



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PERUGIA

Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie

Corso di Dottorato di Ricerca in

Scienze Ambientali- XXVI Ciclo

**RICICLO E VALORIZZAZIONE DEI SOTTOPRODOTTI
DELL'INDUSTRIA OLEARIA:
EFFETTI SUL MICROBIOTA DEL SISTEMA SUOLO-PIANTA**

s.s.d. BIO/19

Dottoranda

Dr.ssa Laura Fidati

Tutor

Dr. Ermanno Federici

Coordinatore

Prof. Maurizio Petruccioli

1. INTRODUZIONE	pag. 1
1.1 L'industria olearia	pag. 1
1.2 I sottoprodotti oleari	pag. 4
<i>1.2.1 Le acque di vegetazione</i>	<i>pag. 7</i>
<i>1.2.2 La sansa</i>	<i>pag. 9</i>
<i>1.2.3 Le sanse umide</i>	<i>pag. 9</i>
<i>1.2.4 La sansa esausta</i>	<i>pag. 10</i>
1.3 La gestione dei sottoprodotti oleari	pag. 12
<i>1.3.1 Aspetti normativi</i>	<i>pag. 12</i>
<i>1.3.2 Spandimento dei sottoprodotti oleari tal quale sui terreni</i>	<i>pag. 17</i>
1.4 Valorizzazione dei residui oleari	pag. 20
<i>1.4.1 Valorizzazione agronomica</i>	<i>pag. 21</i>
<i>1.4.2 Compostaggio</i>	<i>pag. 23</i>
<i>1.4.3 Valorizzazione nell'industria del florovivaismo</i>	<i>pag. 25</i>
<i>1.4.4 Recupero energetico</i>	<i>pag. 26</i>
<i>1.4.5. Produzione di mangimi</i>	<i>pag. 27</i>
1.5 Aspetti microbiologici degli scarti oleari	pag. 29
<i>1.5.1 La biodiversità batterica negli scarti oleari</i>	<i>pag. 29</i>
<i>1.5.2 La biodiversità fungina negli scarti oleari</i>	<i>pag. 32</i>
1.6 Microbiologia del processo di compostaggio	pag. 35
1.7 Effetti dell'aggiunta di scarti organici sull'ecosistema suolo-pianta	pag. 39
<i>1.7.1 Priming effect</i>	<i>pag. 39</i>
<i>1.7.2 Interazioni tra radice e suolo</i>	<i>pag. 42</i>
<i>1.7.3 Interazioni tra pianta e microrganismi del suolo</i>	<i>pag. 46</i>
<i>1.7.4 Effetti tossici degli scarti oleari sull'ecosistema suolo-pianta</i>	<i>pag. 48</i>
<i>1.7.5 Effetti protettivi degli scarti organici da fitopatogeni</i>	<i>pag. 49</i>
1.8 Metodi molecolari in ecologia microbica	pag. 51
<i>1.8.1. DNA ribosomiali ed altri geni marcatori utilizzati in ecologia microbica per la differenziazione tassonomica delle popolazioni</i>	<i>pag. 51</i>
<i>1.8.2. Elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE: Denaturing, TGGE: Temperature Gradient Gel Electrophoresis)</i>	<i>pag. 55</i>
<i>1.8.3 Sequenziamento di cloni derivati da librerie di clonaggio</i>	<i>pag. 57</i>
<i>1.8.4 Sequenziamenti di nuova generazione (NGS)</i>	<i>pag. 59</i>
<i>1.8.5 PCR quantitativa (Real Time PCR)</i>	<i>pag. 59</i>

2. SCOPO DELLA TESI	pag. 63
3. MATERIALI E METODI	pag. 66
3.1 Allestimento della prova di spandimento in campo di sanse tal quali e compostate	pag. 66
3.2 Allestimento della prova di coltivazione in vaso di piante diolivo (<i>Olea europaea</i>) con substrati da invasatura a base di sansa umida tal quale e compostata	pag. 70
3.3 Allestimento della prova di coltivazione in aziende florovivaistiche con substrati da invasatura a base di compost di sansa	pag. 72
3.4 Preparazione dei campioni di suolo, radici e rizosfera	pag. 75
3.5 Analisi delle comunità microbiche.	Pag. 77
3.5.1 Estrazione di DNA metagenomico	pag. 77
3.5.2 Amplificazione PCR dei geni ribosomali 16S e 18S	pag. 77
3.5.3 Elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE)	pag. 79
3.5.4 PCR quantitativa (qPCR)	pag. 80
3.5.5 Clonaggio e sequenziamento	pag. 82
3.5.6 Sequenziamenti di nuova generazione (NGS)	
con tecnologia Illumina	pag. 83
3.6 Analisi statistica	pag. 84
4. RISULTATI	pag. 85
4.1 Prova di spandimento in campo di sanse tal quali e compostate	pag. 86
4.1.1 Effetti sulle proprietà chimiche del suolo	pag. 87
4.1.2 Effetti sulla comunità batterica del suolo	pag. 90
4.1.3 Effetti sulla comunità fungina del suolo	pag. 93
4.2 Prova di coltivazione in vaso di piante di olivo (<i>Olea europaea</i>) con substrati da invasatura a base di sansa umida tal quale e compostata	pag. 100
4.2.1 Effetti sulla crescita della pianta	pag. 101
4.2.2 Effetti sulle dinamiche della comunità batterica di suolo e rizosfera	pag. 104
4.2.3 Effetti sulla composizione della comunità batterica di suolo e rizosfera dopo 30 giorni	pag. 110

4.2.4 Effetti sulle dinamiche della comunità fungina di suolo e rizosfera	<i>pag. 132</i>
4.2.5 Effetti sulla composizione della comunità fungina della rizosfera dopo 30 giorni	<i>pag. 139</i>
4.3 Prova di coltivazione in aziende florovivaistiche con substrati da invasatura a base di compost di sansa	<i>pag. 145</i>
4.3.1 Monitoraggio del processo di compostaggio	<i>pag. 146</i>
4.3.2. Effetti sulla crescita della pianta	<i>pag. 154</i>
4.3.3 Effetti sulle comunità batteriche di suolo e radici	<i>pag. 157</i>
4.3.4 Effetti sulle comunità fungine di suolo e radici	<i>pag. 173</i>
5. DISCUSSIONE	<i>pag. 186</i>
5.1 Prova di spandimento di sanse e compost in campo	<i>pag. 188</i>
5.2 Prove di coltivazione in vaso di piante di olivo (<i>Olea europaea</i>) e di piante ornamentali con substrati da invasatura a base di sansa umida tal quale e compostata	<i>pag. 191</i>
5.2.1 Monitoraggio del processo di compostaggio	<i>pag. 192</i>
5.2.2 Utilizzo di sansa umida tal quale e compostata per la formulazione di substrati da invasatura per la coltivazione in vaso di piante di olivo (<i>Olea europaea</i>) e di piante ornamentali	<i>pag. 195</i>
6. CONCLUSIONI	<i>pag. 201</i>
7. BIBLIOGRAFIA	<i>pag. 203</i>

1. INTRODUZIONE

1.1 L'industria olearia

Il frutto della pianta sempreverde *Olea europaea* è stato coltivato per centinaia di anni nell'area mediterranea. Quasi il 98% della coltivazione di olivo e il 97% della produzione mondiale è concentrata nel bacino del Mediterraneo (Sabatini 2010).

In Italia, l'uso dell'olio d'oliva sembra essere arrivato dalla Magna Grecia fino al meridione della penisola, per poi diffondersi nel resto d'Italia. Poche informazioni si hanno riguardo alla coltivazione di *Olea europea L.* durante l'epoca medievale, anche se potevano distinguersi tre macro-aree di crescita e sviluppo: il Nord, dove si trovavano piccoli oliveti; il centro, dove le più importanti famiglie dei comuni di Firenze e Lucca producevano olio per il loro consumo; il Sud, in cui si era instaurato un importante commercio di olio d'oliva i cui punti strategici erano il porto di Gaeta e la Sicilia, dove vi erano grandi estensioni di oliveti.

L'olivocoltura rimase un'attività marginale fino al XV secolo, quando cominciò ad espandersi significativamente fino a caratterizzare i paesaggi, giungendo poi ad acquisire l'importanza che ha oggi. Tuttavia, non sono ancora chiari i dettagli riguardanti le tecniche che venivano usate e ancora oggi vi è una discussione ancora aperta nella comunità scientifica. Agli inizi dell'era Moderna, l'olivocoltura si espanse significativamente in tutta la regione del Mediterraneo, grazie allo sviluppo commerciale degli Stati lungo le coste del bacino, e alla richiesta sempre più alta da parte degli stessi stati produttori ma anche da parte delle colonie presenti nel continente americano. Nel XVII secolo, la coltivazione nell'Italia meridionale attraversò un periodo di declino mentre nelle zone del Centro e del Nord la coltivazione di olivo e la vendita di olio vennero intensificate. Alcuni autori credono che il XVIII secolo segnò il passaggio da un'antiquata ad una più moderna olivicoltura che pose le basi per l'attuale mappa agricola del Mediterraneo settentrionale.

Nella scorsa decade (2000/01–2009/10), la produzione di olio d'oliva ha raggiunto una media di 596 920 tonnellate, registrando un incremento del 19,64 % rispetto alla precedente decade (1990/91-2000/01). La Puglia e la Calabria, in particolare, rappresentano rispettivamente il 35,6% e il 34% della produzione nazionale, seguite con distacco dalla Sicilia (8%), la

Campania (5.8%) e il Lazio (3.8%). Nell'insieme, il sud Italia rappresenta il 90% di tutta la produzione italiana.

Inoltre, nell'anno 2010/2011 sono stati registrati 4809 frantoi presenti in Italia. La maggior parte di questi, come si può osservare dalla figura 1 sono concentrati in Puglia (962=20%), Calabria (746=16%) e Sicilia (598=12%), (ISMEA-ISTAT).

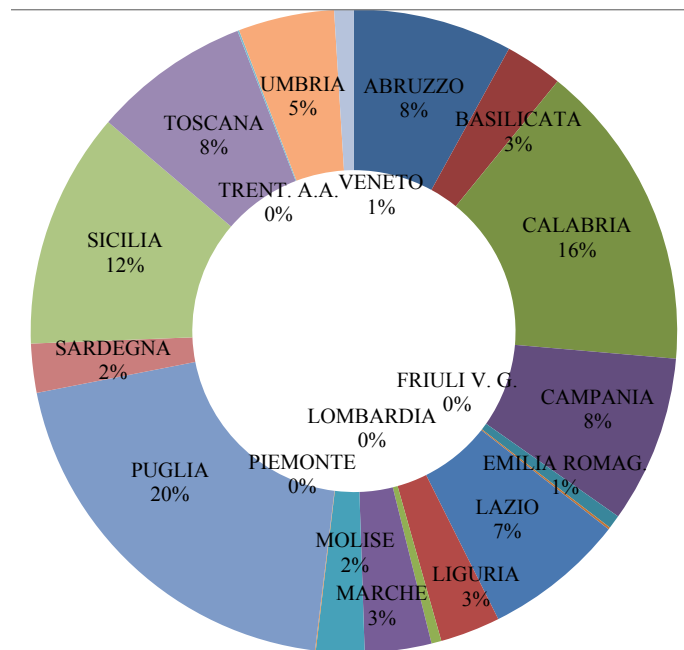


Fig.1 Distribuzione delle aziende frantoiane in Italia nell'anno 2010/2011

Le importazioni di olio d'oliva, che in generale dipendono dalla produzione domestica, hanno raggiunto una media di 108 730 t/anno nella decade 2000/01–2009/10. In questo periodo esse hanno oscillato da un minimo di 40000 t nel 2001/02 ad un massimo di 180000 t nel 2003/04, con una media di oltre le 50000 t/anno. La Spagna rappresenta per l'Italia la maggiore fonte di importazioni di olio d'oliva, fornendo una media di 422 768 t (2010). Essa è il più grande esportatore di olio d'oliva al mondo e con un ruolo rilevante anche all'interno del mercato europeo; l'Italia, d'altro canto, risulta al primo posto nelle esportazioni di olio nei Paesi Terzi. Le esportazioni italiane sono infatti incrementate significativamente (64.46%), arrivando fino a 182 470 t nel periodo 2000/01–2009/10. Di seguito si trovano la Grecia con 76 592 t e la Tunisia con 52 125 t (Source: EUROSTAT).

Il tasso di crescita delle esportazioni italiane è stato abbastanza costante nell'ultima decade, eccetto che per due stagioni (173 000 t nel 2000/01 and 171 000 t nel 2003/04), le quali

coincidono con il notevole decremento della produzione domestica. Tra gennaio e dicembre 2009, i maggiori destinatari delle esportazioni italiane sono stati la Germania (41 854 t), la Francia (32 400 t), il Regno Unito (21 544 t) e la Spagna (18 489 t) (Source: EUROSTAT). Nel 2010, le esportazioni verso i mercati extra-europei erano principalmente rivolti agli Stati Uniti (109 226 t), Canada (24 314 t) e Giappone (18 595 t). (Source: EUROSTAT).

1.2 I sottoprodotti oleari

L'attività del frantoio consiste nella lavorazione delle olive, direttamente provenienti dalla raccolta e non sottoposte ad alcun trattamento preliminare, finalizzata all'estrazione dell'olio attraverso metodi fisici e meccanici. La sansa è un residuo di tale lavorazione le cui caratteristiche fisiche sono determinate dalla tipologia di processamento; essa infatti può risultare sostanzialmente allo stato solido o, all'opposto, in forma di poltiglia intrisa d'acqua e dunque semi-liquida. In Italia è generalmente diffusa la tecnica che conduce ad un residuo solido asciutto con un contenuto variabile in acqua).

I possibili utilizzi/destini della sansa ad oggi individuati sono i seguenti:

- produzione di ulteriore olio ad uso alimentare ("olio di sansa di oliva"), di minore qualità e non più molto apprezzato dal mercato, attraverso un processo chimico operato in industrie denominate "sansifici";
- spandimento sui terreni agricoli, con funzione di fertilizzante;
- inserimento in mangimi destinati alla zootecnia;
- combustione (o altra forma di recupero energetico) in impianti che producono energia da biomasse;
- smaltimento come rifiuto.

L'olio rappresenta una minima parte della biomassa prodotta nell'ambito della filiera olivicola-olearia. Nella filiera olivicolo-olearia possono essere individuate due grandi tipologie di sottoprodotti:

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

Nei paragrafi che seguono si descrivono le caratteristiche dei sottoprodotti appartenenti alle due tipologie.

Pur non rientrando nell'oggetto del presente studio, tratteremo brevemente dei residui di potatura e della raccolta, poiché costituiscono una tipologia di sottoprodotto potenzialmente riutilizzabile, oltre che quantitativamente importante. In Tabella 1 si riportano alcune caratteristiche chimico-fisiche delle biomasse prodotte dalle operazioni di potatura dell'olivo.

Tabella 1 - Caratteristiche chimico-fisiche delle biomasse da potatura dell'olivo

Caratteristiche chimico-fisiche	Frasca	Legna
Quantità di residuo tal quale /100 kg di olive trasformate in olio (kg)	65	15
Contenuto d'acqua nel residuo (%)	52	37
Quantità di residuo secco/100 kg di olive trasformate in olio (kg)	31,2	9,4
Rapporto C/N (% sul secco)	33	128,2
Potere calorifero inferiore (kJ/kg)	18.625	17.163
Contenuto energetico del residuo/100 kg di olive trasformate in olio (kJ/kg)	581.000	161.000

Fonte: - UNASCO.,2004.

Dai dati riportati in Tabella 1 è possibile rilevare che, tra i residui di potatura, la frasca è quello che fornisce la maggior quantità di biomassa e, quindi, il maggiore contenuto energetico. La sua ridotta utilizzazione attuale dipende solo dalle difficoltà tecniche ed economiche del recupero. Foglie e ramaglie di diverse dimensioni costituiscono invece i residui delle attività di raccolta delle olive. La loro quantità varia quindi in funzione del tipo di raccolta condotto in campo. In alcuni casi le foglie, eliminate durante le prime fasi della lavorazione tramite aspirazione, sono destinate all'alimentazione animale o al riporto sul terreno tramite interrimento e conseguente apporto di sostanza organica. La diffusione della raccolta meccanica ha portato a quantità crescenti di questo tipo di sottoprodotto. Le quantità di questa tipologia di sottoprodotto sono difficili da stimare, e variano in funzione dei sistemi di raccolta utilizzati. In peso possono oscillare tra il 2 e il 15% del carico totale di olive, con una densità di 150-300 kg/m³.

I processi tradizionali di estrazione dell'olio d'oliva richiedono notevoli quantità di acqua, variabili tra i 40 ed i 150 litri per ogni quintale di olive lavorate. Questo comporta la produzione di notevoli volumi di reflui da trattare. Tuttavia gli impianti di estrazione olearia evolvono secondo due direzioni, che prevedono sempre una riduzione sensibile di acqua in fase di processo. Infatti, l'acqua aggiunta può essere nulla se le olive presentano un'umidità del 50%, o di 10-20 kg per 100 kg di olive se la pasta olearia ha una umidità iniziale del 40-45%, in modo che la sua umidità, durante il processo di estrazione, non scenda al di sotto del 50%. I suddetti sistemi innovativi di estrazione per centrifugazione prevedono che la pasta olearia possa essere frazionata in due sole fasi (olio e sansa molto umida) oppure in tre fasi (olio, sansa meno umida e acqua di vegetazione). L'attività molitoria dei frantoi italiani produce annualmente, in media, oltre 3 milioni di tonnellate di reflui (sanse ed acque di

vegetazione). I moderni sistemi di estrazione centrifuga (impianti “continui”) frazionano la pasta derivata dalla frangitura delle olive in due fasi, olio e sansa molto umida (58-62%), oppure in tre fasi, olio, sansa con umidità del 48-54%, ed elevate quantità di acqua. Con i decanter a riciclo d’acqua (due fasi e mezzo) si ottiene una sansa meno umida rispetto agli impianti a due fasi e minori quantità di acque di vegetazione rispetto ai “tre fasi”. I vari passaggi previsti dalle due tipologie estrattive (a due o a tre fasi) con i relativi tassi di umidità e aggiunta di acqua nelle diverse fasi sono rappresentati schematicamente in figura 2.

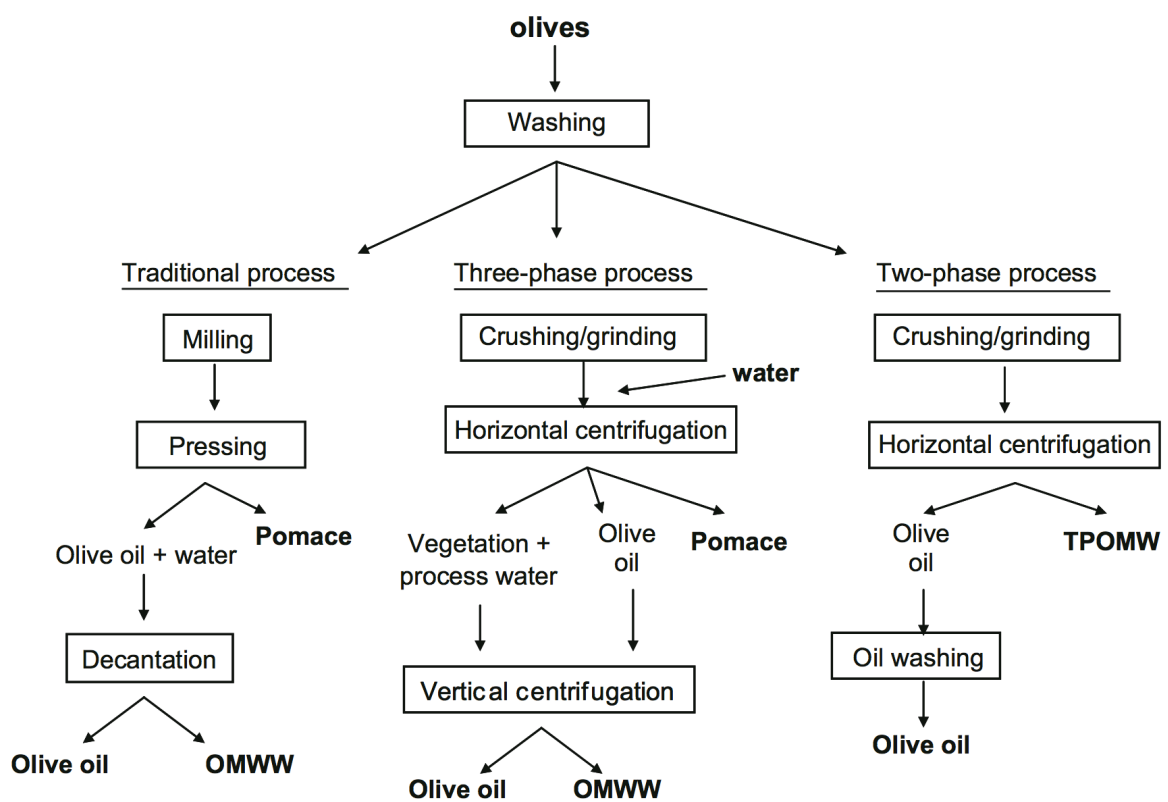


Fig.2 Processi di estrazione dell’olio di oliva a due e tre fasi. (da Morillo et al. 2009)

Pertanto, estraendo l'olio con impianti a due fasi non vengono prodotte acque di vegetazione, ma l'umidità della sansa risulta piuttosto elevata (58-62%), il che crea problemi in fase di spandimento tal quale sui terreni o successiva trasformazione (estrazione al solvente o combustione). Lavorando, invece, a tre fasi, con gli impianti tradizionali si ottiene una sansa con un'umidità accettabile (48-54%) e elevate quantità di acqua di vegetazione. In Tabella 2 si riportano i dati relativi alla quantità di acqua aggiunta per tecnologia di estrazione e le caratteristiche dei sottoprodotti generati.

Tabella 2 - Bilancio di massa nell'estrazione centrifuga a due e tre fasi

Tecnologia di estrazione	Acqua aggiunta (%)	Sansa kg/100 kg olive	Umidità sansa (%)	A.V. (kg/100 kg olive)
Due fasi	0 – 10	75 - 80	58 - 62	0
Tre fasi	50	55 - 57	48 - 54	80 - 110
Tre fasi a riciclo d'acqua	10 – 20	56 - 60	50 - 52	33 - 35

Fonte: - UNASCO.,2004.

1.2.1 Le acque di vegetazione

Le acque di vegetazione (A.V.) rappresentano il sottoprodotto liquido proveniente dal processo di estrazione dell'olio. Le A.V. sono costituite essenzialmente da:

- acqua di costituzione delle olive con un modesto residuo d'olio;
- acqua di lavaggio delle olive e degli impianti;
- acque di diluizione delle paste negli impianti continui.

Caratteristiche chimico-fisiche delle acque di vegetazione

Le caratteristiche chimico-fisiche di queste sostanze variano sostanzialmente in relazione al metodo di estrazione adottato. Nel tradizionale metodo di estrazione per pressione le A.V. sono composte unicamente da acqua e da altre sostanze solubili presenti nella drupe. Nel caso invece dell'estrazione per centrifugazione, detto anche sistema a ciclo continuo, si aggiunge acqua per diluire la pasta di olive. È evidente come nel primo caso viene prodotto un refluo assai più concentrato. Tali reflui, inoltre, contengono in soluzione allo stato colloidale e in sospensione numerosi composti organici e inorganici con sostanze secche il cui tenore totale oscilla tra il 3,5 e il 20% (Tabella 3), in base ai differenti volumi di acqua utilizzati nei diversi processi di trasformazione e alla durata dello stoccaggio.

Tabella 3 - Composizione delle acque di vegetazione

Parametri	Processo continuo a centrifugazione		Processo discontinuo a Pressatura	
	Minimo	Massimo	Minimo	Massimo
pH	5,1	5,8	4,7	5,5
Acqua (%)	79,8	91,7	90,4	96,5
COD (g/l)	54,1	318	29	79
BOD ₅ (g/l)	19	134	17	41
Residuo secco a 105°C	8,3	20	3,5	9,6
Composti organici (%)	7,22	18,3	2,6	8
Sostanze grasse (%)	0,02	1	0,5	2,3
Sostanze azotate (%)	1,2	2,4	0,17	0,4
Zuccheri (%)	2	8	0,5	2,6
Acidi organici (%)	0,5	1,5	Tracce	Tracce
Polialcoli (%)	1	1,5	0,9	1,4
Pectine, tannini (%)	1,3	1,7	0,23	0,5
Polifenoli (%)	1,2	2,4	0,3	0,8
Sostanze minerali a 550°C	1	1,7	0,2	0,5
Fosforo	0,14	0,23	0,03	0,07
Potassio	0,47	0,81	0,11	0,24
Calcio	0,01	0,06	0,01	0,03
Magnesio	0,06	0,1	0,01	0,03

La notevole variabilità nel valore dei costituenti totali è legata ai volumi di acqua utilizzati nei diversi processi di trasformazione e alla durata dello stoccaggio nelle vasche di raccolta. Il tempo di permanenza ha inoltre influenza diretta sul peso di alcuni componenti organici facilmente fermentescibili, sull'entità della sedimentazione dei solidi sospesi, e sulla concentrazione dell'estratto etereo in caso si recuperino le sostanze grasse affioranti. Altri composti importanti sono i fenoli, i quali esercitano una funzione fitotossica sulle piante erbacee, sia pure limitata a poche settimane data la loro degradabilità alla luce e all'aria. Per quanto riguarda invece le informazioni relative alla caratterizzazione microbiologica delle A.V., si riscontra una carenza di dati. Dalle analisi sinora eseguite su A.V. di diversa provenienza emerge come la popolazione microbica è prevalentemente costituita da batteri

cellulosolitici, mentre risultano assenti i nitrificanti. Sono presenti, invece, anche se in numero minore, lieviti e funghi, molti dei quali pectinolitici.

1.2.2 La sansa

La sansa è il sottoprodotto solido della lavorazione delle olive. Essa è caratterizzata soprattutto da umidità residua che può variare in ragione del 25-30% sul totale della massa in virtù del metodo di estrazione. A seconda della tecnologia di estrazione adottata variano i quantitativi di sansa prodotti (Tabella 4).

Tabella 4 - Stima delle quantità di sansa fresca prodotta per tipologia di frantoio

Tipologia frantoio	Frantoi (NR)	Olio ottenuto (T)	Sansa prodotta (T)
Pressione	2.005	106.127	243.281
Continuo	2.846	445.707	1.327.247
Percolante	5	185	521
Misto	607	123.101	350.666
Altro	189	22.706	85.373
Totale	5.652	697.826	2.007.088

Fonte: Elaborazione su dati Agecontrol, 2004; Cnr, 1998

La sansa vergine di oliva presenta caratteristiche simili, sia che provenga da impianti a pressione sia da impianti centrifughi, ad eccezione dell'umidità che passa da valori del 25-30% negli impianti a pressione, a valori del 48-54% negli impianti centrifughi tradizionali, mentre negli impianti centrifughi a due fasi l'umidità sale al 58-62% ed in quelli a risparmio d'acqua intorno al 50-52%.

1.2.3 Le sanse umide

Per venire incontro alle esigenze degli operatori dell'industria olearia è stato messo a punto un sistema di estrazione centrifuga che porta alla riduzione del consumo di acqua e alla riduzione delle quantità di A.V. prodotte. Con l'introduzione dei decanter centrifughi a "due fasi", infatti, all'uscita del ciclo estrattivo si hanno due sole frazioni: olio e sansa vergine il cui contenuto di umidità risulta essere mediamente intorno al 60% contro il 48-54% di quello ottenuto con il sistema tradizionale. Questo aumento del tenore in acqua delle sanse così

prodotte, e per questo dette “sanse umide” (S.U.), ha di fatto posto il problema relativo al loro smaltimento. Le S.U. infatti presentano un’umidità eccessiva per essere accettate dai sansifici, per i quali la voce che più incide sui costi di produzione è proprio quella legata all’essiccamento, fino ad un’umidità dell’8%, attraverso solventi organici (esano). Ulteriori problemi legati allo smaltimento delle sanse umide riguardano il loro trasporto, dato che risultano difficilmente palabili e richiedono, al contrario delle sanse asciutte, cassoni stagni.

1.2.4 La sansa esausta

Con un processo di estrazione dell’olio dalle sanse vergini con solvente (esano) si ottengono l’olio di sansa e le sanse esauste. L’olio di sansa richiede una spesa energetica dieci volte superiore a quella necessaria per l’estrazione meccanica dell’olio dalle olive, oltre a generare rifiuti tossici e ad usare composti chimici di sintesi dannosi all’ambiente e alla salute umana.

