

**UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”
DIPARTIMENTO DI AGRARIA**



**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE AGRARIE E
AGROALIMENTARI**

XXXII° CICLO

TESI DI DOTTORATO

***Valorizzazione dei sottoprodotti agroalimentari oleari
tramite l'impiego dei microrganismi benefici***

***Enhancement of agri-food oil by-products by using
beneficial microorganisms***

Relatore:
Ch.ma Prof.ssa S. L. Woo

Candidato:
Laura Gioia

Correlatore:
Dott.ssa S. Lanzuise

Coordinatore Dott.:
Ch.mo Prof. G. D'Urso

Tutor Aziendale:
Dott. A. Sicari

Tutor Estero:
Ch.mo Prof. E. Monte

Indice

1. Introduzione	1
1.1. Gli scarti della filiera agroalimentare	2
1.1.1. L'impatto ambientale dei rifiuti della filiera agroalimentare	7
1.1.2. Aspetti legislativi per una gestione sostenibile dei rifiuti	9
1.1.3. Il Biorisanimento	12
1.2. I sottoprodotti della filiera agroalimentare - composizione e potenziale riutilizzo	14
1.2.1. La bioraffineria per il recupero dei sottoprodotti agroalimentari (rifiuti organici)	15
1.2.2. Impiego dei sottoprodotti come integratori per le coltivazioni	17
1.2.2.1. Ammendanti organici	18
1.2.2.2. Biostimolanti e biofertilizzanti	19
1.2.2.3. Bioprodotti dalla combinazione degli scarti con i microbi benefici	21
1.3. La valorizzazione dei sottoprodotti oleari	22
1.3.1. La Sansa di Oliva (OP)	22
1.3.2. Le farine di estrazione da girasole (SF) e colza (RS)	26
1.4. I microrganismi benefici in agricoltura	29
1.4.1. Il fungo benefico <i>Trichoderma</i>	32
1.4.1.1. Interazione <i>Trichoderma</i> - patogeno	32
1.4.1.2. Interazione <i>Trichoderma</i> - pianta	33
1.4.1.3. Biorisanamento e bioremedio di inquinanti con <i>Trichoderma</i>	35
2. Scopo della tesi	38
3. Isolamento e identificazione di specie fungine da suolo contaminato	41
3.1. Materiali e metodi	41
3.1.1. Raccolta dei campioni suolo	41
3.1.2. Isolamento dei ceppi fungini	42
3.1.3. Identificazione molecolare dei ceppi fungini isolati	43
3.2. Risultati	44
3.3. Discussione	46
4. Selezione dei ceppi fungini potenzialmente utilizzabili in agricoltura	48
4.1. Valutazione della capacità dei ceppi isolati di svilupparsi in presenza di inquinanti antropici	48
4.1.1. Materiali e metodi	48
4.1.2. Risultati	49
4.1.3. Discussione	52
4.2. Saggi di biocontrollo <i>in vitro</i>	52
4.2.1. Materiali e metodi	52
4.2.2. Risultati	53
4.2.3. Discussione	54
5. Valutazione degli effetti di <i>Trichoderma</i> spp. sulle piante	56
5.1. Valutazione degli effetti di <i>Trichoderma</i> spp. sulla crescita di piante di pomodoro	56
5.1.1. Materiali e metodi	56

5.1.2. Risultati	57
5.2. Valutazione degli effetti di <i>T. harzianum</i> E45 e <i>T. afroharzianum</i> T22 sulla germinazione dei semi e sulla crescita di piante di fagiolo.....	58
5.2.1. Materiali e metodi	58
5.2.2. Risultati	58
5.3. Discussione	59
6. Valutazione della capacità dei funghi di crescere sui sottoprodotti oleari.....	60
6.1. Saggi <i>in vitro</i> su substrato solido contenente la sansa di oliva (OP)	60
6.1.1. Materiali e metodi	60
6.1.2. Risultati	60
6.2. Saggi <i>in vitro</i> in substrato liquido contenente la sansa di oliva (OP)	62
6.2.1. Materiali e metodi	62
6.2.2. Risultati	63
6.3. Saggi <i>in vitro</i> su substrato solido con i sottoprodotti oleari di girasole (SF), colza (RS) e sansa	64
6.3.1. Materiali e metodi	64
6.3.2. Risultati	65
6.3.2.1. Crescita di <i>Trichoderma</i> su substrati solidi contenenti la sansa (OP)	64
6.3.2.2. Crescita di <i>Trichoderma</i> su substrati solido contenenti la farina di girasole (SF).....	66
6.3.2.3. Crescita di <i>Trichoderma</i> su substrati solidi contenenti la farina di colza (RS)	67
6.4. Discussione	68
7. Fermentazione in Stato Solido (SSF) dei sottoprodotti tal quali con <i>Trichoderma</i>	71
7.1. Fermentazione in Stato Solido dei sottoprodotti	71
7.1.1. Materiali e metodi	71
7.1.2. Risultati	72
7.2. Analisi chimico-fisiche dei sottoprodotti a seguito della Fermentazione in Stato Solido con <i>Trichoderma</i>	73
7.2.1. Materiali e Metodi	73
7.2.2. Risultati	73
7.3. Discussione	74
8. Effetti sulla germinazione e crescita delle piante dei filtrati provenienti dalla coltura liquida di <i>Trichoderma</i> sui sottoprodotti oleari	76
8.1. Filtrato proveniente dalla coltura liquida di diversi ceppi di <i>Trichoderma</i> su OP50	76
8.1.1. Materiali e metodi	76
8.1.2. Risultati	77
8.2. Filtrato proveniente dalla coltura liquida dei ceppi di <i>Trichoderma</i> selezionati su OP, RS e SF	81
8.2.1. Materiali e metodi	81
8.2.2. Risultati	82
8.3. Discussione	83
9. Valutazione degli effetti dei sottoprodotti oleari incorporati nel terreno sulla crescita delle piante.....	85
9.1. Utilizzo dei sottoprodotti SF, RS ed OP a concentrazioni variabili dal 5% al 50%	85
9.1.1. Materiali e metodi	85

9.1.2. Risultati	85
9.2. Utilizzo dei sottoprodotti SF, RS ed OP a concentrazioni variabili dal 0,5% al 4%	86
9.2.1. Materiali e metodi	86
9.2.2. Risultati	87
9.3. Utilizzo dei sottoprodotti SF e RS a concentrazioni dell' 1 % e 4%	89
9.3.1. Materiali e metodi	89
9.3.2. Risultati	89
9.4. Discussione	91
10. Valutazione degli effetti dei sottoprodotti SF ed RS pretrattati con <i>Trichoderma</i> in Fermentazione in Stato Solido sulla coltivazione di pomodoro	94
10.1. Valutazione della crescita vegetale	94
10.1.1. Materiali e metodi	94
10.1.2. Risultati	96
10.1.2.1. Altezza del fusto ad un mese dal trapianto	96
10.1.2.2. Altezza del fusto e peso della parte epigea delle piante a due mesi dal trapianto	98
10.1.2.3. Lunghezza delle radici e peso secco della parte ipogea delle piante a due mesi dal trapianto	102
10.1.2.4. SPAD rilevato sulle piante a due mesi dal trapianto	106
10.2. Analisi del suolo e dei vegetali	108
10.2.1. Analisi della presenza di <i>Trichoderma</i> nel suolo	108
10.2.1.1. Materiali e Metodi	108
10.2.1.2. Risultati	108
10.2.2. Analisi chimico-fisica del suolo	110
10.2.2.1. Materiali e Metodi	110
10.2.2.2. Risultati	110
10.2.3. Analisi del materiale vegetale	113
10.2.3.1. Materiali e Metodi	113
10.2.3.2. Risultati	113
10.3. Discussione	116
11. Valutazione dell'effetto del sottoprodotto OP50 colonizzato da <i>Trichoderma</i> T22 sulla promozione della crescita di pomodoro in campo	120
11.1. Materiali e metodi	120
11.2. Risultati	120
11.3. Discussione	121
12. Impianto pilota per trasformazione della sansa di oliva nell'Azienda Santa Rita s.r.l.	122
12.1. Materiali e metodi	122
12.2. Risultati	123
12.3. Implementazione dell'impianto di fermentazione a scala aziendale	126
12.4. Discussione	131
13. Conclusioni	132
14. Bibliografia	137

Elenco tabelle e figure:

- Tabella 1. Rifiuti agroalimentari prodotti in tonnellate (t) in Europa e nei paesi membri nelle varie fasi della filiera agroalimentare.
- Tabella 2. Identità dei funghi isolati dal suolo del sito contaminato tramite identificazione molecolare PCR, amplificando e sequenziando il frammento del ITS1-ITS4. Identità del fungo, del genere o della specie, basata sulla % di query cover e la % simultaneità di identificazione. L'ultima colonna indica il livello di contaminazione da Pb del suolo da cui è stato effettuato l'isolamento 1: basso ($Pb < 1$ g/kg di suolo); 2: medio ($1 < Pb < 10$ g/kg); 3: alto ($Pb > 10$ g/kg di suolo).
- Tabella 3. Percentuale di riduzione del peso secco della biomassa dei funghi testati in coltura liquida arricchita con $CuSO_4$ a varie concentrazioni (0,3mM, 1,5 mM 3mM) rispetto al controllo PDB non arricchito dopo 14 gg di allevamento.
- Tabella 4. Percentuale di riduzione in $CuSO_4$ dopo 14 gg di crescita dei funghi selezionati nei substrati contenenti $CuSO_4$ alle concentrazioni tra 0,15 mM a 3 mM.
- Tabella 5. Effetti di *Trichoderma* T22 e E45 sull'altezza del fusto, larghezza e lunghezza delle foglie di piante di fagiolo.
- Tabella 6. Analisi chimico-fisiche dei sottoprodotti (medie e dev. std.) trattati con *Trichoderma* T22, T25, E45 e controllo con solo PDB (NoF). Moisture: umidità %; OM: sostanza organica %; Ash: ceneri %; N tot: azoto totale (g/kg); N- NH4: azoto ammoniacale (g/kg); pH; P tot: fosforo totale (g/kg).
- Tabella 7. Percentuale di semi di pomodoro germinati su substrati contenenti WA arricchito con i filtrati di OP50 (range 1-20 % v/v) non inoculato con *Trichoderma*. Il CNT è composto da solo WA.
- Tabella 8. % di semi germinati sui substrati contenenti diversa percentuale del surnatante di OP50 precedentemente inoculato con uno dei 10 diversi ceppi *Trichoderma* o non inoculato (NoF).
- Tabella 9. Altezza del fusto di piante di pomodoro cresciute su suolo arricchito con SF e RS in un range dal 5 al 10% (p/p) e OP in un range dal 5 al 50% (p/p).
- Tabella 10. Trattamenti del terreno con i sottoprodotti di Girasole (SF) e Colza (RS) all'1% e al 4% (p/p) pretrattati o meno con i ceppi di *Trichoderma* T22, T25, E45 o con le sospensioni conidiche degli stessi ceppi. CNT: controllo (No *Trichoderma*, No sottoprodotto).
- Tabella 11. Peso secco (g) della parte epigea delle piante cresciute su suolo inoculato con le sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Tabella 12. Peso secco (g) della parte epigea delle piante cresciute su suolo inoculato con le sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Tabella 13. Peso secco (g) della parte ipogea delle piante cresciute su suolo inoculato con le sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con RS all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Tabella 14. Peso secco (g) della parte ipogea delle piante cresciute su suolo inoculato con le sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Tabella 15. Risultati delle analisi chimico fisiche del suolo all'inizio dell'esperimento. Tessitura (% sabbia grossa e fine, limo, argilla); Fosforo (P mg/kg); Azoto totale (N tot. g/kg); pH; Carbonato di calcio (Ca-carbonato %); Capacità di scambio cationico (CEC meq/100 g).
- Tabella 16. Azoto totale (N tot. g/kg) nel suolo inoculato con *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF precedentemente trattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Tabella 17. Azoto totale (N tot. g/kg) nel suolo inoculato con le sospensioni conidiche dei ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF precedentemente trattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.

- Figura 1. Ripartizione percentuale dei rifiuti nei vari settori dell'industria di trasformazione agroalimentare.
- Figura 2. La gerarchia dello scarto o la "waste hierarchy".
- Figura 3. Diagramma decisionale per l'assegnazione del termine "prodotto", "sottoprodotto" o "rifiuto" al materiale di scarto industriale, redatto sulla base della legislazione in vigore.
- Figura 4. Prodotti e composti chimici che possono essere ottenuti in una tradizionale raffineria petrolifera e in una bioraffineria.
- Figura 5. Concetto di bioraffineria.
- Figura 6. Possibili applicazioni di *Trichoderma* per il biorimedio degli inquinanti e la promozione della crescita delle piante. Vengono considerati la selezione genetica e lo sviluppo di piante transgeniche, attraverso l'uso di geni di *Trichoderma*, come strategie per aumentare l'efficacia del biorimedio.
- Figura 7. Mappatura delle posizioni dei campionamenti del suolo nel sito contaminato e il relativo livello di contaminazione da piombo (Pb). Il livello di contaminazione da Pb è indicato con i punti in verde per un livello basso (Pb < 1 g/kg suolo); in rosso per un livello medio (1 < Pb < 10 g/kg) e in nero per un livello alto (Pb >10 g/kg). I campioni di suolo analizzati nel presente studio sono stati prelevati all'interno dei riquadri in rosso 1, 2 e 3, in rappresentanza di ciascuno dei tre diversi livelli di contaminazione.
- Figura 8. Crescita dei ceppi fungini in substrato di PDA contenente CuSO₄ alle concentrazioni di: 0 (CNT), 0.1 mM, 0.3 mM, 1,5 mM e 3 mM. I funghi testati sono: (A) *Strachybotrys chlorohalonata* E22, *Aspergillus niger* E62, *Trichoderma harzianum* E45; (B) *Clonostachys rosea* E43, *Aspergillus versicolor* E80, *Aspergillus niger* E17; C. *Talaromyces pinophilus* E2; *Penicillium chrysogenum* E16.
- Figura 9. Attività di biocontrollo di *C. rosae* E43 (colonia bianca sulla destra) contro i fitopatogeni terricoli (*F. solani*, *S. sclerotium* e *R. solani*) e fogliari (*A. alternata* e *B. cinerea*) in saggi in vitro di competizione diretta in piastra.
- Figura 10. Attività di biocontrollo di *T. harzianum* E45 (colonia verde sulla destra) contro i fitopatogeni terricoli (*F. solani*, *S. sclerotium* e *R. solani*) e fogliari (*A. alternata* e *B. cinerea*) in saggi in vitro di competizione diretta in piastra.
- Figura 11. Velocità di crescita radiale delle specie fungine selezionate su substrato solido contenente OP al 50%, espressa in cm/giorno. I funghi sono: *Talaromyces pinophilus* (E2), *A. fumigatus* (E15), *C. rosae* (E45), *B. bassiana* (E44), *S. birkimanni* (E74), *A. niger* (E62), *T. afroharzianum* T22, *T. harzianum* (E36, E45, T34, E36 e M10), *T. asperellum* (KV906, T25), *T. virens* (GV41), *T. atroviride* (HK2 e HK4).
- Figura 12. Numero delle Unità Formanti Colonie (CFU) dei ceppi *Trichoderma* spp. coltivati in substrato liquido contenente OP50 (sansa di oliva diluita al 50% in acqua, p/v) dopo 1 e 2 settimane di crescita.
- Figura 13. Velocità di crescita radiale (cm/giorno) di *Trichoderma* su substrato solido contenente OP a varie concentrazioni (0,5-50%); i controlli senza OP sono CNT (MM) e PDA. I ceppi di *Trichoderma* sono: (A) T25; (B) E45; (C) T22; e (D) T34.
- Figura 14. Velocità di crescita radiale (cm/giorno) dei *Trichoderma* su substrato solido contenente SF a varie concentrazioni (da 0,5-50%); i controlli No SF sono CNT (MM) e PDA. I ceppi di *Trichoderma* sono: (A) T25; (B) E45; (C) T22; e (D) T34.
- Figura 15. Velocità di crescita radiale (cm/giorno) dei *Trichoderma* su substrato solido contenente RS a varie concentrazioni (0,5-50%); i controlli No RS sono CNT (MM) e PDA. I ceppi di *Trichoderma* sono: (A) T25; (B) E45; (C) T22; e (D) T34.
- Figura 16. Crescita del ceppo di *Trichoderma* T25 sui substrati solidi contenenti i sottoprodotti RS e SF a varie concentrazioni.
- Figura 17. Inoculo di *Trichoderma* sui sottoprodotti. Lo starter dalla coltura è stato inoculato sui sottoprodotti in piastre Petri di 150 mm Ø e mescolato omogeneamente con il substrato. Le colture sono state incubate a 25°C per 48 ore in SSF.

- Figura 18. Fermentazione in stato solido di SF (Foto A) e RS (Foto B) 48 ore dopo l'inoculazione con i ceppi di *T. harzianum* E45 e *T. afroharzianum* T22.
- Figura 19. Altezza delle plantule su substrato contenente WA (CNT) e il filtrato OP50 in un range dall'1% al 20%, senza *Trichoderma*.
- Figura 20. Effetto sulla crescita in altezza delle plantule (cm) dei substrati contenenti il filtrato del sottoprodotto OP50 inoculato con 10 diversi ceppi *Trichoderma* o in assenza di *Trichoderma* (NoF) e successivamente diluito all'5% (v/v) in WA.
- Il controllo è WA solo, no OP50 e no fungo (CNT).
- Figura 21. Effetto sulla crescita in altezza delle plantule (cm) dei substrati contenenti il filtrato del sottoprodotto OP50 inoculato con 10 diversi ceppi *Trichoderma* o in assenza di *Trichoderma* (NoF) e successivamente diluito all'5% (v/v) in WA. Il controllo è WA solo, no OP50 e no fungo (CNT).
- Figura 22. Schema della prova di germinazione e crescita *in vitro* di pomodoro trattato con i surnatanti provenienti dalla crescita in coltura liquida di *Trichoderma* (T22, E45, T34, T25) in MM arricchito con i sottoprodotti OP, SF o RS o con saccarosio (CNT) o in assenza del fungo (NoF). 10 semi sono stati posti sui dischi di filtro di carta imbibiti con il surnatante, poggiati sul M&S agarizzato.
- Figura 23. Altezza delle plantule (cm) trattate con i surnatanti dei sottoprodotti SF (A) e RS (B) senza *Trichoderma* (NoF) o con i ceppi E45, T34, T25 e T22. Il controllo (CNT) è costituito da MM.
- Figura 24. Altezza del fusto (A) e peso secco della parte epigea (B) di piante di pomodoro fertilizzate con SF in un range dallo 0,5 al 4%. Il CNT è costituito da solo suolo.
- Figura 25. Altezza del fusto (cm) (A) e peso secco (g) (B) della parte epigea di piante di pomodoro fertilizzate con RS in un range dallo 0,5 al 4%. Il CNT è costituito da solo suolo.
- Figura 26. Altezza del fusto (grafico A) e peso secco della parte epigea (grafico B) di piante di pomodoro fertilizzate con OP in un range dallo 0,5 al 4%.
- Figura 27. Altezza dei fusti (cm) (A) e peso secco (g) (B) della parte epigea delle piante il cui suolo è stato arricchito con i sottoprodotti SF e RS al 1% e al 4% (peso/peso).
- Figura 28. Lunghezza delle radici (cm) (A) e peso secco delle radici (g) (B) il cui suolo è stato fertilizzato con i sottoprodotti SF e RS al 1% e al 4% (peso/peso).
- Figura 29. Procedura del saggio *in vivo* con i sottoprodotti pretrattati con *Trichoderma* e usati come ammendanti al suolo all'1 % e al 4 % per valutare gli effetti sulla crescita delle piante.
- Figura 30. Altezza delle piante (cm) cresciute su suolo inoculato con sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Figura 31. Altezza delle piante (cm) cresciute su suolo inoculato con sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Figura 32. Altezza delle piante (cm) cresciute su suolo inoculato con sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Figura 33. Altezza delle piante (cm) cresciute su suolo inoculato con sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con RS all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Figura 34. Lunghezza delle radici (cm) delle piante cresciute su suolo inoculato con sospensioni conidiche dei ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Figura 35. Lunghezza delle radici (cm) delle piante cresciute su suolo inoculato con *Trichoderma* (E45, T25, T22) o fertilizzato con RS all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non fertilizzato e non inoculato.

- Figura 36. Effetti sulla crescita delle piante di pomodoro di SF 4% inoculato con *Trichoderma* (E45, T25, T22); A) effetto sulla parte epigea (pianta a sx SF+Tricho e pianta a dx solo SF, no Tricho) e ipogea (SF 4%; SF 4% T25; SF4% E45).
- Figura 37. Spad rilevato su piante cresciute su suolo inoculato con sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o allevate in suolo arricchito con SF all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Figura 38. Spad rilevato su piante cresciute su suolo inoculato con le sospensioni conidiche dei ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF 1% o SF 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Figura 39. CFU del suolo dell'esperimento ad un mese dal trapianto. La foto mostra le Piastre Petri per la conta delle CFU del suolo inoculato con le sospensioni conidiche dei ceppi di *Trichoderma* E45 e T25 (No by-product) o arricchito con RS e SF, all'1% e al 4%, pretrattati o meno (No Fungi) con i due ceppi di *Trichoderma*. Il CNT (No Fungi, No by-product) è costituito da suolo non trattato.
- Figura 40. CFU di *Trichoderma* spp alla fine dell'esperimento rilevate sul suolo inoculato con le sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22), arricchito con RS e SF all'1% o al 4%, pretrattati o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non fertilizzato e non inoculato.
- Figura 41. Fosforo assimilabile (P mg/kg) nel suolo inoculato con sospensioni conidiche dei ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con RS (A) o SF (B) precedentemente trattati o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Figura 42. Azoto totale (N tot. g/kg) nella parte epigea delle piante cresciute su suolo inoculato con *Trichoderma* (E45, T25, T22, T25) o arricchito con SF precedentemente trattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Figura 43. Fosforo assimilabile (P g/kg) nella parte epigea delle piante inoculate con sospensioni conidiche dei ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o cresciute su suolo arricchito con SF precedentemente trattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Figura 44. Azoto totale (N tot. g/kg) nella parte epigea delle piante inoculate con sospensioni conidiche dei ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o cresciute su suolo arricchito con RS precedentemente trattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Figura 45. Fosforo assimilabile (P g/kg) nella parte epigea delle piante inoculate con le sospensioni conidiche di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o cresciute su suolo arricchito con RS precedentemente trattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*.
- Figura 46. Impianto pilota presso l'azienda Santa Rita.
- Figura 47 Numero di spore/ml di *T. afroharzianum* nei campioni di brodo fermentato raccolti durante la I fermentazione.
- Figura 48. Determinazione delle CFU di *T. afroharzianum*, presenti nei campioni di brodo fermentato raccolti durante la II fermentazione.
- Figura 49 Batch da 50 l per la preparazione dello Starter microbico.
- Figura 50 Particolare del batch da 50 l.
- Figura 51 Agitatore (A) interno al fermentatore di 500 l, e il rubinetto inferiore del batch per l'uscita del prodotto liquido alla fine della fermentazione (B).
- Figura 52 Schematizzazione dell'impianto di fermentazione a scala aziendale. E' prevista la preparazione di un Pre-starter del microrganismo in beuta e di uno Starter nel batch da 50 l. Nel batch da 500 viene effettuata la fermentazione del sottoprodotto con *Trichoderma* per l'ottenimento di una formulazione liquida, utilizzabile direttamente in campo. Si può procedere alla separazione tramite una centrifuga dei prodotti di interesse.
- Figura 53 Schematizzazione del diagramma di flusso del processo di fermentazione.
- Figura 54 Ciclo del processo per il biorisanamento e la valorizzazione dei sottoprodotti oleari provenienti dall'estrazione dell'olio di oliva, colze e girasole tramite l'uso di *Trichoderma*.

Abstract

La filiera agro-alimentare è uno dei settori produttivi maggiormente responsabile delle problematiche che riguardano gli scarti di lavorazione che costituiscono un rischio potenziale per la salute dell'uomo e dell'ambiente, con il rilascio di inquinanti nelle acque e nel suolo e l'emissione di gas ad effetto serra. Lo smaltimento di tali rifiuti rappresenta un ingente costo economico per i produttori. Invece, gli scarti agroalimentari possono essere fonti economiche per nuovi prodotti o sostanze in molteplici settori produttivi, con benefici aggiuntivi sociali ed ambientali. Lo sviluppo di nuovi sistemi biotecnologici di conversione dei rifiuti rientra nell'orientamento di economia circolare, ampiamente sostenuto dalle politiche Europee e mondiali per allentare la pressione sulle risorse naturali e diminuire le problematiche legate allo smaltimento.

Questo Dottorato di Ricerca (Ciclo XXXII) è stato svolto nell'ambito dei "Dottorati Innovativi con caratterizzazione industriale (Asse I "Capitale Umano", Azione I.1 del Programma Operativo Nazionale "Ricerca e Innovazione 2014-2020", Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca), che ha previsto lo svolgimento di periodi di studio e ricerca presso un'impresa di trasformazione di prodotti agroalimentari, l'Azienda Santa Rita s.r.l. (Vibo Valentia, VV) e all'estero per una collaborazione scientifica nel laboratorio del Prof. Enrique Monte (Università di Salamanca, Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias, CIALE, Salamanca, Spagna).

L'attività di ricerca si è stata focalizzata sulla messa a punto di un processo biotecnologico per il biorisanamento e la valorizzazione dei sottoprodotti della filiera agro-alimentare olearia, provenienti dall'estrazione degli oli da oliva (OP), da colza (RS) e da girasole (SF), attraverso l'uso dei microrganismi benefici, ed in particolare di *Trichoderma*. Lo scopo della tesi è stato lo sviluppo di una biotecnologia microbica, potenzialmente applicabile su scala aziendale di piccole dimensioni, mirata alla mitigazione della fitotossicità dei sottoprodotti oleari, al loro impiego come substrati per la crescita dei microrganismi benefici per la produzione di integratori del suolo, quali ammendanti o biostimolanti, da utilizzare per la fertilizzazione-nutrizione e promozione della crescita delle piante.

Nella fase iniziale, l'isolamento e l'identificazione di ceppi fungini da un suolo contaminato e successivi saggi di biocontrollo e promozione della crescita hanno permesso di selezionare i microrganismi più adatti per una potenziale applicazione in ambito agricolo come biopesticidi e biostimolanti delle colture e per biorisanamento di matrici

contaminate. Tra i 45 ceppi fungini isolati e identificati, il ceppo di *Trichoderma harzianum* E45 ha mostrato un'elevata resistenza e capacità di rimozione del rame, ha promosso la crescita e lo sviluppo di piante di pomodoro, ed è risultato efficace nel biocontrollo di un'ampia gamma di patogeni terricoli e fogliari.

Successivamente, sono state individuate le condizioni ottimali per l'allevamento di *Trichoderma* su substrati di crescita liquidi e/o solidi contenenti i sottoprodotti oleari. I ceppi di *T. afroharzianum* T22, *T. harzianum* T34 e E45 e di *T. asperellum* T25 sono stati selezionati come i più promettenti per la loro capacità di crescita su OP, RS e SF. L'integrazione di basse concentrazioni dei sottoprodotti (0,5 - 10%) ha contribuito ad un rapido sviluppo dei ceppi, raggiungendo performance paragonabili o superiori a quelle ottenute sui substrati di crescita convenzionali commerciali. La SSF (fermentazione in stato solido) direttamente sui sottoprodotti SF e RS, ha favorito un'abbondante crescita e sporulazione dei ceppi di *Trichoderma* selezionati in 48 h.

Sono stati allestiti diversi saggi *in vitro* ed *in vivo* con semi e piante di pomodoro al fine di valutare l'effetto dei sottoprodotti oleari pretrattati in SSF o in fermentazione liquida sulla crescita delle piante. Il pretrattamento di SF o RS in SSF con *Trichoderma* ha potenziato gli effetti positivi dei sottoprodotti nel promuovere la crescita delle piante quando aggiunti alla concentrazione dell'1% del peso del suolo, le combinazioni di SF o RS con il ceppo T22 sono risultati di essere i trattamenti più efficaci. I sottoprodotti hanno favorito inoltre lo sviluppo e la persistenza di *Trichoderma* nel suolo, potenziandone gli effetti benefici diretti ed indiretti sulla pianta. Inoltre, la crescita di *Trichoderma* sui sottoprodotti, sia in liquido che in SSF, ha determinato la diminuzione degli effetti fitotossici di SF e RS.

Infine, è stato sviluppato ed implementato un impianto per la fermentazione liquida dei microbi benefici, quale *Trichoderma* spp., sul sottoprodotto OP a piccola scala aziendale presso Santa Rita s.r.l. È stata dimostrata la possibilità di integrare, a valle del processo di trasformazione dei prodotti agroalimentari, strategie innovative che rendono le aziende autonome di processare gli scarti della propria filiera, al fine di ottenere un bioprodotto liquido prontamente applicabile come ammendante o biostimolante in diversi sistemi colturali.

Il lavoro di questa tesi serve come base scientifica per ricerche future che potrebbero permettere il miglioramento del processo di valorizzazione dei sottoprodotti agroalimentari, mirate a: identificare il modo d'azione, classificare, e purificare le sostanze

da *Trichoderma* (ad es. enzimi) che sono coinvolti nei processi di biodegradazione e nel biorisanamento; caratterizzare dei composti biostimolanti per la crescita delle piante; e provare i trattamenti di bioformulati nuovi su colture diverse, etc. Infine, l'indagine ha permesso lo sviluppo di biotecnologie che rientrano sia nel concetto dell'economia circolare, con il riciclo degli scarti per l'ottenimento di prodotti dall'elevato valore aggiunto, che nel concetto di agricoltura sostenibile, con l'utilizzo dei prodotti biologici innovativi, non chimici, per la protezione e produzione delle colture.

Abstract (EN)

The agro-food supply chain is one of the production sectors that is most responsible for producing problems regarding industrial wastes that are a potential risk to human and environment health due to the release of pollutants in water and soil, and the emission of greenhouse gases. The disposal of such wastes constitutes an economic cost to producers. Instead, the reuse of agri-food waste can be an economic resource for new products or substances useful in a multitude of manufacturing sectors, generating additional social and environmental benefits. The development of new biotechnological waste conversion systems enters as part of the orientation for the circular economy, widely supported by European and global policies to reduce the burden on natural resources and reduce the problems related to waste disposal.

This Research Doctorate (Cycle XXXII) was carried out as part of the "Dottorati Innovativi con caratterizzazione industriale" (Asse I "Capitale Umano", Azione I.1 del Programma Operativo Nazionale "Ricerca e Innovazione 2014-2020", Ministry of University Education and Research), that has provided for the execution of study and research periods at an agri-food processing company, Azienda Santa Rita s.r.l. (Vibo Valentia, VV) , and abroad in a scientific collaboration at the laboratory of Prof. Enrique Monte (University of Salamanca, Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias, CIALE, Salamanca, Spain).

The research activity focused on the development of a biotechnological process for the biosanification and enhancement of the by-products from agri-food oil processing, produced from the extraction of olive (OP), rapeseed (RS) and sunflower (SF), with the use of beneficial microorganisms, in particular *Trichoderma* species. The main aim of the thesis was the development of a microbial biotechnology, potentially applicable on a small company scale, to reduce the phytotoxicity of oil by-products, using them as substrates for the growth of beneficial microorganisms, then to produce soil integrator/enhancer products, such as amendments or biostimulants, for use in the fertilization-nutrition and promotion of plant growth.

In the initial phase, fungal strains were isolated from contaminated soils and identified, then subsequent biocontrol and growth promotion assays allowed the selection of the most suitable microorganisms for potential agricultural applications, such as biopesticides and biostimulants of crops, through the bioremediation of agri-food wastes. Among the 45 fungal strains isolated and identified, the *Trichoderma harzianum* strain E45 exhibited the highest resistance and capacity to remove copper, promoted the

growth and development of tomato plants, and was effective in biocontrol of a wide range of soil and foliar pathogens.

Subsequently, optimal conditions were identified for cultivating *Trichoderma* on liquid and/or solid growth substrates containing the oil by-products. Strains of *T. afroharzianum* T22, *T. harzianum* T34 and E45 and *T. asperellum* T25 were selected as the most promising *Trichoderma* for their ability to grow on OP, RS and SF. The integration of low concentrations of the by-products (0.5 - 10%) contributed to a rapid growth of the strains obtaining performances comparable or superior to that obtained on conventional commercial growth substrates. The SSF (solid state fermentation) directly on the SF and RS by-products, favored an abundant growth and sporulation of the selected *Trichoderma* strains in 48h.

Various *in vitro* and *in vivo* assays were conducted with tomato seeds and seedlings to evaluate the effect on plant growth of the oil by-products, when pretreated in SSF with the microorganisms or culture filtrates from *Trichoderma* grown on the by-products. In general, pretreatment of SF and RS in SSF with *Trichoderma* enhanced the positive effects on the development of the epigeal and hypogeal plant parts, in comparison to treatments containing only the by-products or fungi; among which, the combinations of SF or RS with strain T22 were found to be the most effective biostimulant treatments. The by-products also favored the development and persistence of *Trichoderma* in the soil, thus enhancing its direct and indirect beneficial effects on the plant. In addition, the culturing of *Trichoderma* on the by-products, both in liquid and in SSF, resulted in decreased phytotoxic effects when SF or RS were added to the soil at a high concentration of 4% (w/w soil).

Finally, a small scale pilot system was developed and implemented for the liquid fermentation of beneficial microbes, such *Trichoderma* spp., on the OP by-products produced on at the company Santa Rita s.r.l. This demonstrated the possibility of integrating, downstream from the transformation process of the agri-food products, innovative strategies that allow companies to be autonomous in managing the wastes from their own industrial processes, in order to obtain a liquid bioproduct ready for applications as a soil enhancer or biostimulant in different cultivation systems.

The work of this thesis serves as the scientific basis for future research that could improve the recycling of agrofood by-products processes by aiming studies to: identify the mode of action, classify and purify *Trichoderma* compounds (e.g. enzymes) that are involved in the biodegradation and bioremediation processes; characterize the

biostimulating compounds for plant growth; and test the new bioformulation treatments on different crops etc. Finally, the investigation has permitted the development of a process involving promising biotechnologies combining agri-food oil by-products with plant beneficial microbes that enters both in the concept of the circular economy with the recycling of wastes, to the generation of value-added products, that enters in the concept of sustainable agriculture with the use of innovative non-chemical biological products for crop protection and production.

1. Introduzione

A seguito dell'aumento della popolazione globale registrata nell'ultimo secolo, la necessità di incrementare le produzioni agricole per garantire la sicurezza alimentare, ha portato progressivamente all'instaurarsi in agricoltura di tecniche colturali caratterizzate da un uso intensivo di fertilizzanti e fitofarmaci di sintesi, causando un notevole impatto a discapito delle risorse ambientali e della salute del pianeta (Godfrey *et al.*, 2010; Ray *et al.*, 2013). Lo sviluppo sostenibile costituisce oggi la principale sfida delle politiche globali. La riduzione, il riciclo e il riutilizzo dei rifiuti giocano un ruolo chiave nell'ottica di uno sviluppo economico volto alla salvaguardia della salute dell'uomo e dell'ambiente. In questo contesto, la riduzione dei rifiuti della filiera agroalimentare costituisce un obiettivo prioritario a livello mondiale per garantire la sostenibilità dell'agroecosistema, allentare la pressione sulle risorse naturali e diminuire le emissioni di gas ad effetto serra e di sostanze inquinanti tossiche per la salute dell'uomo e dell'ambiente (FAO, 2019). L'attuale tendenza delle politiche comunitarie (ad es. EU, Green Deal) comprende l'adozione di un modello di sviluppo basato sull'economia circolare che presuppone nuove modalità di produzione e di consumo volte alla valorizzazione dei prodotti, dei materiali e delle risorse, riducendo al minimo la produzione di rifiuti (EC, 2015). Gli scarti della filiera agroalimentare possono essere fonti economiche di prodotti o sostanze utilizzabili in molteplici settori produttivi che spaziano dall'agricoltura, al settore energetico e delle costruzioni, all'industria alimentare, cosmetica o farmaceutica (Mohan *et al.*, 2016; Parajuli *et al.*, 2019; Maina *et al.*, 2017; Castilla-Archilla *et al.*, 2019). La trasformazione di tali scarti in sottoprodotti o coprodotti, intesi come materia prima da utilizzare in un processo produttivo di bioraffineria, permette di diminuire le problematiche legate allo smaltimento e di aumentare l'efficienza della filiera agroalimentare (Mohan *et al.*, 2016). In quest'ottica, gli scarti possono essere utilizzati per la produzione di ammendanti, biofertilizzanti, bioformulati e biostimolanti al fine di favorire il reintegro dei nutrienti, la fertilità del suolo e una maggiore produttività delle colture, riducendo l'apporto di input esterni quali fertilizzanti chimici e pesticidi (Xu *et al.*, 2018; De Corato *et al.*, 2018; Puglia *et al.*, 2021; Diacono *et al.*, 2019).

Il riutilizzo dei rifiuti organici dalle coltivazioni come ammendanti è storicamente una pratica comune in agricoltura. Tuttavia, quando la produzione locale di tali rifiuti supera la capacità di stoccaggio e di applicazione locale, tale pratica può trasformarsi in

uno smaltimento incauto e inadeguato generando danni ambientali associati all'inquinamento delle matrici ambientali, sovra-fertilizzazione, fitotossicità, emissione di gas ad effetto serra e infestazione di agenti patogeni (Unger, 1994). Per evitare queste problematiche, è necessario trovare metodi alternativi che favoriscano il reintegro degli scarti nell'ambito della produzione agricola e che contribuiscano a trasformare tali materiali in prodotti dall'elevato valore aggiunto. I microrganismi benefici costituiscono uno strumento interessante per la degradazione, il riciclo e il biorisanamento dei rifiuti (Van der Geize *et Dijkhuizen*, 2004; Thyagi *et al.*, 2011; Khomenkov *et al.*, 2008) e sono attualmente utilizzati in agricoltura come metodo di lotta biologica e come promotori della crescita delle piante (Woo *et Lorito*, 2007; Woo *et Pepe*, 2018). Potenzialmente, la combinazione dei rifiuti provenienti dalla filiera agroalimentare con i microrganismi può contribuire a ridurre la pericolosità di eventuali sostanze tossiche e aprire interessanti prospettive per lo sviluppo di prodotti per la difesa e di biostimolanti per promuovere la produttività delle colture e la fertilità del suolo in modo ecosostenibile. Pertanto, la trasformazione degli scarti in biostimolanti, biofertilizzanti e bioformulati attraverso l'utilizzo sinergico dei microrganismi benefici costituisce un metodo innovativo per prevenire i rischi ambientali causati dallo smaltimento e ridurre l'utilizzo di sostanze chimiche di sintesi in agricoltura, traducendosi in una soluzione rispettosa dell'ambiente per la valorizzazione dell'intera filiera agroalimentare.

1.1. Gli scarti della filiera agroalimentare

Si prevede, che la domanda di prodotti agricoli aumenterà del 35-50% nel 2050 dovuto alla crescita della popolazione e del reddito (FAO, 2019). Soddisfare questa richiesta metterà a dura prova le risorse naturali e contribuirà ad aumentare i danni ambientali, quali il cambiamento climatico, il degrado del suolo, la scarsità e l'inquinamento delle risorse idriche e la perdita di biodiversità.

La filiera agroalimentare è sempre più lunga e complessa a causa della maggiore domanda di prodotti processati, di varietà e convenienza dei prodotti e della richiesta di standard sempre più elevati di qualità e sicurezza. Il crescente spostamento della popolazione dalle campagne ai centri urbani, aumenta le distanze geografiche che separano il luogo di produzione da quello di consumo rendendo più complicata l'offerta alimentare e la distribuzione dei prodotti. Tali fattori, insieme ai processi di trasformazione,

hanno portato ad un'elevata produzione di rifiuti provenienti della filiera agroalimentare, aumentando i rischi per la salute dell'uomo e dell'ambiente ad essi correlati.

Non esiste una definizione semplice di "rifiuti agroalimentari" perché il termine è definito in modo diverso, secondo l'uso, dalle istituzioni e dalla letteratura specializzata. La mancanza di una definizione univoca complica non solo la raccolta di dati omogenei e confrontabili, ma anche l'impiego di azioni risolutive e condivise a larga scala (FAO, 2019). In generale, la definizione di "rifiuto", contenuta nell'articolo 3 della Waste Framework Directive (Direttiva 2008/98/EC) è: "qualsiasi sostanza od oggetto di cui il detentore si disfi o abbia l'intenzione o l'obbligo di disfarsi". In particolare, i rifiuti della filiera agroalimentare rientrano nella definizione più generale di "biomassa", citata nella Direttiva Europea 2009/28/EC come: "la frazione biodegradabile di prodotti, rifiuti e residui di origine biologica provenienti dall'agricoltura, silvicoltura e industrie correlate, comprese la pesca e l'acquacoltura, nonché la frazione biodegradabile dei rifiuti industriali e urbani."

I rifiuti della filiera agroalimentare provengono dalla produzione agricola, e in più, includono i rifiuti alimentari e di cucina prodotti da nuclei domestici, servizi di ristorazione e punti vendita al dettaglio nonché i rifiuti prodotti dagli impianti dell'industria di trasformazione agroalimentare e dalla distribuzione. Tali rifiuti organici sono inclusi nei codici europei dei rifiuti CER 200108 (prodotti non commercializzabili come sottoprodotti vegetali e di frutta; scarti alimentari come carne, pesce, pane, uova, formaggi, pasticceria, fondi di caffè, bustine di tè, ecc.) e EWC 200201 che comprendono gli avanzi di lavorazione di ortaggi, potature, talee, scarti di giardino, ecc.

Dalla letteratura è evidente che il termine di rifiuto agroalimentare è strettamente vincolato alla concezione di spreco alimentare. La distinzione tra "food losses" e "food waste" proposta dalla FAO (FAO, 2019) indica come "food losses" «le perdite alimentari che si riscontrano durante le fasi di produzione agricola, post-raccolto e trasformazione degli alimenti», mentre i "food waste" sono «gli sprechi di cibo che si verificano nell'ultima parte della catena alimentare (distribuzione, vendita e consumo finale)». I primi dipendono da limiti logistici e infrastrutturali, i secondi perlopiù da fattori comportamentali. Possiamo ulteriormente suddividere i rifiuti agroalimentari sulla base delle fasi della filiera agroalimentare da cui derivano (FAO, 2019):

- Produzione: tali residui includono gli scarti della coltivazione, non commercializzabili come foglie, potature, etc. In questa fase i rifiuti possono generarsi in campo per il deterioramento dei prodotti da commercializzare, a causa

ad esempio di condizioni climatiche sfavorevoli o infestazioni delle colture; nel momento del raccolto i rifiuti possono essere causati da inefficienze e anomalie nella raccolta, da difetti estetici dei prodotti o da esigenze e standard di mercato che ne impediscano la raccolta; nella fase successiva alla raccolta, i rifiuti possono essere causati da problemi di conservazione e contaminazione.

- **Trasformazione:** in questa fase i rifiuti derivano dal processamento e trasformazione dei prodotti alimentari e possono includere scarti dei processi industriali, eliminazione di prodotti sub-standard, perdite, etc.
- **Distribuzione:** i rifiuti agroalimentari prodotti in questa fase possono avere origine nella distribuzione all'ingrosso e al dettaglio e in tutti i food services (ristoranti, mense, bar, etc.).
- **Consumo:** in questa fase, quella del consumo finale, i rifiuti agroalimentari comprendono gli scarti derivanti dalla preparazione dei pasti nelle famiglie o da alimenti che vengono eliminati perché scaduti o in eccesso.

Le stime del volume globale di perdite e sprechi alimentari sono imprecise e inconfrontabili, complicate da una disponibilità di dati limitata ed eterogenea, per la mancanza di una definizione univoca e di metodi di raccolta dati e analisi standardizzati. Un'analisi che riguarda a livello globale tutte le fasi della filiera agroalimentare è stata realizzata dall' Istituto Svedese per l'alimentazione e la biotecnologia dalla FAO e risale al 2011 (FAO, 2011; FAO, 2019). Tale studio stima che globalmente, ogni anno, vengono prodotti ca. 1,3 miliardi di tonnellate di scarti agroalimentari costituiti principalmente da frutta e verdura, insieme a radici e tuberi, il cui ammontare, pari a 2,3 miliardi di tonnellate nel 2009/2010, è equivalente a più di metà dell'intera produzione annuale mondiale di cereali (FAO, 2011). E' stato evidenziato che i paesi industrializzati e quelli in via di sviluppo producono all'incirca la stessa quantità di scarti agroalimentari, rispettivamente pari a 670 e 630 milioni di tonnellate. I "food losses", ovvero gli scarti prodotti in fase di produzione, raccolta, post-raccolta e lavorazione, sono più rilevanti nei paesi in via di sviluppo a causa delle infrastrutture carenti. Invece, lo spreco di cibo o "food waste", che si verifica a livello di venditori e consumatori è un problema maggiormente riscontrato nei paesi industrializzati, che eliminano prodotti alimentari che potrebbero essere consumati.

A livello Europeo, uno studio realizzato dal DG Ambiente (EC, 2010) ha effettuato una stima dei rifiuti agroalimentari nelle fasi di trasformazione, distribuzione e consumo

finale per ogni Stato membro. Tali dati indicano che vengono eliminate circa 90 milioni di tonnellate di rifiuti agroalimentari all'anno, con la fase di consumo finale che incide per il 42% sul totale. Un altro studio interessante svolto analizzando il database dell'Eurostat stima la quantità di rifiuti agroalimentari generata dai paesi dell'Unione Europea ammonta complessivamente a circa 86 milioni di tonnellate l'anno (Scotto, 2012). Tali quantitativi sono diversamente distribuiti nelle fasi della filiera prima elencati variando da paese a paese, evidenziando che la maggior parte dei rifiuti agroalimentari derivano dalla fase di consumo finale (Tabella 1). Tra questi rifiuti, vi sono residui di verdure, frutta e carni che sarebbero potuti essere consumati ma sono buttati via (commestibili) e gli scarti derivanti dalla preparazione di cibi (non commestibili, ad esempio ossa o gusci di uova) (WRAP, 2009). La seconda fase che incide maggiormente sulla produzione degli scarti a livello europeo è la fase di produzione con i residui di coltivazione, prodotti non commercializzabili o giacenze. La fase di trasformazione è la terza fase ad incidere sulla produzione dei rifiuti a livello comunitario e durante la quale, secondo gli studi condotti dal WRAP nel Regno Unito (Waste and Resources Action Programme), vengono prodotti per il 70% rifiuti inevitabili, legati agli scarti fisiologici delle industrie agroalimentari (WRAP, 2008).

Relativamente a quest'ultima fase, uno studio condotto dalla Barilla Center for Food & Nutrition (BCFN, 2009) identifica i seguenti macrosettori nell'industria di trasformazione: lavorazione e conservazione di frutta e ortaggi; fabbricazione di oli e grassi vegetali e animali; industria lattiero casearia e di gelati; lavorazione di granaglie e prodotti amidacei; produzione, lavorazione e conservazione di carne e pesce; industria delle bevande; fabbricazione di altri prodotti alimentari. La maggior parte dei rifiuti prodotti in tale fase proviene dalla lavorazione e conservazione di frutta e ortaggi e dall'industria lattiero-casearia (Segré *et* Falasconi, 2011) (Figura 1). La composizione degli scarti prodotti durante la fase di trasformazione varia in maniera sostanziale sulla base del settore produttivo e quindi della materia prima trasformata. Ad esempio, dall'industria di trasformazione di cereali e legumi provengono grandi quantità di crusca e semi; l'industria lattiero-casearia produce rifiuti con composti organici complessi come zucchero, grassi e proteine; la lavorazione e trasformazione di frutta e ortaggi produce rifiuti nella forma di bucce, parti di frutta e verdura non commercializzabili, semi, melassa, bagassa, foglie, stocchi e acque reflue; e i residui delle industrie olearie sono prodotti dopo l'estrazione dell'olio dai semi e

sono noti come panelli o farine di estrazione (colza, girasole, etc.). Nel caso dell'olio di oliva i residui di trasformazione sono composti da sansa e acque di vegetazione (BCFN, 2012).

Tabella 1. Rifiuti agroalimentari prodotti in tonnellate (t)/anno in Europa, e nei paesi membri, nelle varie fasi della filiera agroalimentare (Fonte: Impatto ambientale dei rifiuti e degli sprechi agroalimentari in Europa e in Italia).

	<u>Produzione</u> (t/anno)	<u>Trasformazione</u> (t/anno)	<u>Distribuzione</u> (t/anno)	<u>Consumo finale</u> (t/anno)	<u>Totale</u> (t/anno)
EU	23.984.415	15.746.397	12.441.372	33.811.226	85.983.410
Austria	10.080	166.313	370.500	784.570	1.331.463
Belgio	101.689	397.725	409.127	960.330	1.868.871
Bulgaria	209.487	128.486	114.491	303.298	755.762
Cipro	12.514	0	15.452	50.700	78.666
Danimarca	2.147	243.777	45.676	494.914	786.514
Estonia	33.224	24.454	24.564	82.236	164.478
Finlandia	25.854	166.130	5.767	231.280	429.031
Francia	485.400	1.859.757	1.080.000	6.322.944	9.748.101
Germania	486.748	3.092.548	2.072.000	4.055.703	9.706.999
Grecia	0	174.837	0	424.498	599.335
Irlanda	0	88.613	0	292.326	380.939
Italia	1.867.216	1.894.325	263.645	3.326.060	7.351.246
Lettonia	34.064	28.534	4.092	63.142	129.832
Lituania	425.727	81.147	15.734	115.028	637.636
Lussemburgo	330	0	11.598	71.298	83.226
Malta	10	0	1.775	23.022	24.807
Paesi Bassi	2.501.840	785.779	1.324.257	1.837.599	6.449.475
Polonia	982.849	1.135.624	124.256	1.021.499	3.264.228
Portogallo	31.711	253.153	577.685	457.949	1.320.498
Regno Unito	182.856	2.591.001	3.366.000	8.300.000	14.439.857
Repubblica Ceca	150.884	245.267	48.799	265.173	710.123
Romania	15.030.916	315.498	25.199	706.785	16.078.398
Slovacchia	76.620	89.204	23.813	148.365	338.002
Slovenia	4.582	17.686	11.405	76.941	110.614
Spagna	1.104.651	1.659.056	1.906.017	2.108.615	6.778.339
Svezia	123.142	87.280	409.133	905.000	1.524.555
Ungheria	99.874	220.204	190.387	381.951	892.416

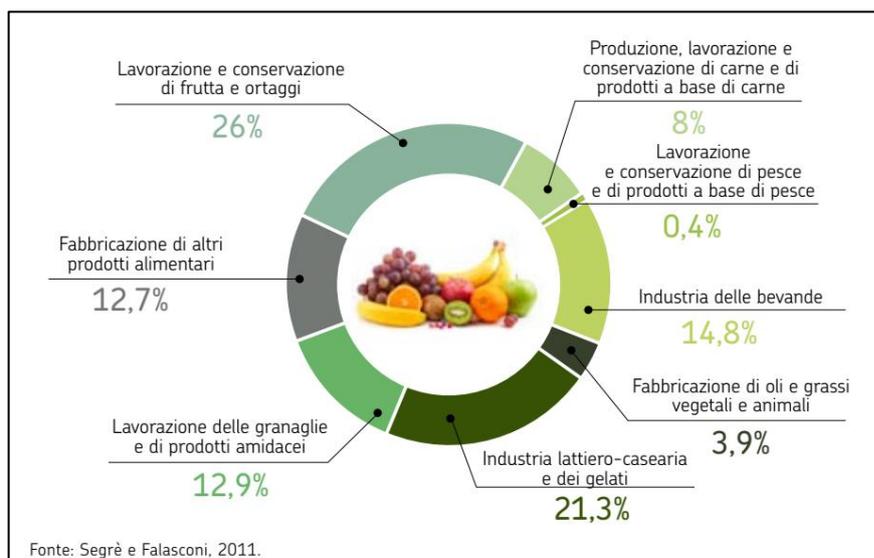


Figura 1. Ripartizione percentuale dei rifiuti nei vari settori dell'industria di trasformazione agroalimentare (Fonte: Segrè et Falasconi, 2011).

Tali flussi di rifiuti sono solo parzialmente valorizzati a diversi livelli di valore aggiunto (lasciati in campo, mangimi, compostaggio), mentre le frazioni maggiori vengono smaltite come rifiuti speciali, con costi rilevanti e impatti negativi sulla sostenibilità dell'industria alimentare (Gaur *et al.*, 2020; FAO, 2013; Rushton, 2003).

1.1.1. L'impatto ambientale dei rifiuti della filiera agroalimentare

I rifiuti ed effluenti che vengono prodotti durante la filiera alimentare spesso possono contenere un'elevata concentrazione composti tossici e metalli pesanti. Se non trattati e smaltiti correttamente tali rifiuti possono causare la dispersione dei contaminanti nelle matrici ambientali ed entrare nelle catene trofiche, generando enormi danni a discapito della biodiversità e della salute umana, con fenomeni quali bioaccumulo, biomagnificazione e eutrofizzazione delle acque (FAO, 2013; Rushton, 2003). A causa della mancanza di alternative valide dal punto di vista economico e soprattutto di mezzi tecnici per trasformarli in prodotti utili, spesso i rifiuti organici e gli effluenti provenienti dalla filiera agroalimentare non sono valorizzati e vengono destinati allo smaltimento. Lo smaltimento di tali rifiuti tramite i metodi tradizionali, tra cui l'incenerimento e lo smaltimento in discarica comportano ingenti costi economici e sociali, con importanti conseguenze sulla salute dell'uomo e dell'ambiente. L'incenerimento è una tecnica di

smaltimento ampiamente usata per ridurre il volume dei rifiuti e produrre energia elettrica e calore. Nonostante ciò, l'elevato contenuto di umidità dei rifiuti organici limita l'applicabilità di tale processo. Inoltre, l'incenerimento rilascia gas tossici come diossina, metalli pesanti, ossidi di azoto e di zolfo (NO_x, SO_x) che possono contaminare il suolo, l'aria e l'acqua e causare danni all'apparato respiratorio ed endocrino e cancro (Rushton, 2003; FAO, 2013).

I rifiuti organici biodegradabili costituiscono il rifiuto con il maggiore impatto ambientale e rischio per lo smaltimento in discarica dato che possono andare incontro ad autocombustione, aumentando il rischio di incendi, e causare la percolazione e la dispersione di sostanze tossiche nel suolo e nelle acque sotterranee. Per evitare questi rischi, le discariche richiedono una manutenzione continua e il trattamento delle acque reflue così come il recupero dei gas tossici. Infatti, la decomposizione dei materiali comporta oltre a cattivi odori, il rilascio di gas come metano, diossido di carbonio, diossina e benzene, che causano malattie polmonari e diversi tipi di cancro (El-Fadel *et al.*, 1997; Park *et Shin*, 2001). Oltre ad essere potenzialmente rischioso dal punto di vista ecologico, questo metodo di smaltimento consuma terra utile e risorse naturali ed economiche per contenere i rifiuti.

La perdita economica riguarda anche il potenziale riutilizzo dei rifiuti come materie prime seconde da reintegrare nei cicli produttivi per lo sviluppo di numerosi prodotti di alto valore aggiunto tramite processi chimici, enzimatici e microbiologici. Una parte importante dei rifiuti organici è infatti nutriente e biodegradabile, costituita da carboidrati, proteine, lipidi, fibre, vitamine, minerali, olio, cere, resine, pigmenti e acqua libera, ecc. (Velis, 2015) e potrebbe essere valorizzata. Questi possono potenzialmente essere convertiti o utilizzati per la produzione di numerosi prodotti nell'ambito farmaceutico, alimentare, agricolo, industriale ed energetico (Mohan *et al.*, 2016; Parajuli *et al.*, 2019; Maina *et al.*, 2017; Castilla-Archilla *et al.*, 2019). Tale approccio rientra nell'orientamento attualmente sostenuto dalle politiche Europee e mondiali di "economia circolare" che mira allo sviluppo nuovi sistemi tecnologici in cui il processo di conversione dei rifiuti e la produzione di bio-energia e bio-prodotti sono integrati tra loro all'interno un sistema di riciclo e di bioraffinazione ecologico ed efficiente. Quest'approccio è in contrapposizione con le modalità di smaltimento attuali che rispondono invece ad un modello economico lineare, che prevede l'estrazione delle risorse, la fabbricazione e il consumo dei prodotti e lo smaltimento di ciò che viene considerato rifiuto.

1.1.2. Aspetti legislativi per una gestione sostenibile dei rifiuti

La sostenibilità della filiera agroalimentare e la gestione dei rifiuti sono temi portanti delle politiche globali nell'ottica di una riduzione dell'impatto dell'uomo sulle risorse naturali e sull'ambiente e mirano a sviluppare nuove modalità di produzione e di consumo volte alla valorizzazione massima dei prodotti, dei materiali e delle risorse, relegando al minimo la produzione di rifiuti (Mohan *et al.*, 2016; Parajuli *et al.*, 2019; Maina *et al.*, 2017). Nell'approccio di economia circolare il prodotto al termine del suo "ciclo di vita" non diventa un rifiuto ma bensì una nuova risorsa: il materiale o i sottoprodotti derivanti dalla sua produzione e trasformazione vengono reintrodotti, laddove possibile, in un altro ciclo produttivo. Così i prodotti si possono riutilizzare generando ulteriore valore al prodotto stesso, estendendone il ciclo di vita e contribuendo a ridurre i rifiuti al minimo (Velis, 2015). La Commissione Europea definisce, nell'ambito dell'economia circolare, la bioeconomia come "la produzione di risorse biologiche rinnovabili e la conversione di queste risorse e flussi di rifiuti in prodotti a valore aggiunto, come alimenti, mangimi, prodotti a base biologica e bioenergia" (EC, 2012). La bioeconomia presuppone l'uso di materiali biologici come materia prima per la realizzazione dei prodotti, detti bioprodotti, ottenuta grazie a processi di tipo biotecnologico, biofisico e biochimico. Una delle principali categorie dei materiali in input della bioeconomia è rappresentata dai rifiuti organici destinati alla produzione di bioenergia, biomateriali e composti biochimici.

