

BIOMASSE VEGETALI E *STEAM-EXPLOSION* NELLA DIFESA FITOSANITARIA

Un'opportunità per l'efficienza energetica e la
sostenibilità ambientale in agricoltura

U. DE CORATO, F.A. CANCELLARA

ENEA – Unità Tecnica Efficienza Energetica
Servizio Agricoltura
Ufficio Territoriale di Bari, (Bari)

C. VIOLA

ENEA – Unità Tecnica Efficienza Energetica
Servizio Agricoltura
Centro Ricerche Casaccia, Roma

E. VIOLA, G. ARCIERI, F. ZIMBARDI

ENEA – Unità Tecnica Tecnologie Trisaia
Laboratorio Tecnologie e Impianti per l'Uso Energetico delle Biomasse e Solare Termico
Centro Ricerche Trisaia, Rotondella (Matera)



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

BIOMASSE VEGETALI E *STEAM-EXPLOSION* NELLA DIFESA FITOSANITARIA

Un'opportunità per l'efficienza energetica e la
sostenibilità ambientale in agricoltura

U. DE CORATO, F.A. CANCELLARA
ENEA – Unità Tecnica Efficienza Energetica
Servizio Agricoltura
Ufficio Territoriale di Bari, (Bari)

C. VIOLA
ENEA – Unità Tecnica Efficienza Energetica
Servizio Agricoltura
Centro Ricerche Casaccia, Roma

E. VIOLA, G. ARCIERI, F. ZIMBARDI
ENEA – Unità Tecnica Tecnologie Trisaia
Laboratorio Tecnologie e Impianti per l'Uso Energetico delle Biomasse e Solare Termico
Centro Ricerche Trisaia, Rotondella (Matera)

I Rapporti tecnici sono scaricabili in formato pdf dal sito web ENEA alla pagina
<http://www.enea.it/it/produzione-scientifica/rapporti-tecnici>

I contenuti tecnico-scientifici dei rapporti tecnici dell'ENEA rispecchiano l'opinione degli autori e non necessariamente quella dell'Agenzia.

The technical and scientific contents of these reports express the opinion of the authors but not necessarily the opinion of ENEA.

BIOMASSE VEGETALI E STEAM-EXPLOSION NELLA DIFESA FITOSANITARIA

Un'opportunità per l'efficienza energetica e la sostenibilità ambientale in agricoltura

U. DE CORATO, F. A. CANCELLARA, C. VIOLA, E. VIOLA, G. ARCIERI, F. ZIMBARDI

Riassunto

La soppressività manifestata da alcune fonti di biomassa vegetale ad alto contenuto ligneo celluloso pretrattata con la tecnologia di steam-explosion e normalmente utilizzata per la produzione industriale di bioetanolo di 2^a generazione, è stata dimostrata contro alcune specie di funghi fitopatogeni trasmesse attraverso il suolo mediante biosaggi condotti in vivo ed in vitro. Questa particolare attività biologica viene esercitata grazie all'effetto inibitore di molecole furaniche prodottesi dalla degradazione di sostanze zuccherine (soprattutto emicellulose) durante questo pre-trattamento. Tale soppressività può essere utilmente sfruttata in serra nella difesa fitosanitaria di specie orticole, a vantaggio di un miglioramento dell'efficienza energetica e della sostenibilità ambientale in agricoltura protetta. L'attività soppressiva delle biomasse esplose suggerisce che il loro impiego, parallelo alla tradizionale produzione di bioetanolo, potrebbe contribuire alla riduzione dei consumi di agrofarmaci e fumiganti di sintesi chimica, ottenendo così una maggiore sicurezza alimentare, una migliore salvaguardia per l'ambiente ed un incremento dell'efficienza energetica della filiera agro-chimica nei sistemi orticoli protetti dell'Italia meridionale.

Parole chiave: Bioenergia, Difesa Fitosanitaria delle Colture, Efficienza Energetica in Agricoltura, Orticoltura, Substrati Soppressivi

Summary

The suppressive activity of some vegetable biomass sources at high lingo-cellulosic content pre-treated by steam-explosion technology for the 2nd generation bio-ethanol industrial production against soil-borne fungal diseases, has been demonstrated through bioassays carried out in vivo and in vitro. This particular biological activity depends on by the inhibitor effect of furanic molecules produced through a degradation of sugary substances (i. e. hemicelluloses) during the steam-explosion treatment. The suppressive effect could be usefully employed in the horticultural crop protection for the improvement of the environmental sustainability and energy efficiency in a protected agriculture. A suppressive activity of the steam exploded biomasses suggests that the use of synthetic fungicides and fumigants could be very limited in horticulture under greenhouse conditions. The employment of the biomasses pre-treated by steam-explosion could be useful to improve human health, environmental safety and energy efficiency in the agro-chemical chain of the South Italian horticultural systems.

Key words: Bio-energy, Crop Protection, Energy Efficiency in Agriculture, Horticulture, Suppressive substrates

INDICE

INTRODUZIONE	7
CENNI DI METODOLOGIA SPERIMENTALE	11
STUDIO DELL'INIBIZIONE <i>IN VITRO</i>	11
STUDIO DELL'INIBIZIONE <i>IN VIVO</i>	12
RISULTATI	13
INIBIZIONE <i>IN VITRO</i>	13
INIBIZIONE <i>IN VIVO</i>	16
DISCUSSIONE	19
CONCLUSIONI	21
BIBLIOGRAFIA	23

Introduzione

In ambito energetico, la biomassa è qualsiasi sostanza organica, di origine vegetale o animale, da cui sia possibile ricavare energia attraverso un impiego diretto o previo processo di conversione. La biomassa vegetale, ovvero ogni sostanza organica di origine biologica in forma non fossile prodotta dalla fotosintesi, può provenire da colture erbacee o arboree coltivate specificatamente per la produzione di energia (colture energetiche), dai prelievi di legna dai boschi, dai residui delle operazioni selvicolturali e agricole, dalle segherie, dalle industrie del legno e dal comparto agroindustriale. La biomassa vegetale può essere utilizzata tal quale per produrre energia termica ed elettrica, oppure trasformata in biocombustibili. Le biomasse vegetali rappresentano quindi la forma più sofisticata di accumulo dell'energia solare mediante il processo di fotosintesi. I vegetali sono in grado di convertire l'energia radiante in energia chimica, stoccandola sotto forma di molecole complesse ad elevato contenuto energetico come carboidrati, lignina, proteine e lipidi. A livello globale, in questo modo vengono fissate complessivamente circa 2×10^{11} tonnellate di carbonio all'anno, con un contenuto energetico equivalente a 70 miliardi di tonnellate di petrolio, circa 10 volte l'attuale fabbisogno energetico mondiale. Per tale motivo la biomassa è considerata un "vettore energetico" rinnovabile praticamente inesauribile, se opportunamente utilizzato, qualora il suo ritmo di impiego non superi la capacità di rigenerazione. In realtà le biomasse non sono illimitate, ma la loro disponibilità dipende dalla superficie ad essa destinata, nonché dalle condizioni climatiche ed ambientali che tendono a limitare la crescita delle specie in modo conveniente ed economico. L'utilizzo a fini energetici delle biomasse vegetali può essere vantaggioso quando queste si presentano concentrate nello spazio e disponibili con sufficiente continuità nell'arco dell'anno, al contrario, un'eccessiva dispersione sul territorio o una troppo concentrata stagionalità delle produzioni rendono più difficili e onerose le operazioni di raccolta, trasporto e stoccaggio. Le biomasse impiegate a fini energetici sono disponibili in varie forme che vengono tipicamente suddivise in funzione del comparto di provenienza (Vivoli *et al.*, 2008).

La conversione energetica delle biomasse vegetali per via biochimica porta alla produzione di biocombustibili gassosi (biogas) e liquidi (biodiesel e bioetanolo). Il Comitato Scientifico dell'Agenzia Europea dell'Ambiente sostiene però che l'uso dei biocombustibili in realtà aumenta, anziché diminuire, le emissioni di CO₂ in atmosfera, salvo nei casi in cui la coltivazione delle colture energetiche sia limitata a terreni agricoli marginali od incolti (Ciccarese, 2011).

