

UN POTENZIALE IMPIEGO DEI REFLUI OTTENUTI DA BIOMASSE VEGETALI TRATTATE CON LA *STEAM-EXPLOSION* NELLA DIFESA FITOSANITARIA

Un'ulteriore 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, presso Consorzio Universitario Uni.Versus, Bari

C. VIOLA

ENEA – Unità Tecnica Efficienza Energetica
Servizio Agricoltura

Centro Ricerche Casaccia, Roma

E. VIOLA, V. VALERIO, 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

UN POTENZIALE IMPIEGO DEI REFLUI OTTENUTI DA BIOMASSE VEGETALI TRATTATE CON LA *STEAM-EXPLOSION* NELLA DIFESA FITOSANITARIA

Un'ulteriore 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, presso Consorzio Universitario Uni.Versus, Bari

C. VIOLA

ENEA – Unità Tecnica Efficienza Energetica
Servizio Agricoltura

Centro Ricerche Casaccia, Roma

E. VIOLA, V. VALERIO, 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.

UN POTENZIALE IMPIEGO DEI REFLUI OTTENUTI DA BIOMASSE VEGETALI TRATTATE CON LA STEAM-EXPLOSION NELLA DIFESA FITOSANITARIA

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

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

Riassunto

Una sperimentazione che prevedeva l'applicazione di reflui da *steam explosion* di miscanto, paglia di grano e canna comune o *Arundo* nel settore della difesa fitosanitaria contro alcune specie di funghi fitopatogeni trasmesse attraverso l'aria ed il suolo, e causanti gravi malattie su pomodoro, fragola, melanzana, pisello e melone coltivate in sistemi-serra energeticamente efficienti della Puglia, è stata condotta dall'ENEA nel biennio 2012-2013. Tale ricerca è stata sviluppata con lo scopo di mettere a punto strategie innovative per un miglioramento sia dell'efficienza energetica della filiera agro-chimica e sia della sostenibilità ambientale degli agrosistemi locali sfruttando un rifiuto della *steam-explosion*. I dati ottenuti nel corso di prove condotte *in vitro* ed *in vivo*, rispettivamente in laboratorio ed in serra, su otto sistemi specie vegetale/fungo patogeno (patosistemi) hanno dimostrato che l'effetto soppressivo dei reflui di miscanto e paglia di grano (e, in minor misura, anche di canna comune) verso alcuni patosistemi sono stati molto incoraggianti. L'applicazione di questi reflui alle foglie, ai frutti ed alle piantine nel corso di trattamenti preventivi effettuati con reflui diluiti 1:2 con acqua di irrigazione ha fornito percentuali di soppressione significativamente molto alte su sei patosistemi (*A. alternata*/pomodoro, *B. cinerea*/pomodoro, *C. acutatum*/fragole, *C. fulvum*/pomodoro, *F. solani* f. sp. *lisi*/pisello e *V. dahliae*/melanzana) rispetto agli otto saggiati. Questi reflui possono essere applicati con estrema facilità ed economicità su frutti, foglie e piantine durante le ordinarie operazioni di trapianto e/o di difesa degli organi epigei di queste colture ortive da infezioni fungine. Il riscontro dell'assenza di alterazioni chimico-fisico-organolettiche a carico dei frutti di fragola e pomodoro trattati con questi reflui contenenti sostanze antimicrobiche volatili, come i furfurali e gli acidi acetico e formico, considerati nel loro complesso come i responsabili dell'attività fungicida o fungistatica dei reflui saggiati, è stato accolto positivamente ed apre verso nuove prospettive di difesa fitosanitaria eco-compatibile.

Parole chiave: Agro-energia, Difesa fitosanitaria eco-compatibile, Efficienza energetica in orticoltura, *Steam-Explosion*

Summary

The antifungal activity of liquid wastes (SELW) produced by detoxification of steam exploded biomass of Miscanthus sinensis, Arundo donax and wheat straw for the 2nd generation bioethanol production has been studied against plant pathogenic fungi for the first time. Quantification of fermentation inhibitors (2-furaldehyde, 5-hydroxymethylfurfural, acetic and formic acid) has been carried out. Mycelial growth inhibition and conidial germination of eight fungal strains [Alternaria alternata, Botrytis cinerea, Colletotrichum acutatum, Cladosporium fulvum, Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (FOL), F. oxysporum f. sp. melonis (FOM), F. solani f. sp. lisi and Verticillium dahliae] have been tested in vitro at dilution range of 1:2, 1:4 and 1:8 for each SELW. Disease suppression has been determined in vivo on eight horticultural pathosystems (A. alternata/tomato, B. cinerea/tomato, C. acutatum/strawberry, C. fulvum/tomato, FOL/tomato, FOM/melon, F. solani f. sp. lisi/pea and V. dahliae/eggplant). The suppression of each SELW; applied whether in form of spray on tomato leaves and skin fruits of tomato and strawberry, whether in form of watering suspension on seedling radical system of tomato, melon, pea and eggplant; has been tested at dilution range of 1:2, 1:4 and 1:8 under greenhouse in curative and preventive treatments. The investigations carried out in vitro have shown that M. sinensis SELW resulted more suppressive than wheat straw SELW, and A. donax SELW was less suppressive than wheat straw SELW at the lowest dilutions. Relationships between the concentrations of 2-furaldehyde, acetic and formic acid presents in the SELW and their antifungal effect have been found. Moreover, B. cinerea, C. fulvum, V. dahliae, A. alternata, C. acutatum and F. solani f. sp. lisi were more inhibited than FOL and FOM. The investigations performed in vivo have shown that the SELW of M. sinensis and wheat straw should be easily diluted at 1:2 rate (sometime at 1:4) through irrigation water and used in preventive treatments for controlling six fungal diseases. In particular, they could be used by dipping of radical apparatus during the seedling transplanting in case of F. solani f. sp. lisi/pea and V. dahliae/eggplant; whereas, they should be nebulized on leaves and fruits before symptoms appearance in case of A. alternata/tomato, B. cinerea/tomato, C. acutatum/strawberry and C. fulvum/tomato. This study is interesting for the potential employment of these SELW in the horticultural crop protection at South Italy. So, it is possible well conjugate the industrial production of 2nd generation biofuels to use of SELW derived from Steam-Explosion process in agriculture energy efficiency and in sustainable horticulture.

Key words: Agro-energy, Crop protection eco-compatibility, Energy efficiency in horticulture, *Steam-Explosion*

INDICE

INTRODUZIONE	7
METODOLOGIA SPERIMENTALE	9
PRODUZIONE DI REFLUI DA BIOMASSE VEGETALI TRATTATE CON LA <i>STEAM-EXPLOSION</i>	9
DETERMINAZIONE DEGLI INIBITORI MICROBICI NEI REFLUI DA <i>STEAM-EXPLOSION</i>	10
STUDIO DELL'INIBIZIONE <i>IN VITRO</i>	11
COLLEZIONE DI FUNGHI FITOPATOGENI SAGGIATA.....	11
VALUTAZIONE DELLA PERCENTUALE DI INIBIZIONE DELLA CRESCITA MICELIARE.....	11
VALUTAZIONE DELLA PERCENTUALE DI GERMINAZIONE DEI CONIDI	12
STUDIO DELLA SOPPRESSIONE <i>IN VIVO</i>	13
CENNI DESCRITTIVI SULLE MALATTIE TRASMESSE ATTRAVERSO L'ARIA.....	13
CENNI DESCRITTIVI SULLE MALATTIE TRASMESSE ATTRAVERSO IL SUOLO.....	17
GESTIONE DELLE PROVE IN SERRA.....	20
ESECUZIONE DEI TRATTAMENTI CURATIVI E PREVENTIVI PER LE MALATTIE TRASMESSE ATTRAVERSO L'ARIA	21
ESECUZIONE DEI TRATTAMENTI CURATIVI E PREVENTIVI PER LE MALATTIE TRASMESSE ATTRAVERSO IL SUOLO	21
VALUTAZIONE DELLA PERCENTUALE DI SOPPRESSIONE DELLA MALATTIA	22
RISULTATI E DISCUSSIONE	22
DETERMINAZIONE DEGLI INIBITORI MICROBICI NEI REFLUI DA <i>STEAM-EXPLOSION</i>	22
STUDIO DELL'INIBIZIONE <i>IN VITRO</i>	23
STUDIO DELLA SOPPRESSIONE <i>IN VIVO</i>	30
EFFETTO DEL TRATTAMENTO PREVENTIVO PER LE MALATTIE TRASMESSE ATTRAVERSO L'ARIA..	30
EFFETTO DEL TRATTAMENTO CURATIVO PER LE MALATTIE TRASMESSE ATTRAVERSO L'ARIA.....	30
EFFETTO DEI TRATTAMENTI SULLA QUALITA' DEI FRUTTI.....	30
EFFETTO DEL TRATTAMENTO PREVENTIVO PER LE MALATTIE TRASMESSE ATTRAVERSO IL SUOLO.....	33
EFFETTO DEL TRATTAMENTO CURATIVO PER LE MALATTIE TRASMESSE ATTRAVERSO IL SUOLO.....	33
CONCLUSIONI	36
BIBLIOGRAFIA	37

INTRODUZIONE

Fonti FAO stimano che in Italia la quantità di fertilizzanti ed agro-farmaci di sintesi chimica impiegati in agricoltura sia pari a 118 kg/ha, corrispondenti a non meno di 3 tep/anno. Per quanto riguarda, ad esempio, le sole lavorazioni del terreno per colture da pieno campo di soia, grano ed orzo, sperimentazioni condotte nel Nord-Est dell'Italia hanno dimostrato che l'adozione di tecniche di *no-tillage* e di *minimum tillage* comporterebbero rispettivamente un incremento del rapporto output/input di energia pari a 4,18 e 4,57, rispetto a 4,09 con l'adozione di tecniche convenzionali di coltivazione. Di conseguenza, si stima anche una riduzione di emissioni di CO₂ pari a 1.190-1.553 m³/ha × anno (Campiotti *et al.*, 2011).

Fonti SINAB stimano che in Italia il numero di aziende "biologiche" che adottano tali tecniche sia pari a 43.159 al 31/12/2007, corrispondenti 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. Per contrastare le spese di energia da un lato, e la necessità di ridurre le emissioni di CO₂ dall'altro, è necessaria quindi l'introduzione sia di nuove tecnologie energetiche ad elevata efficienza che il ricorso ad innovativi sistemi e processi produttivi eco-compatibili in grado di massimizzare il livello di efficienza energetica dei cicli colturali. Allo scopo di mantenere contemporaneamente un'accettabile sostenibilità ambientale e migliorare l'efficienza energetica dei sistemi agricoli italiani, è necessario anche favorire l'impiego locale di fonti agro-energetiche (Campiotti *et al.*, 2011).

L'attuale quadro legislativo di riferimento, costituito dal Decreto Legislativo (D.L.) del 30 Maggio 2008 n. 115 (attuazione della Direttiva 2006/32/CE), dalla Direttiva 20/20/20 (che prevede per l'Italia entro il 2020 la quota del 17% dei consumi finali di energia mediante impiego di energie rinnovabili), dal D.L. del 3 Marzo 2011 n. 28 (attuazione della Direttiva 2009/28/CE), dal Protocollo di Kyoto e dalla Direttiva 2009/128/CE (uso sostenibile dei prodotti fitosanitari o agro-farmaci), è orientato proprio in questa direzione. In relazione alla Direttiva 2009/128/CE, l'uso di nuovi agro-farmaci e fumiganti di sintesi chimica a basso dosaggio, in grado di sostituire l'ormai vietato bromuro di metile ampiamente utilizzato fino al recente passato, potrebbe essere opportunamente integrato con compost soppressivi arricchiti artificialmente con funghi antagonisti per la gestione eco-sostenibile dei substrati orto-floro vivaistici impiegati nelle serre del Nord-Italia (Pugliese *et al.*, 2011).

Ricerche condotte in ENEA nel triennio 2009-2011 con lo scopo di investigare su approcci innovativi da applicare alla difesa fitosanitaria di colture ortive in serra contro funghi fitopatogeni del suolo, suggeriscono per un impiego ulteriore ed alternativo delle biomasse vegetali pretrattate con la *steam-explosion* (De Corato *et al.*, 2012a). Tale impiego, mirato a migliorare sia l'efficienza energetica della filiera agro-chimica in agricoltura che la sostenibilità ambientale dei sistemi orticoli in serra, non solo apporterebbe un ulteriore valore aggiunto alla *steam explosion*, tecnologia del resto già validata e riconosciuta come fra le più efficaci nel pretrattamento delle biomasse vegetali per la produzione di bio-etanolo di 2° generazione, ma anche una potenziale riduzione dell'impiego di agro-farmaci e fumiganti di sintesi chimica con conseguenti risparmi di energia e di acqua in agricoltura. L'impiego delle biomasse esplose ottenute da matrici lignocellulosiche ad elevato contenuto in emicellulose potrebbe essere raccomandato nei piani di difesa fitosanitaria dei sistemi orticoli italiani praticati in serra. Infatti, l'impiego integrato di biomasse vegetali esplose (alternative ai compost soppressivi microbiologicamente arricchiti con funghi antagonisti) con agro-farmaci di ultima generazione a basso dosaggio, potrebbe contribuire sia ad un significativo incremento del rapporto output/input di energia della filiera agro-chimica, sia alla riduzione dei rischi da agro-farmaci per l'ambiente, per la salute dei consumatori e per la sicurezza degli operatori agricoli (De Corato *et al.*, 2012b).

Allo scopo di migliorare l'efficienza del processo di produzione di bio-etanolo di 2° generazione, è stato messo a punto in ENEA un trattamento delle biomasse esplose, da effettuarsi prima della fermentazione in impianti-pilota, con lo scopo di rimuovere il *mix* di inibitori della fermentazione (furfurale, aldeide benzoica ed acidi organici volatili) che si formano durante la *steam explosion* a seguito della degradazione degli zuccheri (Tanahashi, 1990) e che interferiscono negativamente con l'attività biologica dei lieviti alcoligeni (Cuna *et al.*, 2004; De Bari *et al.*, 2004). Ricercatori del Centro Ricerche Trisaia dell'ENEA hanno messo a punto e brevettato un tipo di processo adatto a questo scopo (Arcieri *et al.*, 2012). Durante tale processo, la biomassa in uscita dall'impianto-pilota ST.E.LE. del CR Trisaia viene sottoposta ad un trattamento di tipo fisico per allontanare questo *mix* di inibitori, ottenendo così un esplosivo immediatamente fermentabile, senza perdite di materiale utile e senza aggiunta di additivi chimici.

Per la raccolta dei condensati è stato utilizzato un essiccatore a pale cave. È stato utilizzato un modello batch di piccola taglia (25 litri), fornitoci dall'azienda olandese MFG-Gouda (www.gmfgouda.com). Con questo dispositivo sono stati trattati circa 6 kg di esplosivo per prova, impostando la velocità di rotazione delle pale a 40 rpm (variabile da 20 a 60 rpm). Le pale cave e la camicia esterna sono state riscaldate mediante l'innesto di acqua riscaldata con vapore, controllando la temperatura mediante termocoppia immersa nel substrato, interfacciata con un sistema di controllo della temperatura (interfaccia del bioreattore Biostat-D della B. Braun Biotech International). Il sistema Gouda è dotato di un coperchio superiore (removibile) con tubo di aspirazione, che può essere collegato a sistemi da vuoto e a condensatori per l'aspirazione e la raccolta dei condensabili. La procedura di essiccazione e raccolta dei condensati è operata secondo lo schema mostrato nella Figura 1. I condensabili sono raccolti in un pallone a valle di un refrigeratore. In questo caso la rimozione dei volatili è stata aiutata mediante vuoto spinto effettuato con pompa ad olio rotativa.

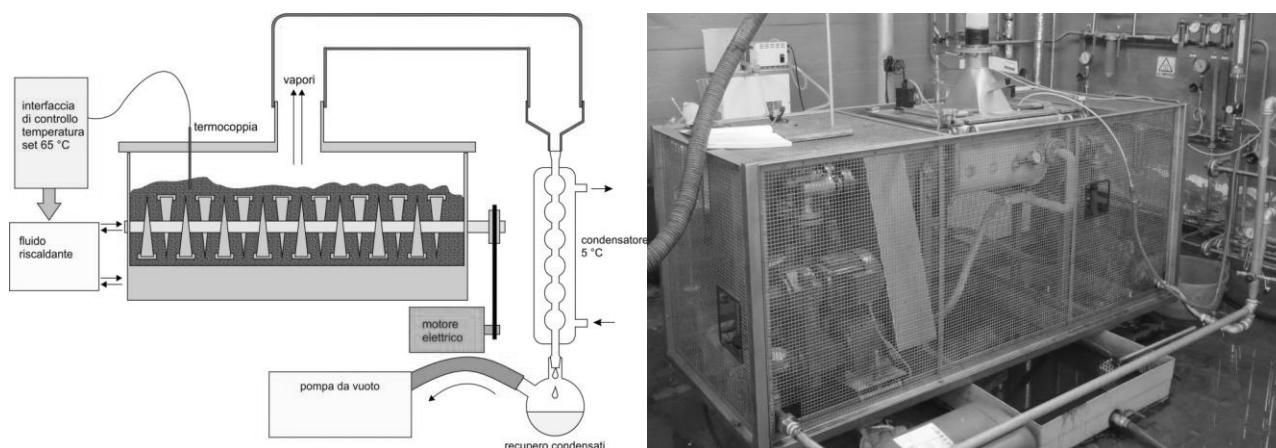


Fig. 1 – Essiccazione con coperchio, vuoto e recupero dei condensati.