Il documento approvato della Commissione Europea nel dicembre 2015 - "L'anello mancante - Piano d'azione dell'Unione europea per l'economia circolare" (EC, 2015), contiene il piano di azione proposto come sostegno per uno sviluppo economico sostenibile. Tra i settori prioritari identificati, il piano d'azione richiede specifiche strategie mirate alla gestione dei rifiuti alimentari, richiamando gli obiettivi dell'Agenda 2030 per una riduzione almeno del 50% dei rifiuti alimentari nell'UE. Il piano d'azione identifica 54 azioni per garantire il passaggio verso una economia circolare, tra le quali meritano una particolare attenzione per l'importanza nell'ambito dei rifiuti della filiera alimentare, le seguenti:

- a) la progettazione ecocompatibile;
- b) la revisione della legislazione in materia di rifiuti;
- d) la gestione e prevenzione dello spreco degli alimenti e gestione dei rifiuti alimentari che rappresentano una delle principali cause dei gas climalteranti.

In maniera operativa tali azioni intendono inoltre stimolare il mercato delle materie prime secondarie e il riutilizzo dei prodotti a partire dalla fase di progettazione dello stesso e attraverso disposizioni legislative in grado di rendere tali materie prime seconde e sottoprodotti equiparabili alle materie prime “primarie”, in termini di commercializzazione, trasporto e utilizzazione, chiarendo meglio anche le norme di qualità che possano consentirne l’impiego a pari condizioni.

Nel 2018 la Commissione Europea, ribadisce nel documento “Una bioeconomia sostenibile per l’Europa: rafforzare il collegamento tra economia, società e ambiente” (EC, 2018) la necessità di una mobilitazione di portatori di interessi pubblici e privati a sostegno della ricerca e dell’applicazione di innovazioni nell’ambito della valorizzazione dei rifiuti della filiera agroalimentare per sostenere le iniziative esistenti e promuoverne di nuove. La Direttiva di riferimento nell’ambito della gestione circolare dei rifiuti è la Waste Framework Directive (Direttiva 2006/12/EC), modificata dalla Direttiva n. 2018/851/UE, che stabilisce una gerarchia di interventi sul tema dei rifiuti descritta sotto forma di triangolo invertito, un ordine di preferenza delle azioni per ridurre e trattare i rifiuti, in quantità sempre minore (Figura 2).



Figura 2. La gerarchia dello scarto o la “waste hierarchy” (Fonte: EU, 2006).

Si parte dalla fase di “*product non waste*”, con la prevenzione o riduzione degli acquisti ed i consumi dei prodotti alimentari in eccesso, per ridurre gli sprechi e l’uso di imballaggi che saranno scartati. Successivamente, segue la fase di “*waste*”, in cui durante i processi di

lavorazione e preparazione per il consumo vengono inevitabilmente prodotti degli scarti. Viene valutato il riutilizzo, che è “qualsiasi operazione attraverso la quale prodotti o componenti che non sono rifiuti sono reimpiegati per la stessa finalità per la quale erano stati concepiti”. A seguire, il processo del riciclo, in cui “i materiali di rifiuto sono ritrattati per ottenere prodotti, materiali o sostanze da utilizzare per la loro funzione originaria o per altri fini”. Successivamente, si dovrebbe favorire il recupero o “*recovery*”, inteso come “qualsiasi operazione il cui principale risultato sia di permettere ai rifiuti di svolgere un ruolo utile sostituendo altri materiali che sarebbero stati altrimenti utilizzati per assolvere una particolare funzione o di prepararli ad assolvere tale funzione, all’interno dell’impianto o nell’economia in generale”. Infine, si arriva allo smaltimento o “*disposal*”, di un volume ridotto al minimo e inevitabile, degli scarti nella filiera che non sono recuperabili.

Altro punto fondamentale introdotto nella New Waste Framework Directive (Direttiva 2018/851/UE) è la cosiddetta “Responsabilità estesa del produttore” che prevede una serie di misure volte ad assicurare che agli stessi produttori, spetti la responsabilità finanziaria e operativa della gestione della fase del ciclo di vita in cui il prodotto diventa un rifiuto, incluse le operazioni di raccolta differenziata, di cernita e di trattamento. Tale obbligo comprende anche la responsabilità di contribuire alla prevenzione dei rifiuti e alla riutilizzabilità e riciclabilità dei prodotti nella fase di produzione e trasformazione. La Direttiva introduce anche i criteri del cosiddetto “*end of waste*” che devono essere soddisfatti dai prodotti/materiali che originano da operazioni di recupero, affinché gli stessi non rientrino più nella definizione di rifiuto. Quindi, un rifiuto sottoposto ad attività di recupero diventa un sottoprodotto o una materia prima seconda, da utilizzare in una specifica attività industriale, esclusa dal regime dei rifiuti. Nell’ambito dei sottoprodotti, una sostanza od oggetto derivante da un processo di produzione il cui scopo primario non è la produzione di tale articolo, può non essere considerato rifiuto se ci sarà un ulteriore utilizzo legale della sostanza o oggetto che non porterà a impatti complessivi negativi sull’ambiente o la salute umana. Tale valutazione può essere riportata sottoforma di un diagramma di tipo decisionale, per riassumere e semplificare i concetti di “rifiuto”, “sottoprodotto” e “prodotto”, qui in parte descritti (Figura 3).

Nella filiera agroalimentare, le pratiche di economia circolare comprendono l’impiego minimo di input esterni e la valorizzazione del potenziale nutritivo presente nei residui e nei sottoprodotti agricoli. La trasformazione di questi ultimi, nell’ottica dello sviluppo di un sistema basato sul concetto di riciclo e biorisanamento, può contribuire

significativamente alla riduzione dell’impatto ambientale delle filiere agroalimentari, riducendo i problemi ambientali, economici e sociali associati allo smaltimento dei rifiuti agroalimentari. In questo senso, le bioindustrie possono offrire numerose valide alternative per l’utilizzo dei sottoprodotti per la produzione di prodotti alternativi con valore aggiunto, utilizzabili nel settore agricolo, energetico, alimentare e farmaceutico.

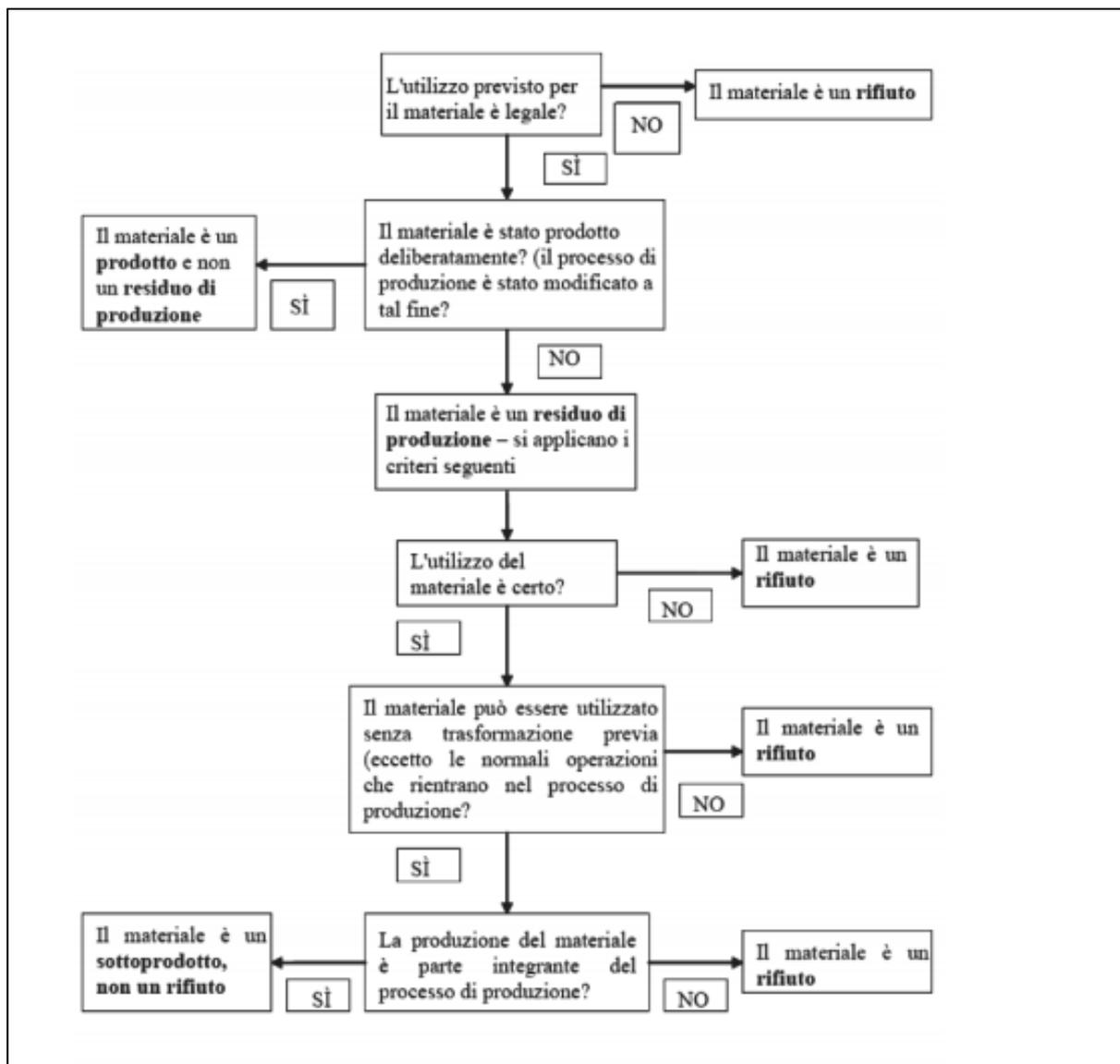


Figura 3. Diagramma decisionale per l’assegnazione del termine “prodotto”, “sottoprodotto” o “rifiuto” dal materiale di scarto industriale, redatto sulla base della legislazione in vigore (Fonte: <http://www.compost.it>).

1.1.3. Il Biorisanamento

Le tecniche convenzionali utilizzate per la bonifica di matrici ambientali contaminate o per la riduzione di sostanze pericolose nei rifiuti sono spesso poco ecosostenibili, costose e di difficile applicazione. Inoltre, spesso non portano ad una

decontaminazione definitiva e causano a loro volta rifiuti difficilmente smaltibili (Vidali, 2001). Il biorisanamento è una tecnica di bonifica di una matrice inquinata basata sull'utilizzo di piante o microrganismi in grado di assorbire, degradare o trasformare le sostanze inquinanti, sfruttando le loro attività biologiche naturali. In quanto tale, offre una soluzione a basso costo e bassa tecnologia che generalmente gode di un'elevata accettazione da parte dell'opinione pubblica. Inoltre, spesso il biorisanamento può essere eseguito *in loco*, senza quindi trasportare la matrice contaminata altrove (Dua *et al.*, 2002). Nonostante i numerosi vantaggi, in generale il biorisanamento risulta essere più lento delle tecniche ingegneristiche convenzionali e spesso l'efficacia viene compromessa dalle numerose variabili ambientali che influiscono sui processi biologici (Vidali, 2001). Per di più, sebbene le metodologie impiegate non siano tecnicamente complesse, sono necessarie una notevole esperienza e competenza per progettare e implementare un programma di biorisanamento di successo, valutando a fondo l'idoneità di un sito e ottimizzando le condizioni biologiche per ottenere un risultato soddisfacente (Guarino *et al.*, 2017).

I microrganismi, per la loro biodiversità e per le loro grandi potenzialità metaboliche, vengono ampiamente sfruttati per il biorisanamento di rifiuti contenenti sostanze pericolose o di matrici ambientali contaminate, quali acque e suolo (Thyagi *et al.*, 2011; Guarino *et al.*, 2017; Dua *et al.*, 2002). I microrganismi possiedono numerose strategie di adattamento ambientale, come la possibilità di modificare la membrana cellulare per mantenere le funzioni biologiche necessarie (de Carvalho, 2012), la produzione di composti tensioattivi come biosurfattanti (Ron *et Rosenberg*, 2002) e l'uso di pompe di efflusso per diminuire la concentrazione di composti tossici all'interno delle cellule (Shaw *et Dussan*, 2015). Alcuni microrganismi sono in grado di convertire e utilizzare gli inquinanti organici al fine di ottenere la produzione di energia necessaria per i loro processi metabolici, trasformandoli in forme elementari e composti meno tossici o non tossici attraverso processi cosiddetti di biodegradazione o biotrasformazione (Ma *et al.*, 2018). L'efficienza del biorisanamento dipende da molti fattori di natura biotica e abiotica che comprendono la capacità di crescita e l'attività dei microrganismi, i fattori ambientali (quali ad esempio pH, temperatura, umidità, nutrienti, potenziale redox e contenuto di ossigeno), nonché la tipologia di contaminante e la sua biodisponibilità fisico-chimica (solubilità, struttura chimica e tossicità) (Guarino *et al.*, 2017). La velocità di degradazione dipende, dalla quantità di "catalizzatore" presente, rappresentato dal numero di organismi capaci di metabolizzare il contaminante, così come dalla quantità di enzimi prodotti da tali

microorganismi in grado di ridurre la quantità o la pericolosità del contaminante. Questi ultimi appartengono perlopiù ai gruppi delle ossidoreduttasi, idrolasi, liasi, transferasi, isomerasi e ligasi (Sharma *et al.*, 2018).

1.2. I sottoprodotti della filiera agroalimentare - composizione e potenziale riutilizzo

I rifiuti e gli effluenti provenienti dalla filiera agroalimentare sono generalmente costituiti da vari composti organici, quali carboidrati (amido, cellulosa, emicellulosa e lignina), proteine, zuccheri, fibre, vitamine e lipidi, ed inorganici quali carbonio, azoto e fosforo. Inoltre, tali residui possono contenere numerose sostanze fitochimiche, come carotenoidi, fenoli e tocoferoli (Velis, 2015). Alcuni scarti sono tradizionalmente utilizzati o trasformati per alimentazione animale, come ammendanti e materiale da costruzione o per la produzione di energia. Nonostante ciò, il mercato di tali prodotti spesso non è in grado di assorbire la totalità dei rifiuti, o il loro riutilizzo non è economicamente vantaggioso ed è quindi necessario ipotizzare altre vie di valorizzazione per ottenere altri prodotti con maggiore valore aggiunto. L'attuale modello di utilizzo e recupero della biomassa vegetale dei rifiuti organici in linea con i principi di bioeconomia circolare, potrebbe essere rappresentato dalle cosiddette bioraffinerie (Figura 4).

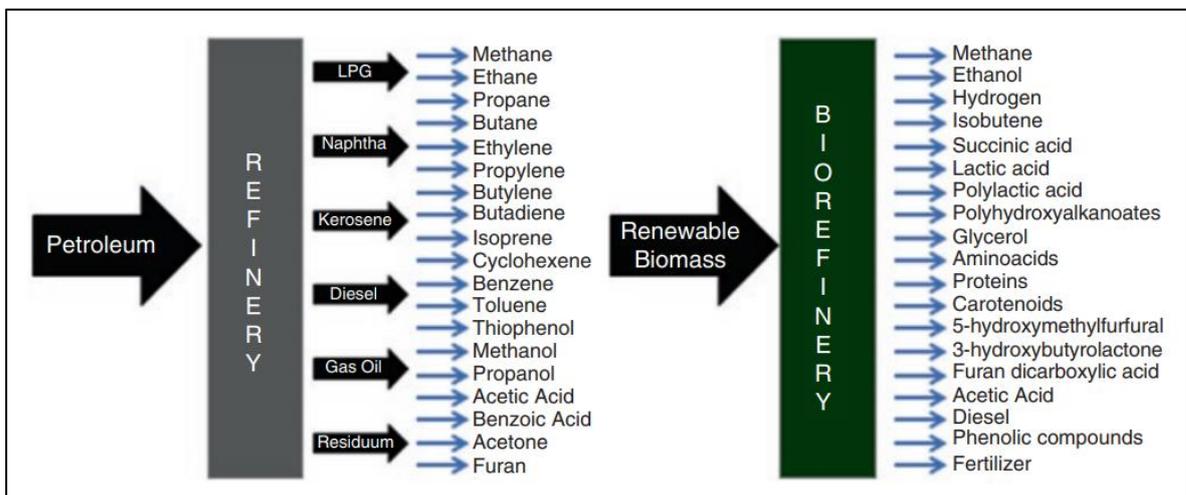


Figura 4. Prodotti e composti chimici che possono essere ottenuti in una tradizionale raffineria petrolifera e in una bioraffineria (Fonte: Castilla-Archilla *et al.*, 2019).

1.2.1. La bioraffineria per il recupero dei sottoprodotti agroalimentari (rifiuti organici)

Per analogia con le raffinerie da petrolio, una bioraffineria per recuperare la biomassa rinnovabile dei sottoprodotti agroalimentari (rifiuti organici) potrebbe essere rappresentata come una piattaforma tecnologica complessa destinata a produrre, a partire

dalle diverse componenti della biomassa (amido, olio, cellulosa, emicellulosa, proteine, lignina, ecc.), una vasta gamma di bioprodotto di interesse industriale, quali ad esempio materie prime per prodotti chimici, additivi, biocombustibili, energia e fertilizzanti.

Questo sistema integra processi di conversione della biomassa di natura chimica, fisica o microbiologica, purché a basso impatto ambientale (Castilla-Archilla *et al.*, 2019; Mohan *et al.*, 2016; Maina *et al.*, 2017; Rhozyel *et al.*, 2018). Il concetto di bioraffineria presuppone un utilizzo “a cascata” della biomassa vegetale, in cui gli scarti di ogni fase del processo vengono utilizzati per un successivo processo produttivo, in modo da raggiungere l’obiettivo di “zero waste” o quasi. Il processo è classificato in tre generazioni, in funzione della tipologia di biomassa utilizzata: la prima generazione si basa su biomasse vegetali appartenenti direttamente dalla filiera alimentare; la seconda generazione si basa sulla valorizzazione delle biomasse residuali; e la terza generazione si basa invece sull’utilizzo delle microalghe (Castilla-Archilla *et al.*, 2019; Ginni *et al.*, 2020). Nelle bioraffinerie di prima generazione, l’utilizzo di biomassa appartenente alla filiera alimentare può provocare una serie di problematiche, quali la perdita di energia al netto delle emissioni di gas serra, il rischio di aumento dell’inflazione dei prezzi dei prodotti alimentari e l’instaurarsi di una competizione con il settore alimentare e mangimistico per l’utilizzo delle terre fertili. Inoltre il risparmio di emissioni di CO₂ e di risorse fossili sono limitati dall’alta richiesta energetica per la coltivazione e la conversione delle materie prime, operazioni che contestualmente generano ulteriori impatti ambientali. Alcune di queste problematiche possono essere superate mediante l’utilizzo dei rifiuti provenienti dalla filiera agroalimentare (Castilla-Archilla *et al.*, 2019; Mohan *et al.*, 2016; Maina *et al.*, 2017), dato che la loro composizione complessa ed eterogenea permette di ottenere una vasta gamma di bioprodotto, che si possono suddividere in due grandi categorie: (i) materiali, utilizzati principalmente per le loro proprietà chimico-fisiche; (ii) prodotti energetici, usati per il loro contenuto energetico per fornire energia, elettricità e calore (Castilla-Archilla *et al.*, 2019; Maina *et al.*, 2017; Rhozyel *et al.*, 2018).

I principali prodotti energetici sono:

- biocarburanti gassosi (biogas, syngas, idrogeno, biometano);
- biocarburanti solidi (pellet, lignina, carbone);
- biocarburanti liquidi per il trasporto (bioetanolo, biodiesel, bio-oil);

Per quanto riguarda le produzioni di prodotti e materiali di interesse nell’ambito del settore agricolo vi sono (Figura 5):

- prodotti chimici (fine chemicals, building-blocks, bulk chemical: detergenti, tensioattivi)
- acidi organici (acido succinico, acido lattico ed altri derivati)
- polimeri e resine (bio-plastiche, resine fenoliche etc.)
- biomateriali (cellulosa, carta, pannelli in legno)
- fertilizzanti
- mangimi

Idealmente, una strategia di bioraffineria sostenibile da applicare per la valorizzazione dei sottoprodotti e dei rifiuti della filiera agroalimentare deve consistere in una o più delle seguenti unità operative integrate tra loro (Castilla-Archilla *et al.*, 2019; Usmani *et al.*, 2020):

- Il pretrattamento enzimatico ed estrazione/recupero di sostanze chimiche naturali, biomateriali e ingredienti alimentari, seguiti dalla conversione biotecnologica di alcuni dei prodotti ottenuti in bio-composti più sofisticati.
- La produzione di foraggi/mangimi per animali, eventualmente integrata con la produzione di biocarburanti.
- L'utilizzo e la trasformazione dei residui e degli effluenti come compost o ammendanti e biofertilizzanti per favorire il riciclo dei nutrienti al suolo.

In definitiva, il modello di bioraffineria rivela un approccio moderno che richiede la valorizzazione della biomassa organica in termini di carbonio, volto ad azzerare i rifiuti e le emissioni e tiene conto della gestione di tutte le caratteristiche di sostenibilità in termini di economia, ambiente e società. La materia prima della bioraffineria è fortemente legata al sistema agricolo e all'intera filiera agroalimentare e di conseguenza, il modello di bioraffineria mira anche la salvaguardia e la gestione delle risorse agroambientali quali acqua, suolo e nutrienti, e alla riduzione di input esterni, come combustibili fossili e prodotti chimici, utilizzati in agricoltura (Xu *et al.*, 2018; Puglia *et al.*, 2021; Diacono *et al.*, 2019). Lo sviluppo di schemi di bioraffinazione che prevedano il reintegro di carbonio e nutrienti

attraverso il riutilizzo dei residui organici come ammendanti e biofertilizzanti è necessario per garantire la fertilità del suolo e quindi la sussistenza della bioraffineria stessa.

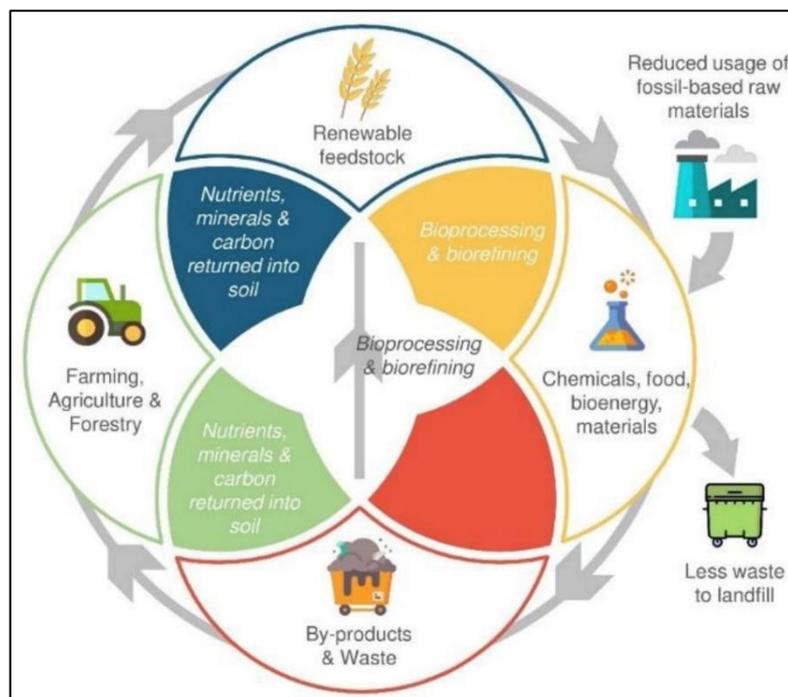


Figura 5. Concetto di bioraffineria (Fonte: Usmani et al. 2020).

1.2.2. Impiego dei sottoprodotti come integratori per le coltivazioni

La progressiva diminuzione del contenuto di sostanza organica nei suoli sottoposti ad agricoltura intensiva è particolarmente preoccupante in Italia. Le conseguenze di tale diminuzione sono immediatamente identificabili dalla degradazione delle proprietà fisiche e chimiche dei suoli, accompagnata dal consistente aumento dei rischi erosivi (Salvati et al., 2011). L'ammendamento del suolo con i rifiuti organici è una pratica ampiamente utilizzata in agricoltura per favorire l'incremento di sostanza organica. Tuttavia, tale pratica, se non eseguita correttamente, può causare una sovra-fertilizzazione del suolo e fenomeni di fitotossicità ed avere importanti ripercussioni ambientali, come l'inquinamento delle falde acquifere e l'emissione di gas ad effetto serra (Unger, 1994). Per evitare queste problematiche, è necessario trovare metodi alternativi per riutilizzare tali scarti nell'ambito della produzione agricola. Lo sviluppo di ammendanti, biofertilizzanti e biostimolanti dai sottoprodotti costituisce un metodo innovativo per prevenire i rischi ambientali causati dallo smaltimento e si traduce in una soluzione rispettosa dell'ambiente per valorizzare i rifiuti agroalimentari a costi ridotti e per limitare l'uso di sostanze chimiche di sintesi in agricoltura (Xu et al., 2018; Puglia et al., 2021; Diacono et al., 2019).

1.2.2.1. Ammendanti organici

Il potenziale utilizzo agronomico dei sottoprodotti come ammendanti organici assume particolare interesse quale mezzo per favorire la fertilità chimica del suolo (Negassa *et al.*, 2011) aumentando sia i macro- e micronutrienti che la sostanza organica, gli acidi fulvici e umici e di conseguenza la capacità di scambio cationico (Kallenbach *et al.*, 2019; Alotaibi *et Schoenau*, 2011). Dal punto di vista fisico tali ammendanti contribuiscono a migliorare le proprietà idrologiche e la struttura del suolo in termini di porosità e aggregazione (Sharma *et al.*, 2017; Diacono *et Montemurro*, 2011; Abiven *et al.*, 2009). L'uso degli scarti organici come ammendanti, oltre ai vantaggi in termini di riduzione dell'impatto ambientale causato dallo smaltimento, contribuisce ad un accumulo di carbonio organico nel suolo e al sequestro del carbonio dall'atmosfera (Kallenbach *et al.*, 2019; Lal *et al.*, 2007). Questi possono inoltre contribuire al ripristino dei suoli degradati, soggetti ad erosione o contaminati. Ad esempio, i residui organici vengono utilizzati con successo come bioassorbenti di contaminanti inorganici e organici e per biodegradazione e biorimediazione di inquinanti organici (Marín-Benito *et al.*, 2013) come fenoli, IPA (idrocarburi policiclici aromatici), pesticidi organici ed erbicidi (Lertpaitoonpan *et al.*, 2015). Inoltre, gli ammendanti a base di residui organici favoriscono l'instaurarsi di un ambiente favorevole allo sviluppo del microbiota del suolo contribuendo ad aumentare anche la fertilità biologica e la biodiversità.

Diversi studi riportano che l'aggiunta di batteri e funghi benefici accelera il processo di mineralizzazione del compost, riducendone la fitotossicità e contribuendo ad ottenere un prodotto migliore per le piante dal punto di vista nutrizionale (Siddiquee *et al.*, 2017; Molla *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2017). In particolare, l'effetto combinato di compost da rifiuti organici e il fungo *Trichoderma*, stimola la produzione di enzimi antiossidanti *in planta* (Bernal-Vicente *et al.*, 2015). Canellas *et al.* (2013) riportano che l'utilizzo combinato del compost e del microrganismo *Herbaspirillum seropedicae* determinano un incremento della promozione della crescita e della resistenza ai patogeni da parte di piante di mais. Pertanto, gli effetti sinergici dei sottoprodotti, dei microrganismi e del sistema suolo-pianta sembrano giocare un ruolo chiave nel miglioramento della crescita delle colture e della qualità del suolo.

1.2.2.2. Biostimolanti e biofertilizzanti

Gli scarti potrebbero essere utilizzati per la produzione di biofertilizzanti o biostimolanti, con l'obiettivo di promuovere la crescita delle piante e aumentare la fertilità chimica e biologica del suolo (Xu *et al.*, 2018; De Corato *et al.*, 2018; Puglia *et al.*, 2021; Diacono *et al.*, 2019; Colla *et Roupael*, 2015). Un biostimolante delle piante è qualsiasi sostanza o microrganismo "la cui funzione è stimolare i processi di nutrizione delle piante indipendentemente dal contenuto di nutrienti del prodotto, con l'unico scopo di migliorare una o più delle seguenti caratteristiche della pianta o della rizosfera vegetale: i) efficienza nell'uso dei nutrienti, ii) tolleranza allo stress abiotico, iii) tratti di qualità, o iv) disponibilità di nutrienti nel suolo o nella rizosfera " (EU, 2019). Per estensione, i biostimolanti vegetali designano anche prodotti contenenti miscele di tali sostanze e/o microrganismi (Du Jardin, 2015).

In particolare, i biostimolanti derivanti dai sottoprodotti di origine vegetale stanno guadagnando popolarità tra la comunità scientifica e le imprese commerciali, grazie alla loro ricchezza di composti bioattivi e alla loro grande efficacia nel migliorare le prestazioni delle colture, oltre al fatto che potrebbero rappresentare una soluzione sostenibile, economica ed eco-compatibile al problema dello smaltimento dei rifiuti (Xu *et al.*, 2018; De Corato *et al.*, 2018; Puglia *et al.*, 2021; Diacono *et al.*, 2019; Colla *et Roupael*, 2020). Questi prodotti generati dai flussi di rifiuti sono classificabili come "matrici organiche complesse" e comprendono i rifiuti alimentari, compost, letame, vermicompost, rifiuti di acquacoltura e trattamenti delle acque reflue, e tale definizione prevede la trasformazione dei rifiuti attraverso microrganismi (fermentazione, degradazione, mineralizzazione) (Du Jardin, 2012). Anche gli acidi umici e gli idrolizzati proteici composti da polipeptidi, oligopeptidi ed amminoacidi, possono provenire da scarti vegetali o animali (Roupael *et Colla*, 2020).

Secondo Puglia *et al.* (2021), per biofertilizzante si intende invece una preparazione contenente diversi tipi di microrganismi che può essere applicata sui semi, al suolo o durante il compostaggio al fine di accelerare i processi microbici benefici nel suolo e aumentare la disponibilità dei nutrienti per le piante. L'azione benefica dei biofertilizzanti è dovuta sia ad aumento considerevole della fertilità chimico-fisica del suolo che all'azione diretta o indiretta dei microrganismi (Puglia *et al.*, 2021). Tra i microrganismi comunemente utilizzati troviamo i microrganismi azoto-fissatori nonché i microrganismi in grado solubilizzare i fosfati o con un elevata attività cellulolitica (Mohammadi *et al.*, 2012). La

maggior parte degli scarti organici provenienti dalla filiera agroalimentare presentano le caratteristiche per essere utilizzati come biofertilizzanti (Diacono *et al.*, 2019).

I biostimolanti ed i biofertilizzanti agiscono attraverso molteplici modalità di azione con effetti additivi e sinergici delle componenti organiche e microbiologiche, dovute ad un insieme incredibilmente diversificato di materiali biologici, per cui determinarne un'unica modalità di azione si è dimostrato estremamente difficile (Brown *et Sa*, 2015; Roupael *et Colla*, 2020). I biostimolanti e i biofertilizzanti agiscono direttamente sulla pianta e indirettamente, migliorando la fertilità del suolo e stimolando l'attività di batteri, lieviti e funghi a produrre molecole benefiche per la pianta stessa. Gli effetti immediati o ritardati nel tempo, si producono a cascata e possono agire sinergicamente sia sulle proprietà del suolo e sul microbioma, sia sulla pianta, inducendo cambiamenti fisiologici, metabolici e ormonali e modificandone l'espressione genica (Brown *et Sa*, 2015). Le molecole organiche presenti in questi prodotti vengono utilizzate come fonte di carbonio, azoto ed energia dai microrganismi, sostenendone lo sviluppo nel suolo e la persistenza, ed a loro volta i microrganismi contribuiscono alla decomposizione della materia organica, generando composti che possono influire direttamente sulla crescita delle piante. Inoltre, i biostimolanti e i biofertilizzanti possono alterare la composizione e l'attività del microbioma del suolo e questo potrebbe essere un altro meccanismo di azione che porta ad un miglioramento della produttività delle colture (Tejada *et al.*, 2011; Colla *et al.*, 2017). Tra le tecniche comunemente utilizzate per la conversione dei sottoprodotti in biostimolanti e biofertilizzanti si cita la fermentazione su substrato solido (SSF) (Xu *et al.*, 2018; Sadh *et al.*, 2018; Abu Tazid *et al.*, 2017), che è utilizzata in un'ampia gamma di bioprocessi finalizzati alla valorizzazione dei rifiuti e alla produzione su larga scala di propaguli di microrganismi benefici come conidi, spore, bioformulati ed enzimi (lipasi, cellulasi, chitinasi, amilasi, ecc.) (Sarhy-Bagnon *et al.*, 2000; Gutiérrez-Sánchez *et al.*, 2013). Gli scarti potrebbero costituire un substrato economico e abbondante per la crescita di un'ampia gamma di microrganismi benefici attraverso la SSF: la composizione polimerica e complessa dei residui offre le condizioni nutritive favorevoli alla crescita, garantendo una fonte di carbonio e la presenza di minerali e proteine necessari per i processi metabolici. I substrati a base di scarti comunemente usati per la SSF sono bagassa, pasta di carta, crusca di frumento, riso e paglia di riso, scarti di frutta e verdura e altri sottoprodotti agro industriali (Sadh *et al.*, 2018; Abu Tazid *et al.*, 2017).

1.2.2.3. Bioprodotti dalla combinazione degli scarti con i microbi benefici

Sono abbondanti gli esempi di valorizzazione dei sottoprodotti agroindustriali attraverso il loro riutilizzo come ammendanti, biostimolanti e biofertilizzanti (Xu *et al.*, 2018; De Corato *et al.*, 2018; Puglia *et al.*, 2021). Ad esempio, è stato dimostrato che i tralci di vite generati durante il processo di potatura contengono composti fenolici, volatili e minerali che sono stati applicati come biostimolante della vite e fertilizzante fogliare (Sanchez-Gomez *et al.*, 2017). Gli estratti acquosi di sottoprodotti di semi di finocchio, limone e orzo hanno migliorato la resa del pomodoro e la qualità dei frutti (Abou Chehade *et al.*, 2018).

D'altra parte, sono numerosi gli studi che utilizzano la combinazione di microrganismi benefici e scarti per la produzione di bioformulati, biostimolanti e metaboliti secondari bioattivi. Gli autori Nahar *et al.* (2012) hanno sviluppato un "Tricho-compost", un fertilizzante costituito da spore di *Trichoderma harzianum* insieme a rifiuti vegetali (crusca di mais, sterco di vacca, giacinto d'acqua, melassa, segatura e rifiuti di pollame), e anche un "Tricho-percolato", un prodotto liquido ottenuto dalla SSF del substrato a base di rifiuti da parte del microrganismo. Ambedue i prodotti hanno aumentato il tasso di germinazione di piantine di cavolo e hanno diminuito l'incidenza di malattie e l'infestazione di nematodi. Altri studi hanno dimostrato l'efficacia della SSF di diversi sottoprodotti, quali ad esempio bagassa di canna da zucchero e vinacce, sansa, crusca di frumento e farina di patate con *Trichoderma* spp. per la produzione di conidi, metaboliti secondari (es. 6PP) ed enzimi litici (Fadel *et al.*, 2015; Hamrouini *et al.*, 2019; De la Cruz-Quiroz *et al.*, 2017). Adan *et al.* (2015) hanno testato l'efficacia di una formulazione contenente *Trichoderma* e diversi sottoprodotti (segatura, crusca di cicerchie, crusca di lenticchie, crusca di grano, crusca di riso, crusca di grano nero e pannello di olio di senape), dimostrandone l'efficacia sia come biopesticida contro il patogeno *Sclerotium rolfsii*, sia come biostimolante, favorendo la germinazione e la crescita di piante di melanzana. I sottoprodotti (melassa, scarti della lavorazione del mais, estratti vegetali, acque reflue) possono essere utilizzati come substrati per la crescita di *Rhizobium*, microrganismi in grado di fissare N₂ rendendolo biodisponibile per le piante (Rebah *et al.*, 2007). Inoltre, è stato dimostrato che i rifiuti agroindustriali (sansa, vinacce, melassa) possono essere utilizzati con successo come substrati di crescita di diversi microrganismi (es. *A. niger*) in grado di solubilizzare, grazie alla produzione di acidi organici, i fosfati inorganici contenuti ad esempio in rocce fosfatiche (Vassileva *et al.*, 2010; Vassilev *et al.*, 2007). Gli autori sopracitati hanno inoltre rilevato un

effetto sinergico tra il trattamento contemporaneo della sansa e delle le piante con i microrganismi, dimostrando che la loro applicazione combinata riduce la fitotossicità della sansa e favorisce considerevolmente la crescita delle piante e l'assorbimento di fosforo (Vassileva *et al.*, 2010; Vassilev *et al.*, 2007).

Inoltre, l'utilizzo di scarti e microrganismi risulta efficace nel recupero di suoli degradati e contaminati. Ad esempio, la vinaccia di canna da zucchero, un sottoprodotto dell'industria dello zucchero, è stata utilizzata come fonte di nutrienti per i microrganismi impiegati per rimozione di composti xenobiotici dall'ambiente, promuovendo il biorisanamento del suolo (Christofoletti *et al.*, 2013).

1.3. La valorizzazione dei sottoprodotti oleari

I sottoprodotti oleari provengono dal processo di estrazione dell'olio da semi o da altri tessuti delle piante. La più parte degli oli vegetali possono essere usati a scopo alimentare o per la produzione di biocarburanti o biodiesel. Tra gli oli maggiormente utilizzati a scopo alimentare troviamo l'olio di colza, di girasole e di oliva. Il processo di estrazione di questi oli può prevedere diversi trattamenti di tipo meccanico, termico e chimico, che influiscono sul valore nutrizionale dell'olio e sulla composizione dei sottoprodotti che ne derivano. I sottoprodotti sono costituiti da farine di estrazione, nel caso dell'olio di girasole e di colza e da sansa e acque di vegetazione per l'olio di oliva. Tali sottoprodotti vengono comunemente riutilizzati come mangimi animali o smaltiti attraverso lo spandimento in campo. Tuttavia, questi possono contenere composti anti nutrizionali o tossici che possono influire negativamente sulle produzioni agricole e sulla salute dell'uomo e dell'ambiente. Infatti, lo smaltimento incauto o sovradimensionato dei sottoprodotti in campo può avere un effetto biocida, generando fenomeni di fitotossicità e il degrado del microbioma del suolo; inoltre il liscivamento di tali composti può causare la contaminazione delle acque superficiali e profonde. Per evitare tali rischi è necessario ampliare le modalità di valorizzazione di questi sottoprodotti attraverso alternative integrabili nei processi produttivi, in grado di aumentarne il valore aggiunto in maniera ecosostenibile ed economica.

1.3.1. La Sansa di Oliva (OP)

L'attività del frantoio consiste nella lavorazione delle olive, direttamente provenienti dalla raccolta e non sottoposte ad alcun trattamento preliminare, finalizzata

all'estrazione dell'olio attraverso metodi fisici e meccanici. L'olio rappresenta una minima parte della biomassa prodotta nell'ambito della filiera olivicolo-olearia. Nella filiera olivicolo-olearia possono essere individuate due grandi tipologie di sottoprodotti (Dermeche *et al.*, 2013):

- *residui di campo*: olive non raccolte, residui di potatura e di raccolta delle olive (legna, frasca, foglie);
- *residui di estrazione olearia*: sansa vergine (più o meno umida a seconda delle tecnologie estrattive), acque di vegetazione, sansa esausta.

I moderni sistemi di estrazione centrifuga (impianti "continui") frazionano la pasta derivata dalla frangitura delle olive in due fasi, olio e sansa molto umida (58-62%), oppure in tre fasi, olio, sansa con umidità del 48-54% ed elevate quantità di acqua. Pertanto, estraendo l'olio con impianti a due fasi non vengono prodotte acque di vegetazione, ma l'umidità della sansa risulta piuttosto elevata, il che crea problemi in fase di spandimento tal quale sui terreni o successiva trasformazione (estrazione al solvente o combustione). Le sanses presentano un'umidità eccessiva per essere accettate dai sansifici, per i quali la voce che più incide sui costi di produzione è proprio quella legata all'essiccamento attraverso solventi organici. Altri problemi legati allo smaltimento delle sanses umide riguardano il loro trasporto, dato che risultano difficilmente palabili e richiedono, al contrario delle sanses asciutte, cassoni stagni (Dermeche *et al.*, 2013).

L'attività molitoria dei frantoi italiani produce in media oltre 3 milioni di tonnellate di reflui (sanses ed acque di vegetazione). La più parte dei frantoi sono piccole imprese, situate nelle regioni del Sud Italia (Sicilia, Calabria e Puglia) (Doula *et al.*, 2012) che spesso non sono a conoscenza dei rischi, soluzioni e tecnologie per il trattamento di tali rifiuti, mentre le industrie più grandi non sono inclini ad adottare nuove tecnologie se i costi sono elevati. Quindi nella maggior parte dei casi, tali scarti sono smaltiti in maniera inadeguata nell'ambiente causando seri danni al suolo, alle falde acquifere e alle acque superficiali, alla flora e alla fauna (Karaouzas *et al.*, 2019; Ashraf *et al.*, 2014).

La sansa viene generalmente riutilizzata nei seguenti modi (Dermeche *et al.*, 2013):

- produzione di ulteriore olio ad uso alimentare (olio di sansa di oliva), di minore qualità e non più molto apprezzato dal mercato, attraverso un processo chimico operato nei "sansifici";
- spandimento sui terreni agricoli, con funzione di fertilizzante;

- inserimento in mangimi destinati alla zootecnia;
- combustione (o altra forma di recupero energetico) in impianti che producono energia da biomasse;
- smaltimento come rifiuto.

Il D.G.R. del 2 agosto 2006 consente lo spargimento controllato sul terreno delle acque di vegetazione e della sansa umida nei limiti di 50 e 80 m³/ha rispettivamente per frantoi a ciclo tradizionale e frantoi a ciclo continuo. In tal senso, l'impiego agricolo offre prospettive molto interessanti per l'ammendamento in pieno campo. Infatti, la sansa vergine, essendo costituita da sostanza organica di origine vegetale non fermentata, e non contenendo metalli pesanti in concentrazioni quantitativamente rilevanti, inquinanti tossici o organismi patogeni, ha una composizione assimilabile ad un ammendante vegetale, quindi può essere oggetto di utilizzazione agronomica. Dal punto di vista agronomico va rilevato che le sansa umide hanno un contenuto di sostanza organica elevato (mediamente pari all'84% s.s.), un livello di sostanze grasse residue vicino al 10%, un'umidità compresa tra il 50 ed il 70%, un buon contenuto in fosforo (0,2% della s.s.) e soprattutto in potassio (intorno al 2% della s.s.) e azoto (circa 1% della s.s.) (Dermeche *et al.*, 2013). La pratica dello spandimento della sansa sul terreno è stata ampiamente studiata, non più quale semplice mezzo per lo smaltimento, ma quale tecnica mirata al miglioramento della fertilità del suolo. Numerosi studi dimostrano che tale pratica apporta un notevole miglioramento delle proprietà fisiche, chimiche e biologiche del terreno e della nutrizione vegetale, che si traduce in un aumento delle rese in termini qualitativi e quantitativi (Aranda *et al.*, 2015; García-Ruiz *et al.*, 2012; Gómez-Muñoz *et al.*, 2013; Proietti *et al.*, 2015). In particolare, l'elevato contenuto in sostanza organica consente il miglioramento delle proprietà chimico-fisiche del suolo, un aspetto assai rilevante data la graduale riduzione del contenuto di sostanza organica nei suoli sottoposti a coltivazioni intensive. Per una valutazione quantitativa delle modificazioni fisiche e chimiche dei terreni trattati con la sansa è necessario tener presente la notevole variabilità della composizione del sottoprodotto dovuta a numerosi fattori, quali ad esempio il periodo e la modalità di stoccaggio, che possono influire sulla parziale sedimentazione della frazione insolubile, sulla trasformazione microbiologica della sostanza organica e sull'evaporazione della componente acquosa. A discapito del potenziale effetto positivo che potrebbero avere questi reflui se usati come fertilizzanti, sono da considerare anche alcune caratteristiche

come l'elevata salinità e acidità, e abbondanza di sostanze organiche quali polifenoli, che conferiscono una potenziale fitotossicità alle sansa impiegate tal quali (Pinho *et al.*, 2017).

Numerosi gruppi di ricerca si sono dedicati allo studio di processi biologici finalizzati a ridurre la tossicità della sansa per la trasformazione in ammendanti e fertilizzanti organici, perlopiù attraverso il compostaggio. Il sottoprodotto è un ottimo materiale di partenza per ottenere compost di qualità e la trasformazione della materia organica è in gran parte dovuta alla rapida successione di popolazioni microbiche che esprimono un'ampia attività enzimatica (Federici *et al.*, 2011). In generale, il processo di compostaggio della sansa favorisce lo sviluppo delle popolazioni microbiche specializzate nella decomposizione della sostanza organica, in particolare dei fenoli, tannini e lipidi. Confrontando la diversità che caratterizza la sansa fresca con quella presente nei prodotti di compostaggio o di vermi-compost, è stato osservato che questi ultimi mostrano degli incrementi nelle attività enzimatiche relative alla deidrogenasi, alla beta-glucosidasi e all'ureasi, come conseguenza della biotrasformazione dei composti fenolici (Vivas *et al.*, 2009). L'aggiunta di funghi benefici e saprofiti (es. *white-rot fungi*) influisce positivamente sul processo di compostaggio, aumentando la degradazione della lignocellulosa tramite la produzione di enzimi quali laccasi e perossidasi. Inoltre, grazie alla crescita miceliale questi funghi facilitano la disponibilità e il trasporto dei nutrienti nel substrato, favorendo l'avanzare del processo. Lo studio di Haddadin *et al.* (2009) rivela che l'aggiunta di *T. harzianum* e *P. chrysosporium* influisce positivamente sulla velocità del processo di compostaggio della sansa e sul tempo di maturazione del compost, permettendo di ottenere un compost stabilizzato in 50 giorni.

Un'altra alternativa al compostaggio consiste nell'inoculo della sansa con funghi saprofiti in grado di stabilizzare il sottoprodotto e degradare i fenoli diminuendo di conseguenza l'effetto fitotossico (Sampedro *et al.* 2005; Sampedro *et al.* 2004; Sampedro *et al.* 2009). Hamrouni *et al.* (2019; 2019a; 2020) hanno dimostrato che è possibile ottenere un'elevata produzione di conidi, enzimi litici (cellulasi, lipasi e amilasi) e 6 PP (6-pentil-alfapirone) utilizzando i residui agroindustriali come substrato di crescita per *T. asperellum* in SSF, risultando la fermentazione particolarmente efficiente su grandi volumi (bioreattori). Gli autori hanno inoltre evidenziato con successivi studi che la presenza della sansa nel substrato influisce positivamente sulla produzione di conidi e di 6PP (Hamrouni *et al.* 2020).

1.3.2. Le farine di estrazione da girasole (SF) e colza (RS)

Il pannello o farina di estrazione è il sottoprodotto dell'estrazione dell'olio dai semi ed è composto principalmente da proteine, fibre (materiali lignocellulosici) e minerali. In confronto alla sansa di oliva che è umida e pastosa perché costituita da semi macinati e residui di polpa e bucce, SF e RS sono secchi, dato che contengono esclusivamente gusci e tegumenti dei rispettivi semi macinati.

Nel 2011, la produzione mondiale di farina di estrazione di colza (Rapeseed - RS) e di girasole (Sunflower - SF) è stata stimata rispettivamente a circa 35 e 14,9 milioni di tonnellate (<http://www.indexmundi.com/agriculture>). Date le loro grandi quantità, negli ultimi decenni c'è stato un crescente interesse per il loro recupero e utilizzo redditizio. Le farine di RS e SF sono state utilizzate ampiamente come fonti di alimentazione animale, in sostituzione la farina di soia nelle diete dei ruminanti o come integrazione proteica nei mangimi di animali monogastrici (Ditta *et King*, 2017; Lomascolo *et al.*, 2012).

Tali sottoprodotti costituiscono substrati economici ed ecologici, utilizzabili come matrice di supporto e come mezzo nutritivo per la crescita di microrganismi che possono essere sfruttati per la biodegradazione del substrato, la riduzione delle sostanze tossiche e il miglioramento del valore nutritivo e della digeribilità delle fibre insolubili (Ramachandran *et al.*, 2007; Lomascolo *et al.*, 2012).

SF ha un alto contenuto di proteine (circa il 32%) con quantità significative di aminoacidi, importanti a livello nutrizionale. Tuttavia, contiene anche composti fenolici come gli acidi clorogenico e caffeico (70% dei fenoli totali), che riducono il suo valore nutritivo legandosi ad aminoacidi essenziali. Parrado e Bautista (1993) hanno dimostrato che utilizzando la frazione lignocellulosica di SF come substrato per la fermentazione del *Trichoderma harzianum* ceppo S/G2431, è stato favorito l'arricchimento proteico del sottoprodotto ed è stata ottenuta una diminuzione del contenuto di fibre dal 74,0% al 38,8%. In alternativa, per aumentare il contenuto proteico di SF sono stati utilizzati enzimi appartenenti al gruppo delle idrolasi, tra cui le cellulasi provenienti da *Humicola insolens* e le pectinasi da specie di *Aspergillus*. Allo stesso modo, Martinez e Duvnjak (2007) hanno utilizzato con successo gli enzimi polifenolossidasi di *Trametes versicolor* per ridurre il contenuto di acido clorogenico di SF del 98% dopo sole 4 ore di incubazione enzimatica. Anche RS ha un alto contenuto proteico (circa 35%), con un ottimo equilibrio di aminoacidi essenziali, ma il suo utilizzo è generalmente limitato dalla presenza di

componenti tossici tra cui l'acido fitico (inositolo acido esaforico), etanolo - carboidrati solubili, glucosinolati e polifenoli (Lomascolo *et al.*, 2012). La detossicazione di RS mediante fermentazione allo stato solido (SSF) con *Rhizopus oligosporus* per 40 ore ha portato alla degradazione dell'84% dei carboidrati, del 30% delle lignine e lipidi e di altri polifenoli, e la riduzione del 47% dei glucosinolati totali. Inoltre, il trattamento ha prodotto un leggero aumento delle proteine totali (Rozan *et al.*, 1996). Questi risultati sono stati confermati da Vig e Walia (2001), che hanno constatato che i livelli di glucosinolati sono drasticamente diminuiti a seguito dell'inoculo con *R. oligosporus* e che il trattamento microbico ha anche aumentato il contenuto di azoto e proteine nel sottoprodotto. La produzione di idrolizzati proteici o la detossificazione delle farine di estrazione di RS e SF mediante trattamenti microbici o enzimatici è stata, inoltre, oggetto di numerosi brevetti negli ultimi dieci anni (Liu *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2007; Aya *et al.*, 2010 e Gu *et al.*, 2011) i cui i processi di fermentazione hanno riguardato l'uso di batteri, lieviti (*Saccharomyces*) e funghi (*Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp.).

Più recentemente, sono state sviluppate nuove alternative all'uso tradizionali di questi sottoprodotti come mangimi che sfruttano la loro struttura e le proprietà fisico-chimiche, insieme alla loro economicità e pronta disponibilità. SF e RS sono buone fonti di nutrienti proteici e zuccherini, e possono fungere da matrice di supporto per vari processi biotecnologici tra cui la produzione di agenti di biocontrollo, biofertilizzanti, enzimi, antibiotici, antiossidanti, vitamine, funghi commestibili, biogas e bio-olio (Ramachandran *et al.*, 2007; Lomascolo *et al.*, 2012). Yao *et al.* (2012) hanno dimostrato la coproduzione di iturina A, un antibiotico lipopeptidico ciclico con attività ad ampio spettro e forte azione antifungina, e acido poli- γ -glutammico, un polimero con potenziale applicazione per fertilizzanti ecologici, da parte del metabolismo secondario del *Bacillus subtilis* coltivato in SSF su RS. Dall'inizio degli anni '90, diversi studi hanno riportato la produzione di vari enzimi microbici (xilanasasi, proteasi, amilasi, fitasi, fosfatasi) utilizzando RS e SF come substrati in SSF o come supplemento nel terreno di coltura (Gattinger *et al.*, 1990; Yeoman *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2010). I glucosinolati contenuti in RS, inizialmente studiati per i succitati effetti antinutrizionali, sono più recentemente oggetto di studio per le loro proprietà terapeutiche e chemio-preventive (Lomascolo *et al.*, 2012). Gli isotiocianati provenienti dall'idrolisi dei glucosinolati sono inoltre composti bioattivi, ampiamente noti per la loro attività biologica ad ampio spettro contro nematodi, funghi terricoli e insetti o erbe infestanti (Lee *et al.*, 2015; Hodge *et al.*, 2019; Poveda *et al.*, 2020). Infatti, gli

isotiocianati, prodotti dalle piante appartenenti alle *Brassicaceae*, possono essere utilizzati come concime biologico per la cosiddetta biofumigazione tecnica, in sostituzione di pesticidi sintetici, come metodo di controllo di patogeni terricoli (Ntalli *et al.*, 2017; Hanscen *et al.*, 2020; Baysal-Gurel *et al.*). Questi composti sono anche utilizzati in post-raccolta contro diversi agenti patogeni alimentari pericolosi per la salute umana (Romeo *et al.*, 2018; Cuggino *et al.*, 2020). Inoltre, l'incorporazione al suolo di farine di estrazione da *Brassica nigra* e di una formulazione liquida a base di olio da *B. carinata* e farine di estrazione di *B. nigra* hanno avuto un effetto positivo sulla crescita del melone, sulla composizione microbica del suolo e sulla attività enzimatica di quest'ultimo (Galletti *et al.*, 2008).

Diversi studi hanno dimostrato la compatibilità della biofumigazione con farine di estrazione di *Brassicaceae* e il fungo benefico *Trichoderma* (Prasad *et al.*, 2018). Di particolare interesse è lo studio di Galletti *et al.* (2008) in cui è stata testata *in vitro* la tolleranza di 40 specie di *Trichoderma* alle sostanze volatili tossiche rilasciate dal sottoprodotto e al contatto diretto con esso. Le specie di *Trichoderma* mostrano un'elevata capacità di crescita sul sottoprodotto, maggiore rispetto a diverse specie di patogeni testati (*Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*). In un esperimento preliminare, l'integrazione al suolo della farina di estrazione insieme all'inoculo con *Trichoderma* spp. si sono rivelati efficaci per il controllo del patogeno *P. ultimum* su barbabietola da zucchero. In un altro esperimento di Galletti *et al.* (2015) il trattamento di semi di melone con un isolato di *Trichoderma harzianum* tollerante ai composti tossici rilasciati dal sottoprodotto e l'applicazione di farine di estrazione da *B. carinata* ha determinato l'aumento della lunghezza delle radici del 20%, un raddoppio del peso secco del germoglio e un aumento sia dell'abbondanza microbica del suolo (+ 46%) che dell'attività enzimatica (+ 90%). Questi effetti da parte di *T. harzianum* sono probabilmente attribuibili sia al potenziamento dei cicli biogeochimici dei nutrienti che alla stimolazione diretta della crescita delle radici. Gli autori sopra citati hanno inoltre constatato che una percentuale significativa di N contenuto in tali sottoprodotti è disponibile in breve tempo, mentre la quantità rimanente è disponibile lentamente, consentendo così un apporto di N più uniforme durante la coltivazione e contribuendo in modo efficiente alla crescita delle piante e all'attività microbica. Similmente, Cohen *et al.* (2005), hanno evidenziato che l'aggiunta di farine di estrazione di *B. napus* al suolo di un frutteto ha alterato le comunità

microbiche sia saprofiti che patogeni, portando a una condizione più favorevole per la crescita delle piante.

I polipeptidi, peptidi e amminoacidi di origine animale e/o vegetale, ottenuti dall'idrolisi di proteine, sono la tipologia di biostimolante il cui uso è in continuo aumento in agricoltura (Colla *et al.*, 2017). Di conseguenza, la farina di estrazione dei semi di girasole e di colza, contenente un'abbondanza di proteine, con un profilo amminoacidico di alta qualità, e altri composti non proteici bioattivi, sono un interessante materiale di partenza per la produzione di biostimolanti e biofertilizzanti, dato che apportano azoto e microelementi con proprietà nutrizionali e hanno un potenziale effetto di promozione della crescita delle piante.

Il rilascio dei peptidi e amminoacidi liberi avviene tramite l'idrolisi delle farine di estrazione con trattamenti con acidi o basi forti e alte temperature, ma questi processi presentano diversi inconvenienti riguardanti sia la sostenibilità che la composizione chimica del prodotto finale. Al contrario l'idrolisi con enzimi prodotti da funghi e batteri contribuisce a preservare la qualità degli amminoacidi liberi e le caratteristiche chimiche delle farine di estrazione (Parrado *et al.*, 1993). Ugolini (2017) ha riportato l'effetto benefico di un idrolizzato proteico ottenuto a seguito di idrolisi enzimatica di SF (con endopeptidasi da *Bacillus licheniformis* e esopeptidasi e endoproteasi da *Aspergillus oryzae*) sulla crescita delle radici di piante di mais. In un altro studio gli autori (Ugolini *et al.*, 2015) hanno confermato effetti interessanti dell'idrolizzato sull'allungamento delle radici di piante di crescione (*Lepidium sativum* L.) e lattuga (*Lactuca sativa* L.) che suggeriscono un'attività auxina-simile, confermando un potenziale uso del prodotto come biostimolante per il settore agricolo.

