradatori del PLA in un intervallo di temperatura di 25-30 °C rappresenta un aspetto fondamentale per migliorare i tassi di degradazione del polimero in ambienti naturali.

La presente attività ha portato all'isolamento di quattro ceppi di attinomiceti, identificati mediante l'analisi del 16S rDNA come *Amycolatopsis* spp., capaci, alla temperatura di 28 °C, di degradare PLA emulsionato in mezzo liquido addizionato con gelatina e il ceppo SNC anche senza gelatina. Inoltre i ceppi SNC, SO1.1 e SST hanno degradato il PLA sotto forma di film, sebbene con efficienza diversa (SNC > SO1.1 > SST) e su mezzi di coltura differenti. Il ceppo di collezione *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43302 ha confermato una buona attività degradativa del PLA in film su mezzo minerale più glicerina ma, a differenza del ceppo SNC, non su estratto di suolo e la sua MIC per il glifosate, parametro importante per l'impiego di un batterio in processi biotecnologici in suoli di vivaio, è risultata solo pari a 2,6 % e a 1,56 % rispettivamente delle MIC del ceppo SO1.1 e dei ceppi SNC e SST.

La disponibilità di “nuovi ceppi” degradatori del PLA alla temperatura di 28 °C e resistenti al glifosate è essenziale per poter in futuro applicare una strategia di bio-incremento con un singolo ceppo o un consorzio di ceppi per accelerare la degradazione di residui di PLA nel suolo e/o in processi di compostaggio.

Bibliografia

- F. Ahmad, I. Ahmad & M.S. Khan, Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.***163**, 173-181 (2008).
- T. Apinya, N. Somatsompop & B. Pragapdee, Selection of a *Pseudonocardia* sp. RM423 that accelerates the biodegradation of poly(lactic) acid in submerged cultures and in soil microcosms. *Int. Biodet. Biodeg.* **20**,23-30 (2015).
- Q. Cai, J. Bei, A. Luo& S. Wang, Biodegradation behaviour of poly(lactide-co-glycolide) induced by microorganisms, *Polym. Degrad. Stab.***71**, 243-251 (2001).
- M. Karamanlioglu& G.D. Robson, The influence of biotic and abiotic factors on the rate of degradation of poly(lactic) acid (PLA) coupons buried in compost and soil. *Polym. Degrad. Stab.***98**, 2063-2071.
- M. N. Kim & S. T. Park, Degradation of poly(L-lactide) by a mesophilic bacterium. *J. Appl. Pol. Sci.* **117**,67-74 (2010).
- M.Y Kim, C. Kim, J. Moon, J. Heo, S.P. Jung & J.R. Kim, Polymer film-based screening and isolation of polylactic acid (PLA)-degrading microorganisms. *J.Microbiol. Biotechnol.* **27**, 342-349 (2017).
- S. Kumar, G. Stecher & K. Tamura, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.***33**, 1870-1874 (2016).
- F. Li, S. Wang, W. Liu & G. Chen, Purification and characterization of poly(L-lactic acid)-degrading enzymes from *Amycolatopsis orientalis* ssp. *Orientalis*. *FEMSMicrobiol. Lett***282**, 52-58 (2008).
- J.R. Marchesi, T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom, D. Dymock& W.G. Wade, Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA.*Appl Environ Microbiol.***64**, 795-759 (1998).
- C. S. Nautiyal, An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.***170**, 265-270 (1999).
- W. Penkhrue, C. Khanongnuch, K. Masaki, W. Pathom-aree, W. Punyodom& S. Lumyong, Isolation and screening of biopolymer-degrading microorganisms from northern Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.***31**, 1431-1442 (2015).
- S. Pérez-Miranda, N. Cabirol, R. George-Téllez, L.S. Zamudio-Rivera & F.J. Fernández, O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J. Microbiol. Methods***70**, 127-31.
- S. Prema. & U. M. Devi, Degradation of poly lactide plastic by mesophilic bacteria isolated from compost. *Int. J. Res. Pure Appl. Microbiol.* **3**, 121-126 (2013).
- H. Pranamuda & Y. Tokiwa, Degradation of poly(L-lactide) by strains belonging to genus *Amycolatopsis*. *Biotechnol. Lett.***21**, 901-905 (1999).
- N. Saitou & M. Nei, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.***4**, 406-425 (1987).

S. M. Satti, A. A. Shah, T.L. Marsh & R. Auras, Biodegradation of poly(lactic acid) in soil microcosms at ambient temperature: evaluation of natural attenuation, bio-augmentation and bio-stimulation. *J. Polym. Env.* **26**, 3848-3857 (2018).

R. Subramani & W. Aalbersberg, Culturable rare actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 9291-9321 (2013).

K. Tamura, M. Nei & S. Kumar, Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 11030-11035 (2004).

D.S. Wang, Q.H. Xue, W.J. Zhu, J. Zhao, J.L. Duan & G.H. Shen, Microwave irradiation is a useful tool for improving isolation of actinomycetes from soil. *Mikrobiologiya* **82**, 106-114 (2013).

I. Wohler, Auxin-indole derivatives in soils determined by a colorimetric method and by high performance liquid chromatography. *Microbiol. Res.* **152**, 399-405 (1997).