Il liquido condensato (refluo) ottenuto a fine processo viene raccolto e stoccato, rappresentando così un sottoprodotto (o rifiuto) della *steam-explosion*. In esso si vanno a concentrare sostanze ad attività antimicrobica come, ad esempio, 2-furaldeide, 5-idrossimetilfurfurale, aldeide benzoica ed acidi organici volatili (acetico e formico). Questo refluvo potrebbe perciò trovare un utile e conveniente impiego nella difesa fitosanitaria integrata, sfruttandone la sua azione tossica contro alcuni funghi fitopatogeni di colture ortive protette. Considerandone, inoltre, la sua completa miscibilità con l'acqua di irrigazione che dà luogo a soluzioni limpide e stabili, questi reflui sono facilmente stoccabili, maneggiabili ed applicabili direttamente sulle piante coltivate in serra per difenderle da attacchi fungini sia a carico dell'apparato aereo che di quello radicale.

Una sperimentazione che prevedeva l'impiego di reflui da *steam explosion* è stata condotta dall'ENEA nel biennio 2012-2013 per la messa di punto di strategie innovative per un miglioramento sia dell'efficienza energetica della filiera agro-chimica e sia della sostenibilità ambientale di agrosistemi in sistemi-serra energeticamente efficienti della Puglia. I risultati di questo lavoro di ricerca sono riportati nel presente Rapporto Tecnico.

METODOLOGIA SPERIMENTALE

La sperimentazione è stata condotta presso le strutture di ricerca dell'ENEA del CR Trisaia e della Sede di Bari, in collaborazione con l'Università degli Studi di Bari.

PRODUZIONE DI REFLUI DA BIOMASSE VEGETALI TRATTATE CON LA *STEAM-EXPLOSION*

Nella sperimentazione sono stati considerati tre tipi di biomassa vegetale (miscanto, canna comune o *Arundo donax* L. e paglia di grano). Le biomasse sono state sottoposte nella loro forma "nativa", ovvero fresca e/o essiccata, ad un pretrattamento di *steam-explosion* con lo scopo di ottenere esplosi di miscanto, canna comune e paglia di grano (Fig. 2) da impiegare per la produzione di bio-etanolo di 2° generazione. Questo trattamento è stato effettuato utilizzando l'impianto-pilota ST.E.LE. del CR Trisaia alle condizioni operative di 207 °C per 6 minuti.



Fig. 2 – Campioni di biomassa esplosa di miscanto, canna comune e paglia di grano ottenuta con un trattamento di *steam-explosion*.

Le biomasse esplose di miscanto, canna comune e paglia di grano sono state poi sottoposte al processo prima descritto, ed il *mix* di inibitori microbici della fermentazione sono stati perciò rimossi dagli esplosi accumulandosi nei rispettivi reflui di condensazione (Fig. 3).



Fig. 3 – Campioni di refluvo ottenuti dalla biomassa esplosa di miscanto, canna comune (*Arundo donax*) e paglia di grano.

DETERMINAZIONE DEGLI INIBITORI MICROBICI NEI REFLUI DA *STEAM-EXPLOSION*

Gli inibitori microbici presenti nei reflui di condensazione di miscanto, canna comune e paglia di grano con caratteristiche volatili, come l'acido formico, l'acido acetico, la 2-furaldeide (furfurale) e il 5-idrossimetilfurfurale (5-HMF), sono stati determinati quantitativamente nella fase acquosa dopo estrazione mediante lavaggio con acqua.

Le concentrazioni di acido formico, 2-furaldeide e 5-idrossimetilfurfurale sono state quantificate mediante cromatografia liquida ad alta pressione con un HPLC (serie HP1100), con rivelatore DAD, colonna Phenomenex Synergi Fusion-RP 80 e, come eluente, un gradiente di acetonitrile acqua (0-15 min, CH₃CN 3%; 15-27 min, CH₃CN 10%; 27-35 min, CH₃CN 17%; 35-50 min, CH₃CN 30%; 50-60 min, CH₃CN 50%).

La concentrazione di acido acetico è stata determinata mediante cromatografia ionica con un HPIC (Dionex LC30), con iniettore automatico AS50, colonna Nucleogel Ion 300 OA e, come detector, indice di rifrazione ED50. H₂SO₄ (0,01 N) è stato utilizzato come eluente (temperatura 40 °C, flusso eluente 0,4 ml/min).

STUDIO DELL'INIBIZIONE *IN VITRO*

La tossicità *in vitro* dei reflui di condensazione (*Steam Explosion Liquid Waste*, o SELW) di miscanto, canna comune e paglia di grano è stata saggiata su un'ampia collezione di funghi patogeni di diverse colture ortive praticate in serra e trasmessi attraverso l'aria ed il suolo. Le percentuali di inibizione della crescita miceliare e di germinazione conidica sono state quantitativamente valutate attraverso biosaggi condotti in laboratorio.

COLLEZIONE DI FUNGHI FITOPATOGENI SAGGIATA

Una collezione di otto isolati fungini [*Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Cladosporium fulvum* (Cke) Cif. (syn. *Passalora fulva*), *Colletotrichum acutatum* Simmonds, *Verticillium dahliae* Kleb., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *pisi* (Jones) Snyder & Hans., *Fusarium oxysporum* (Schl.) f. sp. *melonis* (Leach & Currence) Snyder & Hans. e *Fusarium oxysporum* (Schl.) f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hans.] (Fig. 4), patogeni per il pomodoro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), melone (*Cucumis melo* L.), fragola (*Fragaria x ananassa*), pisello (*Pisum sativum* Asch. et Gr.) e melanzana (*Solanum melongena* L.), è stata utilizzata in tutti i biosaggi per valutare l'attività fungi-tossica dei SELW di miscanto, canna comune e paglia di grano.

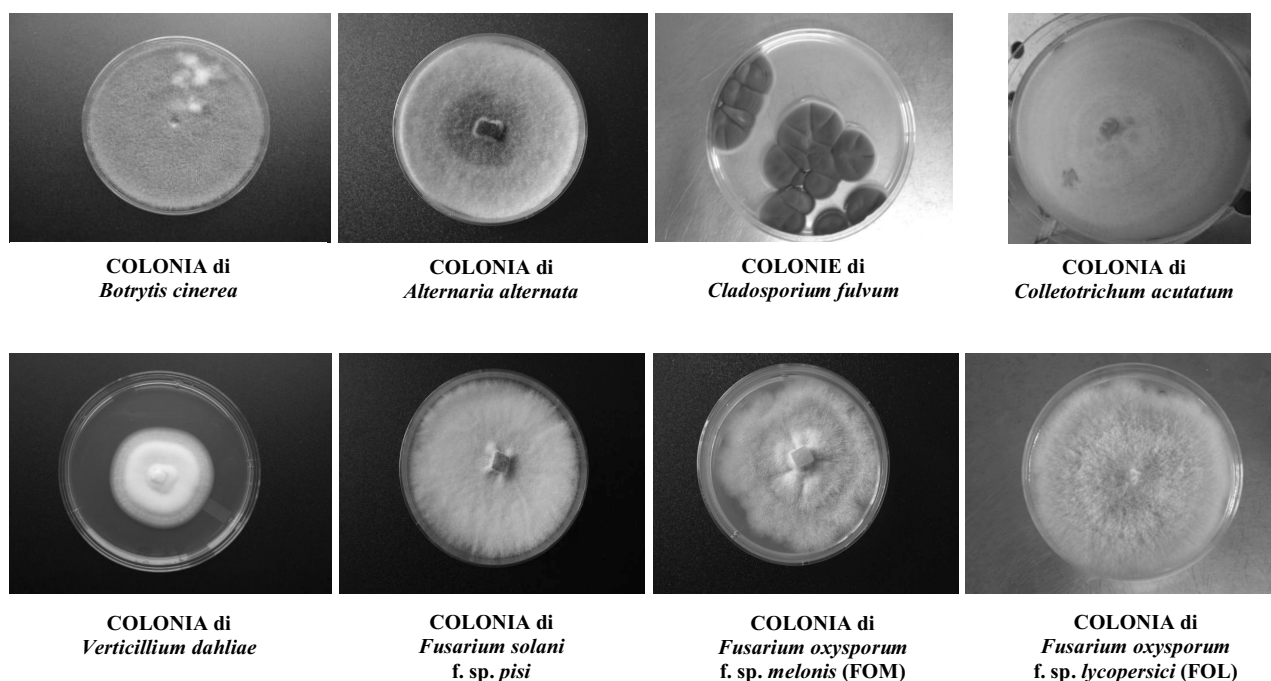


Fig. 4 – Colonie pure di otto specie di funghi fitopatogeni cresciute su substrato agarizzato di Patata-Destrosio-Agar utilizzate nei biosaggi.

VALUTAZIONE DELLA PERCENTUALE DI INIBIZIONE DELLA CRESCITA MICELIARE

La crescita miceliare di *A. alternata*, *B. cinerea*, *C. acutatum*, *C. fulvum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM), *F. solani* f. sp. *pisi* e *V. dahliae* è stata inibita temporaneamente o permanentemente a seguito dell'aggiunta di SELW di miscanto, canna comune e paglia di grano nel substrato artificiale solido di crescita. Tale inibizione è stata quantitativamente determinata attraverso la misurazione della crescita radiale del micelio in piastre Petri (100 mm) contenenti *Potato Dextrose Agar* (PDA). Aliquote di 10 mL di ogni SELW sono

state aggiunte a 100 mL di PDA sterile a 42 ± 3 °C in piastre Petri alle diluizioni di 1:2, 1:4 e 1:8 con acqua distillata sterile. Aliquote di 10 mL di acqua sterile sono state aggiunte a 100 mL di PDA in piastre di controllo. Ogni piastra è stata inseminata con tre cubetti di agar di 5 mm colonizzati dal fungo e prelevati dal margine di colonie di 4-10 giorni. Tutte le piastre, incluse i controlli, sono state mantenute a 24 ± 2 °C per 5-10 giorni al buio. Il rapporto percentuale di Inibizione della Crescita Miceliare (MGI %) è stato calcolato con il seguente algoritmo alla fine del periodo d'incubazione, diverso per ogni fungo, variabile da 5 a 10 giorni:

$$\% \text{ MGI} = [(D_{Co} - D_w) / D_{Co}] \times 100$$

(D_{Co} = media del diametro delle colonie cresciute nelle piastre di controllo; D_w = nelle piastre trattate con ogni SELW alle tre diluizioni). I lotti sperimentali sono stati ripetuti quattro volte con tre repliche di 10 piastre per ciascuna.

L'inibizione temporanea (attività fungistatica) o permanente (attività fungicida) di ogni SELW è stata determinata con metodi standard. I tasselli colonizzati dal fungo totalmente inibiti sono stati piastrati nuovamente sul PDA e le osservazioni di un'eventuale ricrescita del micelio sono state effettuate al 5°-10° giorno di incubazione a 24 ± 2 °C al buio. La presenza di una ricrescita indicava un'azione fungistatica del SELW, mentre l'assenza ne rivelava un'azione fungicida dello stesso. I lotti sperimentali sono stati ripetuti quattro volte con tre repliche di 10 piastre per ciascuna.

VALUTAZIONE DELLA PERCENTUALE DI GERMINAZIONE DEI CONIDI

La germinazione conidica di *A. alternata*, *B. cinerea*, *C. acutatum*, *C. fulvum*, FOL, FOM, *F. solani* f. sp. *pisii* e *V. dahliae* è stata soppressa a seguito dell'aggiunta di SELW di miscanto, canna comune e paglia di grano nel substrato artificiale liquido di crescita. La soppressione conidica è stata quantitativamente determinata attraverso il conteggio dei conidi germinati e la misurazione delle variazioni di densità ottica a seguito della crescita dei conidi su *Czapek Dox Broth* (CDB). Miscela composta da 80 µL di sospensioni conidiche (10^5 conidia/mL) in acqua distillata sterile (ottenuta da colture di 7 giorni cresciute su PDA per due settimane), 100 µL di CDB sterile e 20 µL di ogni SELW alle diluizioni di 1:2, 1:4 e 1:8 con acqua distillata sterile, sono state distribuite entro micro-pozzetti di speciali piastre (Mod. Titration Plate System, AES Laboratory, Milano, Italia). Una fila di pozzetti, riempita con una miscela composta da 80 µL di sospensione conidica, 100 µL di CDB e 20 µL di acqua sterile, è stata usata come controllo. Tutte le piastre sono state incubate a 24 ± 2 °C per 72 ore.

La germinazione conidica è stata valutata a 24 ore di incubazione. Aliquote di 10 µL sono state prelevate con una micropipetta sterile e montate su vetrini da microscopia ottica sterilizzati con alcool denaturato. Il numero dei conidi totali e germinati è stato calcolato tramite l'emocitometro di Burker usando un fotomicroscopio a trasmissione ad ingrandimento di $160\times$ (Mod. BX60, Olympus, Milano, Italia). Il rapporto percentuale di Germinazione Conidica (CG %) è stato calcolato a 24 ore di incubazione in questo modo:

$$\% \text{ CG} = C_G / C_T \times 100$$

(C_G = media del numero di conidi germinati nei campioni trattati con ogni SELW alle tre diluizioni e nei testimoni; C_T = di conidi totali nello stesso campione). I lotti sperimentali sono stati ripetuti due volte con tre repliche di 5 vetrini per ciascuna.

Le variazioni di densità ottica dovute alla crescita dei conidi germinati ed all'allungamento delle strutture ifali, sono state misurate sulle sospensioni conidiche, inclusi i controlli negativi, con prelievi di campioni di sospensione dopo 24, 48 e 72 ore dall'incubazione. La densità ottica è stata

misurata con un lettore spettrofotometrico (Mod. Multiscan-Plus MK II, Lab. Systems OY, Helsinki, Finlandia) alla lunghezza d'onda di 405 nm, ed espresso come assorbanza ($0 \leq \text{abs} \leq 1$). I lotti sperimentali sono stati ripetuti due volte con quattro replicazioni di 5 pozzetti per ciascuna.

STUDIO DELLA SOPPRESSIONE *IN VIVO*

CENNI DESCRITTIVI SULLE MALATTIE TRASMESSE ATTRAVERSO L'ARIA

1) *B. cinerea*/pomodoro

Il fungo attacca tutti gli organi epigei della pianta. Su foglie e fusti si manifesta con aree irregolari di marciame chiaro che presto danno luogo (in presenza di alta umidità) allo sviluppo della caratteristica muffa grigia (Fig. 5). Anche i fiori possono essere colpiti in maniera analoga. Il danno più grave è quello a carico dei frutti, sui quali, attraverso ferite di varia natura, il fungo (Fig. 5) determina marcescenza molle degli stessi. Fattori predisponenti sono: alti valori termici ed igrometrici, eccessiva vigoria della pianta e scarsa ventilazione.



Fig. 5 – Frutto di pomodoro infettato da muffa grigia (in alto). Colonia e conidi di *B. cinerea* (in basso).

2) *A. alternata*/pomodoro

Questo fungo (Fig. 6) determina la comparsa sui frutti e sulle foglie di macchie irregolarmente tondeggianti dapprima clorotiche e poi scure, che col tempo tendono a confluire portando alla formazione di ampie tacche necrotiche concentriche (Fig. 6). Condizioni di alta umidità ambientale favoriscono lo sviluppo della malattia.

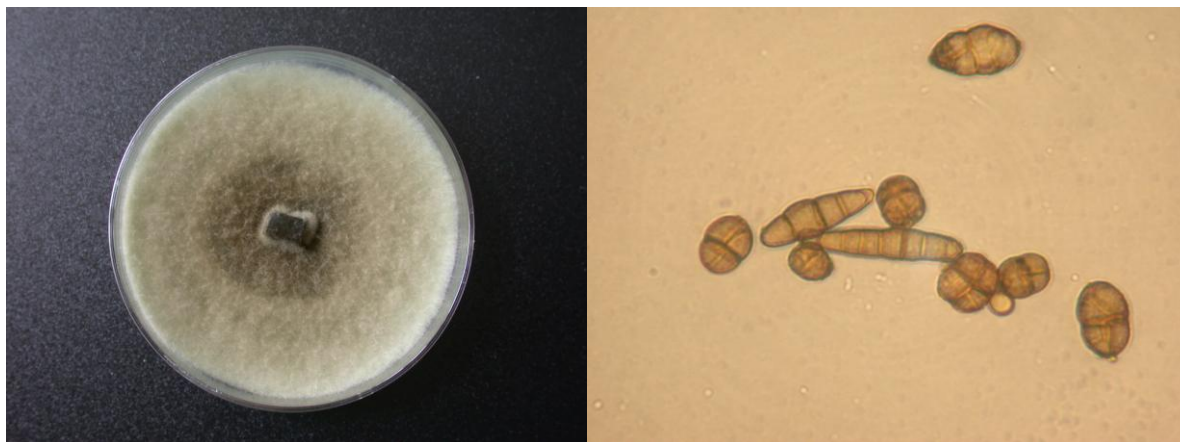


Fig. 6 – Frutti di pomodoro con sintomi da alternariosi rispetto a frutti sani (in alto). Colonia e conidi di *A. alternata* (in basso).