In particolare, il bioetanolo di 2^a generazione può essere prodotto utilizzando biomasse ricche in cellulosa ed emicellulose, come le colture erbacee annuali e poliennali da fibra (miscanto, canna comune, panico, sorgo, cardo), le colture legnose a breve e/o a brevissimo ciclo di rotazione (pioppo, eucalipto, salice, robinia), i residui e sottoprodotti del comparto agro-silvo-forestale (paglia di grano, stocchi di mais, lolla di riso, residui legnosi di potatura). L'impiego di queste fonti vegetali, più diffuse ed economiche rispetto alle tradizionali colture energetiche, prefigura una valida possibilità di sviluppo della filiera del bioetanolo soprattutto laddove tali colture non riescono da sole a garantire alti livelli di produttività (Barisano *et al.*, 2001). Dei principali componenti della biomassa ligneo-cellulosica, soltanto la cellulosa e le emicellulose sono costituite da zuccheri fermentabili che possono essere utilizzati per la produzione industriale di etanolo; pertanto, uno dei punti più critici è la separazione fisica della cellulosa e delle emicellulose dalla lignina. Questo risultato viene egregiamente perseguito attraverso l'impiego di una particolare tecnologia di pretrattamento, la cosiddetta *steam-explosion* (Ballerini *et al.*, 1994). Tale tecnologia è stata già utilizzata per la produzione di etanolo da varie tipologie di biomasse ligneo-cellulosiche ed in particolare dalla paglia di grano (Ricci *et al.*, 2001).

La *steam-explosion* è un processo idrotermico tecnologicamente avanzato a basso impatto ambientale, mediante il quale è possibile ottenere una vasta gamma di prodotti utilizzando biomasse vegetali. Queste, attraverso l'impiego di vapore saturo ad alta pressione (15-30 kg/cm²), vengono riscaldate rapidamente all'interno di appositi reattori nei quali si realizza la separazione delle emicellulose, cellulosa e lignine. Nel processo di *steam-explosion* il materiale organico viene mantenuto alla temperatura desiderata (da 180 a 230 °C) per un breve periodo (da 1 a 10 minuti) nel corso del quale l'emicellulosa viene idrolizzata e resa solubile. Alla fine, la pressione viene rapidamente riportata al valore atmosferico ottenendo una decompressione esplosiva che sfibra ulteriormente la biomassa liberandone gli elementi costituenti (Fig. 1).

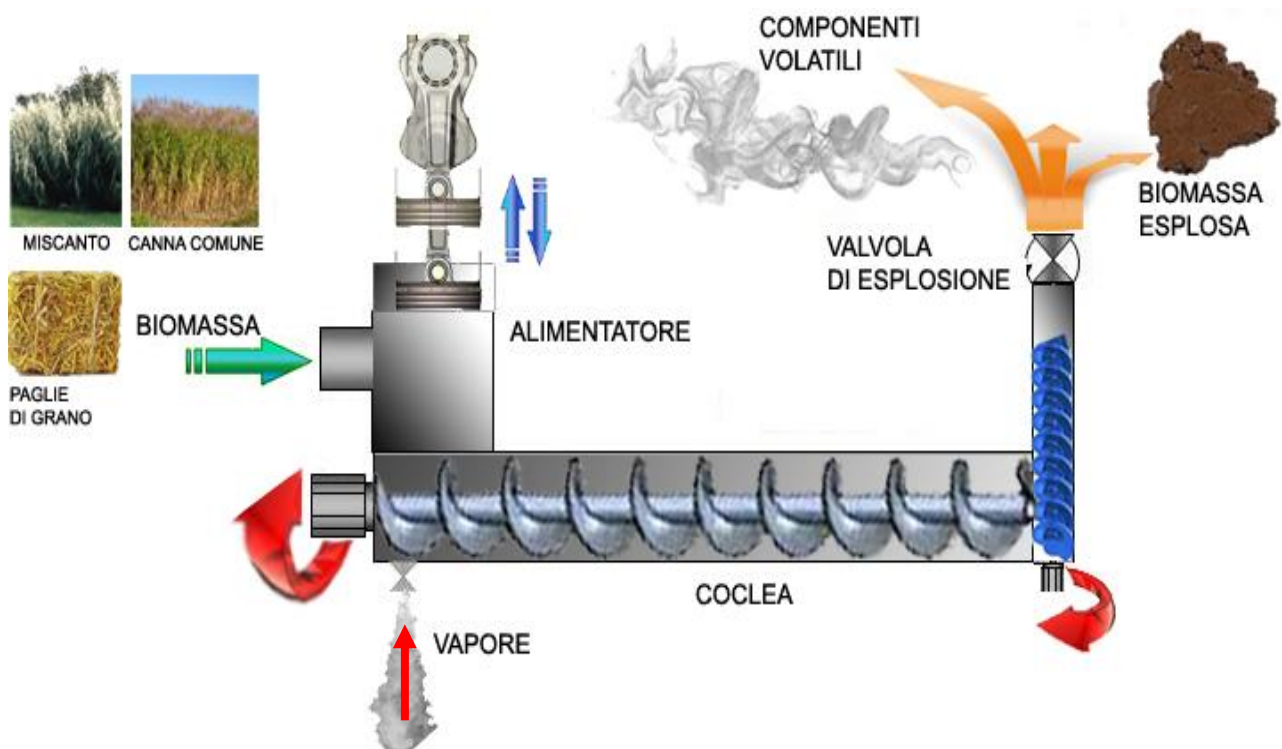


Fig. 1 – Schema di processo della *steam-explosion* per il pre-trattamento delle biomasse vegetali

La diversa severità dei parametri di processo adottati, temperatura e tempo di residenza nel reattore, ne condiziona le caratteristiche chimico-fisiche e la qualità finale della biomassa esplosa. Nel Centro Ricerche ENEA della Trisaia esiste un impianto pilota (ST.E.LE. – STeam Explosion LEgno), uno dei più importanti al Mondo, in cui vi si possono trattare a ciclo continuo fino a 250-300 kg/h di biomassa (Fig. 2).



Fig. 2 – Impianto ST.E.LE. del Centro Ricerche ENEA della Trisaia

Con la *steam-explosion* si garantisce un'utilizzazione totale delle biomasse ottenendo sia prodotti direttamente commerciabili (pasta da carta, pannelli in fibra, mangimi, ecc.), che composti utilizzabili in molteplici settori (autotrazione, industrie tessili, dolciarie e della chimica di base). L'emicellulosa, ad esempio, può essere usata per produrre dolcificanti (xylitolo) o solventi; la cellulosa è impiegata come materia prima nella preparazione della carta, delle fibre tessili o come substrato fermentabile per la produzione di alcoli; dalla lignina si può ottenere sia energia termica che svariati bio-polimeri, come gli asfalti o le fibre di carbonio.

Durante osservazioni condotte in ENEA nel 1994-1995 presso una fungaia commerciale di pleuroto e cardoncello della provincia di Matera con lo scopo di valutare l'effetto ammendante della biomassa esplosa ottenuta da alcune colture energetiche (kenaf, sorgo, miscanto) sulla produttività della fungaia, si evidenziò inaspettatamente un netto decremento produttivo, sia in termini quantitativi che in quelli qualitativi. L'osservazione portò all'intuizione che nei substrati esplosi utilizzati come ammendanti vi fosse qualche sostanza che interferiva negativamente sia con la crescita miceliare e sia con la produzione in carpofori di queste due specie di funghi coltivati (De Corato, dati inediti non pubblicati).

Una successiva fase di studio dell'ENEA evidenziò la presenza di acidi organici e di molecole furaniche nei substrati esplosi, le cui quantità dipendevano sia dal tipo di biomassa trattata che dalla severità del trattamento di *steam-explosion* adottata (Zimbardi *et al.*, 2007). Era anche noto che alcune di queste sostanze, ed in particolare gli acidi acetico e formico, i lignosulfonati, la 2-furaldeide e il 5-idrossimetilfurfurale, possedevano marcate attività antimicrobiche verso alcune specie di lieviti alcoligeni (*Saccaromyces cerevisiae* e *Pichia stipis*) comunemente utilizzati nei sistemi industriali di fermentazione per la produzione di bioetanolo di 2^a generazione (Cuna *et al.*, 2004; De Bari *et al.*, 2004).