Da quanto descritto in questo capitolo, si deduce che le caratteristiche dei sottoprodotti oleari dipendono in gran parte dalla metodologia di estrazione dell’olio adottata. L’evoluzione della tecnologia di estrazione verso sistemi di lavorazione in automatico tende a utilizzare impianti continui che puntino all’utilizzo del sistema centrifugo per la separazione delle fasi, eventualmente accoppiato con altri metodi di estrazione (impianti misti a doppia estrazione). Questi sistemi innovativi di estrazione per centrifuga prevedono che la pasta olearia possa essere frazionata in due sole fasi (olio e sansa molto umida) oppure in tre fasi (olio, sansa meno umida e piccole frazioni d’acqua). La diffusione degli impianti centrifughi, generalmente dotati di alta capacità giornaliera, ha consentito di ridurre i costi della manodopera e i tempi di stoccaggio delle olive con indubbi vantaggi per la qualità dell’olio prodotto, specie nelle regioni meridionali del Paese (Cucurachi, 1975). Anche il sistema continuo della centrifugazione presenta, tuttavia, degli inconvenienti dovuti soprattutto alla necessità di impiegare acqua calda per la diluizione delle paste da avviare al decanter, determinando la riduzione del tenore di antiossidanti naturali degli oli (De Felice et al., 1979; Di Gioacchino et al., 1980; Di Gioacchino et al., 1992) e l’incremento dei volumi di acque di vegetazione prodotti dall’oleificio. Per ridurre tali inconvenienti è stata prospettata la possibilità di riciclare le acque di vegetazione appena prodotte utilizzandole per la diluizione della pasta di olive, prima del suo avvio al decanter, in sostituzione dell’acqua di rete (Cioni, 1991; Amirante et al., 1992). I risultati conseguiti con questa tecnica mostrano che il tenore di

fenoli totali dell'olio aumenta del 30% circa e che il volume delle acque di vegetazione si riduce del 35-40%. Un ulteriore miglioramento nella tecnologia di estrazione dell'olio dalle olive si è registrato con la comparsa di decanter centrifughi che consentono la separazione della fase oleosa dalla pasta di olive gramolata, senza l'aggiunta di acqua: la quantità di acque di vegetazione è quasi annullata e il patrimonio di antiossidanti naturali risulta ben conservato (Di Gioacchino et al., 1994). Accanto a tali vantaggi, tuttavia, è da registrarsi un aumento dell'umidità delle sanse nelle quali confluisce tutta l'acqua di costituzione delle olive.

1.3 La gestione dei sottoprodotti oleari

Una volta descritte le tipologie e le caratteristiche dei principali sottoprodotti oleari, in questo capitolo si esaminano i vari aspetti normativi, ambientali, agronomici legati alla loro gestione. Dopo aver descritto le tecniche consentite dalla normativa vigente, si analizza quella più comunemente praticata: lo spandimento tal quale sui terreni. Infine saranno affrontati le possibili strategie di valorizzazione.

1.3.1 Aspetti normativi

.

Una prima ricognizione dell'attuale normativa in materia di riciclo dei reflui oleari (*legge n.574/1996*) suggerisce di adottare, come uno dei possibili criteri per uno studio più approfondito della stessa normativa, un metodo di analisi basato su:

- le diverse tipologie di reflui prodotte dalla filiera olearia;
- le diverse fasi di gestione per ciascuna delle tipologie di reflui

Le tre principali tipologie di sottoprodotti sono le Acque di vegetazione, la Sansa vergine (o sansa umida) e la Sansa esausta.

A questa prima suddivisione funzionale per l'analisi della normativa specifica è associabile una seconda, basata sulle diverse fasi di gestione per ciascuna tipologia:

- fase di **stoccaggio**;
- fase di **trattamento**;
- fase di **trasporto**;
- fase di **applicazione al terreno**
- fase di **scarico**;
- **altre destinazioni** dei reflui oleari.

La gestione delle acque di vegetazione dei frantoi è stata regolata per lungo tempo dalla *Legge Merli* (*Legge 10 maggio 1976, n. 319*) che assimilandole alle acque reflue di altra provenienza ne proibiva lo spargimento sui terreni agrari in relazione all'elevato carico organico, decretando l'obbligo di provvedere alla depurazione o di ricorrere allo smaltimento in discarica. Dopo numerosi decreti la materia è stata regolamentata ex novo dalla *Legge 11*

novembre 1996, n.574 recante norme in materia di utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e di scarichi dei frantoi oleari e dal *Decreto Ministeriale del 6 luglio 2005* che stabilisce i criteri e le norme tecniche generali per l'utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e delle sanse umide. In base alla *legge n.574/1996* le sanse umide e le acque di vegetazione, residue dalla lavorazione meccanica delle olive che non hanno subito alcun trattamento né ricevuto alcun additivo, possono essere oggetto di utilizzazione agronomica attraverso lo spargimento controllato su terreni agricoli. L'utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione, previa comunicazione al sindaco del comune interessato, è consentita in osservanza del limite di accettabilità di 50 m³ per ettaro nel periodo di un anno per le acque di vegetazione provenienti dai frantoi a ciclo tradizionale, 80 m³ per ettaro per quelle dei frantoi a ciclo continuo. Tale spargimento, inoltre, deve essere realizzato assicurando un'adeguata distribuzione e incorporazione delle sostanze sui terreni in modo da evitare di mettere in pericolo l'approvvigionamento idrico e di nuocere alle risorse viventi e al sistema ecologico. Sono comunque esclusi i terreni posti a distanza inferiore a dieci metri dai corsi d'acqua, quelli situati a distanza inferiore a duecento metri dai centri abitati, i terreni investiti da colture orticole in atto, i terreni in cui siano localizzate falde, i terreni gelati, innevati, saturi d'acqua e inondati, infine anche i boschi, giardini ed aree di uso pubblico ed aree di cava. Le acque di vegetazione vengono stoccate, per un periodo non superiore a 30 giorni, in silos, cisterne, o vasche interrate o sopraelevate all'interno del frantoio o in altra località, previa comunicazione al sindaco ove risiedono (art. 6 L 574/96). La vasca di raccolta deve essere a tenuta, con il fondo e le pareti impermeabilizzate allo scopo di impedire l'inquinamento del terreno, delle acque di falda e delle acque superficiali (art. 5 comma 6 DM 06/07/96). La dimensione deve essere tale da consentire la raccolta delle A.V. incluse le acque di lavaggio delle olive, considerando la capacità lavorativa e la produzione dell'impianto in 30 giorni per 8 ore lavorative e valutando eventuali incrementi dovuti alle precipitazioni se le vasche sono a cielo aperto e non si dispone di adeguate coperture (art. 5 comma 4 DM 06/07/96). I contenitori di stoccaggio delle acque di vegetazione esistenti alla data di entrata in vigore del DM 6 luglio 2005 devono essere adeguati alle disposizioni normative entro due anni. Per i frantoi localizzati in aree urbanizzate, l'adeguamento dei contenitori di stoccaggio può avvenire entro un termine non superiore a tre anni (art. 5 comma 8 DM 06/07/96). Nelle fasi di stoccaggio e trasporto delle acque di vegetazione è vietata la miscelazione delle stesse con effluenti zootecnici o agroindustriali (art. 5 comma 1 DM 06/07/05).

Per quanto riguarda la fase di trattamento delle A.V., sulla base della normativa sono possibili due diverse destinazioni di tale reflu, l'utilizzazione agronomica e lo scarico.

Nel caso dell'utilizzazione agronomica, la normativa di riferimento è costituita dalla legge n. 574/1996. Tale legge non prevede alcun intervento preventivo rispetto all'utilizzazione agronomica delle A.V. Per questa ragione essa non sembra disciplinare e neppure prevedere alcuna forma di trattamento, come ad esempio la diluizione delle A.V. con acqua. Se le A.V. non sono, ovvero non possono essere, utilizzate agronomicamente, è necessario ricorrere al preventivo trattamento. I prodotti risultanti dal processo di depurazione (e la relativa disciplina) possono essere così schematizzati: fase liquida la cui normativa di riferimento è la cosiddetta legge Merli e successive modifiche e integrazioni, e la fase solida (fanghi di risulta). La normativa di riferimento, relativa alle fasi di trattamento e di scarico che risultano in questo caso funzionalmente connesse tra loro, è costituita dal D. Lgs. 27 gennaio 1992, n. 99, da leggersi unitamente alla Legge 19 ottobre 1984, n. 748 e successive modifiche

Per quanto riguarda la fase di scarico delle A.V. è senz'altro da chiarire se e quando esso rientri nell'ambito della "Legge Merli" e successive modifiche e integrazioni ed anche od oppure nell'ambito del D. Lgs. n. 22/1997. Questo punto ha delle conseguenze pratiche di notevole rilevanza, in particolare nel caso di comportamenti illeciti, date le grandi difformità tra i sistemi sanzionatori previsti dalla Legge n. 574/1996, dalla "Legge Merli" ed infine dal D. Lgs. n. 22/1997.

Un'altra possibile destinazione delle A.V. riguarda sempre l'utilizzazione agronomica, non attraverso la diretta applicazione di queste ultime al terreno, ma attraverso una fase "intermedia" quale può essere considerata la produzione di fertilizzanti allo stato fluido a partire dalle A.V. A questo proposito va ricordato quanto già descritto in precedenza a proposito della fase di (possibile) trattamento delle A.V. prima dell'utilizzazione agronomica. Infatti, secondo le norme contenute nel d.m. 05.02.1998 del Ministro dell'Ambiente, le A.V. possono essere recuperate mediante la: "Produzione di fertilizzante allo stato fluido conforme alla L. 19 ottobre 1984, n. 748, cioè la legge il cui titolo recita: "Nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti".

Per quanto riguarda le sansa umida, in riferimento alla legge n.574 del 1996, questa viene considerata come un ammendante vegetale semplice non compostato (quindi applicata al terreno senza specifici limiti quantitativi) se risponde ai requisiti di umidità (massimo 50%), pH (compreso tra 6 e 8,5), carbonio organico sul secco (minimo 40%), azoto organico sul secco (almeno 80% dell'azoto totale), rame totale sul secco (massimo 150 ppm), zinco totale

sul secco (massimo 500 ppm), contenuto in torba sul tal quale (massimo 20%). Sono altresì fissati i seguenti tenori massimi in metalli pesanti, espressi sulla sostanza secca: piombo totale 140 ppm, cadmio totale 1,5 ppm, nichel totale 50 ppm, mercurio totale 1,5 ppm. Lo spandimento delle sanse umide sui terreni aventi destinazione agricola, deve avvenire secondo le modalità previste dall'articolo 4 della legge 11 novembre 1996, n. 574 (citato in precedenza per la modalità di spandimento delle acque di vegetazione). L'utilizzo agronomico dei residui oleari deve essere inoltre condizionato da un attento controllo della composizione chimica di tali reflui, al fine di individuare eventuali sostanze tossiche o nocive e quindi evitare fenomeni di inquinamento del terreno che possano dar luogo ad alterazioni irreversibili (Amirante P., 1998; Amirante e Montel, 1999).

Lo stoccaggio e il trasporto della cosiddetta "sansa vergine" (S.V.), è disciplinato dal decreto ministeriale del 6 luglio 2005. Nelle fasi di stoccaggio e trasporto delle sanse è vietata la miscelazione delle stesse con effluenti zootecnici, agroindustriali o con i rifiuti di cui al decreto legislativo n. 22 del 1997. I contenitori per lo stoccaggio delle sanse umide devono essere adeguatamente impermeabilizzati e coperti al fine di evitare fenomeni di percolazione e infiltrazione.

Le regioni possono stabilire ulteriori specifiche caratteristiche dei contenitori destinati allo stoccaggio delle sanse umide. Esse regolamentano il trasporto in modo da garantire un adeguato controllo sulle movimentazioni delle sanse umide, richiedendo anzitutto gli estremi identificativi del frantoio da cui originano le sanse umide trasportate, del mezzo di trasporto, del destinatario e dell'ubicazione del sito di spandimento, infine gli estremi della comunicazione redatta dal legale rappresentante del frantoio da cui originano le acque trasportate. Le regioni stabiliscono inoltre i tempi di conservazione della documentazione, nonché le forme di semplificazione della documentazione da utilizzarsi nel caso di trasporto effettuato dal personale dipendente dal frantoio o dal titolare del sito di spandimento; stabiliscono altresì le modalità da seguire in caso di conferimento delle sanse ad un contenitore di stoccaggio ubicato al di fuori del frantoio.

Il problema interpretativo che si pone sulla fase di trattamento delle S.V., è se le sanse derivanti dagli impianti centrifughi innovativi "a due fasi" possano essere ascritte alla categoria "sanse umide" *ex legge* n. 574/1996. Se effettivamente così fosse, deve essere ricordato che la legge n. 574/1996 non prevede alcun intervento preventivo rispetto all'utilizzazione agronomica delle S.V., dal momento che: *"Ai fini dell'applicazione della presente legge le sanse umide provenienti dalla lavorazione delle olive e costituite dalle*

acque e dalla parte fibrosa di frutto e dai frammenti di nocciolo possono essere utilizzate come ammendanti in deroga alle caratteristiche stabilite dalla legge 19 ottobre 1984, n. 748, e successive modificazioni".

Una destinazione che risulta implicita nella lettura congiunta degli artt. 4 (recupero dei rifiuti) e 5 (smaltimento dei rifiuti) del "decreto Ronchi" e successive modifiche ed integrazioni, è il conferimento delle S.V. ai sansifici dove, dopo un eventuale trattamento di essiccazione, dalle sanse più secche viene estratto l'olio di sansa per mezzo di opportuni solventi. Il rifiuto che deriva da tale processo produttivo è costituito essenzialmente dalle sanse esauste. Si possono tuttavia ipotizzare altre destinazioni stabilite in maniera estremamente dettagliata dalla specifica normativa, che possono essere alternative ad un'utilizzazione agronomica "diretta e immediata" delle S.V. Tali destinazioni alternative prevedono la possibilità (da verificare attentamente) di produrre biogas mediante processo di digestione anaerobica delle S.V., e di produrre compost attraverso un processo di trasformazione biologica aerobica, le cui caratteristiche sono quelle indicate negli allegati alla legge 19 ottobre 1984, n. 748, e successive modificazioni.

Per quanto riguarda lo stoccaggio della cosiddetta "sansa esausta" (S.E.), esso non è disciplinato dalla Legge n. 574/1996, sia perché tale testo normativo esplicitamente esclude lo stoccaggio dal proprio ambito di applicazione, sia perché le S.E. non sembra possano essere ascritte alla categoria "sanse umide" *ex lege* n. 574/1996. Per tale motivo, lo stoccaggio risulta disciplinato dal D. Lgs n. 22/1997 e succ. modif. ed integraz. Secondo tale decreto lo stoccaggio delle S.V. dovrebbe essere considerato uno stoccaggio di un rifiuto speciale non pericoloso. Inoltre il d.m. 05.02.1998 del Ministero dell'Ambiente iscrive esplicitamente le S.E. nella categoria dei rifiuti non pericolosi che possono essere sottoposti alle procedure semplificate di recupero ai sensi degli articoli 31 e 33 del D. Lgs. n. 22/1997 e succ. modif. ed integrazioni.

Il trattamento della S.E. viene disciplinato sulla base di quanto stabilito dal d.m. 05.02.1998 del Ministero dell'Ambiente, che iscrive esplicitamente le S.E. nella categoria dei rifiuti non pericolosi che possono essere sottoposti alle procedure semplificate di recupero ai sensi degli articoli 31 e 33 del D. Lgs. n. 22/1997 e succ. modif. ed integraz. In particolare, la fase di trattamento delle S.E. è strettamente correlata con l'attività di recupero, come ad esempio nel settore della produzione e del riciclaggio di materie plastiche caricate con polvere di legno, produzione del pannello di particelle, previa vagliatura ed essiccazione o recupero energetico per mezzo di impianti dedicati al recupero energetico di rifiuti o impianti industriali.

Tale fase risulta disciplinata dal D. Lgs n. 22/1997 e succ. modif. ed integrazioni. Secondo tale decreto il trasporto delle S.E. dovrebbe avvenire in ottemperanza agli obblighi stabiliti per i rifiuti speciali non pericolosi che possono essere sottoposti alle procedure semplificate di recupero ai sensi degli articoli 31 e 33 del D. Lgs. n. 22/1997 e succ. modif. ed integrazioni. Per quanto riguarda l'applicazione al terreno (anche per usi agronomici) della cosiddetta "sansa esausta" (S.E.), essa non è disciplinata dalla Legge n. 574/1996 perché le S.E. non sembra possano essere ascritte alla categoria "sanse umide" *ex lege* n. 574/1996. Ciò che invece è interessante notare è che le ceneri di combustione da sansa esausta (prevedendo quindi un'altra destinazione delle S.E., quale il recupero energetico) possono essere a loro volta recuperate attraverso la produzione di fertilizzanti conformi alla legge 19 ottobre 1984, n. 748 e succ. modifiche.

1.3.2 Spandimento dei sottoprodotti oleari tal quale sui terreni

L'impiego delle biomasse di scarto in agricoltura è auspicabile, in quanto, non è possibile soddisfare il fabbisogno di fertilizzanti organici del settore agricolo pur ipotizzando la completa utilizzazione della sostanza organica contenuta nelle migliaia di tonnellate dei fanghi dei depuratori, dei rifiuti urbani e dei sottoprodotti agroindustriali. La decisione del legislatore di consentire l'impiego agronomico dei reflui oleari (acque di vegetazione e sanse umide) tramite spandimento controllato sui terreni agricoli, è quindi positiva ed è anche giustificata, sul piano scientifico, da numerosi studi effettuati per valutare l'effettivo valore agronomico dei reflui. La letteratura in materia, tuttavia, non è sempre concorde nei risultati: molti autori riportano infatti incrementi di resa per alcune colture, altri sconsigliano l'uso agronomico delle acque da frantoio per l'alta concentrazione di sali minerali, il basso pH e la presenza di agenti fitotossici. La pratica dello spandimento diretto dei residui oleari deve quindi tenere conto di eventuali sostanze tossiche o nocive per evitare fenomeni di inquinamento del terreno che possano dar luogo ad alterazioni irreversibili (Amirante e Montel, 1999). È opportuno, altresì, che siano valutati preventivamente lo stato evolutivo e la qualità dei componenti organici presenti nei materiali che vengono introdotti nel terreno, in quanto esistono rischi di natura agronomica (fitossicità). Tali rischi consistono nella presenza di carbonio organico non umificato, a seguito di una incompleta maturazione delle biomasse, e rischi agronomici e sanitari dovuti a prodotti ammendanti ricchi di cationi metallici o di

microrganismi patogeni per l'uomo (De Bertoldi, 1992). Per ridurre i rischi ambientali legati allo spandimento dei reflui tal quali in campo, la legge vigente in materia (la già descritta L.574/96) prevede che tale pratica sia condotta nel rispetto di precisi limiti quali-quantitativi. Diversi sono quindi gli aspetti critici da considerare ai fini di una corretta pratica di spandimento dei reflui oleari e gli obblighi cui sono soggetti i frantoiani. Nella realtà, tuttavia, le condizioni operative di molti olivicoltori e frantoiani, soprattutto di medio-piccole dimensioni, raramente consentono l'adempimento totale delle prescrizioni previste dalla legge. In molti casi, lo spandimento avviene in maniera incontrollata, senza i mezzi adeguati e in condizioni climatiche sfavorevoli. Se da un lato, quindi, lo spandimento dei residui oleari costituisce sempre un metodo vantaggioso dal punto di vista economico, può non esserlo in alcuni casi da un punto di vista agro-ambientale.

In Tabella 5 è riportata una sintesi dei pro e contro dello spandimento su terreni agricoli dei reflui oleari. Occorre aggiungere che la pratica dello spandimento controllato apporta vantaggi agronomici nel breve periodo, in funzione di parametri chimico-fisici e climatici in continua evoluzione e quindi variabili nel tempo. Per quanto riguarda i vantaggi agronomici derivati da spandimento dei reflui, per esempio, molti autori concordano nel preferire pratiche che prevedano trattamenti dei reflui preliminari allo spargimento in campo, tramite compostaggio, il quale permette la biostabilizzazione della sostanza organica e del suo successivo utilizzo da parte del terreno nel medio-lungo periodo.

Tabella 5- Vantaggi e svantaggi dello smaltimento sui terreni dei reflui Oleari (RO)

Vantaggi	Svantaggi
Costi contenuti	Potenziale carico inquinante
Elevato contenuto di macroelementi	Potenziale azione inibitoria microflora tellurica
Apporto ai terreni di sostanza organica fresca (non ancora umificata)	Scarso potere ammendante (la sostanza organica non è umificata)
Effetto erbicida su infestanti	Rischio fitotossicità
Minore impegno tecnologico	Rischio riduzione permeabilità del suolo
Effetti positivi sui terreni	Rischio inquinamento falde
Evita costi depurazione	Rischio ruscellamento e perdita di sostanza organica
	pH acido
	Difficile il pieno rispetto della normativa
	Difficoltà logistiche

Fonte: - UNASCO., 2004.

Per quanto riguarda gli aspetti da considerare per uno spandimento corretto dei reflui sui terreni, occorre verificare caratteristiche podologiche (tipo e struttura del terreno) e nutrizionali (dotazione minerale e di sostanza organica), parametri economici (convenienza e

fattibilità) e vincoli giuridici (il rispetto della normativa vigente e dei quantitativi ammessi), quelli logistici e operativi (disponibilità di mezzi propri e idonei al corretto e uniforme spargimento in campo), e non ultimi quelli relativi ai possibili rischi di impatto ambientale (fitotossicità, inquinamento idrico). Il compostaggio, di cui si parlerà più approfonditamente in seguito, rappresenta un'alternativa interessante, sia per l'ottimizzazione del valore agronomico dei reflui stessi, sia per la loro valorizzazione in prodotti a maggior valore aggiunto.

1.4 Valorizzazione dei residui oleari

La nozione di rifiuto costituisce (con la disciplina che su di essa si innesta) uno dei pilastri fondamentali della politica ambientale comunitaria. Quest'ultima è notoriamente rivolta al conseguimento degli obiettivi generali indicati dall'art. 174 del Trattato CE (ora 191), in particolare di: *salvaguardia, tutela e miglioramento della qualità dell'ambiente protezione della salute umana utilizzazione accorta e razionale delle risorse naturali*. La stessa norma impone un elevato livello di tutela e l'osservanza di una serie di principi, tra cui quelli di precauzione, azione preventiva, correzione dei danni ambientali alla fonte ed il noto "chi inquina paga". A tal fine si sono susseguite ed evolute nel tempo direttive comunitarie rivolte a definire i rifiuti e regolarne la gestione (cioè ogni sorta di manipolazione/trattamento, di carattere sia intermedio sia finale). La nozione di rifiuto è definita dalla direttiva 2008/98/CE come "*qualsiasi sostanza od oggetto di cui il detentore si disfi o abbia l'intenzione o l'obbligo di disfarsi*", definizione già contenuta nell'art. 183 del D.lgs 152/2006.

Invece si definisce sottoprodotto *il residuo ottenuto da un ciclo produttivo* che soddisfa i requisiti elencati nell'art. 184-bis del D.lgs. 152/2006:

- la sostanza o l'oggetto è originato da un processo di produzione di cui costituisce parte integrante, e il cui scopo primario non è la produzione di tale sostanza od oggetto;
- è certo che la sostanza o l'oggetto sarà utilizzato, nel corso dello stesso o di un successivo processo di produzione o di utilizzazione, da parte del produttore o di terzi;
- la sostanza o l'oggetto può essere utilizzato direttamente senza alcun ulteriore trattamento diverso dalla normale pratica industriale;

Il ciclo naturale che regola la vita di tutti gli esseri viventi non prevede il concetto di rifiuto, in quanto, ciò che viene scartato da alcuni organismi, rappresenta una risorsa per gli altri. Al contrario, le attività gestite dall'uomo sono basate su un modello in cui, a fronte di un prelievo di materia ed energia dall'ambiente per produrre beni di consumo, fa seguito una produzione di rifiuti che vengono poi scaricati nell'ambiente stesso. Infatti, uno dei tratti caratterizzanti le società umane più sviluppate, direttamente derivato dagli stili di vita che le contraddistinguono e le regolano, risulta indubbiamente la massiccia produzione di rifiuti di diversa natura e tipologia, che negli ultimi decenni è andata progressivamente aumentando

fino a diventare un vero e proprio problema sociale e ambientale. Il rifiuto, come emerge sia dalla sua definizione comune, sia da quella tecnica, è un semplice scarto che, ponendosi al di fuori del ciclo della materia e dell'energia, rappresenta un serio problema per il Pianeta, ma che l'uomo potrebbe trasformare progressivamente in una preziosa e abbondante risorsa. Tra le diverse tipologie di rifiuti prodotti nell'ambito delle diverse attività umane, la componente organica che li caratterizza risulta sicuramente una tra le più difficili da gestire, dal momento che in discarica produce fermentazioni che causano emissioni maleodoranti e formazione di percolati, e dato che l'incenerimento presenta una resa calorica molto bassa, a causa dell'elevato contenuto in acqua. La possibilità di sottrarre i rifiuti organici a queste destinazioni, indirizzandoli verso percorsi di smaltimento più specifici e sicuri e limitando perciò le problematiche indicate, risulta quindi una opzione di rilevante importanza ambientale.

L'opportunità di trasformare i rifiuti organici in un fertilizzante da destinare all'impiego in agricoltura deriva non soltanto dalla necessità di sottrarre tali materiali alla discarica o all'incenerimento, ma anche dalla scarsa dotazione di sostanza organica che sempre più caratterizza i terreni agricoli.

1.4.1 Valorizzazione agronomica

La progressiva diminuzione del contenuto di sostanza organica nei suoli sottoposti ad agricoltura intensiva è particolarmente preoccupante in Italia. Le conseguenze di tale diminuzione sono immediatamente identificabili dalla degradazione delle proprietà fisiche dei suoli accompagnata dal consistente aumento dei rischi erosivi. L'utilizzazione agronomica di biomasse di rifiuto e di scarto come i sottoprodotti dei frantoi oleari ha quindi assunto particolare interesse quale mezzo per reintegrare la perdita di sostanza organica, per riciclare in maniera corretta gli elementi nutritivi ed infine per la possibilità di smaltire questi rifiuti al più basso costo possibile (Mondini e Sequi 2008, Odlare et al. 2011). Per una valutazione quantitativa delle modificazioni fisiche e chimiche dei terreni trattati con i residui della lavorazione delle olive è necessario tener presente la notevole variabilità della composizione chimica di questi materiali, tutti caratterizzati da bassi pH e da un'elevata presenza di sali e di sostanza organica contenente elevate frazioni difficilmente biodegradabili. Inoltre, la composizione chimica è anche variabile durante il periodo del loro stoccaggio, sia per la

parziale sedimentazione della frazione insolubile, sia per la trasformazione microbiologica della sostanza organica e l'evaporazione della componente acquosa. La pratica dello spandimento dei reflui sul terreno è stata attentamente studiata, non più quale semplice mezzo per lo smaltimento, ma quale tecnica mirante al miglioramento delle proprietà fisiche e chimiche del terreno e della nutrizione vegetale. A discapito dell'effetto positivo che avrebbero però questi reflui se usati come fertilizzanti, vi sono delle caratteristiche particolari quali l'elevata salinità, che potrebbe provocare una forte concentrazione di sali nel suolo, l'elevata acidità, quindi, un pH basso (4,95 per acque provenienti da un'estrazione tradizionale; 5,58 per quelle derivanti da una estrazione continua) e abbondanza di sostanze organiche quali polifenoli a notevole effetto fitotossico.

L'impiego agricolo offre prospettive molto interessanti per l'ammendamento in pieno campo. Infatti, la sansa vergine, essendo costituita da sostanza organica di origine vegetale non fermentata e non contenendo metalli pesanti in concentrazioni quantitativamente rilevanti, inquinanti tossici o organismi patogeni, ha una composizione assimilabile ad un ammendante vegetale, quindi può essere oggetto di utilizzazione agronomica. Il D.G.R. del 2 agosto 2006 consente lo spargimento controllato sul terreno delle acque di vegetazione e della sansa umida nei limiti di 50 e 80 m³/ha⁻¹ rispettivamente per frantoi a ciclo tradizionale e frantoi a ciclo continuo. Dal punto di vista agronomico va rilevato che le sanse umide hanno un contenuto di sostanza organica assai elevato (mediamente pari all'84% s.s.), un livello di sostanze grasse residue vicino al 10%, un'umidità compresa tra il 50 ed il 70%, un buon contenuto in fosforo (0,2% della s.s.) e soprattutto in potassio (intorno al 2% della s.s.) e azoto (circa 1% della s.s.). In particolare, l'elevato contenuto in sostanza organica consente il miglioramento delle proprietà chimico-fisiche del suolo aspetto assai rilevante se si pensa alla preoccupante e graduale riduzione del contenuto di sostanza organica nei suoli sottoposti a coltivazioni intensive (Mondini e Sequi 2008). Tuttavia, a causa dell'elevata acidità e dell'alto contenuto in sali ed in sostanze fenoliche, da alcuni è stata ipotizzata una potenziale fitotossicità delle sanse impiegate tal quali. Quando la sansa umida è stoccata in frantoio per un determinato periodo, le sue proprietà chimiche subiscono variazioni. Il materiale, infatti, conservato per circa 10 mesi in cumulo, completamente all'aperto, senza alcuna protezione dagli agenti atmosferici, subisce una forte riduzione degli ioni idrosolubili (lisciviati dalle piogge) con conseguente perdita di valore delle sue caratteristiche nutrizionali: il K ed il P idrosolubili si riducono a circa il 20% del contenuto iniziale, mentre la percentuale di carbonio organico e di

azoto totale non varia molto, evidenziando, quindi, una modesta decomposizione della frazione organica in esso contenuta.