3) *C. fulvum*/pomodoro

Sulle pagina superiore delle foglie compaiono delle ampie ed irregolari macchie clorotiche cui corrispondono, sulla pagina inferiore, efflorescenze vellutate di color marrone-fulvo (Fig. 7). La fitopatia si sviluppa anche velocemente (36-48 ore) in presenza di temperature comprese tra i 15 e i 27 °C e di alta umidità relativa a causa dell'invasione dei tessuti mesofillari da parte del fungo (Fig. 7).

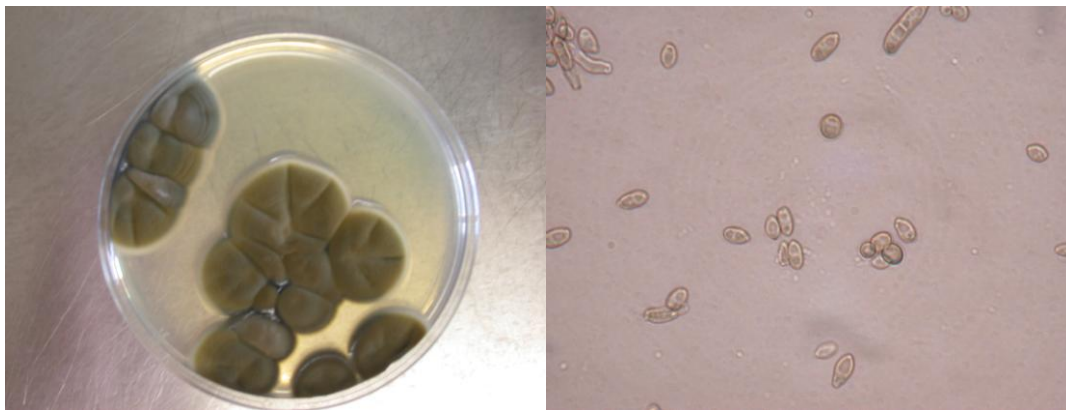


Fig. 7 – Foglie di pomodoro con macchie da cladosporiosi (in alto). Colonie e conidi di *C. fulvum* (in basso).

4) *C. acutatum*/fragola

Particolarmente sensibili sono i frutti in fase di maturazione. Su stoloni, piccioli e peduncoli compaiono lesioni scure e incavate, di forma ellittica. Se persistono condizioni ambientali favorevoli, le macchie tendono progressivamente ad allungarsi e ad avvolgere a manicotto l'organo colpito, provocando una caratteristica strozzatura che causa arresto di sviluppo e avvizzimento della parte apicale. I sintomi sui frutti consistono in macchie brune rotondeggianti, depresse, di consistenza secca che possono espandersi, conferendo al frutto, nel caso non intervengano microrganismi secondari, un aspetto mummificato. Caratteristica è la colorazione scura degli acheni in corrispondenza delle lesioni (Fig. 8). Con elevata umidità ambientale le macchie si presentano oleose e si ricoprono di essudati di colore arancio-salmone, costituiti dalle spore del fungo (Fig. 8).

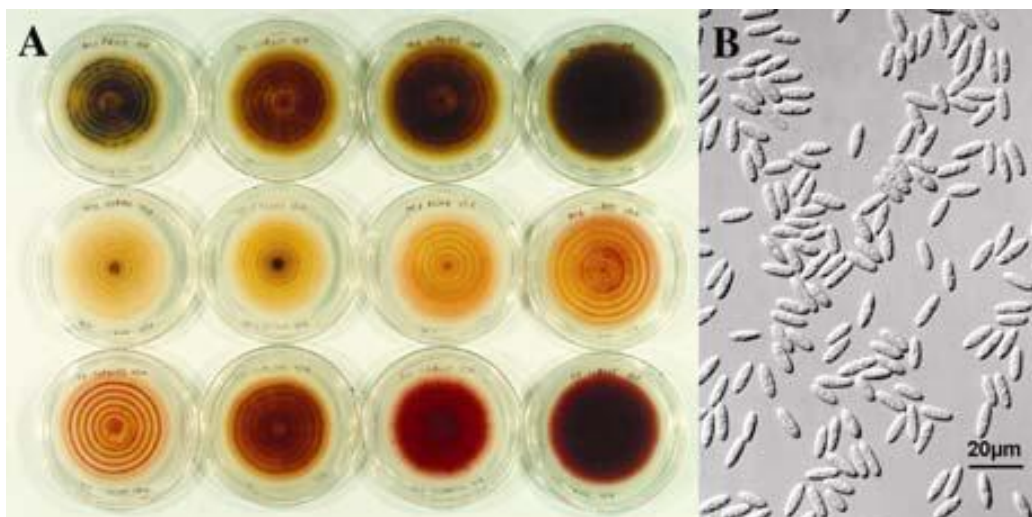


Fig. 8 – Frutto di fragola con sintomi di antracnosi (in alto). Variabilità morfologica delle colonie e dei conidi di *C. acutatum* (in basso).

CENNI DESCRITTIVI SULLE MALATTIE TRASMESSE ATTRAVERSO IL SUOLO

1) *V. dahliae*/melanzana

La manifestazione esteriore della patologia è data da ingiallimenti a cui fanno seguito avvizzimenti della parte aerea (Fig. 9) specie nelle ore e nelle stagioni più calde. Nei casi più gravi si può andare incontro a morte dell'intera pianta. Un leggero scorticamento della parte basale del fusto evidenzierà tessuti sottocorticali caratteristicamente scuri conseguentemente all'invasione del fungo (Fig. 9).

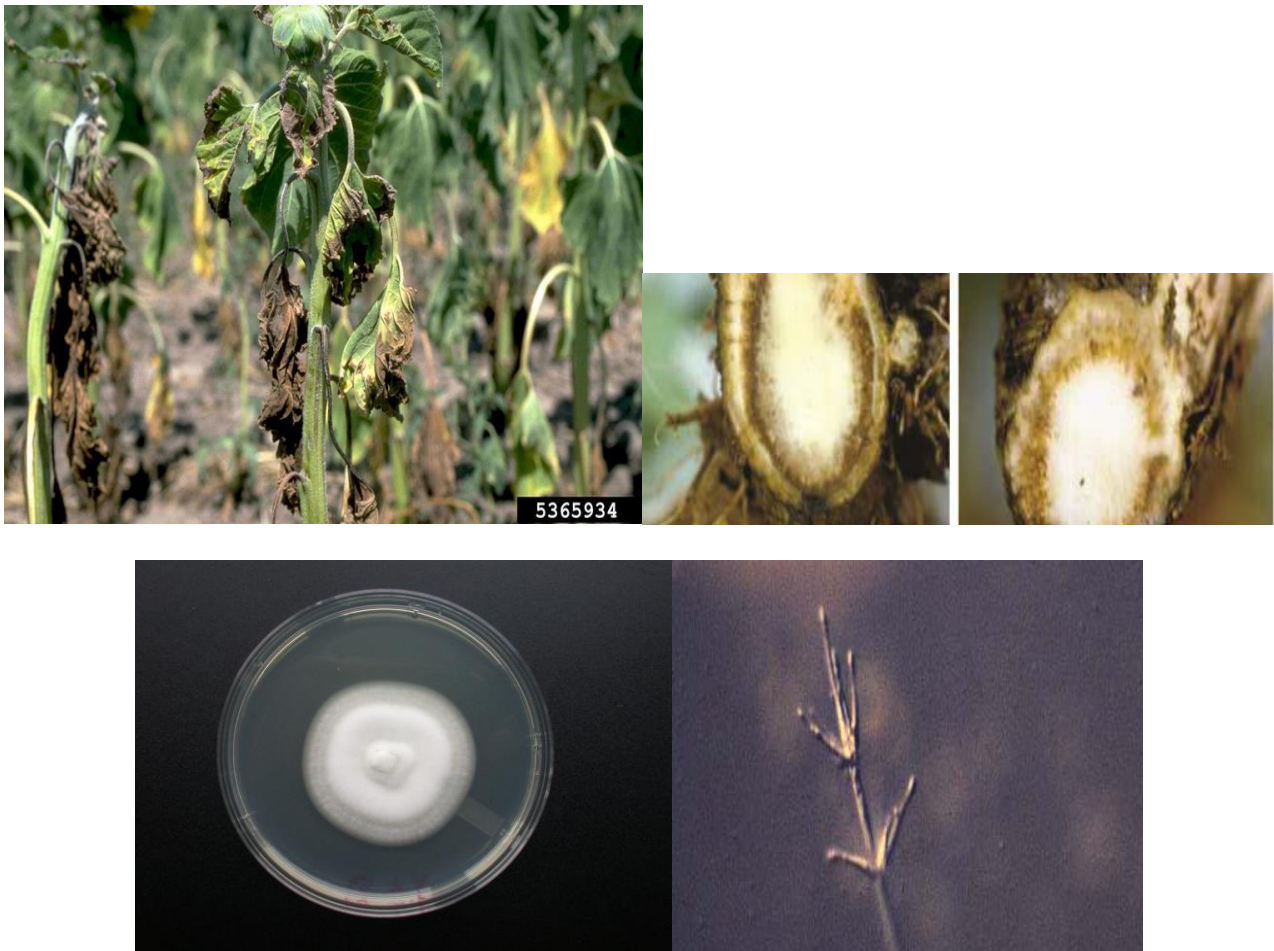


Fig. 9 – Pianta e sezione trasversale di fusto di melanzana con sintomi di tracheoveticeilliosi (in alto). Colonia e conidi di *V. dahliae* (in basso).

2) *F. solani* f. sp. *pisi*/pisello

Con le sue attitudini all'attacco di tessuti parenchimatici, questo fungo (Fig. 10) determina severi marciumi radicali delle piante di pisello. I tessuti corticali delle radici, colletto e basamento del fusto appaiono imbruniti e necrotizzati. La pianta appare deperente, sofferente con le foglie ingiallite (Fig. 10). Quando il marciume e la necrosi si approfondiscono e recingono completamente il piede della pianta, la chioma finisce col disseccare.



Fig. 10 – Piante di pisello con sintomi di fusariosi del colletto e delle radici (in alto). Colonia e conidi di *F. solani* f. sp. *pisi* (in basso).

3) *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL)/pomodoro

La manifestazione esteriore della patologia è data da ingiallimenti a cui fanno seguito avvizzimenti della parte aerea. Nei casi più gravi si può andare incontro a morte dell'intera pianta (Fig. 11). Un leggero scorticamento della parte basale del fusto evidenzierà tessuti sottocorticali caratteristicamente imbruniti conseguenti all'invasione da parte del fungo (Fig. 11).



Fig. 11 – Pianta e sezione di fusto di pomodoro con sintomi di tracheofusariosi (in alto). Colonia e conidi di *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (in basso).

4) *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM)/melone

La manifestazione esteriore della patologia è data da ingiallimenti a cui fanno seguito avvizzimenti della parte aerea. Nei casi più gravi si può andare incontro a marciume dei frutti (Fig. 12). La base del fusto evidenzierà anche in superficie la presenza di aree imbrunite e necrotizzate, nonché di essudati gommosi di colore ambra a seguito dell'invasione del fungo (Fig. 12).

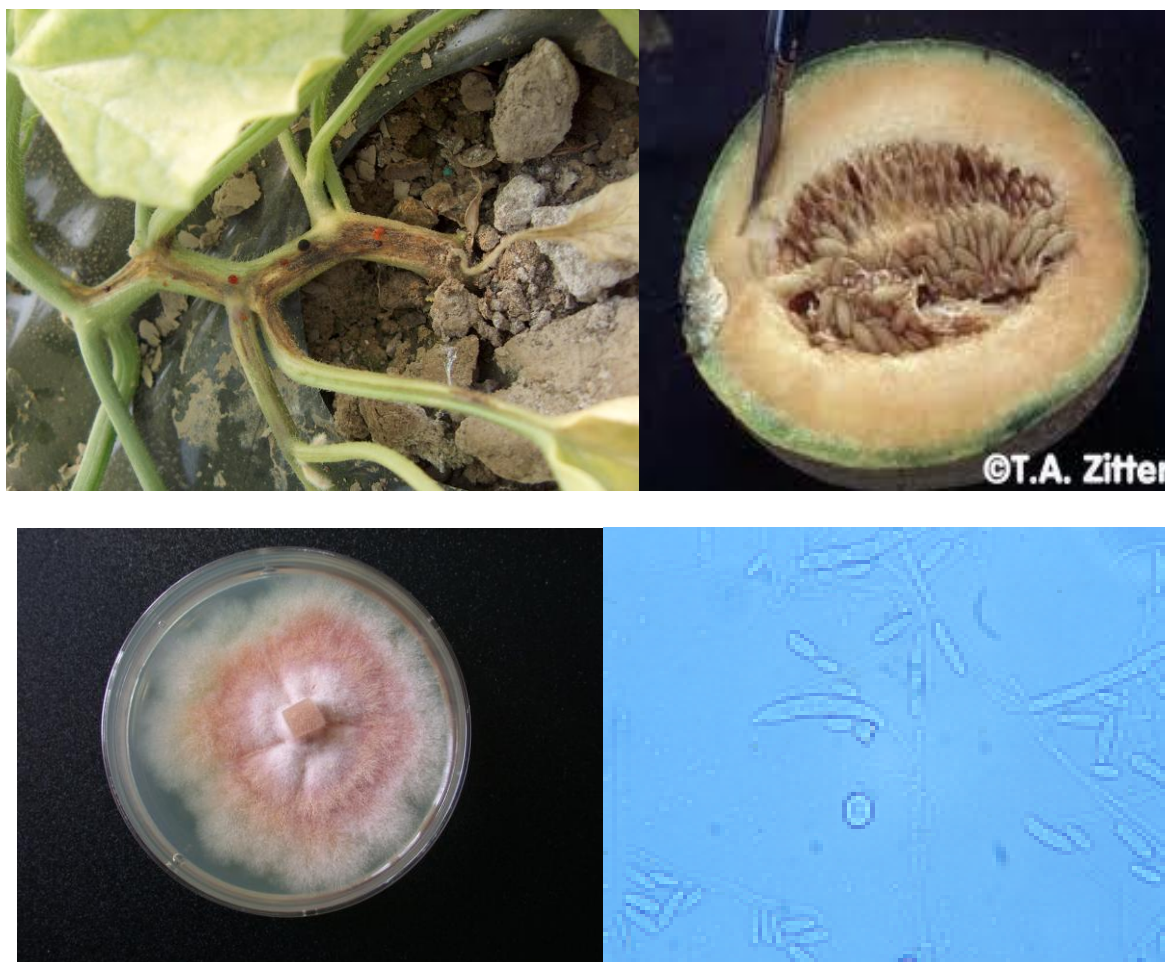


Fig. 12 – Base del fusto e sezione longitudinale di frutto di melone con sintomi di tracheofusariosi (in alto). Colonia e conidi di *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (in basso).

GESTIONE DELLE PROVE IN SERRA

La soppressione *in vivo* generata dei SELW di miscanto, canna comune e paglia di grano sui funghi patogeni sopra descritti è stata valutata sulle otto combinazioni specifiche fungo patogeno/ospite vegetale (patosistemi) descritte e comuni nei sistemi ortivi praticati sotto serra in Puglia. Le percentuali di soppressione delle diverse malattie sono state quantitativamente valutate attraverso biosaggi eseguiti in serra. I seguenti otto patosistemi sono stati testati per valutare la soppressività di SELW di miscanto, canna comune e paglia di grano (*A. alternata*/frutti di pomodoro, *B. cinerea*/frutti di pomodoro, *C. acutatum*/fragole, *C. fulvum*/foglie di pomodoro, FOL/piante di pomodoro, FOM/piante di melone, *F. solani* f. sp. *pisii*/piante di pisello e *V. dahliae*/piante di

melanzana). Colonie di *A. alternata*, *B. cinerea*, *C. acutatum*, *C. fulvum*, FOL, FOM, *F. solani* f. sp. *pisi* e *V. dahliae*, cresciute su PDA a 24 ± 2 °C per 1-2 settimane al buio, sono state omogeneizzate in acqua distillata sterile fino ad ottenere sospensioni conidiche contenenti 10^4 Unità Formanti Colonie/mL che perciò sono state usate come inoculo nelle prove di infezione artificiale. Piante sane di pomodoro (cv. Super Marmande), fragola (cv. Anabelle), melone (cv. Rugoso di Cosenza), pisello (cv. Suprema) e melanzana (cv. Florida Market) sono state allevate in vivaio al riparo da contaminazioni fungine e perciò usate come ospiti sani suscettibili nelle stesse prove. I *tests* biologici per misurare la soppressività di ogni SELW; applicati sia sottoforma di *spray* su foglie di pomodoro e su frutti di pomodoro e fragola, sia sottoforma di sospensione acquosa sull'apparato radicale di piantine di pomodoro, melone, pisello e melanzana; sono stati condotti in due serre ad elevata efficienza energetica nel sito sperimentale di Valenzano (Bari) e termo-condizionate con un impianto a biomassa per il riscaldamento invernale. Per ogni patosistema è stata valutata la soppressività in trattamenti sia preventivi che curativi.