In definitiva, la combinazione dei sottoprodotti OP, SF e RS con i microrganismi benefici potrebbe non solo ridurre la tossicità dei sottoprodotti, ma anche aprire interessanti prospettive per lo sviluppo di metodi di controllo dei patogeni e per la produzione di biostimolanti e biofertilizzanti per promuovere la crescita delle colture e la fertilità del suolo in modo ecosostenibile.

1.4. I microrganismi benefici in agricoltura

A partire dalla metà del XX secolo, l'agricoltura è stata caratterizzata da un insieme di tecniche di coltivazione che prevedono un uso intensivo di fertilizzanti e fitofarmaci di sintesi. Tali pratiche hanno determinato inquinamento ambientale, presenza di residui

tossici negli alimenti e sviluppo di specie patogene resistenti (Goldman *et al.*, 1994; Den Herder *et al.*, 2010). A tutela dell'ecosistema e del consumatore sono stati attuati una serie di provvedimenti legislativi sempre più restrittivi relativamente all'impiego dei prodotti chimici in agricoltura. Infatti, la Direttiva 2009/128 dell'Unione Europea, recepita in Italia con il decreto legislativo del 14 agosto 2012 n° 150 (Ministero per le Politiche Agricole, 2012) ha definito un quadro normativo che prevede “un uso sostenibile dei pesticidi” al fine di ridurre i potenziali rischi per l'ambiente (es.: riduzione della biodiversità, inquinamento del suolo e delle risorse idriche; emissioni di sostanze inquinanti nell'atmosfera; bioaccumulo di composti tossici lungo le catene biotrofiche, ecc.) e per la salute umana (contatto e inalazione di sostanze cancerogene; patologie metaboliche, neurodegenerative, polmonari, cardiovascolari, ecc.). In virtù della nuova normativa, gli agricoltori devono ridurre significativamente l'utilizzo di fitofarmaci e fertilizzanti chimici, incrementando proporzionalmente l'adozione di pratiche ecosostenibili per la difesa delle colture. Inoltre, per rispondere alla sempre più crescente ed esigente domanda del mercato, gli agricoltori devono aumentare la quantità delle produzioni mantenendo nel contempo elevati standard qualitativi e di salubrità dei prodotti commercializzati. In quest'ottica, l'impiego di microrganismi benefici trova un'ampia applicazione nell'ambito delle pratiche di difesa integrata (IPM-*Integrated Pest Management*) e di lotta biologica, come valida alternativa ai fitofarmaci e ai fertilizzanti di sintesi per la difesa e per la promozione della crescita delle colture.

In generale, l'applicazione dei microrganismi nel controllo dei fitopatogeni sfrutta quelle che sono i naturali processi di interazione tra gli microrganismi, in questo caso di antagonismo o parassitismo. L'antagonista microbico che in grado di sopprimere l'agente fitopatogeno, viene definito come “agente di biocontrollo” (BCA) e le sue azioni di controllo sono il risultato di diversi meccanismi diretti ed indiretti sul bersaglio. I meccanismi diretti si realizzano nell'ambito dell'interazione antagonista-patogeno, e comprendono: il parassitismo, l'antibiosi e la competizione per spazio e nutrienti (Inbar *et Chet*, 1994; Bisset, 1991; Chet *et al.*, 1997; Kubicek *et Harman*, 1998). Tra i meccanismi indiretti, invece, vi sono le modificazioni morfologiche e biochimiche elicitate nella pianta ospite stimolata dall'agente antagonista, con l'attivazione della risposta di difesa della pianta che si traduce in una maggiore resistenza a stress biotici e abiotici (Harman *et al.*, 2004). Infatti, alcuni antagonisti sono in grado di modulare i meccanismi di difesa delle piante, inducendo l'attivazione della risposta ipersensibile (*Hypersensible response*, HR) e della resistenza

sistemica indotta (*Induced Systemic Resistance, ISR*). Tale induzione di resistenza coinvolge la produzione di diversi metaboliti attivi, come proteine con attività enzimatica o proteine omologhe ai prodotti dei geni di virulenza, che fungono da elicitivi dei meccanismi di difesa (Viterbo *et al.*, 2007). Nessuno di questi meccanismi esclude l'altro ed anzi, è più frequente che l'agente di biocontrollo espliciti la sua attività antagonista attraverso diversi meccanismi di azione. In particolare, la tipologia di azione di un BCA, nel complesso processo del biocontrollo, dipende dal patogeno, dall'ospite e dalle condizioni ambientali, tra cui fondamentali risultano disponibilità di nutrienti, pH, temperatura ed umidità (Vinale *et al.*, 2008).

I BCA come microrganismi benefici delle piante possono anche promuovere direttamente il loro sviluppo e crescita favorendo l'assorbimento di acqua e nutrienti come fosforo, azoto e ferro dall'ambiente, nonché modulando la crescita della pianta attraverso la regolazione o produzione di ormoni (auxine, citochine, ed etilene) (Tall *et Meyling*, 2018). Numerosi sono i risultati sperimentali che confermano un effetto benefico dei BCAs di promozione della crescita (Plant Growth Promotion - PGP), aumento del tasso di germinazione e della produzione e miglioramento delle caratteristiche nutrizionali delle culture (Dunne *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 1988; Pierson *et Weller*, 1994; Duffy *et al.*, 1996, Pascale *et al.*, 2017).

Lo sviluppo di nuovi bioformulati per la promozione della crescita delle piante continua ad ispirare il campo della ricerca. L'aumento della fertilità del suolo, la promozione della crescita e la soppressione dei fitopatologie sono gli obiettivi fondamentali delle industrie dei bioformulati, che offrono, in questo modo, un approccio ecosostenibile per aumentare la resa quantitativa e qualitativa.

Oltre ai funghi e batteri antagonisti viventi, si stanno valutando come potenziali nuovi composti biopesticidi anche le molecole bioattive da essi sintetizzati. Le sostanze bioattive prodotte da organismi antagonisti possono agire direttamente contro i fitopatogeni, inibendone la crescita, o indirettamente, inducendo una risposta di difesa nella pianta o stimolandone la crescita (Lorito *et al.*, 1994; 1996).

In aggiunta, negli ultimi anni, molti studi sono stati finalizzati a valutare la potenziale associazione di BCAs e molecole bioattive, non solo di origine microbica ma anche appartenenti a classi di composti chiamati "botanicals", estratti di piante abili ad inibire lo sviluppo dei patogeni, indurre resistenza sistemica e promuovere la crescita e lo sviluppo delle piante (Singh *et Vijay*, 2011).

1.4.1. Il fungo benefico *Trichoderma*

Il fungo filamentoso del genere *Trichoderma* appartiene al gruppo dei Deuteromiceti. In questo gruppo, vi sono organismi principalmente colonizzatori opportunisti, saprofiti, facilmente isolabili e coltivabili sui più svariati substrati, non patogeni per le piante superiori e presenti in tutti i suoli, compresi quelli forestali e agricoli (Wardle *et al.*, 1993). Tale genere comprende funghi terricoli, che hanno una rapida crescita, con conidi unicellulari di colore verde ed ife ramificate con cellule polinucleate. Il *Trichoderma* racchiude un'elevata gamma di biotipi che si estende dai colonizzatori del suolo, con alto potenziale di biodegradazione, ai simbionti vegetali che colonizzano la rizosfera promuovendo un incremento dello sviluppo ipogeo ed epigeo della pianta.

Le diverse specie di *Trichoderma* sono capaci di utilizzare un'ampia varietà di composti come fonte di carbonio ed azoto, usando preferenzialmente l'azoto in forma ammoniacale, ma anche l'urea e i nitrati, nutrendosi di polisaccaridi complessi, purine, pirimidine, aldeidi ed acidi grassi (Danielson *et Davey*, 1973). Essendo saprofiti, molte specie sono in grado di colonizzare la sostanza organica in decomposizione come le radici delle piante se danneggiate da altri funghi o altri organismi (Davet, 1979).

1.4.1.1. Interazione *Trichoderma* - patogeno

La capacità di *Trichoderma* spp. di contenere o ostacolare lo sviluppo di patogeni vegetali è dovuta ai diversi meccanismi di azione di biocontrollo quali micoparassitismo, l'antibiosi e la competizione per spazio e nutrienti, che non agiscono necessariamente singolarmente, ma spesso sono tra loro complementari.

Il micoparassitismo consiste in un'interazione di tipo nutrizionale che si instaura tra antagonista e patogeno dove l'antagonista trae vantaggio dalla presenza del patogeno, vivendo a spese di quest'ultimo. Il fenomeno si esplica attraverso una prima fase di riconoscimento dell'ospite a distanza, seguita da una crescita chemiotattica verso lo stesso che si conclude con un'interazione fisica che porta alla formazione di strutture specializzate che consentono la penetrazione dell'ospite (Chet *et al.*, 1987) e la colonizzazione, che causa la morte dell'organismo bersaglio e che comporta una riduzione della densità d'inoculo. Durante questi processi *Trichoderma* produce diversi enzimi litici definiti "*Cell Wall Degrading Enzymes*" (CWDE), quali endochitinasi, cellulasi, glucanasi, laccasi proteasi, le

xilanasi, abili ad idrolizzare la parete cellulare del fungo parassitizzato (Kubicek *et* Harman, 1998).

L'antibiosi è un processo che consiste nella produzione, da parte di un microrganismo, di sostanze ad attività antimicrobica che inibiscono lo sviluppo o provocano la morte di altre forme di vita presenti nelle immediate vicinanze. L'antibiosi è un'attività antimicrobica diretta, un fenomeno comune, responsabile dell'antagonismo di molti agenti di biocontrollo (BCAs) batterici. Diversi studi sui meccanismi di antagonismo di *Trichoderma* hanno dimostrato il coinvolgimento di molte molecole ad attività antibiotica, dalla gliovirina e gliotossina ad α -pironi, terpeni, polichetidi, derivati isocianidici e composti appartenenti al gruppo dei peptaiboli (Vinale *et* Sivasithamparam, 2020; Vinale *et al.*, 2008a; Vinale *et al.*, 2008b). È stato documentato che molti di essi producono un effetto sinergico in combinazione con i CWDEs, incrementando l'attività inibitoria nei confronti di funghi fitopatogeni (Harman *et al.*, 2004)

La competizione per spazio e nutrienti è un fenomeno che si crea tra diverse popolazioni di individui che convivono nella stessa nicchia ecologica, che hanno le stesse esigenze fisiologiche e fisiche. La competizione di *Trichoderma* spp. nei confronti degli altri microrganismi può interessare l'approvvigionamento di nutrienti derivanti da substrati già colonizzati dai patogeni, come nel caso del biocontrollo di *Botrytis* spp. e *Sclerotinia* spp. (Dubos, 1987; Gullino, 1992), oppure l'utilizzo degli essudati radicali delle piante e dei semi germinanti, come accade nell'interazione antagonistica con *P. ultimum* (Ahmad *et* Baker, 1988). L'abilità competitiva è dovuta, tra le altre cose, alla capacità di influenzare la disponibilità di alcuni nutrienti nella rizosfera ai competitori provocandone la riduzione quali-quantitativa e diminuendo le possibilità di successo dell'infezione da parte del patogeno, ad esempio attraverso la produzione dei siderofori simili a quelli di *Pseudomonas* spp. che influenzano l'acquisizione del ferro, (Vinale *et al.*, 2013). Inoltre, la capacità di alcuni isolati di *Trichoderma* di competere per spazio e nutrienti è strettamente correlata all'abilità di alcuni ceppi di colonizzare l'apparato radicale delle piante, nota come la competenza per la rizosfera, inducendo in alcuni casi anche un miglioramento della crescita, dell'architettura e dell'efficienza delle radici (Ozbay *et* Newman, 2004).

1.4.1.2. Interazione *Trichoderma* - pianta

In aggiunta alla capacità di attaccare o inibire direttamente la crescita di agenti fitopatogeni, alcuni ceppi di *Trichoderma* interagiscono attivamente con la pianta

promuovendone la crescita, con conseguenze benefiche sulla tolleranza a stress biotici ed abiotici. Infatti, alcuni ceppi mostrano una forte “competenza per la rizosfera” che permette loro di colonizzare una vasta superficie radicale e di persistere sulle radici per diverse settimane o addirittura mesi. Questa capacità permette quindi al fungo di formare una stabile e duratura associazione con la pianta in svariate condizioni ambientali. Infatti, alcuni *Trichoderma* sono endofiti e infettano la pianta senza risultare essere patogeni, restando confinati nei primi strati delle cellule corticali e inducendo una serie di cambiamenti metabolici volti a limitare l’ingresso del fungo (Moràn-Diez *et al.*, 2021). Nell’interazione con la pianta, non solo il fungo prolifera utilizzando risorse nutrizionali fornite dalla pianta ma, come conseguenza dell’associazione con le radici, è anche favorito nella colonizzazione di nuove ed estese aree nel suolo. Invece, i vantaggi per la pianta consistono nella solubilizzazione di numerosi nutrienti utili che possono essere presenti in forma insolubile o non disponibile, che includono fosforo, ferro, rame, zinco e manganese (Altomare *et al.*, 1999). In letteratura sono riportate diverse evidenze in merito alla capacità di *T. harzianum* di favorire l’assorbimento e l’utilizzo più efficiente di composti azotati nella pianta (Fiorentino *et al.*, 2018; Harman *et al.*, 2000). Molto spesso gli effetti benefici osservati sono riconducibili alla capacità del fungo di rilasciare siderofori, composti la cui azione contrasta la scarsa biodisponibilità per la pianta dei minerali ferrosi presenti nel suolo, in particolare in terreni poco acidi (Kraemer *et al.*, 2006). Ad esempio, l’acido harzianico (HA), prodotto dal ceppo *T. harzianum* M10, ha dimostrato notevoli proprietà biologiche, tra cui la promozione della crescita delle piante e la capacità di chelare il ferro del terreno, facilitandone così l’assorbimento da parte della pianta (Vinale *et al.*, 2013).

La promozione della crescita e la tolleranza agli stress abiotici sono state inoltre correlate alla capacità del fungo benefico di stimolare la produzione di acido 3-indolacetico (IAA) e di giberelline che promuovono la crescita vegetale e lo sviluppo di radici laterali (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Pelagio-Flores *et al.*, 2017). Inoltre, diversi esperimenti hanno dimostrato che le piante colonizzate da *Trichoderma* non solo manifestano un miglioramento dell’accrescimento, ma risultano anche più verdi e con una maggiore area fogliare in correlazione con l’aumento della pigmentazione fotosintetica di clorofilla. Probabilmente, l’aumento del tasso di fotosintesi che contribuisce al vigore generale della pianta spiegherebbe la promozione della produttività delle piante colonizzate (Harman *et al.*, 2000). È interessante notare come gli effetti benefici che specie di *Trichoderma*, utilizzati in agricoltura come bioagrofarmaci o biofertilizzanti, esercitano sulle piante

risultino maggiori quanto più le condizioni di coltivazione sono lontane da quelle ideali. Infatti, aumenti significativi delle rese sono stati osservati quando le piante erano soggette a condizioni di stress o che riducevano la naturale soppressività del suolo (Lorito *et al.*, 2010). Anche la qualità di alcuni prodotti sembra essere migliorata a seguito dei trattamenti con questi funghi. Recentemente è stato osservato un incremento del contenuto di polifenoli totali e della capacità antiossidante nelle uve trattate in campo con ceppi o metaboliti di *Trichoderma* (Pascale *et al.*, 2017).

In aggiunta, l'invasione delle radici da parte di *Trichoderma* provoca un incremento nella produzione di enzimi vegetali correlati alla difesa, tra cui varie perossidasi, chitinasi, β -1,3-glucanasi, nonché l'attivazione del pathway delle lipossigenasi e delle liasi. La capacità di *Trichoderma* di stimolare l'induzione di resistenza sembra coinvolgere la produzione di diversi metaboliti attivi come proteine con attività enzimatica o proteine omologhe ai prodotti dei geni di virulenza che fungono da elicitatori dei meccanismi di difesa (Viterbo *et al.*, 2007). Altre molecole che possono stimolare l'induzione di resistenza nella pianta derivano dall'interazione che il fungo stabilisce con i patogeni e con la pianta stessa. Per esempio, l'azione degli enzimi degradativi della parete cellulare dei patogeni fungini e delle piante determina il rilascio di oligosaccaridi e di altre molecole a basso peso molecolare che possono innescare sia reazioni di antagonismo in *Trichoderma* sia reazioni di difesa della pianta (Woo *et al.*, 2007). In tal modo *Trichoderma* è in grado, non solo di produrre direttamente composti tossici nei confronti di patogeni, ma anche di stimolare fortemente le piante a produrre i propri metaboliti di difesa.

1.4.1.3. Biorisanamento e bioremedio di inquinanti con *Trichoderma*

L'abbondante produzione di conidi, insieme all'elevata resistenza e adattabilità a diverse condizioni ambientali e alla versatilità nella produzione di molteplici enzimi, conferiscono ai funghi del genere *Trichoderma* la capacità di degradare numerosi composti tossici e di crescere sui più svariati substrati e nei suoli di tutte le principali zone geografiche. Tali caratteristiche lo rendono particolarmente adatto al biorisanamento di rifiuti contenenti sostanze pericolose o di matrici ambientali contaminate, quali acque e suolo (Figura 6).

Diversi studi evidenziano la capacità di *Trichoderma* di rimozione e riduzione dei metalli pesanti da substrati contaminati, attraverso diversi meccanismi di azione. Alcune specie di *Trichoderma* tollerano e accumulano diversi metalli pesanti come rame, zinco,

cadmio e arsenico compartimentalizzandoli all'interno delle cellule fungine (Errasquin *et al.* 2003; Harman *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2010). Le specie *T. asperellum* e *T. viridae* rimuovono l'arsenico da substrati liquidi attraverso la biovolatilizzazione, convertendolo per via enzimatica alla sua forma volatile (Zeng *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2011).

Varie specie del genere *Trichoderma* sono in grado di metabolizzare gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) come naftalene, fenantrene, crisene, pirene e benzo [a] pirene (Atagana, 2009; Verdin *et al.*, 2004). La capacità di degradazione degli IPA da parte di *Trichoderma* si è dimostrata paragonabile e persino superiore e più veloce rispetto a quella di diversi funghi del marciume bianco, noti per essere eccellenti degradatori degli IPA. Le specie segnalate come degradatori di IPA includono *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride*, *T. virens* e *T. asperellum* (Argumedo-Delira *et al.*, 2012; Cerniglia *et al.* Sutherland 2010; Zafra *et al.*, 2015a).

L'effetto di fungicidi contenenti ioni metallici e sostanze chimiche su *Trichoderma* spp. è stato ampiamente studiato per valutare la possibilità di integrare diverse strategie di difesa delle piante da patogeni fungini. *Trichoderma* spp. hanno mostrato una maggiore tolleranza per i fungicidi ad ampio spettro rispetto a molti altri microbi del suolo, riscontrando la capacità di colonizzare il suolo trattato con pesticidi rapidamente (Oros *et al.*, 2011) e degradare residui di pesticidi nel suolo come clordano, lindano e DDT, pentacloronitrobenzene e pentaclorofenolo (Ezzi e Lynch 2005; Zhou *et al.* 2007; Katayama *et al.* Matsumura, 1993).

L'associazione *Trichoderma*-pianta è particolarmente adatta alla bonifica matrici con più contaminanti in quanto, oltre a contribuire attivamente alla riduzione di metalli e alla degradazione di contaminanti organici, *Trichoderma* può favorire il fitorimedio, promuovendo la crescita e la resistenza delle piante e incrementando la biodisponibilità e l'assorbimento di vari metalli e metalloidi tossici, aiutando così nelle attività di fitoestrazione (Harman *et al.* 2004b; Cao *et al.* 2008). *Trichoderma atroviridae* favorisce l'assorbimento e la traslocazione di Nichel, Zinco e Cadmio in *Brassica juncea*, mentre *T. harzianum* promuove la crescita del *Salix fragilis* in suolo multi-contaminato da metalli (Adams *et al.*, 2007). Diversi ceppi di *T. harzianum* possono disintossicare il cianuro di potassio e favorire contemporaneamente la crescita delle radici della felce *Pteris vittata*, iperaccumulatrice di arsenico (Lynch *et al.* Moffat 2005). L'applicazione combinata di funghi micorrizici arbuscolari e *T. harzianum* ha aumentato la tolleranza e l'accumulo di elevate concentrazioni di alluminio e arsenico da parte di *Eucalyptus globulus* (Arriagada *et al.*,

2007, 2009). I meccanismi messi in atto da *Trichoderma* per facilitare la tolleranza allo stress metallico nelle piante sono attribuiti in particolare ad una promozione della crescita radicale, alla protezione dai danni ossidativi nelle piante e ad una maggiore disponibilità ed efficienza di assorbimento dei nutrienti (Harman *et al.*, 2004b; Tu *et al.*, 2004; Arriagada *et al.*, 2009; Mastouri *et al.*, 2010).

Infine, sono state impiegate numerose strategie per migliorare l'applicabilità di *Trichoderma* nei processi di biorisanamento, dalla selezione di ceppi iperaccumulatori e tolleranti a numerosi composti tossici, alla mutagenesi e fusione di protoplasti. Zhou *et al.* (2007) hanno studiato la degradazione del cianuro da parte dei mutanti di *Trichoderma* costruiti mediante integrazione mediata da enzimi di restrizione (REMI), mentre Wang *et al.* (2009) hanno utilizzato questo metodo per generare un mutante di *Trichoderma* in grado di migliorare il fitorisanamento di *Brassica napus* in un suolo inquinato da cadmio.

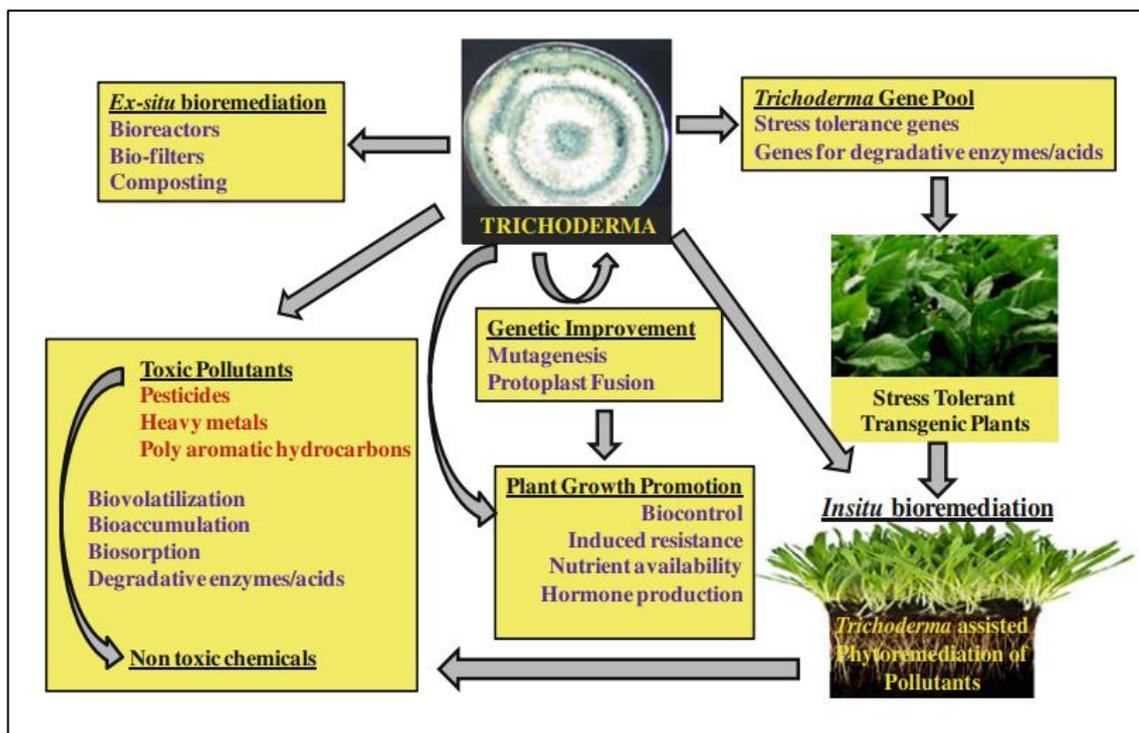


Figura 6. Possibili applicazioni di *Trichoderma* per il biorimedia degli inquinanti e la promozione della crescita delle piante. Vengono considerati la selezione genetica e lo sviluppo di piante transgeniche, attraverso l'uso di geni di *Trichoderma*, come strategie per aumentare l'efficacia del biorimedia (Fonte: Tripathi *et al.*, 2013).

2. Scopo della tesi

Il Dottorato di Ricerca (Ciclo XXXII) è stato svolto nell'ambito del Programma Operativo Nazionale "Ricerca e Innovazione 2014-2020" del Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca con riferimento all'Asse I "Capitale Umano", Azione I.1 "Dottorati Innovativi con caratterizzazione industriale". In linea con gli obiettivi del suddetto Programma di sostenere l'alta formazione in coerenza con i bisogni del sistema produttivo nazionale, sono stati svolti dei periodi di studio e ricerca presso un'impresa e all'estero, in collaborazione con:

- Il Dottore Andrea Sicari dell'Azienda Santa Rita s.r.l con Sede a Vibo Valentia (Loc. Porto Salvo) e a Napoli; e
- Il Prof. Enrique Monte, responsabile del "Laboratory of Growth Regulators" presso il Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Università de Salamanca, (Campus de Villamayor, Salamanca, Spagna).

L'azienda Santa Rita opera nel settore delle specialità alimentari tipiche calabresi, trasformando prodotti freschi nazionali provenienti da agricoltura biologica, quali olive, ortaggi e pesce, per produrre conserve e semiconserve al naturale, ottenute senza alcun ausilio di additivi di natura chimica. Essendo l'olio di oliva uno dei principali prodotti dell'azienda, le attività di ricerca si sono focalizzate sul recupero e la valorizzazione degli scarti olivicoli, e nello specifico della sansa d'oliva (OP), proveniente dal sistema di estrazione "a due fasi" dell'azienda. In particolare, OP è stata testata come substrato per la crescita di microrganismi benefici utilizzabili in agricoltura con l'obiettivo di implementare un processo produttivo a scala industriale basato sull'approccio dell'economia circolare, in cui lo scarto viene reintegrato nel ciclo di trasformazione per generare prodotti dall'elevato valore aggiunto. A tale scopo è stato analizzato un processo di fermentazione in fase liquida, con macchinari già in via di sviluppo, direttamente all'interno della sede aziendale di Vibo Valentia. Lo stage, è stato condotto per implementare il sistema proposto per il recupero, riciclo e fermentazione della sansa con microbi selezionati. L'obiettivo principale è stato di sviluppare una potenziale produzione di bioformulati, biostimolanti, biofertilizzanti o bioammendanti utilizzabili in ambito agricolo per la promozione della produzione e la difesa ecosostenibile delle colture.

Il gruppo di ricerca diretto dal Prof. Enrique Monte è riconosciuto a livello internazionale per lo studio di microrganismi benefici in agricoltura, ed in particolare per i ceppi fungini del genere *Trichoderma*. Il gruppo di ricerca è anche coinvolto in numerosi progetti per l'implementazione di bioformulati a base di *Trichoderma* applicabili per il miglioramento delle rese produttive e la difesa in campo. Inoltre, il gruppo di ricerca collabora attivamente con la "Sociedad Cooperativa General Agropecuaria, ACOR" azienda spagnola leader nel settore della produzione e commercializzazione di zucchero e oli alimentari e diversi prodotti destinati all'alimentazione animale. Al momento dello stage nel laboratorio, sono state fornite dall'Azienda le farine provenienti dall'estrazione dell'olio di Colza e di Girasole per svolgere indagini sul loro riutilizzo. Le attività di ricerca svolte presso la sede estera hanno riguardato lo sviluppo di nuove alternative all'uso tradizionale di questi sottoprodotti come mangimi, attraverso l'utilizzo dei microrganismi benefici del genere *Trichoderma*. Lo stage di ricerca si è focalizzato sull'impiego delle farine come substrato di crescita di *Trichoderma* spp., analizzandone le caratteristiche e la capacità di diversi ceppi fungini nel recupero qualitativo del sottoprodotto, come integratore nel suolo, per la crescita delle piante.

In sintesi, lo scopo di questa ricerca di tesi è di studiare e sviluppare un processo di valorizzazione dei sottoprodotti provenienti dall'estrazione dell'olio di oliva (OP), di colza (RS) e di girasole (SF) attraverso l'uso di microrganismi selezionati.

La suddivisione degli obiettivi viene elencata in seguito, riportando in tra parentesi i titoli dei capitoli della tesi relativi a ciascuno degli obiettivi identificati:

1. Isolare microbi da suoli contaminanti, identificarli per individuare i ceppi già noti come possibili microbi benefici nelle produzioni agricole (- Isolamento e identificazione di specie fungine da suolo contaminato -).
2. Determinare i microbi resistenti ai composti inquinanti, per selezionare i potenziali ceppi per le prove sui sottoprodotti oleari (- Selezione dei ceppi fungini potenzialmente utilizzabili in agricoltura -).
3. Selezionare i ceppi che hanno effetti positivi sulla crescita e sviluppo delle piante, e capacità di biocontrollo contro i fitopatogeni per la loro applicazione in ambito agricolo come biopesticidi e biostimolanti delle colture (- Selezione dei ceppi fungini potenzialmente utilizzabili in agricoltura; Valutazione degli effetti di *Trichoderma* spp. sulle piante -).

4. Individuare le condizioni per l'allevamento dei funghi sui sottoprodotti oleari OP, RS e SF utilizzati come substrato liquido e/o solido (- Valutazione della capacità dei funghi di crescere sui sottoprodotti oleari; Fermentazione in Stato Solido (SSF) dei sottoprodotti tal quali con *Trichoderma* -).
5. Valutare l'effetto sulla crescita delle piante dei sottoprodotti oleari (- Valutazione degli effetti dei sottoprodotti oleari incorporati nel terreno sulla crescita delle piante -).
6. Testare le combinazioni di sottoprodotti oleari trattati con i funghi selezionati sulla crescita delle piante (- Effetti sulla germinazione e crescita delle piante dei filtrati provenienti dalla coltura liquida di *Trichoderma* sui sottoprodotti oleari; Valutazione degli effetti dei sottoprodotti SF ed RS pretrattati con *Trichoderma* in Fermentazione in Stato Solido sulla coltivazione di pomodoro; Valutazione dell'effetto del sottoprodotto OP50 colonizzato da *Trichoderma* T22 sulla promozione della crescita di pomodoro in campo -).
7. Sviluppare un impianto pilota meccanizzato a scala industriale per valorizzare i sottoprodotti con i microbi benefici (- Impianto pilota per trasformazione della sansa di oliva nell'Azienda Santa Rita s.r.l. -).

Lo scopo finale è di sviluppare un processo biotecnologico potenzialmente utilizzabile su scala aziendale, per permettere alle aziende agroalimentari di processare in autonomia i sottoprodotti dalla propria filiera, utilizzandoli come substrato per l'allevamento di microbi selezionati per ottenere un prodotto dal maggiore valore, da applicare come ammendante o biostimolante nei diversi sistemi colturali.

In questa maniera, il biorisanimento e riciclo degli scarti soddisfano il concetto di economia circolare ed economia verde, contribuendo allo sviluppo dell'agricoltura ecosostenibile.

3. Isolamento e identificazione di specie fungine da suolo contaminato

3.1. Materiali e metodi

3.1.1. Raccolta dei campioni suolo

Un sito contaminato è stato individuato per i prelievi dei campioni di suolo con lo scopo di isolare di ceppi fungini resistenti e capaci di crescere e/o degradare inquinanti antropici. Il sito, localizzato nella zona industriale a sud di Marcianise (Regione Campania, Italia- 41 ° 00'48.9 "N - 14 ° 17'49.7" E), è adiacente ad un'azienda operante nel settore dello smaltimento e riciclo di batterie esauste per autoveicoli e rifiuti metallici industriali. In uno studio precedente (Visconti *et al.*, 2018), la Sezione di Agronomia del Dipartimento di Agraria (UNINA), ha svolto un'analisi chimica del suolo dello stesso sito e classificato il contenuto dei metalli pesanti secondo la procedura indicata per l'analisi del rischio sanitario ambientale nell'Art. 240 del D.lgs 152/06. L'analisi ha evidenziato che la concentrazione nel suolo di metalli pesanti, in particolare di cadmio (Cd) e piombo (Pb), è al di sopra dei limiti della cosiddetta "concentrazione soglia di contaminazione" (CSC). I valori indicano che il sito è altamente contaminato e costituisce un rischio elevato per la salute dei lavoratori e delle persone esposte. La Figura 7 mostra la mappatura del grado di contaminazione del sito sulla base della concentrazione di Pb riscontrato nel suolo, classificando le parcelle per tre diversi livelli di contaminazione: **Basso: Pb < 1 g/kg**, **Medio: 1 < Pb < 10 g/kg** e **Alto: Pb >10 g/kg**. Il campionamento del suolo è stato eseguito su 3 parcelle, ciascuna relativa ad uno dei tre livelli di contaminazione. In particolare, da ogni parcella sono stati raccolti tre campioni di suolo a circa 10-20 cm di profondità dalla zona della rizosfera, prelevando il terreno intorno alle radici di piante spontanee presenti nel punto di campionamento in apposite buste di plastica. Inoltre, è stato prelevato un campione di un suolo non contaminato in una zona confinante ed esterna al sito contaminato ed utilizzato come controllo "positivo" per la determinazione dei ceppi fungini eventualmente presenti. In totale, 12 campioni sono stati raccolti e conservati in frigo a 4°C, fino all'analisi presso il laboratorio di Patologia vegetale della Dipartimento di Agraria (UNINA).



Figura 7. Mappatura delle posizioni dei campionamenti del suolo nel sito contaminato e il relativo livello di contaminazione da piombo (Pb). Il livello di contaminazione da Pb è indicato con i punti in verde per un livello basso ($Pb < 1 \text{ g/kg}$ suolo); in rosso per un livello medio ($1 < Pb < 10 \text{ g/kg}$) e in nero per un livello alto ($Pb > 10 \text{ g/kg}$). I campioni di suolo analizzati nel presente studio sono stati prelevati all'interno dei riquadri in rosso 1, 2 e 3, in rappresentanza di ciascuno dei tre diversi livelli di contaminazione.

3.1.2. Isolamento dei ceppi fungini

L'isolamento dei microrganismi fungini dal suolo del sito contaminato è stato eseguito sulla base del protocollo indicato nello studio di Caruso *et al.* (2020) apportando modifiche non sostanziali.

Una sospensione di suolo è stata preparata in acqua e sottoposta a diluizioni seriali secondo lo schema riportato di seguito:

- Diluizione iniziale 1:10 → 10 gr di suolo sono stati diluiti in una soluzione composta da 100 ml di acqua e Ringer e 0.162 gr di pirofosfato di sodio e posti in agitazione per 30 minuti a temperatura ambiente su un agitatore vortex (Fisherbrand™)
- Dalla diluizione iniziale sono state effettuate delle diluizioni seriali 1:10 fino a 10^{-4}
- 100 μL delle diluizioni 10^{-3} e 10^{-4} sono prelevati e distribuiti omogeneamente con apposite anse microbiologiche ad L su piastre Petri (90 mm) contenenti substrato

solido selettivo Rose Bengal Agar (RBA; HiMedia) con Igepal (Sigma-Aldrich) allo 0,1% v/v .

Tre piastre sono state preparate per ogni diluizione e incubate al buio a 25°C per 5 giorni, monitorando ogni 24 ore la crescita delle colonie fungine. Il numero totale delle colonie fungine sulle piastre di RBA è stata espressa in Unità Formanti Colonie (CFU/gr di suolo).

Le colonie morfologicamente differenti sono state isolate in coltura pura su PDA e sottoposte a caratterizzazione macroscopica e microscopica utilizzando il microscopio Leitz HM-Lux (Leitz, Germania).

3.1.3. Identificazione molecolare dei ceppi fungini isolati

Ciascuna colonia fungina è stata isolata, trasferita su nuovo substrato per ottenere una coltura pura, da utilizzare per l'identificazione molecolare della specie fungina. L'estrazione del DNA è stata realizzata impiegando il NucleoSpin® Soil Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) secondo il protocollo riportato dal kit e l'analisi del DNA ribosomiale (rDNA) è stata eseguita secondo le indicazioni di de Graaff *et al.* (1988).

L'identificazione molecolare è stata effettuata attraverso la tecnica del PCR (Polymerase Chain Reaction), impiegando la sequenza dell'Internal Transcribed Spacer (circa 500 bp) del rDNA per i funghi, utilizzando i primers descritti nello studio di White *et al.* (1990):

- ITS1 Forward (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')
- ITS4 Reverse (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

I campioni sono stati amplificati utilizzando il Thermal Cycler MiniAmp (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) impostando il programma di:

- Denaturazione iniziale: 95°C, 3 minuti
- Amplificazione: 35 cicli
- Denaturazione iniziale: 95°C, 30 secondi
- Annealing (allineamento): 52°C, 30 secondi
- Allungamento: 72°C, 1 minuto
- Allungamento finale: 72°C, 10 minuti

I prodotti di PCR sono stati separati per elettroforesi su gel di agarosio (1% p/v) e quantificati attraverso metodo fluorimetrico con il Qubit® 2.0. Gli ampliconi sono stati purificati impiegando il kit Pure Link Quick PCR purification (Invitrogen, Waltham, MA, USA),

sequenziati (Eurofins Genomics _Vimodrone, Milano, Italia) e confrontati, per similitudine, con le banche dati su piattaforma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), contenenti le sequenze depositate per i funghi identificati. Dopo l'identificazione molecolare, tutte le specie fungine sono state successivamente conservate in monocultura. Per ogni fungo identificato un plug di micelio fresco è stato prelevato dalla coltura pura, inserito in Eppendorf contenente una soluzione di glicerolo al 20% e conservate a - 20 °C. Inoltre, i conidi delle specie selezionate per i successivi esperimenti sono stati raccolti utilizzando 10 mL di acqua distillata sterile con 0,1% Tween-20, quindi filtrati per allontanare i residui di micelio, sciacquati con acqua distillata sterile, contati con un vetrino contaglobuli (camera di Burker) e conservati a -20°C in una soluzione acquosa di glicerolo 20% (v/v) fino al loro utilizzo.

3.2. Risultati

Dal confronto delle sequenze nucleotidiche di campioni fungini con le banche dati (BLAST), sono state selezionate le identità che presentano delle percentuali di query cover e di identificazione/similitudine maggiore del 95% con le specie corrispondenti. L'analisi morfologica e molecolare ha permesso di identificare 45 isolati fungini diversi (Tabella 2). L'analisi molecolare mostra che i ceppi isolati appartengono a 24 generi differenti. Quello più abbondante in termini di numero di isolati è il genere *Aspergillus* con un totale di 10 isolati. In particolare, due isolati diversi sono stati identificati per ciascuna delle specie *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. ustus*. Sono state inoltre identificate le specie *A. crustosus*, *A. affinis*, *A. versicolor* e *A. westerdijkiae*. Appartenenti al genere *Fusarium*, si riscontrano 4 specie diverse identificate come *F. chlamydosporum*, *F. equiseti*, *F. nigrum* e *F. solani*. Un totale di 4 isolati appartiene al genere *Penicillium*, identificati come *P. pimateouiense* (2 isolati), *P. chrysogenum* e *P. brevicompactum*. Tre isolati del genere *Clonostachys* sono identificati come *C. rosea* (2 isolati) e *C. divergens*. Infine, sono presenti due isolati delle specie *Trichoderma harzianum*, *Talaromyces pinophilus* e *Chaetomium sphaerale*. Il numero di ceppi fungini isolati dal suolo con contaminazione alta, media e bassa è pari rispettivamente a 25, 9 e 11. Inoltre, la carica fungina (CFU: Colony Forming Units) (dati non mostrati), è risultata maggiore nei campioni di suolo con un livello di contaminazione alto. Infatti, per questi ultimi è stata evidenziata una carica fungina di circa 10^6 CFU/g di suolo, mentre nei campioni di suolo con contaminazione medio e basso le CFU sono risultate nell'ordine di circa 10^5 CFU/g, al pari del suolo non contaminato.

Tabella 2. Identità dei funghi isolati dal suolo del sito contaminato tramite identificazione molecolare PCR, amplificando e sequenziando il frammento del ITS1-ITS4. Identità del fungo, del genere o della specie, basata sulla % di query cover e la % simultudine di identificazione. L'ultima colonna indica il livello di contaminazione da Pb del suolo da cui è stato effettuato l'isolamento 1: basso ($Pb < 1$ g/kg di suolo); 2: medio ($1 < Pb < 10$ g/kg); 3: alto ($Pb > 10$ g/kg di suolo).

Sigle del campione	Fungo Identità - genere, specie	Query cover %	Ident. %	Livello di contaminazione da Pb
E37	<i>Absidia</i> sp.	100	99	1
E25	<i>Acremonium persicinum</i>	98	99	2
E60	<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	99	100	1
E61	<i>Alternaria</i> sp.	95	99	3
E3	<i>Aspergillus crustosus</i>	99	96	3
E40	<i>Aspergillus affinis</i>	98	100	3
E15	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99	99	1
E51	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99	99	1
E62	<i>Aspergillus niger</i>	99	99	3
E17	<i>Aspergillus niger</i>	98	100	3
E75	<i>Aspergillus ustus</i>	100	99	2
E86	<i>Aspergillus ustus</i>	99	99	2
E80	<i>Aspergillus versicolor</i>	100	99	2
E59	<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	98	100	2
E44	<i>Beauveria bassiana</i>	99	99	3
E67	<i>Bipolaris cynodontis</i>	98	100	1
E27	<i>Chaetomium sphaerale</i>	99	99	3
E49	<i>Chaetomium sphaerale</i>	98	99	3
E56	<i>Cladosporium</i> sp.	98	99	3
E42	<i>Clonostachys divergens</i>	98	95	1
E29	<i>Clonostachys rosea</i>	98	95	2
E43	<i>Clonostachys rosea</i>	89	99	1
E71	<i>Epicoccum nigrum</i>	96	98	3
E24	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	100	99	3
E26	<i>Fusarium equiseti</i>	99	99	3
E28	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	100	3
E4	<i>Fusarium solani</i>	100	99	3
E6	<i>Geosmithia</i> sp.	88	89	3
E30	<i>Gliomastix polychroma</i>	99	99	3
E13	<i>Humicola</i> sp.	98	99	3
E64	<i>Penicillium chrysogenum</i>	98	99	3
E79	<i>Penicillium pimateouiense</i>	98	99	2
E32	<i>Penicillium brevicompactum</i>	99	99	3
E16	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99	99	3
E19	<i>Pyrenochaetopsis leptospora</i>	100	99	3
E27	<i>Scytalidium lignicola</i>	98	100	2
E74	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	99	99	3
E12	<i>Stagonospora</i> sp.	98	96	1
E76	<i>Stagonospora</i> sp.	97	96	1
E22	<i>Strachybotrys chlorohalonata</i>	99	100	3
E2	<i>Talaromyces pinophilus</i>	99	99	1
E8	<i>Talaromyces pinophilus</i>	100	98	1
E36	<i>Trichoderma harzianum</i>	98	99	3
E45	<i>Trichoderma harzianum</i>	99	100	3
E52	<i>Trichothecium crotocinigenum</i>	97	96	2

3.3. Discussione

In linea con i risultati ottenuti in questa prova, diversi autori hanno riscontrato i generi *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* e *Trichoderma* tra i più abbondanti in suoli contaminati da piombo (Pb), rame (Cu), cadmio (Cd), arsenico (As) e zinco (Zn) (Iram *et al.*, 2009; Zafar *et al.*, 2007; Fazli *et al.*, 2015).

I microorganismi possono adottare numerosi meccanismi che gli permettono di sopravvivere in presenza di inquinanti, come ad esempio la capacità di modificare la membrana cellulare per mantenere le funzioni biologiche necessarie (de Carvalho *et al.*, 2012), la produzione di composti tensioattivi come biosurfattanti (Ron *et Rosenberg*, 2002) e l'uso di pompe di efflusso per diminuire la concentrazione di composti tossici all'interno delle cellule (Van Hamme *et al.*, 2003).

La caratterizzazione dettagliata del grado di inquinamento del suolo ha permesso di prelevare i campioni per l'isolamento in maniera puntuale, in base al livello di contaminazione presente nel punto di campionamento. In questo studio non sono state svolte analisi relativamente alla correlazione tra la composizione e l'abbondanza microbica e il livello di contaminazione del suolo. Tuttavia, alcuni autori hanno riscontrato diversi effetti dell'inquinamento da metalli pesanti sulla diversità microbica del suolo, mentre altri studi non hanno rilevato alcuna correlazione tra tali fattori (Chodak *et al.*, 2013; Op De Beeck, 2013; Iram *et al.*, 2009). Tale discordanza potrebbe essere dovuta a numerose variabili quali ad esempio le specie metalliche coinvolte e il grado di contaminazione dei suoli oggetto di studio, nonché l'effettiva tossicità degli ioni metallici. Inoltre, anche le caratteristiche chimico-fisiche del suolo come la sostanza organica, il pH e la capacità di scambio cationico possono influenzare fortemente la biodisponibilità dei metalli e quindi la comunità microbica stessa (Chodak *et al.*, 2013; Op De Beeck, 2013; Iram *et al.*, 2009). I microorganismi, per la loro biodiversità e per le loro grandi potenzialità cataboliche, vengono ampiamente sfruttati per il biorisanamento di matrici ambientali contaminate, quali acque e suolo e di rifiuti contenenti sostanze pericolose (Van der Geize *et Dijkhuizen*, 2004; Thyagi *et al.*, 2011; Khomenkov *et al.*, 2008). La capacità di adattamento a elevati livelli di contaminazione del suolo da metalli pesanti suggerisce un potenziale uso dei ceppi isolati per il biorimediazione. In particolare, questo studio ha mirato ad isolare i microorganismi da un suolo contaminato da metalli pesanti dato che una delle problematiche riscontrate

nell'impiego di ammendanti provenienti dai rifiuti organici è l'elevata contaminazione da questi composti (Farrell *et Jones*, 2009).

Sulla base di una ricerca bibliografica, tra i 45 microrganismi isolati ed identificati, è stato focalizzato l'interesse sulle specie fungine con caratteristiche ecologiche e metaboliche potenzialmente utili in agricoltura e/o nell'ambito del biorimedia. In particolare, sono state selezionate le specie note in letteratura per la capacità di resistere a stress abiotici e per essere impiegati in processi di biorisanamento quali: *S. chlorohalonata* (E22); *A. niger* (E62); *T. harzianum* (E45); *C. rosea* (E43); *A. versicolor* (E80); *A. niger* (E17); *T. pinophilus* (E2); *P. chrysogenum* (E16); *Mucor* sp. (E5); *Absidia* sp. (E37) (Carstens, 2018; Acosta-Rodriguez *et al.*, 2017; Hoseinzadeh *et al.*, 2017; Cecchi *et al.*, 2017; Kour *et al.*, 2021; Rudakiya *et al.*, 2021; Din *et al.*, 2021).

4. Selezione dei ceppi fungini potenzialmente utilizzabili in agricoltura

4.1. Valutazione della capacità dei ceppi isolati di svilupparsi in presenza di inquinanti antropici

4.1.1. Materiali e metodi

I 10 funghi selezionati: *S. chlorohalonata* (E22); *A. niger* (E62); *T. harzianum* (E45); *C. rosea* (E43); *A. versicolor* (E80); *A. niger* (E17); *T. pinophilus* (E2); *P. chrysogenum* (E16); *Mucor* sp. (E5); *Absidia* sp. (E37) (Carstens, 2018; Acosta-Rodriguez *et al.*, 2017; Hoseinzadeh *et al.*, 2017; Cecchi *et al.*, 2017; Kour *et al.*, 2021; Rudakiya *et al.*, 2021; Din *et al.*, 2021) sono stati oggetto di ulteriori valutazioni *in vitro* per determinare la loro capacità di svilupparsi in presenza degli altri inquinanti antropici, in particolare del rame, che è comunemente impiegato nella difesa delle colture agricole. I funghi sono stati allevati su Potato Dextrose Agar (PDA, HIMEDIA, India) in piastre Petri in condizioni di sterilità.

Un primo saggio è stato allestito in piastre ELISA da 24 pozzetti, contenente ciascuno 1,5 ml di PDA con diverse concentrazioni di CuSO_4 : 3 mM, 1,5 mM, 0.3 mM, 0.1 mM. Dopo solidificazione del substrato, un disco di micelio del fungo di 0,5 cm di diametro è stato prelevato al margine delle colture fungine in crescita e posizionato al centro di ogni pozzetto. Il controllo è stato ottenuto inoculando i funghi in pozzetti contenenti PDA, senza CuSO_4 . Le piastre sono state incubate a 25°C al buio, e sono state osservate visivamente dopo 8 giorni per valutare la crescita del micelio. Per ogni combinazione tra l'isolato e la concentrazione di CuSO_4 sono state effettuate due repliche.

I microrganismi che hanno mostrato una maggiore tolleranza al CuSO_4 sono stati testati in un secondo saggio *in vitro* in coltura liquida. Tre dischi di agar di 0,5 cm di diametro prelevati al margine delle colture in crescita dei diversi isolati, sono stati posti in beute contenenti 100 ml di PDB (Potato Dextrose Broth, HIMEDIA, India) arricchito con CuSO_4 alle seguenti concentrazioni: 3 mM; 1,5 mM; 0.3 mM. Il controllo è stato ottenuto allevando i ceppi esclusivamente in PDB.

Le beute sono state incubate ad una temperatura di 25°C, con agitazione orbitale ed esposte quotidianamente a 12 ore di luce. Dopo 14 giorni di crescita è stata raccolta la biomassa fungina, filtrando la coltura liquida con tessuto non tessuto (TNT). Sono stati determinati il peso fresco e a seguito di liofilizzazione, il peso secco della biomassa fungina. Successivamente è stata determinata la concentrazione del rame residuo nei filtrati colturali sulla base del protocollo riportato da Wen *et al.* (2017), utilizzando lo

spettrofotometro Jasco V-730 a due diversi valori UV/VIS nello spettro di assorbanza del Cu (275 e 630 nm).

4.1.2 Risultati

I risultati evidenziano un andamento di crescita diverso a seconda del fungo considerato (Figura 8). In particolare, lo sviluppo dei ceppi *T. harzianum* (E45), *A. niger* (E62 ed E17), *C. rosea* (E43) non è rallentato dalla presenza nel mezzo di CuSO_4 per nessuna delle concentrazioni testate. Invece, i ceppi *P. chrysogenum* (E16), *T. pinophilus* (E2), *Mucor* sp. (E5) e *Absidia* sp. (E37) mostrano un rallentamento della crescita all'aumentare della concentrazione di CuSO_4 nel substrato. Per i ceppi *A. versicolor* (E80), *S. chlorohalonata* (E22) non è stato possibile, nei tempi previsti dal saggio, valutare gli effetti del rame sulla crescita miceliale, data la lentezza intrinseca con la quale i due microrganismi si sviluppano. Per ceppi *T. pinopilus* (E2), *Mucor* sp. (E5), *Absidia* sp. (E37), *C. rosae* (E43), *T. harzianum* (E45); *A. niger* (E62), *A. versicolor* (E80) è stato allestito un ulteriore saggio *in vitro* per verificare oltre che la crescita dei funghi in presenza di CuSO_4 , la capacità di assorbire e/o metabolizzare il metallo nel tessuto fungino. Si evidenzia che tutti i ceppi presentano una riduzione della crescita dose dipendente. Infatti, lo sviluppo miceliale è rallentato e/o inibito completamente all'aumentare della concentrazione del rame nel mezzo (Tabella 3). La crescita dei ceppi *Absidia* sp. (E37), *C. rosae* (E43) ed *A. versicolor* (E80), è ridotta già alla concentrazione di rame pari a 0,3 mM, in confronto agli altri funghi, ed è totalmente inibita alla concentrazione di 3mM. I ceppi più tolleranti al rame risultano essere *A. niger* (E62), seguito da *T. pinopilus* (E2) e *Mucor* sp. (E5) per i quali, alla concentrazione di CuSO_4 di 3mM, è stata registrata una riduzione percentuale del peso secco della biomassa rispettivamente del 18,5%, 50,5% e 55,3%. I risultati ottenuti per *T. harzianum* (E45), suggeriscono una moderata tolleranza al composto in esame, infatti alla concentrazione di rame di 3 mM si è verificata una riduzione percentuale del peso secco della biomassa di circa il 75%.

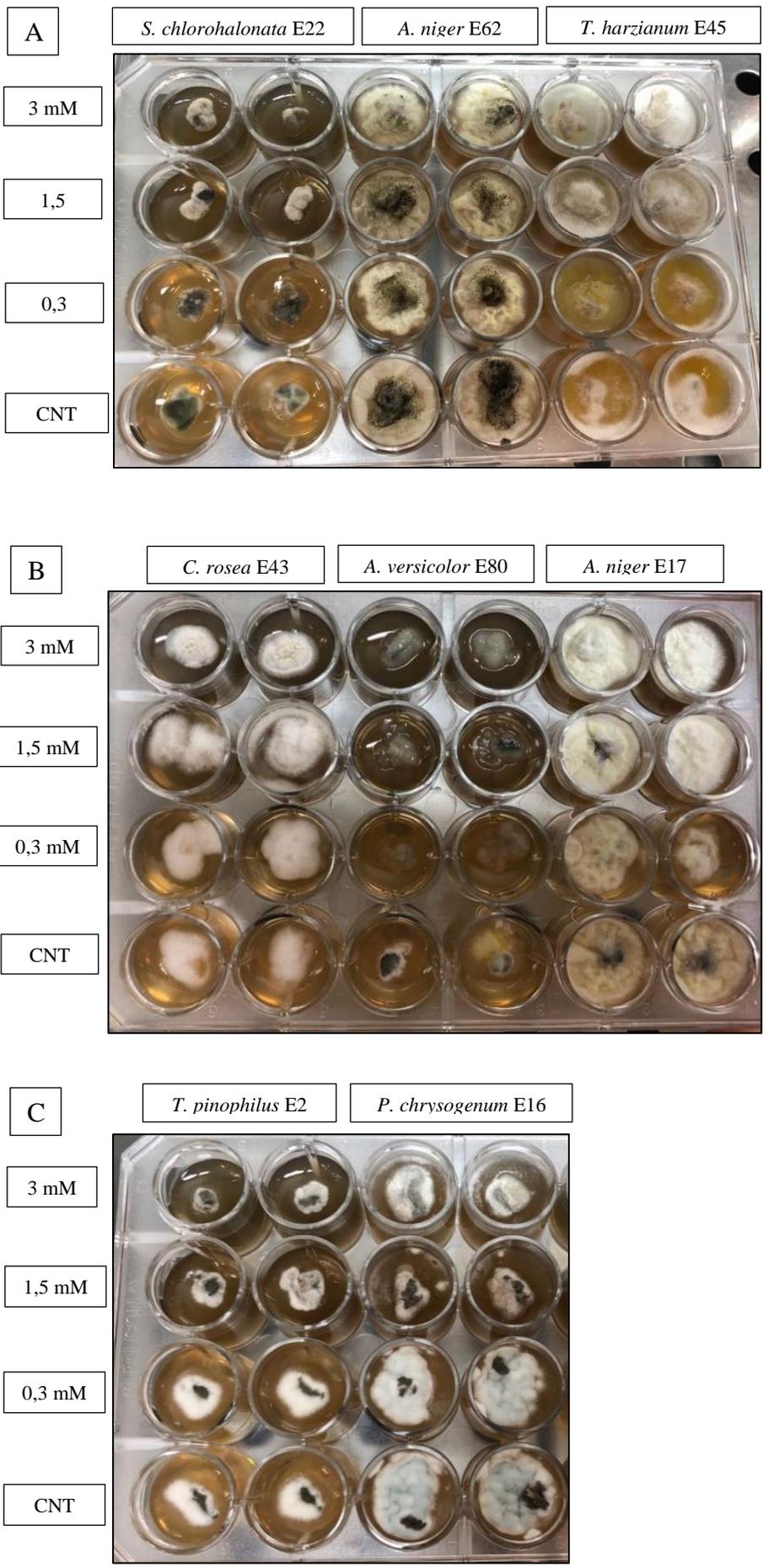


Figura 8. Crescita dei ceppi fungini in substrato di PDA contenente CuSO_4 alle concentrazioni di: 0

(CNT), 0.1 mM, 0.3 mM, 1,5 mM e 3 mM. I funghi testati sono: (A) *Strachybotrys chlorohalonata* E22, *Aspergillus niger* E62, *Trichoderma harzianum* E45; (B) *Clonostachys rosea* E43, *Aspergillus versicolor* E80, *Aspergillus niger* E17; C. *Talaromyces pinophilus* E2; *Penicillium chrysogenum* E16.

Tabella 3. Percentuale di riduzione del peso secco della biomassa dei funghi testati in coltura liquida arricchita con CuSO_4 a varie concentrazioni (0,3 mM, 1,5 mM e 3 mM) rispetto al controllo PDB non arricchito dopo 14 gg di allevamento.

Fungal strain	% reduction of dry weight biomass		
	CuSO_4 0,3 mM	CuSO_4 1,5 mM	CuSO_4 3 mM
<i>T. pinophilus</i> (E2)	5,3	28,9	50,5
<i>Mucor</i> sp. (E5)	5,3	28,0	55,3
<i>Absidia</i> sp. (E37)	38,7	70,5	100
<i>C. rosae</i> (E43)	30,8	44,8	100
<i>T. harzianum</i> (E45)	11,4	40,1	75,6
<i>A. niger</i> (E62)	1,6	6,3	18,5
<i>A. versicolor</i> (E80)	39,5	100	100

La capacità di ridurre il CuSO_4 nel substrato varia in maniera sostanziale a seconda della specie e della concentrazione di CuSO_4 (Tabella 4). Per quanto riguarda il substrato contenente 0,15 mM di CuSO_4 , i ceppi *T. harzianum* e *A. niger* riducono il contenuto totale di rame del 28% e 35% rispettivamente. Ad una concentrazione di CuSO_4 pari a 0,3 mM le specie che mostrano la maggiore capacità di assorbire il rame sono state *C. rosae* e *T. harzianum*. Quest'ultimo dimostra essere il più performante, anche nel substrato contenente 1,5 mM di CuSO_4 . Infine, *A. niger* è in grado di dimezzare il contenuto di rame nel substrato a maggiore concentrazione di CuSO_4 .