E' stata quindi avviata nel 2008 un'ampia sperimentazione, sia *in vivo* che *in vitro*, volta a dimostrare l'esistenza di un'attività inibitrice/soppressiva esercitata da alcuni tipi di biomassa esplosa, ottenuta con un pre-trattamento della biomassa fresca e/o essiccata di alcune colture energetiche in sperimentazione presso il Centro ENEA della Trisaia, verso una collezione di funghi patogeni di specie ortive particolarmente dannosi nelle serre in Puglia e Basilicata e trasmessi normalmente attraverso il suolo (*soil-borne*).

Da una valutazione agro-bio-energetica della possibilità di diffondere e di affermare la coltivazione di colture energetiche in aree aride, semi-aride e marginali dell'Italia meridionale per la loro conversione in bioetanolo (Pari, 2011), si è ritenuto utile prendere in considerazione per questa sperimentazione i seguenti tipi di biomassa esplosa, proveniente da:

- 1) coltivazioni sperimentali di miscanto o *Miscanthus sinensis* × *giganteus* (Fig. 3),
- 2) coltivazioni sperimentali di canna comune o *Arundo donax* (Fig. 3),
- 3) residui colturali di paglia di grano reperiti presso aziende agricole locali.



Fig. 3 – Coltivazioni di miscanto e di canna comune effettuate presso i campi sperimentali del Centro Ricerche ENEA della Trisaia

Queste biomasse, raccolte nella loro forma “nativa”, ovvero fresca e/o essiccata, sono state prima sottoposte ad un pre-trattamento di *steam-explosion* condotto a 207° C per 6 minuti per ottenerne i rispettivi esplosi (Fig. 4), e successivamente gli stessi utilizzati nelle prove sperimentali in serra oggetto del presente Rapporto Tecnico.



Fig. 4 – Esplosi ottenuti con un pre-trattamento di *steam-explosion* della biomassa nativa a 207 °C per 6 minuti

Di seguito sono riassunti i risultati di questa sperimentazione, ed indicate alcune implicazioni su un possibile impiego “innovativo” della biomassa esplosa di miscanto, canna comune e paglia di grano come ammendanti nella protezione integrata di colture ortive praticate in sistemi serra ad elevata efficienza energetica in Puglia e Basilicata.

Le biomasse vegetali potrebbero rappresentare dunque non solo una fonte di energia rinnovabile per la produzione di energia e di etanolo, ma anche un’opportunità per l’implementazione di un approccio innovativo finalizzato al miglioramento dell’efficienza energetica e della sostenibilità ambientale della filiera agro-chimica dell’agricoltura protetta in Italia Meridionale.

Cenni di metodologia sperimentale

Studio dell’inibizione *in vitro*

Nel 2008-2009 sono stati condotti biosaggi *in vitro* presso i Laboratori Agrobiotecnologici dell’ENEA di Trisaia, valutando quantitativamente l’entità dell’effetto inibitore della 2-furaldeide e del 5-idrossimetilfurfurale su sette specie di funghi patogeni di specie ortive da serra trasmesse attraverso il suolo (*Pythium ultimum*, *Phytophthora nicotianae*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*) le cui colonie pure sono rappresentate nelle Figure 5 e 6.

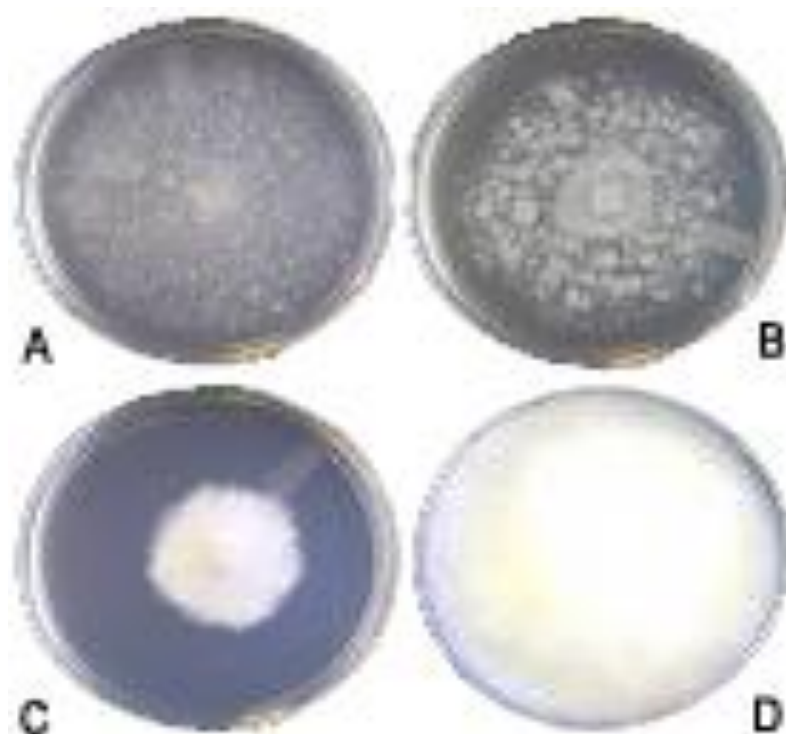
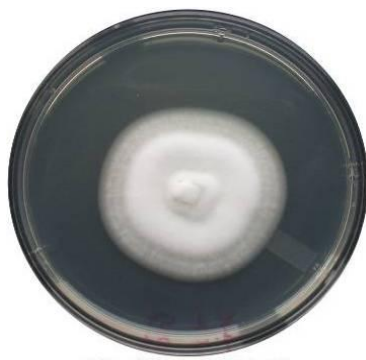


Fig. 5 – Colonie pure di *Phytophthora nicotianae* a diversi stadi di sviluppo (A: 24 ore, B: 48 ore, C: 72 ore e C: 96 ore) cresciute su substrato agarizzato di Patata-Destrosio-Agar ed utilizzate nei biosaggi *in vitro*



**COLONIA DI
VERTICILLIUM DAHLIAE**



**COLONIA DI
RHIZOCTONIA SOLANI**



**COLONIA DI
PYTHIUM ULTIMUM**



**COLONIA DI
FUSARIUM OXYSPORUM
F. SP. MELONIS**



**COLONIA DI
SCLEROTINIA
SCLEROTIORUM**



**COLONIA DI
FUSARIUM OXYSPORUM
F. SP. LACTUCAE**

Fig. 6 – Colonie pure di sei specie di funghi fitopatogeni cresciute su substrato agarizzato di Patata-Destrosio-Agar ed utilizzate nei biosaggi *in vitro*

La metodologia sperimentale adottata per l'esecuzione dei biosaggi, la valutazione analitica della percentuale dell'indice di Inibizione della Crescita Miceliare (% MGI = *Mycelial Growth Inhibition*) su substrati di crescita agarizzati a base di Patata-Destrosio-Agar ed il metodo di confronto statistico delle differenze dei dati medi di MGI sono riportati in letteratura (De Corato *et al.*, 2011).

Studio dell'inibizione *in vivo*

Nel 2010-2012 le ricerche sono state estese con la conduzione di saggi di patogenicità eseguiti *in vivo* presso serre ad elevata efficienza energetica della Facoltà di Agraria dell'Università di Bari, messe gentilmente a disposizione del Servizio di Efficienza Energetica in Agricoltura dell'ENEA di Bari, con lo scopo di valutare quantitativamente l'entità dell'effetto soppressivo delle biomasse esplose di miscanto, canna comune e paglia di grano, ottenute con un pretrattamento di *steam-explosion* a 207 °C per 6 minuti utilizzando l'impianto ST.E.LE.