ESECUZIONE DEI TRATTAMENTI CURATIVI E PREVENTIVI PER LE MALATTIE TRASMESSE ATTRAVERSO L'ARIA

Nei quattro patosistemi relativi a malattie dell'apparato aereo (frutti e foglie) di pomodoro e fragola trasmesse attraverso l'aria (*A. alternata*/pomodoro, *B. cinerea*/pomodoro, *C. acutatum*/fragole e *C. fulvum*/pomodoro), le piante sono state testate nello stadio di fruttificazione. Nel corso dei trattamenti curativi, 10 unità asintomatiche (foglie/frutti) di ogni pianta saggiata sono state prima spruzzate con una sospensione conidica di *A. alternata* (su frutti di pomodoro), *B. cinerea* (su frutti di pomodoro), *C. acutatum* (su fragole) e *C. fulvum* (su foglie di pomodoro). Poi, 5 foglie/frutti di questi sono stati spruzzati con ciascun SELW alle diluizioni di 1:2, 1:4 e 1:8 con acqua d'irrigazione dopo 12 ore dall'inoculazione; mentre le restanti 5 foglie/frutti sono state usate come controllo e perciò spruzzate solo con acqua d'irrigazione dopo 12 ore dall'inoculazione. Nei trattamenti preventivi, 5 unità asintomatiche (foglie/frutti) di ogni pianta saggiata sono state prima spruzzate con ciascuna SELW alle diluizioni di 1:2, 1:4 e 1:8 con acqua d'irrigazione; mentre altre 5 foglie/frutti asintomatici della stessa pianta sono stati usati come controllo e perciò spruzzate solo con acqua d'irrigazione. Poi, tutte le 10 unità asintomatiche (foglie/frutti) trattate della stessa pianta sono state inoculate artificialmente (spruzzate) con ciascuna sospensione conidica dopo 12 ore dal trattamento. Le piante sono state mantenute in serra a 24 ± 3 °C e $90 \pm 5\%$ Umidità Relativa (U. R.) fino alla comparsa di sintomi di marciume sulle bacche di pomodoro e sui frutti di fragola e di muffa sulle foglie di pomodoro (Goidànich e Casarini, 1988).

Inoltre, sono state eseguite osservazioni qualitative sugli eventuali effetti fitotossici causati dai reflui sulle superfici delle foglie e dei frutti, sia alla fine dei *tests* biologici che durante la vita commerciale dei frutti. Infine, anche la fragranza e gli aromi dei frutti di pomodoro e fragola trattati con ciascun SELW sono stati valutati qualitativamente dopo 15 giorni dalla raccolta mediante procedure standard di analisi sensoriale.

ESECUZIONE DEI TRATTAMENTI CURATIVI E PREVENTIVI PER LE MALATTIE TRASMESSE ATTRAVERSO IL SUOLO

Nei quattro patosistemi relativi a malattie dell'apparato radicale di pomodoro, melone, pisello e melanzana trasmesse attraverso il suolo (FOL/pomodoro, FOM/melone, *F. solani* f. sp. *pisi*/pisello e *V. dahliae*/melanzana), le piante sono state inoculate artificialmente allo stadio di plantula durante il loro trapianto in filari contenenti torba disinfestata con calore umido. Nel corso dei trattamenti curativi, l'apparato radicale di piante di 8-10 giorni è stato immerso per 2-3 minuti in una sospensione conidica di FOL (per il pomodoro), FOM (per il melone), *F. solani* f. sp. *pisi* (per il

pisello) e *V. dahliae* (per la melanzana); poi, per 3 minuti in una sospensione acquosa di ogni SELW diluito 1:2, 1:4 e 1:8 con acqua d'irrigazione dopo 5 minuti dall'inoculazione. Nei trattamenti preventivi, l'apparato radicale è stato immerso prima in una sospensione acquosa di ogni SELW diluito 1:2, 1:4 e 1:8 con acqua d'irrigazione per 3 minuti, e poi per 2-3 minuti in ciascuna sospensione fungina dopo 5 minuti dal trattamento. Le piante di controllo sono state invece immerse in acqua d'irrigazione per entrambi i trattamenti, ed inoculate con i funghi allo stesso modo di quelle test. Le piante sono state poi tutte mantenute in serra a 22 ± 2 °C e $80 \pm 3\%$ U. R. fino alla comparsa di sintomi di avvizzimento ed imbrunimenti vascolari su pomodoro, melone e melanzana e di marciume delle radici e del colletto su pisello (Goidànich e Casarini, 1988).

VALUTAZIONE DELLA PERCENTUALE DI SOPPRESSIONE DELLA MALATTIA

I sintomi di malattia relativi a ciascun patosistema sono stati valutati visivamente su ogni pianta saggiata, e la frequenza delle unità con sintomi di malattia, ovvero il numero di foglie, di frutti o di piante intere mostranti i sintomi specifici delle diverse malattie (Figure 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12), sono state contate dalla prima apparizione dei sintomi fino alla fine del periodo di osservazione, diverso per ogni patosistema, variabile da 15 a 60 giorni.

In relazione alla relazione quantitativa fra l'effetto antifungino dei diversi SELW testati alle tre diluizioni, il livello di soppressività delle malattie dei lotti trattati è stato comparato con quello dei rispettivi lotti di controllo, attraverso il calcolo dell'Indice percentuale di Soppressione della Malattia (DSI %):

$$\% \text{ DSI} = [(N_P - N_M) / N_P] \times 100$$

(N_M = media della frequenza delle unità malate nei lotti trattati con ogni SELW alle tre diluizioni; N_P = media della frequenza delle unità malate nei lotti di controllo).

RISULTATI E DISCUSSIONE

DETERMINAZIONE DEGLI INIBITORI MICROBICI NEI REFLUI DA *STEAM-EXPLOSION*

I risultati analitici condotti sui campioni di refluo di miscanto, paglia di grano e canna comune sono riportati nella Tabella 1.

Inibitori microbici	Refluo da biomassa esplosa di miscanto (g/L)	Refluo da biomassa esplosa di paglia (g/L)	Refluo da biomassa esplosa di canna (g/L)
2-furaldeide (furfurale)	0.43	2.51	0.34
5-idrossimetilfurfurale (5-HMF)	tracce	tracce	tracce
Acido Acetico	4.77	2.14	1.31
Acido Formico	1.49	0.42	0.14

Tab. 1 – Composizione in furfurali ed acidi organici volatili presenti in reflui da biomassa esplosa di miscanto, paglia di grano e canna comune.

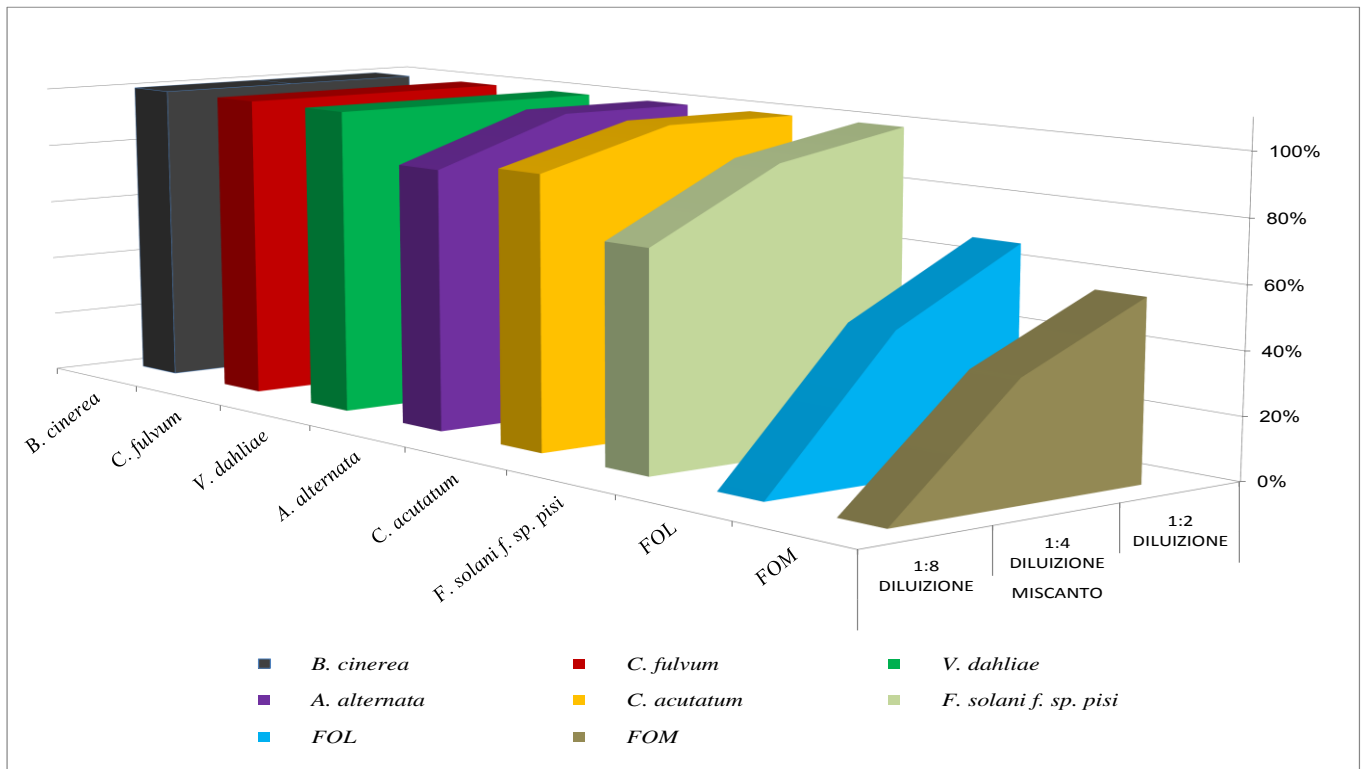
STUDIO DELL'INIBIZIONE *IN VITRO*

Le percentuali di inibizione della crescita miceliare e di germinazione conidica a 24 ore d'incubazione degli 8 isolati fungini fitopatogeni saggiati a seguito dell'aggiunta di SELW di miscanto, paglia di grano e canna comune alle tre diluizioni (1:2, 1:4 e 1:8), sono riportate in ordinate dei grafici descritti nelle Figure 13, 14 e 15.

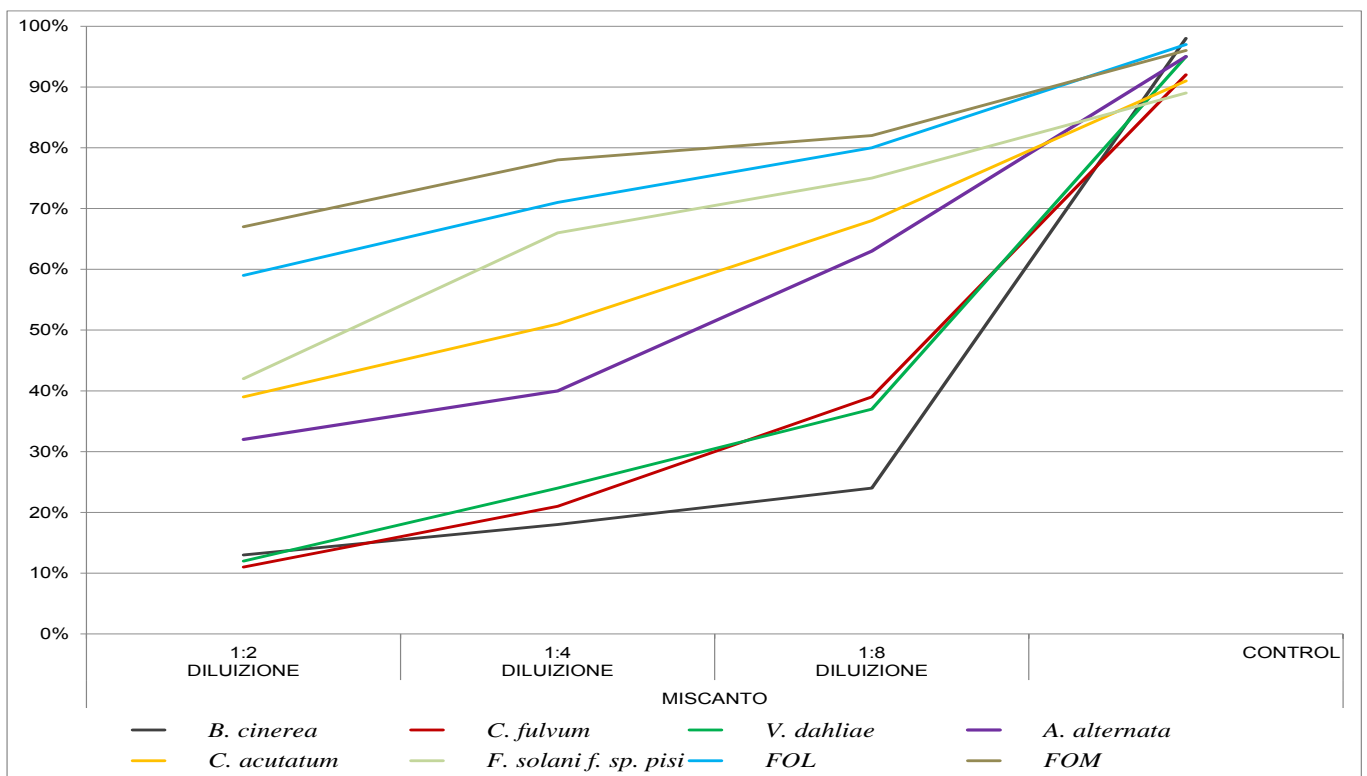
Appare evidente che il refluo di miscanto (Fig. 13) è quello che ha ottenuto il miglior effetto soppressivo su tutti gli isolati fra tutti quelli saggiati sia in termini di inibizione della crescita miceliare che in quello di germinazione conidica. L'inibizione miceliare è stata totale (100%) su *B. cinerea*, *C. fulvum* e *V. dahliae* a tutte le tre diluizioni determinando effetti fungi-tossici, ed ha anche raggiunto valori molto vicini al 100% su *A. alternata*, *C. acutatum* e *F. solani* f. sp. *pisi* alla diluizione di 1:4, mentre l'inibizione decresceva intorno al 60% alla diluizione di 1:8. Scarsi effetti inibitori sono stati osservati su FOL e FOM a parità di diluizione. Analoga distribuzione la si è osservata sulla germinazione conidica: per *B. cinerea*, *C. fulvum* e *V. dahliae* la germinazione è stata significativamente soppressa rispetto al controllo a tutte le tre diluizioni; per *A. alternata*, *C. acutatum* e *F. solani* f. sp. *pisi* la germinazione è stata significativamente soppressa alle diluizioni di 1:2 e 1:4 ma non a 1:8; infine, per FOL e FOM gli effetti soppressivi sono stati poco significativi rispetto al controllo a parità di diluizione. Passando all'esame dei risultati del refluo di paglia di grano (Fig. 14), appare evidente che questo è apparso un po' meno soppressivo di quello di miscanto a parità di rapporto di diluizione, sia in termini di inibizione della crescita miceliare che in quello di germinazione conidica. L'inibizione miceliare è stata del 100% su *B. cinerea*, *C. fulvum*, *V. dahliae*, *A. alternata*, *C. acutatum* e *F. solani* f. sp. *pisi* solo alla diluizione di 1:2 determinando solo effetti fungi-statici; mentre decresceva intorno al 40% alla diluizione di 1:8; e scarsissimi effetti inibitori sono stati osservati su FOL e FOM a parità di diluizione. Analoga distribuzione la si è osservata sulla germinazione conidica, ma con percentuali di germinazione che sono risultate significativamente più alte rispetto al refluo di miscanto. Passando, infine, a considerare i risultati del refluo di canna comune (Fig. 15), questo è apparso il meno soppressivo fra tutti quelli saggiati a parità di rapporto di diluizione, sia in termini di inibizione della crescita miceliare che in quello di germinazione conidica. Anche in questo caso si conferma che la crescita miceliare di *B. cinerea*, *C. fulvum*, *V. dahliae*, *A. alternata*, *C. acutatum* e *F. solani* f. sp. *pisi* è stata maggiormente inibita di quella di FOL e FOM a parità di diluizione; mentre significative soppressioni sulla germinazione conidica sono state osservate con evidenza solo su *B. cinerea*, *C. fulvum* e *V. dahliae*.