1.4.2 Compostaggio

Il compostaggio è una prospettiva molto promettente nella politica del riciclo dei sottoprodotti organici, in vista della produzione di fertilizzanti da impiegare tal quali o come base per formulati. Per loro natura, infatti, i sottoprodotti della lavorazione olearia possono essere considerati un ottimo materiale di partenza per ottenere compost di “qualità”. Il prodotto finale è esente da xenobiotici, è ricco di nutrienti minerali e di sostanza organica stabilizzata. Il compostaggio è un processo naturale di trasformazione biologica della composizione originaria della matrice organica che produce un materiale stabilizzato, mineralizzato, igienizzato e fitocompatibile (Roig et al. 2006). Il processo avviene con l’ausilio di microrganismi aerobi i quali si accrescono, catalizzando una parziale degradazione aerobica delle sostanze organiche, una trasformazione ossido-riduttiva di alcuni dei composti inorganici e la sintesi di nuovi composti organici, più stabili. La conduzione del processo di compostaggio presuppone, quindi, la corretta conoscenza dei meccanismi microbici che ne sono alla base. Il compostaggio è una tecnica attraverso la quale viene controllato, accelerato e migliorato il processo naturale a cui va incontro qualsiasi sostanza organica per effetto della flora microbica naturalmente presente nell'ambiente. Si tratta di un processo aerobico di decomposizione biologica della sostanza organica in un materiale simile al terreno chiamato “humus”. La degradazione avviene attraverso la digestione enzimatica dei sottoprodotti, operata da microrganismi del suolo che utilizzano la sostanza organica quale substrato. La degradazione aerobica della sostanza organica ne determina la mineralizzazione a CO₂, acqua e sali inorganici con una riduzione della massa del 40-50% e produzione di biomassa (humus) che è un prodotto biologicamente stabile, umificato, igienizzato, ricco di microelementi fertilizzanti (P, N, K) e fitocompatibile e adatto ai più svariati impieghi agronomici, dal florovivaismo alle colture praticate in pieno campo.

Il compostaggio della sansa è una prospettiva molto promettente nella politica del riciclo dei sottoprodotti della lavorazione olearia, che possono essere considerati un ottimo materiale di partenza per ottenere compost di qualità.

L'ottimizzazione del processo di compostaggio e quindi dell'attività dei microrganismi è funzione principalmente della porosità del substrato, della presenza di ossigeno, dell'umidità, del pH, della temperatura e dell'equilibrata presenza di nutrienti. E' da tenere ben presente che questi parametri sono, in genere, interdipendenti tra loro.

La porosità del substrato (misura degli spazi vuoti all'interno della biomassa) determina il mantenimento dell'ottimale grado di ossigenazione della massa in compostaggio. I fattori che influenzano la porosità sono principalmente la pezzatura e forma del materiale, il grado di umidità della massa e la forma del cumulo. Particelle più grandi e uniformi incrementano la porosità, ma al diminuire della dimensione delle particelle corrisponde un più elevato tasso di degradazione aerobica ad opera dei microrganismi: è necessario quindi trovare un compromesso che porti ad una situazione di equilibrio tra attività microbica e compattamento del cumulo.

Il processo di compostaggio richiede e consuma ossigeno in proporzione diretta all'attività microbica: la prima fase di decomposizione è caratterizzata da una richiesta molto elevata che va diminuendo con l'avanzare del processo verso la fase di maturazione. E' da tener presente comunque che il processo di compostaggio è sì ossidativo, ma non deve portare alla totale mineralizzazione della sostanza organica bensì alla stabilizzazione ed umificazione dei materiali di partenza: l'adeguata composizione della miscela iniziale ed il ricorso a periodici rivoltamenti garantiscono un ottimale scambio con l'ossigeno atmosferico.

L'acqua è il mezzo nel quale avvengono le reazioni chimiche, la diffusione ed il trasporto degli elementi nutritivi, il movimento dei microrganismi. I materiali avviati al compostaggio dovrebbero essere caratterizzati da un contenuto di umidità compreso tra il 55% ed il 65%. Il processo, soprattutto nella prima fase, genera calore e causa un'elevata evaporazione: è necessario quindi che il contenuto in acqua di partenza sia più elevato e che l'umidità persa venga reintegrata umidificando il prodotto.

La temperatura è il principale fattore fisico che fornisce indicazioni valide sull'andamento del processo di compostaggio in quanto diretto indicatore dell'attività microbica. L'attività di decomposizione microbica rilascia una grande quantità di energia sotto forma di calore che diffonde nella massa e provoca l'innalzamento della temperatura. Le temperature termofile sono importanti affinché avvenga la distruzione dei patogeni presenti nel substrato di partenza. Dal momento che temperature superiori ai 65°C provocano la morte della maggior parte dei microrganismi, riducendo in tal modo il tasso di decomposizione del substrato, è opportuno monitorare il processo affinché non venga superata tale soglia minima. Tutti i

sistemi di aerazione abbassano la temperatura del substrato e permettono di mantenere la temperatura nell'intervallo compatibile con l'attività microbica.

Carbonio, azoto, fosforo e potassio costituiscono le principali fonti di energia per i microrganismi e costituiscono il pool di nutrienti che rende più o meno elevato il valore agronomico di un compost.

Il compostaggio è relativamente poco sensibile al pH dei substrati di partenza, in virtù della grande varietà di microrganismi che intervengono nel processo. Nel materiale in via di stabilizzazione il pH può variare notevolmente col progredire del processo, i valori ottimali sono però compresi tra 6,0 e 8,0. In generale, i batteri preferiscono un pH vicino alla neutralità e i funghi un ambiente acido.

1.4.3 Valorizzazione nell'industria del florovivaismo

Nel campo del florovivaismo il substrato da invasatura più utilizzato è la torba la quale si accumula in suoli ricchi d'acqua in assenza di ossigeno e rappresenta lo stadio iniziale della formazione di carbone. È composta da materia organica soprattutto di origine vegetale, ma anche di altra natura, e rappresenta un ottimo substrato da invasatura grazie all'apporto di nutrienti e al pH ottimale per la crescita delle piante.

La torba ha però lo svantaggio di essere una risorsa non rinnovabile e negli ultimi anni in alcune nazioni europee (Austria, Germania, Gran Bretagna, Svizzera) il suo utilizzo è stato osteggiato da gruppi ambientalisti, con lo scopo di limitare l'estrazione della torba, preservando così l'habitat delle torbiere (Schmilewski, 2000; Carlile, 2001). L'aumento dei costi e il fatto che non sia una risorsa rinnovabile ha richiamato l'attenzione sulla necessità di trovare substrati da invasatura alternativi affinché questa venga sostituita.

In linea teorica gli scarti dei frantoi oleari, sia tal quali che compostati, potrebbero rappresentare un ottimo substrato sostitutivo alla torba, grazie all'apporto di sostanze organiche, di sali minerali e di altri nutrienti indispensabili per la crescita delle piante in vaso. Alcuni autori suggeriscono che la combinazione tra torba e compost nei substrati da invasatura possa essere sinergica: la torba spesso favorisce l'aerazione e la ritenzione di acqua mentre il compost e altri additivi migliorano la capacità fertilizzante del substrato. Inoltre, i sottoprodotti organici e i compost possiedono le proprietà di porosità ed aerazione

paragonabili a quelle della torba e quindi possono essere definiti sostituti ideali (Chong 2005, Ostos et al. 2008).

Questi scarti potrebbero però influire anche sulle popolazioni microbiche presenti nell'ecosistema radici-suolo. La microflora ha funzioni fondamentali per la vita della pianta e modifiche a livello della composizione del substrato potrebbero rispecchiarsi in variazioni nella popolazione microbica che interagisce con le radici, causando cambiamenti nella pianta, non necessariamente vantaggiosi o positivi (Hardoim et al. 2008, Karpouzas et al. 2009).

I substrati da invasatura influiscono quindi sulla crescita e la salute della pianta in due modi: sia direttamente, attraverso l'apporto di sostanze nutrienti e di sali minerali, sia indirettamente, andando a influenzare la microflora dell'ecosistema suolo-pianta (Hassan e Mathesius 2012). L'utilizzo delle sanse come substrati da invasatura potrebbe risolvere due problematiche: la necessità di trovare un'alternativa alla torba nel campo del florovivaismo e lo smaltimento dei rifiuti dell'industria olearia, che potrebbero essere così riciclati in modo produttivo. Il punto cruciale è quindi quello di cercare di individuare se e quanto sia favorevole per la pianta la sostituzione della torba con gli scarti derivanti dall'industria olearia e in che modo questi sottoprodotti debbano essere trattati per essere valorizzati e utilizzati come substrati da invasatura.

1.4.4 Recupero energetico

La sansa esausta o la vergine essiccata può essere utilizzata come combustibile e fonte di energia termica, previa essiccazione in essiccatori cilindrici rotanti. Anche il nocciolino una volta separato dalla sansa ed essiccato può essere convenientemente recuperato a fini energetici. In Tabella 6 sono riportati i valori relativi al potere calorico della sansa e suoi sottoprodotti.

Tabella 6- Potere calorico della sansa e sottoprodotti

Sottoprodotto	Potere calorico (kcal/kg)
Sansa da pressione	2.800-3.000
Sansa (3 fasi)	2.500 - 2.800
Sansa esausta	3.500
Nocciolino	4.000

Fonte: Pubblicazione UNEP

Tale pratica di recupero consente di risparmiare sui costi dell'energia prodotta da fonti non rinnovabili, evitando il ricorso a fonti combustibili fossili, tra l'altro sempre più costose, oltre che inquinanti per l'ambiente. La termovalorizzazione delle sanse esauste o dei nocciolini consente inoltre di eliminare il problema dei residui trasformandoli in materie prime per generare energia termica ed elettrica. Permette infine di sostituire altri combustibili contribuendo alla diversificazione energetica, e comporta una riduzione di inquinanti nell'aria e delle emissioni ad azione climalterante (gas serra). La valorizzazione delle sanse a fini energetici può essere sfruttata sia per la produzione di energia termica che elettrica (co-generazione).

1.4.5. Produzione di mangimi

Un'ulteriore possibilità di valorizzazione della sansa di oliva è quella di impiegarne la polpa quale integratore nell'alimentazione animale (Jardak et al., 1997). Le sanse denocciolate possono trovare impiego come complemento alla nutrizione animale e possono quindi essere d'interesse per l'industria mangimistica e il settore dell'allevamento animale principalmente bovino, ovino e caprino. La sansa vergine di oliva presenta una elevata percentuale di fibra, quale cellulosa e lignina, quest'ultima non digeribile dagli animali. Pertanto, si rende necessario ridurre l'elevata presenza di fibra; questa riduzione è ottenibile con la separazione meccanica del nocciolino, ricco in lignina, dalla polpa. Tale separazione consente altresì un arricchimento del contenuto proteico del 15-18%. La polpa così ottenuta, dopo essere stata eventualmente pellettizzata, è utilizzabile, in miscela con altri costituenti, per la formazione della razione alimentare. Questa pratica risulta essere di grande interesse per l'alimentazione del bestiame nelle zone aride del bacino del Mediterraneo, laddove è difficoltoso l'approvvigionamento di foraggio fresco. Riguardo all'uso zootecnico la sansa, avendo un adeguato patrimonio antiossidante e una frazione grassa, caratterizzata da una composizione acidica di pregio (alto contenuto di acido oleico ed equilibrata composizione in acidi grassi poli-insaturi), potrebbe essere utilizzata come integratore nell'alimentazione zootecnica. Sono stati fatti di recente studi sulla possibilità di utilizzare sansa di olive denocciolata nell'alimentazione dell'agnello pesante (Ragni et al., 2003), che hanno dimostrato come questo alimento nell'area del mediterraneo possa costituire una valida integrazione

all'alimentazione di piccoli ruminanti. Nell'uso zootecnico della sansa si deve poi considerare che ci sono dei limiti di somministrazione legati al suo contenuto di lignina che la rende poco digeribile.

1.5 Aspetti microbiologici degli scarti oleari

1.5.1 La biodiversità batterica negli scarti oleari

Grande parte della biodiversità microbica all'interno degli scarti di frantoio origina dal suolo e da ambienti acquiferi, nei quali sono stati identificati anche batteri fecali (Kavroulakis et al. 2011, Tsiamis et al. 2012).

Tsiamis et al. 2012 hanno rivelato che la struttura della comunità batterica è sostanzialmente influenzata dallo specifico cultivar dal quale lo scarto origina, infatti, le comunità batteriche derivanti da diverse varietà di olive condividono all'incirca soltanto il 15% delle OTU identificate, indicando chiaramente come il fattore cultivar sia determinante nel profilo della comunità. Inoltre, in tutti i campioni esaminati, la diversità dei batteri coltivabili era costituita da alcuni membri di *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Bacteroidetes*, mentre le analisi molecolari hanno evidenziato la presenza di una biodiversità più ampia dominata da membri di tutte le classi di *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria* and *Actinobacteria*.

Vivas et al. 2009 hanno evidenziato che gli scarti derivanti dal sistema di estrazione a due fasi sono dominati da membri appartenenti al Phylum *Proteobacteria*, seguito da *Actinobacteria* (*Streptomyces*), *Firmicutes* (*Staphylococcus*) e ceppi di *Acidobacteria* non coltivabili quale componente minoritaria della comunità all'interno dello scarto.

Inoltre, membri di *Hydrocarboniphaga*, *Pseudoxanthomonas* e *Stenotrophomonas* (*Gammaproteobacteria*) sono stati identificati, mentre *Comamonas* (*Betaproteobacteria*) era il principale gruppo microbico registrato. Infine, un solo rappresentante degli *Alphaproteobacteria*, *Brevundimonas* sp., è stato trovato (Vivas et al. 2009).

Allo scopo di affrontare i problemi legati allo smaltimento degli scarti oleari, con particolare riferimento ai valori di pH acido e all'odore sgradevole, è stato aggiunto Ca(OH)_2 agli scarti ottenuti dal sistema a due fasi ottenendo la formazione di un sottoprodotto secondario alcalino (Ntougias et al. 2006a). Il cambiamento del valore di pH dato da questo trattamento chimico ha favorito batteri basofili e alcalino-tolleranti con un certo grado di alofilia. Ntougias et al. 2006b hanno così identificato i generi *Bacillus*, *Idiomarina*, *Halomonas*, and *Nesterenkonia* come anche batteri alo-tolleranti filogeneticamente associati ai generi *Corynebacterium*, *Novosphingobium*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter*, e *Serratia*.

Inoltre, da questo studio è stato rivelato che la maggioranza di questi isolati può utilizzare i composti fenolici che caratterizzano tali scarti come unica fonte di carbonio.

La microflora presente nello scarto indagata in un altro studio (Jones et al. 2000) sembra essere alterata nella struttura della membrana lipidica in un modo atipico tale da favorire l'adattamento della cellula alle condizioni di stress date dalla bassa attività dell'acqua (a_w), basso pH e dall'elevato contenuto di polifenoli.

Dal punto di vista infettivo, *Staphylococcus spp.* negli scarti oleari può essere considerato un potenziale agente infettivo. Basandosi sulle metodiche API e conta vitale, anche ceppi di *Enterobacter cloacae* sono stati frequentemente trovati negli effluenti tal quali, seguito da membri delle specie *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Serratia odorifera* (Venieri et al. 2010), mentre *Citrobacter braakii* risultava predominante durante l'acidogenesi. Rappresentanti delle specie *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae* e *Photobacterium damsela* anche sono stati individuati. Inoltre, numeri elevati di *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, e *Enterobacter spp.* sono stati registrati negli scarti di frantoio, tenendo conto del fatto che *Enterobacter spp.* sono patogeni umani (Venieri et al. 2010). Quindi è possibile affermare che *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* come anche *Firmicutes* e *Actinobacteria* sono i principali gruppi batterici che sono stati ritrovati nei sottoprodotti dell'industria olearia.

Tenendo conto del fatto che l'analisi della distribuzione delle sequenze del 16S depositate nei database internazionali potrebbe essere influenzata dagli step di amplificazione PCR che precedono il sequenziamento, è stata comunque constatata la presenza di 585 sequenze batteriche identificate all'interno degli scarti oleari.

L'analisi di questi filotipi conferma che gran parte delle sequenze ricade all'interno dei gruppi *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria*. I gruppi *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* rappresentano da soli il 50% delle sequenze geniche 16S rRNA depositate in GenBank, mentre i *Firmicutes*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* rappresentano circa il 17, 12, 9 e 7% dei filotipi batterici identificati negli OMW, rispettivamente (Fig 3).

All'interno dei *Gammaproteobacteria*, i gruppi *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Xanthomonadaceae* e *Pseudomonadaceae spp.* sono i maggiori rappresentanti. Inoltre, i ceppi appartenenti alle *Oxalobacteraceae* e *Comamonadaceae* sono predominanti all'interno dei *Betaproteobacteria*, mentre le *Acetobacteraceae* sono il taxon maggioritario negli *Alphaproteobacteria*. Tra i *Firmicutes*, le *Bacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Lactobacillaceae* e

Paenibacillaceae sono le famiglie più abbondanti, mentre i filotipi associati agli *Actinobacteria* fanno parte delle famiglie *Micrococcaceae*, *Microbacteriaceae* e *Propionibacteriaceae*. I filotipi identificati come *Bacteroidetes* negli scarti sono associate alle famiglie *Prevotellaceae*, *Porphyromonadaceae* e *Sphingobacteriaceae*.

Approssimativamente, il 20% dei filotipi batterici identificati all'interno dei sottoprodotti oleari e in ambienti ad essi legati appartengono al gruppo dei coliformi (*Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, e *Serratia spp.*) ed altri batteri enterici (Brugère et al. 2009), come le famiglie *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Eubacteriaceae*, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, e *Ruminococcaceae spp.* Questi risultati impongono la necessità di uno smaltimento *safe* di tali scarti.

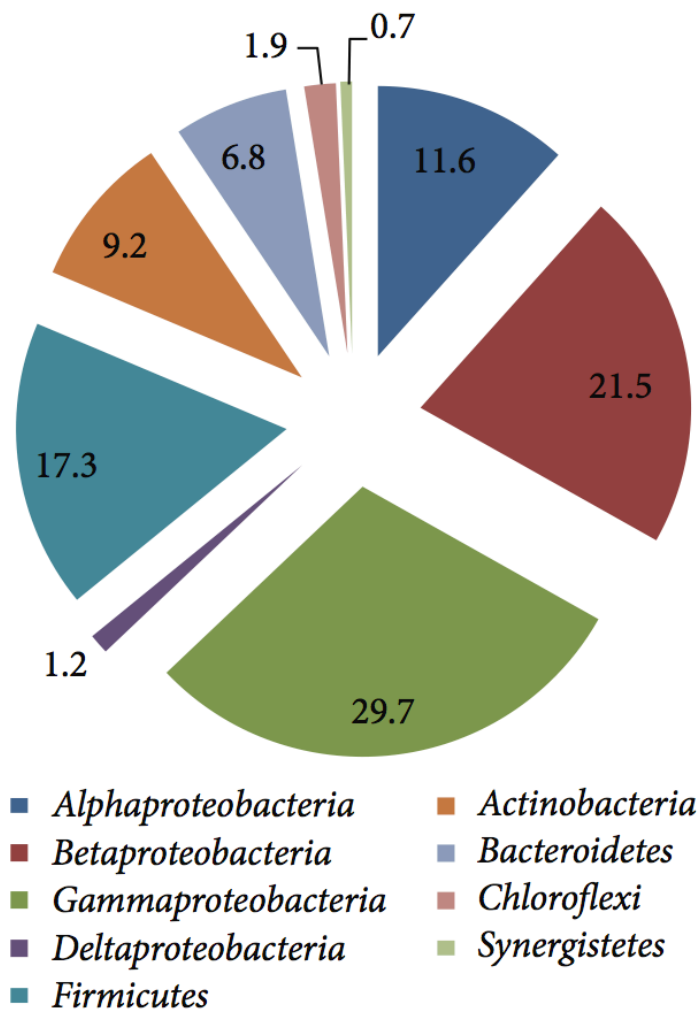


Fig.3 Filotipi batterici identificati all'interno degli scarti oleari (Ntougias et al. 2013)

1.5.2 La biodiversità fungina negli scarti oleari

Le popolazioni di lieviti sembrano essere molto abbondanti all'interno degli scarti di frantoio (Ben Sassi et al. 2006). Infatti, lieviti dei generi *Geotrichum* (*G. candidum*), *Candida* (*C. membranifaciens*, *C. michaelii*, *C. inconspicua*, e *C. tropicalis*), *Pichia* (*P. fermentans* and *P. holstii*), *Rhodotorula* (*R. mucilaginosa*), e *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*) sono stati recentemente isolati in questi scarti (Bleve et al. 2011).

In accordo con quanto detto sopra, Sinigaglia et al. 2010 hanno riscontrato che *Candida boidinii*, *Pichia holstii* (syn. *Nakazawaea holstii*), *P. membranifaciens*, e *Saccharomyces cerevisiae* erano le specie predominanti identificate nei sottoprodotti oleari della Regione Puglia (Italia) mostrando delle attività fortemente pectolitiche e xilanolitiche. A questo riguardo, è stato osservato che questi lieviti potevano effettivamente ridurre i fenoli totali, con la conseguente diminuzione di molti composti, come l'acido p-cumarico, vanillico e caffeico (Sinigaglia et al. 2010). Altri gruppi appartenenti a *Pichia* (*P. guilliermondii*-syn. *Meyerozyma guilliermondii*) e *Candida* (*C. diddensiae* e *C. ernobii*) spp. sono stati individuati anche nei sottoprodotti di frantoio in Marocco (Ben Sassi et al. 2008)

In un altro studio (Romo-Sanchez et al. 2010) è stato riscontrato che molti di questi isolati presentavano attività enzimatiche come quella cellulasica, beta-glucanasica, beta-glucosidasica, perossidasi e poligalatturonasi, le quali nel complesso contribuiscono alla degradazione di composti complessi come i fenoli presenti negli scarti.

Inoltre, basandosi su questo studio, la biodiversità dei lieviti all'interno delle sanse e, più in generale, dello scarto di frantoio, sembra dipendere dalla varietà dell'olivo. Una rassegna del National Center for Biotechnology Information (NCBI) ha rivelato la presenza di 106 sequenze depositate che erano associate ai funghi identificati nello scarto e in ambienti ad esso legati.

L'analisi di queste sequenze conferma che la maggioranza dei filotipi ad esse associati ricadono nei gruppi *Glomeromycota*, *Basidiomycota*, *Ascomycota* e funghi che non sono stati assegnati (Fig. 4).

La maggiorparte di questi filotipi, circa il 60%, fanno parte dei *Basidiomycota*, mentre i *Glomeromycota* e i funghi non classificati rappresentano circa il 19 ed il 17% rispettivamente. Soltanto il 3% è dato dal gruppo *Ascomycota*, anche se è possibile che questa popolazione sia sottostimata dal momento che molti studi in letteratura evidenziano l'utilizzo di primer

specifici soltanto per i due gruppi maggioritari (*Basidiomycota* e *Glomeromycota*) (Ipsilantis et al. 2009).

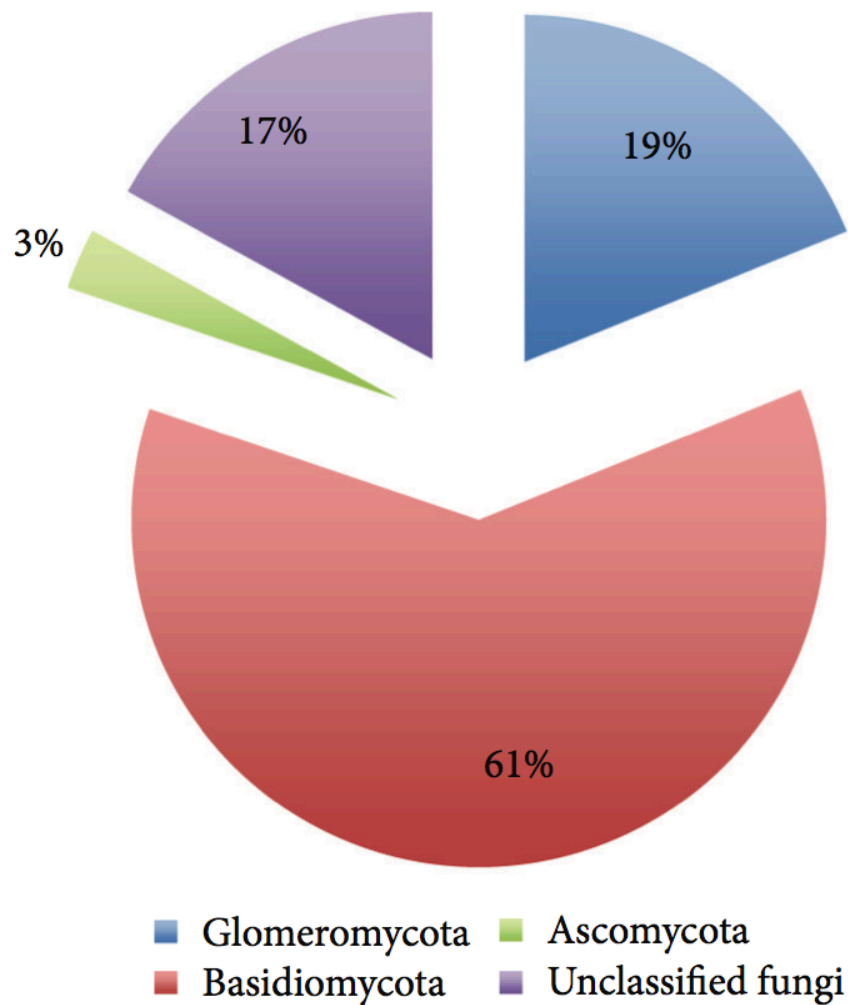


Fig.4 Filotipi fungini identificati all'interno degli scarti oleari (Ntougias et al. 2013)

Sulla base di questi studi, è possibile affermare che i generi *Pichia*, *Candida*, e *Saccharomyces* sono i lieviti più abbondanti negli scarti oleari e la riduzione dei composti come fenoli e zuccheri è la principale funzione di questi microrganismi all'interno di questo habitat, anche se sembra che essi di fatto contribuiscano di meno alla decolorazione degli scarti rispetto ai funghi *white-rot* (Ben Sassi et al. 2008). Inoltre, il pH acido che caratterizza

tale scarto, potrebbe risultare vantaggioso per le popolazioni fungine che competono con i batteri per i nutrienti.

I funghi filamentosi come *Aspergillus* e *Penicillium spp.*, sono abitanti comuni delle sanse (Millan et al. 2000, Aissam et al.2007) mentre i funghi *white-rot* sono stati isolati in misura minore. Sembra che elevate concentrazioni saline e di zuccheri e pH acidi possano favorire la crescita dei lieviti osmotolleranti (Giannoutsou et al. 2004).

1.6 Microbiologia del processo di compostaggio

Il compostaggio è un processo naturale di trasformazione biologica della matrice organica che produce un materiale stabilizzato, mineralizzato, igienizzato e fitocompatibile. Si tratta di un processo aerobico di decomposizione biologica della sostanza organica (Roig et al. 2006).

La generazione di calore che si ottiene durante il processo di compostaggio è conseguenza delle attività metaboliche dei microrganismi che portano a drammatici cambiamenti chimico-fisici della sostanza organica, ottenendo alla fine biomassa, CO₂ e prodotti finali che costituiscono l'*humus*. La trasformazione della materia organica è in gran parte dovuta alla rapida successione di popolazioni microbiche specializzate che esprimono una vasta gamma di attività enzimatiche (Tuomela et al. 2000, Ryckeboer et al., 2003).