L'attività soppressiva di queste biomasse è stata saggiata in serra mediante l'allestimento di prove di patogenicità considerando sette sistemi pianta/fungo molto importanti per l'orticoltura pugliese e lucana (cetriolo/*P. ultimum*, pomodoro/*P. nicotianae*, fagiolo/*R. solani*, finocchio/*Sclerotinia sclerotiorum*, melanzana/*Verticillium dahliae*, melone/*F. oxysporum* f. sp. *melonis* e lattuga/*F. oxysporum* f. sp. *lactucae*). Tale attività biologica è stata confrontata con quella di un compost commerciale, comunemente usato come ammendante nei substrati orto-floro vivaistici, in possesso di note proprietà soppressive verso alcune specie di funghi fitopatogeni del suolo (Pugliese *et al.*, 2011).

Ciascun substrato (esplosi di miscanto, canna comune, paglia di grano e compost) è stato saggiato in miscelazione con la torba a tre dosi crescenti (10, 20 e 30% peso/peso), previa disinfestazione della miscela torba/substrato con calore umido a 130° C per tre ore e successiva inoculazione della stessa con ceppi virulenti di ciascun fungo patogeno.

La metodologia sperimentale adottata per l'esecuzione delle prove di patogenicità in serra, la valutazione analitica della percentuale dell'Indice di Soppressione della Malattia (% DSI = *Disease Suppressive Index*) ed il metodo di confronto statistico dei dati medi delle differenze di DSI sono riportati in letteratura (De Corato *et al.*, 2011).

Risultati

Inibizione *in vitro*

La tabella 1 riporta i valori medi percentuale dell'indice di Inibizione della Crescita Miceliare (% MGI) in relazione a concentrazioni crescenti di 2-furaldeide (variabile da 0.2 a 3.2 g/l) e 5-idrossimetilfurfurale (variabile da 0.03 a 0.48 g/l) aggiunti al substrato di coltura, distinti per ciascun inibitore e per ogni specie fungina. Le lettere che seguono ogni valore rappresentano la significatività statistica delle differenze fra le medie della % MGI, analizzata secondo il test di Tukey HSD per una probabilità $P < 0.05$. Inoltre, nei casi di inibizione totale di crescita del micelio (MGI = 100%), è stato distinto un effetto meramente fungistatico (inibizione temporanea della crescita del fungo) da uno fungicida vero e proprio (inibizione permanente, ovvero la morte del fungo) esercitato dagli inibitori e valutato in piastra mediante saggi biologici specifici (De Corato *et al.*, 2011).

I risultati riportati nella tabella 1 mostrano livelli statisticamente elevati di inibizione della crescita del micelio di cinque fra i sette funghi considerati a seguito dell'aggiunta nel substrato di crescita della 2-furaldeide e del 5-idrossimetilfurfurale agli intervalli di concentrazioni considerati. In particolare, *P. ultimum*, *P. nicotianae*, *V. dahliae*, *S. sclerotiorum* e *R. solani* mostrano rispettivamente livelli di inibizione del 100, 100, 100, 88 e 82% a seguito dell'aggiunta di 3.2 g/l di 2-furaldeide; e del 100, 100, 100, 95 e 91% conseguenti all'aggiunta di 0.48 g/l di 5-idrossimetilfurfurale. Dalla stessa tabella si evince che gli altri due funghi (*F. oxysporum* f. sp. *melonis* e *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*) evidenziano, al contrario, una ridotta sensibilità all'effetto inibitore di entrambi i furfurali.

Inoltre, l'aggiunta di 5-idrossimetilfurfurale alla concentrazione di 0.48 g/l determina un effetto fungicida su *P. ultimum*, *P. nicotianae* e *V. dahliae*; viceversa la 2-furaldeide induce un analogo effetto solo su *P. ultimum* alla concentrazione di 3.2 g/l, mentre per i due restanti funghi si osserva solo un effetto fungistatico.

Un impatto visivo sull'inibizione dovuta all'aggiunta di 2-furaldeide e di 5-idrossimetilfurfurale a tre diverse concentrazioni sulla crescita in piastra di colonie fungine-test in substrati agarizzati artificialmente contaminati dai due furfurali, è documentato dalla Figura 7.

P. nicotianae



P. ultimum



R. solani



Fig. 7 – Effetto inibitore della 2-furaldeide e del 5-idrossimetilfurfurale sulla crescita in piastra dei patogeni *P. nicotianae*, *P. ultimum* e *R. solani* in presenza di tre livelli di concentrazione (piastre in alto) rispetto al proprio controllo cresciuto in assenza di furfurali

Concentrazione di inibitori (g/l)	<i>P. ultimum</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>
2-furaldeide							
0.2	0 e	0 e	0 e	0 d	0 e	0 b	0 b
0.4	38 d	31 d	35 d	21 c	19 d	0 b	0 b
0.8	57 c	46 c	49 c	28 c	30 c	11 b	8 b
1.6	78 b	64 b	85 b	61 b	67 b	32 a	28 a
3.2	100 a**	100 a*	100 a*	82 a	88 a	38 a	33 a
5-idrossimetilfurfurale							
0.03	0 e	0 e	0 e	0 e	0 d	0 b	0 b
0.06	46 d	25 d	51 d	34 d	42 c	0 b	0 b
0.12	64 c	57 c	71 c	54 c	49 c	9 b	7 b
0.24	82 b	79 b	85 b	73 b	72 b	27 a	28 a
0.48	100 a**	100 a**	100 a**	91 a	95 a	31 a	37 a

Tab. 1 – Effetto inibitore della 2-furaldeide e del 5-idrossimetilfurfurale, aggiunti al terreno di coltura a differente concentrazione, sulla crescita miceliare in piastra di sette specie di funghi fitopatogeni

Nota: Medie dei valori di % MGI seguite da lettere differenti risultano statisticamente diverse secondo il Tukey's HSD test ($P < 0.05$).

*Attività fungistatica (inibizione temporanea della crescita del micelio, ovvero quiescenza del fungo).

**Azione fungicida (inibizione permanente della crescita del micelio, ovvero morte del fungo).

Inibizione *in vivo*

I sette istogrammi che seguono, uno per ciascun sistema pianta/fungo, riportano in ordinate i valori medi percentuale dell'Indice di Soppressione della Malattia (% DSI) in relazione alle dosi crescenti di biomassa (10, 20 e 30%), distinti per ciascuna dose saggiata e per ogni tipo di biomassa considerata (contraddistinta da colori diversi). Le lettere che sormontano ogni istogramma rappresentano la significatività statistica delle differenze fra le medie della % DSI, analizzata secondo il test di Tukey HSD per una probabilità $P < 0.05$.

I risultati ottenuti mostrano livelli di soppressione delle biomasse esplose statisticamente superiori rispetto a quelli ottenuti con il compost a tutte le dosi saggiate, ma con una significatività maggiore rilevata alla dose massima del 30%.

In particolare, la soppressività dell'esplosivo di miscanto varia dal 97% in melanzana/*V. dahliae* al 25% in lattuga/*F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, ed è significativamente maggiore in tutti i sistemi se confrontata al compost ed alla paglia di grano, ed in due sistemi se paragonata alla canna.

L'effetto soppressivo dell'esplosivo di canna comune varia da 85% in melanzana/*V. dahliae* al 18% in lattuga/*F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, ed è statisticamente superiore in cinque sistemi se confrontato a quello del compost ed alla paglia di grano.

La soppressività del compost varia dal 64% in melanzana/*V. dahliae* al 16% in lattuga/*F. oxysporum* f. sp. *lactucae*, ed è significativamente minore in tutti i sistemi se confrontata al miscanto, ed in cinque sistemi se paragonata alla canna comune.

Infine, l'effetto soppressivo dell'esplosivo di paglia di grano varia dal 45% in melanzana/*V. dahliae* al 13% in melone/*F. oxysporum* f. sp. *melonis*, ed è statisticamente minore in tutti i sistemi se confrontato a quello del miscanto, in sei sistemi se paragonato alla canna, ed in cinque sistemi rispetto a quello del compost.

Un impatto visivo sulla soppressività dovuta all'aggiunta di biomassa esplosa di miscanto e di canna comune su piantine-test di cetriolo cresciute in cassette contenenti una miscela di torba/substrato soppressivo artificialmente inoculata da *P. ultimum*, è documentato dalla Figura 8.