I risultati della cinetica di accrescimento dei conidi a 24, 48 e 72 ore d'incubazione in sospensioni fungine trattate con SELW di miscanto, paglia di grano e canna comune rispetto al controllo, sono riportati nelle Figure 16, 17 e 18 separatamente per ciascuna delle tre diluizioni (1:2, 1:4 e 1:8).

Appare evidente che i reflui di miscanto e paglia hanno ottenuto i migliori risultati rispetto al refluo di canna, sia in termini di blocco della crescita dei conidi germinati che in quello dell'allungamento delle ife germinative nel periodo di tempo che va dalle 48 alle 72 ore d'incubazione. Tale blocco si evidenzia nei grafici riportati nelle figure 16, 17 e 18 da incrementi trascurabili dei valori di assorbanza ottica (in ordinate) in questo intervallo di tempo. Tale effetto è risultato, pertanto, significativamente evidente su *B. cinerea*, *C. fulvum*, *V. dahliae*, *A. alternata*, *C. acutatum* e *F. solani* f. sp. *pisi*, ma non su FOL e FOM, sia alla diluizione di 1:2 (Fig. 16) che a quella di 1:4 (Fig. 17) a seguito del trattamento con refluo di miscanto e paglia. Il trattamento con refluo di canna, invece, non ha determinato significative differenze rispetto al controllo a queste due diluizioni. Per la diluizione di 1:8, infine, l'incremento dell'assorbanza non è risultato significativamente diverso da quello del controllo per tutti gli isolati fungini e per tutti i reflui saggiati (Fig. 18), evidenziando così una inefficacia soppressiva dei reflui se saggiati alla maggiore diluizione.

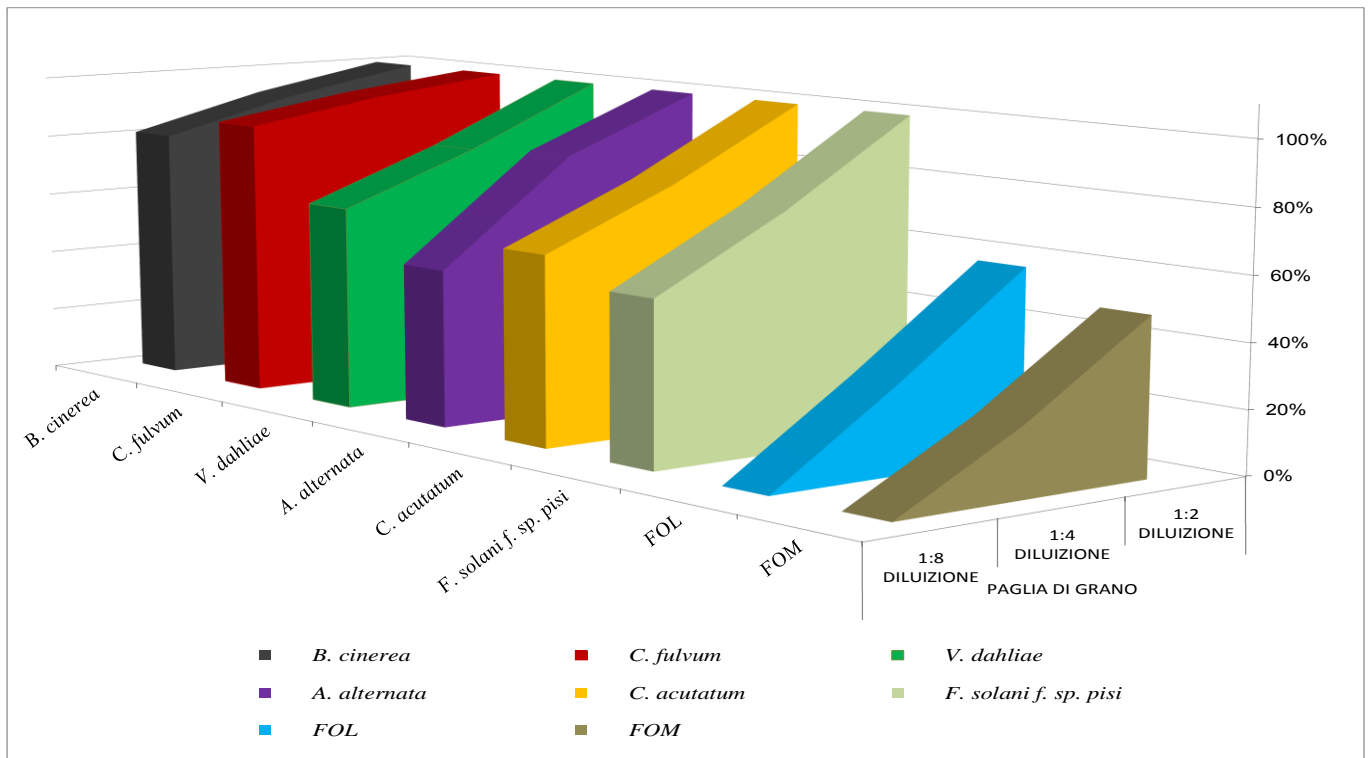


SELW DI MISCANTO

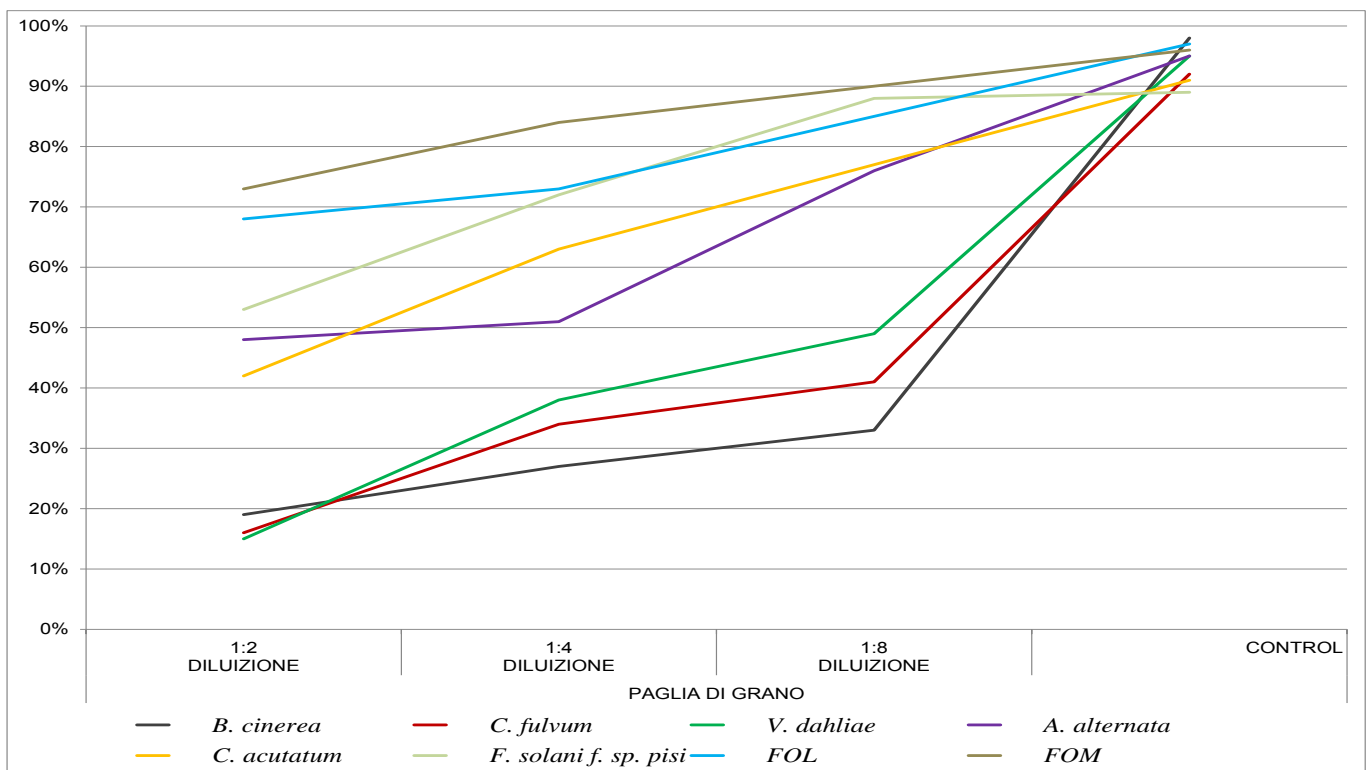


SELW DI MISCANTO

Fig. 13 – Percentuali di inibizione della crescita miceliare (sopra) e di germinazione conidica a 24 ore d'incubazione (sotto) di 8 isolati fungini fitopatogeni in seguito all'applicazione di 3 diluizioni (1:2, 1:4 e 1:8) di reflui (SELW) di miscanto rispetto al controllo.

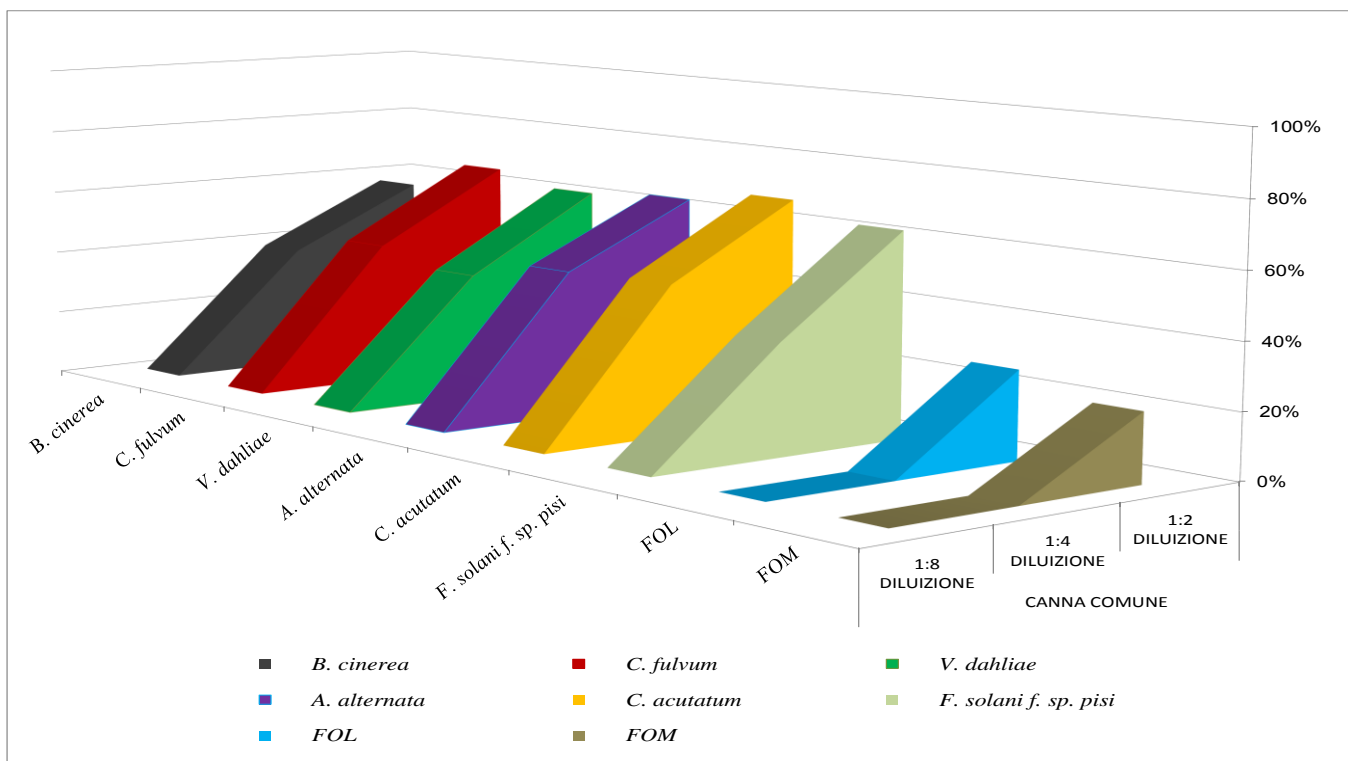


SELW DI PAGLIA DI GRANO

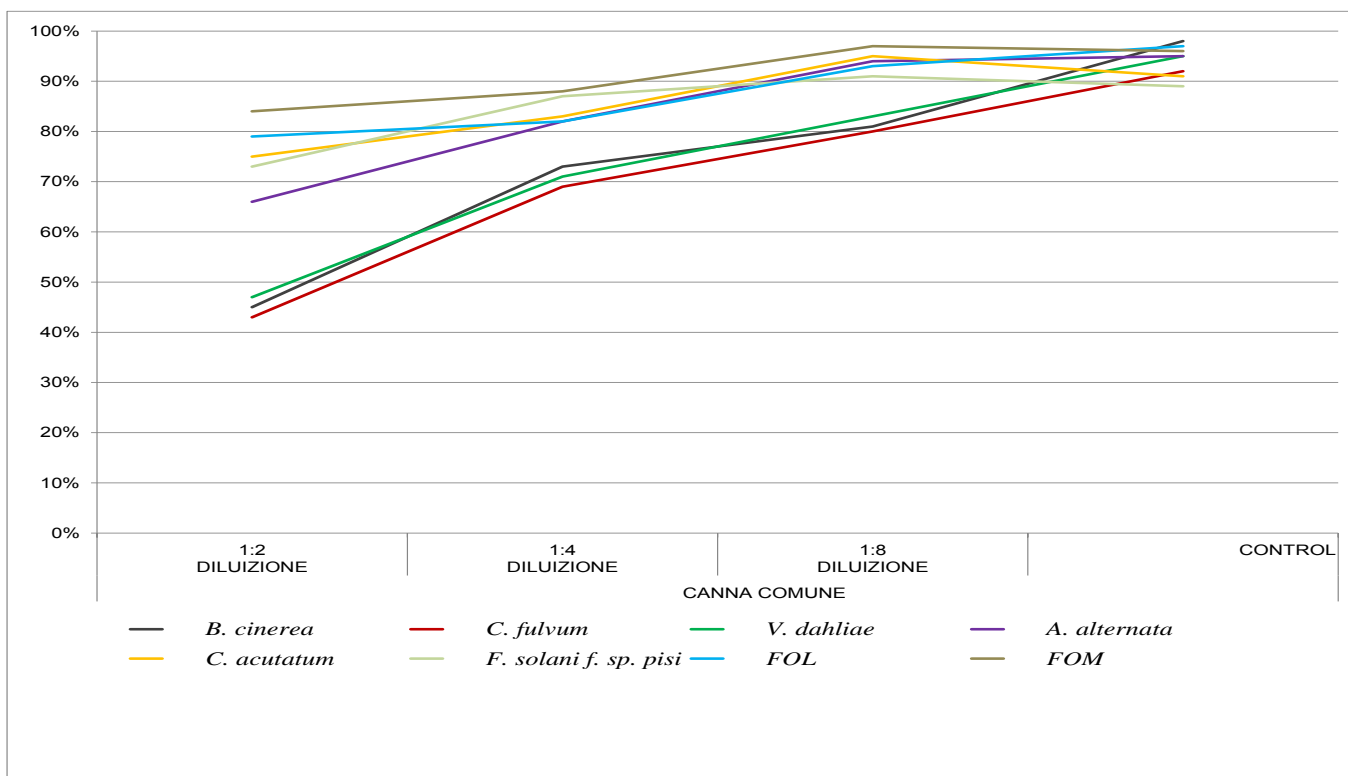


SELW DI PAGLIA DI GRANO

Fig. 14 – Percentuali di inibizione della crescita miceliare (sopra) e di germinazione conidica a 24 ore d'incubazione (sotto) di 8 isolati fungini fitopatogeni in seguito all'applicazione di 3 diluizioni (1:2, 1:4 e 1:8) di reflui (SELW) di paglia di grano rispetto al controllo.