Tabella 4. Percentuale di riduzione in CuSO_4 dopo 14 gg di crescita dei funghi selezionati nei substrati contenenti CuSO_4 alle concentrazioni tra 0,15 mM a 3 mM.

Fungal strain	% reduction of CuSO_4			
	0,15 mM	0,3 mM	1,5 mM	3 mM
<i>T. pinophilus</i> (E2)	0	6%	35%	0
<i>Mucor</i> sp. (E37)	18%	30%	35%	23%
<i>Absidia</i> sp. (E37)	19%	26%	36%	0
<i>C. rosae</i> (E43)	24%	45%	28%	0
<i>T. harzianum</i> (E45)	28%	41%	37%	16%
<i>A. niger</i> (E62)	35%	23%	32%	53%
<i>A. versicolor</i> (E80)	12%	15%	12%	0%

4.1.3. Discussione

I ceppi di *T. harzianum* E45 e *A. niger* E62 sono, tra i funghi testati, quelli più tolleranti e performanti in termini di crescita della biomassa e capacità di riduzione del rame.

La specie *A. niger* è ampiamente riconosciuta per la sua tolleranza e capacità di assorbimento di metalli pesanti ed in particolare Cu (Gupta *et al.* 2015; Cavalcanti *et al.* 2015). Diversi studi hanno rilevato che la specie *T. harzianum* è in grado di crescere su substrati contaminati mostrando un'elevata capacità di assorbimento e rimozione di numerosi metalli pesanti tra i quali Cu e Pb, Nichel (Ni), Zinco (Zn) (Zafar *et al.*, 2007; Anand *et al.*, 2006; Yazdani *et al.*, 2010; Siddiquee *et al.*, 2013). In particolare, gli autori Iskandar *et al.* (2011) hanno dimostrato che tra 41 funghi isolati da una matrice contaminata, *A. niger* e *T. asperellum* sono state la specie con maggiore capacità di crescita e di rimozione di Cu da PDB arricchito con tale metallo. Lo stesso studio dimostra inoltre che l'aumento del metallo nel substrato provoca una progressiva riduzione del peso secco della biomassa fungina. Pur non potendo essere distrutti biologicamente, i metalli pesanti possono essere rimossi o ridotti dai microrganismi attraverso vari meccanismi che includono: la biotrasformazione, il biosorbimento, il bioleaching, la biomineralizzazione e il bioaccumulo (Verma *et Sharma*, 2017). I funghi possono rimuovere il Cu attraverso i meccanismi simultanei di bioaccumulo e biosorbimento (Zhang *et al.*, 2021). La capacità di bioaccumulo può essere attribuita alla presenza all'interno delle cellule fungine delle metallotioneine, proteine con un'elevata affinità di legame con il Cu mentre il biosorbimento è il risultato dell'interazione ionica e la formazione di complessi tra gli ioni metallici e i gruppi funzionali presenti sulla membrana cellulare (Iram *et al.*, 2015)

I risultati ottenuti in questo studio confermano il potenziale dei ceppi di *A. niger* (E62) e *T. harzianum* (E45) come agenti di biorimediazione per la rimozione del Cu da matrici contaminate. L'elevata tolleranza a matrici inquinate e l'efficacia nella riduzione dei contaminanti ne suggerisce un potenziale impiego per il biorimediazione e la valorizzazione dei rifiuti.

4.2. Saggi di biocontrollo *in vitro*

4.2.1. Materiali e metodi

Al fine di verificare ulteriormente l'utilità in agricoltura, tra i funghi isolati ed identificati, sono stati selezionati 3 ceppi appartenenti a *Clonostachys rosae* E43; *Trichoderma harzianum* E45; *Talaromyces pinophilus* E2, di cui sono note, da letteratura, le loro capacità antagoniste nei confronti di agenti fitopatogeni (Lorito *et al.*, 2010, Woo *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2020; Abdel-Rahim *et al.*, 2018).

Per i ceppi selezionati sono stati allestiti saggi di “*plate confrontation*” o competizione diretta tra l'antagonista e il patogeno in piastra per determinare la capacità di biocontrollo. I saggi *in vitro* sono stati condotti con i fitopatogeni tellurici (*Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotium* e *Fusarium solani*) e i patogeni fogliari (*Alternaria alternata* e *Botrytis cinerea*), appartenenti alla collezione micologica del Laboratorio di Patologia Vegetale del Dipartimento di Agraria (UNINA).

Culture fungine pure sono state allevate su piastre contenenti PDA alla temperatura di 25°C fino a completo sviluppo del micelio sul substrato. Sono stati prelevati dischi di 5 mm di diametro dalle colture del patogeno e dell'antagonista, posti in piastre di PDA in posizione diametralmente opposta, e le piastre sono state incubate a 25°C. Per ogni combinazione antagonista/patogeno sono state effettuate cinque repliche. La crescita miceliale del fungo antagonista e del fungo patogeno è stata misurata ogni 12 ore per i successivi 7 giorni. La capacità dell'antagonista di inibire o limitare lo sviluppo dei funghi patogeni è stata valutata osservando le seguenti attività:

- Micoparassitismo; osservabile dallo sviluppo di una zona di schiarimento o attività di lisi delle ife del fungo patogeno dovuto alla produzione enzimatica dell'antagonista, o sovrapposizione del micelio dell'antagonista su quello del patogeno;
- Antibiosi; osservabile dalla formazione di un alone di inibizione, che impedisce il contatto fisico tra il micelio fungino grazie al rilascio da parte dell'antagonista di metaboliti tossici di natura volatile e non-volatile.

4.2.2. Risultati

Il fungo *C. rosae* E43 ha rallentato significativamente la crescita radiale dei due patogeni fogliari *A. alternata* e *B. cinerea*, mostrando attività di micoparassitismo (Figura 9). Nessun effetto, invece è stato evidenziato nei confronti dei patogeni tellurici *R. solani*, *S. sclerotium* e *F. solani*. Per il ceppo *T. pinophilus* E2 i risultati sono stati inficiati dalla

crescita di micelio a partire da spore disperse accidentalmente sulla superficie della piastra e lontane rispetto al punto di inoculo del fungo antagonista. Per quanto riguarda il ceppo di *T. harzianum* E45, i risultati ottenuti hanno evidenziato la capacità del microrganismo di limitare e ridurre, mediante un meccanismo di micoparassitismo lo sviluppo di tutti i patogeni saggiati (Figura 10).

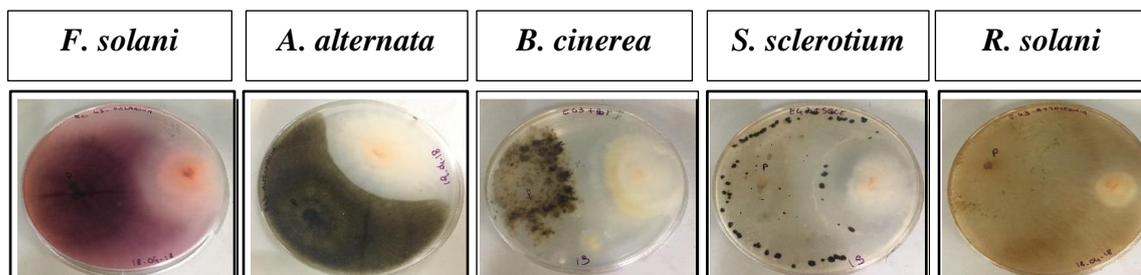


Figura 9. Attività di biocontrollo di *C. rosae* E43 (colonia bianca sulla destra) contro i fitopatogeni terricoli (*F. solani*, *S. sclerotium* e *R. solani*) e fogliari (*A. alternata* e *B. cinerea*) in saggi *in vitro* di competizione diretta in piastra.

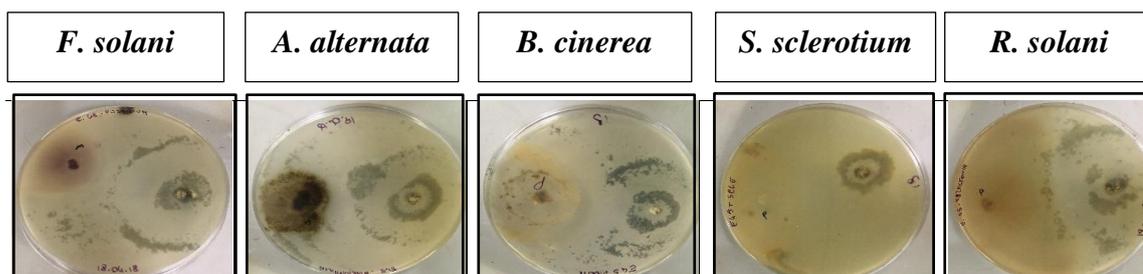


Figura 10. Attività di biocontrollo di *T. harzianum* E45 (colonia verde sulla destra) contro i fitopatogeni terricoli (*F. solani*, *S. sclerotium* e *R. solani*) e fogliari (*A. alternata* e *B. cinerea*) in saggi *in vitro* di competizione diretta in piastra.

4.2.3. Discussione

I risultati evidenziano che il ceppo *C. rosae* (E43) e *T. harzianum* (E45) sono risultati efficaci nel contenimento *in vitro* di diversi fitopatogeni terricoli e fogliari. Dalla letteratura si rileva che *C. rosae* è efficace non solo nel contenimento di *A. alternata* e *B. cinerea*, ma anche nei confronti di numerosi altri patogeni, incluso *R. solani*, *S. sclerotium* e *Fusarium* spp. contro i quali, in questo saggio, non ha mostrato attività antagonista (Sun *et al.*, 2020; Salamone *et al.*, 2018; Rodriguez *et al.*, 2011). I funghi del genere *Trichoderma* sono noti agenti di biocontrollo (BCA) in grado di agire contro un ampio spettro di patogeni fungini (Harman *et al.*, 2004; Vinale *et Sivasithamparam*, 2020; Woo *et Lorito*, 2007) e sono contenuti in numerosi bioformulati commercializzati in tutto il mondo per la difesa delle colture (Woo *et al.* 2014; Lorito *et al.*, 2010). Il micoparassitismo, rientra tra i principali

meccanismi impiegati da *Clonostachys* spp. e *Trichoderma* spp. per contrastare innumerevoli agenti fitopatogeni (Sun *et al.*, 2020; Lorito *et al.*, 1994; Lorito *et al.*, 1996; Harman *et al.*, 2000). Di particolare rilevanza, durante il processo di micoparassitismo, è la produzione da parte di entrambi i funghi di diversi enzimi litici definiti “*Cell Wall Degrading Enzymes*” (CWDE), quali endochitinasi, cellulasi, glucanasi, laccasi, proteasi, le xilanasi, abili ad idrolizzare la parete cellulare del fungo parassitizzato (Qualhato *et al.*, 2013; Chatterton *et al.*, 2009; Fatema *et al.*, 2018). Il ceppo di *T. harzianum* E45 isolato da suolo contaminato, nei saggi in vitro, è risultato efficiente nel contenimento di un’ampia gamma di funghi fitopatogeni, mostrando la sua potenzialità come BCA. Ulteriori studi relativi alla sua attività di biocontrollo nonché di interazione benefica con la pianta sono necessari, in quanto possono aprire interessanti prospettive relative al suo impegno per lo sviluppo di nuovi bioformulati.

5. Valutazione degli effetti di *Trichoderma* spp. sulle piante

Al fine di valutare un possibile effetto benefico del ceppo di *Trichoderma* E45 in termini di promozione della crescita delle piante e germinazione dei semi, sono stati condotti saggi *in vivo* con piante di pomodoro e di fagiolo. In entrambi i saggi è stato utilizzato anche il ceppo *Trichoderma afroharzianum* T22, principio attivo del biofungicida commerciale Triatum (fornito da Koppert Biological Systems, Rotterdam, Olanda). Nel saggio con le piante di pomodoro è stato testato *Trichoderma harzianum* E45, inoltre è stato utilizzato il ceppo di *T. asperellum* T25, (IMI 296237), isolato in Colombia (Hermosa *et al.*, 2000) e fornito dall'Istituto Hispano-Luso de Investigaciones Agraria (CIALE), partner estero del progetto di Dottorato.

5.1 Valutazione degli effetti di *Trichoderma* spp. sulla crescita di piante di pomodoro

5.1.1 Materiali e metodi

Le sospensioni conidiche dei ceppi di *T. harzianum* E45, *T. afroharzianum* T22 e di *T. asperellum* T25, per il trattamento delle piantine di pomodoro tramite irrigazione al terreno, sono state prodotte mediante un processo di fermentazione bi-fasico liquido/solido messo a punto nel Laboratorio di Patologia Vegetale (UNINA). Le spore dei ceppi testati, conservate in una soluzione di glicerolo al 20% e mantenute alla temperatura di -80° C, sono state utilizzate per l'inoculo in coltura liquida di 100 ml di PDB (Potato Dextrose Broth, HIMEDIA, India) alla concentrazione finale di 1×10^6 spore/ml. Le colture vegetative sono state lasciate in agitazione a 150 r.p.m per 48 h a 25°C. Buste di polipropilene dotate di apposite *air strip* filtranti (SacO₂, Belgio) contenenti 500 g di riso Parboiled sono state sterilizzate. Le colture starter in PDB sono state quindi utilizzate per inoculare il riso nelle buste. Le colture sul riso sono state incubate per 5 gg a 25° C alla luce, mescolate quotidianamente e mantenute in posizione orizzontale fino alla sporulazione. Alla fine del processo di fermentazione solida le spore sono state raccolte mediante lavaggio del riso con acqua sterile e successivamente filtrate con del tessuto non tessuto (TNT). La concentrazione della sospensione conidica è stata determinata con l'utilizzo di una camera contaglobuli (camera di Burkner). Per i trattamenti al suolo sono state utilizzate sospensioni conidiche, dei singoli ceppi, diluite in acqua alla concentrazione di 1×10^6 spore/ml. Semi di pomodoro (*Solanum lycopersicum* cv. San Marzano nano) sono stati posti a germinare in una seminiera di polistirolo da 120 fori, a 20°C e con il 100% di

UR. Dopo 10 giorni dall'emergenza, le piantine sono state trapiantate in vasi di 12 cm Ø, contenenti terriccio universale (Floragard, Oldenberg, Germania).

Al trapianto e a cadenza quindicennale per circa 2 mesi, le piantine sono state irrigate al suolo con 50 ml di ciascuna sospensione conidica. Il controllo negativo (CNT) è stato ottenuto irrigando le piante con sola acqua. Ogni trattamento consisteva in 4 repliche biologiche, ciascuna di 8 piante, suddivise in blocchi randomizzati. Il saggio è stato condotto in serra, in condizioni di temperatura e umidità controllate. Dopo 5 trattamenti, le piante sono state raccolte e sono stati misurati i principali indici biometrici (altezza del fusto, lunghezza delle radici, numero di foglie, peso secco di radici e fusto).

L'analisi statistica dei risultati è stata svolta con i programmi Minitab 18 Statistical Software® e PAST 3®. Per ciascuno dei parametri analizzati è stata effettuata un'analisi della varianza unidirezionale con il test parametrico ANOVA (One way analysis of variance, ANOVA) per verificare la presenza di differenze statistiche tra le medie. Il test di Levene è stato eseguito per verificare l'omogeneità della varianza dalle medie e dalle mediane richiesta dall'ANOVA e il coefficiente H è stato accettato con valore $p \geq 0,05\%$. La distribuzione di normalità del residuo è stata verificata con il Test di Shapiro-Wilk con $W \geq 0,05$ e p normale $\geq 0,05$. Il test post-hoc di Tukey è stato utilizzato per identificare i trattamenti statisticamente differenti tra loro mentre il test post-hoc di Dunnett è stato svolto per rivelare i trattamenti che differiscono statisticamente dal controllo (p -value < 0,05). Nel caso in cui il dataset analizzato non soddisfi i parametri sopracitati richiesti per l'esecuzione del test parametrico ANOVA è stata svolta l'analisi della varianza utilizzando il test non parametrico di Kruskal-Wallis. In tal caso l'analisi è stata seguita dal test post-hoc di Dunn con il livello di significatività statistica fissato a $p < 0,05$, per identificare i trattamenti statisticamente differenti.

5.1.2. Risultati

Le piante di pomodoro inoculate con i ceppi di *T. harzianum* E45, *T. afroharzianum* T22 e il ceppo *T. asperellum* T25 presentano un incremento della lunghezza delle radici rispettivamente del 24%, 22% e 19% in comparazione al controllo H₂O (CNT) (Kruskal Wallis, H chi²: 39,92; p same: 4,453E-08). Anche il peso secco delle radici (H chi²: 8,7; p same: 0,0329) delle piante trattate con E45 e T22 risulta essere significativamente aumentato, rispetto al CNT, del 45% e del 32% rispettivamente (dati non mostrati). Per quanto riguarda

l'altezza dei fusti e il peso secco della parte epigea delle piante, per tutti i trattamenti effettuati, non sono state evidenziate differenze significative.

5.2. Valutazione degli effetti di *T. harzianum* E45 e *T. afroharzianum* T22 sulla germinazione dei semi e sulla crescita di piante di fagiolo

5.2.1. Materiali e metodi

Semi di fagiolo muno o indiano verde (*Vigna radiata*, Mung Bean) sono stati conciati con sospensione conidiche dei ceppi *T. harzianum* E45 e *T. afroharzianum* T22, con concentrazione di 1×10^6 sp/ml in acqua. In particolare, 30 semi per ogni trattamento, sono stati posti in una piastra Petri, bagnati con 5 ml della sospensione di spore, girati frequentemente per coprirne la superficie uniformemente, poi lasciati ad asciugare in condizioni di sterilità per circa 24 ore. Il controllo negativo (CNT) è stato ottenuto trattando i semi solo con acqua sterile. Dieci semi sono stati piantati in vasi da 16 cm di \varnothing contenente terriccio universale; per ogni trattamento sono state realizzate 3 repliche biologiche, e i vasi sono stati posti in blocchi randomizzati in serra a temperatura di ca. 25°C e luce naturale. Quotidianamente sono stati raccolti i dati relativi al numero di semi germinati. I parametri biometrici relativi all'altezza del fusto e alla lunghezza e larghezza delle foglie sono stati raccolti dopo 3 settimane dalla semina. L'analisi statistica dei risultati è stata svolta come descritto nella sezione 5.1.1.

*Tabella 5. Effetti di Trichoderma T22 e E45 sull'altezza del fusto, larghezza e lunghezza delle foglie di piante di fagiolo. Il CNT è costituito da piante trattate esclusivamente con acqua. I dati contrassegnati con * sono statisticamente differenti dal CNT secondo il Dunn's post hoc test.*

	CNT		T22		E45	
	Mean	St. dev.	Mean	St. dev.	Mean	St. dev.
Shoot height (cm)	22,5 ±	2,3	22,0 ±	2,4	21,1 ±	2,2
Leaf length (cm)	7,5 ±	1,5	7,3 ±	1,4	6,6 * ±	1,7
Leaf width (cm)	3,4 ±	0,5	3,4 ±	0,5	2,9 * ±	0,6

Rispetto al CNT, i trattamenti effettuati con i ceppi di *Trichoderma* non hanno determinato un incremento significativo del tasso e velocità di germinazione né dei parametri biometrici considerati (Tabella 5).

5.3. Discussione

I ceppi di *Trichoderma* E45, T25 e T22 hanno stimolato la crescita delle piante di pomodoro, contribuendo ad una maggiore lunghezza delle radici. Il fungo benefico *Trichoderma* è ampiamente utilizzato in agricoltura per i noti e molteplici effetti benefici sulla crescita e produzione delle colture. Infatti, numerosi ceppi di diverse specie di *Trichoderma*, in aggiunta alla capacità di attaccare o inibire direttamente la crescita di agenti fitopatogeni, sono anche in grado di interagire attivamente con la pianta promuovendone la crescita e migliorando la resistenza a stress biotici e abiotici (Harman *et al.*, 2004; Lorito *et al.*, 2010). Tali effetti sono correlati alla capacità di questi funghi benefici sintetizzare composti ormono-simili, che promuovono la crescita delle radici aumentandone la superficie di suolo esplorata e migliorando di conseguenza l'assorbimento di acqua e nutrienti (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Pelagio-Flores *et al.*, 2017; Fiorentino *et al.*, 2018; Colla *et al.*, 2015). *Trichoderma* può inoltre indurre un miglioramento dello stato nutrizionale della pianta stessa, attraverso la solubilizzazione diretta di diversi nutrienti nel suolo, come fosfati, ferro e rame o la produzione di siderofori, che rendono questi elementi facilmente disponibili per l'assorbimento radicale (Altomare *et al.*, 1999). Tuttavia, non è stato rilevato nessun effetto benefico sulla crescita del fagiolo. L'appartenenza delle colture esaminate a famiglie botaniche differenti potrebbe giustificare la variabilità negli effetti, infatti, diversi gruppi di ricerca hanno evidenziato che l'interazione benefica di *Trichoderma* con la pianta può essere legata alla specie vegetale o addirittura al genotipo (Baker, 1988; Ousley *et al.*, 1994; Fiorentino *et al.*, 2018; Tucci *et al.*, 2011). I risultati di promozione della crescita di piante di pomodoro a seguito dell'inoculo con il ceppo E45, isolato da suolo contaminato, aprono il campo ad ulteriori approfondimenti per il suo impiego per lo sviluppo di nuovi bioformulati.

6. Valutazione della capacità dei funghi di crescere sui sottoprodotti oleari

Sono stati allestiti saggi *in vitro* al fine di determinare la capacità di alcuni dei ceppi fungini isolati dal sito contaminato e di diversi ceppi di *Trichoderma*, selezionati dalle collezioni micologiche del Laboratorio di Patologia Vegetale (UNINA) e dell' Istituto Hispano-Luso de Investigaciones Agraria (CIALE; Salamanca, Spagna), di crescere e svilupparsi su scarti oleari della filiera agroalimentare. In particolare, sono stati utilizzati i seguenti sottoprodotti:

- la sansa (Olive Pomace: OP)
- la farina di estrazione dell'olio di girasole (Sunflower: SF)
- la farina di estrazione dell'olio di colza (Rapeseed: RS)

OP è il sottoprodotto solido pastoso del processo di estrazione dell'olio di oliva che è stata fornita dall'azienda Santa Rita s.r.l (VV), partner aziendale del progetto di Dottorato. Entrambi i sottoprodotti SF e RS sono stati forniti dalla "Sociedad Cooperativa General Agropecuaria (ACOR)" sita a Valladolid in Spagna, e diversamente da OP che è un impasto umido, questi prodotti si presentano come una farina secca.

6.1. Saggi *in vitro* su substrato solido contenente la sansa di oliva (OP)

6.1.1. Materiali e metodi

Tra i funghi isolati dal sito contaminato sono stati selezionati i ceppi appartenenti a specie di cui è nota la capacità di resistere a vari stress abiotici e di stabilire un'interazione benefica con le piante, quali: *T. pinophilus* (E2), *A. fumigatus* (E15), *C. rosae* (E45), *B. bassiana* (E44), *S. birkimanni* (E74), *A. niger* (E62) e *T. harzianum* (E36 e E45) (Joseph *et al.*, 2020; Acosta-Rodriguez *et al.*, 2017; Hoseinzadeh *et al.*, 2017; Cecchi *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2021; Rao *et al.*, 2015). Inoltre, sono stati utilizzati anche i ceppi *T. afroharzianum* T22, *T. harzianum* E36 ed M10, *T. asperellum* KV906, *T. virens* GV41, *T. atroviride* HK2 e HK4, appartenenti alla collezione micologica del Laboratorio di Patologia Vegetale (UNINA), e i ceppi di *T. harzianum* T34 e *T. asperellum* T25 forniti dall'Istituto Hispano-Luso de Investigaciones Agraria (CIALE; Salamanca, Spagna). Tutti i funghi sono stati allevati in coltura pura su Potato Dextrose Agar in piastre Petri a 25°C in condizioni sterili e trasferiti regolarmente per mantenere le colture fresche. La sansa (OP) è stata diluita in un mezzo salino minimo (MM: 15 g/L KH₂SO₄; Metalli traccia 1 ml/L; MgSO₄ 1M 2,4 ml/L; CaCl₂ 1M 4,1 ml/L; (NH₄)SO₄ 20 ml/L. Portato a pH 5.5) in rapporto 1:1 p/v (OP50) e solidificata con 1.5% (p/v) di agar. Il substrato è stato sterilizzato e versato nelle piastre Petri di diametro

90 mm. Dischi di 0,5 cm diametro sono stati prelevati al margine delle colture in crescita dei funghi su PDA e posizionati al centro del substrato OP. Il controllo (CNT) è stato ottenuto allevando i ceppi fungini in piastre Petri contenenti MM agarizzato e arricchito con l'1,5% di saccarosio come fonte di carbonio e di energia. Per ciascun ceppo fungino in esame sono state eseguite 3 repliche. Le colture sono state incubate in incubatore termostato a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ al buio per 5 giorni. Ad intervalli di 24 h sono stati misurati i due diametri ortogonali della colonia miceliale. Il tasso di crescita radiale (RG; "Radial Growth") espresso in mm/giorno è stato calcolato sulla base la seguente formula:

$$\text{RG (mm/giorno)}: \frac{\text{RG}_{24} - \text{RG}_{96}}{n.\text{giorni}}$$

Dove RG_{24} è la crescita rilevata dopo 24 h dall'inoculazione, e RG_{96} è la crescita dopo 96 h, e il numeri dei giorni che intercorrono tra le due misure è pari a 3gg.

L'analisi statistica dei risultati è stata svolta come descritto nel paragrafo 5.1.1.

6.1.2. Risultati

I ceppi di *Trichoderma* e la specie *A. niger* hanno mostrato una velocità di crescita maggiore rispetto alle restanti specie fungine testate (ANOVA, F: 218,05; *p* same: 1,951E-09). In particolare, i ceppi E45, T22, T25 e T34 sono stati i più performanti raggiungendo una crescita di circa 1,5 cm al giorno, seguiti dai ceppi M10 e HK2 la cui crescita si aggira attorno a 1,3 cm/giorno (Figura 11).

Anche la velocità di crescita di *A. niger* è stata di circa 1,3 cm al giorno. Il resto delle specie testate presentano una velocità di crescita minore rispetto alle specie sopracitate. Le specie *T. pinophilus* e *A. westerdijkiae* mostrano una crescita di circa 0,5 cm/giorno, mentre *B. bassiana* risulta la specie con la crescita più stentata. La velocità di crescita dei microrganismi rilevata su OP50 risulta avere un andamento paragonabile al CNT (dati non mostrati), indicando che le differenze tra i tassi di crescita dei diversi microrganismi sono dovuti a ritmi di accrescimento specifici di ogni microrganismo e indipendenti dalla presenza nel substrato del sottoprodotto

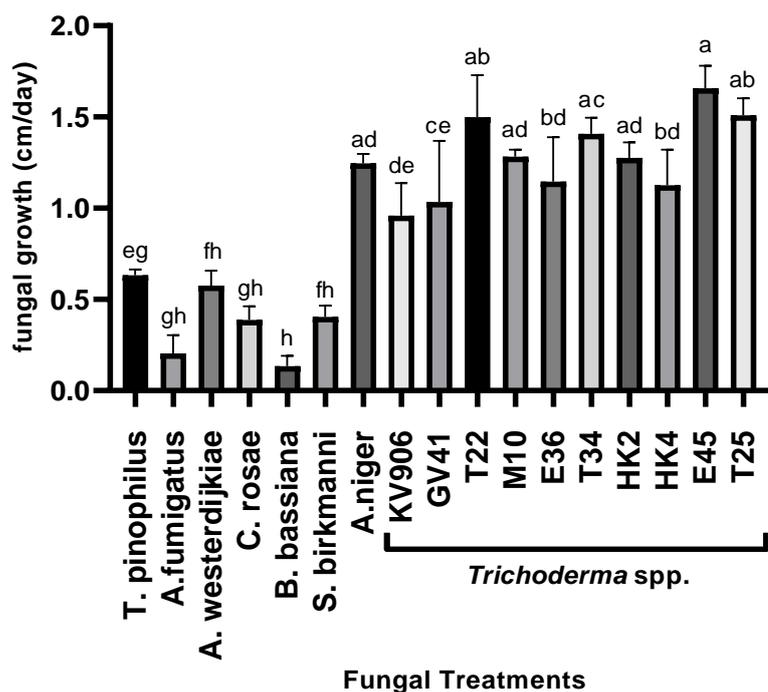


Figura 11. Velocità di crescita radiale delle specie fungine selezionate su substrato solido contenente OP al 50%, espressa in cm/giorno. I funghi sono: *T. pinophilus* (E2), *A. fumigatus* (E15), *C. rosae* (E45), *B. bassiana* (E44), *S. birkmanni* (E74), *A. niger* (E62), *T. afroharzianum* T22, *T. harzianum* (E36, E45, T34, E36 e M10), *T. asperellum* (KV906, T25), *T. virens* (GV41), *T. atroviride* (HK2 e HK4). Le lettere diverse indicano i valori significativamente differenti secondo il Tukey's post hoc ($P < 0,05$) test svolto a seguito dell'ANOVA.

6.2. Saggi *in vitro* in substrato liquido contenente la sansa di oliva (OP)

6.2.1. Materiali e metodi

Tutti i ceppi di *Trichoderma* spp. impiegati nel saggio su substrato solido + sansa OP50 sono stati testati ulteriormente in substrato liquido arricchito con sansa (OP50) per valutare la loro capacità di crescere in questa condizione. Gli isolati sono stati allevati su PDA fino ad ottenere una completa sporulazione. Le spore sono state raccolte in 10 ml d'acqua distillata sterile con 0,1% Tween-20, e filtrate tramite lana di vetro per rimuovere i frammenti fungini, sciacquate con acqua distillata sterile, contate e la sospensione di spore è stata conservata a -20°C in glicerolo 20% (v/v), fino al suo utilizzo.

Il substrato di crescita OP50, composto da 100 ml di acqua e sansa in rapporto 1:1 (p/v), a seguito di sterilizzazione è stato inoculato con 100 μl della sospensione conidica alla concentrazione di 1×10^8 sp/ml, per raggiungere una concentrazione conidica finale nel

substrato di 1×10^5 . Il controllo è stato l'allevamento di ceppi in mezzo minimo (MM) arricchito con l'1,5% di saccarosio. Tutte le beute sono state incubate ad una temperatura di 25°C, con agitazione orbitale a 120 r.p.m. Dopo una e due settimane di crescita è stato prelevato un campione di 10 ml di substrato per la determinazione delle Unità Formanti Colonie (CFU) seguendo il protocollo descritto precedentemente nella Sezione 3.1.2. L'analisi statistica dei risultati è stata svolta come descritto nel paragrafo 5.1.1.

6.2.2. Risultati

Tutti i ceppi hanno mostrato una capacità di sviluppo su OP50 paragonabile a quella rilevata sul CNT senza la sansa (dati non mostrati). In alcuni casi, la carica fungina determinata nei campioni di substrato OP50 prelevati dopo una settimana è risultata aumentata. Infatti dalla concentrazione dell'inoculo iniziale di 1×10^6 CFU/ml si è passati ad un valore tra $0,5$ e 8×10^7 CFU/ml, a seconda del ceppo (Figura 12). Questi dati confermano quanto evidenziato nel precedente saggio di crescita su substrato solido arricchito con OP50. Infatti, E45 e T22 hanno una crescita maggiore in termini di CFU, raggiungendo 8×10^7 CFU/ml dopo una settimana, seguiti da T34 e T25 con una concentrazione di 6×10^7 CFU/ml. Si nota, tuttavia, che la crescita di questi quattro ceppi diminuisce radicalmente durante la seconda settimana; in particolare per il ceppo T25 la crescita è ridotta a ca. 2×10^7 CFU/ml. Al contrario, la crescita del ceppo GV41 aumenta nella seconda settimana passando da un valore di 4×10^7 CFU/ml nella prima settimana, a un valore di $6,5 \times 10^7$ CFU/ml in quella successiva. I ceppi KV906, M10, E36 e HK2 risultano avere una crescita ridotta in entrambe le settimane in confronto al resto dei ceppi testati, con una crescita $< 2 \times 10^7$ CFU/ml.

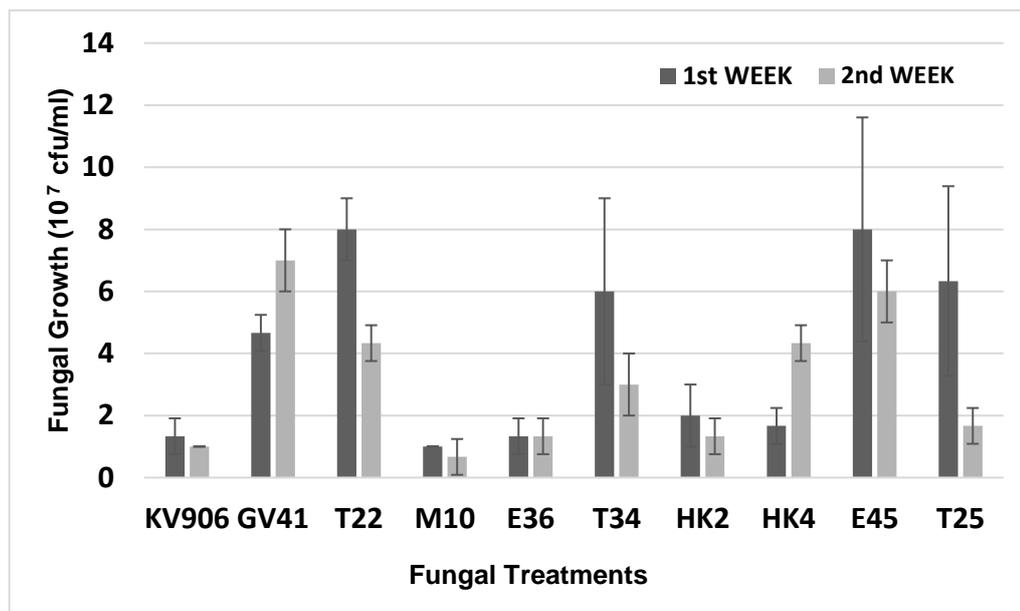


Figura 12. Numero delle Unità Formanti Colonie (CFU) dei ceppi *Trichoderma* spp. coltivati in substrato liquido contenente OP50 (sansa di oliva diluita al 50% in acqua, p/v) dopo 1 e 2 settimane di crescita.

6.3. Saggi *in vitro* su substrato solido con i sottoprodotti oleari girasole (SF), colza (RS) e di sansa

6.3.1. Materiali e metodi

I ceppi di *Trichoderma* T25, T22, E45 e T34 con una maggiore capacità di crescita in substrati arricchiti con il sottoprodotto sansa (OP50), sono stati selezionati per le successive prove di crescita su substrati con SF e RS.

I ceppi sono stati nuovamente saggiati per la loro capacità di crescita su OP solido per il confronto con SF e RS. Le piastre Petri sono state preparate con il mezzo salino minimo agarizzato (MM) contenente i sottoprodotti alle seguenti concentrazioni (p/v):

- OP: 0,5% - 1% - 2,5% - 4% -5% - 10% - 20% - 50%
- SF: 0,5% - 1% - 2,5% - 4% -5% - 10%
- RS: 0,5% - 1% - 2,5% - 4% -5% - 10%

Il controllo (CNT) è MM arricchito con l'1,5% di saccarosio e un ulteriore controllo positivo è stato aggiunto allevando i funghi su PDA.

Nel saggio, i vari substrati, preparati come indicato precedentemente, sono stati inoculati con 15 µl di una sospensione conidica alla concentrazione di 1 x 10⁸ spore/ml. Per ogni ceppo di *Trichoderma*, sono state eseguite 3 repliche per ciascuna delle concentrazioni dei tre sottoprodotti. Le colture sono state poste in un incubatore termostato a 24 ± 1 °C al

buio e per 3 giorni. Ad intervalli di 24 h sono stati misurati due diametri ortogonali della colonia, da cui è stato calcolato il tasso di crescita radiale (RG) espresso in mm/giorno. L'analisi statistica dei risultati è stata svolta come descritto nel paragrafo 5.1.1.

6.3.2. Risultati

6.3.2.1. Crescita di *Trichoderma* su substrati solidi contenenti la sansa (OP)

La crescita radiale dei ceppi di *Trichoderma* selezionati su MM arricchito con OP è simile ai risultati osservati in precedenza (Figura 13). Per tutti i ceppi, la velocità di crescita sui substrati contenenti OP a % comprese nel range 0,5-20% è più elevata rispetto al CNT su MM ed è paragonabile o maggiore, in relazione alle % di OP, rispetto a quella sul PDA. Sul substrato OP al 50%, tutti i ceppi hanno mostrato un abbassamento della velocità di crescita, risultando comunque simile alla crescita su MM, ma minore rispetto al PDA, fatta eccezione per E45 per cui la crescita risulta statisticamente paragonabile. In particolare, E45 mostra uno sviluppo più rapido rispetto agli altri ceppi, raggiungendo la massima velocità di crescita su OP al 4 % con 3 cm/giorno (Kruskal-Wallis H χ^2 : 25,27; p same: 0,002605), del 50% più elevata rispetto a MM e PDA. A seguire i ceppi T25 e T22, raggiungono una velocità di crescita su OP al 5% con circa 2 cm/giorno. Infine il ceppo T34, è il meno performante tra i ceppi, mostrando una crescita più rapida su OP al 5% (1,5 cm/giorno) (ANOVA F: 28,05; p same: 1,951E-09).

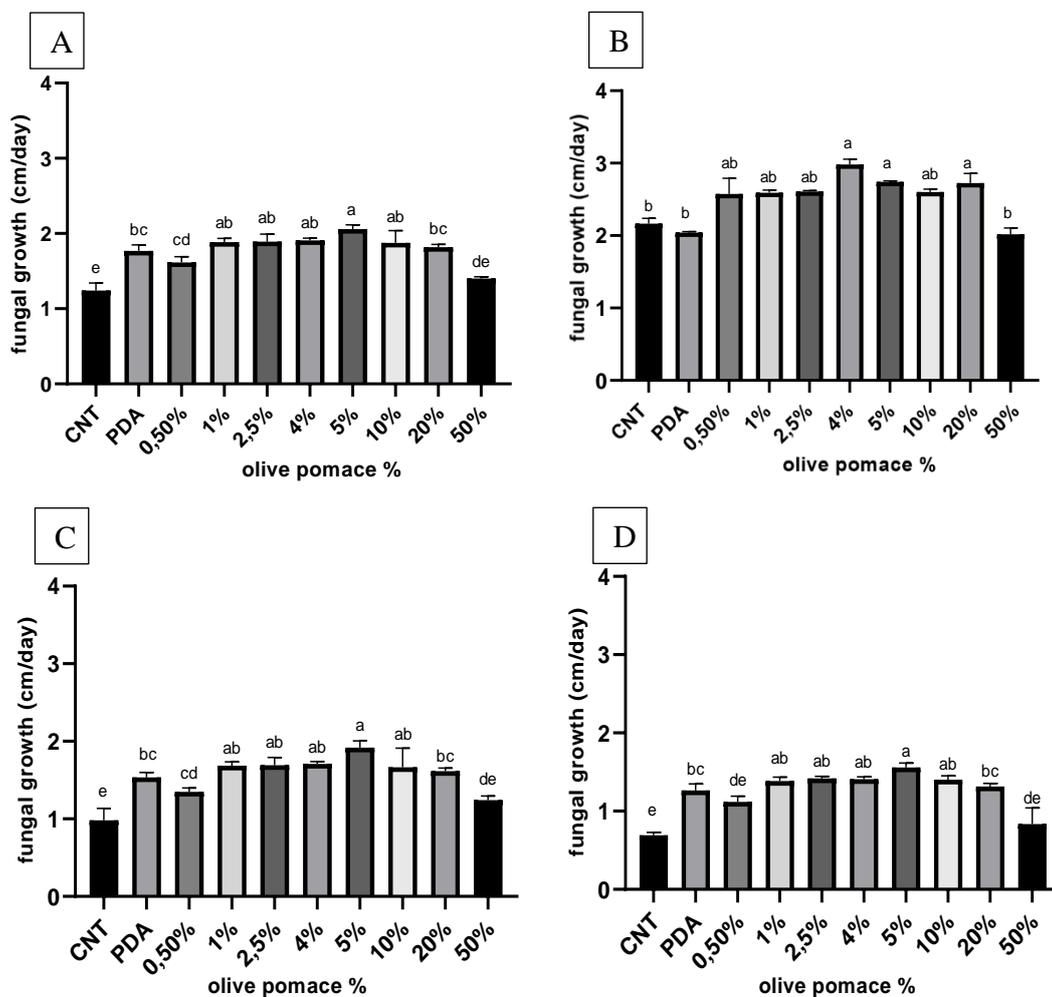


Figura 13. Velocità di crescita radiale (cm/giorno) di *Trichoderma* su substrato solido contenente OP a varie concentrazioni (0,5-50%); i controlli senza OP sono CNT (MM) e PDA. I ceppi di *Trichoderma* sono: (A) T25; (B) E45; (C) T22; e (D) T34. Le lettere diverse indicano le differenze significative (P -value < 0,05) tra le medie secondo il Tukey's post hoc test (grafico A, C, D) oppure il Dunn's post hoc test (grafico B).

6.3.2.2 Crescita di *Trichoderma* su substrati solido contenenti la farina di girasole (SF)

La crescita di *Trichoderma* (Figura 14) su MM arricchito con SF risulta essere fortemente influenzata dalla quantità di sottoprodotto aggiunta al substrato per tutti i quattro ceppi. La velocità di crescita dei ceppi è infatti significativamente maggiore sul substrato arricchito con 5% e 10% di SF, rispetto ai controlli e alle altre concentrazioni di SF saggate. I ceppi E45 e T22 hanno una crescita più rapida rispetto a T34 e T25, raggiungendo circa 3,5 cm di crescita giornalieri su SF 5% e SF 10%. Il ceppo E45 ha avuto una crescita complessivamente migliore rispetto agli altri ceppi indipendentemente dalle concentrazioni di SF testate. Inoltre, la velocità di crescita dei ceppi T25 e T34 sui substrati contenenti SF nel range 0,5-4% è maggiore rispetto ai CNT su MM e PDA.

Per quanto riguarda l'analisi statistica svolta sul dataset del T25, il Test di Kruskal-Wallis ha riportato un valore H (χ^2) pari a 24,08 e p (same) di 0,002142. L'ANOVA

effettuata sul dataset del ceppo E45 ha riportato valori di $p(\text{same})$ pari a $4,219E-12$ e F 102,9. Nel dataset della crescita radiale del T22 e del T34, l'ANOVA ha un F pari a 98 e un p same di $1,7E-09$.

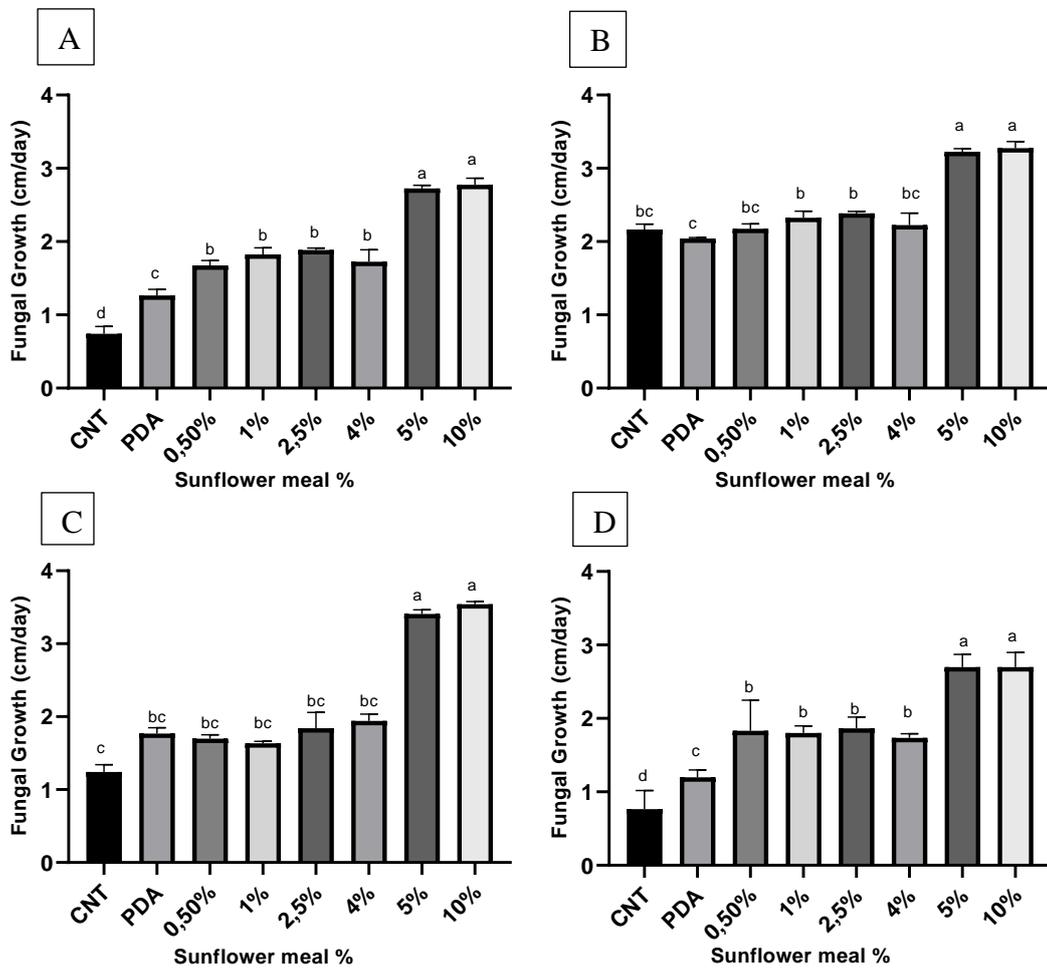


Figura 14. Velocità di crescita radiale (cm/giorno) di *Trichoderma* su substrato solido contenente SF a varie concentrazioni (0,5-50%); i controlli No SF sono CNT (MM) e PDA; e i ceppi di *Trichoderma* sono: (A) T25; (B) E45; (C) T22; e (D) T34. Le lettere diverse indicano le differenze significative (p values < 0,05 tra i valori dalla media secondo il Tukey's post hoc test (grafico A, C, D) oppure il Dunn's post hoc test (grafico B).

6.3.2.3 Crescita di *Trichoderma* su substrati solidi contenenti la farina di colza (RS)

I risultati della crescita dei ceppi di *Trichoderma* (Figura 15) su MM arricchito con RS alle diverse concentrazioni segue la stessa tendenza osservata per il sottoprodotto SF. Il substrato contenente RS al 5% favorisce una crescita più rapida di tutti i ceppi testati, rispetto al CNT e PDA. La velocità di crescita di T25, E45 e T34 sul sottoprodotto è sempre maggiore rispetto al CNT, indipendentemente dal quantitativo % presente, mentre per il ceppo T22 alle concentrazioni di RS dal 0,5 al 4%, la crescita risulta paragonabile a quella ottenuta su PDA.

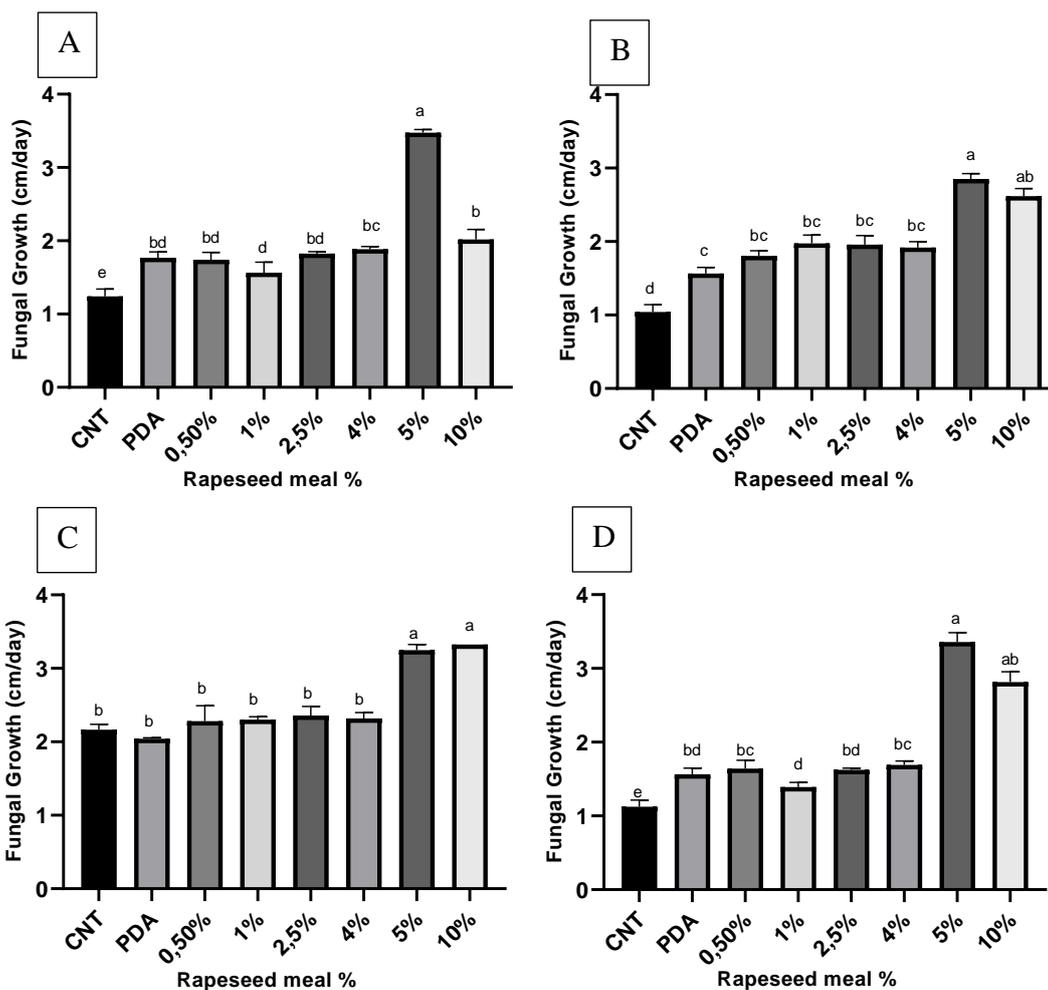


Figura 15. Velocità di crescita radiale (cm/giorno) di *Trichoderma* su substrato solido contenente RS a varie concentrazioni (0,5-50%); i controlli No RS sono CNT (MM) e PDA; e i ceppi di *Trichoderma* sono: (A) T25; (B) E45; (C) T22; e (D) T34. Le lettere diverse indicano le differenze significative (p value < 0,05) tra i valori dalla media secondo il Tukey's post hoc test (grafico A, C, D) oppure il Dunn's post hoc test (grafico B).

6.4. Discussione

La letteratura dimostra che molteplici sottoprodotti sono risultati idonei alla crescita di microrganismi benefici, come ad esempio *Trichoderma* spp., figurandosi come buoni sostituti ai substrati di crescita tradizionali e come fonte di carbonio alternativa (Sadik *et al.*, 2021; Rocha *et al.* 2021; Panda *et al.*, 2019; Ramanujam *et al.*, 2004).

Relativamente ad OP, i risultati ottenuti nei diversi saggi indicano che, quando utilizzato a basse concentrazioni nel substrato, il sottoprodotto permette un rapido sviluppo dei microrganismi testati ed in particolare *Trichoderma* spp., con performance paragonabili o superiori ai substrati tradizionali utilizzati come controlli. In particolare, lo sviluppo di *Trichoderma* risulta essere particolarmente performante su MM arricchito con il 5% di OP, favorendo in media un tasso di accrescimento dei ceppi selezionati di circa il 40% maggiore

rispetto al PDA. I risultati descritti concordano con quanto riportato da numerosi autori che hanno riscontrato un'elevata capacità di crescita di *Trichoderma* spp. su substrati contenenti OP, mostrando il potenziale impiego del sottoprodotto come substrato per la produzione di conidi, metaboliti secondari, enzimi, biofertilizzanti e biostimolanti (Haddadin *et al.*, 2009; Sadik *et al.*, 2020; Hamrouni *et al.*, 2019; Hamrouni *et al.*, 2020; Rayhane *et al.*, 2019; Leite *et al.*, 2016). In particolare, Rayhane *et al.* (2019) hanno dimostrato che la crescita di *Trichoderma asperellum* su un substrato contenente OP ha raggiunto valori 1×10^8 sp/g di sottoprodotto dopo una settimana a seguito dell'inoculo con plug di micelio. Anche lo studio di Marra *et al.* (2018) dimostra che la crescita di *Trichoderma* su un substrato composto da un estratto acquoso di OP, è del 50% maggiore rispetto alla crescita del fungo rilevata sul PDA. È noto tuttavia che sottoprodotti provenienti dall'estrazione dell'olio di oliva contengono sostanze antimicrobiche che ad elevate concentrazioni possono inibire la crescita di numerosi microrganismi, tra questi i composti fenolici a basso peso molecolare, gli acidi grassi liberi e composti aromatici (Leontopoulos *et al.*, 2015; Mavrakis, 2009; Yangui *et al.*, 2008). Nel paragrafo 6.3.2.1 si evidenzia che quando il sottoprodotto è utilizzato al 50% in MM la crescita di *Trichoderma* è rallentata considerevolmente, probabilmente a causa delle elevate concentrazioni di tali composti antimicrobici nel substrato; si può ipotizzare invece che a % minori di sottoprodotto nel substrato la concentrazione sia irrilevante o comunque non sufficiente ad influenzarne la crescita.

I risultati attestano che la presenza dei sottoprodotti SF e RS come unica fonte di carbonio e di nutrienti nel substrato di crescita garantisce un'elevato sviluppo di *Trichoderma* (Figura 16). Infatti, l'arricchimento di MM con il 5% dei sottoprodotti aumenta in media la velocità di crescita dei ceppi selezionati rispetto al PDA di circa l'85% nel caso di RS e di circa il 95% nel caso di SF. I sottoprodotti SF e RS risultano essere una ottima fonte di nutrienti proteici e zuccherini e possono fungere da matrice di supporto per vari processi biotecnologici finalizzati alla produzione di prodotti dall'elevato valore aggiunto, utilizzabili in molteplici ambiti produttivi (Ramachandran *et al.* 2007; Lomascolo *et al.*, 2012; Ugolini *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2010).

Strain T25

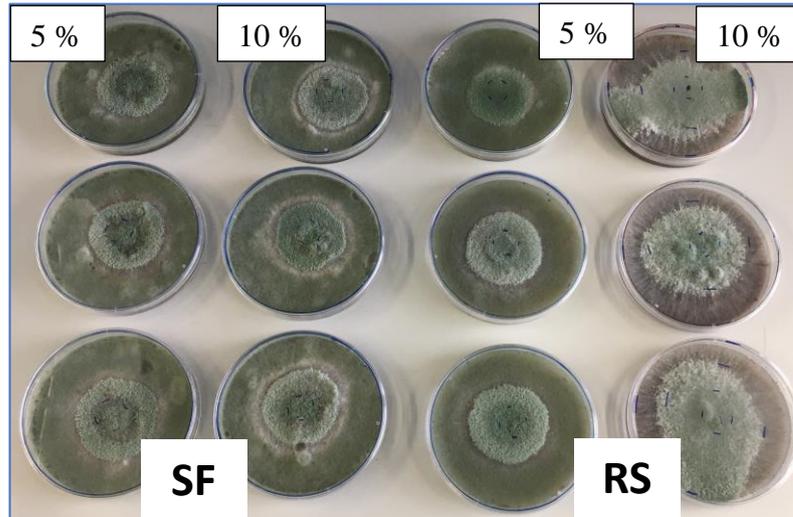


Figura 16. Crescita del ceppo di *Trichoderma* T25 sui substrati solidi contenenti i sottoprodotti RS e SF a varie concentrazioni.

L'integrazione di RS e SF nei substrati non ha mostrato effetti negativi sulla crescita di *Trichoderma* che sarebbero potuti sorgere a causa della presenza di componenti tossici in questi sottoprodotti, ed in particolare in RS. Tra questi l'acido fitico, gli isotiocianati, provenienti dall'idrolisi dei glucosinolati, e i polifenoli sono ampiamente noti per l'attività antimicrobica (Ramachandran *et al.* 2007; Lomascolo *et al.*, 2012). L'assenza di effetti negativi di RS sulla crescita di *Trichoderma* potrebbe essere dovuta, oltre che alle basse % di sottoprodotto utilizzato, anche all'inattivazione dell'enzima mirosinasi, coinvolto nell'idrolisi dei glucosinolati in isotiocianati, a seguito della sterilizzazione del sottoprodotto ad elevate temperature. Lo studio condotto da Galletti *et al.* (2008), nel quale sono stati testati più di 40 specie di *Trichoderma*, conferma un'elevata capacità di crescita dei microrganismi su farine di estrazione di *Brassica carinata*, dimostrando che lo sviluppo di numerosi ceppi aumenta significativamente in presenza del sottoprodotto sterilizzato e sparso sulla superficie del substrato di crescita (WA), con una crescita di alcuni ceppi di oltre il 100% più elevata rispetto al controllo con solo WA.