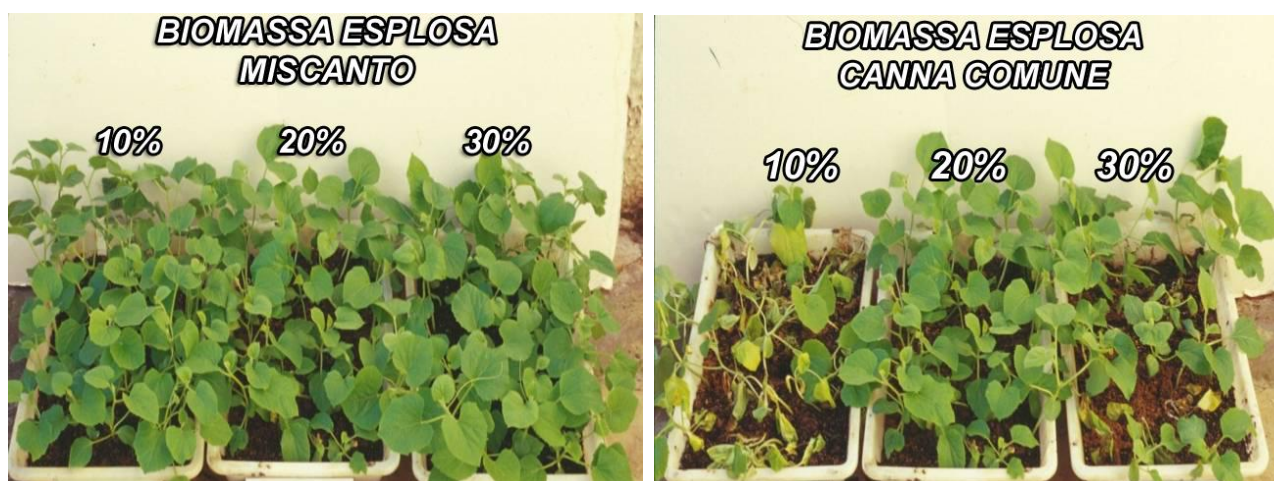
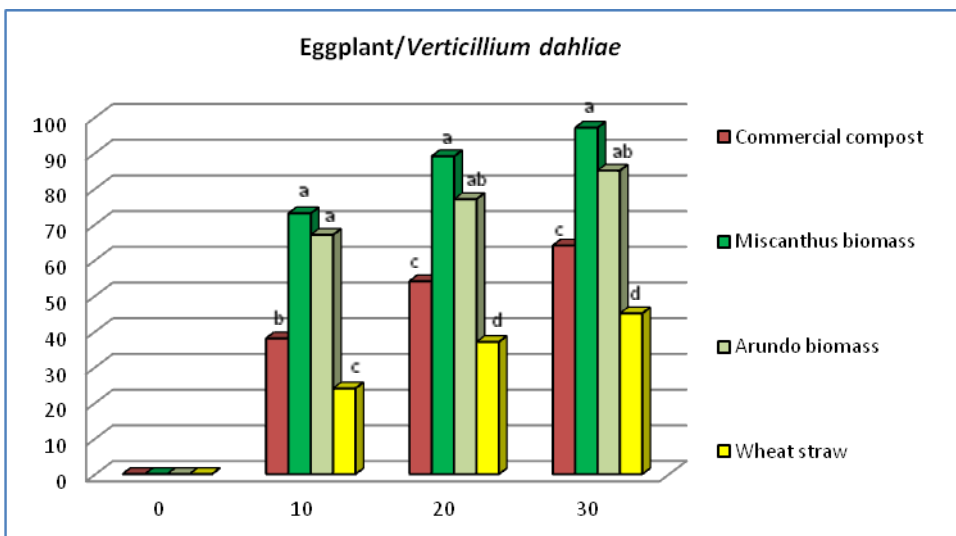
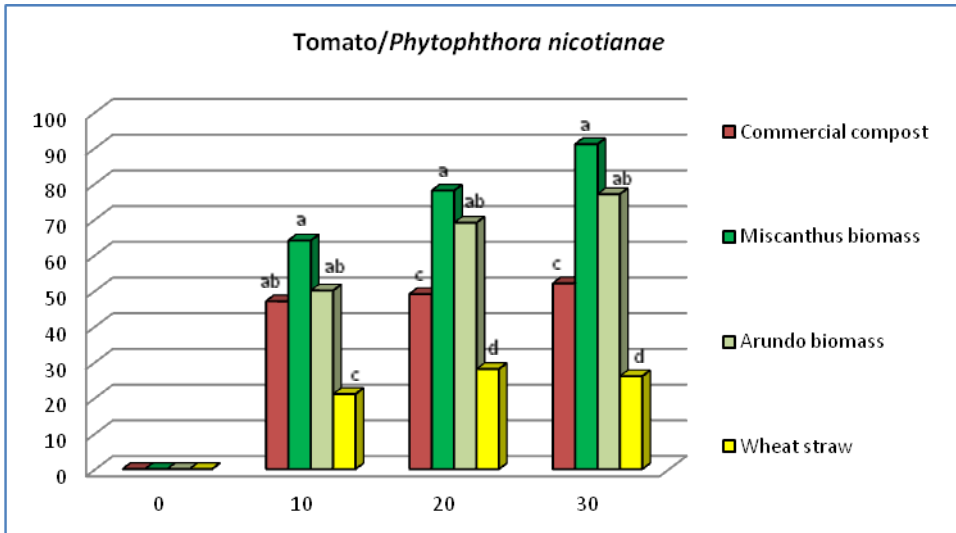
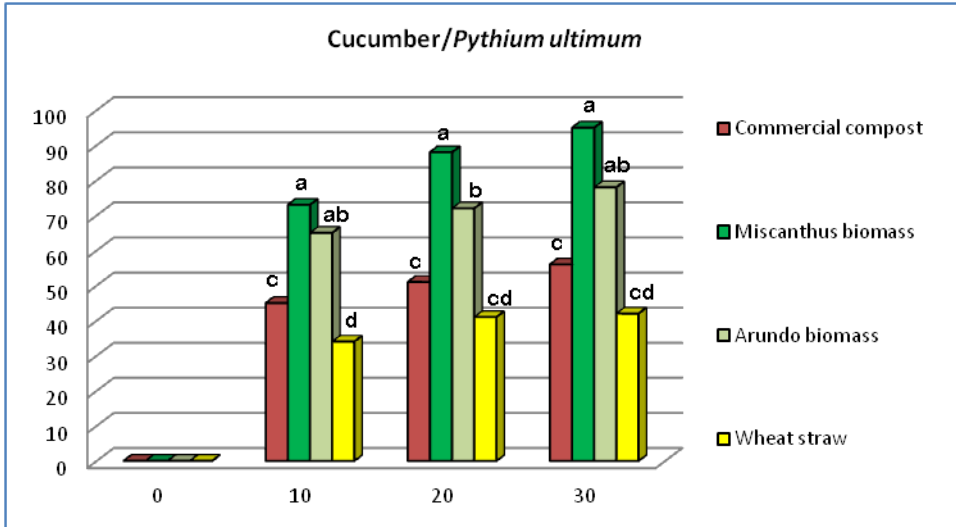
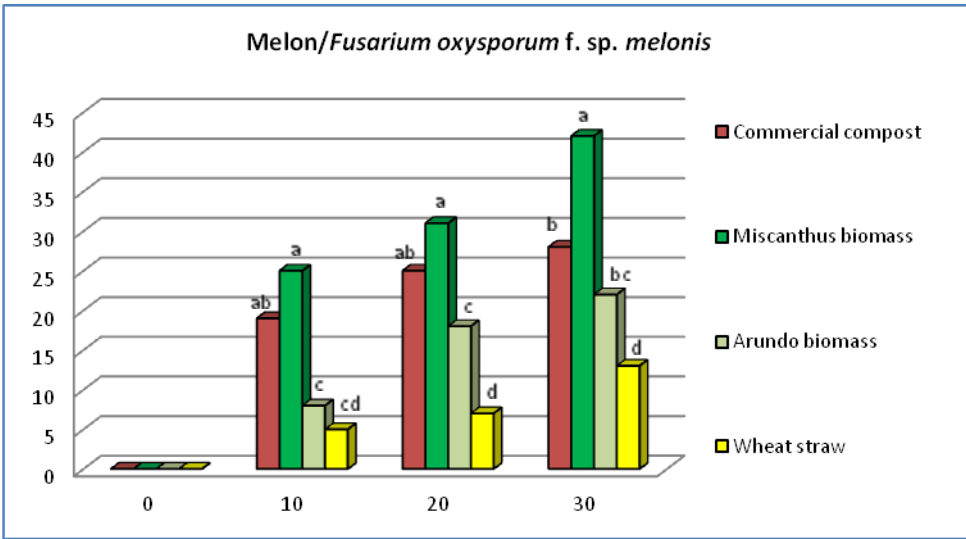
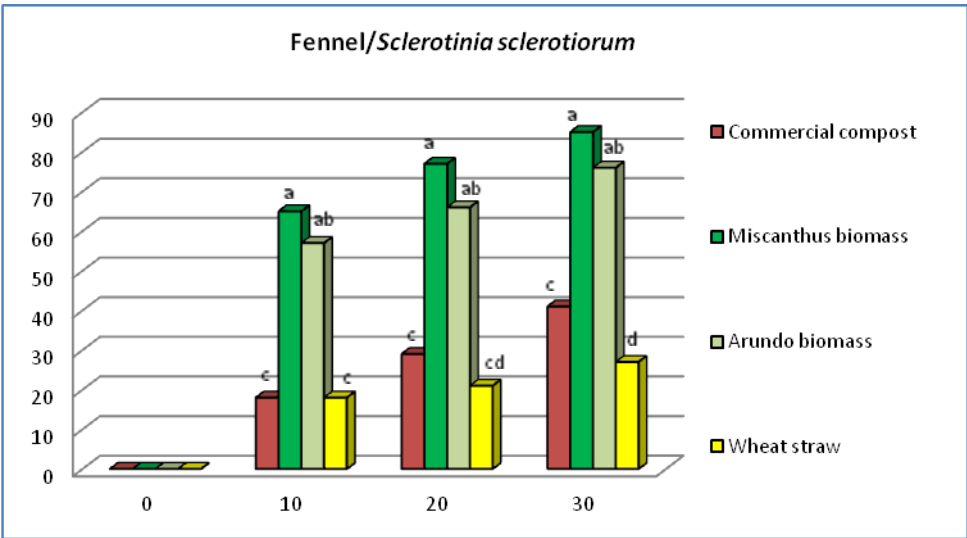
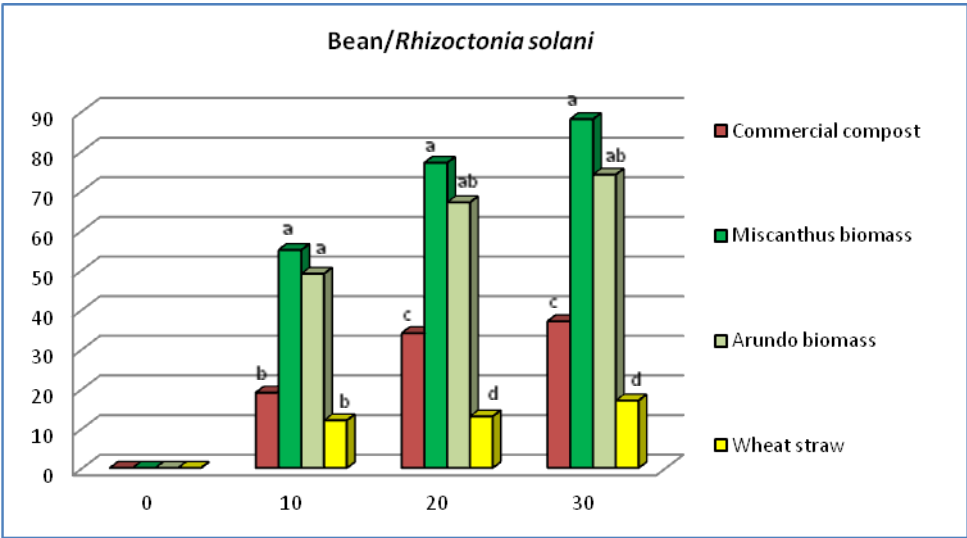
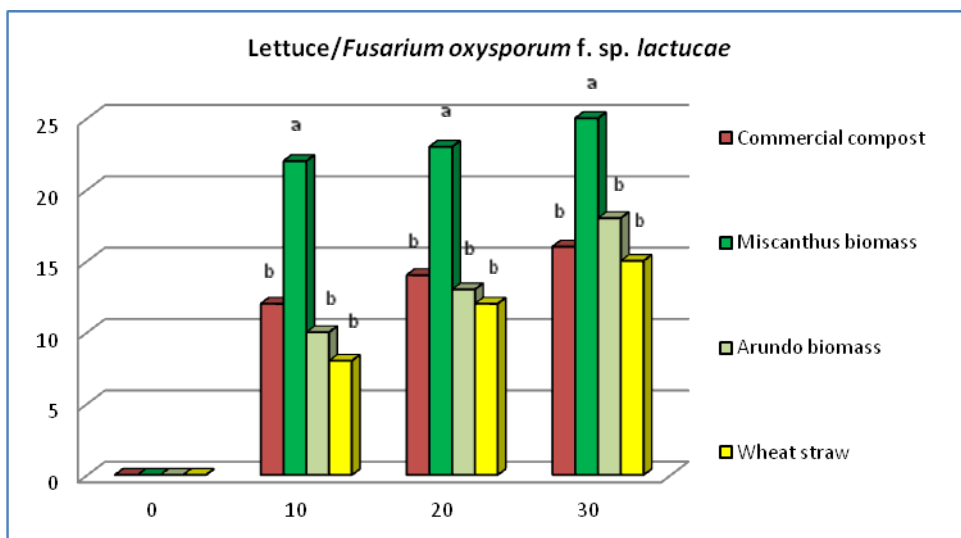