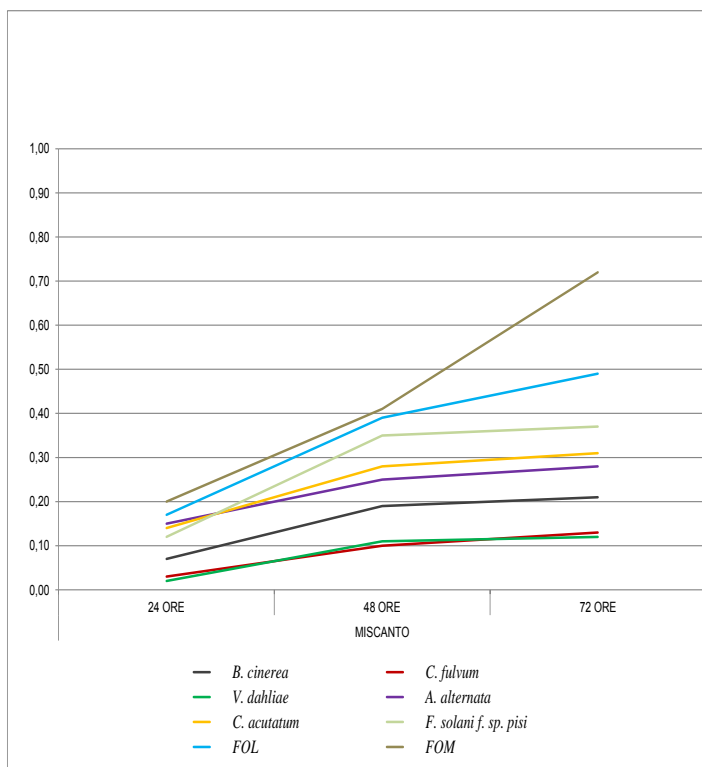


SELW DI CANNA COMUNE

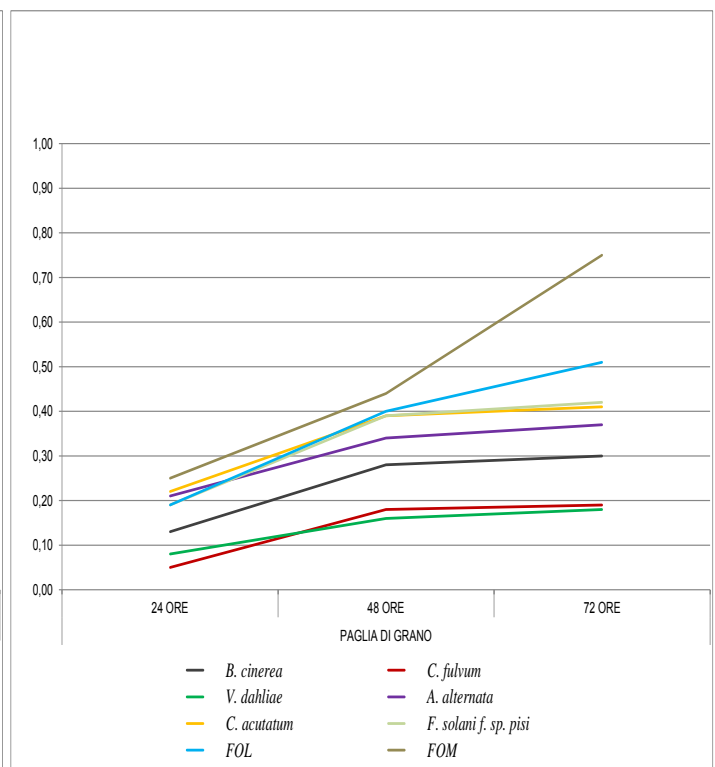


SELW DI CANNA COMUNE

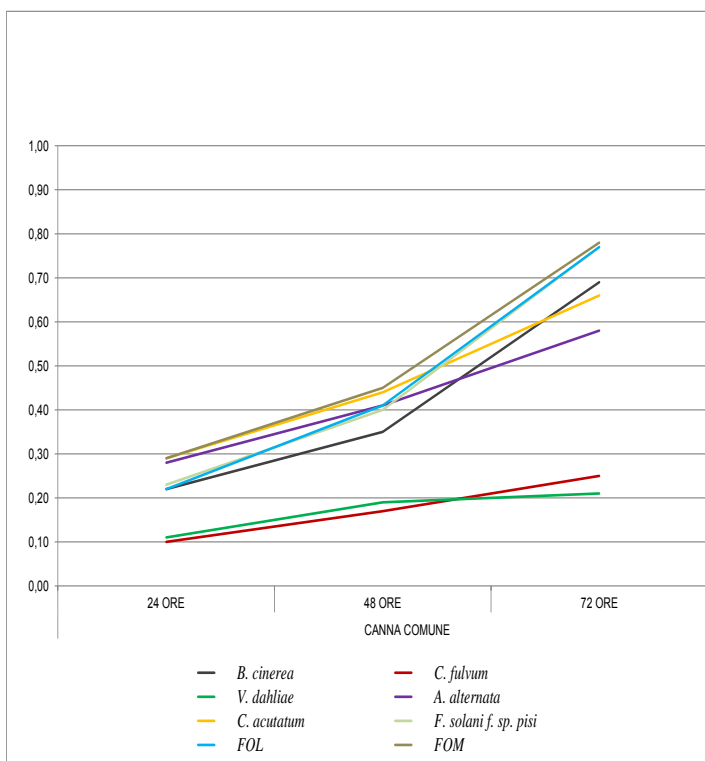
Fig. 15 – Percentuali di inibizione della crescita miceliare (sopra) e di germinazione conidica dopo 24 ore d'incubazione (sotto) di 8 isolati fungini fitopatogeni in seguito all'applicazione di 3 diluizioni (1:2, 1:4 e 1:8) di reflui (SELW) di canna comune rispetto al controllo.



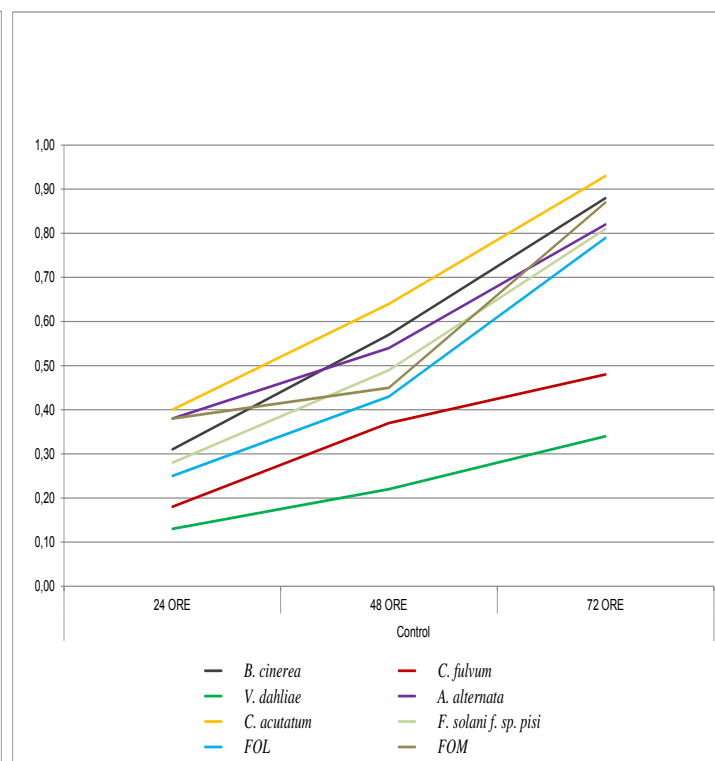
SELW DI MISCANTO DIL. 1:2



SELW DI PAGLIA DI GRANO DIL. 1:2

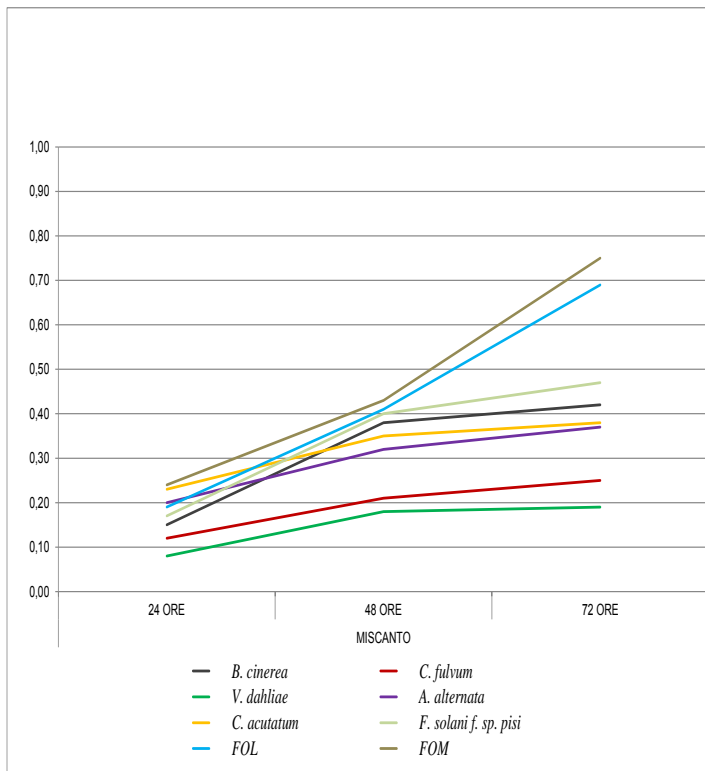


SELW DI CANNA DIL. 1:2

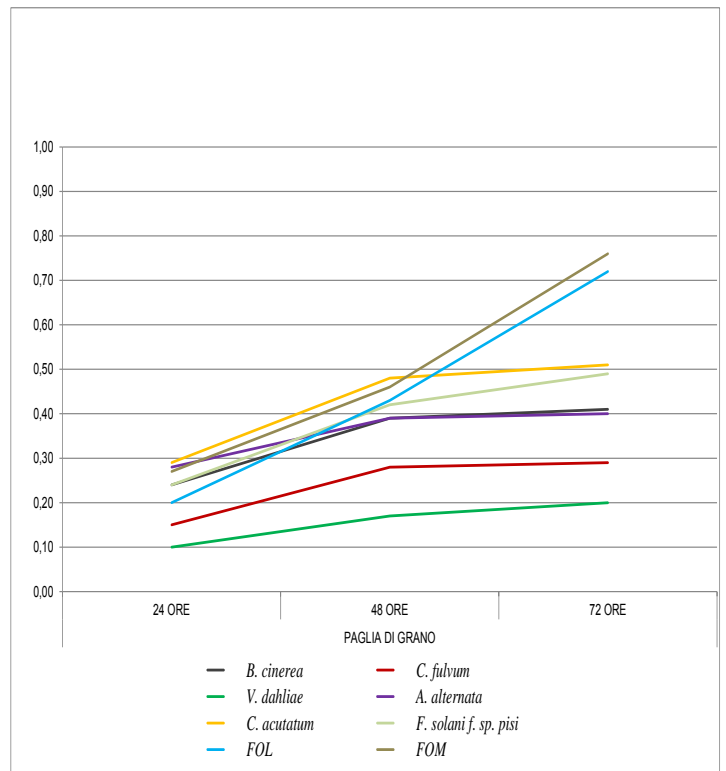


CONTROLLO

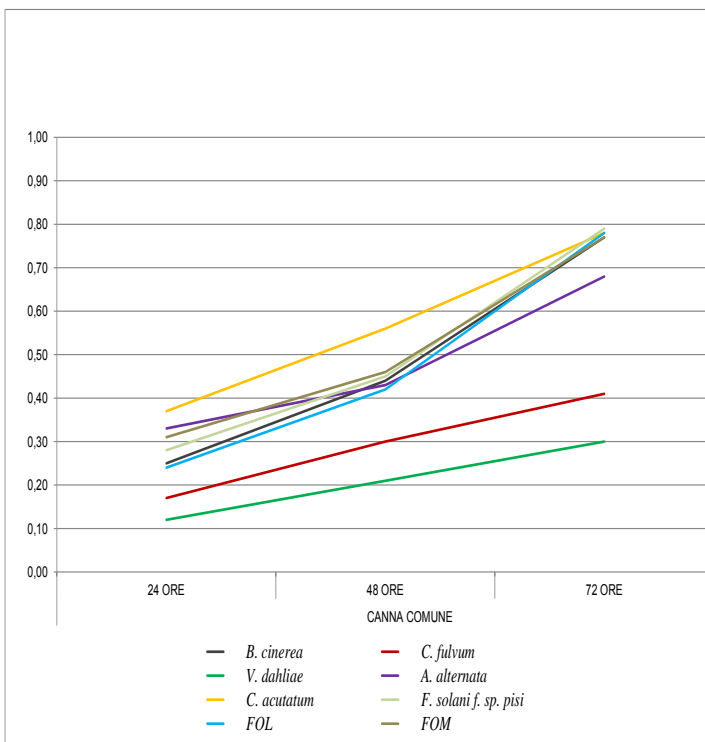
Fig. 16 – Cinetica della crescita conidica a 24, 48 e 72 ore d'incubazione in sospensioni trattate con reflui (SELW) di miscanto, paglia di grano e canna comune alla diluizione di 1:2 rispetto al controllo.