Lo sviluppo di *Trichoderma* in tempi brevi su OP, RS e SF apre il campo ad ulteriori approfondimenti per l'utilizzo dei sottoprodotti come substrati di crescita per la produzione bioformulati, biofertilizzanti o biostimolanti, utilizzabili per la lotta biologica o come promotori della crescita delle piante.

7. Fermentazione in Stato Solido (SSF) dei sottoprodotti tal quali con *Trichoderma*

7.1 Fermentazione in Stato Solido dei sottoprodotti

7.1.1. Materiali e metodi

In quest'esperimento i ceppi di *Trichoderma* E45, T22 e T25, selezionati per la loro capacità di crescita sui substrati contenenti i sottoprodotti, sono stati allevati in Fermentazione in Stato Solido (SSF) utilizzando come substrato di crescita i sottoprodotti tal quali: le farine provenienti dall'estrazione dell'olio di girasole (SF) e di colza (RS), e la sansa proveniente dall'estrazione dell'olio di oliva (OP).

In primo luogo, è stata preparata una coltura starter inoculando le sospensioni conidiche dei tre ceppi in beute contenenti 100 ml di PDB a una concentrazione finale di 1×10^6 spore/ml. Le beute sono state incubate in un agitatore orbitale per 48 h a 25 °C e 120 r.p.m. In seguito, dopo 48 h di crescita la coltura starter è stata diluita in acqua sterile in rapporto 1:1 ed è stata utilizzata per inoculare i sottoprodotti. I sottoprodotti sono stati preventivamente sterilizzati e 30 gr di ciascun sottoprodotto è stato distribuito uniformemente in piastre Petri da 150 mm di \emptyset . L'inoculo starter diluito è stato versato su ciascun sottoprodotto e miscelato con l'ausilio di anse a L per favorire una distribuzione omogenea dell'inoculo su tutto il substrato (Figura 17). Per i sottoprodotti SF ed RS è stato utilizzato un volume di inoculo della coltura starter diluita pari a 30 ml. Infatti, in questo caso 30 ml di inoculo starter diluito sono risultati idonei ad imbibire uniformemente i 30 gr di sottoprodotto. Nel caso del sottoprodotto OP essendo più compatto e umido, è risultato sufficiente un inoculo di coltura starter diluita di circa 10 ml per imbibire completamente i 30 gr di sottoprodotto. Il controllo in assenza dei funghi (NoF) è stato effettuato utilizzando al posto dell'inoculo starter solo PDB.

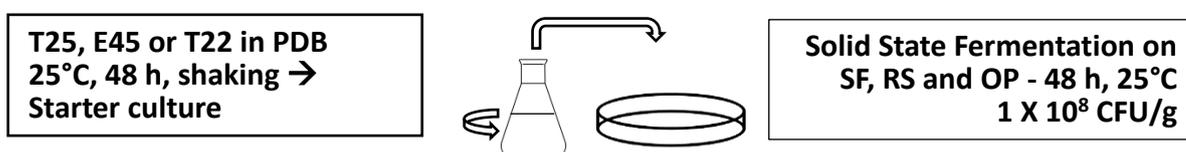


Figura 17. Inoculo di *Trichoderma* sui sottoprodotti. Lo starter dalla coltura è stato inoculato sui sottoprodotti in piastre Petri di 150 mm \emptyset e mescolato omogeneamente con il substrato. Le colture sono state incubate a 25°C per 48 ore in SSF.

Le piastre sono state chiuse con l'apposito coperchio e incubate in termostato a 24 ± 1 °C con 12 h di luce giornaliera. Dopo 48 ore, al raggiungimento di un abbondante livello di

sporulazione omogeneo, 10 g di sottoprodotto sono stati prelevati e sono state effettuate delle diluizioni seriali per determinare le CFU come descritto nella Sezione 3.1.2.

7.1.2 Risultati

La crescita di tutti i ceppi *Trichoderma* è risultata di essere molto rapida e omogenea su RS e SF (Figura 18), raggiungendo una fase di sporulazione densa dopo 48 ore dall'aggiunta dell'inoculo starter diluito (concentrazione iniziale di spore pari a 1×10^6 spore/ml) sui sottoprodotti, ottenendo un numero di CFU pari a 1×10^8 CFU per g di substrato. Nel caso di OP la crescita risulta essere più stentata e disomogenea, con una scarsa capacità da parte dei microrganismi di colonizzare gli strati più profondi del substrato, e infine, dopo 48 ore è stata raggiunto un valore di CFU nello strato più superficiale, pari a 1×10^7 CFU per g di sottoprodotto.

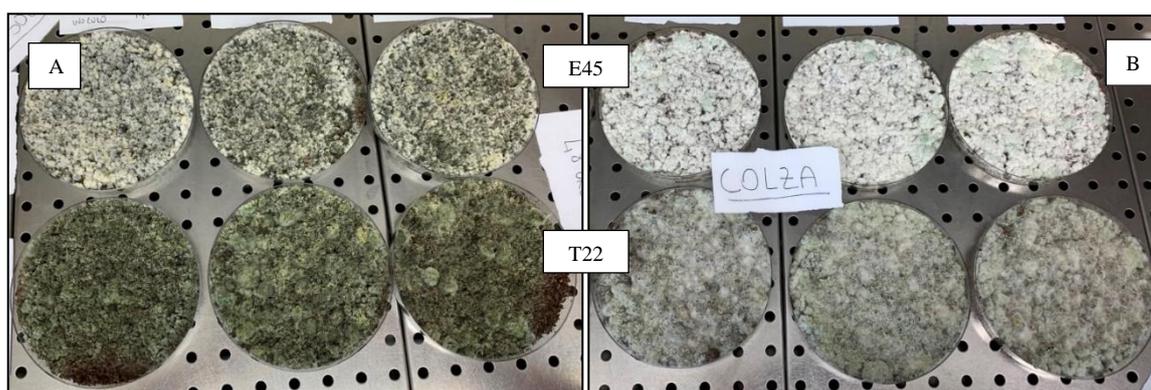


Figura 18. Fermentazione in stato solido di SF (Foto A) e RS (Foto B) 48 ore dopo l'inoculo con i ceppi di *T. harzianum* E45, *T. afroharzianum* T22.

7.2. Analisi chimico-fisiche dei sottoprodotti a seguito della Fermentazione Stato Solido con *Trichoderma*

7.2.1 Materiali e Metodi

Contestualmente, trascorse le 48 h di fermentazione, i diversi sottoprodotti, inoculati o meno con *Trichoderma*, sono stati raccolti ed analizzati dal laboratorio del Centro di Ricerca Interdipartimentale sulla Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) per l'Ambiente, l'Agro-Alimentare ed i Nuovi Materiali (CERMANU), sito presso il Dipartimento di Agraria (UNINA), al fine di determinarne: umidità, sostanza organica (OM) ceneri, azoto totale (N tot.), azoto ammoniacale (N-NH₄) pH e fosforo totale (P tot.). Le analisi relative a umidità, sostanza organica e ceneri sono state svolte secondo "Metodi di analisi dei

compost. Determinazioni chimiche, fisiche, biologiche e microbiologiche: analisi merceologica dei rifiuti” (Regione Piemonte, 1998). Le analisi del N tot. sono state svolte seguendo il protocollo del Ministero per le Politiche Agricole (1999) in “Metodi ufficiali di Analisi chimica del suolo.”, mentre il pH sulla base del documento “Metodi ufficiali di analisi dei fertilizzanti.” (Ministero per le Politiche Agricole, 2002). Infine, la determinazione del P tot. è stata effettuata secondo Gericke e Kurmies (1952). L’analisi statistica dei risultati è stata svolta come descritto nel paragrafo 5.1.1.

7.2.2. Risultati

L’analisi chimico-fisiche dei sottoprodotti (Tabella 6), pretrattati o non in SSF con *Trichoderma*, mostrano che nei tre scarti la percentuale di umidità aumenta in presenza del fungo rispetto al substrato NoF, a cui è stato aggiunto solo PDB. In particolare, per quanto riguarda SF trattato con *Trichoderma*, la % di umidità del sottoprodotto è 2,5 volte maggiore rispetto al substrato senza fungo. Nel caso di RS la % di umidità è 1,6 volte maggiore in presenza di T22 e circa 2 volte maggiore in presenza di T25 e E45. L’aumento della % di umidità è meno evidente nel caso di OP, infatti aumenta del 17% in presenza di T22 e del 20% con T25 e E45. La % di cenere mostra la tendenza ad aumentare leggermente in seguito al trattamento con *Trichoderma* nei sottoprodotti SF e RS. Dall’analisi dell’N tot. si evince che SF e RS contengono in media un quantitativo di N tot di circa 45 g/kg e 56 g/kg, nettamente maggiore rispetto a OP (in media 8 g/kg).

L’ANOVA evidenzia che il contenuto di NH_4 in RS è significativamente maggiore in presenza di *Trichoderma* rispetto al controllo NoF (p same: 4,793E-07; F 124). In particolare, la fermentazione di T25, E45 e T22 su SF, contribuisce ad un aumento significativo di NH_4 in confronto al controllo (NoF) pari a 2,2 volte maggiore per T25, e a 2,7 e 1,7 volte più elevata rispettivamente per E45 e T22. Per quanto riguarda RS, si evince che nel sottoprodotto trattato con il ceppo T22, il contenuto di NH_4 è 2 volte più elevato rispetto al CNT e aumenta ulteriormente in RS trattato con T25 (3,5 volte maggiore rispetto al CNT) e E45 (3 volte maggiore rispetto a CNT). Inoltre, *Trichoderma* favorisce un innalzamento del pH portandolo dal valore iniziale di 5,9 a una media di circa 6,1 nel caso di SF e da un valore iniziale di 5,7 a una media di 6,2 nel caso di RS. Infine, RS risulta essere tra i tre sottoprodotti quello con il maggiore quantitativo medio di P totale (10,5 g/kg), seguito da SF (8 g/kg) e OP (0,6 g/kg).

Tabella 6. Analisi chimico-fisiche dei sottoprodotti (medie e dev. std.) trattati con *Trichoderma* T22, T25, E45 e controllo con solo PDB (NoF). Moisture: umidità %; OM: sostanza organica %; Ash: ceneri %; N tot: azoto totale (g/kg); N- NH4: azoto ammoniacale (g/kg); pH; P tot: fosforo totale (g/kg). Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Tukey post hoc test.

Treatment		Moisture	OM	Ash	N Tot	N-NH4	pH	P Tot
By product	Strain	%	%	%	g/Kg	g/Kg		g/Kg
SF	NoF	3,44 ± 0,5	90,23 ± 0,46	6,34 ± 0,04	48,25 ± 1,91	1,85 ^d ± 0,06	5,87 ± 0,01	7,76 ± 0,53
	T22	8,34 ± 1,49	84,77 ± 1,36	6,90 ± 1,36	44,66 ± 3,87	3,22 ^c ± 0,32	6,15 ± 0,01	8,32 ± 0,06
	T25	8,53 ± 1,55	84,59 ± 1,53	6,88 ± 1,53	45,50 ± 0,24	4,11 ^b ± 0,12	6,08 ± 0,02	7,44 ± 1,02
	E45	8,78 ± 0,83	84,37 ± 0,86	6,85 ± 0,86	42,99 ± 1,07	5,09 ^a ± 0,01	6,14 ± 0,02	8,18 ± 0,44
RS	NoF	4,87 ± 1,43	87,93 ± 1,48	7,21 ± 1,48	61,14 ± 0,8	2,59 ^d ± 0,48	5,71 ± 0,48	10,25 ± 0,21
	T22	8,11 ± 1,95	85,31 ± 1,87	6,58 ± 1,87	54,91 ± 0,44	4,90 ^c ± 0,63	6,10 ± 0,63	7,82 ± 0,36
	T25	10,1 ± 1,63	81,57 ± 1,67	8,28 ± 1,67	51,32 ± 0,56	9,10 ^a ± 0,27	6,29 ± 0,27	11,32 ± 1,18
	E45	10,8 ± 1,39	80,89 ± 1,48	8,29 ± 1,48	53,19 ± 0,26	7,95 ^b ± 0,26	6,16 ± 0,26	12,36 ± 0,3
OP	NoF	58,80 ± 1,23	91,98 ± 1,35	2,22 ± 1,35	7,24 ± 0,63	1,21 ± 0,18	5,96 ± 0,18	0,60 ± 0,03
	T22	68,57 ± 0,83	91,06 ± 0,9	2,36 ± 0,9	8,43 ± 0,19	1,70 ± 0,19	6,05 ± 0,19	0,82 ± 0,03
	T25	70,29 ± 0,5	90,64 ± 0,35	2,07 ± 0,35	7,62 ± 0,12	1,31 ± 0,28	6,06 ± 0,28	0,53 ± 0,01
	E45	70,72 ± 1,09	89,97 ± 0,97	2,31 ± 0,07	7,39 ± 0,74	1,32 ± 0,17	5,97 ± 0,17	0,59 ± 0,03

7.3. Discussione

Diversi autori hanno dimostrato che la Fermentazione in Stato Solido (SSF) si configura come il tipo di fermentazione più adatto all'utilizzo dei sottoprodotti come substrato di crescita di numerosi microrganismi, in particolare i funghi. Infatti, è comunemente utilizzata in un'ampia gamma di bioprocessi che includono il biorisanamento di rifiuti pericolosi e di rifiuti agroindustriali, nonché la produzione su larga scala di conidi, biostimolanti e bioformulati, metaboliti secondari e enzimi (De la Cruz Quiroz *et al.*, 2015; Sarhy-Bagnon *et al.*, 2000). La SSF porta i microrganismi coltivati a stretto contatto con i rifiuti e quindi permette un utilizzo efficiente del substrato per la fermentazione. Questo tipo di fermentazione ha il vantaggio di essere economica, di facile applicazione e manutenzione. Diversi studi hanno dimostrato l'efficacia della SSF per la crescita di *Trichoderma* spp. per la produzione di conidi, metaboliti secondari (es. 6PP) ed enzimi litici, utilizzando bagassa di canna da zucchero e vinacce, sansa, crusca di frumento e farina di patate (Fadel *et al.*, 2015; Hamrouini *et al.*, 2019; De la Cruz-Quiroz *et al.* 2017). In

particolare, i risultati ottenuti in questo esperimento risultano essere in linea con quanto descritto da Baghat *et Pan* (2006) che hanno osservato una rapida capacità di crescita di *T. harzianum* e *T. viride* su 13 sottoprodotti testati in numerose combinazioni tra loro. Nello specifico, gli autori hanno constatato che la presenza di farine di estrazione nel substrato di crescita, composto dalla combinazione dei diversi sottoprodotti, ha sostenuto l'insediamento iniziale e la successiva proliferazione dei funghi. Le farine di estrazione hanno garantito l'apporto di azoto e altri nutrienti essenziali e favorito l'aerazione del substrato e di conseguenza la crescita, la sporulazione e l'attività enzimatica nel fungo. Anche Hamrouni *et al.* (2019; 2019a;2020) hanno dimostrato che è possibile ottenere un'elevata crescita di *T. asperellum* in termini di biomassa e produzione di conidi utilizzando un substrato contenente sansa ed altri sottoprodotti agroindustriali per la crescita in SSF.

La composizione dei sottoprodotti in assenza di *Trichoderma* (NoF) non discosta di molto da quanto riportato in bibliografia (Mazzoncini *et al.*,2015; Briones *et al.*, 2011; Egues *et al.*, 2010; Vuorela *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2009; Parrado *et* Bautista, 1993; Ramachandran *et al.* 2007; Geneau Sbartai *et al.*, 2008). L'effetto dei trattamenti con *Trichoderma* sulla composizione chimico-fisica dei sottoprodotti è risultato di difficile confronto con quanto riportato in letteratura dovuto alla variabilità dei sistemi di fermentazione, tipi di microrganismi inoculati, e dei substrati utilizzati per l'allevamento. Troncozo *et al.* (2019) hanno osservato diversi cambiamenti nella composizione chimico-fisica delle vinacce, un sottoprodotto della spremitura dell'uva per la produzione del vino, a seguito di SSF con sei microrganismi tra cui *T. harzianum*. Coerentemente con quanto riscontrato dagli autori succitati, nel presente studio *Trichoderma* apporta un leggero aumento del pH e un notevole aumento di NH₄ rispetto al substrato non inoculato rendendolo più facilmente disponibile per l'assorbimento da parte delle piante.

Le analisi mostrano che i sottoprodotti hanno un elevato contenuto di SO, N e P in SF e RS ciò suggerisce un potenziale uso, in combinazione con *Trichoderma*, come ammendanti, biofertilizzanti e biostimolanti per colture. Data l'elevata crescita del fungo sul sottoprodotto è plausibile ipotizzare che questo possa fungere da *carrier* per la crescita del microrganismo nel suolo, favorendone lo sviluppo e la persistenza delle popolazioni fungine. L'utilizzo di SF e RS con *Trichoderma* potrebbe dunque avere un effetto positivo combinato sulle piante attraverso l'apporto contemporaneo di nutrienti e di un microrganismo benefico in grado di promuoverne la crescita.

8. Effetti sulla germinazione e crescita delle piante dei filtrati provenienti dalla coltura liquida di *Trichoderma* sui sottoprodotti oleari

Diversi esperimenti sono stati svolti con lo scopo di determinare gli effetti sulla germinazione del seme e la crescita/sviluppo delle piante di pomodoro dei filtrati colturali provenienti dalla coltivazione di *Trichoderma* su substrati contenenti i differenti sottoprodotti (OP, RS e SF), come unica fonte nutrizionale.

8.1. Filtrato proveniente dalla coltura liquida di diversi ceppi di *Trichoderma* su OP50

8.1.1. Materiali e metodi

I filtrati colturali (o surnatanti) provenienti dalla crescita dei ceppi di *Trichoderma* in substrato liquido contenente OP, come indicato nella sezione 6.3, sono stati saggiati come substrati per la coltura *in vitro* di pomodoro al fine verificare i loro effetti sulla germinazione e sviluppo delle piante.

In primo luogo, si è provveduto a preparare i substrati solidi agarizzati per la coltura *in vitro* di pomodoro, sterilizzando i filtrati provenienti dalla crescita dei ceppi di *Trichoderma* (E36, E45, KV906, GV41, T22, M10, E36, T34, HK2, HK4, T34 e T25) su OP50. In seguito, tali filtrati sono stati diluiti in Water Agar (WA) a diverse percentuali (1% - 5% - 10% - 20% v/v). Inoltre, sono stati preparati i substrati con WA arricchito con il surnatante del solo sottoprodotto OP50, non inoculato con *Trichoderma* (NoF), alle stesse concentrazioni percentuali; più un controllo (CNT) con solo WA (no OP50 e no *Trichoderma*). I substrati sono stati quindi versati in piastre Petri da 150 mm diametro e lasciati asciugare fino a completa solidificazione.

Semi di pomodoro cv. San Marzano nano sono stati disinfettati con una soluzione di candeggina all'1% per 2 minuti, e poi sciacquati con acqua sterile 3 volte. Dieci semi sono stati trasferiti nelle piastre contenenti i substrati e per ogni condizione sono state effettuate 5 repliche. Successivamente le piastre sono state avvolte in carta alluminio e incubate al buio in un incubatore termostatico a 25°C. La conta dei semi germinati è stata fatta quotidianamente. Dopo una settimana, le piastre sono state poste in posizione verticale, al fine di permettere la crescita in altezza delle plantule. La lunghezza delle plantule è stata determinata dopo 14 giorni di crescita nel caso dei substrati contenenti il surnatante al 1%, 5% e 10%, e dopo 21 giorni di crescita nei substrati con il surnatante al 20%. L'analisi statistica dei risultati è stata svolta come descritto nel paragrafo 5.1.1.

8.1.2. Risultati

Il filtrato di OP50 (in assenza di *Trichoderma*) diluito all'1% e al 5% in WA non ha influito sulla germinazione dei semi, infatti la percentuale di semi germinati è statisticamente uguale al CNT su WA (ANOVA, p same: 4,114E-06; F : 39,8). Invece, il surnatante di OP50 diluito al 10% e al 20% in WA ha avuto un effetto negativo sulla germinazione dei semi, riducendo la percentuale di semi germinati al 53% e 23% rispettivamente (Tabella 7). Il substrato contenente l'1% del surnatante di OP50 non ha influito né sulla germinazione dei semi, né l'altezza delle plantule, risultando paragonabile al controllo su WA (Kruskal-Wallis, H χ^2 : 39,8; p same: 5,061E-08). All'aumentare del contenuto di filtrato OP50 nel substrato, l'altezza delle plantule è diminuita progressivamente, risultando statisticamente minore rispetto al CNT nei trattamenti OP50 10% e OP50 20% (Figura 19).

Diversamente, i risultati della crescita delle piante sul substrato arricchito con i filtrati di OP50 precedentemente inoculato con i ceppi di *Trichoderma* (1% - 5% - 10% - 20% v/v) mostrano una tendenza diversa da quella osservata precedentemente. Le plantule germinate sul substrato contenente il surnatante OP50 all'1% con i ceppi di *Trichoderma* E45, T22, T34 o T25 (Figura 20) risultano significativamente più alte rispetto al CNT (WA) e alle piante del trattamento NoF (Kruskal-Wallis, H χ^2 : 41,39; p same: 1,998E-05).

Tabella 7. Percentuale di semi di pomodoro germinati su substrati contenenti WA arricchito con i filtrati di OP50 (range 1-20% v/v) non inoculato con Trichoderma. Il CNT è composto da solo WA. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Tukey post hoc test.

Treatment	% germinated seeds
CNT	73% ^a
OP50 1%	73% ^a
OP50 5%	67% ^{ab}
OP50 10%	53% ^b
OP50 20%	23% ^c

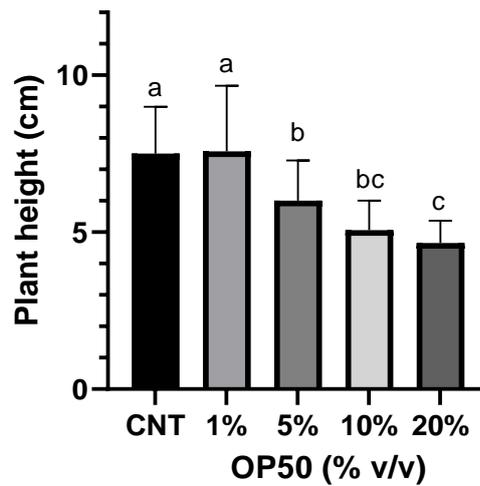


Figura 19. Altezza delle plantule su substrato contenente WA (CNT) e il filtrato OP50 in un range dall'1% al 20%, senza *Trichoderma*. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Dunn's post hoc test.

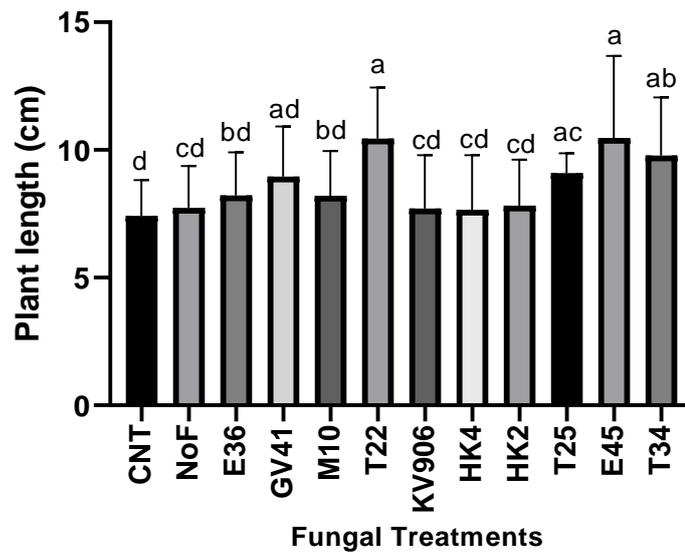


Figura 20. Effetto sulla crescita in altezza delle plantule (cm) dei substrati contenenti il filtrato del sottoprodotto OP50 inoculato con 10 diversi ceppi *Trichoderma* o in assenza di *Trichoderma* (NoF) e successivamente diluito all'1% (v/v) in WA. Il controllo è WA solo, no OP50 e no fungo (CNT). Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Dunn's post hoc test.

Nel caso di OP50 5% la crescita dei ceppi di *Trichoderma* sul sottoprodotto in coltura liquida (Figura 21) determina una riduzione della fitotossicità del surnatante sul pomodoro, riportando le piante ad un'altezza uguale o superiore alle piante del CNT (Figura 13). Otto

ceppi di *Trichoderma* risultano, aumentare significativamente la crescita delle plantule rispetto al trattamento con il solo sottoprodotto (NoF). In particolare, il trattamento con il surnatante del ceppo T22 favorisce una maggiore altezza delle piante rispetto al resto dei trattamenti.

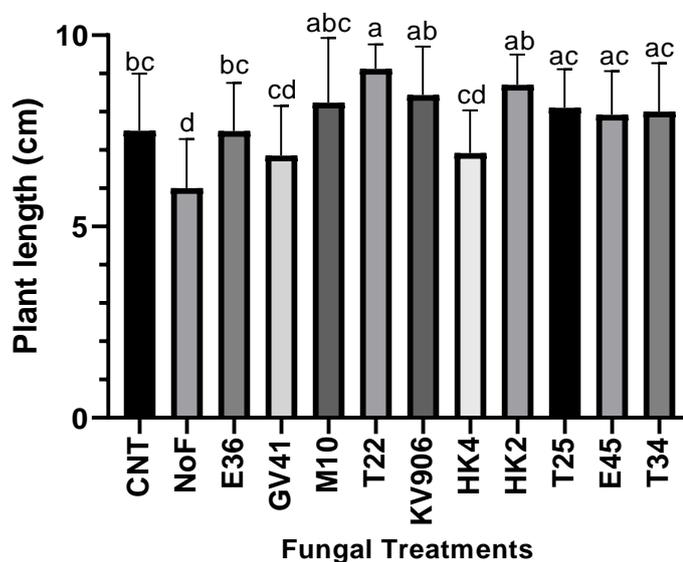


Figura 21. Effetto sulla crescita in altezza delle plantule (cm) dei substrati contenenti il filtrato del sottoprodotto OP50 diluito all'5% (v/v) in WA, precedentemente inoculato con 10 diversi ceppi *Trichoderma* o in assenza di *Trichoderma* (NoF). Il controllo è WA solo, no OP50 e no fungo (CNT). Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Dunn's post hoc test.

Il filtrato di OP50 al 20%, indipendentemente dai trattamenti con i ceppi di *Trichoderma*, ha influito negativamente sulla germinazione dei semi, determinandone una drastica riduzione rispetto al CNT (Test di Kruskal- Wallis H chi^2 : 39,8; p same: 5,061E-08). Pur non risultando differenze significative tra i trattamenti, è possibile notare che i filtrati provenienti dall'allevamento con *Trichoderma* su OP50 favoriscono la germinazione e che il numero dei semi germinati rimane uniforme per tutte le tre concentrazioni di OP50 (1%, 5% e 10%). Al contrario, il substrato NoF causa una progressiva riduzione nella germinazione all'aumentare della concentrazione di OP50 (Tabella 8).

Tabella 8. Percentuale di semi germinati sui substrati contenenti diversa percentuale del surnatante di OP50 precedentemente inoculato con uno di 10 diversi ceppi *Trichoderma* o non inoculato (NoF). Il controllo (CNT) è WA solo, in assenza di OP50 e del fungo. Gli asterischi indicano medie significativamente differenti da CNT secondo il Dunn's post hoc test.

OP50	% of germinated seeds											
	CNT	NoF	E36	GV41	M10	T22	KV906	HK4	HK2	T25	E45	T34
1%	73%	73%	63%	73%	63%	60%	73%	67%	73%	67%	77%	63%
5%	73%	67%	63%	73%	73%	70%	63%	63%	77%	63%	73%	63%
10%	73%	53%	63%	63%	53%	67%	67%	63%	73%	63%	77%	67%
20%	73%	23%	37%*	37%*	37%*	37%*	27%*	37%*	33%*	27%*	37%*	37%*

8.2. Filtrato proveniente dalla coltura liquida dei ceppi di *Trichoderma* selezionati su OP, RS e SF

8.2.1. Materiali e metodi

Sono stati allestiti saggi *in vitro* al fine di verificare gli effetti sulla germinazione e sulla crescita di pomodoro dei filtrati ottenuti dalla crescita dei quattro ceppi di *Trichoderma* selezionati (E45, T34, T25 e T22) in coltura liquida arricchita con i sottoprodotti SF, RS e OP. Diversamente dal precedente esperimento i funghi sono stati fatti crescere in un substrato contenente il 10 % dei sottoprodotti e successivamente i filtrati colturali sono stati filtro sterilizzati. Nel precedente esperimento i filtrati sono stati autoclavati al fine di garantirne la sterilità, nel seguente esperimento invece si è provveduto alla filtro sterilizzazione che garantisce in definitiva una minore alterazione della composizione chimica dei filtrati colturali e degradazione di composti quali fenoli e proteine. Inoltre, i filtrati sono stati utilizzati per imbibire i semi al fine di garantirne il totale assorbimento e testare gli effetti di tale trattamento, utilizzabile anche in presemina *in vivo*, sulla crescita delle piante.

Per ciascun ceppo di *Trichoderma*, sono stati inoculati 200 µl di una sospensione conidica (concentrazione 1×10^8 spore/ml) in una beuta contenente 200 ml di substrato di crescita composto da Minimum Medium (MM) + 20 gr di ciascun sottoprodotto SF, RS o OP. Il controllo (CNT) contenente solo MM è stato arricchito con l'1,5% di saccarosio. Un ulteriore controllo è stato effettuato diluendo ciascun sottoprodotto non inoculato con *Trichoderma* in MM (NoF). Per ogni condizione in esame sono state eseguite 3 repliche. Tutte le beute sono state incubate a 24 ± 1 °C al buio, in agitazione orbitale a 120 r.p.m., per 48 h. Al termine del periodo di crescita, i filtrati colturali sono stati separati dalla biomassa fungina mediante filtrazione tramite tessuto non tessuto (TNT). I filtrati sono stati centrifugati a 5000 r.p.m. per 20 minuti, e ca. 10 ml di surnatante sono stati filtrosterilizzati con l'ausilio di un filtro a siringa di 0,22 micron e conservati a 4°C, fino all'utilizzo.

Il mezzo Murashige and Skoog (M&S, Himedia) (4,4 g/L), arricchito con saccarosio (10 g/L) e agar (1,5 g/L) è stato versato e lasciato solidificare in piastre Petri (90mm Ø). Dischi di filtro di carta sterili (90mm Ø) sono stati appoggiati sulla superficie del mezzo e sono stati imbibiti con 1,5 ml di ciascun surnatante sterile. Il CNT è stato effettuato con l'aggiunta di acqua sterile. Dieci semi di pomodoro (cv. San Marzano nano), opportunamente disinfettati, sono stati posizionati su ogni disco di carta (Figura 22). Per ogni trattamento sono state svolte 4 repliche. Le piastre sono state chiuse con parafilm,

avvolte in carta d'alluminio e incubate ad una temperatura di 25 ± 1 °C al buio. I semi germinati sono stati contati ogni giorno e dopo 14 giorni dalla semina è stata misurata la lunghezza delle plantule. L'analisi statistica dei risultati è stata svolta come descritto nella sezione 5.1.1.

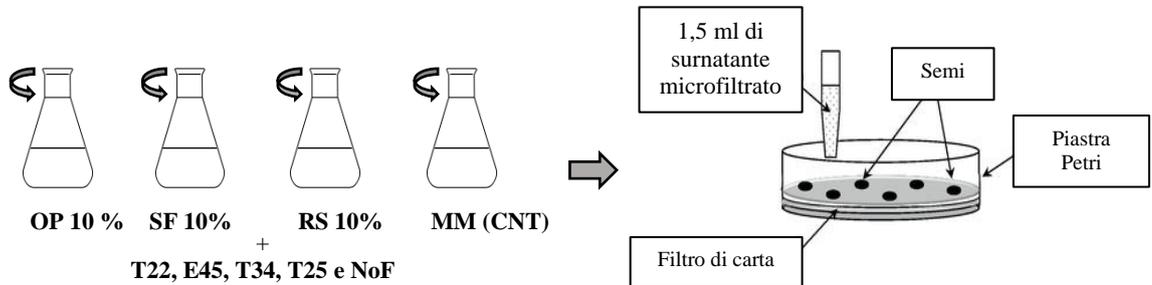


Figura 22. Schema della prova di germinazione e crescita in vitro di pomodoro trattato con i surnatanti provenienti dalla crescita in coltura liquida di *Trichoderma* (T22, E45, T34, T25) in MM arricchito con i sottoprodotti OP, SF o RS o con saccarosio (CNT) o in assenza del fungo (NoF). 10 semi sono stati posti sui dischi di filtro di carta imbibiti con il surnatante, poggiati sul M&S agarizzato.

8.2.2. Risultati

I trattamenti con i filtrati non hanno riportato differenze significative per quanto riguarda la germinabilità e la velocità di germinazione dei semi (dati non mostrati). Invece, i filtrati colturali dei sottoprodotti SF e RS inoculati o meno con *Trichoderma* hanno un effetto fitotossico sulla crescita delle plantule, causando una significativa diminuzione della lunghezza del fusto rispetto al CNT (Figura 23).

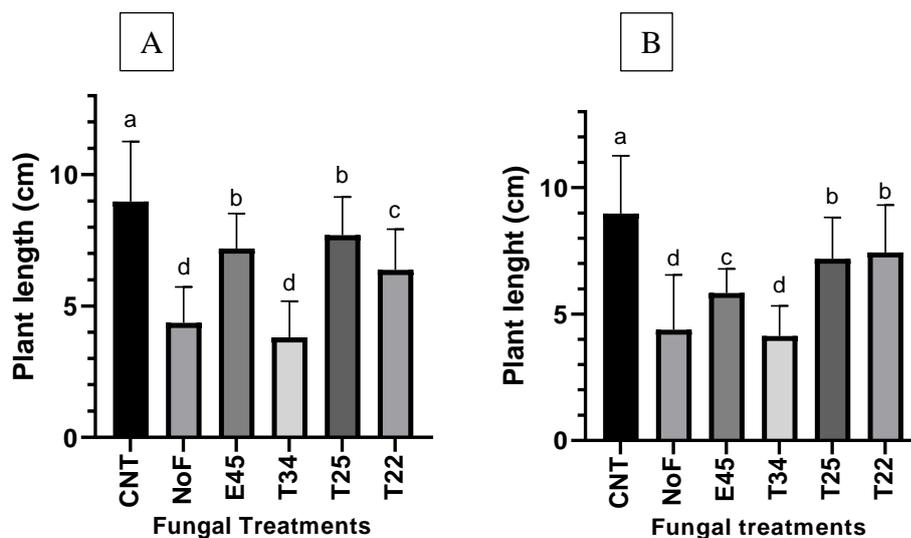


Figura 23. Altezza delle plantule (cm) trattate con i surnatanti dei sottoprodotti SF (A) e RS (B) senza *Trichoderma* (NoF) o con i ceppi E45, T34, T25 e T22. Il controllo (CNT) è costituito

da MM. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Dunn's post hoc test (grafico A) o il Tukey post hoc test (grafico B).

Nonostante ciò, per SF (Kruskal-Wallis: H chi²: 154,9; p same: 1,13E-31) e RS (ANOVA: P same 1,319E-37; F 52,35) si evidenzia che i filtrati provenienti dalla coltura liquida dei ceppi di *Trichoderma* E45, T25 e T22 sono meno fitotossici, determinando una riduzione dell'altezza delle piante meno incisiva rispetto ai surnatanti dei sottoprodotti non inoculati (NoF).

8.3. Discussione

Il filtrato di OP, a concentrazioni maggiori del 5% v/v nel substrato, causa la diminuzione della crescita delle plantule di pomodoro rispetto al CNT. Anche gli autori Marra *et al.* (2018) hanno constatato che il trattamento dei semi di *Lepium sativum* L. e *Brassica rapa* L. subsp. *Oleifera* con un estratto acquoso di OP (50 g/L, precedentemente essiccato e polverizzato) ha influito negativamente sulla crescita *in vitro* delle radici delle piante, determinando nel caso di *L. sativum* la diminuzione della lunghezza delle radici di più del 70% rispetto al controllo. I risultati sono concordi, inoltre, con quanto riportato nello studio di Aranda *et al.* (2015) nel quale un estratto acquoso di OP, anche a basse concentrazioni, ha ridotto drasticamente la crescita di piante di pomodoro. I saggi condotti con i filtrati dei sottoprodotti RS e SF diluiti al 10% in WA, hanno causato una notevole diminuzione della crescita di piante di pomodoro, probabilmente attribuibile alla presenza nei sottoprodotti di composti tossici quali polifenoli e glucosinolati (Lomascolo *et al.*, 2012). I risultati dimostrano che la coltivazione liquida di diversi ceppi di *Trichoderma* su substrati contenenti i tre sottoprodotti, determina una riduzione degli effetti fitotossici dei rispettivi filtrati colturali sul pomodoro. Molti autori hanno riportato la capacità di numerosi funghi, tra cui diverse specie di *Trichoderma*, di diminuire la fitotossicità dei sottoprodotti contribuendo alla loro detossificazione. Tali effetti possono essere attribuiti principalmente all'azione di enzimi idrolitici prodotti dai funghi, in grado di degradare le sostanze tossiche contenute negli scarti come fenoli, glucosinolati e altri composti (Rozan *et al.*, 1996; Vig et Walia, 2001; Sampedro *et al.*, 2004; Aranda *et al.*, 2015; Trocozo *et al.*, 2019; Leontopolus *et al.*, 2015). Ad esempio, Troncozo *et al.* (2019) hanno constatato una diminuzione degli effetti fitotossici di un estratto acquoso contenente vinacce, provenienti dalla spremitura dell'uva (10% p/v) su piante di pomodoro e lattuga a seguito della crescita sui sottoprodotti di diversi funghi, tra cui un ceppo di *T. harzianum*. Nel succitato studio di Aranda *et al.* (2015)

si evidenzia una notevole diminuzione degli effetti fitotossici dell'estratto acquoso di OP a seguito della crescita sul sottoprodotto delle specie fungine *Fusarium oxysporum*, *F. lateritium* e *Penicillium chrysogenum*.

L'effetto benefico del fungo sulla crescita delle piante è stato riscontrato anche nel primo saggio, con l'1 % di surnatante di OP50, % non fitotossica. Non si può escludere che tale effetto sia dovuto alla presenza di metaboliti secondari prodotti da *Trichoderma*. E' noto che i funghi del genere *Trichoderma* sono in grado di produrre dei composti ormonosimili che generano dei cambiamenti sostanziali nel metabolismo della pianta favorendone la crescita e inducendo, in definitiva, la pianta ad una maggiore resistenza sistemica. Tra questi, ad esempio l'acido 3-indolacetico (IAA) gioca un ruolo chiave nel favorire una maggiore tolleranza della pianta a stress abiotici (Vinale *et al.*, 2012; Vinale *et al.*, 2014; Contreras-Cornejo *et al.*, 2016; Pascale *et al.*, 2017).

9. Valutazione degli effetti dei sottoprodotti oleari incorporati nel terreno sulla crescita delle piante

Al fine di verificare un effetto sulla crescita delle piante dell'uso diretto dei 3 sottoprodotti incorporati nel terreno, sono stati allestiti saggi *in vivo* su piante di pomodoro per definire: a) la concentrazione di sottoprodotto non fitotossico; b) i livelli di fitotossicità di ciascun sottoprodotto; c) gli effetti dei trattamenti con *Trichoderma* spp. sui sottoprodotti, volti a ridurre fitotossicità o migliorare la crescita delle piante; d) quale combinazione tra la tipologia e concentrazione di sottoprodotto e ceppo di *Trichoderma* ha maggiore potenzialità per lo sviluppo di prodotti agricoli come fertilizzanti o biostimolanti.

9.1. Utilizzo dei sottoprodotti SF, RS ed OP a concentrazioni variabili dal 5 % al 50%

9.1.1. Materiali e metodi

L'esperimento è stato condotto mescolando nel terriccio un quantitativo in peso di SF e RS (sottoprodotto secco) pari al 5% e al 10% (p/p). Nel caso di OP (sottoprodotto umido), oltre al 5% e 10%, sono state aggiunte anche le percentuali del sottoprodotto pari al 25% e al 50%. Il terriccio universale (Floragard, Germania), precedentemente sterilizzato, è stato mischiato in maniera uniforme ed omogenea con i 3 sottoprodotti alle percentuali sopra indicate e poi impiegato per riempire seminiere di polistirolo da 40 fori (6 cm Ø). Il controllo (CNT) è stato effettuato utilizzando esclusivamente terriccio sterile. Semi di pomodoro (cv. San Marzano nano), sono stati piantumati singolarmente in ciascun foro e successivamente ogni seminiera è stata coperta con carta inumidita per assicurare una elevata % di Umidità Relativa (UR). Le seminiere sono state poste in serra a 25° C. Sono state effettuate 3 repliche biologiche per ogni trattamento, ciascuna di 5 piante, disposte in blocchi randomizzati. A due settimane dall'emergenza delle piantine è stata misurata l'altezza del fusto. L'analisi statistica dei risultati è stata svolta come descritto nel paragrafo 5.1.1.

9.1.2. Risultati

I risultati relativi all'altezza del fusto a sole 2 settimane dall'emergenza mostrano che le percentuali di sottoprodotti impiegate sono fortemente fitotossiche e suggeriscono una relazione dose effetto. Infatti all'aumentare della % di sottoprodotto corrisponde una riduzione significativa dell'altezza delle piante. In particolare, l'aggiunta di SF al 5% e al 10% determina una diminuzione dell'altezza delle piante rispettivamente del 25% e 53%

rispetto al CNT (Tabella 9). Nel caso di RS al 5 % l'altezza diminuisce del 60% rispetto al CNT, mentre al 10% è stata registrata un'elevata mortalità, tale da non permettere la raccolta dei dati. OP diminuisce del 12% la lunghezza delle piante rispetto al CNT quando usato al 5% e provoca una progressiva diminuzione dell'altezza delle plantule all'aumentare del suo contenuto nel terriccio, con una riduzione, del parametro biometrico considerato, del 61 % rispetto al CNT quando usato al 50%.

Tabella 9. Altezza del fusto di piante di pomodoro cresciute su suolo arricchito con SF e RS in un range dal 5 al 10% (p/p) e OP in un range dal 5 al 50% (p/p). Il CNT è costituito da solo suolo.

	Treatment	Mean (cm)	St. dev
SF	CNT	5,9	0,7
	5%	4,4	1,4
	10%	2,8	0,7
RS	CNT	6,1	1,0
	5%	2,4	0,4
	10%	-	
OP	CNT	6,0	0,7
	5%	5,3	1,1
	10%	4,9	0,6
	25%	3,1	0,6
	50%	2,3	0,1

9.2. Utilizzo dei sottoprodotti SF, RS ed OP a concentrazioni variabili dal 0,5 % al 4%

9.2.1. Materiali e metodi

Un successivo saggio è stato allestito trapiantando piante di pomodoro (cv. San Marzano Nano), a 10 giorni dall'emergenza in terreno sterile, in vasi di 14 cm Ø contenenti terreno precedentemente arricchito con i sottoprodotti SF, RS e OP alle percentuali in peso dello 0,5%, 1%, 2,5% e 4%. Il controllo (CNT) è stato effettuato utilizzando esclusivamente terriccio senza l'aggiunta dei sottoprodotti. Sono state effettuate 3 repliche biologiche per

ogni trattamento, ciascuna di 5 piante, disposte in blocchi randomizzati. Dopo 21 giorni dal trapianto sono stati valutati i principali parametri biometrici (altezza fusto, lunghezza radice, peso fresco della parte epigea e ipogea delle piante). La biomassa epigea è stata raccolta, pesata e poi seccata in stufa a 60°C fino a peso costante per la quantificazione della sostanza secca. Le radici sono state accuratamente lavate con acqua corrente al fine di rimuovere i residui di suolo e sono state quindi pesate e poi seccate in stufa a 60°C fino a peso costante per la quantificazione del peso secco. L'analisi statistica dei risultati è stata svolta come descritto nel paragrafo 5.1.1.

9.2.2. Risultati

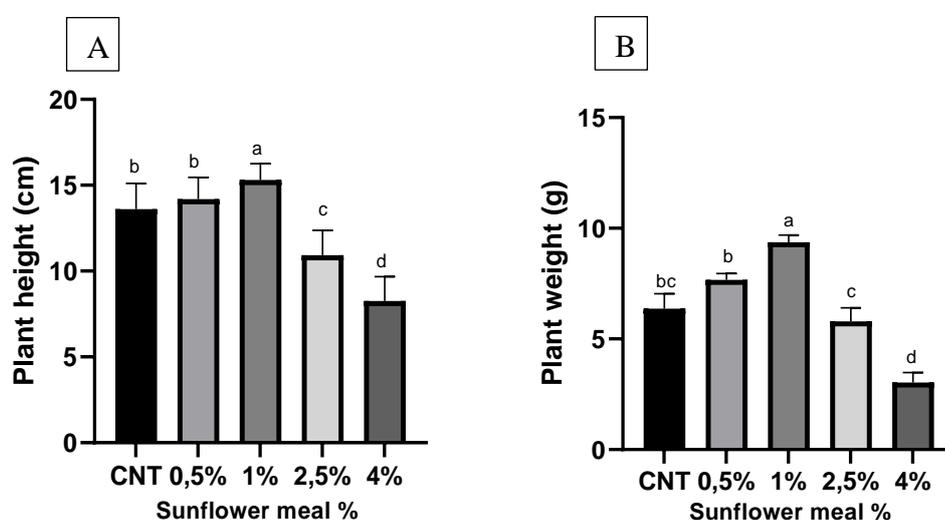


Figura 24. Altezza del fusto (cm) (A) e peso secco della parte epigea (g) (B) di piante di pomodoro fertilizzate con SF in un range dallo 0,5 al 4%. Il CNT è costituito da solo suolo. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Tukey post hoc test.

I risultati mostrano che dopo circa 21 giorni dal trapianto l'aggiunta al suolo del sottoprodotto SF all'1% contribuisce ad aumentare sia l'altezza del fusto (ANOVA, p same: $3,715E-38$; F 108,8) che il peso secco (ANOVA, p same: $3,331E-07$; F 67,72) della parte epigea delle piante rispetto al CNT (Figura 24). Un contenuto di SF, pari al 2,5 e 4 %, ha invece causa la progressiva diminuzione dei due parametri biometrici, confermando l'effetto fitotossico del sottoprodotto evidenziato nei precedenti esperimenti.

Un andamento simile si osserva per l'altezza del fusto e il peso secco della parte epigea di piante fertilizzate con RS (Figura 25). Quando al terriccio viene aggiunto RS all'1% l'altezza delle piante è significativamente maggiore rispetto agli altri trattamenti (ANOVA, p same: $8,646E-39$; F 112,4). L'altezza delle piantine diminuisce progressivamente quando

si aggiungono al suolo le percentuali del 2,5 % e 4% del sottoprodotto. Mentre le piante trattate con RS allo 0,5 % e 1% hanno un peso secco della parte epigea paragonabile al CNT, l'aggiunta al suolo di RS al 2,5 e 4 % causa una forte diminuzione del parametro rispetto al CNT (ANOVA, P same: 3,331E-07; F : 67,72).

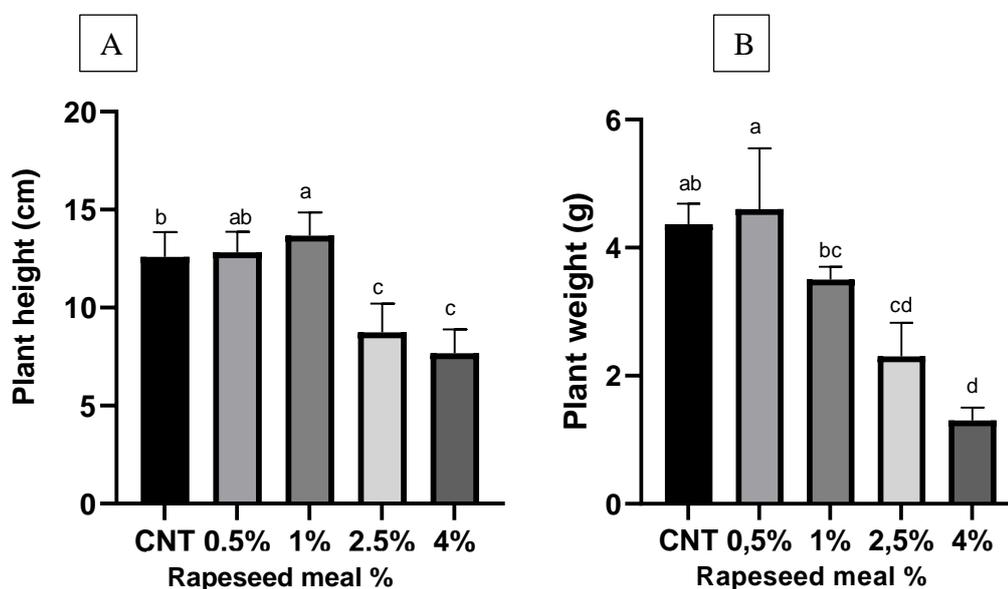


Figura 25. Altezza del fusto (cm) (A) e peso secco della parte epigea (g) (B) di piante di pomodoro fertilizzate con RS in un range dallo 0,5 al 4%. Il CNT è costituito da solo suolo. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Tukey's post hoc test.

Il sottoprodotto OP riduce significativamente l'altezza delle piante rispetto al CNT quando usato a % maggiori dell'1% (Kruskal-Wallis, H χ^2 di 78,13 e un p same di 4,049E-16). L'aggiunta di OP allo 0,5 e 1% non varia l'altezza delle piante rispetto al CNT (Figura 26). I risultati relativi al peso secco della parte epigea delle piante trattate con OP mostrano un andamento simile ai risultati relativi all'altezza: OP al 2,5% e 4% influisce negativamente sul peso secco rispetto al CNT (ANOVA p (same) di 6,886E-39 e F pari a 21,38). Il peso secco non varia invece rispetto al CNT quando al suolo viene aggiunto OP allo 0,5% e 1%.

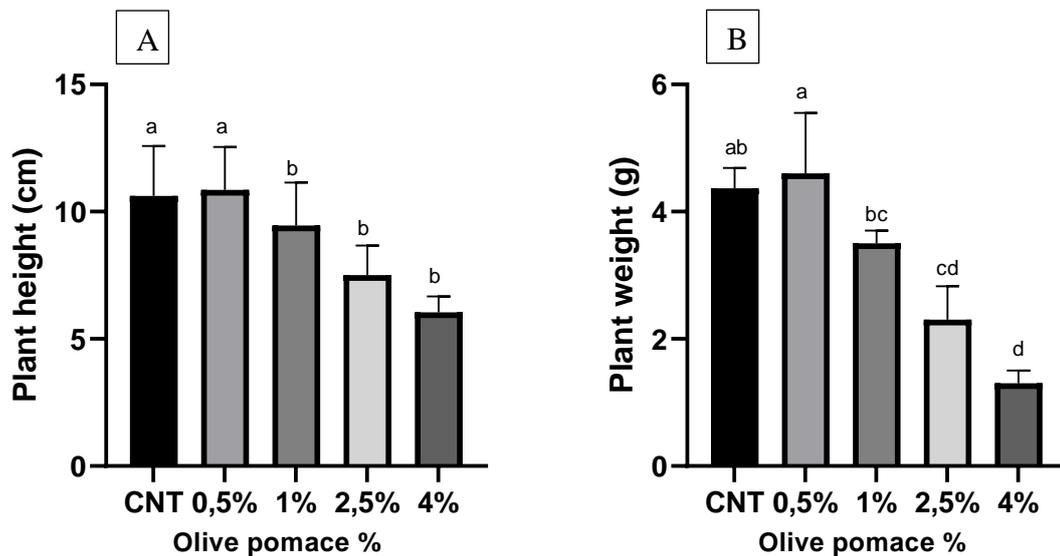


Figura 26. Altezza del fusto (cm) (A) e peso secco (g) (B) della parte epigea di piante di pomodoro fertilizzate con OP in un range dallo 0,5 al 4%. Il CNT è costituito da solo suolo. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Dunn's post hoc test (grafico A) o il Tukey's post hoc test (grafico B).

9.3. Utilizzo dei sottoprodotti SF e RS a concentrazioni dell'1 % e 4%

9.3.1. Materiali e metodi

Un ultimo esperimento è stato ripetuto aggiungendo al suolo i sottoprodotti SF ed RS alle percentuali in peso dell'1% e 4% del peso del terriccio, al fine di confermarne i risultati ottenuti nei saggi descritti nei paragrafi precedenti su un periodo di coltivazione più lungo, pari a due mesi. Il controllo (CNT) è stato effettuato utilizzando esclusivamente terriccio. Sono state effettuate 3 repliche biologiche per ogni trattamento, ciascuna di 8 piante di pomodoro, disposte in blocchi randomizzati. Dopo 2 mesi dal trapianto sono stati valutati i principali parametri biometrici (altezza fusto, lunghezza radice, peso fresco e secco della parte epigea e ipogea delle piante). L'analisi statistica dei risultati è stata svolta come descritto nel paragrafo 5.1.1.

9.3.2. Risultati

I risultati (Figura 27) relativi alla crescita delle piante a due mesi dal trapianto confermano un andamento simile ai risultati osservati nel precedente esperimento, a 21 giorni dal trapianto, dimostrando che l'aggiunta dei sottoprodotti alla concentrazione dell'1% aumenta l'altezza delle piante di pomodoro rispetto al CNT, del 13% nel caso di SF e del 24% nel caso di RS. Quando i sottoprodotti vengono aggiunti al suolo al 4% si conferma

l'effetto fitotossico, l'altezza delle piante rispetto al CNT diminuisce del 15% nel caso di SF e del 19% nel caso di RS (ANOVA, p same 1,491E-12; F 24,08).

In aggiunta, i trattamenti SF 1% e RS 1% favoriscono un incremento significativo del peso secco della parte epigea delle piante rispetto al CNT (Kruskal Wallis, H χ^2 : 12,23; p same: 0,014). L'utilizzo, invece dei sottoprodotti SF ed RS al 4% causa una diminuzione del peso rispetto al CNT e al resto dei trattamenti.

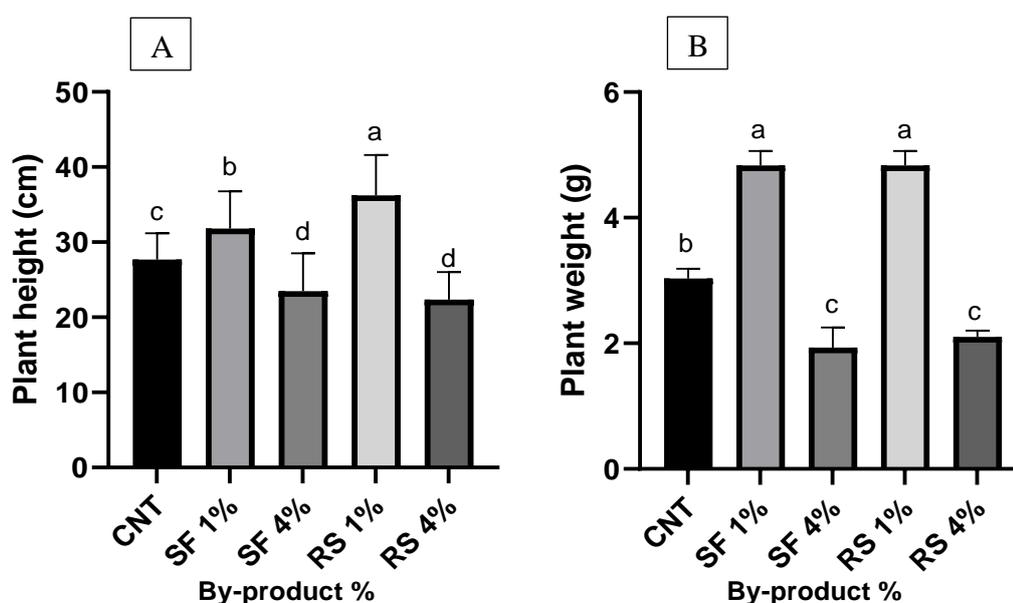


Figura 27. Altezza dei fusti (cm) (A), e peso secco (g) (B) della parte epigea delle piante il cui suolo è stato arricchito con i sottoprodotti SF e RS al 1% e al 4% (peso/peso). Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Fisher's post hoc test.

Per quanto riguarda la lunghezza delle radici delle piante (Figura 28) SF ed RS all'1% diminuiscono tale parametro rispettivamente del 25% e del 37%. Questo decremento risulta essere ancora più evidente quando i sottoprodotti vengono utilizzati al 4%: SF diminuisce la lunghezza delle radici del 60% rispetto al CNT (Kruskal Wallis, H χ^2 : 39,92; p same: 4,453E-08), mentre RS del 50% (ANOVA p same 2,123E-06; F 45,84). Il trattamento SF 1% favorisce invece un maggiore peso secco delle radici rispetto al resto dei trattamenti, con un incremento di circa il 100% rispetto al CNT. Il trattamento RS 1% invece non provoca una variazione significativa del peso secco delle radici risultando uguale al CNT. Infine, SF e RS al 4% causano una drastica riduzione del peso secco delle radici, riducendolo del 50% rispetto al CNT.