In particolare, le tannasi microbiche sono coinvolte nella degradazione dei tannini, una classe di polifenoli presente appunto negli scarti oleari la cui attività gioca un ruolo importante nel processo di compostaggio dei sottoprodotti oleari e nel processo di umificazione della sostanza organica. Il loro contributo, quindi, può migliorare le proprietà agronomiche della matrice finale da destinare a molteplici impieghi come quelli precedentemente illustrati (Pepi et al. 2010).

Infatti il processo avviene con l'ausilio di microrganismi aerobi i quali si accrescono, catalizzando una parziale degradazione aerobica delle sostanze organiche, una trasformazione ossido-riduttiva di alcuni dei composti inorganici e la sintesi di nuovi composti organici più stabili. La conduzione del processo di compostaggio presuppone, quindi, la corretta conoscenza dei meccanismi microbici che ne sono alla base (Ntougias et al. 2006, Albuquerque et al. 2007). Ogni materiale di natura biologica può essere avviato al compostaggio, anche se può essere necessario eseguire una miscelazione di più materiali per ottenere un idoneo substrato di partenza. Per loro natura i sottoprodotti della lavorazione olearia possono essere considerati un ottimo materiale di partenza per ottenere compost di "qualità". Questo processo permette di apportare sostanze nutritive ai terreni agricoli ed evita gli effetti negativi. Il prodotto finale è esente da xenobiotici, è ricco di nutrienti minerali e di sostanza organica stabilizzata.

Pertanto il compostaggio è una tecnica attraverso la quale viene controllato, accelerato e migliorato il processo naturale a cui va incontro qualsiasi sostanza organica per effetto della flora microbica naturalmente presente nell'ambiente.

Ciò che si ottiene dal processo di compostaggio è:

- la **stabilizzazione** del rifiuto: cioè il raggiungimento della maturità sia biologica che agronomica, che garantisca l'assenza di agenti fitotossici. Ciò avviene nella fase di bioossidazione termofila in cui i microrganismi, in presenza di ossigeno, ossidano la sostanza organica attraverso la mineralizzazione della frazione più facilmente fermentescibile.
- l' **igienizzazione** del rifiuto: la decomposizione aerobica libera una notevole quantità di energia sotto forma di calore; nella massa di materiale, in fermentazione controllata, le temperature (55-70°C) distruggono gli agenti patogeni, stabilizzando il prodotto dal punto di vista biologico.

Il processo di compostaggio, in base alle differenti popolazioni microbiche che si affermano e predominano e alle temperature raggiunte, viene suddiviso in tre fasi. Nella prima fase avviene la degradazione della sostanza organica più facilmente degradabile (zuccheri, amminoacidi, etc.) ad opera di microrganismi aerobi psicrofili e mesofili che consumano ossigeno e producono calore (reazione termofila), come ad esempio, quelli appartenenti al genere *Bacillus* (*B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*) isolati in uno studio condotto da Federici et al. 2011. Tale prima fase si definisce anche mesofila poiché i batteri che vi operano vivono a temperature intermedie (18-45 °C). In questa fase, quindi, gran parte delle sostanze organiche più semplici come carboidrati, lipidi, proteine vengono trasformate in acqua, calore e CO₂. Ed il calore è elemento importante in quanto è proprio l'innalzamento progressivo della temperatura provocato dall'attività metabolica dei batteri mesofili a portare alla scomparsa di questi batteri e l'elezione di quelle popolazioni batteriche più resistenti, innescando la fase termofila. In questa seconda fase, che può durare vari mesi, si sviluppano popolazioni di batteri autotrofi facoltativi termofili come quelli isolati da Federici et al. 2011, membri appartenenti al genere *Microbacterium spp.* e *Rhodococcus spp.* e inoltre specie di *Bacillus spp.* (*B. licheniformis*), e termofili estremi, capaci di vivere a temperature elevate (50-70 °C fino al massimo a 90 °C). La presenza di batteri autotrofi va giustificata con il fatto che gran parte delle sostanze organiche, utilizzabili dai batteri già presenti nella massa, sono state consumate, e questa condizione seleziona le popolazioni in grado di sfruttare sostanze chimiche come l'idrogeno per la produzione di energia necessaria a fissare l'anidride carbonica presente in composti energetici (batteri chemioautotrofi). Anche in tale fase il calore gioca un ruolo preminente in quanto deve essere adeguatamente dissipato per evitare che un ulteriore aumento di temperatura (oltre i 90°C) inattivi la maggior parte dei microrganismi e arresti il processo di compostaggio. Quindi nelle applicazioni

biotecnologiche del compostaggio è opportuno regolare il processo affinché non venga superata questa soglia di deriva termica. Durante la fase termofila, le alte temperature accelerano la degradazione di proteine, grassi e carboidrati complessi quali cellulosa ed emicellulosa, che rappresentano due tra i più importanti polimeri strutturali delle piante. Le stesse temperature causano anche reazioni di caramellizzazione non biologica degli zuccheri che, insieme all'incipiente formazione di sostanze umiche, contribuisce ad impartire il colore bruno al substrato. Inoltre l'elevata temperatura comporta anche un'elevata evaporazione di acqua. Ed è proprio la mancanza d'acqua e la pressione selettiva che portano ad una rapida scomparsa dei batteri e al termine della fase termofila. Man mano che la disponibilità dei composti ricchi di energia comincia ad esaurirsi la temperatura della matrice in trasformazione gradualmente decresce raggiungendo così la fase di raffreddamento e di maturazione mesofila. A tal punto si innesca la terza fase di maturazione in cui la bassa umidità favorisce la crescita e diffusione di funghi, che si erano propagati temporalmente per sporulazione al momento dell'innalzamento della temperatura, e di attinomiceti (*Actinobacteria*). Questi attueranno mediante l'emissione di specifici enzimi una progressiva, anche se incompleta, degradazione delle sostanze più complesse come la cellulosa, la lignina e le emicellulose. In questa ultima fase la temperatura raggiunta è simile a quella ambientale (Federici et al. 2011).

Quindi, dall'analisi delle diverse fasi del compostaggio, si osservano differenti gruppi microbici che intervengono nel processo di compostaggio e si tratta principalmente di batteri, attinomiceti e funghi.

I batteri posseggono la capacità di degradare un ampio spettro di sostanze differenti e sono i principali responsabili della produzione di calore durante il compostaggio. Essi sono generalmente decompositori veloci che utilizzano le sostanze più facilmente degradabili ed i metaboliti secondari dei funghi. Gli attinomiceti sono in grado di degradare sostanze complesse come lignina, chitina, cellulose e proteine. Quando intervengono nella fase finale di maturazione contribuiscono alla formazione di sostanze umiche e alla formazione del caratteristico "odore di terra" proprio del compost maturo.

Numerosi sono i funghi che intervengono sia nella fase mesofila sia in quella termofila del processo di compostaggio. Essi sono in grado di degradare tutti i polimeri complessi quali emicellulose, pectina, lignina e cere di origine vegetale, rendendo disponibili i metaboliti intermedi per l'attacco batterico (Šnajdr et al. 2008).

La biodiversità funzionale negli scarti di frantoio è stata descritta in letteratura come relativamente bassa anche se con tendenze in aumento durante i trattamenti aerobici (Vivas et al. 2009). Confrontando la diversità che caratterizza gli scarti freschi con quella presente nei prodotti di compostaggio o di vermi-compost, è stato osservato che quest'ultima mostrava degli incrementi nelle attività enzimatiche relative alla deidrogenasi, alla beta-glucosidasi e all'ureasi come conseguenza della biotrasformazione dei composti fenolici (Vivas et al. 2009). Il compost derivante da tali scarti comunemente esibisce attività enzimatiche extracellulari molto elevate, come quelle delle esterasi e delle ureasi, mentre attività più basse sono state registrate per enzimi la cui funzione è legata direttamente a cellule microbiche metabolicamente attive (Benitez et al. 2005, Fernandez-Gomez et al. 2011). Il contenuto di carbonio e azoto all'interno degli scarti oleari compostati sembra influenzare la diversità catabolica e funzionale della microflora autoctona andando ad alterarne la struttura più a favore degli *Alphaproteobacteria* e *Actinobacteria* piuttosto che dei *Betaproteobacteria* (Fernandez-Gomez et al. 2011). Infatti, Fernandez-Gomez et al. 2011 hanno riportato che lo scarto oleario compostato è dominato dai generi *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Sphingobacterium spp.* e che sia gli *Actinobacteria* che gli *Sphingobacteria* sono coinvolti nella stabilizzazione delle sostanze chimiche più complesse.

In generale il processo di compostaggio sembra favorire lo sviluppo delle popolazioni batteriche specializzate nella decomposizione della sostanza organica, in particolare dei fenoli, tannini e lipidi. Ad esempio, Ertugrul et al. 2007 hanno isolato varie specie appartenenti al genere *Bacillus* con elevata attività lipolitica.

1.7 Effetti dell'aggiunta di scarti organici sull'ecosistema suolo-pianta

1.7.1 Priming effect

Nonostante i progressi fatti nelle tecniche di coltivazione intensiva, è ormai generalmente accettato che lo sfruttamento dei suoli provoca un deterioramento della qualità riducendo il contenuto di sostanza organica e la stabilità strutturale (Bronick and Lai, 2005). Allo scopo di prevenire la riduzione della sostanza organica, i suoli possono essere ammendati con scarti di natura organica, in particolare quelli derivanti da attività agro-industriali (Federici et al. 2009). In tale contesto, i microrganismi del suolo giocano un ruolo estremamente importante poiché sono coinvolti in molti processi biochimici ed in particolare nel turnover del carbonio, che permette loro di rilasciare i nutrienti biodisponibili per la pianta, di decomporre sostanze tossiche e di influenzare così le dinamiche della sostanza organica e la struttura dei suoli. Anche se la biomassa microbica rappresenta soltanto una piccola porzione del carbonio totale del suolo (0.1–5%, Robert and Chenu, 1992), questa è caratterizzata dall'avere un rapido turnover se confrontata con le altre componenti della sostanza organica (Sparling et al., 1998). Per tale ragione, le comunità microbiche possono essere considerate come indicatori dei cambiamenti che avvengono all'interno degli ecosistemi soggetti ad aggiunte di sostanza organica proveniente da scarti organici.

I fattori abiotici, come la temperatura, l'umidità del suolo e il pH, rappresentano le principali componenti che guidano il turnover del carbonio nel suolo, i quali agiscono indirettamente, principalmente andando ad influenzare l'attività microbica di mineralizzazione della sostanza organica e dei residui organici della pianta. Tuttavia, oltre questi fattori, molti fattori biotici influenzano direttamente la mineralizzazione del carbonio e a tale proposito è stato introdotto il termine *priming effect*, per descrivere i cambiamenti in termini di turnover della sostanza organica, prodotti dall'aggiunta di sostanze organiche o minerali (Kuzyakov et al. 2000) al suolo (Fig.5). Tali cambiamenti sono dovuti all'alterazione dell'attività microbica come risposta all'anormale ammontare e disponibilità di carbonio.

L'evoluzione accelerata di CO₂ in risposta all'attivazione del metabolismo microbico come anche un più alto turnover della biomassa microbica non è correlato, tuttavia, al turnover della sostanza organica e quindi, in questo caso, si tratta di un priming effect apparente (aPE).

Solitamente, la successione microbica che ha inizio dopo l'aggiunta di sostanza organica fresca è accompagnata dall'attivazione di vari microrganismi che precedentemente erano dormienti, i quali rispondono in modo specifico ai substrati aggiunti.

L'attività accelerata di questi microrganismi può stimolare la degradazione della sostanza organica del suolo come risultato del co-metabolismo ed una elevata produzione enzimatica producendo quindi il priming effect reale (*rPE*).

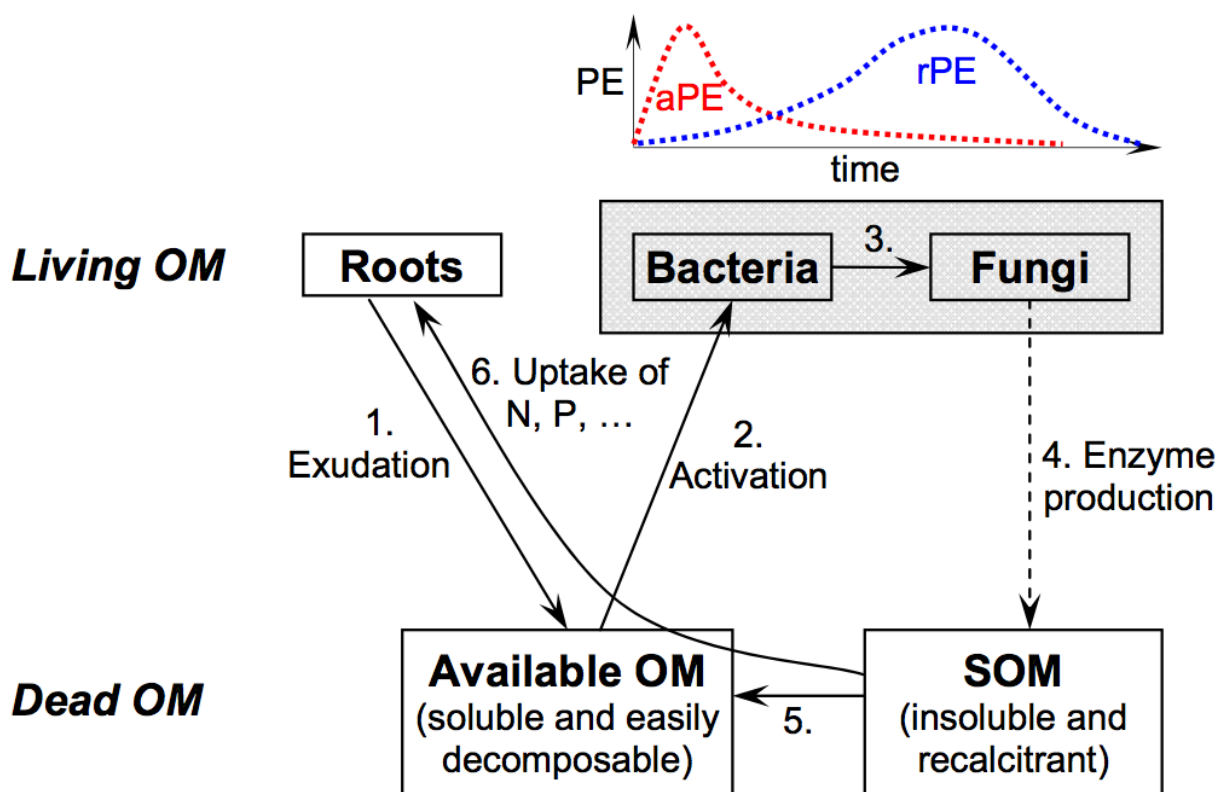


Fig.5 Successione degli eventi che si verificano durante il *priming effect reale e apparente* (da Kuzyakov et al. 2010).

La questione che in letteratura viene ampiamente discussa si riferisce sostanzialmente a quali microrganismi siano responsabili del priming effect, sia esso reale o apparente (Paterson et al. 2007, Moore-Kucera and Dick 2008). Questi studi, infatti, rivelano che i batteri rappresentano il primo gruppo che intrappola e metabolizza grande parte delle sostanze organiche più facilmente disponibili subito dopo che esse sono state incorporate nel suolo. Tali attività determinano la conseguente accelerazione del turnover della biomassa batterica, in particolare dei batteri *r*-strateghi, responsabili del priming effect apparente (Blagodatskaya et al. 2007, Nottingham et al 2009).

Gli step successivi nella degradazione della sostanza organica sono una questione aperta, alcuni autori come Fontaine et al. 2003 suggeriscono che altri gruppi, che preferenzialmente metabolizzano sostanze meno disponibili, beneficiano della necromassa batterica prodotta dopo l'esaurimento di quelle sostanze più facilmente disponibili. Uno di questi gruppi microbici potrebbe essere rappresentato dai funghi i quali si specializzano nella degradazione delle sostanze organiche più complesse e meno accessibili per i batteri, capaci di crescere in condizioni di scarsità di nutrienti o di utilizzare substrati lontani da loro grazie al supporto delle ife. Questi microrganismi sono dunque principalmente *K*-strateghi, che vengono inizialmente stimolati dai residui batterici e dai loro lisati per poi degradare sostanze organiche scarsamente disponibili, ciò determina l'incremento del turnover della sostanza organica del suolo e dunque contribuiscono al priming effect reale (Otten et al. 2001, Fontaine et al. 2003, Blagodatskaya et al. 2010). Tuttavia, sostenere che i funghi siano gli unici responsabili del rPE non sarebbe corretto poiché microrganismi *r*- e *k*-strateghi sono rappresentati sia nei funghi che nei batteri; inoltre, in entrambi i gruppi si trovano specie capaci di degradare sostanze di differente grado di complessità con possibilità di modificare le loro preferenze secondo la disponibilità del substrato presente.

Tenendo in considerazione l'ecosistema suolo-pianta, è ragionevole sostenere che i meccanismi coinvolti nel priming effect a seguito dell'aggiunta di scarti organici, come gli scarti oleari, sono estremamente rilevanti avendo quindi delle conseguenze anche su particolari compartimenti come quello della rizosfera.

1.7.2 Interazioni tra radice e suolo.

Quando ci riferiamo all'interazione tra pianta ed ecosistema nella quale questa è ubicata, anche nel caso di piante in vaso, tre sono le regioni principali da prendere in considerazione (Fig.6):

- L'apparato radicale;
- La rizosfera;
- Il *bulk soil*.

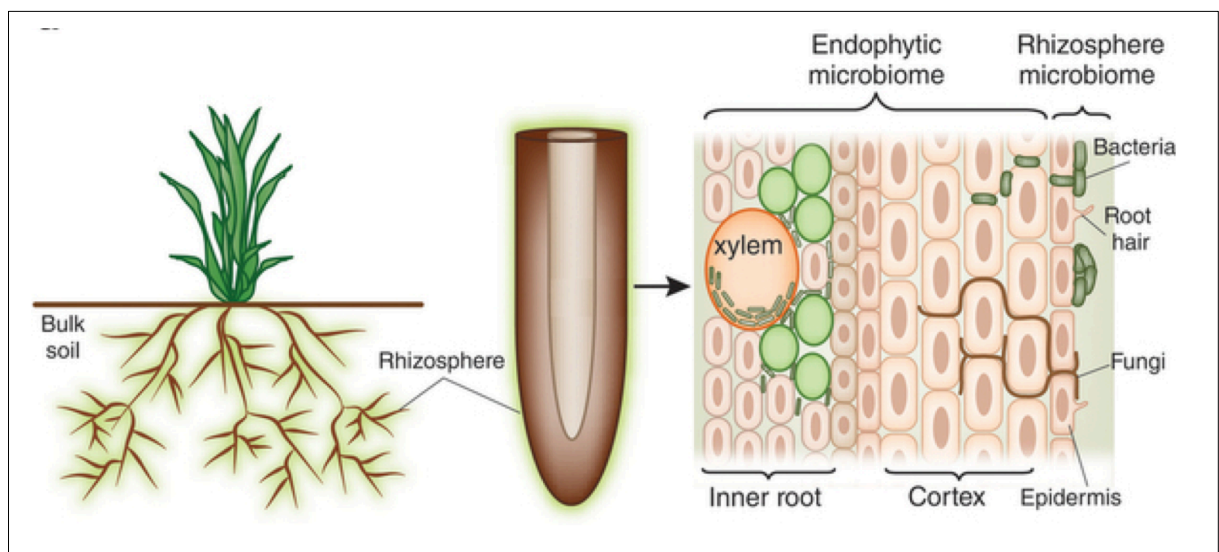


Fig.6 Rappresentazione dell'ecosistema suolo-pianta attraverso i suoi principali comparti costituiti da suolo, rizosfera e radici

La radice è l'organo della pianta specializzato nell'assorbimento di acqua e sali minerali dal terreno, fondamentali per la vita dell'organismo vegetale. Ha anche la funzione di ancoraggio, di produzione di ormoni e di secrezione di essudati. La rizosfera (dal greco *rhizo*=radice; *sphàira*=sfera) è la porzione di suolo che circonda le radici delle piante, da cui queste assorbono i nutrienti essenziali e l'acqua necessaria per crescere. In questa regione si trovano componenti biotiche come microorganismi simbiotici, batteri benefici e patogeni, funghi micro e macroscopici. La rizosfera può essere suddivisa in tre zone:

- endorizosfera, ambiente multi stratificato, che si estende dalla superficie delle radici fino ai primi strati cellulari interni, dove si può avere invasione microbica e colonizzazione;
- rizopiano o superficie esterna radicale, costituito dallo strato epidermico con peli radicali (rizoderma) e dallo strato mucoide, dove si può avere una colonizzazione microbica;
- ectorizosfera, che consiste nel volume di suolo adiacente alle radici di dimensioni variabili a seconda del tipo di pianta e delle interazioni con le popolazioni microbiche presenti in tale zona. Infine, con il termine *bulk soil* si indica il terreno, il suolo, al di fuori della rizosfera non penetrato dalle radici delle piante. In questa regione la concentrazione dei composti organici naturali è molto più bassa rispetto a quella della rizosfera; lo stesso vale per le popolazioni microbiche, presenti in misura minore. L'influenza della pianta sull'ambiente nella quale questa è ubicata si esplica attraverso la rizodeposizione, processo di secrezione da parte dell'apparato radicale di materiale organico e inorganico. Questo materiale può essere composto da cellule o frammenti cellulari o da essudati radicali. Gli essudati prodotti dalle piante (Fig.7) e rilasciati nel terreno circostante si possono classificare in due tipologie:
 - Essudati a basso peso molecolare: composti idrosolubili come zuccheri, acidi organici, aminoacidi e fenoli;
 - Essudati ad alto peso, ovvero sostanze macropolimeriche polisaccaridiche insolubili come ectoenzimi (fosfatasi, polifenoli ossidasi) e mucillagini, come il mucigel che circonda le radici e nel quale sono immersi i microrganismi. Il mucigel ha la funzione originaria di lubrificare la radice per permettere la penetrazione della stessa all'interno del suolo; è però un ottimo ambiente per la crescita di batteri, specialmente azotofissatori, e funghi.

Il fenomeno della rizodeposizione porta a quello che è definito effetto rizosfera, termine coniato da Hiltner (1904) per descrivere l'influenza degli essudati radicali nella proliferazione dei microrganismi del suolo e interni alla radice (Hartmann et al., 2008): la secrezione nel suolo di tutti questi essudati ne modifica la composizione, apporta sostanze nutrienti per i

microrganismi, e questo influenza la microflora, sia per quanto riguarda la biodiversità che la carica microbica; le popolazioni microbiche sono dalle 5 alle 100 volte (in media 20 volte) più numerose nella rizosfera che nel resto del suolo. Questa variabilità è data dal fatto che la secrezione di essudati da parte delle radici è influenzata da numerosi fattori come la specie vegetale, l'età e lo stato nutrizionale della pianta e le condizioni ambientali.

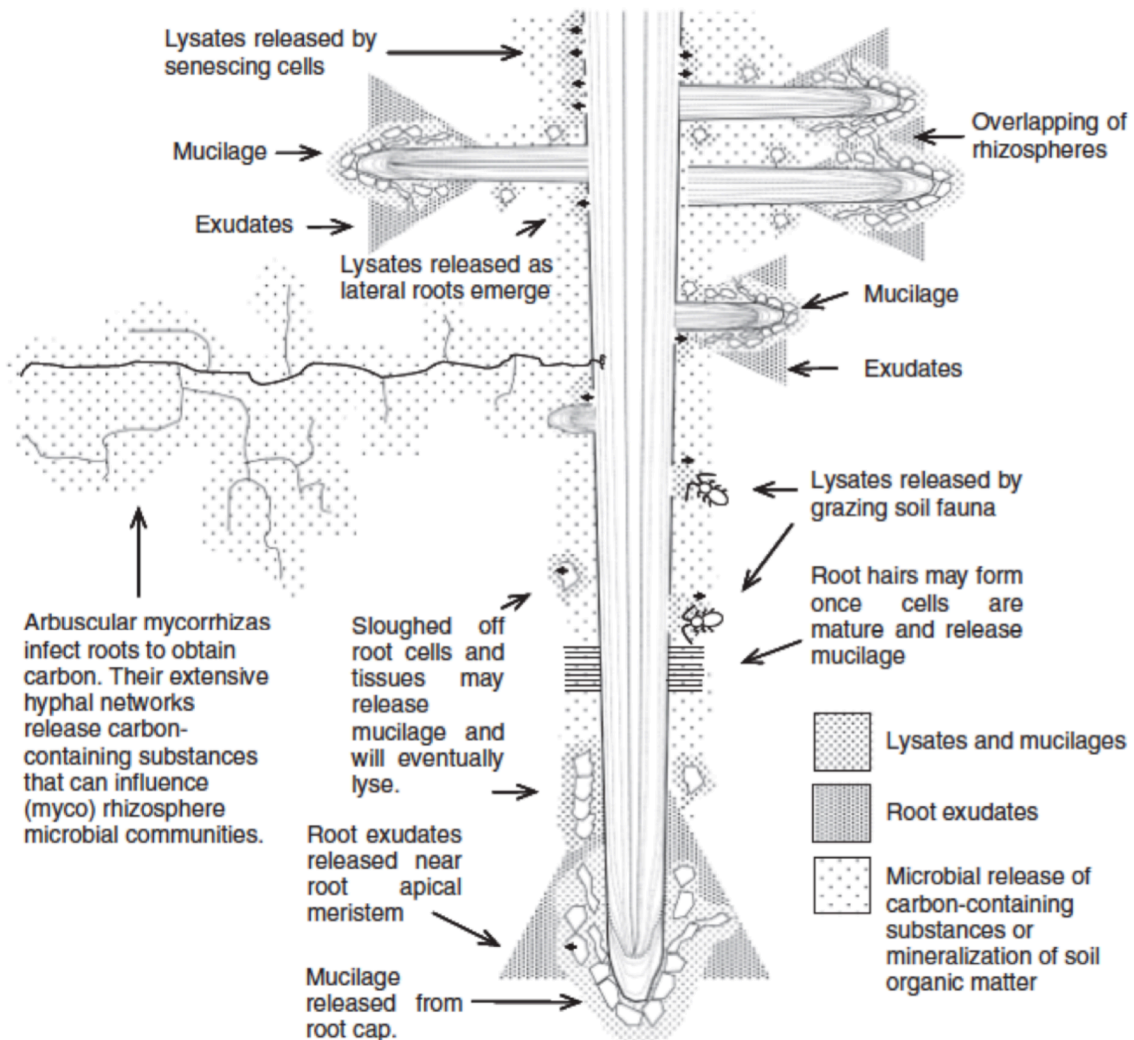


Fig.7 Interazioni tra apparato radicale della pianta e microrganismi presenti nel suolo.

Con la denominazione *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) (Kloepper et al., 1978) si indicano tutti quei microrganismi presenti nella rizosfera che promuovono la crescita della pianta e hanno effetto di biofertilizzanti, biorisanatori e biopesticidi; un esempio di PGPR sono i batteri generi *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium* e *Bacillus*. La struttura del suolo, consentendo il movimento dei microrganismi rizosferici presenti nelle immediate vicinanze della radice, ne favorisce il reclutamento (Dennis et al., 2010). Gli effetti benefici sulla pianta si esplicano attraverso meccanismi d'azione diretti e indiretti (Fig.8); esempi di effetti diretti sono la fissazione dell'azoto atmosferico, la produzione di siderofori chelanti il ferro e la solubilizzazione del fosforo che rendono più disponibili le due sostanze per l'assorbimento da parte delle piante, e la sintesi di fitormoni che ne stimolano lo sviluppo.