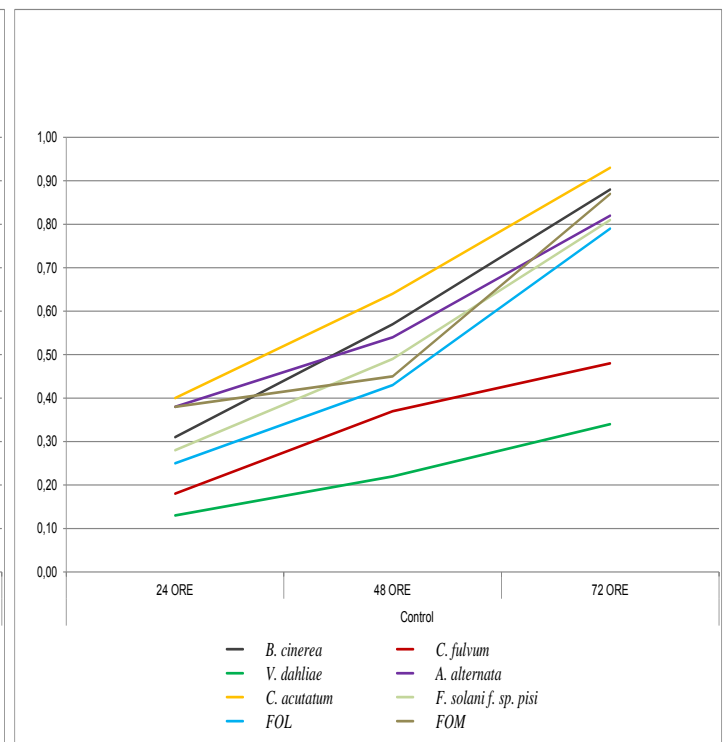
SELW DI MISCANTO DIL. 1:4



SELW DI PAGLIA DI GRANO DIL. 1:4

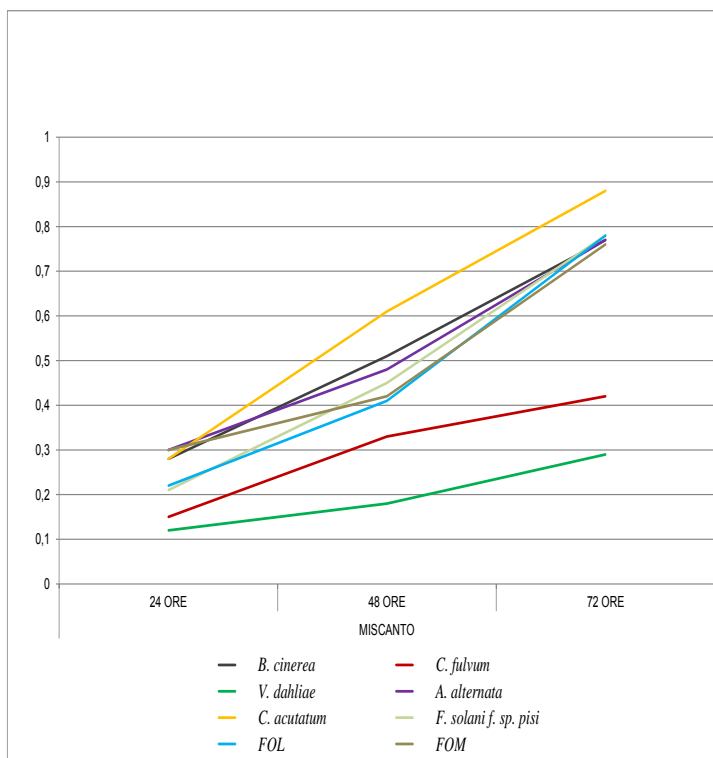


SELW DI CANNA DIL. 1:4

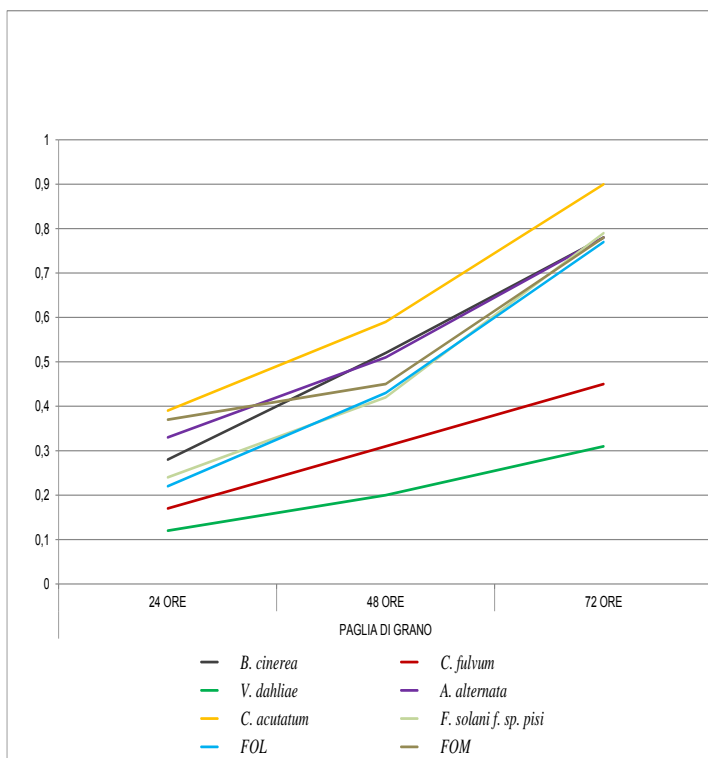


CONTROLLO

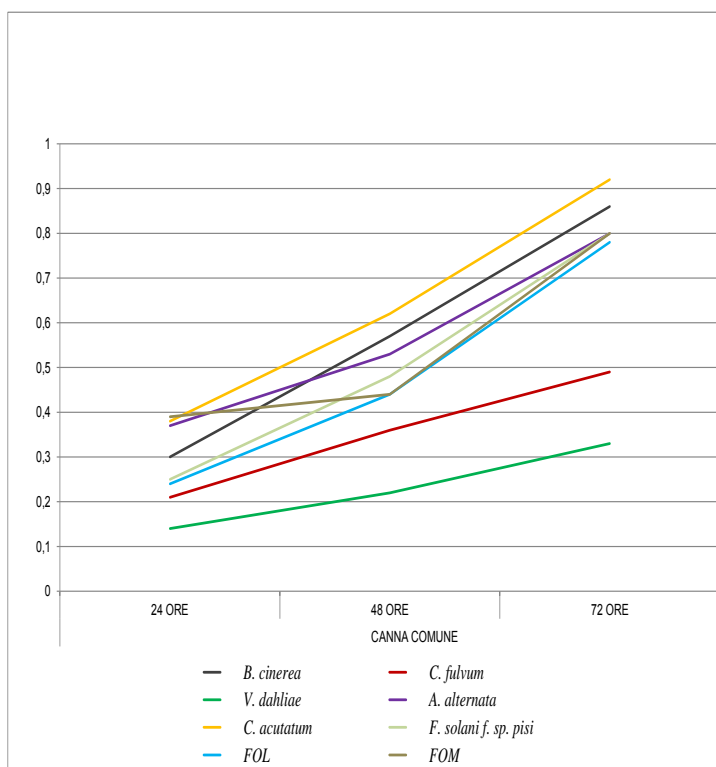
Fig. 17 – Cinetica della crescita conidica a 24, 48 e 72 ore d'incubazione in sospensioni trattate con reflui (SELW) di miscanto, paglia di grano e canna comune alla diluizione di 1:4 rispetto al controllo.



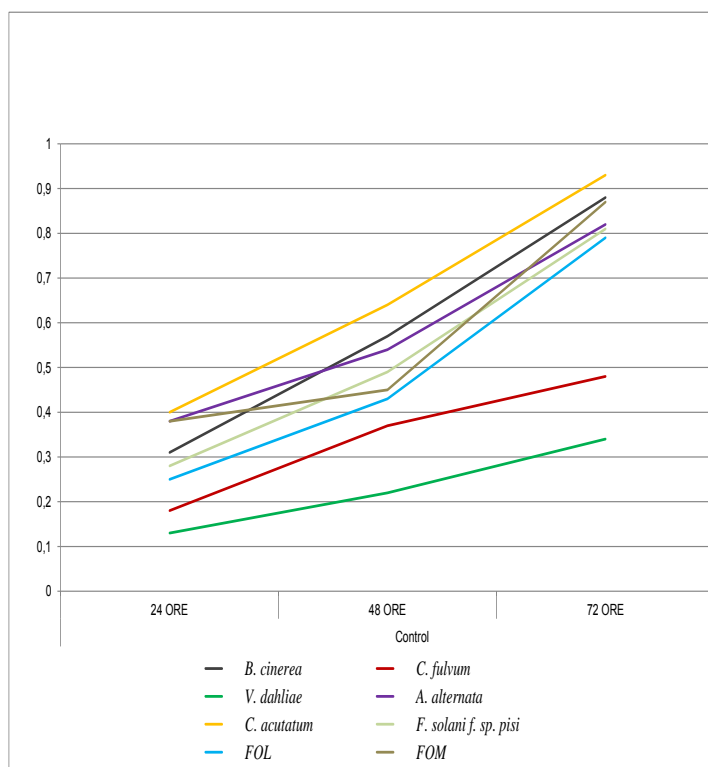
SELW DI MISCANTO DIL. 1:8



SELW DI PAGLIA DI GRANO DIL. 1:8



SELW DI CANNA DIL. 1:8



CONTROLLO

Fig. 18 – Cinetica della crescita conidica a 24, 48 e 72 ore d'incubazione in sospensioni trattate con reflui (SELW) di miscanto, paglia di grano e canna comune alla diluizione di 1:8 rispetto al controllo.

STUDIO DELLA SOPPRESSIONE *IN VIVO*

EFFETTO DEL TRATTAMENTO PREVENTIVO PER LE MALATTIE TRASMESSE ATTRAVERSO L'ARIA

Le percentuali di soppressione del marciume dei frutti di pomodoro nei patosistemi *B. cinerea*/pomodoro e *A. alternata*/pomodoro, della cladosporiosi del pomodoro e dell'antracnosi della fragola nei patosistemi *C. fulvum*/pomodoro e *C. acutatum*/fragola, a seguito di trattamenti preventivi con reflu di miscanto, paglia e canna diluiti 1:2, 1:4 e 1:8, sono riportate in ordinate dei grafici descritti nelle Figure 19 e 20. In tutti e quattro i patosistemi si evidenzia una significativa efficacia del trattamento con il reflu di miscanto, che ha consentito di raggiungere valori di soppressione intorno al 70-80% se applicato alla diluizione di 1:2. Tale efficacia si è quasi dimezzata se applicato alla diluizione di 1:4, mentre non c'è stata alcuna soppressione alla diluizione di 1:8. L'applicazione del reflu di paglia ha consentito di ottenere percentuali di soppressione intorno al 40-55% se considerato alla diluizione di 1:2. Anche in questo caso l'efficacia soppressiva di questo reflu si è circa dimezzata ed annullata del tutto se applicato, rispettivamente, alle diluizioni di 1:4 e 1:8. Infine, l'uso del reflu di canna non ha sortito risultati incoraggianti anche se applicato alla diluizione di 1:2, eccetto che per il patosistema *C. acutatum*/fragola ove è stato raggiunto un modesto 25% di soppressione della malattia.

EFFETTO DEL TRATTAMENTO CURATIVO PER LE MALATTIE TRASMESSE ATTRAVERSO L'ARIA

Le percentuali di soppressione del marciume dei frutti di pomodoro nei patosistemi *B. cinerea*/pomodoro e *A. alternata*/pomodoro, della cladosporiosi del pomodoro e dell'antracnosi della fragola nei patosistemi *C. fulvum*/pomodoro e *C. acutatum*/fragola, a seguito di trattamenti curativi con reflu di miscanto, paglia e canna diluiti 1:2, 1:4 e 1:8, sono riportate in ordinate dei grafici descritti nelle Figure 19 e 20. Un'analoga distribuzione dei valori di soppressione delle malattie è stata osservata nei trattamenti curativi rispetto a quelli preventivi. Va evidenziato che, a parità di tutte le condizioni sperimentali adottate, ciascun trattamento curativo è risultato ridotto di efficacia del 10-15% rispetto al corrispondente trattamento preventivo. In particolare, va rilevato che il trattamento curativo con il reflu di paglia di grano è risultato del tutto inefficace su tutti e quattro i patosistemi anche se applicato alla diluizione di 1:4.

EFFETTO DEI TRATTAMENTI SULLA QUALITÀ DEI FRUTTI

I frutti di pomodoro e di fragola artificialmente inoculati con i funghi e non mostranti i sintomi di marciume conseguentemente al trattamento con i reflui, sono stati mantenuti in osservazione per altri 15 giorni dopo la raccolta in una cella refrigerata. Trascorso tale periodo, ne sono stati valutati: i caratteri organolettici mediante l'allestimento di un *panel test* che ha adottato procedure standard di analisi sensoriale, eventuali danni fitotossici anche a carico delle foglie di pomodoro di piante trattate contro la cladosporiosi, nonché eventuali recidive delle malattie. Da queste osservazioni è risultato che i frutti di pomodoro e di fragola non hanno mostrato né recidive della malattia, mantenendosi perfettamente sani ed esenti da sintomi, né sintomi fitotossici dovuti all'applicazione dei reflui, né alterazioni organolettiche rispetto ai frutti né inoculati e né trattati che sono stati perciò usati come controllo. Anche le foglie di piante di pomodoro trattate contro la cladosporiosi non hanno mostrato né segni di fitotossicità e né recidiva della malattia anche dopo 15 giorni dall'ultimo rilievo in serra.

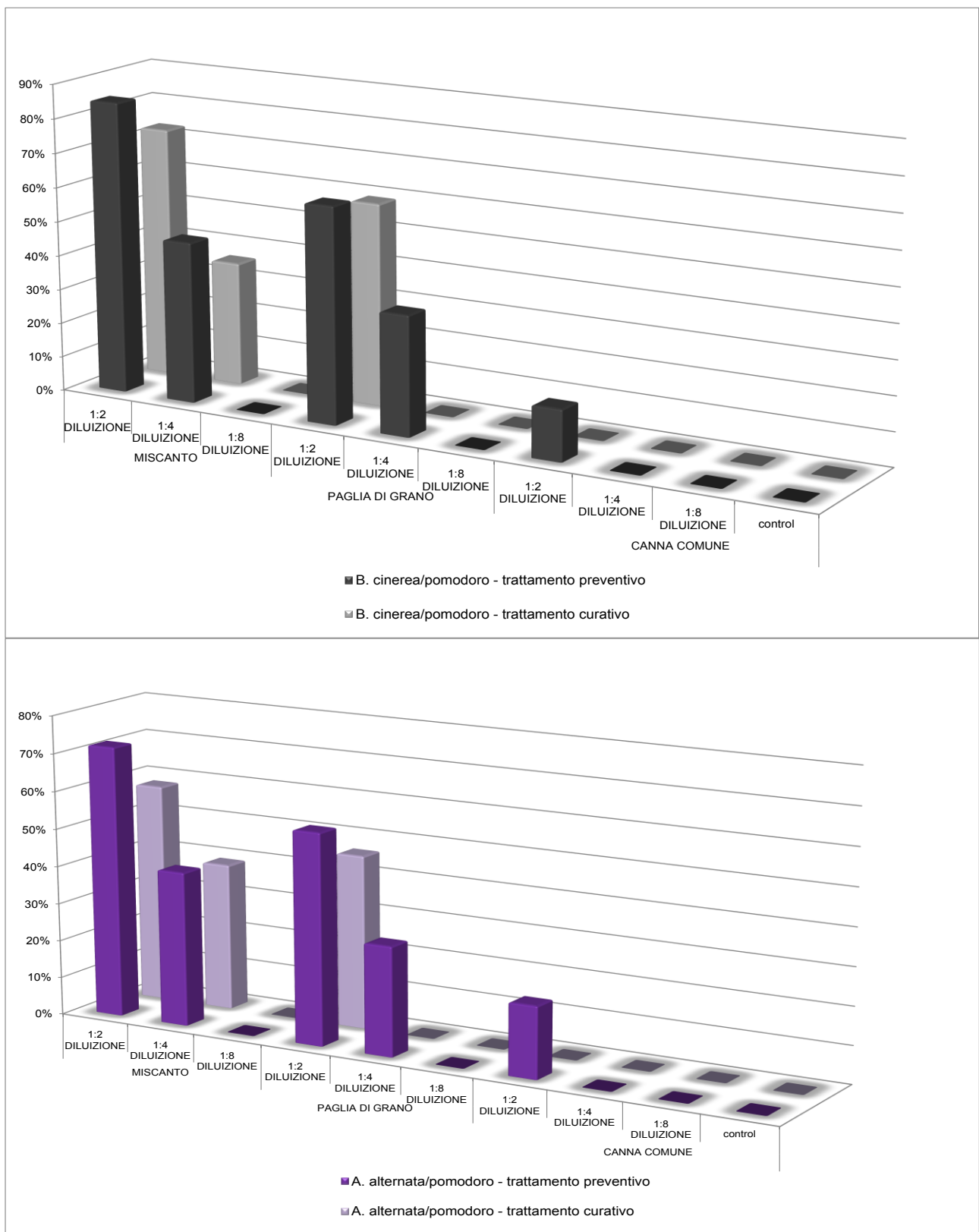


Fig. 19 – Percentuali di soppressione del marciume dei frutti di pomodoro nei patosistemi *B. cinerea*/pomodoro (sopra) e *A. alternata*/pomodoro (sotto) a seguito di trattamenti preventivi e curativi con refluo di miscanto, paglia e canna (diluiti 1:2, 1:4 e 1:8) rispetto al controllo.

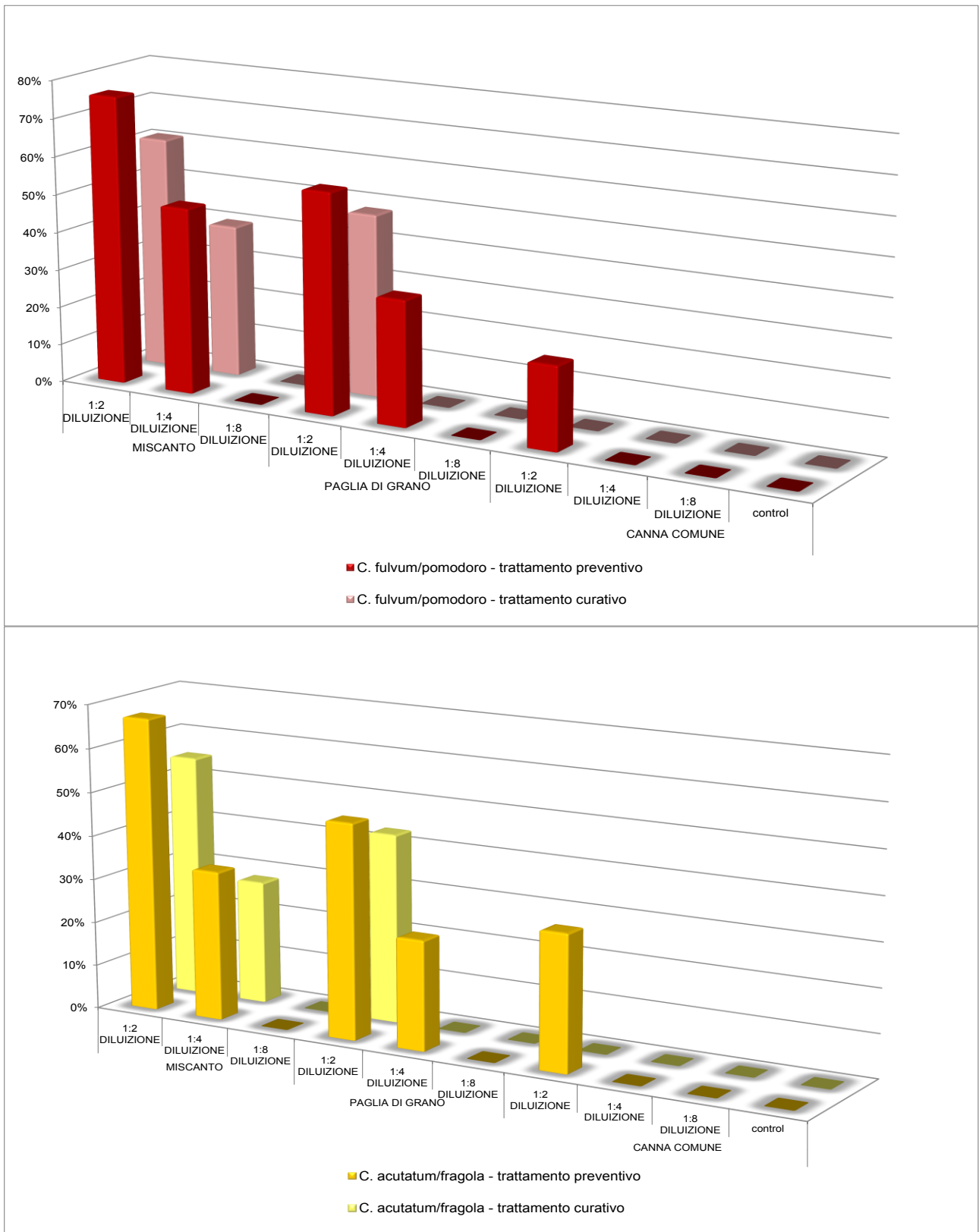


Fig. 20 – Percentuali di soppressione della cladosporiosi del pomodoro (sopra) e dell'antracnosi della fragola (sotto) nei patosistemi *C. fulvum*/pomodoro e *C. acutatum*/fragola a seguito di trattamenti preventivi e curativi con refluo di miscanto, paglia e canna (diluiti 1:2, 1:4 e 1:8) rispetto al controllo.