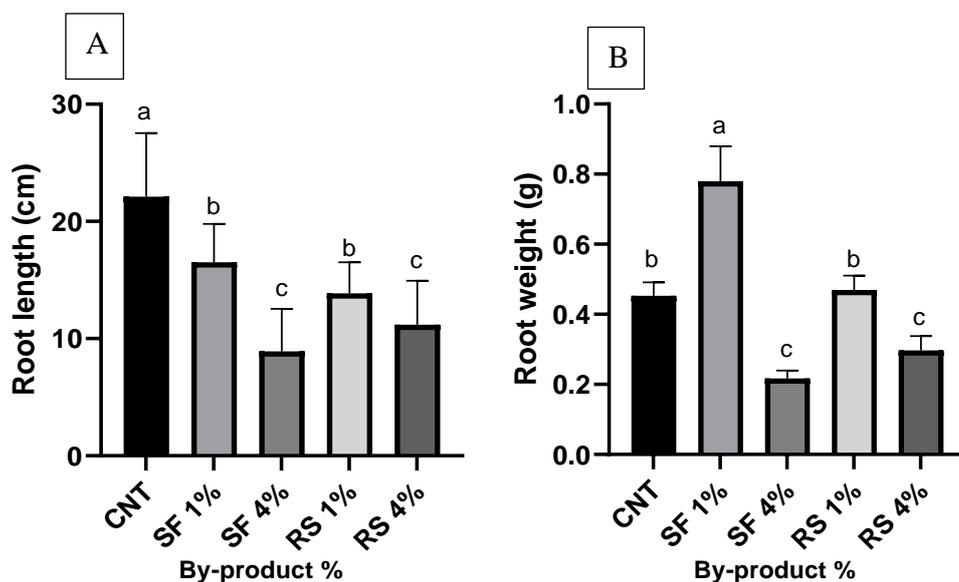


Figura 28. Lunghezza delle radici (cm) (grafico A) e peso secco delle radici (g) (grafico B) il cui suolo è stato fertilizzato con i sottoprodotti SF e RS al 1% e al 4% (peso/peso) Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Dunn's post hoc test (grafico A) e Tukey's post hoc test (grafico B).

9.4. Discussione

I risultati dimostrano che l'aggiunta al suolo dei sottoprodotti all'1 % contribuisce ad aumentare notevolmente la crescita delle piante rispetto al controllo: l'altezza del fusto aumenta del 10 % e 25 % nei trattamenti con SF 1 % e RS 1% e il peso secco della parte epigea delle piante aumenta di circa il 90 % in ambedue i trattamenti rispetto al controllo. Inoltre SF 1% favorisce un incremento del peso secco delle radici dell'80% rispetto al controllo. I risultati ottenuti sono in linea con quanto descritto da diversi autori che hanno riscontrato l'aumento della crescita di *Lactuca sativa* L., *Beta vulgaris* L., *Spinacia oleracea* L. (Mazzoncini *et al.*, 2015) e *Cichorium endivia* L. (Zaccardelli *et al.*, 2008) a seguito dell'incorporazione al suolo di SF e di farine provenienti dall'estrazione dell'olio da *Brassicaceae*, a % comprese tra l'1 e il 2% del peso del suolo. In particolare, nello studio di Zaccardelli *et al.* (2008) l'aggiunta dei sottoprodotti aumenta la produzione di lattuga di circa l'80% rispetto al controllo e nel caso dello spinacio e della bieta tale incremento supera il 150%. Gli studi citati dimostrano che i sottoprodotti RS e SF possono essere utilizzati come fertilizzanti organici in quanto apportano N e sostanza organica garantendo rese paragonabili a quelle ottenute utilizzando fertilizzanti azotati minerali. L'uso di SF e RS come fertilizzanti organici azotati (N) può rappresentare un'opportunità per ridurre l'impatto ambientale correlato alla produzione e all'uso di fertilizzanti chimici (elevato utilizzo di energia fossile, massiccia emissione di gas serra, lisciviazione di azoto,

volatilizzazione del protossido di azoto, ecc.) e per migliorare la fertilità del suolo attraverso l'apporto di carbonio organico.

Per quanto riguarda l'aggiunta al suolo di OP, non sono stati riscontrati effetti benefici sulla crescita della coltura, al contrario sono stati osservati effetti fitotossici a partire da concentrazioni di OP molto basse (1 %) con una notevole diminuzione dell'altezza e peso del fusto. Diversi studi dimostrano invece che l'aggiunta di OP al suolo, a concentrazioni simili a quelle testate, favorisce un aumento delle rese sia in termini qualitativi che quantitativi, apportando un miglioramento delle proprietà fisiche, chimiche e biologiche del terreno (Aranda *et al.*, 2015; García-Ruiz *et al.*, 2012; Gómez-Muñoz *et al.*, 2013; Proietti *et al.*, 2015; Saviozzi *et al.*, 2001). La discordanza tra i risultati ottenuti e la letteratura può essere attribuita alla variabilità della composizione del sottoprodotto, in particolare in termini di contenuto di sostanze fitotossiche quali i polifenoli. Tale variabilità può dipendere da numerosi fattori tra cui ad esempio le modalità e i tempi di stoccaggio del sottoprodotto, che possono influire sulla sedimentazione della frazione insolubile, sulla trasformazione microbiologica della sostanza organica e sull'evaporazione della componente acquosa (Saadi *et al.*, 2007; Pinho *et al.*, 2017).

I sottoprodotti SF e RS utilizzati a % pari al 2,5 % e al 4% hanno fortemente ridotto la crescita delle piante, causando una diminuzione dell'altezza e del peso secco della parte epigea delle piante, nonché una minore lunghezza e peso secco delle radici. Questi fenomeni di fitotossicità riscontrati possono essere attribuiti alla presenza di un'elevata concentrazione di composti tossici contenuti nei sottoprodotti nello strato superiore del suolo esplorato dalle radici, nonché dalla somministrazione di un'eccessiva dose di N alle piante. Le farine di estrazione di oli da semi di *Brassicaceae* sono caratterizzati dalla presenza di glucosinolati la cui idrolisi porta alla formazione di isotiocinati, noti per gli effetti tossici su piante e microorganismi, inclusi quelli responsabili dei processi di nitrificazione e mineralizzazione dell' N. L'azione biocida di questi composti è correlata alla concentrazione e alla tipologia di glucosinolati (Lee *et al.*, 2015; Hodge *et al.*, 2019; Poveda *et al.*, 2020). Inoltre, SF e RS possono contenere una frazione di olio residuo dai processi di estrazione, la cui presenza al suolo può rallentare i processi di mineralizzazione, incidendo negativamente sulla disponibilità dei nutrienti per le piante, in particolare di azoto (N) e fosforo (P). Ciò può verificarsi a causa del comportamento idrofobo della frazione lipidica, che impedisce l'imbibizione del sottoprodotto dopo l'incorporazione nel suolo, o a causa dell'inibizione dell'attività microbica del suolo dovuta alla presenza nella frazione oleosa di

composti tossici, come i polifenoli (Zaccardelli *et al.*, 2013). Gli effetti fitotossici riscontrati sulle piante di pomodoro, a seguito dell'aggiunta al suolo di un'elevata % di RS e SF, possono essere stati causati da un azione diretta dei composti tossici presenti nei sottoprodotti sulle radici delle piante e/o indiretta, causando un impatto negativo sul microbioma del suolo. L'utilizzo di microrganismi benefici, come *Trichoderma* spp., può ridurre gli effetti fitotossici dei sottoprodotti contribuendo alla degradazione delle sostanze tossiche e all'instaurarsi di un ambiente edafico favorevole alla crescita vegetale ed indurre le piante ad una maggiore resistenza agli stress, promuovendone in definitiva la crescita.

10. Valutazione degli effetti dei sottoprodotti SF ed RS pretrattati con *Trichoderma* in Fermentazione in Stato Solido sulla coltivazione di pomodoro

Sono stati realizzati saggi *in vivo* su pomodoro al fine di verificare l'effetto sulla crescita delle piante dell'incorporazione nel terreno dei sottoprodotti SF e RF colonizzati da ceppi di *Trichoderma* (E45, T22 e T25) a seguito di un processo di Fermentazione in Stato Solido (SSF), allestito come descritto nella Sezione 2.5.4.

10.1. Valutazione della crescita vegetale

10.1.1. Materiali e metodi

Semi di pomodoro (cv. San Marzano nano) sono stati posti a germinare in serra, in terriccio universale, a 20°C e con il 100% di UR. Dopo 10 giorni dalla semina, le piantine germinate sono state trapiantate in vasi di 14 cm Ø contenenti il terriccio mescolato con i sottoprodotti SF o RS colonizzati dai ceppi di *Trichoderma*, aggiunti in percentuali pari all'1% e al 4% del peso del terriccio. Come controllo è stato utilizzato terriccio arricchito con i sottoprodotti SF e RS all'1% e al 4%, non colonizzato dai funghi. Inoltre, sono stati aggiunti i trattamenti con ciascuno dei ceppi di *Trichoderma*, innaffiando il terreno con una sospensione di spore, per valutare l'effetto sulla crescita vegetativa dei singoli ceppi (Tabella 10). Il trattamento di innaffiamento è stato eseguito al momento del trapianto e a cadenza di 15 gg per circa 2 mesi con l'irrigazione di 50 ml di ciascuna sospensione conidica dei ceppi E45, T22 e T25 alla concentrazione di 1×10^6 spore/ml. Come controllo negativo (CNT) sono state utilizzate le piante allevate in terreno non arricchito con i sottoprodotti-*Trichoderma*, non innaffiate con i funghi, e irrigate con sola acqua (Figura 29). Per ogni trattamento sono state effettuate 3 repliche biologiche, ciascuna di 8 piante, disposte in blocchi randomizzati. I saggi sono stati condotti in serra, in condizioni controllate di temperatura a 25 °C, fotoperiodo 14/10 ore luce/buio e umidità relativa dell'80%.

Tabella 10. Trattamenti del terreno con i sottoprodotti di Girasole (SF) e Colza (RS) all'1% e al 4% (p/p) pretrattati o non trattati con i ceppi di *Trichoderma* T22, T25, E45 o con le sospensioni conidiche degli stessi ceppi. CNT: controllo (No *Trichoderma*, No sottoprodotto).

Sigle	Trattamenti % Sottoprodotto + ceppo <i>Trichoderma</i>
1	CNT
2	T22
3	T25
4	E45
5	SF 1%
6	SF 1% T22
7	SF 1% T25
8	SF 1% E45
9	SF 4%
10	SF 4% T22
11	SF 4% T25
12	SF 4% E45
13	RS 1%
14	RS 1% T22
15	RS 1% T25
16	RS 1% E45
17	RS 4%
18	RS 4% T22
19	RS 4% T25
20	RS 4% E45

Ad un mese dal trapianto è stata rilevata l'altezza del fusto ed è stato misurato il contenuto di clorofilla nelle foglie, utilizzando un apposito misuratore SPAD (SPAD-502, Konica Minolta, Inc.). Tale misurazione è stata ripetuta dopo 2 mesi dal trapianto, insieme alla valutazione dei principali parametri biometrici (altezza fusto, lunghezza radice, peso fresco della parte epigea e ipogea delle piante). La biomassa epigea è stata raccolta e pesata e poi seccata in stufa a 60°C fino a peso costante per la quantificazione del peso

secco. Le radici sono state accuratamente lavate con acqua corrente al fine di rimuovere i residui di suolo e sono state quindi pesate e poi seccate in stufa a 60°C fino a peso costante per la quantificazione della sostanza secca. L'analisi statistica dei risultati è stata svolta come descritto nel paragrafo 5.1.1.

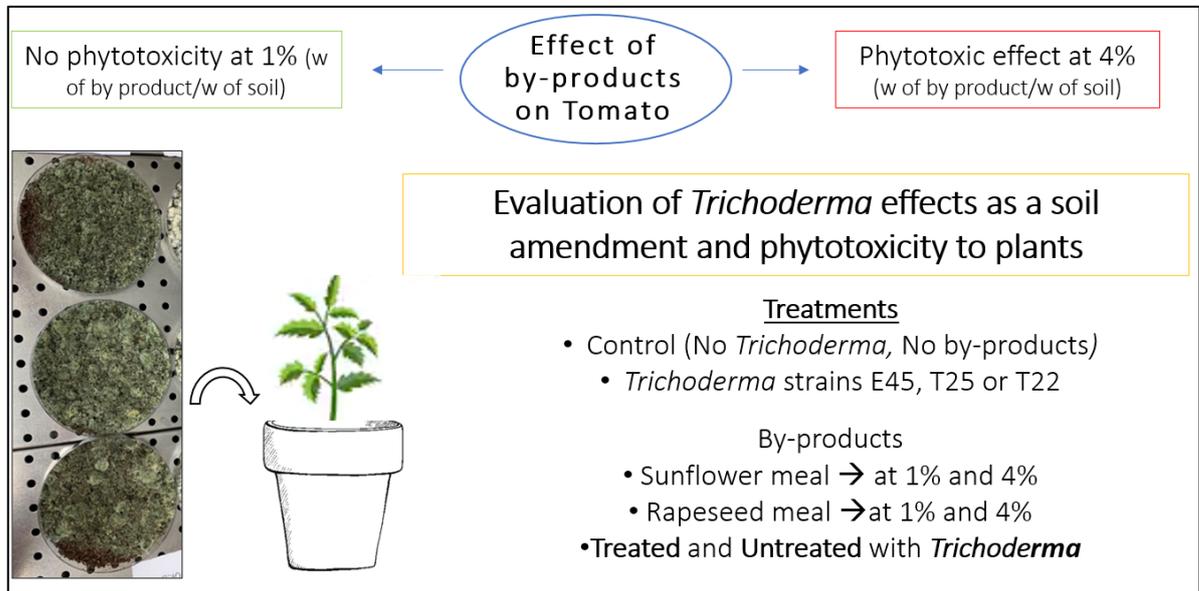


Figura 29. Procedura del saggio in vivo con i sottoprodotti pretrattati con *Trichoderma* e usati come ammendanti al suolo all'1% e al 4% per valutare gli effetti sulla crescita delle piante.

10.1.2. Risultati

10.1.2.1. Altezza fusto ad un mese dal trapianto

Il trattamento del suolo con le sospensioni conidiche dei ceppi di *Trichoderma* non influisce significativamente sull'altezza delle piante, sebbene E45 favorisca un leggero incremento della crescita rispetto al CNT (Figura 30). L'aggiunta al suolo di SF 1% non influisce sull'altezza delle piante rispetto al CNT, al contrario SF 1% inoculato con il ceppo T22 favorisce la crescita di circa il 50% in più rispetto al CNT e al sottoprodotto non inoculato (SF 1%). Mentre SF 4% in assenza di *Trichoderma* risulta essere fortemente fitotossico, riducendo significativamente tale parametro, SF 4% inoculato con T22 ed E45, non determina una diminuzione dell'altezza rispetto al CNT. Infine, le piante trattate con SF 4% T25, pur risultando di altezza minore rispetto al CNT, sono comunque più alte delle piante trattate esclusivamente con SF al 4%, dimostrando in definitiva che *Trichoderma* riduce la fitotossicità del sottoprodotto quando utilizzato al 4% (Kruskal-Wallis, H χ^2 : 85,93; p same: 1,02E-13).

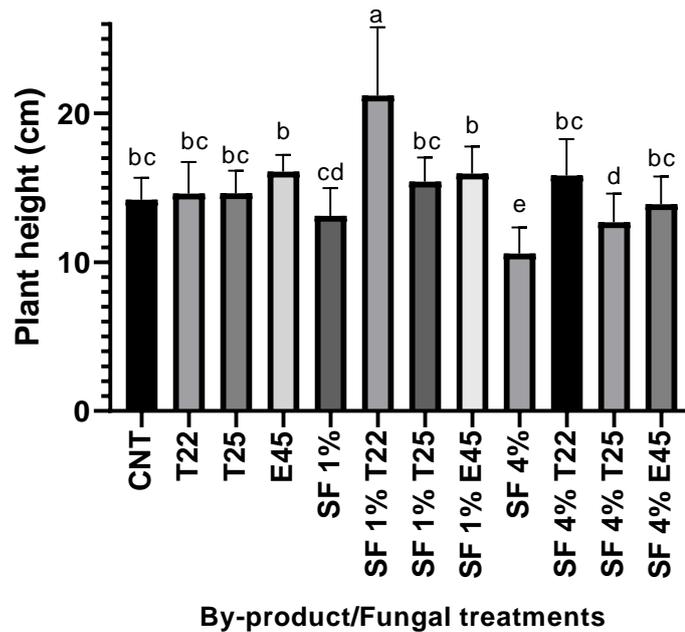


Figura 30. Altezza delle piante (cm) cresciute su suolo inoculato con sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF all'1% o al 4% precedentemente trattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non trattato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti tra loro secondo il Dunn's post hoc test.

Anche nel caso di RS (Figura 31), l'altezza delle piante coltivate sul suolo arricchito con RS 1% T22 è maggiore rispetto al resto dei trattamenti, con un aumento del 51% rispetto al CNT e del 66% rispetto a RS 1% (Kruskal-Wallis, $H \chi^2: 90,17$; $p \text{ same}: 1,50E-14$). L'impiego di RS 1% pretrattato con i ceppi E45 e T25 influisce positivamente sulla crescita in altezza delle piante rispetto al sottoprodotto tal quale. Inoltre, l'aggiunta al suolo di RS 4% inoculato con i ceppi di *Trichoderma* T22 e E45 favorisce una maggiore crescita delle piante rispetto a RS al 4% tal quale, riducendone la fitotossicità. In definitiva, entrambi i sottoprodotti inoculati con alcuni ceppi di *Trichoderma* aumentano l'altezza delle piante rispetto al CNT e rispetto ai sottoprodotti in assenza di *Trichoderma*.

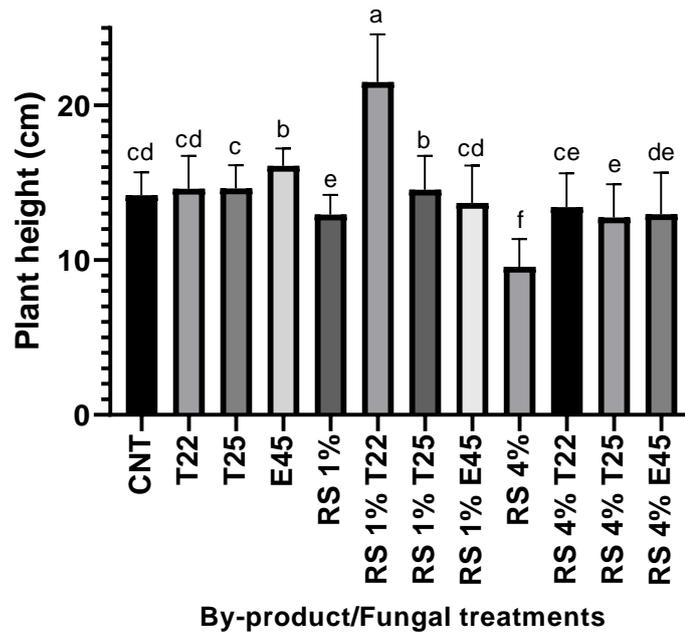


Figura 31. Altezza delle piante (cm) cresciute su suolo inoculato con sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non fertilizzato e non inoculato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti tra loro secondo il Mann Whitney's post hoc test.

10.1.2.2. Altezza del fusto e peso della parte epigea delle piante a due mesi dal trapianto

I risultati relativi all'altezza dei fusti a due mesi dal trapianto confermano quanto descritto precedentemente, rendendo ancora più evidente l'effetto dei sottoprodotti in combinazione con *Trichoderma* sulla crescita delle piante. L'aggiunta al suolo di SF all'1% e al 4% pretrattato in SSF con i ceppi *Trichoderma* influisce positivamente sulla crescita delle piante, determinando un'altezza maggiore rispetto al CNT e ai sottoprodotti senza *Trichoderma* (ANOVA, p same: 4,413E-29; F :23,95). È importante sottolineare l'effetto positivo dell'impiego di SF pretrattato con i ceppi *Trichoderma*; oltre a determinare una maggiore altezza delle piante rispetto al CNT e a sottoprodotto tal quale, favorisce una maggiore crescita anche rispetto all'inoculo con i soli ceppi di *Trichoderma* (Figura 32). Infatti mentre l'altezza delle piante inoculate con i soli ceppi di *Trichoderma* risulta essere statisticamente uguale al CNT, SF 1% E45 determina un aumento dell'altezza del fusto pari al 50% e SF 1% T25 e SF 1% T22 di circa il 40 % rispetto al CNT e all'inoculo con i soli ceppi. Nel caso di SF al 4% pretrattato con i tre ceppi di *Trichoderma*, le piante hanno un'altezza significativamente maggiore paragonate al CNT e con valori simili a SF 1%.

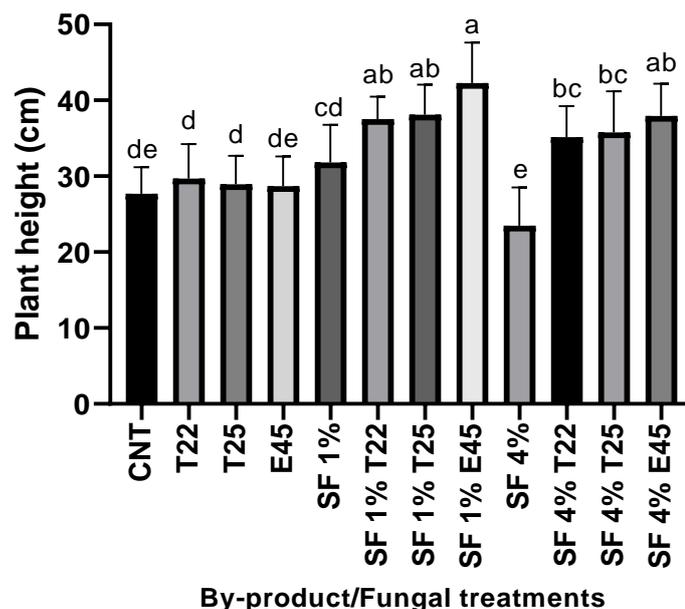


Figura 32. Altezza delle piante (cm) cresciute su suolo inoculato con sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non trattato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti tra loro secondo il Tukey's post hoc test.

Le piante dei trattamenti SF 1% T22, SF 1% E45 e SF 1% T25 hanno un peso secco della parte epigea rispettivamente del 40 %, 38 % e 37% più elevato rispetto al CNT (Kruskal-Wallis H χ^2 : 30,38; p same: 0,001). Anche il peso secco delle piante del trattamento SF 1% è significativamente maggiore rispetto al CNT (+ 35%). Come riscontrato precedentemente per l'altezza delle piante, anche in questo caso è importante sottolineare l'effetto positivo dell'interazione tra *Trichoderma* e il sottoprodotto sul peso secco della parte epigea; SF pretrattato con i ceppi *Trichoderma* favorisce un aumento del peso secco della parte epigea rispetto all'inoculo con i soli ceppi di *Trichoderma* (Tabella 11). Il trattamento SF 4% riduce il peso secco rispetto al CNT e a tutti gli altri trattamenti. Anche in questo caso, il pretrattamento del sottoprodotto con *Trichoderma* contribuisce ad una riduzione della fitotossicità, determinando un aumento del peso secco della parte epigea riportandolo a valori simili al CNT.

Tabella 11. Peso secco (g) della parte epigea delle piante cresciute su suolo inoculato con le sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non fertilizzato e non inoculato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Mann Whitney's post hoc test.

Treatment	Dry weight \pm st. dv. (g)	Grouping
SF 1% T22	5,1 \pm 0,1	A
SF 1% E45	5 \pm 0,3	A
SF 1% T25	4,9 \pm 0,3	A B
SF 1%	4,8 \pm 0,2	A B C
T22	3,8 \pm 0,3	B C D
E45	3,7 \pm 0,9	C D
T25	3,6 \pm 0,2	D
SF 4% T25	3,5 \pm 0,2	D
SF 4% E45	3,4 \pm 0,3	D
SF 4% T22	3,3 \pm 0,3	D
CNT	3 \pm 0,2	D
SF 4%	1,9 \pm 0,4	E

Inoltre, l'altezza delle piante dei trattamenti RS 1% T22, RS 1% T25 e RS 1% E45 risulta essere maggiore del 55%, del 50% e del 40% rispetto al CNT e al solo inoculo con i ceppi di *Trichoderma*. Anche in questo caso, l'uso combinato di *Trichoderma* e del sottoprodotto favorisce la crescita in altezza delle piante rispetto ai trattamenti con i soli ceppi di *Trichoderma* e con il sottoprodotto tal quale. Il pretrattamento di RS con *Trichoderma* diminuisce inoltre l'effetto fitotossico del sottoprodotto al 4%, determinando un'altezza del fusto significativamente maggiore rispetto alle piante del trattamento RS 4% e riportando l'altezza delle piante a valori uguali e, nel caso di RS 4% T25, maggiori del CNT.

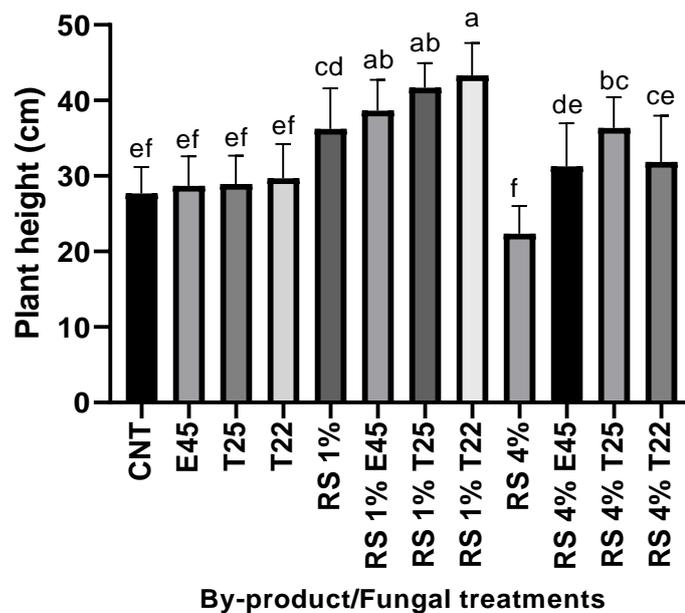


Figura 33 Altezza delle piante (cm) cresciute su suolo inoculato con sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con RS all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non trattato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti tra loro secondo il Dunn's post hoc test.

A conferma dei risultati relativi all'altezza delle piante, l'aggiunta al suolo di RS 1% pretrattato o meno in SSF con *Trichoderma* determina un maggiore del peso secco della parte epigea delle piante in confronto al resto dei trattamenti (Kruskal-Wallis H χ^2 : 30,07; p same: 0,001473), con un incremento nel caso del trattamento RS 1% T22 del 100% rispetto al CNT. Il pretrattamento del sottoprodotto con *Trichoderma* in SSF riduce fortemente la fitotossicità di RS al 4%, riportando il peso secco delle piante a valori uguali al CNT (tabella 12).

Tabella 12. Peso secco (g) della parte epigea delle piante cresciute su suolo inoculato sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non fertilizzato e non inoculato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Mann Whitney's post hoc test.

Treatment	Dry weight (g)	Grouping
RS 1% T22	6,1 ±0,3	A
RS 1% E45	4,9 ±0,3	B
RS 1%	4,8 ±0,2	B
RS 1% T25	4,8 ±0,7	B
T22	3,8 ±0,2	C
RS 4% T22	3,8 ±0,3	C
E45	3,8 ±0,3	C
RS 4% T25	3,6 ±0,1	C D
T25	3,6 ±0,3	C D
RS 4% E45	3,4 ±0,3	C D
CNT	3 ±0,1	D
RS 4%	2,1 ±0,1	E

10.1.2.3. Lunghezza delle radici e peso secco della parte ipogea delle piante a due mesi dal trapianto

L'inoculo con le sospensioni conidiche dei ceppi di *Trichoderma* T22, T25 e E45 determina una lunghezza delle radici significativamente maggiore paragonato al CNT (Test di Kruskal-Wallis H χ^2 : 91,33; p same: di 9,09E-15). L'aggiunta al suolo di SF 1% diminuisce invece la lunghezza delle radici rispetto al CNT. Il pretrattamento del sottoprodotto SF con i ceppi di *Trichoderma* T22, T25 e E45 contribuisce ad aumentare la lunghezza delle radici rispettivamente del 44%, 39% e 37% rispetto a SF 1%, risultando paragonabile al CNT (Figura 34). Inoltre, la lunghezza delle radici dei trattamenti SF 1% T22 e SF 1% T25 sono statisticamente paragonabili alle radici delle piante inoculate con i rispettivi ceppi di *Trichoderma*. SF 4% riduce drasticamente la lunghezza delle radici, risultando minore rispetto al CNT e al resto dei trattamenti. Anche in questo caso, l'inoculo del sottoprodotto con i ceppi di *Trichoderma* favorisce un aumento della lunghezza delle radici di circa l'80 % rispetto alle radici delle piante trattate solo SF 4 %.

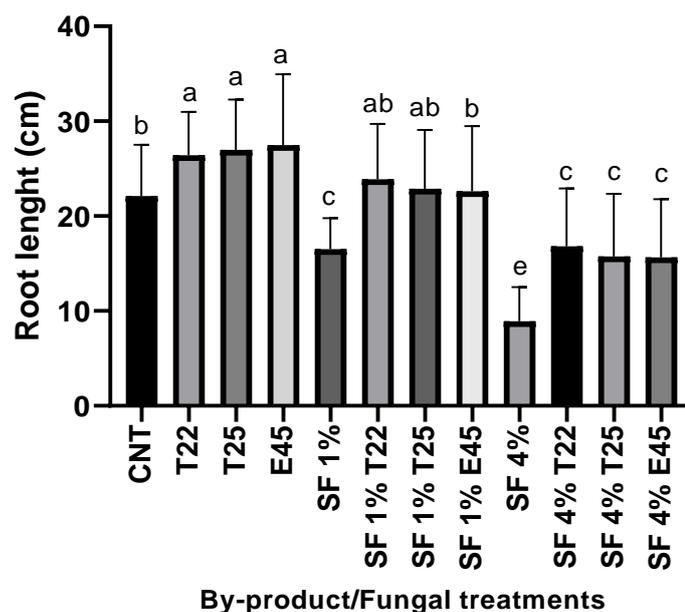


Figura 34. Lunghezza delle radici (cm) delle piante cresciute su suolo inoculato con sospensioni conidiche dei ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF all'1% o al 4% precedentemente trattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non trattato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti tra loro secondo il Mann Whitney post hoc test.

Il peso secco delle radici delle piante dei trattamenti SF 1 % T22 e T25 risulta significativamente maggiore rispetto al resto dei trattamenti (tabella 13) (ANOVA, p same: $1,604E-15$; F 70,53). A seguire SF 1% E45 e SF 1% sono i trattamenti che favoriscono un peso secco delle radici più elevato. Anche in questo caso, l'aggiunta al suolo del sottoprodotto inoculato con *Trichoderma* favorisce un considerevole incremento del peso delle radici non solo rispetto al CNT, ma anche rispetto alle radici inoculate con le sole sospensioni conidiche dei ceppi. Inoltre, l'inoculo del sottoprodotto con *Trichoderma* ne riduce la fitotossicità quando utilizzato al 4 %, determinando nel caso di SF 4% T25 un peso secco della parte ipogea significativamente più elevato rispetto a SF 4%. Riguardo il peso secco delle radici inoculate con le spore di *Trichoderma* non sono state riscontrate differenze significative rispetto al CNT (Figura 36). L'aggiunta al suolo di RS all'1 e 4% determina un decremento della lunghezza delle radici rispetto al CNT (Figura 35).

Tabella 13. Peso secco (g) della parte ipogea delle piante cresciute su suolo inoculato sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non fertilizzato e non inoculato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Tukey' s post hoc test.

Treatment	Dry weight (g)	Grouping
SF 1% T22	1,48 ±0,17	A
SF 1% T25	1,45 ±0,1	A
SF 1% E45	0,95 ±0,09	B
SF 1%	0,78 ±0,03	B C
E45	0,66 ±0,03	C D
T22	0,60 ±0,08	C D
T25	0,53 ±0,03	D
SF 4% T25	0,48 ±0,07	D
CNT	0,45 ±0,03	D E
SF 4% T22	0,44 ±0,05	D E
SF 4% E45	0,42 ±0,06	D E
SF 4%	0,22 ±0,02	E

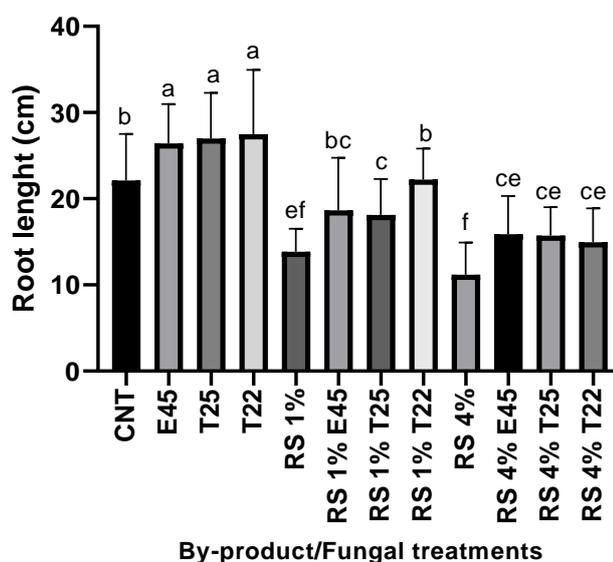


Figura 35. Lunghezza delle radici (cm) delle piante cresciute su suolo inoculato con *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con RS e SF all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non fertilizzato e non inoculato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti tra loro secondo il Mann Whitney post hoc test.

L'inoculo del sottoprodotto con i tre ceppi di *Trichoderma*, favorisce un aumento della lunghezza delle radici rispetto al trattamento con il solo sottoprodotto all'1%, riportando nel caso di RS 1% E45 e RS 1% T22 il parametro a valori paragonabili al CNT (Kruskal Wallis, H chi²: 9,108; p same: 4,47E-18). Inoltre, le radici delle piante trattate con RS 4% pretrattato con *Trichoderma*, hanno una lunghezza maggiore di circa il 40 % rispetto alle piante del trattamento RS 4% tal quale.

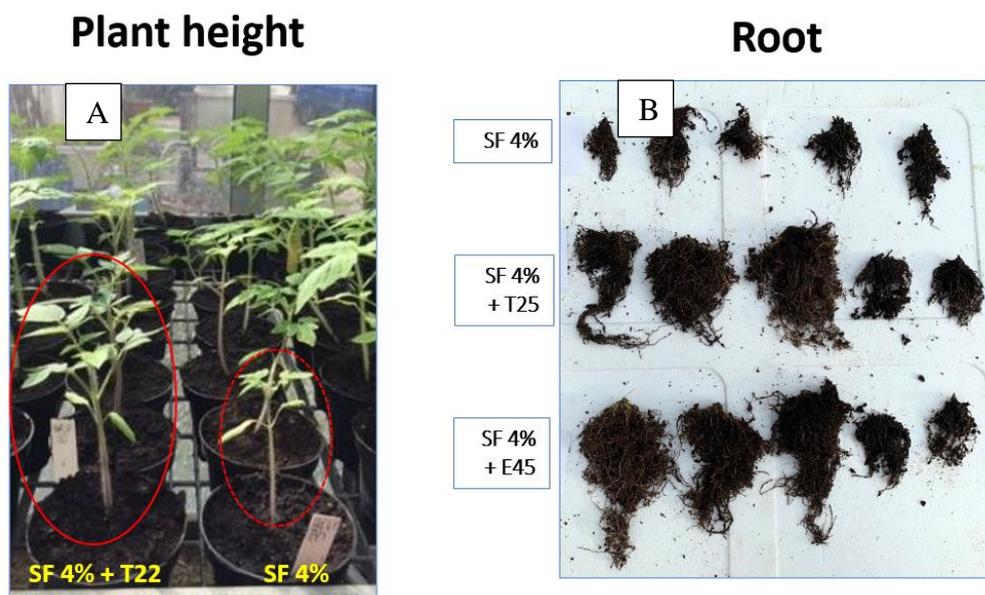


Figura 36. Effetti sulla crescita delle piante di pomodoro di SF 4% inoculato con *Trichoderma* (E45, T25, T22); A) effetto sulla parte epigea (pianta a sx SF+Tricho e pianta a dx solo SF, no Tricho) e ipogea (SF 4%; SF 4% T25; SF4% E45).

L'andamento del peso secco delle radici trattate con RS risulta essere simile a quanto evidenziato per SF. Nello specifico i trattamenti RS 1% T25, RS 1% T22 ed E45 favoriscono un incremento significativo del peso secco delle radici rispetto al resto dei trattamenti, pari a circa il 30% rispetto ad RS 1% e al CNT (Kruskal-Wallis: H chi²: 29,57; p same: 0,001794). Inoltre, il pretrattamento in SSF di RS 4% con i ceppi T22 e T25 determina un aumento significativo del peso secco delle radici rispetto a RS 4% tal quale, riducendone quindi la fitotossicità (tabella 14).

Tabella 14. Peso secco (g) della parte ipogea delle piante cresciute su suolo inoculato sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con RS all'1% o al 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non fertilizzato e non inoculato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Mann Whitney's post hoc test.

Treatment	Dry weight (g)	Grouping
RS 1% T25	0,69 ±0,05	A
RS 1% T22	0,69 ±0,01	A
E45	0,66 ±0,03	A
RS 1% E45	0,63 ±0,07	A B
T22	0,6 ±0,08	A B
RS 4% T22	0,56 ±0,01	A B
T25	0,53 ±0,03	A B
RS 4% T25	0,51 ±0,1	B
RS 1%	0,47 ±0,04	B C
CNT	0,45 ±0,03	B C
RS 4% E45	0,39 ±0,05	C
RS 4%	0,30 ±0,04	C

10.1.2.4. SPAD rilevato sulle piante a due mesi dal trapianto

I valori dello SPAD (Figura 37) delle piante trattate con SF all'1 % e al 4% inoculato o meno con *Trichoderma* tendono ad aumentare rispetto al CNT (Kruskal-Wallis, H chi²: 73,44; *p* same: 2,671E-11). Le piante trattate con SF 4 % in assenza di *Trichoderma* mostrano valori di SPAD minori rispetto a SF 4% E45 e SF 4% T25. Infine, il trattamento con il ceppo T25 provoca una riduzione significativa di tale parametro rispetto al CNT. Lo SPAD misurato sulle piante trattate con RS mostra un andamento simile alle piante fertilizzate con SF (Kruskal Wallis, H chi²: 73,05; *p* same: 3,171E-11). Infatti, i valori tendono ad aumentare in presenza del sottoprodotto (Figura 38).

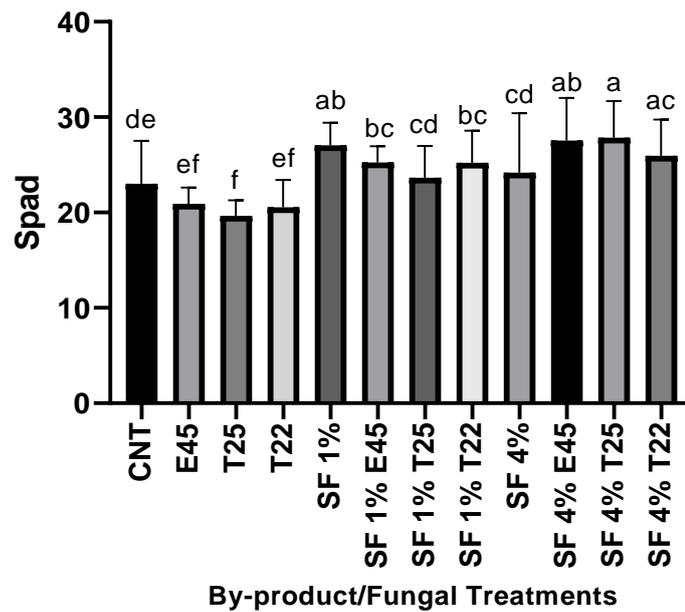


Figura 37. Spad rilevato su piante cresciute su suolo inoculato con sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o allevate in suolo arricchito con SF all'1% o al 4% precedentemente trattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non trattato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti tra loro secondo il Mann Whitney's post hoc test.

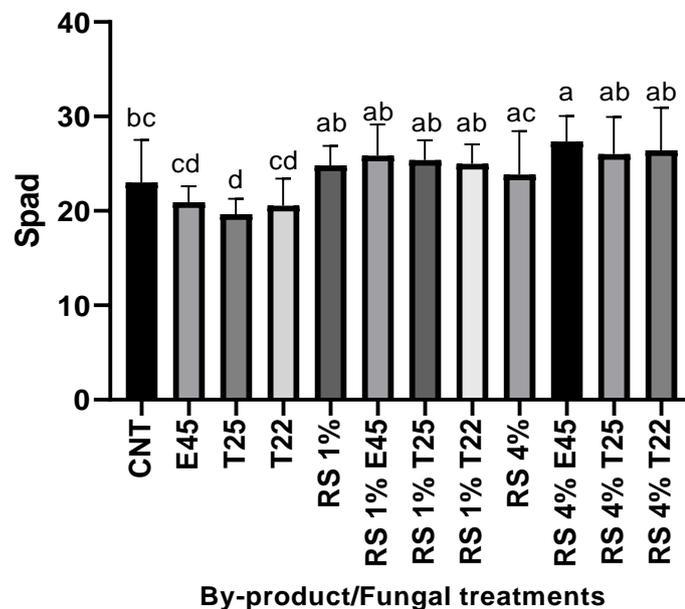


Figura 38. Spad rilevato su piante cresciute su suolo inoculato con le sospensioni conidiche dei ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con RS 1% o SF 4% precedentemente trattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non trattato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti tra loro secondo il Mann Whitney's post hoc test.

10.2. Analisi del suolo e dei vegetali

Il suolo rizosferico è stato analizzato alla fine dell'esperimento, per determinarne la quantità di *Trichoderma* presente e la composizione chimico-fisica. Inoltre, sono state effettuate le analisi della chimiche delle parti epigee ed ipogee delle piante di pomodoro. Le analisi del suolo e dei vegetali sono state effettuate dal laboratorio del Centro di Ricerca Interdipartimentale sulla Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) per l'Ambiente, l'Agro-Alimentare ed i Nuovi Materiali (*CERMANU*), sito presso il Dipartimento di Agraria.

10.2.1. Analisi della presenza del *Trichoderma* nel suolo

10.2.1.1. Materiali e metodi

Per la determinazione delle CFU nel suolo ad un mese dal trapianto e al termine dell'esperimento, è stato raccolto un campione di suolo rizosferico per ogni replica/trattamento, prelevando il terreno intorno alle radici delle piante e raccogliendolo in apposite buste di plastica. I campioni sono stati conservati in frigo a 4°C, fino all'analisi presso il laboratorio di Patologia vegetale della Dipartimento di Agraria (UNINA).

Una sospensione di suolo è stata preparata in acqua e sottoposta a diluizioni seriali secondo lo schema riportato di seguito:

- Diluizione iniziale 1:10 → 10 gr di suolo sono stati diluiti in una soluzione composta da 100 ml di acqua e Ringer e 0.162 gr di pirofosfato di sodio e posti in agitazione per 30 minuti a temperatura ambiente su un agitatore vortex (Fisherbrand™)
- Dalla diluizione iniziale sono state effettuate delle diluizioni seriali 1:10 fino a 10⁻⁴
- 100 µL delle diluizioni 10⁻⁴ e 10⁻⁵ sono prelevati e distribuiti omogeneamente con apposite anse microbiologiche ad L su piastre Petri (90 mm) contenenti PDA (Potato Dextrose Agar) con Igepal (Sigma-Aldrich) allo 0,1% v/v .

Tre piastre sono state preparate per ogni diluizione, incubate al buio a 25°C per 5 giorni, monitorando ogni 24 ore la crescita delle colonie fungine. Il numero totale delle colonie fungine sulle piastre di PDA è stata espressa in Unità Formanti Colonie (CFU/gr di suolo).

L'analisi statistica dei risultati è stata svolta come descritto nel paragrafo 5.1.1.

10.2.1.2. Risultati

Le CFU di *Trichoderma* rilevate ad un mese dal trapianto e al termine dell'esperimento mostrano che l'aggiunta al suolo dei sottoprodotti RS e SF favorisce un maggiore sviluppo rispetto al trattamento con le sospensioni conidiche dei ceppi.

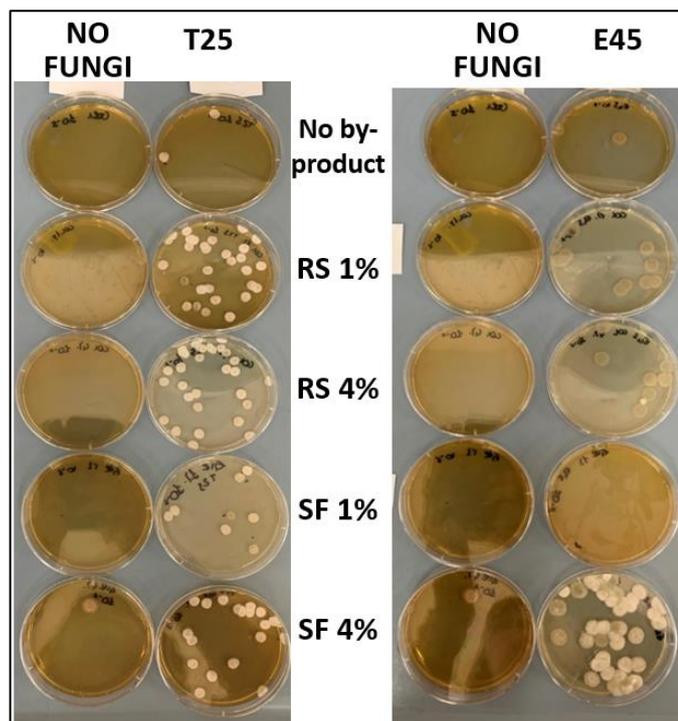


Figura 39. CFU del suolo dell'esperimento ad un mese dal trapianto. La foto mostra le Piastre Petri per la conta delle CFU del suolo inoculato con le sospensioni conidiche dei ceppi di *Trichoderma* E45 e T25 (No by-product) o arricchito con RS e SF, all'1% e al 4%, pretrattati o meno (No Fungi) con i due ceppi di *Trichoderma*. Il CNT (No Fungi, No by-product) è costituito da suolo non trattato.

In entrambe i casi le CFU aumentano all'aumentare della % di sottoprodotto pretrattato aggiunto. Ad un mese dal trapianto (Figura 39), le CFU raggiungono valori medi di 1×10^7 e 3×10^7 nel suolo contenente l'1% e il 4% dei sottoprodotti pretrattati (Kruskal Wallis, H chi²: 93,05; *p* same: 6,654E-11) (dati non mostrati). Nel suolo CNT e arricchito con i sottoprodotti non è stata riscontrata la presenza dei funghi.

Al termine dell'esperimento le CFU diminuiscono sostanzialmente rispetto al primo campionamento (Figura 40), raggiungendo valori massimi nei trattamenti con SF e RS al 4% inoculati con i ceppi E45 e T25 e RS 4% T22, con una media di circa $1,9 \times 10^5$ CFU/g di suolo (Kruskal Wallis, H chi²: 9,108; *p* same: 4,47E-18). Si riscontra la presenza del fungo anche nei suoli arricchiti con i soli sottoprodotti, probabilmente a causa di una contaminazione durante la coltivazione. Nel CNT invece le CFU sono pari a zero.

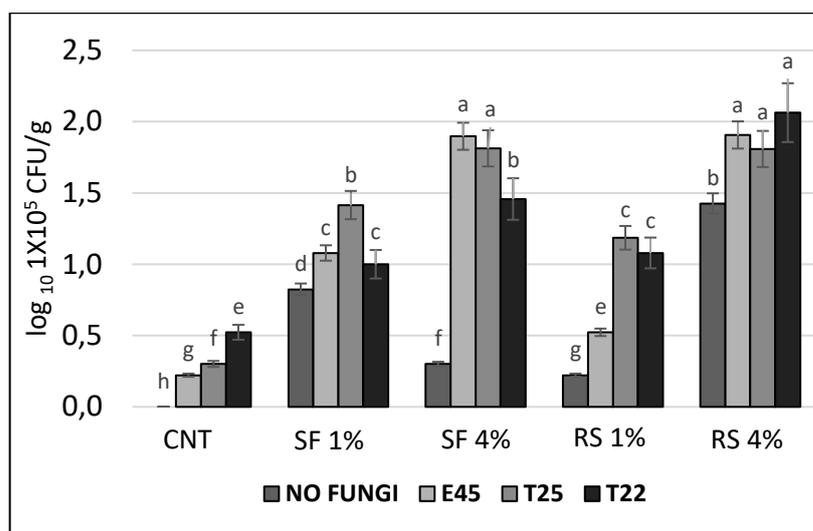


Figura 40. CFU di *Trichoderma* spp. alla fine dell'esperimento rilevate nel suolo rizosferico inoculato con le sospensioni conidiche di ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22), arricchito con RS e SF all'1% o al 4%, pretrattati o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non fertilizzato e non inoculato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Dunn's post hoc test.

10.2.2. Analisi chimico-fisica del suolo

10.2.2.1. Materiali e metodi

Un campione di terriccio è stato prelevato all'inizio dell'esperimento per valutare le principali caratteristiche chimico-fisiche: tessitura, pH, fosforo assimilabile (P_2O_5), azoto totale (N tot.), azoto ammoniacale (NH_4), pH, calcio carbonato (Ca-carbonato), capacità di scambio cationico (CEC). Le analisi sono state effettuate come indicato nel documento "Metodi di Analisi chimica del suolo D.M. 13/09/1999" emanato dal Ministero per le Politiche Agricole (1999). Alla fine dell'esperimento un campione di suolo per ogni trattamento è stato effettuato prelevando un aliquota di circa 10 g di suolo da ogni vaso per valutare il quantitativo di N tot. e fosforo totale e assimilabile.

10.2.2.2. Risultati

I risultati delle analisi chimico-fisiche del suolo all'inizio del saggio sono riportate in tabella 15. La tabella 16 mostra il contenuto di N totale nel suolo arricchito con SF, alla fine dell'esperimento, ovvero dopo circa due mesi dal trapianto. Risulta evidente che all'aumentare della % di sottoprodotto utilizzato, il contenuto di N totale nel suolo aumenta.

Tabella 15. Risultati delle analisi chimico fisiche del suolo all'inizio dell'esperimento. Tessitura (% sabbia grossa e fine, limo, argilla); Fosforo (P mg/kg); Azoto totale (N tot. g/kg); Azoto ammoniacale (NH₃/NH₄⁺ pH; Carbonato di calcio (Ca-carbonato %); Capacità di scambio cationico (CEC meq/100 g).

Tessitura				P mg/kg	N Tot. g/kg	NH ₃ /NH ₄ ⁺ g/kg	pH	Ca-carbonato %	CEC meq/100 g
Sabbia grossa %	Sabbia Fine %	Limo %	Argilla %						
62,3	30,6	6,6	0,5	94,4	7,83	1,24	6,92	0,41	102

Tabella 16. Azoto totale (N tot. g/kg) nel suolo inoculato con *Trichoderma* (E45, T25, T22, T25) o arricchito con SF precedentemente trattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non trattato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Tukey post hoc test.

Treatment	N tot (g/kg)	Grouping
SF 4%	11,44 ±0,03	A
SF 4% E45	11,42 ±0,03	A
SF 4% T25	11,36 ±0,09	A
SF 4% T22	11,35 ±0,05	A
SF 1% T25	8,48 ±0,08	B
SF 1% T22	8,42 ±0,08	B
SF 1%	8,41 ±0,04	B
SF 1% E45	8,40 ±0,01	B
T22	7,84 ±0,05	C
E45	7,84 ±0,03	C
CTN	7,84 ±0,06	C
T25	7,81 ±0,05	C

L'azoto totale è più elevato quando il suolo è arricchito con SF 1% pretrattato o meno con *Trichoderma* rispetto al CNT, con un quantitativo medio di 8,4 g/kg (ANOVA, p same: 9,815E-30; F: 1121). Il suolo del trattamento SF 4% mostra un contenuto di N totale pari a 11,4 g/kg risultando maggiore di circa il 45% rispetto al CNT. Il contenuto di N totale del suolo del trattamento RS mostra un andamento simile a quello appena descritto per SF.

Nella tabella 17, si nota che il contenuto di N nei suoli arricchiti con RS al 4%, con o senza *Trichoderma*, è significativamente più elevato rispetto al resto dei trattamenti, con un contenuto medio di 10,4 g/kg (ANOVA, *p* same: 2,135E-28 e *F*: 854,6). A seguire, i trattamenti RS 1% con o senza *Trichoderma* presentano un contenuto medio di N totale pari in media a 8,5 g/kg. Il contenuto totale di N nei suoli arricchiti con SF e RS mostra un andamento e un quantitativo medio simile tra i due sottoprodotti.

Tabella 17. Azoto totale (N tot. g/kg) nel suolo inoculato con le sospensioni conidiche dei ceppi di Trichoderma (E45, T25, T22) o arricchito con SF precedentemente trattato o meno con i ceppi di Trichoderma. Il CNT è costituito da suolo non fertilizzato e non inoculato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Tukey post hoc test.

Factor	N tot (g/kg)	Grouping
RS 4%	10,56 ±0,03	A
RS 4% T22	10,40 ±0,03	A
RS 4% E45	10,37 ±0,09	A
RS 4% T25	10,32 ±0,05	A
RS 1% T22	8,59 ±0,03	B
RS 1%	8,58 ±0,01	B
RS 1% T25	8,45 ±0,05	B
RS 1% E45	8,43 ±0,05	B
T22	7,84 ±0,05	C
E45	7,84 ±0,03	C
CTN	7,84 ±0,05	C
T25	7,81 ±0,05	C

Per quanto riguarda il contenuto di fosforo assimilabile (mg/kg) nel suolo, i risultati mostrano che l'andamento è simile per i due sottoprodotti (Figura 41). Come descritto precedentemente per l'N, il contenuto di P nel suolo è correlato al quantitativo di sottoprodotto aggiunto. In particolare, l'aggiunta al suolo di RS al 4 % pretrattato o meno con *Trichoderma* contribuisce ad aumentare il P nel suolo, risultando significativamente maggiore rispetto al resto dei trattamenti e superiore a 700 mg/kg. Nel suolo arricchito con RS al 1% pretrattato o meno con *Trichoderma* il contenuto di P

assimilabile è superiore a 250 mg/kg contro 95 mg/kg del CNT (Kruskal Wallis, H chi²: 34,38; p same: 0,0003). Il P assimilabile nel suolo dei trattamenti SF 1% inoculato o meno con *Trichoderma* è pari circa 450 mg/kg e aumenta a valori superiori a 1200 mg/kg nei trattamenti con SF al 4% .

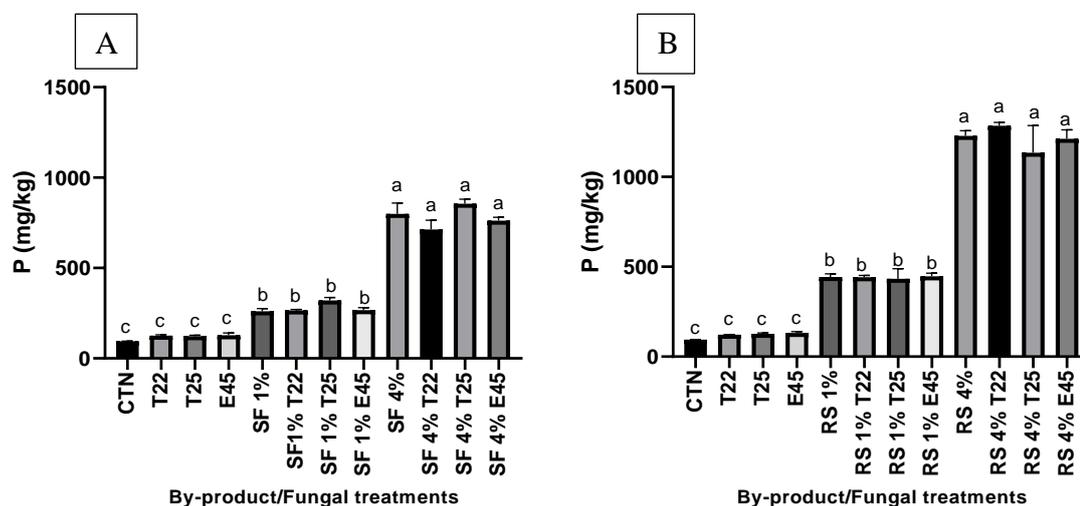


Figura 41. Fosforo assimilabile (P mg/kg) nel suolo inoculato con sospensioni conidiche dei ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con RS (A) o SF (B) precedentemente trattati o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non trattato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Dunn's post hoc test.

10.2.3. Analisi del materiale vegetale

10.2.3.1. Materiali e metodi

Al termine dell'esperimento la parte epigea delle piante è stata raccolta ed un subcampione è stato essiccato in stufa a 60°C per determinare il contenuto di fosforo totale e l'azoto totale, secondo quanto indicato dal Ministero delle Politiche agricole, alimentari e forestali (2012) in "Metodi nazionali di riferimento per le analisi dei succhi di frutta ed ortaggi e prodotti analoghi". L'analisi statistica dei risultati è stata svolta come descritto nel paragrafo 5.1.1.

10.2.3.2 Risultati

L'aggiunta al suolo di SF 4% pretrattato o meno con *Trichoderma* spp. comporta un aumento significativo del contenuto di N tot. nelle piante rispetto al resto dei trattamenti, con un incremento rispetto al CNT pari a circa il 140% (Kruskal-Wallis, H chi²: 33,52; p same: 0,0004272). L'inoculo di SF 4% con E45 risulta in un contenuto di N minore nei tessuti delle

piante rispetto al trattamento con SF 4% (Figura 43). Le piante del trattamento SF 1 % pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma* mostrano un contenuto di N di circa il 50% più elevato rispetto al CNT.