Fig. 8 – Effetto soppressivo della biomassa esplosa di miscanto e di canna comune miscelata con torba al 10, 20 e 30% (peso/peso) su piantine di cetriolo allevate in substrati infestati artificialmente con il fungo patogeno *P. ultimum*.







Nota: Medie dei valori di % DSI sormontate da lettere differenti risultano statisticamente diverse secondo il Tukey's HSD test ($P < 0.05$).

Discussione

L'insieme di queste evidenze sperimentali portano alle seguenti considerazioni.

- Le biomasse esplose di miscanto, canna comune e paglia di grano posseggono evidenti proprietà soppressive verso alcuni funghi fitopatogeni del suolo che causano malattie gravi su specie ortive coltivate in Puglia e Basilicata in serra (cetriolo, pomodoro, fagiolo, finocchio e melanzana).
- L'esplosione di miscanto risulta significativamente efficace come substrato soppressivo più di quello di canna in due sistemi (melone/*F. oxysporum* f. sp. *melonis* e lattuga/*F. oxysporum* f. sp. *lactucae*) e più del compost e dell'esplosione di paglia di grano in tutti e sette i sistemi.
- L'esplosione di canna comune risulta statisticamente efficace come substrato soppressivo più del compost in cinque sistemi (cetriolo/*P. ultimum*, pomodoro/*P. nicotianae*, fagiolo/*R. solani*, finocchio/*S. sclerotiorum* e melanzana/*V. dahliae*) e dell'esplosione di paglia di grano in sei sistemi (cetriolo/*P. ultimum*, pomodoro/*P. nicotianae*, fagiolo/*R. solani*, finocchio/*S. sclerotiorum*, melanzana/*V. dahliae* e lattuga/*F. oxysporum* f. sp. *lactucae*).
- L'esplosione di paglia di grano risulta significativamente il meno efficace come substrato soppressivo rispetto ai due precedenti in cinque sistemi (pomodoro/*P. nicotianae*, fagiolo/*R. solani*, finocchio/*S. sclerotiorum*, melanzana/*V. dahliae* e melone/*F. oxysporum* f. sp. *melonis*).
- Le proprietà soppressive dei substrati esplosi risultano quindi, limitatamente al miscanto e alla canna, statisticamente superiori rispetto a quelle del compost commerciale. L'esplosione di paglia di grano si è mostrato, viceversa, meno soppressivo anche dello stesso compost in taluni sistemi.
- Riguardo al diverso livello di sensibilità dei sistemi verso l'effetto soppressivo delle biomasse esplose, cinque di essi (cetriolo/*P. ultimum*, pomodoro/*P. nicotianae*, fagiolo/*R. solani*, finocchio/*S. sclerotiorum* e melanzana/*V. dahliae*) mostrano una maggiore vulnerabilità rispetto ai restanti due (melone/*F. oxysporum* f. sp. *melonis* e lattuga/*F. oxysporum* f. sp. *lactucae*). Questo dato è, peraltro, in accordo con quanto rilevato nei biosaggi *in vitro* sull'effetto inibitore