EFFETTO DEL TRATTAMENTO PREVENTIVO PER LE MALATTIE TRASMESSE ATTRAVERSO IL SUOLO

Le percentuali di soppressione della tracheovorticilliosi della melanzana, del marciume dei fusti di pisello, della tracheofusariosi del pomodoro e del melone nei patosistemi *V. dahliae*/melanzana, *F. solani* f. sp. *pisi*/pisello, FOL/pomodoro e FOM/melone, a seguito di trattamenti preventivi con refluo di miscanto, paglia e canna diluiti 1:2, 1:4 e 1:8, sono riportate in ordinate dei grafici descritti nelle Figure 21 e 22. Nei patosistemi *V. dahliae*/melanzana e *F. solani* f. sp. *pisi*/pisello si evidenzia una soddisfacente efficacia del trattamento con il refluo di miscanto, che ha consentito di raggiungere valori di soppressione intorno al 45-55% se applicato alla diluizione di 1:2. Tale efficacia si è ridotta se applicato alla diluizione di 1:4, mentre non c'è stata alcuna soppressione alla diluizione di 1:8. L'applicazione del refluo di paglia ha consentito di ottenere percentuali di soppressione intorno al 30-35% se considerato alla diluizione di 1:2. Anche in questo caso l'efficacia soppressiva di questo refluo si è considerevolmente ridotta ed annullata del tutto se applicato, rispettivamente, alle diluizioni di 1:4 e 1:8. Infine, l'uso del refluo di canna non ha sortito risultati incoraggianti anche se applicato alla diluizione di 1:2, eccetto che per il patosistema *F. solani* f. sp. *pisi*/pisello ove è stato raggiunto un modesto 23% di soppressione della malattia. Invece, insoddisfacenti del tutto sono stati gli effetti soppressivi ottenuti (circa il 18%) nei patosistemi FOL/pomodoro e FOM/melone anche a seguito del trattamento preventivo con il refluo di miscanto alla diluizione di 1:2.

EFFETTO DEL TRATTAMENTO CURATIVO PER LE MALATTIE TRASMESSE ATTRAVERSO IL SUOLO

Le percentuali di soppressione della tracheovorticilliosi della melanzana, del marciume dei fusti di pisello, della tracheofusariosi del pomodoro e del melone nei patosistemi *V. dahliae*/melanzana, *F. solani* f. sp. *pisi*/pisello, FOL/pomodoro e FOM/melone, a seguito di trattamenti curativi con refluo di miscanto, paglia e canna diluiti 1:2, 1:4 e 1:8, sono riportate in ordinate dei grafici descritti nelle Figure 21 e 22. Anche per questo lotto di trattamenti va rilevata un'analogia distribuzione dei valori di soppressione della tracheovorticilliosi della melanzana e del marciume dei fusti di pisello nei trattamenti curativi rispetto a quelli preventivi. Va evidenziato che, a parità di tutte le condizioni sperimentali adottate, ciascun trattamento curativo è risultato significativamente ridotto di efficacia rispetto al corrispondente trattamento preventivo. In particolare, va rilevato che il trattamento curativo con il refluo di paglia di grano è risultato del tutto inefficace sui patosistemi *V. dahliae*/melanzana e *F. solani* f. sp. *pisi*/pisello anche se applicato alla diluizione di 1:4. Infine, si conferma che insoddisfacenti del tutto sono stati gli effetti soppressivi ottenuti (circa il 14%) nei patosistemi FOL/pomodoro e FOM/melone anche a seguito di un trattamento curativo con il refluo di miscanto alla diluizione di 1:2.

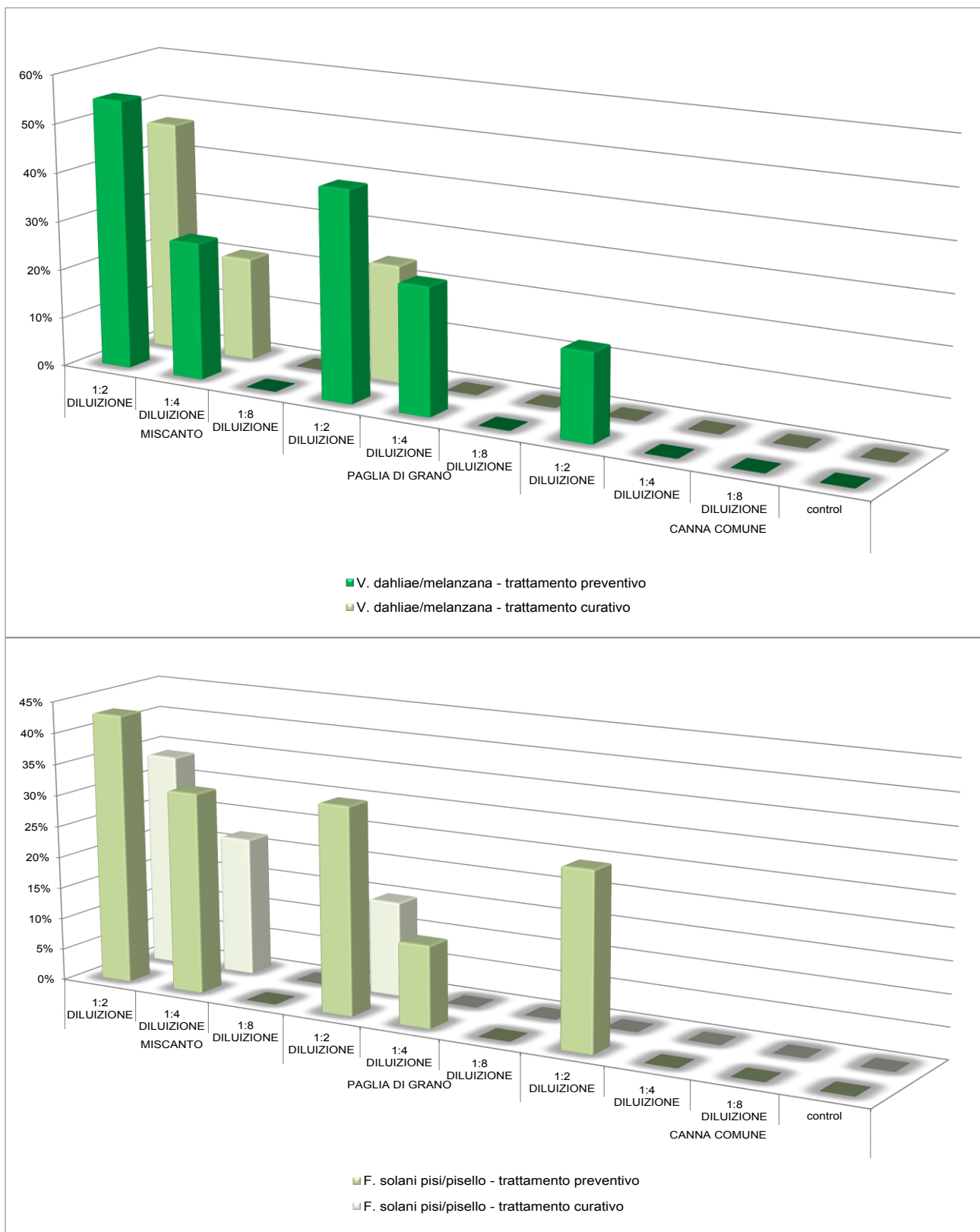


Fig. 21 – Percentuali di soppressione della tracheovorticilliosi della melanzana (sopra) e del marciume del colletto e delle radici di pisello (sotto) nei patosistemi *V. dahliae*/melanzana e *F. solani* f. sp. *psii*/pisello a seguito di trattamenti preventivi e curativi con reflui di miscanto, paglia e canna (diluiti 1:2, 1:4 e 1:8) rispetto al controllo.

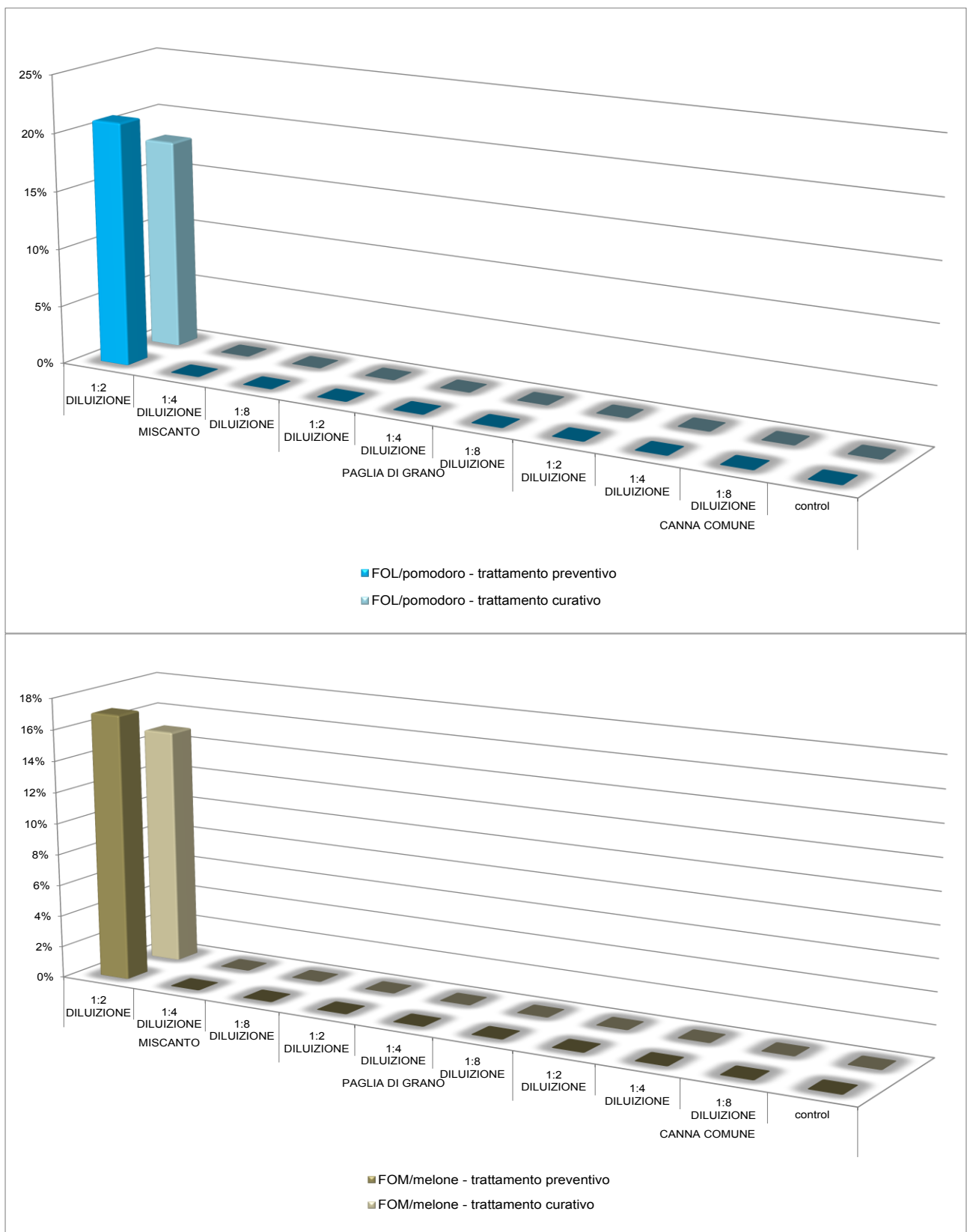


Fig. 22 – Percentuali di soppressione della tracheofusariosi del pomodoro (sopra) e del melone (sotto) nei patosistemi FOL/pomodoro e FOM/melone a seguito di trattamenti preventivi e curativi con reflui di miscanto, paglia e canna (diluiti 1:2, 1:4 e 1:8) rispetto al controllo.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti da questa ricerca permettono quindi di concludere che:

- 1) si fa sempre più urgente l'opportunità di dover integrare, nel più ampio contesto del processo industriale che porta alla produzione di bioetanolo di 2° generazione e di altri importanti *chemicals*, il trattamento specifico di rimozione del *mix* di inibitori dalle biomasse esplose prima dell'avvio della fermentazione in impianti-pilota;
- 2) questi reflui, considerati come rifiuti o sottoprodotti da smaltire, sono estremamente facili da maneggiare, conservare e stoccare in attesa del loro smaltimento e/o di una loro conveniente utilizzazione in agricoltura o in altri settori da indagare;
- 3) i dati sulla soppressione *in vivo* causata dai reflui di miscanto e paglia di grano (e, in minor misura, anche da quello di canna comune o *Arundo*) sono ritenuti molto incoraggianti se applicati alla diluizione di 1:2 con acqua di irrigazione su sei patosistemi (*A. alternata*/pomodoro, *B. cinerea*/pomodoro, *C. acutatum*/fragole, *C. fulvum*/pomodoro, *F. solani* f. sp. *pisi*/pisello e *V. dahliae*/melanzana) durante trattamenti preventivi alle foglie, ai frutti ed alle piantine;
- 4) questi reflui possono essere applicati con estrema facilità ed economicità su frutti, foglie e piantine durante le ordinarie operazioni di trapianto e/o di difesa degli organi epigei delle colture ortive qui considerate da infezioni fungine in sistemi-serra della Puglia;
- 5) il riscontro dell'assenza di alterazioni chimico-fisico-organolettiche a carico dei frutti di fragola e pomodoro trattati con questi reflui contenenti sostanze antimicrobiche volatili, come i furfurali e gli acidi acetico e formico, considerati nel loro complesso come i responsabili dell'attività fungicida o fungistatica, è stato accolto molto positivamente ed apre verso nuove prospettive di difesa fitosanitaria;
- 6) infine, il rinvenimento di letteratura internazionale che indica il 5-hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde, il 5-HMF ed altri derivati furanici come prodotti naturali già usati come aromi e fragranze nell'industria agro-alimentare, e sfruttati insieme agli acidi acetico e formico anche nell'industria farmaceutica, cosmetica, dei pesticidi, degli erbicidi, dei fungicidi, degli insetticidi e dei disinfettanti (Rigal e Gaset, 1983; Morales, 2008), supporta ulteriormente la bontà dei risultati qui esposti ed incoraggia il proseguimento della ricerca in tale direzione di marcia.

Tutto ciò fa ritenere, quindi, che i risultati di questa ricerca siano incoraggianti nel considerare i reflui di miscanto e paglia di grano come prodotti da usare potenzialmente nel settore della difesa fitosanitaria di colture orticole in serra contro alcuni funghi fitopatogeni dell'aria e del suolo in integrazione con agro-farmaci sintetici di ultima generazione a basso dosaggio, anche al fine di contribuire ad un miglioramento sia dell'efficienza energetica della filiera agro-chimica e sia della sostenibilità ambientale di agrosistemi in sistemi-serra energeticamente efficienti del Sud-Italia.

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.
- 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.
- 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., Viola, E., Maccioni, O., Arcieri, G., Sharma, N., Zimbardi, F., 2012a. 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*, 2 (4), 388-405.
- De Corato, U., Cancellara, F. A., Viola, C., Viola, E., Arcieri, G., Zimbardi, F., 2012b. Biomasse vegetali e *steam-explosion* nella difesa fitosanitaria: un'opportunità per l'efficienza energetica e la sostenibilità ambientale in agricoltura. ENEA, RT/2012/18/ENEA, ISSN/0393-3016 25 pp.
- Goidànich, G. e Casarini, B., 1988. La difesa delle piante orticole: fisiopatie, virosi e malattie crittogamiche. Edizioni Edagricole, Bologna, 1140 pp.
- Morales, F.J., 2008. Hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. In: *Process-Induced Food Toxicants*. Stadler and Lineback Publisher; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken; New Jersey, USA, pp. 135-174.
- 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.
- Rigal, L., Gaset, A., 1983. Direct preparation of 5-hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde from polyholosides: a chemical valorisation of the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Biomass*, 3, 151-163.
- Tanahashi, M., 1990. Characterization and degradation mechanisms of wood components by steam explosion and utilization of exploded wood. *Wood Resource*, 77, 49-117.

Edito dall' **ENEA**
Servizio Comunicazione

Lungotevere Thaon di Revel, 76 - 00196 Roma

www.enea.it

Stampa: Tecnografico ENEA - CR Frascati
Pervenuto il 18.7.2013

Finito di stampare nel mese di luglio 2013