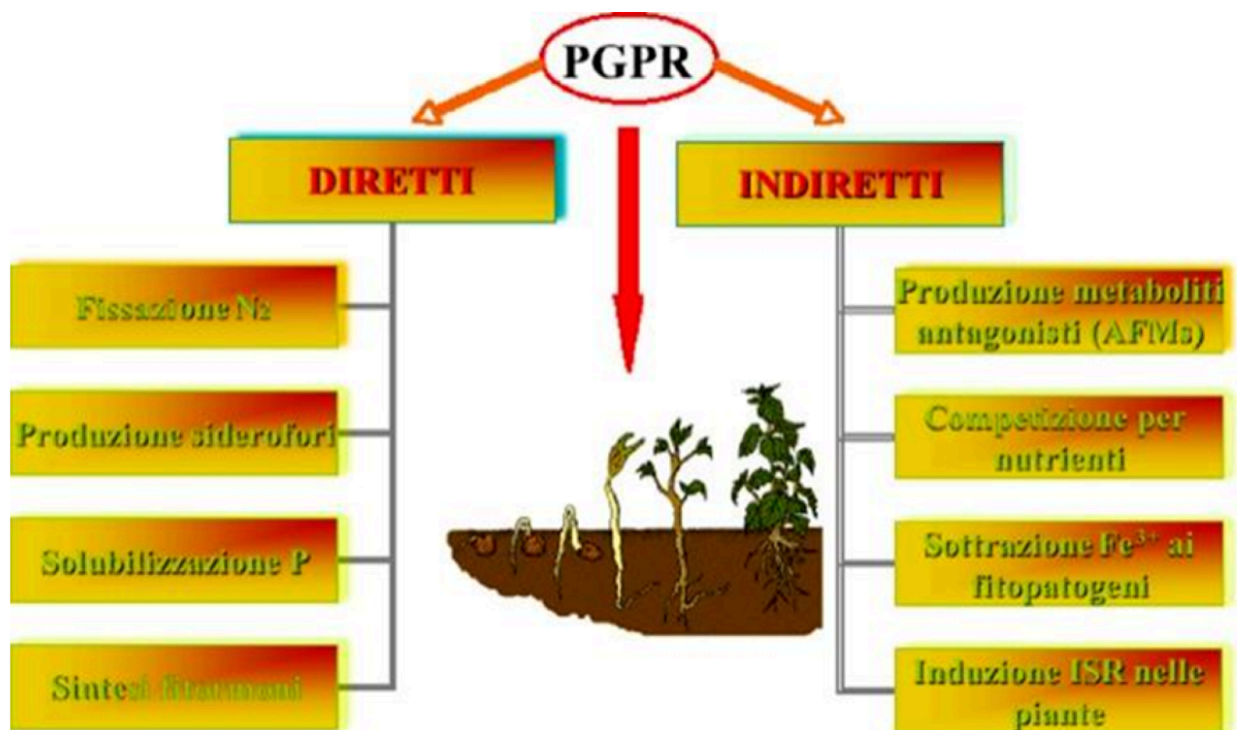


Fig. 8 Effetti diretti e indiretti dei *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) sulla pianta

Tra i meccanismi indiretti possiamo invece citare la produzione di metaboliti antagonisti nei confronti dei microrganismi dannosi, la competizione verso i patogeni per i nutrienti o per specifiche nicchie, la capacità di produrre siderofori chelanti il ferro non più disponibile per i microrganismi dannosi e l'induzione della resistenza sistemica indotta (ISR).

1.7.3 Interazioni tra pianta e microrganismi del suolo.

Quando si parla di ecosistema vegetale è necessario tenere in considerazione tutte quelle interazioni che si instaurano tra l'apparato radicale e i microrganismi presenti nel suolo, siano questi batteri o funghi.

Il suolo è un habitat ricco di comunità microbiche, appartenenti a gruppi differenti, le quali possono essere suddivise in due categorie: la microflora autoctona e i microrganismi zimogeni. La prima categoria comprende specie sia batteriche che fungine presenti a un livello generalmente stazionario; i gruppi ecofisiologici, capaci di svolgere specifiche funzioni ed attività metaboliche, appartengono a questa classe. La seconda categoria è quella dei microrganismi zimogeni: invasori alloctoni, i quali degradano i resti organici freschi, che si moltiplicano con rapidità per poi tornare al livello iniziale.

Fin dall'inizio della sua crescita la pianta interagisce con la componente biotica del suolo. La fase iniziale di interazione con i microrganismi si può definire come fase di colonizzazione nella quale i microrganismi, grazie a diversi fattori, si muovono verso le radici. Questo movimento può essere sia passivo, per mezzo di flussi di acqua nel suolo, che attivo, attraverso un processo di chemiotassi attivato dagli essudati vegetali che stimolano lo spostamento dei microrganismi verso l'apparato radicale. Tra i vari prodotti stimolanti la chemiotassi possiamo citare i composti fenolici e aromatici, gli zuccheri e gli amminoacidi. Successivamente alla fase di colonizzazione avviene un adsorbimento aspecifico dei microrganismi alla superficie della radice grazie alle forze elettrostatiche; è possibile poi l'ancoraggio della cellula batterica all'apparato radicale. Questo porta alla formazione di interazioni simbiotiche piuttosto complesse tra la pianta e il suo ospite. È possibile distinguere due tipologie di simbiosi: ectosimbiosi, nel caso in cui il microrganismo viva sulla superficie dell'ospite, ed endosimbiosi, nel caso in cui risieda nello spazio intercellulare o intracellulare. Nel secondo caso parliamo di endofiti.

La simbiosi permette in genere alla pianta di acquisire nuove funzioni sia metaboliche, come l'azotofissazione e la degradazione della cellulosa, che non metaboliche come la protezione da agenti chimici, fisici e biologici. La simbiosi si distingue in ulteriori due tipologie: ciclica, nel caso in cui ad ogni generazione la pianta debba "richiamare" attraverso segnali chimici i microrganismi simbiotici, e permanente, nel caso in cui il simbionte sia trasmesso verticalmente, quindi di generazione in generazione. Le micorrize sono un classico esempio di simbiosi tra l'apparato radicale e microrganismi del suolo; queste sono un tipo di associazione simbiotica mutualistica che si instaura tra le radici di molte piante e i funghi presenti nel suolo, alla quale possono partecipare, in diversa misura, anche i batteri. Da questa associazione sia la pianta che il microrganismo traggono vantaggio: la pianta fornisce ai funghi simbiotici carboidrati semplici prodotti con la fotosintesi indispensabili al loro metabolismo, i funghi producono fattori di crescita vegetali che inducono alterazioni morfologiche delle radici stimolando la formazione dello strato micorrizico.

I benefici che la pianta trae da tale simbiosi sono numerosi: il maggior sviluppo delle sue radici e quindi l'aumentata estensione dell'apparato radicale, l'amplificata efficienza di assorbimento di nutrienti, ioni e acqua, oltre che la protezione dagli stress ambientali e dai patogeni.

Si possono distinguere due tipi di micorrize: ectomicorrize (micorrize ectotrofiche) e le endomicorrize (micorrize vescicolari-arbuscolari); le prime sono un'infezione superficiale nella quale le ife non penetrano all'interno dei tessuti dell'apparato radicale, ma lo rivestono formando una guaina intorno alla radice; nel secondo caso si osserva invece una penetrazione del fungo all'interno delle cellule radicali. Un ulteriore esempio di relazione simbiotica tra pianta e microrganismo è quella che si instaura tra batteri dei generi *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* e piante di leguminosa. Questa interazione porta alla formazione di noduli radicali nei quali il batterio si differenzia in peribatterioide e converte l'azoto atmosferico in ammoniacale che viene utilizzata dalla pianta come fonte di azoto; il mutualismo si basa sul fatto che il batterio ricopre il ruolo di azotofissatore e la pianta fornisce ad esso carbonio, di conseguenza entrambi traggono beneficio dalla simbiosi.

I microrganismi del suolo e i simbiotici della pianta intervengono nei principali cicli biogeochimici risultando indispensabili per l'organismo vegetale: nel ciclo dell'azoto possiamo individuare microrganismi fondamentali nella fase di proteolisi e ammonizzazione, quindi nella mineralizzazione dell'azoto proteico con conseguente liberazione di NH_4^+ , e batteri nitrificanti, che ossidano l'ammonio a nitrito il quale viene ossidato a nitrato; nel ciclo

del carbonio troviamo cellulolitici, microrganismi che degradano la cellulosa, amilolitici, che degradano l'amido, pectinolitici, i quali degradano la pectina e ligninolitici che degradano la lignina.

Non tutti i microrganismi presenti nel suolo né tutti i simbionti apportano benefici alla pianta, in alcuni casi la pianta non riceve né danno né vantaggi in altri casi i simbionti sono fitotossici. I microrganismi saprofiti rientrano nella classificazione di microrganismi che non apportano svantaggi alla pianta, ma neanche vantaggi, se non in modo indiretto. Le funzioni di questi microrganismi sono numerose e tra queste è importante ricordare il loro ruolo nella decomposizione della sostanza organica e quindi nella mineralizzazione degli elementi nutritivi, indispensabili per l'equilibrio dell'ecosistema del suolo e per il circolo dei nutrienti. Di conseguenza il beneficio che la pianta ne trae è indiretto, ma comunque indispensabile.

Gli stessi essudati che richiamano simbionti benefici per l'organismo vegetale fungono da stimolo chemiotattico anche per quelli che sono simbionti patogeni e che quindi apportano danno alla pianta ad esempio inibendone la crescita attraverso la produzione di fitotossine, come il cianuro, o danneggiando la microflora della rizosfera come nel caso dell'inibizione dei batteri azoto-fissatori e delle micorrize.

Le interazioni tra pianta e microflora sono evidentemente molto complesse e si assiste a una reciproca interazione oltre che a una reciproca influenza: attraverso gli essudati le piante modificano la microflora la quale a sua volta influenza la pianta nei più svariati modi. È evidente come la vita della pianta e il suo sviluppo siano imprescindibili da questo legame con i microrganismi del suolo e come le modificazioni dell'ambiente possano, ad esempio attraverso l'utilizzo di compost derivanti dagli scarti oleari, portare a modificazioni della microflora con possibili effetti sulla crescita e sulla salute della pianta.

1.7.4 Effetti tossici degli scarti oleari sull'ecosistema suolo-pianta

La tossicità che caratterizza gli scarti dell'attività di frantoio risiede nel fatto che questi contengono elevati livelli di BOD₅, COD, polifenoli di peso molecolare variabile, acidi grassi a corta e a lunga catena e composti inorganici. Pratiche agricole poco ortodosse, che spesso vedono lo spandimento incontrollato di tali scarti in pieno campo, provocano problemi di natura ambientale come il rilascio di ammoniaca, metano e di cattivi odori nell'atmosfera, e il rilascio di sostanze organiche inquinanti nelle falde acquifere (Altieri et al. 2011).

I polifenoli presenti nelle sanse sono ben conosciuti per influenzare il processo di nitrificazione nel suolo e per avere effetti deleteri sull'attività della comunità microbica residente, aspetti legati anche all'elevato rapporto C:N ed il basso pH che caratterizzano questo tipo di scarto, i quali sembrano provocare l'immobilizzazione dell'azoto nel suolo (Benitez et al. 2005).

Quindi, la tossicità dei sottoprodotti oleari legata soprattutto alla presenza dei polifenoli, sembra essere rivolta verso piante, cellule animali, insetti e microrganismi.

In particolare, viene riportato che l'azione antimicrobica è stata riscontrata nei confronti di ceppi di *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*, e questa è molto più potente rispetto alle azioni sommate indotte dai singoli composti fenolici, sottolineando dunque un effetto sinergico (Obied et al. 2007).

Inoltre, i fenoli contenuti nelle sanse presentano effetti soppressivi verso i molluschi e nei confronti di erbacce e nematodi (Cayuela et al. 2008).

1.7.5 Effetti protettivi degli scarti organici da fitopatogeni

I funghi ed oomiceti patogeni delle piante sono considerati fattori tra i più limitanti della produttività negli ecosistemi agricoli, poiché sono difficilmente controllabili con i sistemi convenzionali quali l'impiego di colture resistenti e prodotti chimici fungicidi. La mancanza di controlli chimici affidabili, come anche la resistenza da parte di alcuni patogeni ai trattamenti chimici, rappresentano alcune delle ragioni che hanno portato allo sviluppo di nuove misure di controllo.

Il divieto dell'uso del metil bromuro, ad esempio, che è il più efficace prodotto per la disinfestazione dei suoli usato al mondo, ha ancora di più accentuato la necessità di provvedere a delle misure alternative che siano, oltre che altamente efficaci, anche a basso costo e con limitato impatto ambientale, in modo tale da incentivare un'agricoltura di tipo eco-sostenibile.

L'impiego di ammendanti organici di origine vegetale (l'incorporazione di residui vegetali nel suolo) o di letami animali, come anche compost e substrati da invasatura basati sulla torba, sono stati proposti, sia in sistemi agricoli convenzionali che biologici, per migliorare la struttura e la fertilità dei suoli e per diminuire l'incidenza di malattie causate da patogeni del suolo (Cavigelli e Thien, 2003, Noble e Coventry, 2005). Nel secolo scorso, l'introduzione di

fertilizzanti organici sintetici, di varietà resistenti a malattie e l'uso di fungicidi hanno progressivamente indotto gli agricoltori a credere che non vi potesse essere più alcuna utilità degli ammendanti organici per migliorare la fertilità dei suoli (Hoitink e Boehm, 1999). Tutto questo ha condotto a considerare i residui colturali ed il letame come rifiuti solidi.

Tale condotta ha causato una diminuzione della sostanza organica e della fertilità del suolo e un aumento di malattie portate da fitopatogeni (Bailey e Lazarovits, 2003). Problemi simili sono stati osservati anche per le coltivazioni di piante in vaso (Hoitink e Boehm, 1999), tuttavia, da ormai alcuni decenni, si riconosce un rinnovato interesse per l'applicazione di sostanza organica al suolo giacché la comunità scientifica ha portato all'attenzione la pericolosità fumiganti del suolo e fungicidi nei confronti dell'ambiente, della salute umana e degli ecosistemi.

Molti studi hanno mostrato che gli ammendanti organici possono controllare le malattie delle piante causate da fitopatogeni (Szczzech, 1999; Szczzech e Smolin'ska, 2001; McKellar e Nelson, 2003; Coventry et al., 2005). Inoltre, in molti di questi studi, vengono proposti dei possibili meccanismi di azione che portano alla soppressività della malattia, come ad esempio la stimolazione delle attività di batteri antagonisti, il rilascio di sostanze mico-tossiche durante la decomposizione della sostanza organica aggiunta o l'induzione di resistenza nelle piante ospiti.

Tuttavia, sono stati osservati anche effetti negativi da parte dell'aggiunta di ammendanti organici che hanno condotto all'incremento della severità della malattia (Mazzola et al., 2001; Tilston et al., 2002; Pérez-Piqueres et al., 2006). Anche in questo caso sono stati descritti alcuni possibili meccanismi che hanno portato a questa deriva, come ad esempio la stimolazione della crescita del fitopatogeno grazie alle sostanze nutritive apportate con l'ammendante organico, come ad esempio i residui solidi dell'industria olearia (Bonanomi et al., 2006a) oppure il rilascio di sostanze fitotossiche che indeboliscono la pianta ospite danneggiandone i tessuti radicali e dunque facilitando l'attacco del patogeno (Ye et al., 2004, Bonanomi et al., 2006b).

I risultati contrastanti sopra descritti producono scetticismo tra gli agricoltori circa l'impiego di ammendanti organici per il controllo delle malattie nei vegetali, atteggiamento accentuato dal fatto che al momento non esistono metodi affidabili che permettano di predire quale sia l'effetto di tale impiego sui patogeni del suolo (Scheuerell et al., 2005; Termorshuizen et al., 2007).

1.8 Metodi molecolari in ecologia microbica

1.8.1. DNA ribosomiali ed altri geni marcatori utilizzati in ecologia microbica per la differenziazione tassonomica delle popolazioni

Il marcatore molecolare maggiormente utilizzato in microbiologia ambientale è sicuramente il gene codificante l'rRNA 16S batterico (Fig.9). Gli rRNA rappresentano infatti, molecole essenziali per la vita delle cellule poiché costituiscono la parte non proteica dei ribosomi e rappresentano un elemento chiave della sintesi proteica. La loro funzione è quella di fornire un meccanismo per la decodifica del RNA messaggero in amminoacidi e di interagire con l'rRNA transfer, provvedendo all'attività della peptidil-transferasi. Queste molecole sono perciò presenti, nelle loro varianti, in tutte le cellule di tutti gli esseri viventi, tanto da considerarsi molecole “universali” e di origine antichissima. Negli organismi procariotici gli rRNA vengono distinti, in base al loro coefficiente di sedimentazione, in 5S, 16S e 23S e i relativi geni vengono indicati come 16S-, 23S- e 5S- rDNA. Negli eucarioti si distinguono invece gli rRNA, 18S, 28S e 5,8S.



Fig.9 Rappresentazione schematica delle regioni costanti e variabili del gene 16S rRNA.

I geni che codificano gli rRNA sono organizzati in entrambe le classi di organismi in operoni che consistono di una regione promotrice seguita dalla sequenza codificante per l'rRNA 16S/18S, una regione spaziatrice (*intergenic spacer region*, ITS), che può contenere un numero variabile di geni per l'rRNA transfer, la sequenza dell'rRNA 23S/28S e, dopo un secondo breve spaziatore, quella per il 5S/5,8S.

Il gene codificante l'rRNA 16S (16S rDNA) subisce mutazioni molto lentamente durante l'evoluzione e solo in rarissimi casi è soggetto ad eventi di trasferimento genico orizzontale. Per questo motivo l'analisi comparativa della sequenza del 16S rDNA permette di costruire alberi filogenetici e di stabilire quindi, le relazioni esistenti tra gli organismi viventi. Il 16S DNA è diventato quindi, negli ultimi anni il marcatore genico di elezione per gli studi tassonomici e filogenetici nei procarioti. Un secondo fattore determinante per la preferenza di questo gene, rispetto ad altri potenziali marcatori molecolari, risiede nel fatto che la sua dimensione è compatibile con l'amplificazione PCR e con uno sforzo di sequenziamento non eccessivo.

Questo fatto ha spinto i ricercatori a depositare nelle banche dati un numero enorme di sequenze del rDNA 16S, rendendo perciò questo gene un marcatore ideale per il confronto tra un ceppo incognito e la banca dati di tutti i microrganismi noti. Non esiste infatti, a tutt'oggi, alcun altro gene per il quale sia disponibile una paragonabile mole di dati.

In particolare, il gene codificante il 16S rRNA è costituito da circa 1550bp e contiene regioni altamente conservate interspaziate da regioni ipervariabili che assumono un'importante rilevanza filogenetica e tassonomica dato che sono quelle che possono accettare delle mutazioni e che differiscono perciò tra organismi diversi. Inoltre, la presenza di regioni del gene altamente conservate permettono la sua amplificazione *in vitro* mediante PCR, attraverso l'utilizzo di diverse coppie di primer "universali" che sono stati sviluppati ed ampiamente utilizzati negli ultimi anni (Giovannoni et al., 1990; Lane, 1985; Muyzer et al, 1993, 1995; Amann et al., 1995; Marchesi et al., 1998).

Uno dei possibili errori che però si può compiere nell'uso del rDNA 16S, come marcatore molecolare nello studio delle comunità microbiche, è quello di una sovrastima della biodiversità dovuta al fatto che praticamente tutti i microrganismi posseggono copie multiple dei geni ribosomiali. L'eterogeneità, spesso superiore al 5%, nelle sequenze geniche dei diversi rDNA 16S di uno stesso organismo, è stata infatti riportata da vari autori (Amann, 2000; Klappenbach et al., 2001; Shimizu et al., 2001).

Un ulteriore rischio potenziale nell'amplificazione PCR di questo gene direttamente dal DNA metagenomico, estratto da campioni ambientali, deriva dal fatto che spesso si ha la formazione di sequenze "chimeriche" dovute all'associazione di sequenze derivate da specie diverse. Due fattori principali possono incrementare la probabilità di formazione di questo tipo di strutture:

- la disponibilità di molecole altamente frammentate di rDNA 16S che possono essere generate sia durante l'estrazione del DNA che da una loro parziale elongazione durante la reazione di amplificazione PCR;
- la presenza di un'alta percentuale di regioni conservate nel rDNA 16S che dopo la denaturazione, possono appaiarsi tra loro durante la reazione di PCR.

L'amplificazione delle sequenze chimeriche, una volta originatesi, procede con la stessa efficienza delle altre sequenze di rDNA 16S presenti nel DNA metagenomico iniziale comportando quindi, una sovrastima della reale biodiversità di un campione e rendendo difficile il confronto di queste sequenze con quelle depositate nelle banche dati. Una sequenza chimerica può essere riconosciuta, in ogni caso, sia controllando la complementarità di alcune regioni della sequenza stessa oppure effettuando un'analisi comparativa di differenti sezioni del prodotto di amplificazione dell'rDNA 16S.

Mentre variazioni nelle sequenze del rDNA 16S hanno, comunque, permesso di aumentare notevolmente le conoscenze sulla diversità e l'ecologia delle comunità batteriche nel suolo, l'identificazione tassonomica dei funghi, basata sulla sequenza del rDNA 18S, risulta più problematica e limitata generalmente a livello di genere o famiglia. Questo è dovuto principalmente all'assenza di variazioni nelle sequenze del rDNA 18S di specie strettamente correlate come conseguenza dell'evoluzione temporalmente più corta dei funghi rispetto ai batteri. Come risultato, vi è quindi, anche la mancanza di banche dati di rDNA 18S esaustive. Comunque, mentre questo è principalmente vero per gli organismi appartenenti ai *phyla* degli Ascomiceti e Basidiomiceti, nel caso dei Glomeromiceti si hanno maggiori informazioni (Schüßler et al., 2001).

Una ulteriore limitazione nello studio della diversità fungina in campioni di suolo è dovuta alla mancanza di *primer* altamente specifici, in grado di amplificare solo l'rDNA fungino discriminando, nel DNA metagenomico estratto direttamente dal suolo, sequenze ribosomiali derivate da altri organismi procariotici o eucariotici. La sfida dei ricercatori, in questi anni, è stata quindi quella di costruire dei *primer* in grado di amplificare il maggior *range*

tassonomico possibile di specie fungine ma, allo stesso tempo, in grado di prevenire la co-amplificazione di sequenze derivate da altri organismi eucariotici strettamente correlati.

Come nel caso del rDNA 16S procariotico, anche l'rDNA 18S eucariotico (circa 1870bp) presenta delle regioni ipervariabili e delle regioni altamente conservate sulla base delle quali sono stati sviluppati *primer*.

Un'ulteriore regione *target*, ampiamente utilizzata in studi tassonomici nell'ambito della biodiversità fungina, è quella compresa tra il gene dell'rRNA 18S e quello dell'rRNA 23S, che comprende anche l'rDNA 5,8S e che viene detta *Internal Transcribed spacer* (ITS).

Tale regione, così come altre sequenze non codificanti dell'rDNA, ha subito il maggior grado di mutazione durante l'evoluzione e quindi notevoli variazioni di sequenza sono riscontrabili anche in specie strettamente correlate. Per questo motivo, la regione ITS è quella che fornisce, generalmente, la maggiore risoluzione tassonomica rispetto a sequenze derivate, invece, da regioni codificanti (Lord et al., 2002).

La reazione a catena della Polimerasi (PCR) è in grado di produrre milioni di copie di una porzione di un dato gene di interesse, di un intero gene o di *cluster* genici con alta fedeltà in breve tempo. Nel settore ambientale è sicuramente il metodo più impiegato per l'amplificazione del gene codificante l'RNA ribosomiale (rRNA) 16S ma viene anche applicato per l'analisi dei geni catabolici coinvolti nella biodegradazione dei contaminanti organici (Wilson et al., 1999).

Nonostante la PCR sia alla base della maggior parte degli studi molecolari condotti al fine di comprendere sia la struttura che la funzione di comunità microbiche in campioni ambientali, presenta delle limitazioni, derivate principalmente dall'estrazione diretta del DNA totale (metagenoma) dal campione stesso. Il punto iniziale nell'analisi del DNA metagenomico è, appunto, l'efficienza di estrazione e la purezza con la quale esso viene estratto e quindi la possibilità di poterlo utilizzare nelle successive applicazioni.

I metodi utilizzati per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni prima dell'estrazione degli acidi nucleici rappresentano alcune delle fonti principali di errori che possono essere introdotti nell'estrazione del DNA e ripercuotersi nelle successive analisi. Di particolare interesse è ad esempio la temperatura alla quale il campione viene conservato e la sua esposizione all'ossigeno. In campioni conservati per tempi lunghi, entrambi questi fattori possono, infatti, alterare la composizione microbica ed è quindi necessario estrarre gli acidi nucleici subito dopo la raccolta del campione per non modificare la composizione delle comunità microbiche originariamente presenti (Wintzingerode et al., 1997). Oltre alla raccolta

e conservazione dei campioni, anche i metodi di estrazione diretta del DNA possono essere fonte di errore: infatti, un'insufficiente lisi cellulare può portare alla preferenziale estrazione del DNA da batteri Gram-negativi mentre trattamenti troppo aggressivi possono provocare un'eccessiva frammentazione del DNA estratto (Wintzingerode et al., 1997).

L'efficienza di amplificazione può essere anche compromessa dal fatto che sostanze inibitrici, come acidi umici e fulvici, che vengono generalmente estratte con il DNA, possono interferire con la *Taq* polimerasi o altri enzimi di modificazione. Questo problema è stato comunque largamente superato negli anni con la messa a punto di diversi protocolli di estrazione e purificazione del DNA utilizzato poi come *template* per le successive reazioni di amplificazione (Smalla et al., 1993).

1.8.2. Elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE: Denaturing, TGGE: Temperature Gradient Gel Electrophoresis):

L'elettroforesi su gel a gradiente denaturante è una delle tecniche comunemente utilizzate in microbiologia molecolare per la caratterizzazione della struttura e lo studio della dinamica di popolazioni microbiche in campioni ambientali. La DGGE, in particolare, è stata largamente utilizzata in diversi studi di caratterizzazione della struttura di comunità batteriche sia in campioni di suolo che di acque (Muyzer et al., 1993; Heure & Smalla, 1997; Muyzer & Smalla, 1998; Macnaughton et al., 1999; Chang et al., 2000; Nakatsu et al., 2000; Watanabe et al., 2000; Kleikemper et al., 2002; El-Latif Hesham et al., 2006).

Nelle analisi condotte mediante DGGE o TGGE si ottiene la separazione di piccoli frammenti di DNA (200-700bp), amplificati tramite PCR, della stessa lunghezza ma di differente sequenza. La separazione avviene su gel di poliacrilammide e si basa sulla diminuzione della mobilità elettroforetica dei prodotti di PCR a doppio filamento che vengono parzialmente denaturati dal gradiente chimico (una miscela di urea e formamide), nel caso della DGGE, o termico, nel caso della TGGE.

Inizialmente gli *amplicons* vengono separati in base al loro peso molecolare, determinato principalmente dal loro contenuto in Guanina e Citosina, ma procedendo lungo il gel essi sono soggetti a condizioni denaturanti sempre più forti che provocano la progressiva separazione dei due filamenti di DNA ritardando in tal modo sempre più il loro procedere lungo il gel. L'arresto dei frammenti in un particolare punto del gel si avrà quando essi

raggiungono condizioni denaturanti tali da separare quasi completamente i due filamenti. Il punto di arresto di ogni frammento dipende quindi dalla sua composizione nucleotidica per cui, il numero di bande prodotte durante questo tipo di corse elettroforetiche sarà proporzionale al numero di specie dominanti nel campione. I frammenti, comunque, non vengono mai completamente denaturati grazie al fatto che una sequenza ricca in Guanina e Citosina, legata covalentemente al *primer forward*, detta *GC-clamp*, viene aggiunta ai frammenti stessi durante la loro amplificazione.

I vantaggi connessi all'utilizzo di queste tecniche possono essere riassunti in tre punti principali:

1. la possibilità di monitorare cambiamenti sia strutturali che funzionali, dovuti a qualsiasi tipo di perturbazione, nelle comunità batteriche analizzate;
2. la possibilità di ottenere in modo rapido un profilo delle popolazioni principalmente rappresentative delle comunità stesse;
3. la possibilità di identificare popolazioni microbiche attraverso escissione e sequenziamento delle bande. Questo è particolarmente utile, ad esempio, nel caso di campioni ambientali particolari o derivati da siti contaminati, dove la maggior parte delle specie microbiche presenti sono scarsamente conosciute (Forney et al., 2004).

Oltre ai vantaggi, anche diverse limitazioni sono legate all'impiego di tali procedure come ad esempio la scelta della coppia dei *primer* utilizzati per l'amplificazione del gene per l'rRNA 16S e l'ottimizzazione del gradiente. Il profilo ottenuto, infatti, dipende strettamente dalla coppia di *primer* utilizzati.

Heure e collaboratori (2001) hanno utilizzato ad esempio 14 diverse regioni ipervariabili del gene dell'rRNA 16S per generare profili DGGE dimostrando che la regione V6 è quella che fornisce una migliore risoluzione dei profili da campioni di suolo. Nel caso, invece, si voglia distinguere diversi gruppi filogenetici, devono essere impiegate coppie di *primers* disegnate sulla base di ulteriori regioni ipervariabili (Gomes et al., 2001).

Oltre alla scelta della più adeguata coppia di *primers*, queste metodiche mostrano una notevole difficoltà nel poter fare comparazioni tra gel diversi, soprattutto nel caso di profili complessi ed inoltre, le informazioni derivate dal sequenziamento delle bande escisse sono limitate a frammenti di 500-700bp del gene analizzato che possono portare alla mancanza della specificità richiesta per l'identificazione filogenetica di molti organismi.