della 2-furaldeide e del 5-idrossimetilfurfurale su *P. ultimum*, *P. nicotianae*, *V. dahliae*, *S. sclerotiorum* e *R. solani* (Tab. 1).

Dati in corso di pubblicazione (De Corato *et al.*, 2012) circa il contenuto della 2-furaldeide e del 5-idrossimetilfurfurale nella biomassa vegetale esplosa, dimostrano che il miscanto ne contiene rispettivamente 3.41 e 3.72 mg/g, la canna comune ne possiede 1.63 e 2.38 mg/g, e nella paglia di grano ne sono presenti 1.18 e 1.44 mg/g (Tab. 2).

Tipo di biomassa esplosa	2-furaldeide (mg/g)	5-idrossimetilfurfurale (mg/g)
Miscanto	3.41	3.72
Canna comune	1.63	2.38
Paglia di grano	1.18	1.44

Tab. 2 – Composizione (mg/g) in furfurali di tre tipi di biomassa esplosa ottenuta con un pre-trattamento di steam-explosion a 207 °C per 6 minuti
(fonte: De Corato *et al.*, 2012 – dati in corso di pubblicazione)

La diversa efficacia soppressiva dei tre tipi di esplosivo verso i funghi saggiati che è stata osservata in queste prove potrebbe essere quindi messa in relazione con la diversa concentrazione di 2-furaldeide e di 5-idrossimetilfurfurale. Infatti, l'esplosivo di miscanto e canna, risultati più soppressivi rispetto all'esplosivo di grano, posseggono una maggiore concentrazione di entrambi i furfurali a parità di severità di trattamento. Viceversa, la paglia di grano, contenendo una minore concentrazione dei due furfurali, è risultata la meno soppressiva.

A tal proposito va rilevato inoltre che la formazione di furfurali negli esplosivi deriva da un complesso processo di degradazione biochimica a carico dei carboidrati presenti nella biomassa, e sembra che ciò dipenda sia dal tipo di matrice ligneo cellulosa che dai parametri di severità adottati durante la *steam-explosion* (Tanahashi, 1990).

Sebbene sia dunque difficile stabilire a priori la formazione di furfurali in termini quantitativi, tuttavia sembra che la quantità di furfurali prodottisi durante la *steam-explosion* sia correlata positivamente al contenuto di zuccheri C₅, ovvero alla quantità della frazione emicellulosica presente nella biomassa nativa a parità di severità di trattamento (Viola *et al.*, 2004).

Dati riportati in bibliografia confermano questa ipotesi, in quanto evidenziano che la biomassa nativa di miscanto contiene il 30% in peso di C₅ sulla sostanza secca, rispetto al 24% della canna comune e, a seguire, al 20% della paglia di grano (Tab. 3).

Composizione della biomassa nativa	Paglia di grano (wt_{DM} %)	Canna comune (wt_{DM} %)	Miscanto (wt_{DM} %)
Carboidrati a C₆	36	41	44
Carboidrati a C₅	20	24	30
Lignina	24	25	18
Ceneri	8	5	4
Estrattivi inazotati	8	4	3
n. d.	4	1	1

Tab. 3 – Composizione percentuale in peso sulla sostanza secca in carboidrati e lignina di tre tipi di biomassa vegetale (fonte: Viola *et al.*, 2004)

Pertanto, anche alla luce dei dati riportati nella Tabella 2 e negli istogrammi, è lecito supporre che le biomasse ligneo cellulose a più alto contenuto in emicellulose potrebbero contenere maggiori concentrazioni di furfurali a seguito di un trattamento di *steam-explosion* condotto alle stesse condizioni sperimentali. Questo potrebbe determinare un maggior effetto soppressivo verso alcuni funghi fitopatogeni del suolo delle biomasse vegetali a più alto contenuto in emicellulose rispetto a quelle contenenti una minore frazione emicellulosica.

In definitiva, la scelta:

- 1) del tipo di biomassa ligneo cellulosa da sottoporre a *steam-explosion*,
- 2) della severità del trattamento di esplosione,
- 3) del sistema pianta/patogeno “bersaglio”,

condizionano notevolmente l’effetto soppressivo globale della biomassa considerata e quindi il risultato finale rispetto ai tradizionali ammendanti (compost) e fungicidi di sintesi chimica (geodisinfestanti e fumiganti).

Le biomasse vegetali pretrattate con la *steam-explosion* possiedono, dunque, una interessante attività antifungina che potrebbe essere utilmente sfruttata come “ammendanti soppressivi” nella difesa fitosanitaria di alcune colture ortive allevate sotto serra contro alcuni funghi fitopatogeni trasmessi attraverso il suolo, come accade ad esempio per il sistema cetriolo/*P. ultimum* (Fig. 9).



Fig. 9 – Piante di cetriolo cresciute in filari contenenti miscele di torba/substrati soppressivi infestati artificialmente con il fungo patogeno *P. ultimum*

Conclusioni

Le ricerche condotte in ENEA suggeriscono quindi per un impiego “ulteriore” delle biomasse pretrattate con la *steam-explosion* nella difesa fitosanitaria di colture ortive in serra. Tale impiego non solo apporterebbe un ulteriore valore aggiunto alla *steam explosion*, tecnologia già validata e riconosciuta nel Mondo come fra le più efficaci nel pretrattamento delle biomasse vegetali, ma anche una riduzione dell’impiego di agrofarmaci di sintesi chimica nella difesa fitosanitaria in serra contro alcuni funghi fitopatogeni del suolo.

Come è noto, infatti, la FAO stima in Italia in 118 kg/ha la quantità di fertilizzanti ed agrofarmaci impiegati in agricoltura, corrispondenti a non meno di 3 tep/anno. Nella filiera agrochimica si inserisce la sotto-filiera Agricoltura Biologica con un numero di aziende “biologiche” di circa 43.159, pari al 23,5% del totale comunitario e con una superficie investita di 1.150.255 ha, pari al 16,1% della SAU biologica della UE (fonte SINAB al 31/12/2007). Per quanto riguarda le lavorazioni del terreno in colture in pieno campo di soia, grano e orzo, sperimentazioni condotte nel Nord Est dell’Italia hanno dimostrato un risparmio energetico dei trattamenti alternativi, con un rapporto output/input di energia in aumento in assetto di agricoltura conservativa e semi-

conservativa (4,18 e 4,57) rispetto a quella convenzionale (4,09). Di conseguenza, si stimerebbe una diminuzione di emissioni di CO₂ di 1.190-1.553 m³/ha × anno (Campiotti *et al.*, 2011).

Per contrastare le spese di energia da un lato, e la necessità di ridurre le emissioni di CO₂ dall'altro, per mantenere un'accettabile sostenibilità ambientale e per migliorare l'efficienza energetica dei sistemi agricoli italiani, è indispensabile sia l'introduzione di nuove tecnologie energetiche eco-compatibili, sia il ricorso ad innovative pratiche colturali e a nuovi sistemi e processi produttivi in grado di massimizzare il livello di efficienza energetica dei cicli colturali e favorire l'impiego locale delle agro-bioenergie (Campiotti *et al.*, 2011).