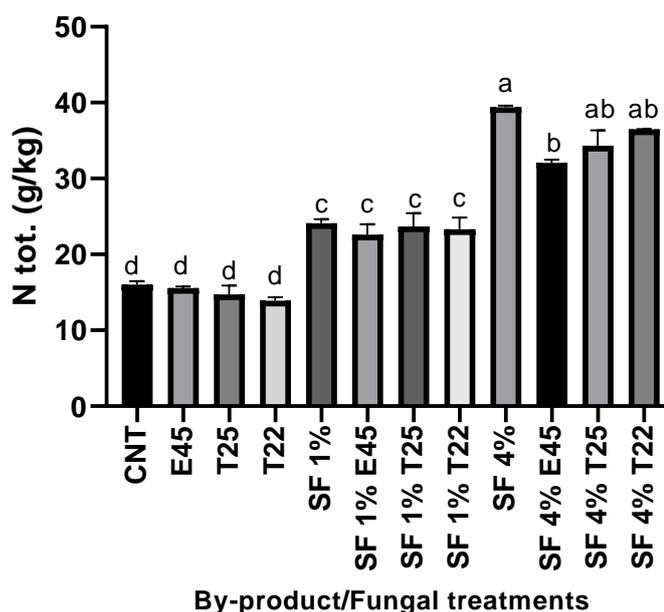


Figura 13. Azoto totale (N tot. g/kg) nella parte epigea delle piante cresciute su suolo inoculato con *Trichoderma* (E45, T25, T22) o arricchito con SF precedentemente trattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non fertilizzato e non inoculato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Dunn's post hoc test.

Le piante dei trattamenti SF 1% inoculato o meno con i ceppi di *Trichoderma* presentano un contenuto di P maggiore rispetto al CNT (ad esclusione di SF 1% T25 che risulta uguale) e paragonabile alle piante inoculate con le sospensioni conidiche di *Trichoderma* (ANOVA, p same: $1E-05$; F 32553). SF 4% inoculato o meno con *Trichoderma* aumenta il P nella parte epigea delle piante rispetto al CNT e al resto dei trattamenti, attestandosi su un contenuto medio di circa 17 g/kg (Figura 44). L'aggiunta al suolo di RS 4% pretrattato o meno con i ceppi di *Trichoderma* determina un notevole aumento del contenuto di N nella parte epigea della pianta rispetto al CNT, con una media circa 40 g/kg (Figura 44) (Kruskal-Wallis, H χ^2 : 34,39; p same: 0,0003108). Ad esclusione di RS 1% T25, le cui piante hanno un contenuto di N uguale al CNT, il trattamento RS 1% inoculato o meno con *Trichoderma*, risulta in un contenuto di N nei tessuti delle piante di circa il 27 % superiore rispetto al CNT.

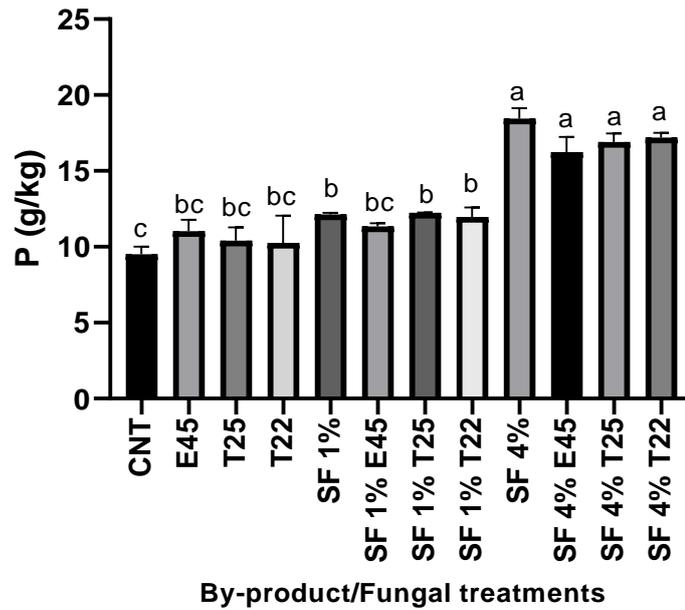


Figura 44. Fosforo assimilabile (P g/kg) nella parte epigea delle piante inoculate con sospensioni conidiche dei ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o cresciute su suolo arricchito con SF precedentemente trattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo trattato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Tukey's post hoc test.

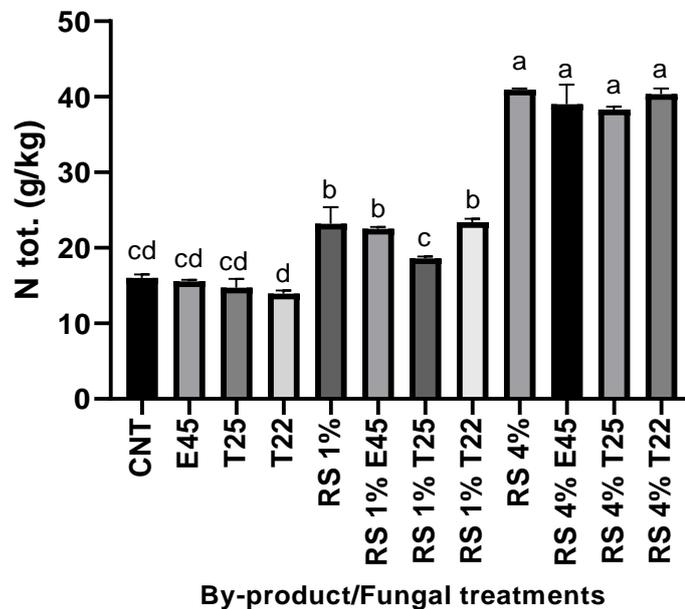


Figura 44. Azoto totale (N tot. g/kg) nella parte epigea delle piante inoculate con sospensioni conidiche dei ceppi di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o cresciute su suolo arricchito con RS precedentemente trattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non trattato. diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Dunn's post hoc test.

L'arricchimento del suolo con RS al 4% pretrattato o meno con *Trichoderma* incrementa il contenuto di fosforo nelle piante in maniera significativa rispetto al CNT (H χ^2 : 34,32; p same: 0,0003) (Figura 45). Le piante del trattamento SF 1% registrano un contenuto di N paragonabile al CNT e all'inoculo con le sospensioni conidiche dei ceppi.

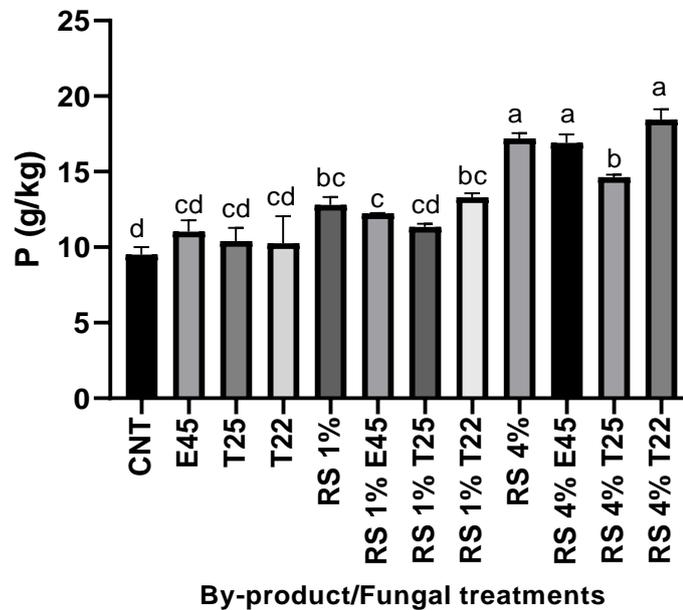


Figura 45. Fosforo assimilabile (P g/kg) nella parte epigea delle piante inoculate con le sospensioni conidiche di *Trichoderma* (E45, T25, T22) o cresciute su suolo arricchito con RS precedentemente trattato o meno con i ceppi di *Trichoderma*. Il CNT è costituito da suolo non trattato. Le lettere diverse indicano medie significativamente differenti secondo il Dunn's post hoc test.

10.3. Discussione

L'aggiunta al suolo dei sottoprodotti all'1% e l'inoculo con le sospensioni conidiche di *Trichoderma* non favoriscono in maniera significativa la promozione della crescita delle piante in termini di altezza e peso secco della parte epigea. L'utilizzo dei sottoprodotti all'1% pretrattati in SSF con *Trichoderma* ha invece un effetto positivo sulla crescita delle piante traducendosi, nella maggior parte delle combinazioni, in un aumento significativo dell'altezza e del peso secco della parte epigea, non solo rispetto al CNT, ma anche rispetto al sottoprodotto tal quale e all'inoculo con le sole sospensioni conidiche dei ceppi. L'impiego dei sottoprodotti all'1% inoculati con *Trichoderma*, favorisce anche un incremento della lunghezza e del peso delle radici delle piante rispetto ai trattamenti con i sottoprodotti non inoculati, riportando tali parametri fino a valori simili o maggiori del CNT.

I risultati ottenuti sono coerenti con quanto descritto da diversi autori che hanno riscontrato un aumento della crescita delle piante attraverso l'uso combinato dei sottoprodotti e microrganismi. In particolare, gli autori Galletti *et al.* (2015) hanno constatato che l'incorporazione al suolo di farine di estrazione di *Brassica nigrae* in combinazione con un isolato di *T. harzianum* favorisce la crescita di piante di melone. Gli autori attribuiscono tali effetti al potenziamento dei cicli biogeochimici dei nutrienti contenuti negli scarti da parte di *T. harzianum*, che contribuisce in sostanza ad una maggiore biodisponibilità dei nutrienti, rendendoli più facilmente assimilabili dalle piante. I risultati ottenuti nel presente studio relativamente alla composizione chimica del suolo e dei vegetali mostrano che *Trichoderma*, non contribuisce ad un incremento della disponibilità e assorbimento da parte delle piante dell'N e del P contenuto nei sottoprodotti. L'effetto positivo riscontrato dall'uso combinato del sottoprodotto con *Trichoderma* potrebbe essere attribuibile a diversi fattori concomitanti. I sottoprodotti, utilizzati come substrato di allevamento dei funghi in fermentazione in stato solido, fungono da "supporto fisico o coadiuvante naturale" per i microrganismi, contribuendo ad un maggiore sviluppo del fungo in termini di CFU, mantenendone la vitalità e favorendone la persistenza nel suolo nel tempo rispetto all'inoculo costituito solo da sospensioni conidiche. Inoltre, l'uso combinato dei sottoprodotti e dei microrganismi potrebbe aver generato l'alterazione della composizione e dell'attività del microbioma del suolo e questo potrebbe essere un altro meccanismo d'azione che porta ad un miglioramento della crescita delle piante (Tejada *et al.*, 2011; Colla *et al.*, 2017). Le molecole organiche presenti nei sottoprodotti vengono utilizzate come fonte di carbonio, azoto o energia dai microrganismi, a loro volta i microrganismi contribuiscono alla decomposizione della materia organica generando composti che possono influire direttamente sulla crescita delle piante. L'idrolisi dei sottoprodotti attraverso gli enzimi prodotti dai funghi può favorire il rilascio di polipeptidi, peptidi e amminoacidi e altri componenti non proteici bioattivi, che possono agire da biostimolanti. Questi fattori potrebbero contribuire a potenziare gli effetti benefici diretti e indiretti del microrganismo e del sottoprodotto sulle colture e sul microbioma del suolo. A tal proposito, lo studio condotto da Ugolini (2017) ha riportato l'effetto benefico di un idrolizzato proteico ottenuto a seguito di idrolisi enzimatica di SF (con endopeptidasi da *Bacillus licheniformis* e esopeptidasi e endoproteasi da *Aspergillus oryzae*) sulla crescita delle radici di piante di mais. In un altro studio gli stessi autori (Ugolini *et al.*, 2014) hanno confermato gli effetti benefici dell'idrolizzato

sull'allungamento delle radici di piante di crescione (*Lepidium sativum* L.) e lattuga (*Lactuca sativa* L.) suggerendo un'attività auxino-simile e confermando un potenziale uso del prodotto come biostimolante per il settore agricolo. D'altra parte, sono molteplici gli esempi in cui la combinazione dei sottoprodotti e microrganismi benefici è stata utilizzata con successo per la produzione di bioformulati, biostimolanti, biofertilizzanti e metaboliti secondari bioattivi (Xu *et al.* 2018; De Corato *et al.*, 2018; Vassileva *et al.*, 2010; Vassilev *et al.*, 2007; Rebah *et al.*, 2007; Singh *et al.* 2011; Fadel *et al.*, 2015; Hamrouni *et al.*, 2019; De la Cruz-Quiroz *et al.* 2017). In particolare, gli autori Nahar *et al.* (2012) hanno dimostrato l'efficacia di un biofertilizzante costituito da spore di *T. harzianum* insieme a rifiuti vegetali (crusca di mais, sterco di vacca, melassa, segatura e rifiuti di pollame) nel promuovere la crescita di diverse colture. Anche gli autori Adan *et al.* (2015) hanno testato l'efficacia di una formulazione contenente *Trichoderma* e diversi sottoprodotti (segatura, crusca di cicerchie, crusca di lenticchie, crusca di grano, crusca di riso, crusca di grano nero e pannello di olio di senape) dimostrandone l'efficacia nel promuovere la crescita di piante di melanzana.

I fenomeni di fitotossicità riscontrati a seguito dell'incorporazione al suolo di SF e RS al 4% possono essere stati causati dalla presenza di olio residuo nei sottoprodotti nonché da un'eccessiva concentrazione di composti con effetto biocida, quali glucosinolati e polifenoli. La fitotossicità può essere stata determinata da un'azione diretta dei composti sui tessuti della pianta e/o indiretta, determinando un ambiente edafico sfavorevole, con un impatto negativo sul microbioma del suolo e di conseguenza sulla nutrizione e crescita della pianta (Lee *et al.*, 2015; Hodge *et al.*, 2019; Poveda *et al.*, 2020). Il pretrattamento dei sottoprodotti in SSF con *Trichoderma* riduce gli effetti fitotossici quando questi vengono aggiunti al suolo al 4%, aumentando notevolmente l'altezza e il peso della parte epigea delle piante rispetto ai trattamenti con sottoprodotti non inoculati, riportando i parametri a valori superiori o paragonabili al CNT. Diversi autori hanno riportato la capacità di numerosi funghi, tra cui *Trichoderma* spp., di detossificare i sottoprodotti principalmente attraverso all'azione di enzimi in grado di degradare le sostanze tossiche in essi contenuti come i fenoli, glucosinolati e altri composti (Rozan *et al.*, 1996; Vig et Walia, 2001; Sampedro *et al.*, 2009; Aranda *et al.*, 2015; Trocozo *et al.*, 2019; Leontopolus *et al.*, 2015). Come discusso nel paragrafo 6.10, l'efficacia e l'economicità della SSF fanno sì che questo tipo di fermentazione sia ampiamente utilizzato per il biorisanamento di rifiuti pericolosi e di rifiuti agroindustriali, nonché per la produzione su larga scala di conidi, biostimolanti e

bioformulati, metaboliti secondari e enzimi (Sarhy-Bagnon *et al.*, 2000; Gutiérrez-Sánchez *et al.*, 2013). Non si può escludere, inoltre, che la riduzione degli effetti fitotossici sia dovuta alla capacità di *Trichoderma* di interagire attivamente con la pianta, promuovendone la crescita e migliorando la resistenza a stress biotici e abiotici (Harman *et al.*, 2004; Lorito *et al.*, 2010). Tali effetti sono correlati alla capacità di questi funghi benefici sintetizzare composti ormono-simili, come l'acido 3-indolacetico (IAA), che promuovono la crescita del fusto e delle radici, aumentando la superficie di suolo esplorata da queste ultime e migliorando di conseguenza l'assorbimento di acqua e nutrienti (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Pelagio-Flores *et al.*, 2017; Fiorentino *et al.*, 2018; Colla *et al.*, 2015). *Trichoderma* può inoltre contribuire a solubilizzare diversi nutrienti nel suolo, come ferro e rame e produrre siderofori, rendono questi elementi facilmente disponibili per la nutrizione delle piante (Altomare *et al.*, 1999).

Relativamente alle analisi del suolo e dei vegetali, coerentemente con i risultati ottenuti in questo esperimento, gli autori Mazzoncini *et al.* (2015) e Ronga *et al.* (2019) hanno dimostrato che l'aggiunta al suolo di SF e farine di estrazione da *Brassicaceae* contribuiscono ad aumentare notevolmente il contenuto di N e P nei tessuti epigei di piante di lattuga, spinacio e cardo. Tali studi dimostrano inoltre che i sottoprodotti utilizzati costituiscono una valida alternativa ai fertilizzanti minerali per garantire una corretta ed efficiente nutrizione delle piante, riducendo notevolmente l'impatto ambientale in termini di perdita dei nutrienti e rilascio di gas ad effetto serra.

11. Valutazione dell'effetto del sottoprodotto OP50 colonizzato da *Trichoderma* T22 sulla promozione della crescita di pomodoro in campo

11.1 Materiali e metodi

Il seguente saggio è stato realizzato in pieno campo, su pomodoro al fine verificare l'effetto sulla crescita della fertilizzazione con il sottoprodotto OP50 colonizzato dal ceppo di *Trichoderma* T22 (OP50 + T22).

Di seguito si riportano i trattamenti effettuati:

- T22
- OP50
- OP50 + T22
- Controllo H2O

Il saggio è stato condotto nel campo sperimentale (tunnel di 8 m x 20 m coperto da film plastici termici in PVC a luce diffusa) delle serre di Patologia Vegetale del Dipartimento di Agraria di Portici (Università degli Studi di Napoli Federico II, UNINA). In particolare semi di pomodoro (cv. Principe Borghese) sono stati posti a germinare in serra, in terreno, a 20 °C e con il 100% di UR. Dopo 15 giorni dall'emergenza, le piantine di pomodoro, sono state trapiantate al suolo.

La sansa utilizzata per i trattamenti OP50 e OP50 + T22 è stata ottenuta mediante diluizione in acqua (50% sansa + 50% H2O). Per il trattamento OP50 + T22 la sansa è stata utilizzata come substrato di crescita in fermentazione liquida per il ceppo T22 per due settimane al buio a 25°C, come descritto nel paragrafo 6.2.

Un volume pari a 10 ml di OP50 e OP50 +T22 è stato applicato al suolo una sola volta, al momento della messa a dimora. Il controllo negativo è stato ottenuto trapiantando le piante sul suolo non trattato. L'effetto di promozione della crescita è stato, inoltre, comparato con quello relativo al singolo ceppo utilizzato come sospensione conidica per innaffiare il suolo. Tale trattamento è stato effettuato applicando al terreno, in prossimità del colletto, una sospensione conidica concentrata a 1×10^6 sp/ml. Il trattamento è stato ripetuto ogni 15 giorni, per due mesi, utilizzando volumi crescenti di sospensioni conidiche (10 ml per il primo trattamento, 30 ml per il secondo ed il terzo, e 100 ml per l'ultimo trattamento), in relazione allo stato fisiologico della pianta. Il controllo negativo è sempre stato innaffiato con lo stesso volume di acqua.

Ogni trattamento è stato effettuato in triplicato e per ognuno sono state usate 10 piante, per un totale di 30 piante per trattamento. Le piante sono state disposte secondo

lo schema a blocchi randomizzati. Al termine dell'esperimento, a due mesi dal trapianto, sono stati rilevati i seguenti parametri: concentrazione di clorofilla (SPAD), altezza del fusto, distanza internodale, numero di palchi fiorali e fruttiferi. L'analisi statistica dei risultati è stata svolta come descritto nel paragrafo 5.1.1.

11.2. Risultati

L'altezza media dei fusti delle piante inoculate con le sospensioni conidiche di T22 e fertilizzate con OP50 è maggiore rispetto al CNT (ANOVA, p same: 1E-03; F 123) contribuendo rispettivamente ad un incremento di circa il 25% e il 17% (dati non mostrati). Nel caso dei palchi fruttiferi e dei palchi fiorali così come per i valori di SPAD nessun trattamento è risultato differente rispetto al CNT.

11.3. Discussione

I risultati ottenuti confermano che *T. afroharzianum* T22 promuove la crescita di piante di pomodoro, coerentemente a quanto riportato nello studio di Carillo *et al.*, 2020, nel quale è stato dimostrato che il ceppo aumenta la resa del pomodoro (cv. Pixel) del 40% rispetto al controllo. Tale effetto può essere attribuibile ai numerosi e concomitanti effetti benefici elicitati dal fungo, tra cui la protezione da agenti fitopatogeni la promozione della crescita delle radici e una maggiore efficienza di assorbimento e il trasporto dei nutrienti (Harman *et al.*, 2004). Inoltre, il fungo è in grado di sintetizzare composti ormono-simili, come l'acido 3-indol-acetico (IAA) (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009) che stimolano la formazione laterale delle radici, incrementando la superficie radicale e facilitando l'approvvigionamento da parte della pianta di acqua e nutrienti (Fiorentino *et al.*, 2018; Colla *et al.*, 2015; Roupheal *et al.*, 2020; Macías-Rodríguez *et al.*, 2018). Il fungo agisce inoltre direttamente sulla solubilizzazione di rocce fosfatiche, ferro e rame presenti nel suolo rizosferico e produce siderofori, rendendo questi elementi facilmente biodisponibili per le piante (Harman *et al.*, 2004). I risultati mostrano che l'aggiunta al suolo di OP50 ha incrementato l'altezza del fusto del 17% rispetto al CNT, confermando quanto riscontrato dagli autori Brunetti *et al.* (2005) in cui si evidenzia un incremento della crescita di piante di grano duro a seguito dell'incorporazione al suolo di OP. Gli autori attribuiscono tali effetti all'aumento di sostanza organica nel suolo che ha favorito un miglioramento delle caratteristiche fisiche, contribuendo ad una maggiore efficienza di ritenzione idrica con una riduzione della perdita di acqua per evaporazione.

12. Impianto pilota per trasformazione della sansa di oliva nell'Azienda Santa Rita s.r.l.

In coerenza con gli obiettivi del Dottorato di Ricerca con caratterizzazione industriale in cui Santa Rita è partner aziendale, si è provveduto ad implementare il sistema produttivo aziendale a valle dell'estrazione dell'olio di oliva, valorizzando la sansa di oliva per l'ottenimento di prodotti dall'elevato valore aggiunto. Lo scopo è stato quello di sviluppare un processo fermentazione in fase liquida utilizzando i sottoprodotti come substrato per l'ottenimento di formulati a base di *Trichoderma* utilizzabili in agricoltura. L'andamento e le condizioni di fermentazione che possono influenzare la crescita fungina e la produzione di metaboliti sono state testate dapprima a scala laboratoriale, presso i laboratori della sede dell'Azienda a Napoli. Individuati i parametri critici di processo si è provveduto a trasferire le procedure acquisite in fase laboratorio su scala aziendale, implementando il sistema produttivo già presente in azienda.



Figura 46. Impianto pilota presso l'azienda Santa Rita.

12.1 Materiali e metodi

Le prove sperimentali in laboratorio sono state condotte in un fermentatore con un volume utile di 50 l e completamente strumentato al fine di monitorare principali variabili di processo, quali:

- temperatura
- pH
- aerazione
- agitazione
- potenziale redox

Il substrato utilizzato è stato ottenuto diluendo in mezzo salino minimo (MM) contenente il sottoprodotto OP al 4% (p/v) come fonte di carbonio ed energia. Precedenti saggi hanno permesso di verificare che, rispetto all'inoculo diretto del sottoprodotto con le spore del fungo, l'utilizzo di uno Starter, proveniente dalla crescita del microrganismo in un mezzo di coltura ricco in termini di nutrienti (PDB, Potato Dextrose Broth), migliora notevolmente lo

sviluppo successivo del fungo sul sottoprodotto, favorendo la produzione finale di conidi e biomassa. Quindi per la preparazione dello Starter per l'inoculo vegetativo, le spore del ceppo di *Trichoderma* T22, conservate in una soluzione di glicerolo al 20% e mantenute alla temperatura di -80° C, sono state prelevate in opportune condizioni di sterilità e piastrate su terreno di coltura PDA (Potato Dextrose Agar). Le colture sono state incubate a 25° C per circa 7 giorni e lasciate sporulare. Le spore sono state raccolte utilizzando, per ciascuna piastra, 10 ml di H₂O distillata sterile e, sono state utilizzate direttamente per l'inoculo in coltura liquida alla concentrazione finale di 1 X 10⁶ conidi per ml di PDB. Lo starter, pari al 10% del volume di lavoro del fermentatore (5 l), è stata lasciato in agitazione a 150 r.p.m per 48 h a 25° C. Al termine della fermentazione, lo Starter è stato trasferito asetticamente nel fermentatore contenente il substrato arricchito con OP.

Al fine di ottimizzare i parametri di processo, sono state variate di volta in volta le condizioni operative, monitorando gli effetti sulla produzione di spore e biomassa del ceppo. In particolare tre fermentazioni sono state condotte fissando la temperatura a 25°C e variando l'agitazione e l'aerazione. La prima fermentazione (I) è stata condotta per 7 gg, fissando la temperatura a 25°C, l'aerazione a 0,7 vvm e, l'agitazione a 150 r.p.m. Al fine di migliorare la crescita fungina la successiva fermentazione (II) è stata condotta abbassando i valori relativi all'aerazione ed agitazione rispettivamente da 0,7 a 0,5 vvm e da 200 r.p.m a 100 r.p.m. I dati ottenuti, sono stati confermati da una terza fermentata (III) realizzata nelle stesse condizioni operative.

Per ogni fermentata, a partire dall'inoculo, sono stati prelevati due campioni di brodo fermentato quotidianamente, per otto giorni. I campioni sono stati sottoposti alla conta diretta delle spore fino al settimo giorno e sono state determinate le CFU/ml fino all'ottavo giorno di fermentazione. La conta diretta delle spore è stata effettuata con l'ausilio di una camera conta globuli. Per la determinazione delle CFU, 1 ml di campione è stato sottoposto a diluizioni seriali decimali, come descritto nel paragrafo 3.1.2.

12.2 Risultati

I dati ottenuti riportati nella Figura 47 evidenziano nella prima fermentazione una sporulazione crescente nel tempo fino al raggiungimento del valore massimo di 1,3 x 10⁶ a fine fermentazione. Il numero di spore/ml ottenuto alla fine della seconda e terza fermentazione risulta rispettivamente di 2,12 x 10⁶ e di 7,0 x 10⁶ (dati non mostrati).

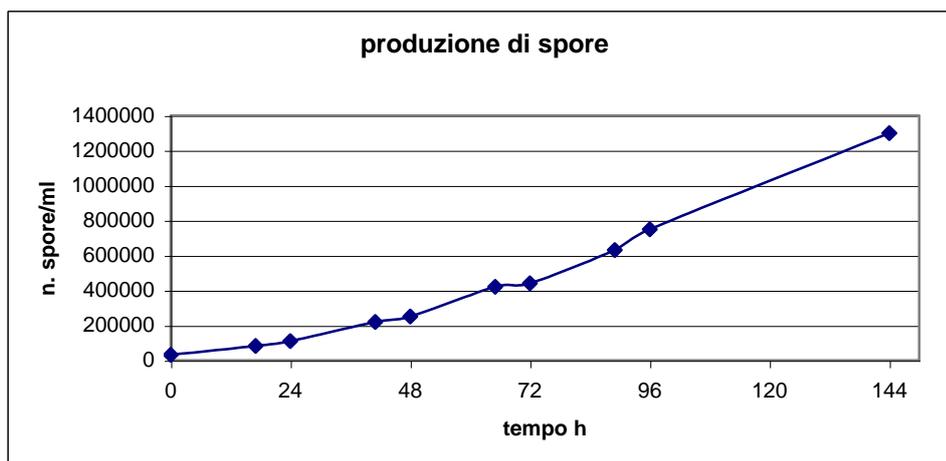


Figura 47. Numero di spore/ml di *T. afroharzianum* nei campioni di brodo fermentato raccolti durante la I fermentazione.

Anche nel caso delle CFU/ml si registra un aumento nel tempo, con un valore massimo a 8 giorni dall'inoculo. Le CFU/ml determinate alla fine della prima fermentazione risultano essere pari a $0,5 \times 10^6$ mentre alla fine della seconda e terza fermentazione sono di $2,0 \times 10^7$ (Figura 48).

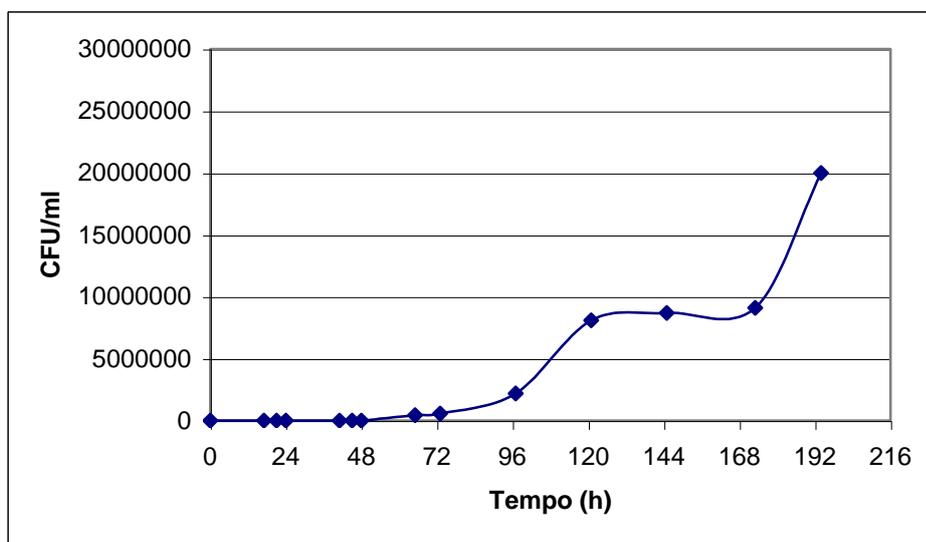


Figura 48. CFU/ml di *T. afroharzianum* nei campioni di brodo fermentato raccolti durante la II fermentazione.

12.3 Implementazione dell'impianto di fermentazione a scala aziendale

L'attività di ricerca presso la sede aziendale di Vibo Valentia è stata condotta



Figura 49. Batch da 50 l per la preparazione dello Starter microbico.

trasferendo le procedure e le conoscenze acquisite in fase laboratorio al fine di implementare l'impianto di fermentazione in fase liquida a scala aziendale presente nei locali adibiti alla trasformazione dei prodotti agroalimentari. Il sistema produttivo già presente in azienda è stato progettato per realizzare fermentazioni in sistema chiuso, per consentire il monitoraggio e la regolazione delle principali variabili di processo.

Per garantire un efficiente scale-up di lavorazione il sistema consiste di due bioreattori in batch in scala 1:10. Il primo batch (Figure 49 e 50), per la preparazione dell'inoculo starter, ha un volume utile di 50 l e il secondo (Figura 51) permette la fermentazione di 500 l di substrato. Entrambi i batch, in acciaio inox, sono completamente automatizzati per il mantenimento della temperatura (da 25 a 37 °C) mediante corrente di vapore o resistenze e flusso di acqua fredda in un'apposita camicia esterna. L'agitazione e omogeneizzazione del substrato avviene mediante un sistema di pale agitanti e frangiflutti. L'aerazione per entrambi i batch viene garantita da un sistema di aerea compressa, opportunamente filtrata, insufflata dal fondo dei reattori. Il passaggio dell'inoculo dal primo al secondo batch avviene mediante pompa peristaltica dotata di apposite tubazioni in pvc sterilizzabile. Durante la fermentazione è possibile monitorare e correggere i principali parametri di processo associati alla crescita microbica, tramite apposite sonde (pH, temperatura, potenziale redox, antifoam), al fine di ottimizzare lo sviluppo della biomassa e la produzione di eventuali metaboliti bioattivi. Il campionamento del brodo fermentato nel batch da 500 l per eventuali controlli della crescita microbica (CFU e produzione di metaboliti) può essere effettuato mediante delle apposite uscite alloggiato su fondo del bioreattore. In aggiunta, il sistema produttivo prevede a valle una centrifuga per separare i prodotti di interesse in uscita (biomassa dal brodo fermentato).

Le problematiche riscontrate dell'impianto già presente in azienda, riguardano principalmente il batch destinato alla preparazione dello starter microbico, ed in particolare: l'assenza di un sistema di sterilizzazione del substrato in entrata; la mancanza di guarnizioni per permettere una chiusura ermetica; la presenza di una finestrella per l'inoculo dei microrganismi, non adeguata a garantire il mantenimento delle condizioni di sterilità; l'assenza un uscita per il campionamento del substrato; la ridotta velocità di rotazione del sistema di pale agitanti e frangiflutti (circa 90 r.p.m).



Figura 50. Particolare del batch da 50 l.

Sono state dunque previste alcune modifiche al batch preesistente per la realizzazione dello starter, al fine di renderlo utilizzabile per processo di fermentazione. Le modifiche da apportare sono:

- modificare il tubo per permettere l'insufflazione di aria e vapore all'interno del substrato per garantirne la sterilizzazione (120 °C per 30 min.)
- aggiungere un uscita per il campionamento del substrato
- aumentare fino a 150 r.p.m la velocità degli agitatori
- sostituire la finestrella preesistente per l'inoculo dei microrganismi con un ingresso con siringa di trasferimento in grado di mantenere le condizioni di sterilità
- aggiungere guarnizioni per permettere una chiusura ermetica

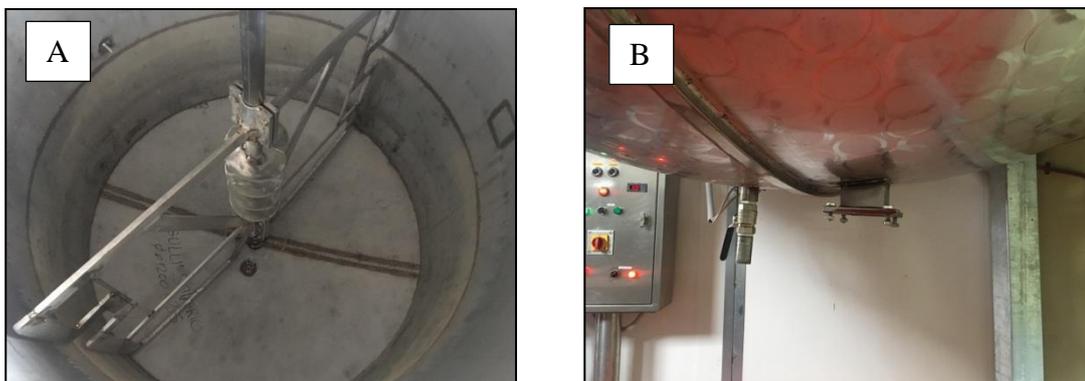


Figura 51. Agitatore (A) interno al fermentatore di 500 l, e il rubinetto inferiore del batch per l'uscita del prodotto liquido alla fine della fermentazione (B).

Inoltre, al fine di garantire una maggiore efficienza dell'intero processo di fermentazione è stata prevista la realizzazione di un batch verticale *ex novo* per la preparazione dello starter microbico con fondo conico concavo avente le seguenti caratteristiche:

- volume utile 50 l
- possibilità di sterilizzazione del substrato a 120°C per 30 minuti
- uscita per campionamento dal fondo
- ingressi superiori:
 - 1) inoculo (con siringa di trasferimento)
 - 2) aria/azoto
 - 3) sonda (pH, temperatura, ecc)
- agitatore a rastrelliera con velocità tra i 120 e 150 r.p.m. e frangiflutti

Il processo prevede a monte la preparazione di una coltura pre-starter di *Trichoderma* in laboratorio, che servirà per l'inoculo del micelio del microorganismo già germinato nel batch da 50 l, contenente un substrato convenzionale o a base di sansa, per l'ottenimento di un volume maggiore di Starter di *Trichoderma*. Tale Starter verrà utilizzato per il successivo inoculo del batch da 500 l contenete la sansa dove avverrà la fermentazione finale per l'ottenimento di un prodotto liquido pronto all'uso in campo per promuovere la crescita delle colture (Figura 52).

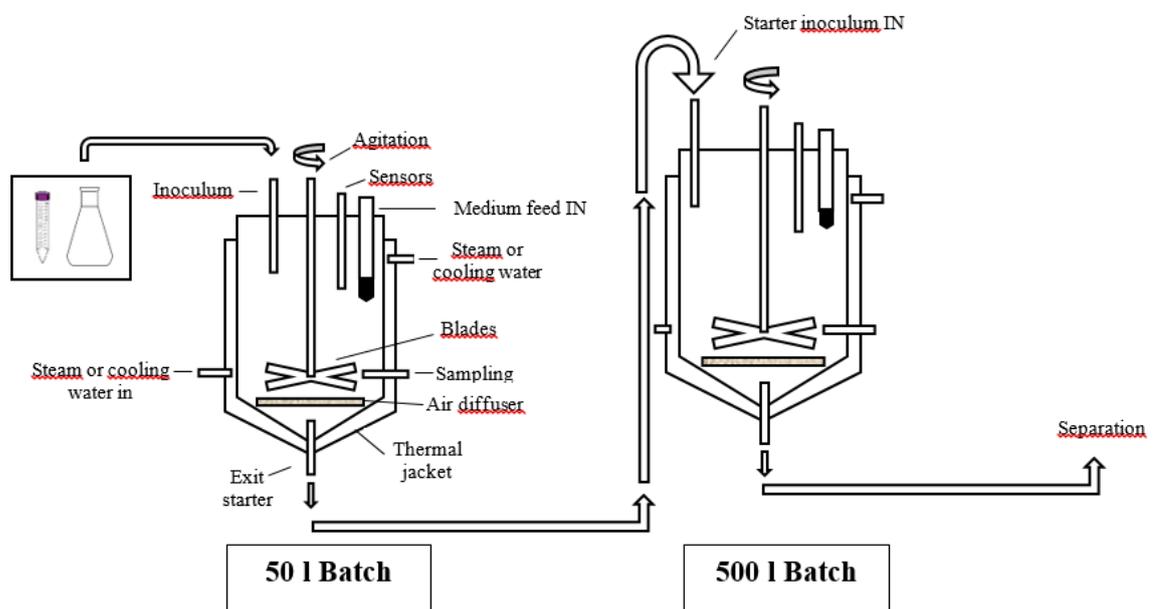


Figura 52. Schematizzazione dell'impianto di fermentazione a scala aziendale. E' prevista la preparazione di un Pre-starter del microorganismo in beuta e di uno Starter nel batch da 50 l. Nel batch da 500 viene effettuata la fermentazione del sottoprodotto con *Trichoderma* per l'ottenimento di una formulazione liquida, utilizzabile direttamente in campo. Si può procedere alla separazione tramite una centrifuga dei prodotti di interesse.

In sintesi, il processo prevede i seguenti step, schematizzati nel diagramma di flusso in Figura 53:

→ **Preparazione di 5 l del Pre-starter di *Trichoderma* in laboratorio**, come descritto nel paragrafo 12.1.

→ **Preparazione dello Starter nel batch da 50 l:**

- 1) Riempimento del batch attraverso l'apposito bocchettone di entrata con circa 45 l del substrato di crescita che può essere PDB o la sansa diluita al 4% in SM.
- 2) Sterilizzazione del substrato (121 °C per 30 min).
- 3) Trasferimento asettico di 5 l di Pre-starter di *Trichoderma* nel substrato di crescita attraverso iniettori a siringa
- 4) Regolazione dei parametri di processo (150 r.p.m; 25°C; 0,5 vvm)
- 5) Fermentazione per 72 h
- 6) Durante la fermentazione: campionamento del brodo di coltura per la valutazione della crescita di *Trichoderma* (CFU, spore/ml)
- 7) Durante la fermentazione: Controllo e correzione dei parametri di processo (pH, temperatura, ecc,)
- 8) Ottenimento di 45 l di starter con una concentrazione potenziale di 7×10^6 spore di *Trichoderma* per ml di substrato
- 9) Valutazione dell'effettiva crescita di *Trichoderma* (CFU, spore/ml)

→ **Fermentazione nel batch da 500 l:**

- 1) Riempimento del batch attraverso l'apposito bocchettone di entrata con circa 450 l del substrato di crescita composto da sansa diluita al 4% in SM.
- 2) Sterilizzazione del substrato (121 °C per 30 min).
- 3) Trasferimento asettico di 45 l di Starter di *Trichoderma* nel substrato di crescita attraverso le apposite tubazioni in pvc
- 4) Regolazione dei parametri di processo (100 r.p.m; 25°C; 0,5 vvm)
- 5) Fermentazione per 7 gg
- 6) Durante la fermentazione: campionamento del brodo di coltura per la valutazione della crescita di *Trichoderma* (CFU, spore/ml), produzione di metaboliti secondari ed enzimi
- 7) Durante la fermentazione: Controllo e correzione dei parametri di processo (pH, temperatura, ecc,)

- 8) Ottenimento di 450 l di fermentato con una concentrazione potenziale di 7×10^6 spore di *Trichoderma* per ml di substrato
- 9) Valutazione della concentrazione finale di *Trichoderma* (CFU, spore/ml) nel prodotto e produzione di metaboliti secondari ed enzimi
- 10) Eventuale centrifugazione per la separazione dei prodotti di interesse
- 11) Ottenimento di bioformulati, biostimolanti e biofertilizzanti applicabili in campo per la promozione della crescita e difesa delle colture
- 12) Eventuale potenziamento della *shelf life* dei prodotti (aggiunta di glicerolo, inibitori di proteasi)

A termine del processo si ottiene un prodotto liquido, facilmente utilizzabile e applicabile direttamente in campo come biostimolante per promuovere la crescita delle colture. Tale prodotto infatti contiene micelio germinato già pronto all'uso che non deve essere riattivato, come accade invece per la più parte dei prodotti commercializzati che si presentano in forma di polvere bagnabile. L'ottenimento di un prodotto liquido permette inoltre di ridurre le fasi a valle della fermentazione limitando ulteriori trasformazioni, quali ad esempio l'essiccazione, evitando così che l'azienda si faccia carico di costi aggiuntivi d'impianto, di manodopera e di manutenzione. Il substrato liquido favorisce inoltre la presenza e la produzione di metaboliti e composti bioattivi indotti dal substrato, quali enzimi litici, coinvolti nei meccanismi di biocontrollo e di interazione pianta-patogeno. Infine, l'aumento della Shelf life, tramite l'aggiunta di glicerolo o inibitori di proteasi, permette di evitare la perdita di metaboliti attivi e consente la conservazione del prodotto a temperatura ambiente (20-25 °C) per 7-8 mesi.

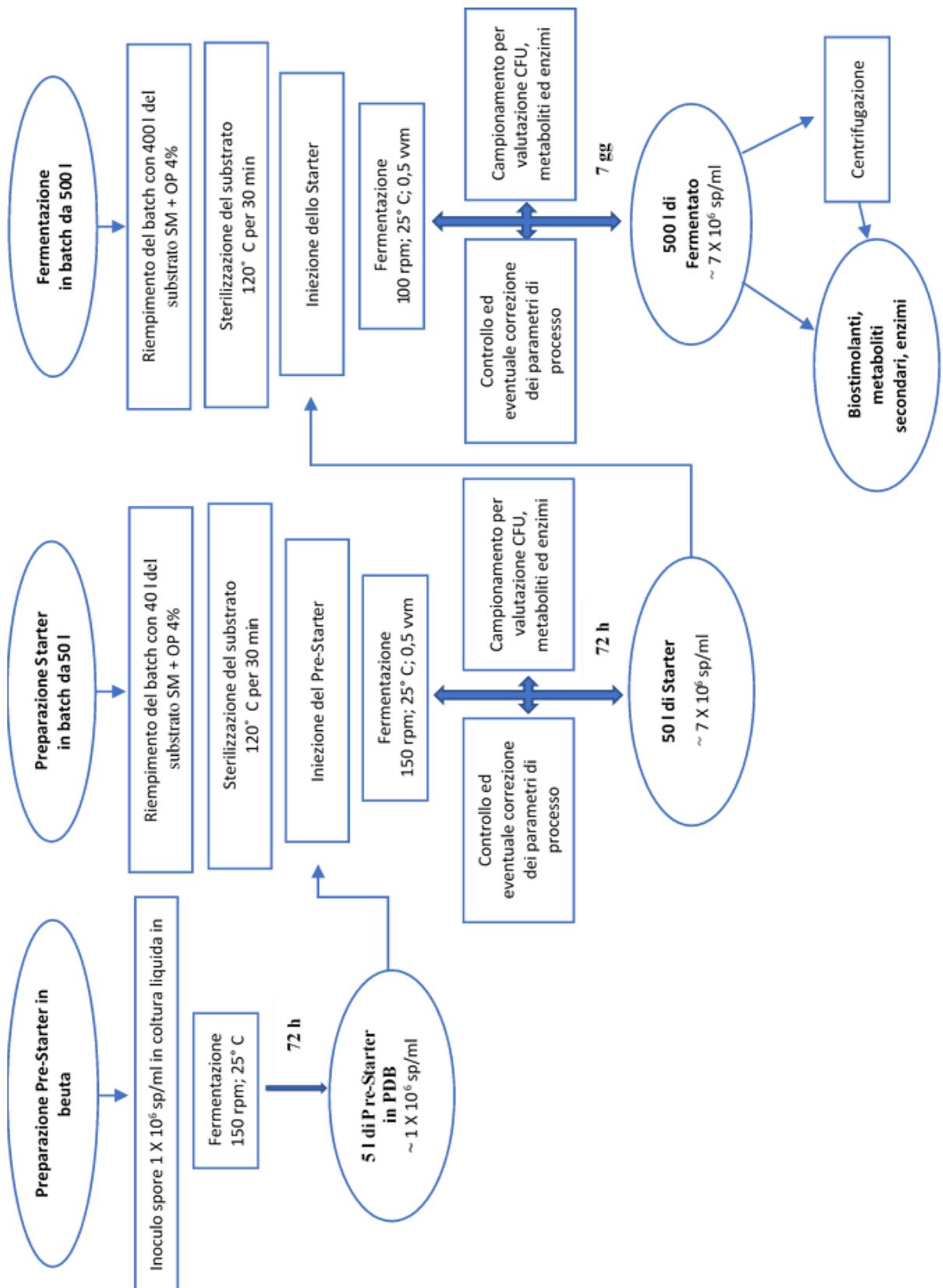


Figura 53. Schematizzazione del diagramma di flusso del processo di fermentazione.

12.4 Discussione

I risultati descritti evidenziano che la fermentazione liquida a scala aziendale (50 l) di *Trichoderma* T22 su un substrato composto dal sottoprodotto diluito al 4 % in un substrato minimo salino garantisce un rapido sviluppo del microrganismo in termini di conidi e biomassa. Numerosi autori hanno riscontrato un'elevata capacità di crescita di *Trichoderma* spp. su substrati contenenti OP, mostrando il potenziale impiego del sottoprodotto per la produzione di conidi, metaboliti secondari, enzimi, biofertilizzanti e biostimolanti (Haddadin *et al.*, 2009; Sadik *et al.*, 2020; Hamrouni *et al.*, 2019; Hamrouni *et al.*, 2020; Rayhane *et al.*, 2019; Leite *et al.*, 2016). L'aumento dell'agitazione e la diminuzione dell'aereazione nella II e III fermentazione hanno contribuito ad incrementare il numero di spore/ml e le CFU/ml. La limitazione di ossigeno unitamente ai moti turbolenti creati dall'eccessiva agitazione definiscono una condizione di maggiore stress per lo sviluppo del fungo che, come riportato da diversi studi bibliografici (Felse *et al.*, 1999, Justen *et al.*, 1996), favorisce la sporulazione del fungo e riduce la crescita miceliare.

La collaborazione instaurata con la sede aziendale di Vibo Valentia ha permesso di implementare il processo di fermentazione a scala industriale presente in azienda rendendo possibile l'utilizzo dell'impianto in sede per la fermentazione di OP utilizzando il fungo benefico *Trichoderma*. L'integrazione nel processo di produzione aziendale della trasformazione del sottoprodotto, rispetta i criteri del cosiddetto "end of waste" delineati dalla normativa vigente, facendo sì che la sansa si trasformi da residuo di produzione a prodotto dall'elevato valore aggiunto: la sterilizzazione, la diluizione e il trattamento con i microrganismi benefici permettono il riutilizzo della sansa come materia prima per produrre biostimolanti o biofertilizzanti per le colture. L'innovazione di tale processo è l'ottenimento di un prodotto liquido pronto all'uso, di facile applicazione in campo e con un'elevata shelf life, che permette di ridurre i costi di ulteriori trasformazioni per garantirne la conservabilità. La messa in atto di tale processo di fermentazione a scala aziendale apre interessanti prospettive per lo sviluppo di prodotti innovativi ed ecosostenibili a partire dall'uso combinato dei sottoprodotti e dei microrganismi benefici, quali bioformulati, biostimolanti, metaboliti secondari e enzimi.

13. Conclusioni

L'agro-alimentare è uno dei settori produttivi maggiormente responsabile delle problematiche che riguardano gli scarti di lavorazione, provenienti sia dalle produzioni in campo che dal processo di trasformazione industriale. Lo smaltimento di tali rifiuti può causare il rilascio di inquinanti nelle acque e nel suolo e l'emissione di gas ad effetto serra, generando seri rischi per la salute dell'uomo e dell'ambiente. In aggiunta, l'agricoltore o il produttore spesso devono farsi carico della responsabilità e del costo dello smaltimento. I costi economici, sociali ed ambientali riguardano anche il mancato riutilizzo degli scarti agroalimentari come materie prime seconde per la produzione di numerosi prodotti di alto valore aggiunto ottenibili nell'ambito farmaceutico, alimentare, agricolo, industriale ed energetico. Lo sviluppo di nuovi sistemi biotecnologici di conversione dei rifiuti rientra nell'orientamento di economia circolare, ampiamente sostenuto dalle politiche Europee e mondiali per allentare la pressione sulle risorse ambientali e diminuire le problematiche legate allo smaltimento.

L'attività di ricerca si è focalizzata sulla messa a punto di tecniche innovative per la valorizzazione dei sottoprodotti dalla filiera agro-alimentare: il riciclo, il biorisanimento, il riutilizzo come substrati per l'allevamento di funghi selezionati per la loro attività di biocontrollo e di interazione benefica con la pianta. I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi hanno evidenziato la possibilità di definire un'applicazione innovativa relativa ad una tecnologia microbica finalizzata alla riduzione della fitotossicità dei sottoprodotti dell'industria olearia (OP: sansa; SF e RS: farine di estrazione dell'olio di Girasole e di Colza) e alla produzione di ammendanti/integratori del suolo e bioformulati per migliorare la crescita delle piante da utilizzare nell'ambito delle produzioni agricole e nella gestione del verde urbano quali parchi, giardini, ecc. Le fasi principali del processo sono rappresentate ciclicamente nella Figura 54.

Nella fase iniziale dell'attività di ricerca, l'isolamento dei ceppi fungini da suolo contaminato e i successivi saggi di biocontrollo e promozione della crescita hanno permesso di selezionare i microrganismi più adatti ad una potenziale applicazione in ambito agricolo come biopesticidi e biostimolanti delle colture e nel biorisanamento dei rifiuti agroalimentari. In particolare, tra i 45 ceppi fungini isolati dal suolo contaminato e identificati tramite analisi morfologica e molecolare, il ceppo di *Trichoderma harzianum* E45 è stato selezionato come il più promettente.

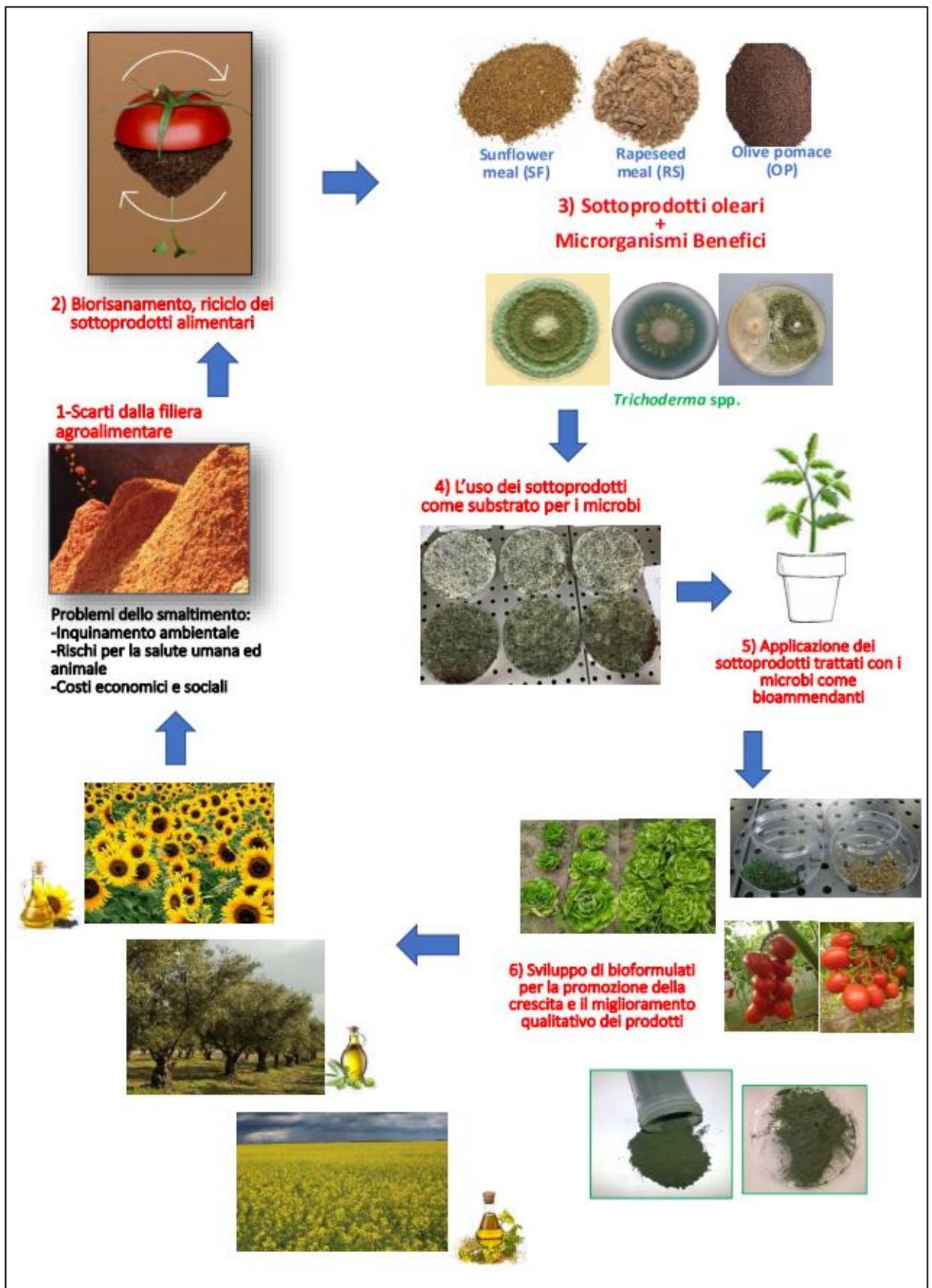


Figura 54. Ciclo del processo per il biorisanamento e la valorizzazione dei sottoprodotti oleari provenienti dall'estrazione dell'olio di oliva, Colza e Girasole tramite l'uso di *Trichoderma*.

Tale ceppo ha mostrato un'elevata resistenza e capacità di rimozione del rame, ha promosso la crescita e lo sviluppo di piante di pomodoro ed è risultato efficace nel biocontrollo di un'ampia gamma di patogeni terricoli e fogliari.

T. afroharzianum T22, *T. harzianum*, T34 e E45 e *T. asperellum* T25 sono stati selezionati, nell'ambito dei numerosi ceppi di *Trichoderma* analizzati in questo studio, per la loro elevata capacità di crescita sui sottoprodotti agroalimentari, oggetto della ricerca. L'integrazione di basse concentrazioni di sansa e farine di estrazione dell'olio di colza e girasole, comprese tra il 0,5 e il 10%, nei terreni salini minimi, liquidi e solidi, ha permesso un rapido sviluppo dei ceppi selezionati, con performance paragonabili o superiori a quelle che generalmente si ottengono sui costosi e complessi substrati di crescita convenzionali. La SSF (Fermentazione in Stato Solido) è risultata la tipologia di fermentazione ottimale per lo sviluppo di *Trichoderma* sui sottoprodotti, favorendo in particolare un abbondante crescita e la sporulazione dei ceppi T22, T25 e E45 su SF e RS in sole 48 h dall'inoculo. La crescita dei funghi in SSF ha inoltre modificato la composizione dei sottoprodotti, incrementando l'azoto in forma ammoniacale, prontamente disponibile per le piante.

L'aggiunta al suolo di OP50 e di SF e RS all'1% ha mostrato avere un effetto fertilizzante sulle piante di pomodoro, apportando N e P facilmente disponibili per la nutrizione vegetale e contribuendo ad aumentare la crescita delle piante. Il pretrattamento di SF e RS in SSF con *Trichoderma* potenzia gli effetti benefici sulla crescita delle piante di pomodoro rispetto a quelli osservati con l'utilizzo esclusivo dei sottoprodotti o dei funghi: l'effetto fertilizzante dei sottoprodotti combinato all'effetto biostimolante di *Trichoderma* si traduce in un considerevole incremento della crescita della parte epigea ed ipogea delle piante stesse. Le combinazioni di SF e RS con il ceppo di *Trichoderma* T22 sono risultati essere i trattamenti più efficaci nel favorire la crescita delle piante.

L'allevamento di *Trichoderma* sui sottoprodotti, sia in liquido che in solido, determina inoltre la diminuzione degli effetti fitotossici sul pomodoro dei relativi filtrati colturali e dei sottoprodotti tal quali, quando aggiunti al suolo ad un'elevata concentrazione (4 %).

Infine, è stato pianificato lo sviluppo e l'implementazione di un impianto pilota presso Santa Rita s.r.l. per la fermentazione liquida dei sottoprodotti a scala aziendale che ha dimostrato la fattibilità di integrare a valle del processo di trasformazione dei prodotti agroalimentari soluzioni biotecnologiche innovative per valorizzare gli scarti attraverso i

microrganismi benefici, trasformandoli in materie prime seconde per l'ottenimento di bioformulati e biostimolanti.