Come tutte le tecniche legate all'amplificazione dei geni ribosomiali, anche in questi casi, una singola banda non corrisponde necessariamente ad una singola specie batterica e ciò è dovuto

a due motivi principali: bande derivate da specie diverse possono avere la stessa mobilità elettroforetica oppure, una singola specie può essere rappresentata da bande multiple, dato che praticamente tutti gli organismi possiedono più operoni per i geni ribosomiali (Nubel et al., 1997);

Infine, l'intensità delle bande può non riflettere la reale abbondanza delle varie popolazioni all'interno della comunità; questi metodi sono difficilmente applicabili allo studio di comunità estremamente complesse che producono profili con centinaia di bande, e diventano quindi praticamente impossibili da distinguere. Il limite di risoluzione è circa l'1%, quindi, solo DNA derivati da organismi che rappresentano più dell'1% nella comunità studiata possono essere visualizzati (Muyzer et al., 1993; Murray et al., 1998).

1.8.3 Sequenziamento di cloni derivati da librerie di clonaggio

Si tratta sicuramente della tecnica più efficace nell'identificazione delle specie microbiche derivate da campioni ambientali permettendo anche di determinare il grado di similarità con specie note attraverso l'uso di banche dati (come ad esempio RDP: *Ribosomal Database Project*; BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*) sempre più aggiornate. Il primo passo di questo approccio prevede il clonaggio di prodotti di PCR e quindi il sequenziamento *random* all'interno della libreria di clonaggio ottenuta. Nel caso si utilizzi il gene per gli rRNA, l'analisi delle sequenze rende possibile l'identificazione delle copie dominanti presenti nel prodotto di PCR.

Le informazioni ottenute su queste sequenze possono essere utilizzate sia per comparare l'abbondanza (*richness*) o la diversità delle specie batteriche tra più campioni, che come base per lo sviluppo di specifiche sequenze oligonucleotidiche (in particolare sonde) utilizzabili per altri approcci molecolari. L'allineamento di sequenze ottenute in questo modo ha ad esempio fornito informazioni necessarie per lo sviluppo di sonde utilizzate nell'ibridazione *in-situ* (FISH) o di *primer* utilizzati in analisi DGGE.

L'approccio del clonaggio-sequenziamento del 16S rDNA è stato per la prima volta utilizzato da Giovannoni e collaboratori (1990) allo scopo di stimare la diversità delle specie di batteri planctonici derivati dal mar dei Sargassi e successivamente impiegato in numerosi studi dello stesso tipo applicati agli ambienti più svariati quali suoli, acque dolci, cibi, campioni di tessuti umani ecc. (Giovannoni et al., 1990).

In acqua dolce, ad esempio, questo approccio è stato utilizzato per studiare la biodiversità in vari laghi dimostrando la predominanza di alcuni gruppi batterici come: *Proteobacteria* (particolarmente β -*Proteobacteria*), *Bacteroides* e *Actinobacteria* (Hiorns et al., 1997; Gloöckner et al., 2000; Eiler & Bertilsson, 2004).

A parte gli errori che possono verificarsi durante la reazione di PCR ed i problemi legati allo *step* di clonaggio, la difficoltà principale di questo metodo è come ottenere una corretta descrizione della reale diversità dei campioni analizzati.

Diversi autori hanno proposto metodi sia parametrici sia non-parametrici per stimare nel migliore modo possibile la *richness* dei campioni esaminati e valutare la diversità in differenti campioni ambientali (Colwell e Coddington, 1994; Hughes et al., 2001; Singleton et al., 2001). Curve di rarefazione o altri parametri possono essere utilizzati al fine di valutare il numero totale di sequenze da analizzare per avere una stima corretta della diversità.

Il sequenziamento *random* risulta comunque un approccio piuttosto laborioso ed economicamente poco conveniente. Al fine di evitare la ridondanza delle sequenze ottenute, le librerie di clonaggio possono essere preventivamente sottoposte a *screening* così da identificare i cloni realmente diversi da sottoporre al sequenziamento. Lo *screening* può essere effettuato sia con l'ausilio delle tecniche molecolari precedentemente descritte, come ad esempio l'ARDRA (Sandaa et al., 2001), che attraverso l'ibridizzazione dei cloni con sonde specifiche (Manz et al., 1992; Amann et al., 1995).

Dopo il sequenziamento, le sequenze vengono generalmente comparate con quelle depositate nelle diverse banche dati a tutt'oggi disponibili. Nel caso di cloni ottenuti da campioni ambientali la banca dati che contiene il maggior numero di sequenze di rRNA 16S derivate da questi organismi è sicuramente RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) che fornisce inoltre un'eccellente gamma di strumenti analitici inclusi quelli che rendono fattibili analisi filogenetiche tra le sequenze inserite e quelle già depositate nella stessa banca dati.

Allo stesso modo anche BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) rappresenta un'ulteriore mezzo per la comparazione delle sequenze depositate *on-line* in diverse banche dati come: EMBL (*European molecular biology laboratory*), NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*).

1.8.4 Sequenziamenti di nuova generazione (NGS)

Il recente sviluppo delle tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) ha notevolmente migliorato la capacità di descrivere le comunità microbiche presenti nella molteplicità degli ambienti. Grazie a questi avanzamenti, in questi ultimi anni i costi di sequenziamento sono rapidamente diminuiti e, di conseguenza, la quantità di dati ottenuti è aumentata in maniera esponenziale. In virtù di questi vantaggi sopra descritti ed in particolare il ridotto costo per sequenza, le tecniche NGS possiedono un grande potenziale nell'indagare la diversità e la composizione delle comunità batteriche e fungine (Rinsoz et al, 2008; Bowers et al, 2011a)

Ad esempio, la tecnologia Illumina è in grado di generare fino a milioni di ampliconi all'interno di una singola corsa fornendo in questo modo un alto *coverage* sia per quanto riguarda gli studi basati sull'analisi degli amplicon sia sull'analisi metagenomica delle comunità microbiche.

Per tali ragioni, questa tecnologia consente di riempire alcune lacune che fino ad ora caratterizzavano le indagini inerenti la struttura e le dinamiche del microbiota nei vari ambienti (Claesson et al, 2010).

A questo tipo di approccio si affiancano gli avanzati metodi computazionali per l'elaborazione della notevole mole di dati che si ottengono al fine di estrapolare significati ecologici su quanto è stato analizzato.

1.8.5 PCR Quantitativa (Real Time PCR)

La Real-Time PCR, detta anche PCR quantitativa è un metodo di amplificazione attraverso la reazione a catena della polimerasi, e quantificazione simultanea del DNA (Kubista et al., 2006).

Ci si avvale sempre più della qPCR per i suoi numerosi aspetti positivi, tra cui l'elevata riproducibilità e specificità, il basso limite minimo di rilevazione dei prodotti di amplificazione e la possibilità di misurare quantità di *template* variabili lungo un *range* di circa sei ordini di grandezza (Fig. 10).

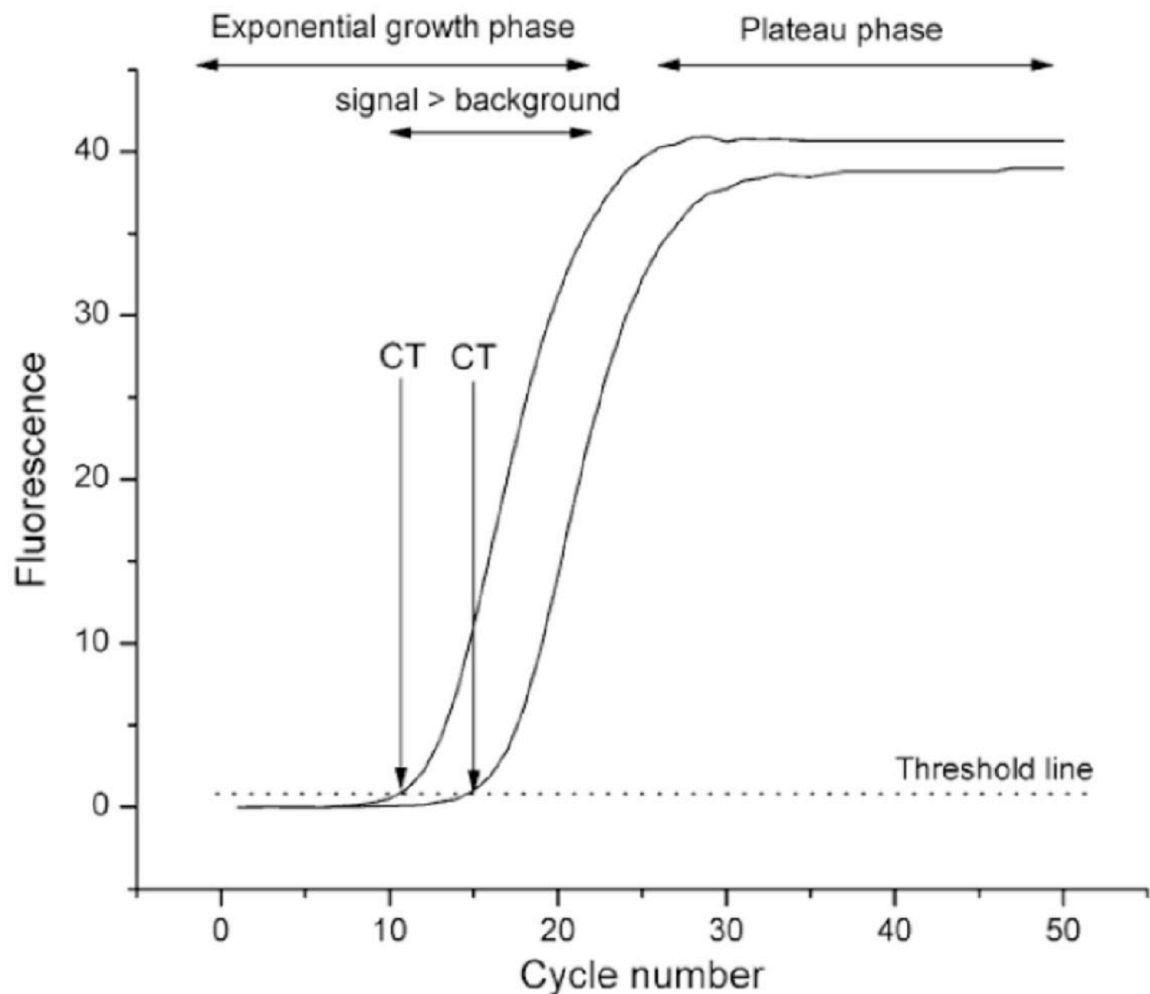


Fig.10 Rappresentazioni delle fasi della PCR quantitativa

L'amplificazione del DNA avviene come in una normale reazione di PCR, costituita dalle tre classiche fasi: denaturazione, appaiamento (*annealing*) ed elongazione ma la caratteristica fondamentale che distingue la qRT-PCR risiede nel fatto che il DNA prodotto ad ogni ciclo di amplificazione viene quantificato in tempo reale grazie all'uso di reagenti fluorescenti che si legano ad esso senza crearne alcun danneggiamento.

Nella Real Time PCR l'intensità della fluorescenza emessa ad ogni ciclo è quindi proporzionale alla concentrazione del prodotto di PCR ottenendo come risultato finale delle

curve sigmoidali che rispecchiano perfettamente l'andamento della stessa reazione di amplificazione. Il primo ciclo al quale lo strumento riesce a rilevare un valore di fluorescenza significativamente più alto rispetto al rumore di fondo (*background*) è definito ciclo soglia (CT), e rappresenta l'inizio della fase esponenziale della reazione. Il valore del CT dipende dalla concentrazione iniziale del gene che si sta quantificando per cui più alta è la concentrazione iniziale del gene più basso sarà il relativo CT.

Esistono due metodologie di quantificazione in Real Time PCR, ciascuna adatta ad una diversa applicazione: la quantificazione assoluta e la quantificazione relativa.

Nel primo caso, la quantità assoluta, incognita, del *template* da misurare viene dedotta per interpolazione con i valori di una curva "standard" ottenuta dai CT relativi all'amplificazione di un *template* a concentrazione nota, diluito serialmente.

Nella quantificazione relativa invece, vengono paragonati i valori di CT ottenuti nell'amplificazione del gene di interesse, con quelli ottenuti dall'amplificazione di un gene di riferimento detto "*housekeeping gene*". Il confronto può essere fatto, ad esempio, anche tra i CT relativi ad un dato gene in un campione sottoposto ad un trattamento e quelli dello stesso gene in un campione non trattato.

I reagenti fluorescenti usati per la Real Time PCR possono essere distinti in tre classi: reagenti che legano il DNA a doppio filamento (dsDNA); sonde sequenza-specifiche (TaqMan); *primer* sequenza-specifici (Molecular Beacon). Tra i composti fluorescenti che legano il dsDNA uno dei più usati è il SYBR GreenI (Morrison et al., 1998) per i numerosi vantaggi derivanti, appunto, dal suo impiego. Quando si utilizza questo tipo di colorante infatti non è richiesto lo sviluppo di sonde, e quindi la conoscenza di porzioni interne del gene da amplificare; inoltre, è possibile utilizzarlo insieme a *primer* di diverso tipo, ed il costo, rispetto ad altri metodi di marcatura dei prodotti di PCR in *real-time*, è sicuramente più basso. Vi è comunque un notevole svantaggio nel suo utilizzo che consiste nella sua incapacità di discriminare molecole di dsDNA di diversa sequenza e quindi si lega, in maniera del tutto aspecifica, ad ogni dsDNA che si genera durante la reazione. Questo crea spesso problemi nella reale quantificazione dei prodotti di PCR desiderati; si rende necessaria, quindi, un'attenta ottimizzazione delle condizioni della reazione, tra cui: la scelta della coppia di *primer* più affine al *template* da amplificare, la loro giusta temperatura di *annealing*, la loro adeguata concentrazione, l'utilizzo di *template* sufficientemente puri etc. Ciò al fine di evitare la formazione di prodotti aspecifici e dimeri di *primer* che vanno a interferire con la quantificazione stessa.

La PCR quantitativa è ormai diventata un importante strumento per quantificare geni funzionali in campioni ambientali. Sono note più di 14000 sequenze di DNA corrispondenti a più di 100 geni funzionali (Zhang & Fang, 2005), fra i quali quelli degli idrocarburi policiclici aromatici (Park & Crowley 2006; Powell et al., 2006).

Oltre all'applicazione nella quantificazione dei geni funzionali, principalmente in termini di numero di copie degli stessi, data la difficoltà nell'estrazione dell'RNA direttamente da campioni ambientali come il suolo, la PCR quantitativa è stata anche largamente impiegata nella quantificazione del numero di batteri utilizzando come gene marcatore quello del 16S rRNA, sia nel caso di ceppi batterici puri che di comunità, avvalendosi dell'amplificazione diretta del DNA metagenomico.

La quantificazione assoluta del numero di copie del gene dell'RNA 16S, non è comunque diretta: ogni organismo ne possiede, infatti, copie multiple (1-15 copie) e, soprattutto nel caso di amplificazioni del DNA metagenomico, non si è in grado di sapere, con certezza, il numero di copie corrispondenti ad ogni specie. Per questo, molto spesso ci si basa su un numero medio di copie, generalmente sette, come fattore di divisione del numero totale di copie del gene stesso, che viene stimato per Real Time PCR.

2. SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro di Dottorato si inquadra nell'ottica del riciclo e della valorizzazione degli scarti derivanti dalle attività agro-industriali ed in particolare quelli prodotti dall'industria olearia. Nel bacino del Mediterraneo, infatti, l'attività di estrazione di olio d'oliva genera una grande quantità di sottoprodotti in un breve periodo dell'anno. Questi sottoprodotti sono ricchi di polifenoli difficili da degradare e presentano, quindi, una possibile fonte di contaminazione ambientale. Per tale ragione assume enorme importanza la ricerca di strategie di smaltimento e riciclo che, oltre che minimizzare tali svantaggi, possano valorizzare questi scarti trasformandoli in risorsa. Il riutilizzo in agricoltura di tali sottoprodotti sembra una buona strategia per trasformarli in risorsa, attraverso, ad esempio, il diretto spandimento in campo eseguito secondo appropriate norme stabilite dai governi nazionali. Molti sottoprodotti agro-industriali, incluse le sanse, possono inoltre essere sottoposte al processo di compostaggio che, trasformandoli in un ammendante di qualità, può permetterne l'impiego come substrato da invasatura in sostituzione della torba o di altro materiale organico-minerale. Ciò può contribuire a ridurre i crescenti problemi economico - ambientali connessi all'impiego della torba e all'utilizzo di concimi chimici. I vantaggi di questa strategia di riciclo degli scarti di frantoio sono quindi duplici: per i frantoiani una via sostenibile di smaltimento del sottoprodotto, e per le aziende vivaistiche un ridotto utilizzo della torba che, oltre a permettere un risparmio economico, può rappresentare un ritorno d'immagine per la possibilità di ottenere prestigiosi marchi europei di qualità ecologica e ridotto impatto ambientale, come *Ecolabel*.

Le comunità microbiche del suolo giocano un ruolo chiave nel corretto funzionamento dell'ecosistema suolo-pianta, come, ad esempio, la ciclizzazione e la disponibilità dei nutrienti, il mantenimento della struttura del suolo e la difesa dai patogeni delle piante. Per la corretta implementazione di strategie di riciclo e valorizzazione degli scarti di frantoio appare, quindi, importante verificare, da un punto di vista microbiologico, se la loro incorporazione nel suolo possa avere conseguenze negative o se, al contrario, questa possa portare ad un miglioramento delle suddette funzioni.

Lo scopo del presente lavoro di tesi di dottorato è, quindi, quello di studiare gli effetti dell'utilizzo di scarti di frantoi oleari, sia tal quali che dopo compostaggio, sulle dinamiche e sul ruolo delle comunità microbiche presenti nell'ecosistema suolo-pianta.

Le prove sperimentali implementate durante il lavoro di tesi sono schematizzate in figura 11.

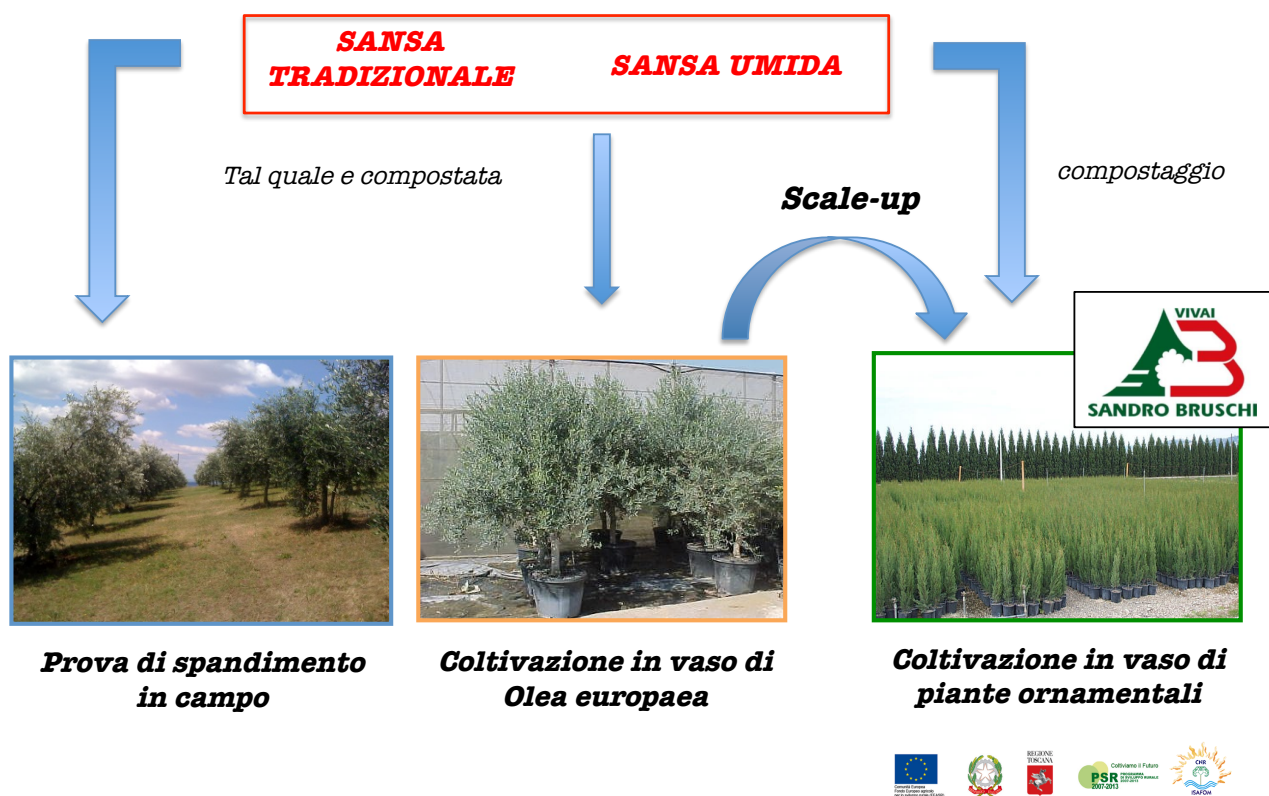


Fig.11 Rappresentazione schematica delle prove svolte durante il lavoro di tesi

Sono state utilizzate due tipologie di sanse, quella tradizionale, prodotta dal sistema estrattivo continuo a 3 fasi, e quella umida, prodotta dal sistema estrattivo a 2 fasi. Entrambi questi scarti sono, inoltre, stati utilizzati sia tal quali che previo processo di compostaggio.

Nella prima parte della tesi è stata affrontata, in collaborazione con il Prof. Proietti del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali e con il Prof. Gigliotti del Dipartimento di Ingegneria Civile ed Ambientale (Università di Perugia), una prova di spandimento in pieno campo (oliveto) di entrambi i tipi di sansa, sia tal quale che compostata.

Nella seconda parte della tesi sono state allestite due prove con l'obiettivo di valutare la valorizzazione degli scarti di frantoio come possibili sostituti della torba per la coltivazione di piante in vaso. Una prima prova su piccola scala, allestita in collaborazione con i Gruppi dell'Università di Perugia prima citati, ha riguardato la parziale incorporazione nel substrato da invasatura di sansa umida, sia utilizzata tal quale sia previo compostaggio.

Una seconda prova, è stata quindi allestita nell'ambito del progetto *“Creazione di un nuovo ammendante, sostitutivo della torba utilizzata nel vivaismo, ottenuto dalla trasformazione degli scarti da frantoio oleario” (SAN-SOIL)*, finanziato dall'Unione Europea e dalla Regione Toscana, con l'obiettivo di valutare l'utilizzo su larga scala di substrati da invasatura per la coltivazione in vaso di piante ornamentali, formulati con quantità crescenti di compost di sansa. Questo progetto ha coinvolto partner scientifici, come il Consiglio Nazionale delle Ricerche e l'Università della Tuscia, e privati, come il frantoio PAM e le aziende floro-vivaistiche “Vivai Sandro Bruschi” e “Vivaio Gieffe” in provincia di Pistoia.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Allestimento della prova di spandimento in campo di sanse tal quali e compostate

Con la collaborazione del gruppo del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali e del Dipartimento di Ingegneria Civile ed Ambientale dell'Università di Perugia è stata allestita una prova di spargimento di sottoprodotti oleari sia freschi che compostati quali ammendanti su un oliveto (*Olea europaea* L.) nella frazione di Petrignano del Comune di Assisi (PG) (12° 56' E longitudine, 43° 11' N latitudine, circa 400 metri s.l.m).

In particolare, due tipologie di sansa ed i loro rispettivi prodotti di compostaggio sono stati considerati:

- Sansa tradizionale: derivante dal sistema estrattivo continuo a 3 fasi, caratterizzata da un basso contenuto in acqua.
- Compost tradizionale: ottenuto mediante un processo di compostaggio condotto su scala pilota all'interno di un cassone (fase attiva) e successivamente in cumulo (fase di maturazione), costituito da una miscela di sansa nocciolata e da residui di potatura dell'olivo nel rapporto in volume 1:1.
- Sansa umida: derivante da un sistema estrattivo innovativo a 2 fasi (DMF-Pieralisi, Jesi, Ancona), in seguito descritto, caratterizzata da un alto contenuto in acqua e per questo anche detta "*sansa paté*".
- Compost da sansa umida: ottenuto mediante un processo di compostaggio condotto su scala pilota all'interno di un cassone (fase attiva) e successivamente in cumulo (fase di maturazione), costituito da una miscela di sansa umida (*sansa paté*) e residui di potatura e anche qui definito "*compost paté*".

La tesi controllo era rappresentata da porzioni di oliveto non soggette ad alcuno spandimento. L'oliveto di circa 12 anni (fig.12) era allevato a vaso in coltura asciutta, con distanza di piantagione di 5,5 x 5,5 m. Dalle analisi effettuate, il terreno dell'oliveto era risultato franco/franco-argilloso con una sensibile presenza di scheletro, con reazione alcalina, con uno

scarso contenuto in sostanza organica, azoto totale, fosforo assimilabile e potassio scambiabile.

Il clima era caratterizzato da scarse precipitazioni ed elevate temperature durante l'estate. La media delle precipitazioni era di 800 mm l'anno, soprattutto concentrate in primavera e in autunno. Durante l'inverno, le temperature scendevano notevolmente, a volte sfiorando il limite di tolleranza degli olivi.



Fig.12 Oliveto sito nella frazione Petrignano del Comune di Assisi, oggetto della prova di spandimento in campo di scarti oleari

Questi ammendanti non sono stati incorporati al suolo, poiché la gestione del terreno dell'oliveto era attuata mediante l'inerbimento, sono stati invece sparsi sulla superficie una volta l'anno per quattro anni, nel mese di marzo, in misura di 50 tonnellate per ettaro, seguiti da 100 Kg per ettaro di urea e 1 Kg per pianta di fertilizzante. I campioni di suolo da destinare alle analisi microbiologiche sono stati prelevati, durante il quarto anno di sperimentazione, dopo 3, 15, 30, 60 e 120 giorni lo spargimento in campo. I campioni di suolo provenienti da 3 parcelle differenti trattate allo stesso modo venivano uniti a formare dei pool, e su di essi venivano eseguite le analisi chimiche e microbiologiche.

La sansa umida utilizzata in questo lavoro di tesi è stata ottenuta da un innovativo sistema estrattivo a due fasi, brevetto del Gruppo Peralisi, Jesi (AN), Italia. In particolare, questo sottoprodotto si ottiene da un estrattore centrifugo a due fasi (Fig.13) che produce da un lato una sansa disidratata simile a quella del tre fasi, dall'altro esso recupera la polpa della sansa, definita "*paté*", ideale per l'utilizzo agronomico e l'alimentazione zootecnica. Si tratta, inoltre, di un estrattore in grado di coniugare la moderna tecnologia di estrazione senza aggiunta di acqua con la lavorazione partitaria grazie al dispositivo di svuotamento del tamburo, gestito automaticamente dal pannello di controllo con pulsanti *touch screen*. La sansa *paté* è così definita perché costituita dalla polpa e dall'umidità dell'oliva senza tracce di nocciolino e si caratterizza per un range di umidità che va 64% al 78%. Questa frazione, adattandosi a diversi impieghi (come ammendante del suolo o surrogato della torba nel florovivaismo; come integratore per la zootecnia; miscelato con altre biomasse per la produzione di biogas; come possibile ingrediente per l'alimentazione umana), rappresenta non più uno scarto da smaltire, bensì un valore aggiunto per il frantoiano.

Il compostaggio della sansa tradizionale e di quella umida è stato descritto da Gigliotti et al. 2012. Nel caso della sansa umida la miscela di compostaggio è stata formulata unendo al *paté* la paglia (8% w/w) ed i residui della potatura degli olivi (22%).

La fase termofila (fase attiva o bioossidativa) è stata condotta all'interno di un bioreattore con un volume di 1 m³ circa, in aerazione forzata (flusso di 20 L min⁻¹ per 10 min all'ora). Temperatura e umidità venivano monitorate in maniera continua: questa fase si considerava conclusa quando la temperatura della massa era simile alla temperatura ambiente e tenuto conto che non si osservava alcuna fase di nuovo riscaldamento (dopo circa 50 giorni). La successiva fase di maturazione del compost è stata condotta in cumulo trapezoidale per 80 giorni circa, con regolare rimescolamento del materiale.



Fig.13 Estrattore centrifugo a due fasi DMF *Pieralisi* che recupera la polpa della sansa, definita “paté”, ideale per l’utilizzo agronomico e l’alimentazione zootecnica.

3.2 Allestimento della prova di coltivazione in vaso di piante di olivo (*Olea europaea*) con substrati da invasatura a base di sansa umida tal quale e compostata.