In questa direzione vanno per l'appunto il Decreto Legislativo del 30 Maggio 2008 n. 115 (attuazione della Direttiva 2006/32/CE), la Direttiva 20/20/20 (impiego delle energie rinnovabili che prevede per l'Italia la quota del 17% dei consumi finali di energia con risorse rinnovabile entro il 2020), il D.L. del 3 Marzo 2011 n. 28 (attuazione della Direttiva 2009/28/CE) ed il noto Protocollo di Kyoto.

L'uso di nuovi agrofarmaci tellurici e di fumiganti di sintesi chimica a basso dosaggio in grado di sostituire l'ormai vietato bromuro di metile, ampiamente utilizzato in passato per disinfestare i substrati orto-floro vivaistici, opportunamente integrato ad ammendanti soppressivi, come alcuni tipi di compost e di biomasse esplose ad elevato contenuto di emicellulose, potrebbe essere raccomandato nei nuovi piani di difesa fitosanitaria dei sistemi orticoli italiani praticati in serra. Infatti, l'impiego integrato delle biomasse vegetali esplose con i prodotti fitosanitari, come prescritto e raccomandato dalla Direttiva 2009/128/CE, potrebbe contribuire sia al miglioramento dell'efficienza energetica della filiera agro-chimica, sia alla riduzione dell'impatto da residui di agrofarmaci sia nell'ambiente che sulla salute del consumatore.

E' ovvio che la ricerca deve proseguire con programmi a medio e lungo termine, utilizzando non tanto l'esplosivo tal quale che è tipicamente destinato alla produzione di bioetanolo, bensì l'effluente derivante dall'allontanamento degli inibitori alla fermentazione. Questo processo potrebbe essere realizzato mediante un impianto brevettato recentemente da ENEA, che prevede un'azione di strippaggio dell'esplosivo in corrente di aria e/o di vapore, ottenendo così un materiale detossificato, ovvero fermentabile, senza perdite di materiale utile, senza aggiunta di additivi chimici ed esente da tutte quelle sostanze che potrebbero interferire negativamente con i processi fermentativi a carico degli zuccheri a cinque e a sei atomi di carbonio (Arcieri *et al.*, 2012). Questo refluo rappresenta un vero e proprio sottoprodotto della *steam-explosion*, ricco in furfurali, acidi organici ed altri inibitori che potrebbe trovare un utile e conveniente impiego in agricoltura protetta alla luce dei risultati qui presentati.

Ed è in questa ottica, inoltre, che vanno compiuti studi e ricerche anche sull'impatto che i furfurali veicolati da ammendanti orto-floro-vivaistici soppressivi, ovvero la biomassa esplosa, potrebbero avere:

- 1) sulla comunità microbica utile del suolo (batteri azoto fissatori, attinomiceti, lieviti saprofiti, funghi antagonisti, ecc.);
- 2) sui rapporti suolo-pianta per quel che concerne l'assorbimento ed il possibile accumulo di furfurali nei tessuti vegetali, in particolare nelle porzioni edibili delle piante coltivate;
- 3) sui processi di degradazione dei furfurali nel suolo;
- 4) sulla protezione dei furfurali da parte dei sistemi colloidali polidispersi del suolo.

Inoltre, l'uso dei substrati esplosivi proposto in questo lavoro di ricerca è confinato ai soli sistemi serra energeticamente efficienti e non è estendibile, al momento, al pieno campo o ad altri sistemi colturali non confinati. Sebbene tali interrogativi restino aperti, tuttavia questi primi risultati sperimentali sono senza dubbio incoraggianti nel proseguimento della ricerca.

Bibliografia

- Arcieri, G., Valerio, V., Viola, E., Zimbardi, F., Braccio, G., 2012. Metodo e relativo impianto per il trattamento di biomassa lignocellulosica. ENEA, Brevetto n° 753/2012.
- Ballerini, D., Desmarquest, J. P., Pourquié, J., Nativel, F., Rebeller, M., 1994. Ethanol production from lignocellulosics: large scale experimentation and economics. *Bioresource Technology* 50, 17.
- Barisano, D., De Bari, I., Viola, E., Zimbardi, F., Braccio, G., Cantarella, M., Gallifuoco, A., 2001. State of the art on bioethanol production. ENEA, RT/2001/6/ERG, 97 pp.
- Campiotti, C. A., Viola, C., Scoccianti, M., Giagnacovo, G., Lucerti, G., Alonzo, G., 2011. Le filiere del sistema agricolo per l'energia e l'efficienza energetica. ENEA, RT/2011/11/ENEA, ISSN/0393-3016, 23 pp.
- Ciccarese, L., 2011. La EEA ha ragione, ma fino ad un certo punto. ENEA, EAI 4-5/2011, 21-23.
- Cuna, D., De Bari, I., Nanna, F., Liuzzi, F., 2004. Bioethanol production from mixed sugar syrups of steam exploded biomass: investigation of adapted strain of *Pichia stipitis* in immobilized-cells bioreactors. In: Proc. of the 2nd World Conf. on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection, 10-14 May 2004, Rome (Italy), vol. II, pp. 1627-1630.
- De Bari, I., Cuna, D., Nanna, F., Braccio, G., 2004. Ethanol production in immobilized-cell bioreactors from mixed sugar syrups and enzymatic hydrolysates of steam-exploded biomass. *Applied Biochemical Biotechnology* 113, 539-557.
- De Corato, U., Sharma, N., Maccioni, O., Zimbardi, F., 2011. Suppressiveness of steam-exploded biomass of *Miscanthus sinensis* var. *giganteus* against soil-borne plant pathogens. *Crop Protection* 30 (3), 246-252.
- De Corato, U., Viola, E., Maccioni, O., Arcieri, G., Sharma, N., Zimbardi, F., 2012. Suppressiveness of steam-exploded biomass of *Arundo donax* L. and wheat straw against soil-borne plant pathogens under greenhouse conditions. *Journal of Agricultural Science and Technology B*, (in corso di stampa).
- Pari, L. (Coord.), 2011. Lo sviluppo delle colture energetiche in Italia: il contributo dei progetti di ricerca SUSCACE e FAESI. Volume edito dal Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), ISBN/978-88-6134-730-4, 896 pp.
- Pugliese, M., Gullino, M. L., Garibaldi, A., 2011. Suppressive effect of compost against *Phytophthora cinnamomi* on ornamentals. In: Proc. of the 17th Italian Phytopathological Society Congress, 12-14 September 2011, Bologna (Italy), S4.16.

- Ricci, E., Viola, E., Zimbardi, F., Braccio, G., Cuna, D., 2001. Etanolo da biomasse lignocellulosiche: produzione di etanolo da paglia di grano mediante pretrattamento di *steam explosion*, idrolisi enzimatica e fermentazione. ENEA, RT/2001/5/ERG, ISSN/1124/7932, 37 pp.
- Tanahashi, M., 1990. Characterization and degradation mechanisms of wood components by steam explosion and utilization of exploded wood. *Wood Resource* 77, 49-117.
- Viola, E., De Bari, I., Zimbardi, F., Braccio, G., 2004. Simulazione di processo ed analisi dei costi per un impianto di produzione di etanolo da biomasse lignocellulosiche. ENEA, RT/2004/31/ENE, ISSN/0393-3016, 55 pp.
- Vivoli, F. P. (Coord.), 2008. Energia dalle biomasse: tecnologie e prospettive. Volume edito da SICENEA e ENEA, ISBN/88-8286-171-6, 137 pp.
- Zimbardi, F., Viola, E., Nanna, F., Larocca, E., Cardinale, M., Barisano, D., 2007. Acid impregnation and steam explosion of corn stalks in batch processes. *Industrial Crops and Products* 26, 195-206.

Edito dall' **ENEA**
Servizio Comunicazione

Lungotevere Thaon di Revel, 76 - 00196 Roma

www.enea.it

Stampa: Tecnografico ENEA - CR Frascati
Pervenuto il 3.10.2012

Finito di stampare nel mese di ottobre 2012