In sintesi, l'attività di ricerca svolta durante il Dottorato mostra che:

- *Trichoderma* può essere utilizzato nel biorisanamento dei sottoprodotti oleari, OP, RS e SF, riducendone considerevolmente gli effetti fitossici
- I sottoprodotti oleari testati, possono essere utilizzati come substrati di crescita per microrganismi benefici utilizzabili in ambito agricolo
- I sottoprodotti OP, RS e SF in combinazione con *Trichoderma* sono validi biofertilizzanti organici in grado di garantire una corretta ed efficiente nutrizione e crescita delle piante
- I sottoprodotti favoriscono una maggiore presenza e persistenza di *Trichoderma* nel suolo

Ulteriori approfondimenti sono necessari per identificare in termini quantitativi e qualitativi la degradazione dei composti tossici dei sottoprodotti da parte di *Trichoderma*. In particolare, sarebbe importante lo studio dei meccanismi d'azione di questi funghi e degli enzimi prodotti, quali ad esempio perossidasi, cellulasi, xilanasi e proteasi, che sono coinvolti nel processo di degradazione e di biorisanamento dei sottoprodotti. Il lavoro svolto apre inoltre interessanti prospettive di ricerca relativamente all'effetto dei sottoprodotti in combinazione con *Trichoderma* sulle caratteristiche qualitative delle piante di pomodoro ed in termini di valore nutrizionale del frutto. In particolare sarebbe interessante approfondire l'eventuale incremento del contenuto di metaboliti secondari ad attività antiossidante quali ad esempio polifenoli, acido ascorbico, β -carotene e licopene. Ulteriori ricerche al fine di comprendere al meglio i meccanismi molecolari e fisiologici alla base della capacità delle componenti della formulazione di aumentare i fitochimici potrebbero contribuire a migliorare le proprietà nutraceutiche delle colture e quindi il benessere dei consumatori.

Sono necessarie, infine ulteriori indagini sugli effetti biostimolanti sulle piante dei sottoprodotti e di *Trichoderma* attraverso test *in vitro* e *in vivo* su diverse colture per confermare e consolidare i risultati ottenuti. Di particolare interesse per lo svolgimento di tali indagini sarebbe l'utilizzo di innovativi sistemi tecnologici altamente specializzati quali le piattaforme di fenotipizzazione ad alta processività (high-throughput phenotyping platform), ossia di impianti completamente automatizzati in serre o camere di crescita,

dotate di controllo ambientale preciso e tecniche di telerilevamento, per valutare in modo non distruttivo la crescita, le prestazioni e lo stato di salute di un gran numero di piante nel tempo, sia in condizioni normali che di stress (salinità, temperatura, contaminati). Attraverso diversi sistemi di acquisizione e analisi delle immagini (visibile, termico e spettrale a diversa lunghezza d'onda) tali piattaforme analizzano morfologia, architettura, colore, salute e stadio fenologico della coltura, misurano temperatura e contenuto di acqua dei tessuti vegetali e monitorano lo stato fisiologico dell'apparato fotosintetico, nonché la risposta ormonale delle piante (produzione di auxine, gibberelina, acido abscissico). Tali sistemi faciliterebbero lo sviluppo di nuovi biostimolanti a base di sottoprodotti e microrganismi in tempi brevi, permettendo la comprensione dei meccanismi d'azione e contribuendo all'implementazione di protocolli per il loro utilizzo a larga scala. Infine, con l'ausilio di tecniche quali la cromatografia liquida-spettrometria di massa (LCMS) sarebbe possibile identificare la produzione qualitativa e quantitativa di composti con azione biostimolante nei prodotti ottenuti dalla crescita dei microrganismi sui sottoprodotti, come ad esempio composti con azione ormono-simile già noti o nuovi composti la cui efficacia sarebbe da testare sulle piante.

In definitiva, l'utilizzo combinato dei sottoprodotti e dei microrganismi benefici per il biorisanamento degli scarti e per la produzione di biostimolanti, biofertilizzanti e bioformulati per la difesa e la promozione della crescita delle colture costituisce un metodo innovativo di valorizzazione dei rifiuti che mira a diminuire l'impatto ambientale dell'intera filiera agroalimentare, riducendo l'uso di sostanze chimiche di sintesi, favorendo un reintegro del carbonio organico e dei nutrienti nel suolo con il ripristino della sua fertilità chimica, fisica e biologica.

14. Bibliografía

- Abdel-Rahim, I. R., & Abo-Elyousr, K. A. (2018). *Talaromyces pinophilus* strain AUN-1 as a novel mycoparasite of *Botrytis cinerea*, the pathogen of onion scape and umbel blights. *Microbiological Research*, 212, 1-9.
- Abiven, S., Menasseri, S., & Chenu, C. (2009). The effects of organic inputs over time on soil aggregate stability-A literature analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(1), 1-12.
- Abou Chehade, L., Al Chami, Z., De Pascali, S. A., Cavoski, I., & Fanizzi, F. P. (2018). Biostimulants from food processing by-products: agronomic, quality and metabolic impacts on organic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1426-1436.
- Abu Yazid, N., Barrena, R., Komilis, D., & Sánchez, A. (2017). Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: a review. *Sustainability*, 9(2), 224.
- Acosta-Rodríguez, I., Cardenas-González, J. F., de Guadalupe Moctezuma-Zárate, M., Perez, A. R., & Martínez-Juárez, V. M. (2017). Hexavalent chromium (VI) removal by *Aspergillus niger*. In *Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation*, 673-688. CRC Press.
- Adams, P., De-Leij, F. A., & Lynch, J. M. (2007). *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microbial Ecol*, 54, 306-313
- Adan, M. J., Baque, M. A., Rahman, M. M., Islam, M. R., & Jahan, A. (2015). Formulating of *Trichoderma* based biopestice for controlling damping off pathogen of eggplant seedling. *Universal Journal of Agricultural Research*, 3(3), 106-113.
- Ahmad, J. S., & Baker, R. (1988). Implications of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 34(3), 229-234.
- Alotaibi, K. D., & Schoenau, J. J. (2011). Enzymatic activity and microbial biomass in soil amended with biofuel production byproducts. *Applied Soil Ecology*, 48(2), 227-235.
- Altomare C., Norvell W.A., Björkman T., & Harman G.E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and environmental microbiology*, 65, 2926-2933.
- Anand, P., Isar, J., Saran, S., & Saxena, R. K. (2006). Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology*, 97(8), 1018-1025.
- Aranda, V., Macci, C., Peruzzi, E., & Masciandaro, G. (2015). Biochemical activity and chemical-structural properties of soil organic matter after 17 years of amendments with olive-mill pomace co-compost. *Journal of environmental management*, 147, 278-285.
- Argumedo-Delira, R., Alarcon, A., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz, J. J., & Pena Cabriales, J. J. (2012). Tolerance and growth of 11 *Trichoderma* strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzo[a]pyrene. *J Environ Manag.*, 95, 291-299.
- Arriagada, C., Aranda, E., Sampedro, I., Garcia-Romera, I., & Ocampo, J. A. (2009). Contribution of the saprobic fungi *Trametes versicolor* and *Trichoderma harzianum* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus deserticola* and *G. claroideum* to arsenic tolerance of *Eucalyptus globules*. *Biores Technol*, 100, 6250-6257

- Arriagada, C. A., Herrera, M. A., Borie, F., & Ocampo, J. A. (2007). Contribution of arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi to the aluminum resistance of *Eucalyptus globulus*. *Water Air Soil Pollut*, 182, 383-394
- Ashraf, H., Iqbal, J., & Qadeer, M. A. (2003). Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresource technology*, 87(1), 57-61.
- Ashraf, M. A., Maah, M. J., & Yusoff, I. (2014). Soil contamination, risk assessment and remediation. *Environmental risk assessment of soil contamination*, 1, 3-56.
- Atagana, H. I. (2009). Biodegradation of PAHs by fungi in contaminated soil containing cadmium and nickel ions. *Afr J Biotechnol*, 8, 5780-5789
- Aya, M., Nao, T., Masahiro, M., & Hiroyuki, T. (2010). Method for producing high protein low glucosinolate rapeseed meal. International Patent JP2010011760 (A)
- Barilla Center for Food and Nutrition (2012). Lo spreco alimentare: cause, impatti e proposte.
- Baysal-Gurel, F., Liyanapathirana, P., & Adesso, K. M. (2020). Effect of *Brassica* crop-based biofumigation on soilborne disease suppression in woody ornamentals. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 42(1), 94-106.
- Baker, R. (1988). *Trichoderma* spp. as plant-growth stimulants. *Critical reviews in Biotechnology*, 7(2), 97-106.
- Bernal-Vicente, A., Pascual, J. A., Tittarelli, F., Hernández, J. A., & Diaz-Vivancos, P. (2015). *Trichoderma harzianum* T-78 supplementation of compost stimulates the antioxidant defence system in melon plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(11), 2208-2214.
- Bhagat, S., & Pan, S. (2007). Mass multiplication of *Trichoderma harzianum* on agricultural byproducts and their evaluation against seedling blight (*Rhizoctonia solani*) of mungbean and collar rot (*Sclerotium rolfsii*) of groundnut. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 77(9), 583.
- Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*. 69(11), 2357-2372.
- Briones, R., Serrano, L., & Labidi, J. (2012). Valorization of some lignocellulosic agro-industrial residues to obtain biopolyols. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87(2), 244-249.
- Brown, P., & Saa, S. (2015). Biostimulants in agriculture. *Frontiers in plant science*, 6, 671.
- Brunetti, G., Traversa, A., De Mastro, F., & Coccozza, C. (2019). Short term effects of synergistic inorganic and organic fertilization on soil properties and yield and quality of plum tomato. *Scientia Horticulturae*, 252, 342-347.
- Canellas, L. P., Balmori, D. M., Médici, L. O., Aguiar, N. O., Campostrini, E., Rosa, R. C., ... & Olivares, F. L. (2013). A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and soil*, 366(1), 119-132.
- Cao, L., Jiang, M., Zeng, Z., Du, A., Tan, H., & Liu, Y. (2008). *Trichoderma atroviride* F6 improves phytoextraction efficiency of mustard [*Brassica juncea* (L.) Coss. var. *foliosa* Bailey] in Cd, Ni contaminated soils. *Chemosphere*, 71, 1769-1773
- Carstens, L. (2018). Biodegradation of organic micropollutants dibutyl phthalate and bisphenol A by fungi.
- Caruso, G., El-Nakhel, C., Roupheal, Y., Comite, E., Lombardi, N., Cuciniello, A., & Woo, S. L. (2020). *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. yield and quality as influenced by

cropping season, protein hydrolysates, and *Trichoderma* applications. *Plants*, 9(6), 697.

- Castilla-Archilla, J., O’Flaherty, V., & Lens, P. N. (2019). Biorefineries: Industrial Innovation and Tendencies. In *Biorefinery* (pp. 3-35). Springer, Cham.
- Castilla-Archilla, J., Papirio, S., & Lens, P. N. (2021). Two step process for volatile fatty acid production from brewery spent grain: hydrolysis and direct acidogenic fermentation using anaerobic granular sludge. *Process Biochemistry*, 100, 272-283.
- Cavalcanti Luna, M. A., Rodrigues Vieira, E., Okada, K., Campos-Takaki, G. M., & do Nascimento, A. E. (2015). Copper-induced adaptation, oxidative stress and its tolerance in *Aspergillus niger* UCP1261. *Electronic journal of biotechnology*, 18(6), 418-427.
- Cecchi, G., Marescotti, P., Di Piazza, S., & Zotti, M. (2017). Native fungi as metal remediators: silver myco-accumulation from metal contaminated waste-rock dumps (Libiola Mine, Italy). *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52(3), 191-195.
- Cerniglia, C.E., & Sutherland, G.R. (2010). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. In: Timmis KN (ed) Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. *Springer*, Berlin, pp 2079-2110
- Chatterton, S., & Punja, Z. K. (2009). Chitinase and β -1, 3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea f. catenulata* against fungal plant pathogens. *Canadian journal of microbiology*, 55(4), 356-367.
- Chet, I., Inbar, J., & Hadar, I., (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT, Söderström B (eds) The Mycota IV: Environmental and microbial relationships. *Springer-Verlag*, Berlin, pp. 165-184.
- Chet, I. (1987). *Trichoderma*: application, mode of action, and potential as biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. *Innovative approaches to plant disease control*, 137-160.
- Christofoletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F. U., & Fontanetti, C. S. (2013). Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. *Waste management*, 33(12), 2752-2761.
- Clemente, R., Pardo, T., Madejón, P., Madejón, E., & Bernal, M. P. (2015). Food byproducts as amendments in trace elements contaminated soils. *Food Research International*, 73, 176-189.
- Cohen, M. F., Yamasaki, H., & Mazzola, M. (2005). *Brassica napus* seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of *Rhizoctonia* root rot. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(7), 1215-1227.
- Colla, G., & Rouphael, Y. (2015). Biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 1-134.
- Colla, G., Hoagland, L., Ruzzi, M., Cardarelli, M., Bonini, P., Canaguier, R., & Rouphael, Y. (2017). Biostimulant action of protein hydrolysates: unraveling their effects on plant physiology and microbiome. *Frontiers in plant science*, 8, 2202.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 149(3), 1579-1592.
- Cook, R. J., & Baker, K. F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society.

- Cuggino, S. G., Bascon-Villegas, I., Rincón, F., Pérez, M. A., Posada-Izquierdo, G., Marugán, J., ... & Pérez-Rodríguez, F. (2020). Modelling the combined effect of chlorine, benzyl isothiocyanate, exposure time and cut size on the reduction of *Salmonella* in fresh-cut lettuce during washing process. *Food microbiology*, *86*, 103346.
- Danielson, R. M., & Davey, C. B. (1973). Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. *Soil Biology and Biochemistry*, *5*(5), 505-515.
- Davet, P. (1979). Technique pour l'analyse des populations de *Trichoderma* et de *Gliocladium virens* dans le sol. *Ann. Phytopathol*, *11*(4), 529-533.
- de Carvalho, C. C. (2012). Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells for growth and bioremediation under extreme conditions. *Research in microbiology*, *163*(2), 125-136.
- De Corato, U., De Bari, I., Viola, E., & Pugliese, M. (2018). Assessing the main opportunities of integrated biorefining from agro-bioenergy co/by-products and agroindustrial residues into high-value added products associated to some emerging markets: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *88*, 326-346.
- de Graaff, L. H., Van den Broek, H., & Visser, J. (1988). Isolation and expression of the *Aspergillus nidulans* pyruvate kinase gene. *Current Genetics*, *11*, 499-503.
- De la Cruz Quiroz, R., Roussos, S., Hernández, D., Rodríguez, R., Castillo, F., & Aguilar, C. N. (2015). Challenges and opportunities of the bio-pesticides production by solid-state fermentation: filamentous fungi as a model. *Critical reviews in biotechnology*, *35*(3), 326-333.
- Den Herder, G., Van Isterdael, G., Beeckman, T., & De Smet, I. (2010). The roots of a new green revolution. *Trends in plant science*, *15*(11), 600-607.
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, *48*(10), 1532-1552.
- Diacono, M., & Montemurro, F. (2011). Long-term effects of organic amendments on soil fertility. *Sustainable agriculture volume 2*, 761-786
- Diacono, M., Persiani, A., Testani, E., Montemurro, F., & Ciaccia, C. (2019). Recycling agricultural wastes and by-products in organic farming: Biofertilizer production, yield performance and carbon footprint analysis. *Sustainability*, *11*(14), 3824.
- Din, G., Hassan, A., Dunlap, J., Ripp, S., & Shah, A. A. (2021). Cadmium tolerance and bioremediation potential of filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* FMS2 isolated from soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1-10.
- Ditta, Y. A., & King, A. J. (2017). Recent advances in sunflower seed meal as an alternate source of protein in broilers. *World's Poultry Science Journal*, *73*(3), 527-542.
- Doula, M. K., Tinivella, F., Moreno Ortgego, L. L., Kavvadias, V. A., Sarris, A., Theocharopoulos, S., ... & Elaiopoulos, K. (2012). Good practices for the agronomic use of olive mill wastes. *Application Guide published in project "PROSODOL: Strategies to improve and protect soil quality from the disposal of olive oil mills' wastes in the Mediterranean region" LIFE07 ENV/GR/000280, Edited by Maria K Doula*, 1-61.
- Du Jardin, P. (2012). The Science of Plant Biostimulants-A bibliographic analysis, Ad hoc study report. European Commission.

- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14.
- Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., & Johri, A. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(2), 143-152.
- Dubos, B. (1992). Biological control of *Botrytis*: state-of-the-art. In *Recent Advances in Botrytis Research- Proceedings of the 10th international Botrytis Symposium, Heraklion, Crete, Greece*. Pudoc scientific Publishers, Wageningen, pp. 169-178
- Duffy, B. K., & Weller, D. M. (1996). Biological Control of Take-all of Wheat in the Pacific Northwest of the USA Using Hypovirulent *Gaeumannomyces graminis* var. tritici and Fluorescent Pseudomonads. *Journal of Phytopathology*, 144(11-12), 585-590.
- Dunne, C., Moënne-Loccoz, Y., McCarthy, J., Higgins, P., Powell, J., Dowling, D. N., & O'gara, F. (1998). Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of *Pythium*-mediated damping-off of sugar beet. *Plant Pathology*, 47(3), 299-307
- Dzionek, A., Wojcieszńska, D., & Guzik, U. (2016). Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19(5), 28-36.
- Egües, I., Alriols, M. G., Herseczki, Z., Marton, G., & Labidi, J. (2010). Hemicelluloses obtaining from rapeseed cake residue generated in the biodiesel production process. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 16(2), 293-298.
- El-Fadel, M., Findikakis, A. N., & Leckie, J. O. (1997). Environmental impacts of solid waste landfilling. *Journal of environmental management*, 50(1), 1-25.
- Eriksson, G., Hedman, H., Boström, D., Pettersson, E., Backman, R., & Ohman, M. (2009). Combustion characterization of rapeseed meal and possible combustion applications. *Energy & Fuels*, 23(8), 3930-3939
- Errasquin, E. L., & Vazquez, C. (2003). Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. *Chemosphere*, 50(1), 137-143.
- European Commission (2010). Preparatory study on food waste across EU 27. October (Vol. 33).
- European Commission (2012). Innovating for a Sustainable Growth-A Bioeconomy for Europe.
- European Commission (2015). L'anello mancante-Piano d'azione dell'Unione europea per l'economia circolare.
- European Commission (2018). Una bioeconomia sostenibile per l'Europa: rafforzare il collegamento tra economia, società e ambiente
- European Union (2019). Parliament Approves New Rules on Fertilisers and Cadmium Limits. *Official Journal of the European Union*.
- European Union (2006). Directive 2006/12/EC of the European Parliament and the Council of 5 April 2006 on Waste. *Official Journal of the European Union*, 27/4/2006
- European Union (2008). Directive 2008/98/EC of the European Parliament and the Council of 19 November 2008 on Waste and Repealing Certain Directives. *Official Journal of the European Union*, 22/11/2008.
- European Union (2009). Directive 2009/28/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the promotion of the use of energy from renewable sources and amending and subsequently repealing Directives 2001/77/EC and 2003/30/EC. *Official Journal of the European Union*, 5, 23/4/2009.

- European Union (2009). Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009. *Official Journal of the European Union*, 309 , 71-86, 21/10/2009
- European Union (2018). Directive 2018/851/EC of the European Parliament and the Council of 30 May 2018 amending Directive 2008/98/EC. *Official Journal of the European Union*, 22/11/2008.
- Ezzi, M.I., & Lynch, J.M. (2005). Biodegradation of cyanide by *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. *Enzyme Microb Technol*, 36, 849-854
- Fadel, H. H. M., Mahmoud, M. G., Asker, M. M. S., & Lotfy, S. N. (2015). Characterization and evaluation of coconut aroma produced by *Trichoderma viride* EMCC-107 in solid state fermentation on sugarcane bagasse. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(1), 5-9.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2011). Global Food Losses and Food Waste. Extent, Causes and Prevention. Rome.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018). The future of food and agriculture: alternative pathways to 2050. Rome.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2019). *The state of food security and nutrition in the world 2019: safeguarding against economic slowdowns and downturns*. Rome.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013). Food Wastage Footprint: Impacts on Natural Resources - Summary Report. Rome.
- Farrell, M., & Jones, D. L. (2009). Heavy metal contamination of a mixed waste compost: metal speciation and fate. *Bioresource technology*, 100(19), 4423-4432.
- Fatema, U., Broberg, A., Jensen, D. F., Karlsson, M., & Dubey, M. (2018). Functional analysis of polyketide synthase genes in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea*. *Scientific reports*, 8(1), 1-17.
- Fazli, M. M., Soleimani, N., Mehrasbi, M., Darabian, S., Mohammadi, J., & Ramazani, A. (2015). Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 13(1), 1-9.
- Federici, E., Pepi, M., Esposito, A., Scargetta, S., Fidati, L., Gasperini, S., ... & Altieri, R. (2011). Two-phase olive mill waste composting: community dynamics and functional role of the resident microbiota. *Bioresource Technology*, 102(23), 10965-10972.
- Felse, P. A., & Panda, T. (2000). Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors-the influence of agitator speed. *Biochemical Engineering Journal*, 4(2), 115-120.
- Fiorentino, N., Mori, M., Cenvinzo, V., Duri, L. G., Gioia, L., Visconti, D., & Fagnano, M. (2018). Assisted phytoremediation for restoring soil fertility in contaminated and degraded land. *Ital. J. Agron*, 13(s1), 34-44.
- Galletti, S., Fornasier, F., Cianchetta, S., & Lazzeri, L. (2015). Soil incorporation of brassica materials and seed treatment with *Trichoderma harzianum*: Effects on melon growth and soil microbial activity. *Industrial crops and products*, 75, 73-78.
- Galletti, S., Sala, E., Leoni, O., Burzi, P. L., & Cerato, C. (2008). *Trichoderma* spp. tolerance to *Brassica carinata* seed meal for a combined use in biofumigation. *Biological Control*, 45(3), 319-327.
- García-Ruiz, R., Ochoa, M. V., Hinojosa, M. B., & Gómez-Muñoz, B. (2012). Improved soil quality after 16 years of olive mill pomace application in olive oil groves. *Agronomy for sustainable development*, 32(3), 803-810.

- Gattinger, L. D., Duvnjak, Z., & Khan, A. W. (1990). The use of canola meal as a substrate for xylanase production by *Trichoderma reesei*. *Applied microbiology and biotechnology*, 33(1), 21-25.
- Gaur, V. K., Sharma, P., Sirohi, R., Awasthi, M. K., Dussap, C. G., & Pandey, A. (2020). Assessing the impact of industrial waste on environment and mitigation strategies: A comprehensive review. *Journal of Hazardous Materials*, 398, 123019.
- Geneau-Sbartai, C., Leyris, J., Silvestre, F., & Rigal, L. (2008). Sunflower cake as a natural composite: composition and plastic properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(23), 11198-11208.
- Gericke, S., & Kurmies, B. (1952). Colorimetrische Bestimmung der Phosphorsäure mit Vanadat-Molybdat. *Fresenius' Zeitschrift Für Analytische Chemie*, 137(1), 15-22.
- Ginni, G., Kumar, S. A., Usman, T. M., Pakonyi, P., & Banu, J. R. (2020). Integrated biorefineries of food waste. In *Food Waste to Valuable Resources* (pp. 275-298). Academic Press.
- Godfrey, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., & Muir, J.F. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*. 327, 812-818.
- Goldman, G. H., Hayes, C., & Harman, G. E. (1994). Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Trends in biotechnology*, 12(12), 478-482.
- Gómez-Muñoz, B. J., Hatch, D., Bol, R., & García-Ruiz R (2013). Agrochemical characterization, net N mineralization, and potential N leaching of composted olive-mill pomace currently produced in southern Spain. *J. Plant Nutr. Soil Sci*, 176(5), 655-663.
- Gu, J. (2007) Method for preparing rapeseed meal peptide using biological fermentation method. International Patent CN101086005 (A)
- Gu, X., Yu, W., Ma, G., & Cheng, H. (2011). Method for reducing fibre content of rapeseed meal. International Patent CN101946854 (A)
- Guarino, C., Spada, V., & Sciarrillo, R. (2017). Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioaugmentation-Assisted Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. *Chemosphere*, 170, 10-16.
- Gullino, M. L. (1992). Chemical control of *Botrytis* spp. *Recent advances in Botrytis research*, 217-222.
- Gupta, P., Kumar, P., & Singh, N. (2015). Adsorption of copper metal by living *Aspergillus niger* L. biomass. *International Journal of Environmental Sciences*, 5(6), 1122.
- Gutiérrez-Sánchez, G., Roussos, S., & Augur, C. (2013). Effect of caffeine concentration on biomass production, caffeine degradation, and morphology of *Aspergillus tamarii*. *Folia microbiologica*, 58(3), 195-200.
- Haddadin, M. S., Haddadin, J., Arabiyat, O. I., & Hattar, B. (2009). Biological conversion of olive pomace into compost by using *Trichoderma harzianum* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource technology*, 100(20), 4773-4782.
- Hamrouni, R., Claeys-Bruno, M., Molinet, J., Masmoudi, A., Roussos, S., & Dupuy, N. (2020). Challenges of enzymes, conidia and 6-pentyl-alpha-pyrone production from solid-state-fermentation of agroindustrial wastes using experimental design and *T. asperellum* strains. *Waste and Biomass Valorization*, 11(11), 5699-5710.
- Hamrouni, R., Josiane, M., Gregoria, M., Yiannis, K., Nathalie, D., Ahmed, M., Sevastianos, R. (2019). From flasks to single used bioreactor: scale-up of solid state

fermentation process for metabolites and conidia production by *Trichoderma asperellum*. *J. Environ. Manage*, 252 (10), 94-96. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109496>

- Hamrouni, R., Molinet, J., Dupuy, N., Taieb, N., Carboue, Q., Masmoudi, A., & Roussos, S. (2019). The effect of aeration for 6-pentyl-alpha-pyrone, conidia and lytic enzymes production by *Trichoderma asperellum* strains grown in solid-state fermentation. *Waste and Biomass Valorization*, 1-10.
- Hanschen, F. S., & Winkelmann, T. (2020). Biofumigation for fighting replant disease-A Review. *Agronomy*, 10(3), 425.
- Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of Biocontrol: Changes in the perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*. 84, 377-393.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol*, 2, 43-56.
- Harman, G.E., Lorito, M., & Lynch, J.M. (2004b). Uses of *Trichoderma* spp. to remediate soil and water pollution. *Adv Appl Microbiol*, 56, 313-330.
- Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. T., Diaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E., & Garcia-Acha, I. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1890-1898.
- Hodge, S., Merfield, C. N., Bluon, A., Berry, N. A., & O'Connell, D. M. (2019). The potential of culinary vegetable oils as herbicides in organic farming: the effect of oil type and repeated applications on plant growth. *Organic Agriculture*, 9(1), 41-51.
- Hoseinzadeh, S., Shahabivand, S., & Aliloo, A. A. (2017). Toxic metals accumulation in *Trichoderma asperellum* and *T. harzianum*. *Microbiology*, 86(6), 728-736.
- Inbar, J., Abramsky, M., Cohen, D., & Chet, I., (1994). Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 100(5), 337-346.
- Iram, S., Ahmad, I., & Stuben, D. O. R. I. S. (2009). Analysis of mines and contaminated agricultural soil samples for fungal diversity and tolerance to heavy metals. *Pak. J. Bot*, 41(2), 885-895.
- Iram, S., Shabbir, R., Zafar, H., & Javaid, M. (2015). Biosorption and bioaccumulation of copper and lead by heavy metal-resistant fungal isolates. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 40(7), 1867-1873.
- Iskandar, N. L., Zainudin, N. A. I. M., & Tan, S. G. (2011). Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. *Journal of Environmental Sciences*, 23(5), 824-830.
- Joseph, L. K., Veena, S. S., Byju, G., Sreekumar, J., & Karthikeyan, S. (2020). Comparative Analysis of Antimicrobial Activities of 43 *Trichoderma* Isolates Against *Sclerotium rolfsii*, the Pathogen Causing Collar Rot Disease in Elephant Foot Yam. *Journal of Root Crops*, 44(2), 53-60.
- Jüsten, P., Paul, G. C., Nienow, A. W., & Thomas, C. R. (1996). Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnology and Bioengineering*, 52(6), 672-684.
- Kallenbach, C. M., Conant, R. T., Calderón, F., & Wallenstein, M. D. (2019). A novel soil amendment for enhancing soil moisture retention and soil carbon in drought-prone soils. *Geoderma*, 337, 256-265.

- Karaouzas, I., Skoulikidis, N. T., Giannakou, U., & Albanis, T. A. (2011). Spatial and temporal effects of olive mill wastewaters to stream macroinvertebrates and aquatic ecosystems status. *Water research*, 45(19), 6334-6346.
- Karigar, C. S., & Rao, S. S. (2011). Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme research*, 2011.
- Katayama, A., & Matsumura, F. (1993). Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan, by *Trichoderma harzianum*. *Environ Toxicol Chem*, 12, 1059-1065
- Khomenkov, V. G., Shevelev, A. B., Zhukov, V. G., Zagustina, N. A., Bezborodov, A. M., & Popov, V. O. (2008). Organization of metabolic pathways and molecular-genetic mechanisms of xenobiotic degradation in microorganisms: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(2), 117-135.
- Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A., Singh, M., Joshi, D., ... & Saxena, A. K. (2021). Beneficial microbiomes for bioremediation of diverse contaminated environments for environmental sustainability: Present status and future challenges. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-23.
- Kraemer, S. M., Crowley, D. E., & Kretzschmar, R. (2006). Geochemical aspects of phytosiderophore-promoted iron acquisition by plants. *Advances in agronomy*, 91, 1-46.
- Kubicek, C. P., Harman G.E., Ondik, K.L.(Eds.), (1998). *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor & Francis. 1: 243-270.
- Lal, R., Follett, R. F., Stewart, B. A., & Kimble, J. M. (2007). Soil carbon sequestration to mitigate climate change and advance food security. *Soil science*, 172(12), 943-956.
- Lee, H. K., Lee, Y. H., Kim, K. S., Jang, Y. S., & Choi, I. H. (2015). The effect control of root-knot nematode by using rapeseed meal in continuous cultivation at greenhouse. *Korean Journal of Plant Resources*, 28(1), 93-100.
- Leite, P., Salgado, J. M., Venâncio, A., Domínguez, J. M., & Belo, I. (2016). Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid-state fermentation. *Bioresource technology*, 214, 737-746.
- Leontopoulos, S. V., Giavasis, I., Petrotos, K., Kokkora, M., & Makridis, C. (2015). Effect of different formulations of polyphenolic compounds obtained from OMWW on the growth of several fungal plant and food borne pathogens. Studies *in vitro* and *in vivo*. *Agriculture and agricultural science procedia*, 4, 327-337.
- Lertpaitoonpan, W., Moorman, T. B., & Ong, S. K. (2015). Effect of swine manure on sulfamethazine degradation in aerobic and anaerobic soils. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(3), 1-13.
- Liu D (2006) Direct enzyme hydrolysis method for preparing rapeseed peptide using rapeseed cake. International Patent CN1884572 (A).
- Lomascolo, A., Uzan-Boukhris, E., Sigoillot, J. C., & Fine, F. (2012). Rapeseed and sunflower meal: a review on biotechnology status and challenges. *Applied microbiology and biotechnology*, 95(5), 1105-1114.
- Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C. K., & Harman, G. E. (1994). Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology*, 140, 623-629.
- Lorito, M., Woo, S. L., D'Ambrosio, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Kubicek, C. P., & Scala, F. (1996). Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 9, 206-213.

- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E., & Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. *Annual review of phytopathology*, 48, 395-417.
- Lynch, J. M., & Moffat, A. J. (2005) Bioremediation—prospects for the future application of innovative applied biological research. *Ann Appl Biol*, 146, 217-221
- Ma, Q., Zhang, X., & Qu, Y. (2018). Biodegradation and biotransformation of indole: advances and perspectives. *Frontiers in microbiology*, 9, 2625.
- Maina, S., Kachrimanidou, V., & Koutinas, A. (2017). A roadmap towards a circular and sustainable bioeconomy through waste valorization. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 8, 18-23.
- Manganiello, G., Sacco, A., Ercolano, M. R., Vinale, F., Lanzuise, S., Pascale, A., ... & Woo, S. L. (2018). Modulation of tomato response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and its secondary metabolite harzianic acid. *Frontiers in microbiology*, 9, 1966.
- Marín-Benito, J. M., Brown, C. D., Herrero-Hernández, E., Arienzo, M., Sánchez-Martín, M. J., & Rodríguez-Cruz, M. S. (2013). Use of raw or incubated organic wastes as amendments in reducing pesticide leaching through soil columns. *Science of the total environment*, 463, 589-599.
- Marra, R., Vinale, F., Cesarano, G., Lombardi, N., d'Errico, G., Crasto, A., ... & Bonanomi, G. (2018). Biochars from olive mill waste have contrasting effects on plants, fungi and phytoparasitic nematodes. *PloS one*, 13(6), e0198728.
- Martinez, E., & Duvnjak, Z. (2006). Enzymatic degradation of chlorogenic acid using a polyphenol oxidase preparation from the white-rot fungus *Trametes versicolor* ATCC 42530. *Process biochemistry*, 41(8), 1835-1841.
- Mastouri, F., Bjorkman, T., Harman, G. E. (2010). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100, 1213-1221
- Mavrakis, T. N. (2009). Exploitation of bioactive constituents of olive leaves, grape pomace, olive mills waste water and their application in phytoprotection.
- Mazzoncini, M., Antichi, D., Tavarini, S., Silvestri, N., Lazzeri, L., & D'Avino, L. (2015). Effect of defatted oilseed meals applied as organic fertilizers on vegetable crop production and environmental impact. *Industrial Crops and Products*, 75, 54-64.
- Ministero delle Politiche agricole, alimentari e forestali (2012). Metodi nazionali di riferimento per le analisi dei succhi di frutta ed ortaggi e prodotti analoghi. *Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale*, 137, 14 giugno 2012.
- Ministero per le Politiche Agricole (1999). Metodi Ufficiali d'Analisi chimica del suolo. *Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale*, 248, 21 ottobre 1999.
- Ministero per le Politiche Agricole (2002). Metodi Ufficiali di analisi dei fertilizzanti. *Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale*, 220, 19 settembre 2002.
- Ministero per le Politiche Agricole (2012). Attuazione della direttiva 2009/128/CE che istituisce un quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi. *Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale*, 202, 30 Agosto 2012
- Mohammadi, K., & Sohrabi, Y. (2012). Bacterial biofertilizers for sustainable crop production: a review. *ARNP J Agric Biol Sci*, 7(5), 307-316.
- Mohan, S. V., Butti, S. K., Amulya, K., Dahiya, S., & Modestra, J. A. (2016). Waste biorefinery: a new paradigm for a sustainable bioelectro economy. *Trends in biotechnology*, 34(11), 852-855,

- Mohan, S. V., Nikhil, G. N., Chiranjeevi, P., Reddy, C. N., Rohit, M. V., Kumar, A. N., & Sarkar, O. (2016). Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: critical review and future perspectives. *Bioresource technology*, 215, 2-12.
- Molla, A. H., Haque, M. M., Haque, M. A., & Ilias, G. N. M. (2012). *Trichoderma*-enriched biofertilizer enhances production and nutritional quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and minimizes NPK fertilizer use. *Agricultural Research*, 1(3), 265-272.
- Morán-Diez, M. E., Martínez de Alba, Á. E., Rubio, M. B., Hermosa, R., & Monte, E. (2021). *Trichoderma* and the Plant Heritable Priming Responses. *Journal of Fungi*, 7(4), 318.
- Nahar, M. S., Rahman, M. A., Kibria, M. G., Karim, A. R., & Miller, S. A. (2012). Use of tricho-compost and tricho-leachate for management of soil-borne pathogens and production of healthy cabbage seedlings. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 37(4), 653-664.
- Negassa, W., Baum, C., & Leinweber, P. (2011). Soil amendment with agro-industrial byproducts: molecular-chemical compositions and effects on soil biochemical activities and phosphorus fractions. *Journal of plant nutrition and soil science*, 174(1), 113-120.
- Ntalli, N., & Caboni, P. (2017). A review of isothiocyanates biofumigation activity on plant parasitic nematodes. *Phytochemistry Reviews*, 16(5), 827-834.
- Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Rineau, F., Smits, M., Vangronsveld, J., & Colpaert, J. V. (2015). Impact of metal pollution on fungal diversity and community structures. *Environmental Microbiology*, 17(6), 2035-2047.
- Oros, G., Naar, Z., & Cserhati, T. (2011). Growth response of *Trichoderma* species to organic solvents. *Mol Inf*, 30, 276-285
- Ousley, M. A., Lynch, J. M., & Whipps, J. M. (1994). Potential of *Trichoderma* spp. as consistent plant growth stimulators. *Biology and Fertility of Soils*, 17(2), 85-90.
- Ozbay, N., & Newman, S. E. (2004). Biological control with *Trichoderma* spp. with emphasis on *T. harzianum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(4), 478-484.
- Panda, S. K., & Maiti, S. K. (2019). An approach for simultaneous detoxification and increment of cellulase enzyme production by *Trichoderma reesei* using rice straw. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 41(22), 2691-2703.
- Parajuli, R., Thoma, G., & Matlock, M. D. (2019). Environmental sustainability of fruit and vegetable production supply chains in the face of climate change: A review. *Science of the Total Environment*, 650, 2863-2879.
- Park, J. W., & Shin, H. C. (2001). Surface emission of landfill gas from solid waste landfill. *Atmospheric Environment*, 35(20), 3445-3451.
- Parrado, J., & Bautista, J. (1993). Protein enrichment of sunflower lignocellulosic fraction by *Trichoderma harzianum* S/G 2431 in low moisture content media. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 57(2), 317-318.
- Pascale, A., Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Lanzuise, S., Ruocco, M., Marra, R., Lombardi, N., Woo, S. L., & Lorito, M. (2017). *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop Protection*, 92, 176-181.
- Patel, M., & Kumar, S. (2021). The Evaluation of *Trichoderma* consortia against *Fusarium udum* causing wilt of Pigeonpea. *Journal of Applied and Natural Science*, 13(2), 537-543.

- Pelagio-Flores, R., Esparza-Reynoso, S., Garnica-Vergara, A., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, A. (2017). *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. *Frontiers in plant science*, 8, 822.
- Pierson, E. A., & Weller, D. M. (1994). to Suppress Take-all and Improve the Growth of Wheat. *Phytopathology*, 84, 940-947.
- Pinho, I. A., Lopes, D. V., Martins, R. C., & Quina, M. J. (2017). Phytotoxicity assessment of olive mill solid wastes and the influence of phenolic compounds. *Chemosphere*, 185, 258-267.
- Poveda, J., Eugui, D., & Velasco, P. (2020). Natural control of plant pathogens through glucosinolates: An effective strategy against fungi and oomycetes. *Phytochemistry Reviews*, 19(4), 1045-1059.
- Prasad, P., Kumar, J., & Pandey, S. (2018). Investigating disease controlling ability of *Brassica* volatiles and their compatibility with *Trichoderma harzianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(3), 887-896.
- Proietti, P., Federici, E., Fidati, L., Scargetta, S., Massaccesi, L., Nasini, L., ... & Gigliotti, G. (2015). Effects of amendment with oil mill waste and its derived-compost on soil chemical and microbiological characteristics and olive (*Olea europaea* L.) productivity. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 207, 51-60.
- Puglia, D., Pezzolla, D., Gigliotti, G., Torre, L., Bartucca, M. L., & Del Buono, D. (2021). The Opportunity of Valorizing Agricultural Waste, Through Its Conversion into Biostimulants, Biofertilizers, and Biopolymers. *Sustainability*, 13(5), 2710.
- Qualhato, T. F., Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Brandao, R. S., Jesuino, R. S. A., & Ulhoa, C. J. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology letters*, 35(9), 1461-1468.
- Ramachandran, S., Singh, S. K., Larroche, C., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2007). Oil cakes and their biotechnological applications-A review. *Bioresource technology*, 98(10), 2000-2009.
- Ramanujam, B., Nambiar, K. K. N., Iyer, R., & Biddappa, C. C. (2004). Mass multiplication of *Trichoderma* sp. on various agricultural and forest byproducts.
- Rao, K. M., Raju, K. S., & Ravisankar, H. (2015). Antifungal properties of native *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii* and *Pythium aphanidermatum* infecting tobacco.
- Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C., & Foley, J. A. (2013). Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *Plos One*, 8(6), 66428
- Rayhane, H., Josiane, M., Gregoria, M., Yiannis, K., Nathalie, D., Ahmed, M., & Sevastianos, R. (2019). From flasks to single used bioreactor: scale-up of solid state fermentation process for metabolites and conidia production by *Trichoderma asperellum*. *Journal of environmental management*, 252, 109496.
- Rebah, F. B., Prévost, D., Yezza, A., & Tyagi, R. D. (2007). Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: a review. *Bioresource technology*, 98(18), 3535-3546.
- Regione Piemonte (1998). Metodi di analisi del compost. Collana ambiente. URL: https://www.regione.piemonte.it/web/sites/default/files/media/documenti/2018-11/metodo_analisi_compost_1998_web.pdf

- Rhozyel, M. S., & Žalpytė, J. (2018). A Macroeconomic Perspective on Green Growth. In *Towards a Sustainable Bioeconomy: Principles, Challenges and Perspectives*, Springer, Cham, pp. 63-73..
- Rocha, L. M., Campanhol, B. S., & Bastos, R. G. (2021). Solid-state cultivation of *Aspergillus niger*-*Trichoderma reesei* from sugarcane bagasse with vinasse in bench packed-bed column bioreactor.
- Rodríguez, M. A., Cabrera, G., Gozzo, F. C., Eberlin, M. N., & Godeas, A. (2011). *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1177-1186.
- Romeo, L., Iori, R., Rollin, P., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2018). Isothiocyanates: An overview of their antimicrobial activity against human infections. *Molecules*, 23(3), 624.
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, 13(3), 249-252.
- Ronga, D., Villecco, D., & Zaccardelli, M. (2019). Effects of compost and defatted oilseed meals as sustainable organic fertilisers on cardoon (*Cynara cardunculus* L.) production in the Mediterranean basin. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 94(5), 664-675.
- Roupael, Y., & Colla, G. (2020). Toward a sustainable agriculture through plant biostimulants: From experimental data to practical applications.
- Rozan, P., Villaum, C., Bau, H. M., Schwertz, A., Nicolas, J. P., & Mejean, L. (1996). Detoxication of rapeseed meal by *Rhizopus oligosporus* sp-T3: a first step towards rapeseed protein concentrate. *International journal of food science & technology*, 31(1), 85-90.
- Rudakiya, D. M., & Patel, Y. (2021). Bioremediation of Metals, Metalloids, and Nonmetals. In *Microbial Rejuvenation of Polluted Environment*, Springer, Singapore, pp. 33-49..
- Rushton, L. (2003). Health hazards and waste management. *British medical bulletin*, 68(1), 183-197.
- Sadh, P. K., Duhan, S., & Duhan, J. S. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1-15.
- Sadik, M. W., Zohair, M. M., El-Beih, A. A., Hamed, E. R., & Sedik, M. Z. (2021). Utilization of Agro-industrial wastes as carbon source in solidstate fermentation processes for the production of value-added byproducts. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 14(1).
- Salamone, A. L., Gundersen, B., & Inglis, D. A. (2018). *Clonostachys rosea*, a potential biological control agent for *Rhizoctonia solani* AG-3 causing black scurf on potato. *Biocontrol Science and Technology*, 28(9), 895-900.
- Salvati, L., Bajocco, S., Ceccarelli, T., Zitti, M., & Perini, L. (2011). Towards a process-based evaluation of land vulnerability to soil degradation in Italy. *Ecological Indicators*, 11(5), 1216-1227.
- Sampedro, I., Cajthaml, T., Marinari, S., Petruccioli, M., Grego, S., & D'Annibale, A. (2009). Organic matter transformation and detoxification in dry olive mill residue by the saprophytic fungus *Paecilomyces farinosus*. *Process Biochemistry*, 44(2), 216-225.

- Sampedro, I., D'Annibale, A., Ocampo, J. A., Stazi, S. R., & García-Romera, I. (2005). Bioconversion of olive-mill dry residue by *Fusarium lateritium* and subsequent impact on its phytotoxicity. *Chemosphere*, *60*(10), 1393-1400.
- Sampedro, I., Romero, C., Ocampo, J. A., Brenes, M., & García, I. (2004). Removal of monomeric phenols in dry mill olive residue by saprobic fungi. *Journal of agricultural and food chemistry*, *52*(14), 4487-4492.
- Sánchez, Ó. J., Ospina, D. A., & Montoya, S. (2017). Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste management*, *69*, 136-153.
- Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Pardo, F., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2017). Moscatel vine-shoot extracts as a grapevine biostimulant to enhance wine quality. *Food Research International*, *98*, 40-49.
- Sarhy-Bagnon, V., Lozano, P., Saucedo-Castañeda, G., & Roussos, S. (2000). Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. *Process Biochemistry*, *36*(1-2), 103-109.
- Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Cardelli, R., Biasci, A., & Riffaldi, R. (2001). Suitability of moist olive pomace as soil amendment. *Water, Air, and Soil Pollution*, *128*(1), 13-22.
- Scotto, A. L. (2012). Tesi di dottorato: Impatto ambientale dei rifiuti e degli sprechi agroalimentari in Europa e in Italia.
- Segrè, A., & Falasconi, L. (2011). Il libro nero dello spreco in Italia: il cibo. Edizioni Ambiente.
- Sharma, A., Saha, T. N., Arora, A., Shah, R., & Nain, L. (2017). Efficient Microorganism compost benefits plant growth and improves soil health in calendula and marigold. *Horticultural Plant Journal*, *3*(2), 67-72.
- Sharma, B., Dangi, A. K., & Shukla, P. (2018). Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review. *Journal of environmental management*, *210*, 10-22.
- Shaw, D. R., & Dussan, J. (2015). Mathematical modelling of toxic metal uptake and efflux pump in metal-resistant bacterium *Bacillus cereus* isolated from heavy crude oil. *Water, Air, & Soil Pollution*, *226*(4), 1-14.
- Siddiquee, S., Aishah, S. N., Azad, S. A., Shafawati, S. N., & Naher, L. (2013). Tolerance and biosorption capacity of Zn $^{2+}$, Pb $^{2+}$, Ni $^{3+}$ and Cu $^{2+}$ by filamentous fungi (*Trichoderma harzianum*, *T. aureoviride* and *T. virens*).
- Siddiquee, S., Shafawati, S. N., & Naher, L. (2017). Effective composting of empty fruit bunches using potential *Trichoderma* strains. *Biotechnology reports*, *13*, 1-7.
- Singh, P. K., & Vijay, K. (2011). Biological control of *Fusarium* wilt of *Chrysanthemum* with *Trichoderma* and botanicals. *Journal of Agricultural technology*, *7*(6), 1603-1613.
- Srivastava, P. K., Vaish, A., Dwivedi, S., Chakrabarty, D., Singh, N., Tripathi, R. D. (2011). Biological removal of arsenic pollution by soil fungi. *Sci Tot Environ*, *409*, 2430-2442.
- Sun, Z. B., Li, S. D., Ren, Q., Xu, J. L., Lu, X., & Sun, M. H. (2020). Biology and applications of *Clonostachys rosea*. *Journal of applied microbiology*, *129*(3), 486-495.
- Tall, S., & Meyling, N. V. (2018). Probiotics for plants? Growth promotion by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* depends on nutrient availability. *Microbial ecology*, 1-7.

- Tejada, M., Benítez, C., Gómez, I., & Parrado, J. (2011). Use of biostimulants on soil restoration: Effects on soil biochemical properties and microbial community. *Applied Soil Ecology*, 49, 11-17.
- Tripathi, P., Singh, P. C., Mishra, A., Chauhan, P. S., Dwivedi, S., Bais, R. T., & Tripathi, R. D. (2013). *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean up. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 15(4), 541-550.
- Troncozo, M. I., Lješević, M., Beškoski, V. P., Anđelković, B., Balatti, P. A., & Saparrat, M. C. (2019). Fungal transformation and reduction of phytotoxicity of grape pomace waste. *Chemosphere*, 237, 124458.
- Tu, S., Ma, L., & Luongo, T. (2004). Root exudates and arsenic accumulation in arsenic hyperaccumulating *Pteris vittata* and non hyperaccumulating *Nephrolepis exaltata*. *Plant Soil*, 258, 9-19.
- Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M., & Lorito, M. (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular plant pathology*, 12(4), 341-354.
- Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231-241.
- Ugolini, L. (2017). High Added-Value Products from Industrial Crop Biomass: Uses in the Agro-Food Sector.
- Ugolini, L., Cinti, S., Righetti, L., Stefan, A., Matteo, R., & D'Avino, L., (2015). Production of an enzymatic protein hydrolyzate from defatted sunflower seed meal for potential application as a plant biostimulant. *Ind. Crops Prod.*, 75, 15-23. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.11.026
- Unger, P. W. (1994). Managing agricultural residues. CRC Press.
- Usmani, Z., Sharma, M., Karpichev, Y., Pandey, A., Kuhad, R. C., Bhat, R., ... & Gupta, V. K. (2020). Advancement in valorization technologies to improve utilization of bio-based waste in bioeconomy context. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131, 109965.
- van der Geize, R., & Dijkhuizen, L. (2004). Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Current opinion in microbiology*, 7(3), 255-261.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 503-549.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Bravo, V., Fernández-Serrano, M., & Nikolaeva, I. (2007). Simultaneous phytase production and rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on dry olive wastes. *Industrial Crops and Products*, 26(3), 332-336.
- Vassileva, M., Serrano, M., Bravo, V., Jurado, E., Nikolaeva, I., Martos, V., & Vassilev, N. (2010). Multifunctional properties of phosphate-solubilizing microorganisms grown on agro-industrial wastes in fermentation and soil conditions. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(5), 1287-1299.
- Velis, C. A. (2015). Circular economy and global secondary material supply chains. *Waste Management and Research*, 33(5), 389-391.
- Verdin, A., Sahraoui, A. L., & Durand, R. (2004). Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *Int Biodeterior Biodegrad*, 53, 65-70
- Verma, N., & Sharma, R. (2017). Bioremediation of toxic heavy metals: a patent review. *Recent patents on biotechnology*, 11(3), 171-187.

- Vidali, M. (2001). Bioremediation. an overview. *Pure and applied chemistry*, 73(7), 1163-1172.
- Vig, A. P., & Walia, A. (2001). Beneficial effects of *Rhizopus oligosporus* fermentation on reduction of glucosinolates, fibre and phytic acid in rapeseed (*Brassica napus*) meal. *Bioresource technology*, 78(3), 309-312.
- Viji, G., Baby, U. I., & Manibushan, R. K. (1993). Induction of fungicidal resistance in *Trichoderma* spp. through UV irradiation. *Indian J Microbiol*, 33, 125-129.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biol Biochem*. 40, 1-10.
- Vinale, F., & Sivasithamparam, K. (2020). Beneficial effects of *Trichoderma* secondary metabolites on crops. *Phytotherapy Research*, 34(11), 2835-2842.
- Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., ... & Woo, S. L. (2013). Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS microbiology letters*, 347(2), 123-129.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Woo, S., & Lorito, M. (2012). *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. *Natural product communications*, 7(11).
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Woo, S. L., Nigro, M., Marra, R., ... & Lorito, M. (2014). *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal*, 8(1).
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., ...& Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72, 80-86.
- Visconti, D., Fiorentino, N., Stinca, A., Di Mola, I., & Fagnano, M. (2018). Use of the native vascular flora for risk assessment and management of an industrial contaminated soil. *Ital. J. Agron*, 13(s1), 23-33.
- Viterbo, A., Wiest, A., Brotman, Y., Chet, I. & Kenerley, C. (2007). The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Molecular Plant Pathology*, 8(6), 737-746.
- Vivas, A., Moreno, B., Garcia-Rodriguez, S., & Benitez, E. (2009). Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresource Technology*, 100(3), 1319-1326.
- Vuorela, S., Meyer, A. S., & Heinonen, M. (2004). Impact of isolation method on the antioxidant activity of rapeseed meal phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 8202-8207.
- Wang, B., Liu, L., Gao, Y., & Chen, J. (2009). Improved phytoremediation of oilseed rape (*Brassica napus*) by *Trichoderma* mutant constructed by restriction enzyme-mediated integration (REMI) in cadmium polluted soil. *Chemosphere*, 74, 1400-1403
- Wang, R., Shaarani, S. M., Godoy, L. C., Melikoglu, M., Vergara, C. S., Koutinas, A., & Webb, C. (2010). Bioconversion of rapeseed meal for the production of a generic microbial feedstock. *Enzyme and Microbial Technology*, 47(3), 77-83.
- Wardle, D. A., Parkinson, D., & Waller, J. E. (1993). Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. *Oecologia*, 94(2), 165-172.
- Waste and Resources Action Programme (2008). Research into consumer behaviour in relation to food dates and portion sizes. October.

- Waste and Resources Action Programme (2009). Down the Drain.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Woo, S. L., & Lorito, M. (2007). Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In *Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management* (pp. 107-130). Springer, Dordrecht.
- Woo, S. L., & Pepe, O. (2018). Microbial consortia: promising probiotics as plant biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in plant science*, 9, 1801.
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., ... & Lorito, M. (2014). *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal*, 8(1).
- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M., & Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96(2), 181-185.
- Xu, L., & Geelen, D. (2018). Developing biostimulants from agro-food and industrial by-products. *Frontiers in plant science*, 9, 1567.
- Yangui, T., Rhouma, A., Triki, M. A., Gargouri, K., & Bouzid, J. (2008). Control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* using olive mill waste water and some of its indigenous bacterial strains. *Crop Protection*, 27(2), 189-197.
- Yao, D., Ji, Z., Wang, C., Qi, G., Zhang, L., Ma, X., & Chen, S. (2012). Co-producing iturin A and poly- γ -glutamic acid from rapeseed meal under solid state fermentation by the newly isolated *Bacillus subtilis* strain 3-10. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 985-991.
- Yazdani, M., Yap, C. K., Abdullah, F., & Tan, S. G. (2010). An *in vitro* study on the adsorption, absorption and uptake capacity of Zn by the bioremediator *Trichoderma atroviride*. *Environment Asia*, 3(1), 53-59.
- Yeoman, K. H., & Edwards, C. (1994). Protease production by *Streptomyces thermovulgaris* grown on rapemeal-derived media. *Journal of applied bacteriology*, 77(3), 264-270.
- Zaccardelli, M., Vilecco, D., Celano, G., & Scotti, R. (2013). Soil amendment with seed meals: Short term effects on soil respiration and biochemical properties. *Applied soil ecology*, 72, 225-231.
- Zafar, S., Aqil, F., & Ahmad, I. (2007). Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource technology*, 98(13), 2557-2561.
- Zafra G, Absalon AE, Cortés-Espinosa DV (2015b) Morphological changes and growth of filamentous fungi in presence of high concentrations of PAHs. *Braz J Microbiol* 46:937-94
- Zeng, X., Su, S., Jiang, X., Li, L., Bai, L., & Zhang, Y. (2010). Capability of pentavalent arsenic bioaccumulation and biovolatilization of three fungal strains under laboratory conditions. *Clean: Soil, Air, Water*, 38, 238-241
- Zhang, K., Wang, S., Guo, P., & Guo, S. (2021). Characteristics of organic carbon metabolism and bioremediation of petroleum-contaminated soil by a mesophilic aerobic biopile system. *Chemosphere*, 264, 128521.

- Zhou, X., Xu, S., Liu, L., Chen, J. (2007). Degradation of cyanide by *Trichoderma mutants* constructed by restriction enzyme mediated integration (REMI). *Biores Technol*, 98, 2958-2962

Ringraziamenti

Al termine di questo percorso vorrei ringraziare tutti coloro che mi sono stati vicini e hanno condiviso con me questa avventura.

La Prof.ssa Woo che mi ha accolto a braccia aperte guidandomi nell'attività di ricerca e nella stesura della tesi con cura e gentilezza, allo stesso tempo con determinazione e professionalità e, soprattutto, sempre con un sorriso.

La Dott.ssa Lanzuise per avermi accompagnato passo dopo passo in questo percorso donandomi il suo tempo e le sue conoscenze con generosità e dedizione, sostenendomi nei momenti difficili senza esitazione.

La Prof.ssa Hermosa e il Prof. Monte per avermi ospitato a Salamanca e fatto sentire a casa sin da subito e avermi dato l'opportunità di vivere un'esperienza indimenticabile.

Il Dott. Vinale e la Dott.ssa Marra per i consigli scientifici e per la disponibilità nell'aiutarmi ogni qualvolta ne ho avuto bisogno.

Il Prof. Fagnano e il Dott. Fiorentino che mi hanno fatto amare la ricerca e sono stati sempre un punto di riferimento ed un esempio da seguire.

Tutti i colleghi dell'Edificio L, Tommaso e Salvatore per i bei momenti condivisi, i consigli e l'aiuto prezioso.

La Dott.ssa Bottiglieri per avermi supportato e sopportato con grande affetto, offrendomi la compagnia necessaria per lavorare con allegria e semplicità.

La Dott.ssa d'Errico per la sua amicizia e per avermi incoraggiato in questi anni con la sua forza e la sua determinazione.

Ringrazio i miei fratelli Marco e Maurizio e i miei amici grandi o piccini, alti o bassi, calvi o capelloni, lontani o vicini, vecchi o nuovi per volermi bene. In particolare Massimo, presente o assente, sarai sempre nel mio cuore.

Ringrazio con tutto il cuore mia mamma e mio padre per credere in me e dimostrarmi il loro amore incondizionato e il loro appoggio ogni giorno.

I miei bambini, Dario e Bruno, per essere quanto di meglio potessi pensare di ricevere in dono da questa vita, siete la mia forza e la mia più grande gioia.

David, per il sostegno e l'amore con cui mi sta vicino ogni giorno, per essermi venuta a prendere la prima volta ed accompagnarmi sempre, fino in capo al mondo.