La collaborazione con i gruppi del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali e del Dipartimento di Ingegneria Civile ed Ambientale dell'Università di Perugia è proseguita con l'allestimento di una seconda prova che consisteva nella coltivazione in vaso di olivi (*Olea europaea*) all'interno della serra della facoltà di Agraria dell'Università di Perugia (circa 400 m s.l.m., 12°23'E longitudine, 43°5'N latitudine).

La temperature media all'interno della serra era moderata durante la primavera (15.9 °C, 20.5 °C e 25.1 °C a marzo, aprile e maggio, rispettivamente), alta in estate (27.6 °C, 28.6 °C e 29.4 °C a giugno luglio ed agosto, rispettivamente), e di nuovo moderata in autunno (24.4 °C, 17.4 °C e 14.3 °C a settembre, ottobre e novembre, rispettivamente). Durante l'inverno, la media oscillava tra 8.1 °C in gennaio e 9.6 °C in dicembre, mentre l'umidità dell'aria si aggirava tra 75% e 90%.

Nel febbraio del 2011, le piantine di *Olea europaea* L., cultivar Leccino, precedentemente allevate in piccoli vasi da 100 ml, sono state trapiantate individualmente in vasi più grandi da 2,5 litri.

Questa prova su piccola scala prevedeva l'impiego della sansa umida (sansa paté), sia tal quale che dopo il processo di compostaggio prima descritto, in parziale sostituzione della torba nella formulazione dei substrati da invasatura. In particolare, sono state prese in considerazione le seguenti tesi sperimentali con diverse formulazioni dei substrati da invasatura:

- Controllo: 40% pomice, 60% torba, (vol/vol);
- Sansa: 40% pomice, 30% torba, 30% sansa umida da sistema Pieralisi DMF (vol/vol);
- Compost: 40% pomice, 30% torba, 30% compost di sansa umida (vol/vol);

La prova è stata disegnata seguendo lo schema dei blocchi randomizzati, che in questo caso erano nove. Ogni blocco era costituito da tre vasi per tipo di formulazione, quindi complessivamente si avevano 27 vasi per ogni tipo di substrato. Le piante sono state irrigate regolarmente secondo la temperatura e l'irradiazione solare all'interno della serra, inoltre esse non hanno mai mostrato segni da stress idrico.

I campioni di suolo e di rizosfera di tre piante trattate allo stesso modo erano riuniti a formare dei pool e poi destinati alle analisi microbiologiche, chimiche ed agronomiche venivano raccolti dopo 30, 60, 120 e 270 giorni dall'inizio della sperimentazione.

3.3 Allestimento della prova di coltivazione in aziende florovivaistiche con substrati da invasatura a base di compost di sansa.

E' stata allestita una prova di coltivazione in vaso all'interno di aziende florovivaistiche nell'ambito del progetto SAN-SOIL, finanziato dall'Unione Europea e dalla Regione Toscana, che aveva come scopo la *“creazione di un nuovo ammendante, sostitutivo della torba utilizzata nel vivaismo, ottenuto dalla trasformazione degli scarti da frantoio oleario”*. In particolare, durante il lavoro di questa tesi di dottorato sono stati approfonditi gli aspetti microbiologici degli ammendanti sperimentali ottenuti dalla trasformazione aerobica della sansa. Sono, infatti, state monitorate diverse varietà ornamentali di piante, coltivate in terricci sperimentali presso aziende vivaistiche con sede in Pistoia, per lo studio delle comunità microbiche esistenti e del loro ruolo nei processi biochimici connessi con la nutrizione vegetale.

I substrati da invasatura sperimentali erano basati su differenti percentuali di compost derivante da una miscela a base di sansa tradizionale e acque di vegetazione, fornite dal frantoio PAM, uno dei partner del progetto. Il processo di compostaggio della miscela sperimentale è stato progettato e monitorato dall'*Istituto per i Sistemi Agricoli e Forestali del Mediterraneo (ISAFoM)* del *Consiglio Nazionale delle Ricerche* (Perugia) e condotto presso il frantoio PAM di Pistoia.

La miscelazione è stata effettuata utilizzando un comune carro miscelatore UNIFEED, mentre le operazioni di caricamento e dosaggio degli ingredienti (sansa vergine, acque di vegetazione (AV), foglie e rametti risultanti dal lavaggio delle olive in frantoio, paglia, cascame di lana), utilizzati per la composizione della miscela sperimentale, sono state effettuate mediante attrezzature (trincia paglia/sarmenti, pompa per il trasferimento delle AV, pala meccanica per il caricamento della sansa vergine, della paglia tritata e del cascame di lana, sistema di pesatura industriale) prevalentemente già in possesso del partner PAM.

Particolare attenzione è stata posta alla selezione dei big bags da impiegare per il confezionamento della miscela da porre in stoccaggio. Al termine di un'attenta ricerca di mercato, sono stati impiegati dei *“big bags”* (grandi sacchi) di capacità pari ad 1 m³, sufficientemente porosi ma robusti, con caratteristiche tali da garantire un'agevole gestione della massa (500 Kg di miscela): infatti tali sacchi erano dotati di un'ampia apertura superiore

per agevolare il riempimento, e, alla base, di un sistema di apertura rapida per facilitare anche il successivo svuotamento che avviene al termine dello stoccaggio/maturazione.

La composizione della miscela sperimentale è mostrata in tabella 7.

Tab.7 Ingredienti utilizzati per la formulazione della miscela sperimentale da sottoporre al processo di compostaggio con indicazioni delle percentuali sul totale e del contenuto percentuale di umidità.

INGREDIENTI	Kg	%	Umidità %
sansa	1000	35,2	50,8
acque di vegetazione (AV)	1160	40,8	95,1
cascame di lana	300	10,6	11,0
paglia	300	10,6	16,1
foglie/rametti da lavaggio olive	80	2,8	53,7

L'intero processo di trasformazione della sostanza organica è durato 252 giorni in cui si potevano osservare le tipiche fasi del compostaggio: fase termofila che caratterizzava i primi 120 giorni, e la fase di *curing* o di maturazione con cui il processo terminava.

Questo materiale è stato oggetto della sperimentazione per valutarne l'utilizzo come sostitutivo della torba, formulando 8 diverse tesi sperimentali che prevedevano sia diverse quantità di compost che presenza/assenza di concime minerale. Lo scopo della sperimentazione era quello di saggiare il comportamento vegetativo di giovani piante coltivate in vasi da 3, 5 o 7 litri su terricci contenenti percentuali diverse della miscela sperimentale a base di reflui oleari in sostituzione della torba (tab.8).

Il trasferimento applicativo dell'innovazione tecnologica proposta nel progetto SAN-SOIL poteva essere validato solo attraverso un'ampia sperimentazione che coinvolgesse il maggior numero possibile di specie/varietà di piante coltivate nell'area vivaistica di Pistoia. Pertanto i tre vivai coinvolti nel progetto SAN-SOIL mettevano a disposizione ben 32 specie/varietà tra quelle più rappresentative della produzione floro-vivaistica nazionale. In base alla disponibilità di piante fornita dai tre vivai, si stabiliva che il modulo minimo sperimentale (a blocchi randomizzati) comprendesse almeno 1024 piante (per prova di coltivazione), all'interno del quale si monitoravano 128 piante per tesi (32 piante per parcella ripetute per 4 parcelle).

Per questo lavoro di tesi sono state prese in esame tre varietà di piante ornamentali coltivate con gli otto terricci sperimentali sopra illustrati:

- *Cupressus sempervirens* 'Pyramidalis';
- *Viburnum lucidum*;
- *Prunus laurocerasus* 'Novita';

Otto piante di ciascuna varietà per ogni tesi sono state recuperate dopo 6 mesi dall'inizio del ciclo colturale mentre, al termine della prova (dopo 12 mesi), venivano sacrificate solo individui della specie *Viburnum lucidum* nelle stesse quantità sopra illustrate.

Per le analisi molecolari microbiologiche ed agronomiche sono stati analizzati campioni di suolo e di radici. Tale approccio ha permesso di ottenere una grande quantità di campioni, i quali, al fine di una migliore gestione sperimentale, sono stati unificati allestendo dei *pool* costituiti dalle otto piante trattate nello stesso modo.

Tab.8 Tesi sperimentali contenenti diverse percentuali della miscela compostata a base di reflui oleari

Tesi a confronto	Descrizione	Torba	Big Bag	Concimazione minerale
% (v/v)				
TC	Testimone aziendale CONCIMATO	30	0	si
TNC	Testimone aziendale NON CONCIMATO	30	0	no
BB_33_C	Big Bag in sostituzione torba (33 %) CONCIMATO	20	10	si
BB_66_C	Big Bag in sostituzione torba (66 %) CONCIMATO	10	20	si
BB_100_C	Big Bag in sostituzione torba (100 %) CONCIMATO	0	30	si
BB_33_NC	Big Bag in sostituzione torba (33 %) NON CONCIMATO	20	10	no
BB_66_NC	Big Bag in sostituzione torba (66 %) NON CONCIMATO	10	20	no
BB_100_NC	Big Bag in sostituzione torba (100 %) NON CONCIMATO	0	30	no

3.4 Preparazione dei campioni di suolo, radici e rizosfera.

L'analisi delle comunità microbiche presenti nel suolo, nella rizosfera e nelle radici delle piante in vaso richiedeva come primo passaggio il campionamento delle tre componenti e di conseguenza il sacrificio della pianta oggetto di studio (Fig.14).

Preparazione del suolo

La pianta veniva estratta dal suo contenitore e successivamente il suolo veniva separato per scuotimento e manualmente dall'apparato radicale; questo poi veniva essiccato all'interno della stufa a 40°C overnight. Il suolo essiccato veniva setacciato per rimuovere le particelle di grosse dimensioni e i residui di radici. Il campione di suolo essiccato e setacciato poteva essere conservato a -20°C per le successive analisi molecolari.

Recupero della rizosfera.

Per poter ottenere separatamente campioni di radici e di suolo rizosferico, la radice ancora "sporca" veniva inserita in un *Falcon* contenente soluzione fisiologica sterile, e posta nell'agitatore per un'ora al termine della quale le radici venivano tolte. La sospensione di suolo rizosferico veniva sottoposta ad una serie di centrifugazioni continue a 17000 RCF per 5', per recuperare la rizosfera. Il campione di rizosfera recuperato poteva essere conservato a -20°C per le successive analisi molecolari.

Recupero delle radici.

Le radici dalle quali era precedentemente recuperata la rizosfera venivano sottoposte ad una serie di lavaggi in modo tale da rimuovere la rizosfera rimanente e da lasciare solo la porzione relativa all'apparato radicale. In particolare, si procedeva con tre lavaggi con salina sterile, un lavaggio con una soluzione costituita da NaOH 2% e Tween 0,2% ed infine con tre lavaggi con salina sterile al termine dei quali la radice era completamente priva di suolo adeso e di eventuali microrganismi non endofiti. Le radici venivano quindi frammentate e conservate a -20°C per le successive analisi molecolari.



Fig.14 Passaggi del campionamento di suolo e radici. Pianta (A); Radici e *bulk soil* (B); Radici e Rizosfera (C, D), Radici (E).

3.5 Analisi delle comunità microbiche.

L'approccio analitico seguito in questa tesi per lo studio del microbiota presente nel sistema suolo-pianta è indipendente dalla classica coltivazione di laboratorio. Infatti sono stati impiegati i metodi molecolari basati sull'estrazione del DNA metagenomico che è definito come l'insieme dei genomi di tutti gli organismi viventi presenti in un campione ambientale.

3.5.1 Estrazione di DNA metagenomico

L'estrazione del DNA metagenomico dai campioni di suolo, radici e rizosfera veniva condotta con l'utilizzo di kit commerciali che variavano in base al tipo di campione di partenza del quale si voleva ottenere il materiale genetico. Per l'estrazione di DNA da suolo e rizosfera si utilizzava il *PowerSoil® DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA), mentre per l'estrazione da campioni di radice si utilizzava invece il *PowerPlant® Pro DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA). L'estrazione di DNA dalle radici era preceduta da passaggi iniziali per facilitare la lisi: congelamento a -80°C per almeno 3 ore precedenti all'estrazione e lisi con pestello in plastica. Entrambi questi kit si basano sull'utilizzo di *beads* per lisare le pareti cellulari, nella fase iniziale, e di colonne di purificazione del DNA in membrane di silice, nella fase finale. Il DNA eluito dal filtro era conservato a -20°C.

3.5.2 Amplificazione PCR dei geni ribosomali 16S e 18S

In questo lavoro di tesi la PCR è stata utilizzata per l'analisi coltura-indipendente delle comunità microbiche e per l'identificazione di cloni fungini. Nel primo caso l'amplificazione era finalizzata all'analisi *DGGE*, che verrà descritta di seguito, in cui una porzione dei geni ribosomiali batterici e fungini venivano usate come target, rispettivamente le coppie di *primers forward* 341F_GC e *reverse* 534R e *forward* FUN_NS e *reverse* GC_fung (Tab.9). Nel secondo caso, per costruire la libreria di cloni, veniva amplificato un frammento interno al 18S utilizzando i *primers* EF4 e Fung5 (Tab.9).; questa regione viene considerata quella

che permette di identificare il maggior numero di gruppi fungini (Hagn et al., 2003; He et al., 2005), inoltre essa possiede una parte in comune con quella amplificata per l'analisi DGGE (frammento comune di 173 bp).

Tab.9 Sequenze dei *primers* utilizzati

<i>EF4</i>	GGAAGGGRTGTATTATTAG	0,3 μ M	Regione ipervariabile 18S fungino
<i>Fung 5</i>	GTAAAAGTCCTGGTTCCCC	0,3 μ M	
<i>534R</i>	ATTACCGCGGCTGCTGG	0,4 μ M	Regione ipervariabile 16S batterico
<i>341F GC</i>	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGGCC TACGGGAGGCAGCAG	0,4 μ M	
<i>FUN_NSI</i>	GTAGTCATATGCTTGTCTC	0,8 μ M	Regione ipervariabile 18S fungino
<i>GCfung</i>	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGGCGCCCGCCCGCCCATTC CCCGTTACCCGTTG	0,8 μ M	

Le reazioni di amplificazione venivano svolte utilizzando il prodotto 5X HOT FIREPol® Blend Master Mix (Solis BioDyne, Tartu, Estonia), già provvisto di enzima, dNTP's e buffer. Il volume finale della reazione era di 20 μ l che includeva 5 μ l di DNA e 15 μ l di master mix.

Il programma di amplificazione relativo al frammento genico del 16S consisteva in una denaturazione iniziale a 95°C per 15 minuti che era seguita da una procedura *touchdown* in cui la temperatura di annealing era impostata inizialmente a 65°C per poi scendere di 0,5°C ad ogni ciclo fino a 55°C. A questa temperatura venivano aggiunti 10 cicli seguiti da uno step di extension a 72°C per 10 minuti (Federici et al. 2007).

Il programma utilizzato per amplificare il frammento genico del 18S da impiegare per l'analisi DGGE consisteva invece in una denaturazione iniziale a 95°C per 15 minuti, seguita da 35 cicli a 95°C per 30 secondi, 55°C per 30 secondi e 72°C per 1 minuto con un ciclo addizionale finale di 72°C per 1 minuto.

Infine, l'amplificazione del frammento genico fungino che è stato in seguito clonato è avvenuta con iniziale denaturazione a 95°C per 15 minuti seguita da 40 cicli a 94°C per 1 minuto, 48°C per 45 secondi e 72°C per 1 minuto, infine è stato aggiunto un ciclo ulteriore di extension a 72°C per 11 minuti.

Tutte le amplificazioni venivano svolte con il termociclatore *T100 Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

L'elettroforesi su gel d'agarosio era quindi utilizzata per analizzare i prodotti di PCR in modo da verificare che si fosse ottenuto il frammento di DNA atteso senza altri prodotti aspecifici. Il tampone di elettroforesi utilizzato era il TAE 0,5x e serviva sia a condurre la corrente elettrica sia a controllare il pH durante l'elettroforesi. I prodotti amplificati già contenevano

un *loading buffer*, che facilitava il caricamento stesso e permetteva di seguire la migrazione. Venivano utilizzati gel al 2,5% per frammenti (fino a 500 pb). Prima della corsa i gel venivano colorati con *SYBR SAFE DNA Gel Stain* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Per determinare le dimensioni dei frammenti, veniva utilizzato il *ladder “FastRulerLowRange”* (Fermentas) caricato e fatto correre insieme ai campioni. Dopo la corsa, il gel veniva posto ai raggi UV del transilluminatore (Gel Doc, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) per poter acquisire l'immagine dei frammenti migrati.

3.5.3 Elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE)

L'elettroforesi su gel a gradiente denaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE*) permette la separazione di piccoli frammenti di DNA (200-700bp), della stessa taglia ma di differente sequenza. La separazione avviene su gel di poliacrilammide e si basa sulla diminuzione di mobilità elettroforetica di frammenti di DNA a doppio filamento che vengono parzialmente denaturati dal gel chimico (miscela di Urea e Formamide) presente nel gel stesso. Questa tecnica è stata utilizzata nel presente lavoro di Tesi per ottenere i *fingerprinting* delle comunità microbiche presenti nei vari campioni. I frammenti analizzati con *DGGE* venivano ottenuti amplificando, dal DNA genomico, una regione ipervariabile (V3) del gene 16S utilizzando la coppia di *primers* 341 *forward* e 534 *reverse* (Muyzer et al., 1993) per i batteri. Per quanto riguarda i funghi venivano utilizzati i *primers* FUN_NS1 (Gomes et al., 2003; Oros Sichler et al., 2005) e CGfung (Das et al., 2007). All'estremità 5' del *primer forward* era unita una sequenza di 40bp ricca di C e G, definita *GC clamp*, necessaria per migliorare la stabilità degli *amplicons* durante la corsa. L'analisi dei frammenti veniva effettuata con il sistema INGENY phorU-2 con gel di poliacrilammide al 6% in Tae 0,5X (20mM Tris, 10mM acetato, 0,5 mM Na2ETDA; pH 7.8) contenente un gradiente lineare di Urea-Formamide da 40% a 60% (il 100% di denaturante è definito come urea 7M e formammide deionizzata 40%). La scelta del gradiente veniva effettuata dopo una serie di prove dove venivano testate diverse concentrazioni di Urea-Formamide. Il gradiente veniva realizzato attraverso un apposito “*gradient former*” collegato ad una pompa peristaltica che flussa il gel alla velocità costante di 5ml/min all'interno di un sistema elettroforetico verticale, miscelando le due seguenti soluzioni:

Per i batteri veniva utilizzato un gradiente compreso tra 40 e 60% mentre per i funghi uno compreso tra il 20 e 35%. La corsa elettroforetica era condotta per 16h a 100V mantenendo la temperatura costante a 60°C. Il gel veniva quindi colorato con SYBR Gold (Invitrogen) in TAE 0,5X per 30 minuti a temperatura ambiente e poi visualizzato con trans illuminatore UV dotato di macchina fotografica (ChemiDoc, BioRad).

L'analisi delle immagini relativa ai profili DGGE veniva effettuata attraverso l'utilizzo del software *Quantity-one image analysis* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) stimando la biodiversità delle specie batteriche o fungine nei diversi campioni e calcolando gli indici ecologici quali:

Richness (S): numero di bande in ogni linea;

Indice di Shannon-Weaver (H) = $-\sum (n_i/N)\log(n_i/N)$,

Indice di Simpson (D) = $\sum p_i^2$

Indice di *Evenness* (E) = $H / \ln S$

dove: n_i = intensità del picco relativo ad ogni banda; N = somma di tutti i picchi relativi alle bande di una linea e $p_i = n_i/N$.

Inoltre, attraverso l'analisi dell'immagine era possibile generare una matrice che permette di confrontare la similarità tra *fingerprints* DGGE basata sul calcolo del coefficiente di Dice e da questa veniva generato il dendrogramma utilizzando l'algoritmo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic mean*).

3.5.4 PCR quantitativa (qPCR).

Questa tecnica rappresenta uno strumento di quantificazione di un frammento *target* del DNA, resa possibile grazie all'uso di fluorocromi che si intercalano nella doppia elica di DNA. Il punto in cui viene rilevato il segnale di fluorescenza è ad ogni ciclo di amplificazione, cioè nella fase esponenziale della reazione, quando ancora tutti i reagenti si trovano in concentrazioni ottimali. L'intensità della fluorescenza aumenta proporzionalmente per ciascun ciclo in funzione della concentrazione di *amplicon*. Il primo ciclo al quale lo strumento riesce a discriminare il valore della fluorescenza prodotta e rilevarne il livello al di sopra del rumore di fondo, è definito *Ct* o ciclo soglia. Maggiore è la quantità di *template* di DNA presente inizialmente nel campione, minore sarà il valore di *Ct* ad esso relativo.

In questo lavoro la qPCR veniva usata per quantificare il numero di copie del gene 16S per i batteri, mentre per i funghi sono stati analizzati due differenti target: lo spaziatore intergenico ITS e il frammento del gene 18S che contiene una porzione in comune con il frammento analizzato in DGGE e con quello che è stato clonato.

In tabella 10 vengono riportati i *primers* utilizzati nelle reazioni di *qPCR*, rispettivamente per i batteri e i funghi.

Tab. 10 Sequenze dei *primers* utilizzati in qPCR

PRIMERS	SEQUENZA	CONCENTRAZIONE FINALE	SPECIFICITA'
341F_hplc	CCTACGGGAGGCAGCAG	0,05 μ M	regione ipervariabile 16S batterico
534R_hplc	ATTACCGCGGCTGCTGG	0,9 μ M	
efITS1F	CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA	0,2 μ M	spaziatore intergenico ITS1-ITS4 fungino
efITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	0,2 μ M	
EF4	GGAAGGGRTGTATTATTAG	0,2 μ M	regione ipervariabile 18S fungino
Fung5	GTAAAAGTCCTGGTTCCCC	0,2 μ M	

Le analisi qPCR venivano svolte con lo strumento LightCycler 96 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) usando il reagente 2x FastStart Essential Green Master Mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), il quale forniva tutti i reagenti fatta eccezione della coppia di *primers* e dell'H₂O per diluire i reagenti. Il mix di reazione era costituito da 12.5 uL di 2x FastStart Essential Green Master Mix, 2.5 uL di ogni primer e 2 uL di DNA.

L'amplificazione del frammento genico del 16S consisteva in un primo step a 95°C per 10 min. seguito da 50 cicli a 95°C per 10 s, 55°C per 10s e 10s di extension a 72°C. Lo spaziatore intergenico fungino veniva amplificato con denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti seguita da 50 cicli a 94°C per 2 minuti, 60°C per 45 s ed extension a 72°C per 45 secondi. Tutte le amplificazioni terminavano con l'analisi della *melting curve* che misura le intensità del segnale durante l'incremento di temperatura di 0,5°C ogni 10 secondi partendo

da 48°C a 95°C. Questa analisi, insieme al controllo della taglia del frammento su gel di agarosio, forniva la conferma della specificità della reazione di amplificazione.

In questo lavoro di tesi venivano usate le metodologie di quantificazione assoluta e quantificazione relativa, secondo le linee guida MIQE (Bustin et al. 2009). Nel primo caso, la quantità assoluta incognita del *template* da misurare, veniva dedotta per interpolazione con i valori di una curva “*standard*” ottenuta dai Ct relativi all’amplificazione del frammento genico target clonato all’interno del vettore pGEM T-easy Vector (Promega Corp., Madison WI, USA) di concentrazione nota, diluito serialmente. Nella quantificazione relativa invece, erano confrontati i valori di Ct ottenuti nell’amplificazione del gene di interesse, con quelli ottenuti dall’amplificazione di un gene di riferimento detto “*housekeeping gene*”. Il calcolo delle variazioni relative dell’abbondanza delle copie geniche vengono espresse come *fold* applicando la seguente formula: $Fold = 2^{\Delta Ct}$, dove **Fold** indica la quantità di copie relativa al campione controllo mentre, ΔCt è la differenza tra i Ct campione *target* e i Ct relativi al campione. Tramite questa formula è possibile ottenere il numero di copie in più o in meno del gene target.

3.5.5 Clonaggio e sequenziamento

Per l’identificazione delle popolazioni fungine presenti nei campioni era utilizzata la metodica del clonaggio e sequenziamento dei frammenti genici 18S. L’amplificazione PCR era condotta utilizzando la coppia di *primers* EF4 e Fung5 come descritto nel paragrafo 3.5.2.

I prodotti di PCR erano purificati con l’EuroGold Gel Extraction Kit (EuroClone s.p.a., Milano, Italy) seguendo il protocollo del kit. La libreria dei frammenti genici 18S era prodotta clonando gli *amplicon* purificati con il pGEM-T Easy Vector Systems (Promega Corp., Madison WI, USA) seguendo le istruzioni fornite dal kit stesso. Lo *screening* dei cloni ottenuti, era eseguito attraverso RFLP. In breve, i cloni venivano sottoposti a PCR al fine di identificare quelli contenenti l’inserito d’interesse e per il successivo *screening* attraverso l’uso di enzimi di restrizione. Nella reazione di amplificazione si utilizzava come *template* una colonia prelevata casualmente dalle piastre della libreria su cui venivano fatti sviluppare i cloni derivati dalle librerie di clonaggio. Le colonie venivano amplificate direttamente (senza essere sospese nel tampone) utilizzando sempre i *primers* EF4 e Fung5. Dei prodotti di PCR ottenuti, 5 µl venivano sottoposti ad una digestione multienzimatica con gli enzimi di

restrizione *HaeIII* e *RsaI* (New England Biolabs., Ipswich, MA, USA) a 37°C per 2h. I frammenti così ottenuti venivano separati su gel d'agarosio al 2,5%. Dal confronto dei profili ottenuti per i vari amplificati, era possibile raggrupparli così che il DNA plasmidico dei cloni rappresentanti ciascun raggruppamento era estratto utilizzando Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corp., Madison WI, USA) seguendo le istruzioni fornite dal produttore del kit. Gli inserti erano amplificati utilizzando il *primer* T7 attraverso il servizio fornito dalla ditta BMR Genomics. Le sequenze del plasmide erano rimosse tramite il *software* MEGA 5.2 in modo da ottenere la sequenza del frammento 18S clonato. Queste sequenze venivano, infine, allineate tra loro e raggruppate in una stessa OTU (*Operational Taxonomic Units*) quando la similarità fra loro era superiore al 97% e confrontate con quelle depositate nelle banche dati GenBank al fine di ottenere una loro assegnazione tassonomica.

3.5.6 Sequenziamenti di nuova generazione (NGS) con tecnologia Illumina

La regione ipervariabile V5-V6 del gene 16S è stata amplificata in modo tale da poter essere sequenziata grazie alla tecnologia di nuova generazione Illumina.

I primers 783F (CAGGATTAGATACCC) e 1027R (CGACRRCCATGCANCACCT) venivano utilizzati per amplificare la porzione selezionata e le condizioni di amplificazione erano: denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti, 29 cicli a 94°C per 50 s, 47°C per 30 s e 72°C per 30 s, infine un ulteriore step di *elongation* a 72°C per 5 minuti. All'estremità 5' del primer forward era attaccato un oligonucleotide di 6 bp definito come *barcode*, necessario per rendere possibile il sequenziamento simultaneo di differenti campioni all'interno della stessa corsa di sequenziamento.

Il prodotto di amplificazione di 288 bp veniva poi purificato con Wizard SV PCR Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA), successivamente la quantità e la purezza venivano valutate attraverso il fluorimetro Q-bit (Invitrogen) con il saggio Quant-iT Assays (Invitrogen). Al fine di ottenere quantità di amplificato congrue alla reazione di sequenziamento sono state eseguite molteplici amplificazioni dello stesso campione ed in seguito venivano formati dei *pool* di DNA.

I campioni poi venivano sequenziati presso l'azienda BMR Genomics (Padova).

L'analisi qualitativa delle sequenze avveniva attraverso l'eliminazione delle sequenze prive di *primers* e/o *barcode* e di quelle più corte del frammento atteso, la loro assegnazione

tassonomica, inoltre, veniva eseguita dall'Università Bicocca di Milano. Quest'ultima, in particolare, veniva condotta utilizzando la funzione *RDP Bayesian Classifier* del *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu>, Wang et al. 2007), utilizzando un livello di confidenza pari a 50% come suggerito per sequenze corte (Claesson et al. 2009).

3.6 Analisi statistica

Nel contesto delle prove di coltivazione in vaso è stata svolta l'analisi della Varianza (ANOVA) sulle *performances* agronomiche delle piante. In particolare, nella prova di coltivazione di *Olea europaea* sono state calcolate le differenze significative fra campioni utilizzando il Test di Duncan ($p < 0,05$), mentre per la prova di coltivazione di piante ornamentali è stato impiegato il test di Fisher LSD ($p < 0,05$).

Inoltre, il calcolo dell'indice di dissimilarità di Bray-Curtis utilizzato per la costruzione dei dendrogrammi dei profili di comunità relativi ai sequenziamenti di nuova generazione e l'elaborazione delle *Heat maps* della distribuzione delle popolazioni sono stati svolti attraverso il software statistico *R*.

4. RISULTATI

In questo capitolo saranno illustrati i risultati relativi a tutte le prove sperimentali portate avanti, con le procedure descritte nel capitolo Materiali e Metodi, nel quadro di questa tesi di Dottorato.

Per prima cosa, saranno presentati i dati ottenuti durante la prova di spandimento in pieno campo (oliveto) di sanse tal quali e compostate (par. 4.1). Questa pratica, può essere considerata come un approccio, a basso costo, per lo smaltimento degli scarti dell'industria olearia e, allo stesso tempo, per il miglioramento della qualità del suolo. In particolare, saranno approfonditi gli effetti che questi scarti avevano sulle caratteristiche chimiche e sulle dinamiche delle comunità microbiche del suolo.

Nella seconda parte della tesi è stata valutata la possibilità di riciclare questi sottoprodotti con un approccio che, oltre a consentirne lo smaltimento, portasse alla loro valorizzazione trasformandoli in compost di qualità, un prodotto che può rappresentare un ideale sostituto della torba nella formulazione di substrati da invasatura. In questo contesto, sono state condotte due prove sperimentali per approfondire gli effetti dell'utilizzo di sansa e compost sulla crescita della pianta e sulle popolazioni batteriche e fungine presenti nel sistema suolo-pianta.

Nel paragrafo 4.2, in particolare, saranno illustrati i risultati riguardanti l'utilizzo di sansa umida da sistema di estrazione a due fasi (Pieralisi DMF), sia tal quale che compostata, per la coltivazione in vaso di piante di olivo (*Olea europaea*).

Nel paragrafo 4.3 saranno, poi, presentati i dati ottenuti durante la prova di coltivazione in vaso di piante ornamentali su larga scala, allestita in aziende vivaistiche nell'ambito del progetto *SAN-SOIL*, in cui la torba è stata sostituita con quantità crescenti di compost di sansa. In questo paragrafo saranno anche presentati i risultati del monitoraggio del processo di compostaggio con particolare riferimento alle dinamiche delle popolazioni batteriche coinvolte nella trasformazione della sostanza organica.

4.1 Prova di spandimento in campo di sanse tal quali e compostate.

La prova di spandimento consisteva nello spargimento di scarti oleari costituiti da una sansa tradizionale derivante dal sistema di estrazione a tre fasi sia da sansa umida a due fasi ottenuta da un sistema di estrazione innovativo (Pieralisi DMF), e il rispettivo compost (Fig. 15). Il suolo oggetto di studio era costituito da un oliveto sul quale per quattro anni erano stati sparsi questi scarti. Il lavoro presentato in questa tesi di Dottorato riguarda il quarto anno di sperimentazione durante il quale sono state monitorate le dinamiche a breve termine (fino a 4 mesi dallo spandimento) delle popolazioni microbiche autoctone e della sostanza organica presente nel suolo.

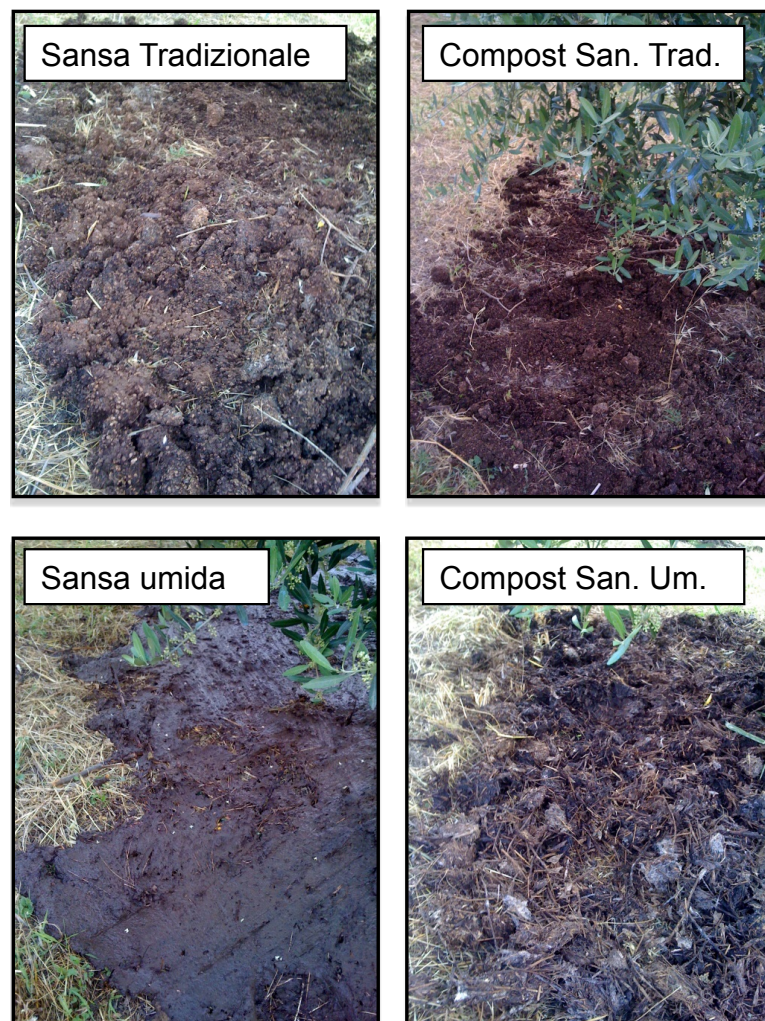


Fig. 15. Ammendamento in pieno campo (oliveto) con scarti oleari tal quali e compostati

4.1.1 Effetti sulle proprietà chimiche del suolo.

Le analisi chimiche del suolo erano volte alla comprensione delle dinamiche della sostanza organica apportata al suolo con gli ammendanti, e di come esse fossero connesse alle dinamiche della comunità microbica autoctona.

Prima di illustrare le caratteristiche chimiche del suolo a seguito dell'aggiunta degli ammendanti, in tabella 11 vengono illustrate le caratteristiche chimiche delle sanse tal quali e compostate utilizzate in questa prova di spargimento.

Tab. 11. Caratteristiche chimiche degli ammendanti utilizzati in campo.

Parametro	Sansa Tradizionale	Compost San. Trad.	Sansa Umida	Compost San. Um.
Umidità (%)	47,1	28,3	78,1	38,4
pH	6,9	7,4	5,1	8,1
EC (dS m ⁻¹)	0,7	1,6	2,6	3,3
TOC (g kg ⁻¹)	493,0	461,0	524,3	473,0
TKN (g kg ⁻¹)	8,3	18,0	16,2	29,0
C/N	59,4	26,2	32,4	16,6
Fenoli* (mg g ⁻¹)	2,1	0,9	31,7	6,0

Le analisi riportano che la sansa umida tal quale era caratterizzata dai più alti valori di umidità, carbonio organico totale e fenoli totali, mentre i valori più alti di pH, conducibilità elettrica e azoto (TKN) erano quelli relativi al compost ottenuto dalla sansa umida. Inoltre, il rapporto C/N presentava dei valori massimi nella sansa tradizionale.

Le analisi svolte consistevano nella determinazione del Carbonio organico totale estraibile dall'acqua (WEOC), degli zuccheri riducenti totali (TRS) e dei fenoli totali (TPC) nei campioni di suolo non ammendato ed in quelli ammendati (Fig. 16).

La WEOC e gli ZRT presentavano circa lo stesso andamento decrescente per tutta la durata della sperimentazione e per tutti e quattro i trattamenti testati.

Dopo 3 giorni dall'ammendamento, si osservavano delle concentrazioni sempre superiori al controllo per tutti e quattro i trattamenti fino ad arrivare a 120 giorni, in cui le concentrazioni erano simili a quelle del controllo. Il trattamento che apportava un incremento maggiore di

WEOC e zuccheri riducenti al suolo era la sansa tradizionale seguita dal compost derivato da sansa tradizionale. Quindi la sansa tradizionale era quella che nel brevissimo periodo apportava più carbonio organico e zuccheri prontamente disponibili che già dopo 15 giorni però risultavano essere quasi del tutto consumati.

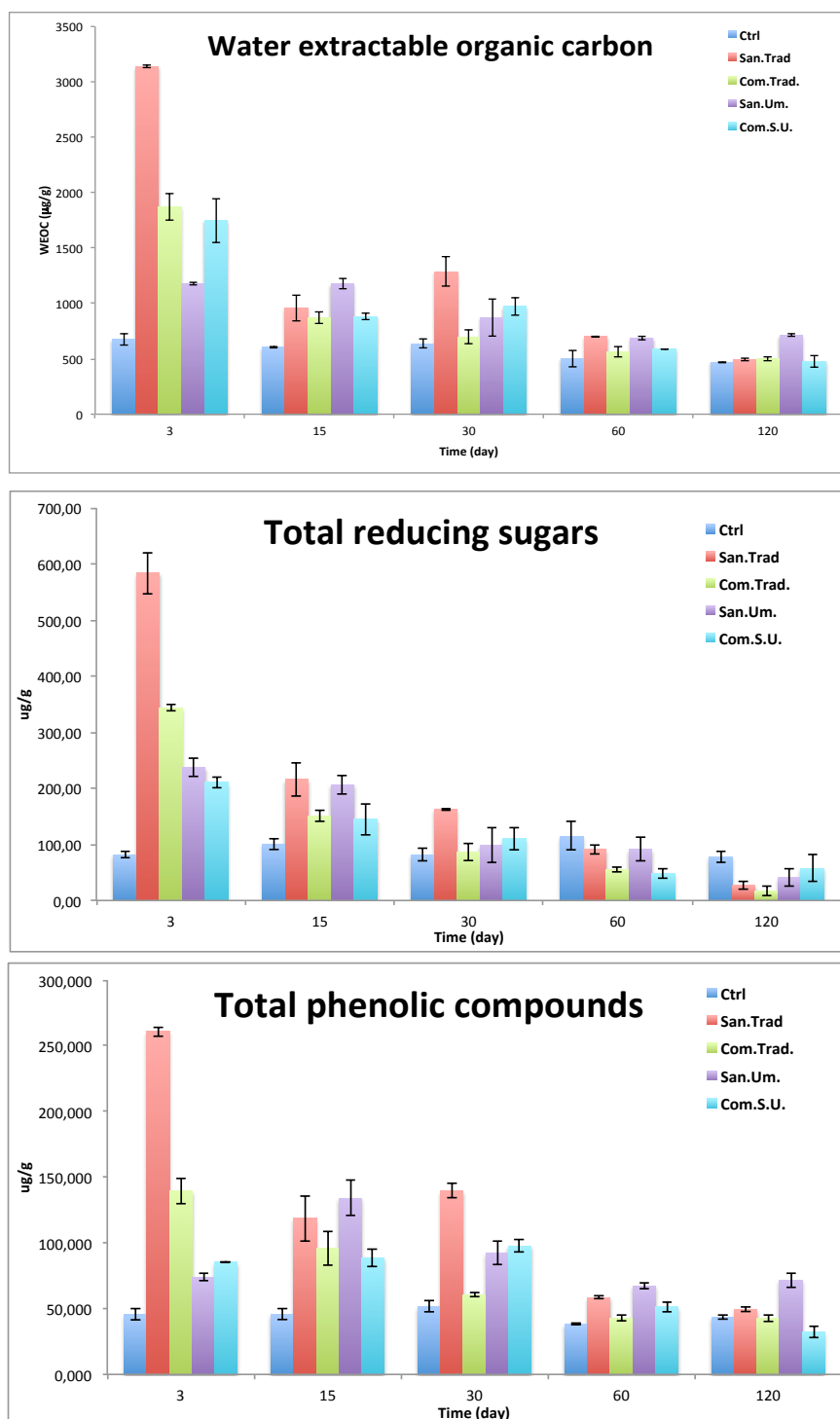


Fig. 16. Proprietà chimiche del suolo controllo e dei suoli ammendati con sansa tradizionale, sansa umida ed i relativi compost.

La diminuzione in WEOC era di circa il 70 % dopo 15 giorni dal trattamento nel caso della sansa tradizionale, rispetto al compost derivato da sansa tradizionale il quale, invece, veniva dimezzato, e alla sansa pat  che rimaneva pressoch  costante fino al 15° giorno per poi subire una riduzione di circa il 50%. Le variazioni nella concentrazione di WEOC potevano essere legata all'equilibrio tra due diversi processi: uno iniziale di solubilizzazione delle componenti pi  labili, seguito delle componenti organiche pi  resistenti e da un altro di sintesi ex novo di componenti a basso peso molecolare o di ri-polimerizzazione e condensazione delle componenti organiche solubili.

Il comportamento delle componenti fenoliche era simile ai precedenti eccetto per il fatto che la diminuzione nel tempo era meno accentuata infatti dopo 30 giorni nel caso della sansa tradizionale il contenuto era stato solo dimezzato. Il tasso di decrescita dei fenoli era pi  lento rispetto agli zuccheri; questa osservazione suggeriva che i carboidrati solubili potevano essere immediatamente utilizzati dalla biomassa microbica del suolo come fonte di carbonio, energia e nutrienti; mentre la componente fenolica, pi  resistente alla degradazione dei microrganismi, poteva subire una degradazione pi  lenta da parte di questi ultimi.

In sintesi la sansa tradizionale e il compost derivato da quest'ultima erano i trattamenti che hanno apportato al suolo, nel breve periodo (dopo 3 giorni), una sostanza organica solubile in acqua ricca in zuccheri e componenti fenoliche e quindi prontamente disponibile per l'attivit  microbica e povera in sostanze umiche con una differenza tra la sansa fresca e quella compostata. Nel caso della sansa pat , e del compost derivante da questa, l'apporto di materiale organico labile era meno accentuato e, i bassi valori che si osservavano subito dopo 3 giorni suggerivano che le sostanze in essa contenute erano probabilmente gi  state degradate dai microrganismi del suolo.

4.1.2 Effetti sulla comunità batterica del suolo.

In questa prova è stato utilizzato un approccio coltura-indipendente per studiare l'impatto dell'aggiunta di scarti oleari solidi, freschi e compostati, sulle comunità microbiche del suolo allo scopo di comprendere il possibile ruolo dei microrganismi come mediatori e promotori della salute e del miglioramento dei suoli.

La figura 17 riporta i *fingerprints*, ottenuti con la metodica DGGE, delle comunità batteriche del suolo dopo 3, 15, 30, 60 e 120 giorni dopo lo spargimento di sottoprodotti di frantoi a due e tre fasi, sia tal quali sia compostati.

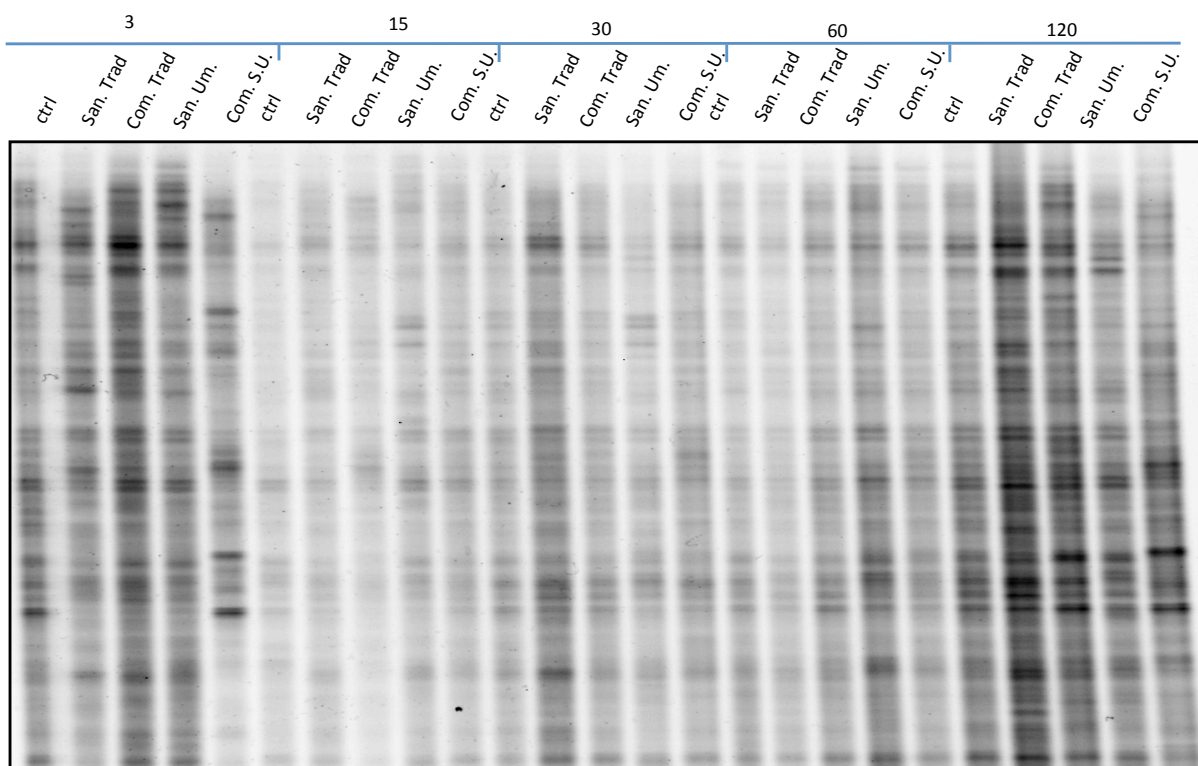


Fig. 17. Fingerprints DGGE delle comunità batteriche presenti nei suoli controllo (ctrl) e in quelli ammendati con sansa tradizionale (San. Trad.), compost di sansa tradizionale (Com. Trad), sansa umida (San. Um.) e compost di sansa umida (Com S.U.) dopo 3, 15, 30, 60 e 120 giorni dallo spandimento.

La comunità batterica presentava una modificazione della biodiversità, espressa dagli indici ecologici *Richness* (S) e *Shannon-Weaver* (H) (Tab. 12), subito dopo che gli ammendanti venivano aggiunti al suolo. Dopo appena 3 giorni dall'ammendamento, infatti, si potevano

apprezzare differenze nella comunità batterica fra il suolo ammendato e non ammendato, con una *Richness* pari a 13, 21, 20 e 13, valori che si riferivano rispettivamente a sansa tradizionale, compost di sansa tradizionale, sansa paté e compost da essa derivante, mentre il controllo aveva un valore di 17. Gli indici H e D confermavano il processo di alterazione immediata dell'equilibrio della comunità. Gli ammendanti che apportavano maggiore ricchezza in termini di popolazioni batteriche erano il compost di sansa tradizionale e la sansa paté non compostata, mentre i restanti ammendanti (sansa tradizionale tal quale e compost di sansa paté) sembravano andare a diminuire la biodiversità totale del suolo. I valori di *Evenness* (E), tuttavia, non subivano grosse alterazioni, rimanendo sempre molto alti ed indicando che i trattamenti che modificavano la ricchezza in specie non andavano comunque ad alterare la loro omogenea distribuzione.

Tab. 12. Indici ecologici di biodiversità ottenuti dall'analisi dei profili DGGE delle comunità batteriche del suolo. *Richness* (S), indice di Shannon-Weaver (H), indice di dominanza di Simpson (D), *Evenness* (E).

TESI	Species Richness (S)	Shannon-Weaver Index (H)	Simpson Index (D)	Evenness (E)
Ctrl 3	17	2,652	0,082	0,936
San. Trad. 3	13	2,452	0,094	0,956
Com. Trad. 3	21	2,895	0,067	0,951
San.Um. 3	20	2,903	0,060	0,969
Com. S.U.3	13	2,284	0,123	0,891
Ctrl 15	12	2,317	0,111	0,932
San. Trad. 15	14	2,540	0,086	0,962
Com. Trad. 15	14	2,498	0,094	0,947
San.Um. 15	14	2,503	0,093	0,948
Com. S.U.15	14	2,552	0,083	0,967
Ctrl 30	14	2,551	0,084	0,967
San. Trad. 30	15	2,540	0,092	0,938
Com. Trad. 30	12	2,395	0,098	0,964
San.Um. 30	15	2,618	0,078	0,967
Com. S.U.30	15	2,567	0,087	0,948
Ctrl 60	15	2,598	0,081	0,959
San. Trad. 60	16	2,665	0,077	0,961
Com. Trad. 60	15	2,546	0,090	0,940
San.Um. 60	17	2,683	0,075	0,947
Com. S.U.60	13	2,466	0,092	0,961
Ctrl 120	22	2,897	0,065	0,937
San. Trad. 120	24	3,031	0,054	0,954
Com. Trad. 120	24	3,027	0,056	0,952
San.Um. 120	22	2,914	0,062	0,943
Com. S.U.120	24	2,905	0,071	0,914

Questo effetto sulla microflora batterica, tuttavia, risultava essere limitato soltanto ai primi 15 giorni, dopodiché non si osservavano differenze tra i profili DGGE relativi al controllo e ai terreni trattati. Gli indici ecologici confermavano questa capacità di resilienza del suolo; dopo 15 giorni, infatti, i suoli ammendati ristabilivano una sorta di equilibrio come suggerito da i valori di S simili tra la comunità presente nel suolo non ammendato ($S = 12$) e quelle nei suoli ammendati con le diverse matrici, in cui tutte presentavano un valore di S pari a 14. E' interessante notare come questo valore fosse identico per i quattro ammendanti, sottolineando come le differenze presenti nel brevissimo termine (3 giorni) non fossero più visibili. Gli indici H, D ed E presentavano lo stesso *trend*, con valori simili tra suolo controllo e suoli ammendati. Per tutto il resto della prova e fino al suo termine (120 giorni) la situazione rimaneva invariata. La ricchezza in bande dei *fingerprint* relativi al suolo non ammendato era, infatti, molto simile tra il controllo (22) e i suoli ammendati con le diverse matrici (24, 24, 22 e 24 per sansa tradizionale, compost di sansa tradizionale, sansa umida e compost di sansa umida, rispettivamente). Stessa cosa si osservava per i valori degli indici H, D ed E.

L'analisi numerica dei *fingerprint* permetteva la computazione degli indici di similarità di *Dice* tra le comunità dei campioni di suolo analizzati. In particolare, era possibile osservare che dopo 3 giorni dallo spandimento la struttura della comunità nei suoli ammendati era profondamente diversa da quella del suolo controllo. Infatti, i valori di similarità riscontrati tra il controllo ed i quattro trattamenti erano relativamente bassi (46,7%, 57,9%, 64,9% e 40% rispettivamente tra sansa tradizionale tal quale, sansa tradizionale compostata, sansa paté tal quale e sansa paté compostata rispetto al controllo). Come già osservato per gli indici ecologici, dopo 15 giorni di trattamento i suoli ammendati mostravano limitate differenze rispetto al controllo, con similarità superiori al 90% per tutti i trattamenti, salvo quello con compost di sansa tradizionale che presentava una similarità del 76,9%. Dopo 30 giorni e fino al termine della prova di spandimento tutti i quattro trattamenti presentavano valori di similarità prossimi o superiori al 90%, confermando, anche per la struttura della comunità, la buona capacità di resilienza dei batteri del suolo. Le dinamiche delle comunità in ciascun campione, elaborate grazie alla *moving window analysis* (MWA) che rappresenta i valori di cambiamento percentuale tra due profili consecutivi della stessa comunità, permetteva di approfondire e meglio comprendere questo fenomeno (Fig. 18). Osservando i grafici si può notare come nell'intervallo di tempo tra 3 e 15 giorni, tutti i suoli ammendati presentavano un alto tasso di cambiamento del profilo della comunità, con valori (compresi tra il 41,2 e il 63 %) molto più elevati di quello della comunità del suolo non ammendato (24,1%). Proprio

questi forti cambiamenti che avevano luogo nei primi giorni di sperimentazione, permettevano alle comunità batteriche dei suoli ammendati di ristabilire la similarità con quelle del suolo controllo, dimostrando la loro capacità di resilienza. Nei periodi successivi, invece, le comunità batteriche presentavano tassi di cambiamento più bassi, a dimostrare la loro capacità di mantenere l'equilibrio raggiunto.

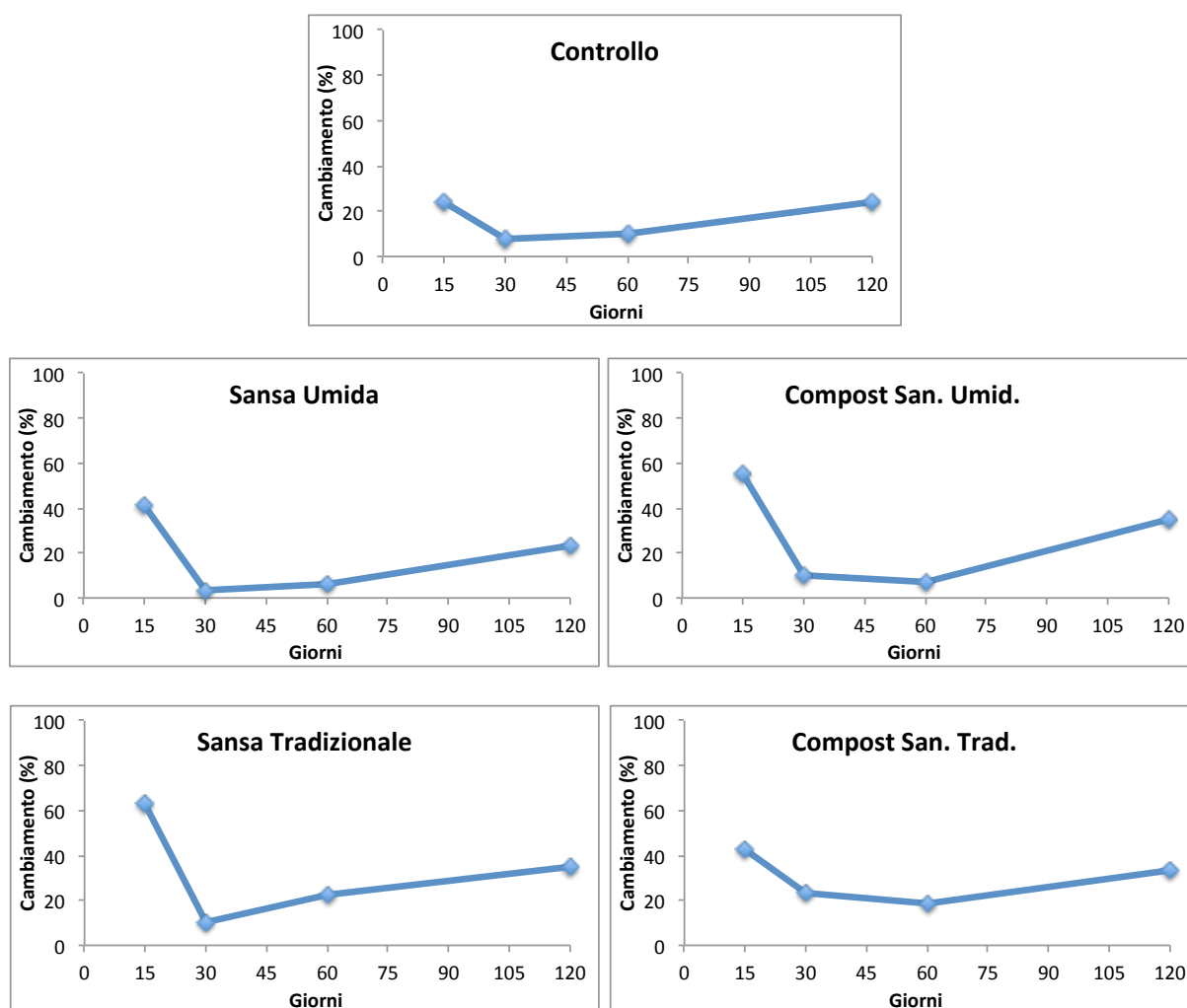


Fig. 18. *Moving window analyses* delle dinamiche delle comunità batteriche del suolo controllo e quelle dei suoli ammendati con sansa umida, compost di sansa umida, sansa tradizionale e compost di sansa tradizionale.

L'analisi quantitativa del frammento genico del 16S ha riportato come non vi fossero delle differenze rilevanti tra le abbondanze riscontrate nei campioni trattati con gli ammendanti e quella relativa al controllo (Fig. 19). Infatti, la differenza più marcata rispetto al suolo non ammendato si riscontrava dopo 15 giorni dall'inizio della prova per il suolo ammendato con il

compost derivante dalla sansa denocciolata, il quale presentava un'abbondanza di appena 3,6 volte superiore rispetto al controllo dello stesso tempo.

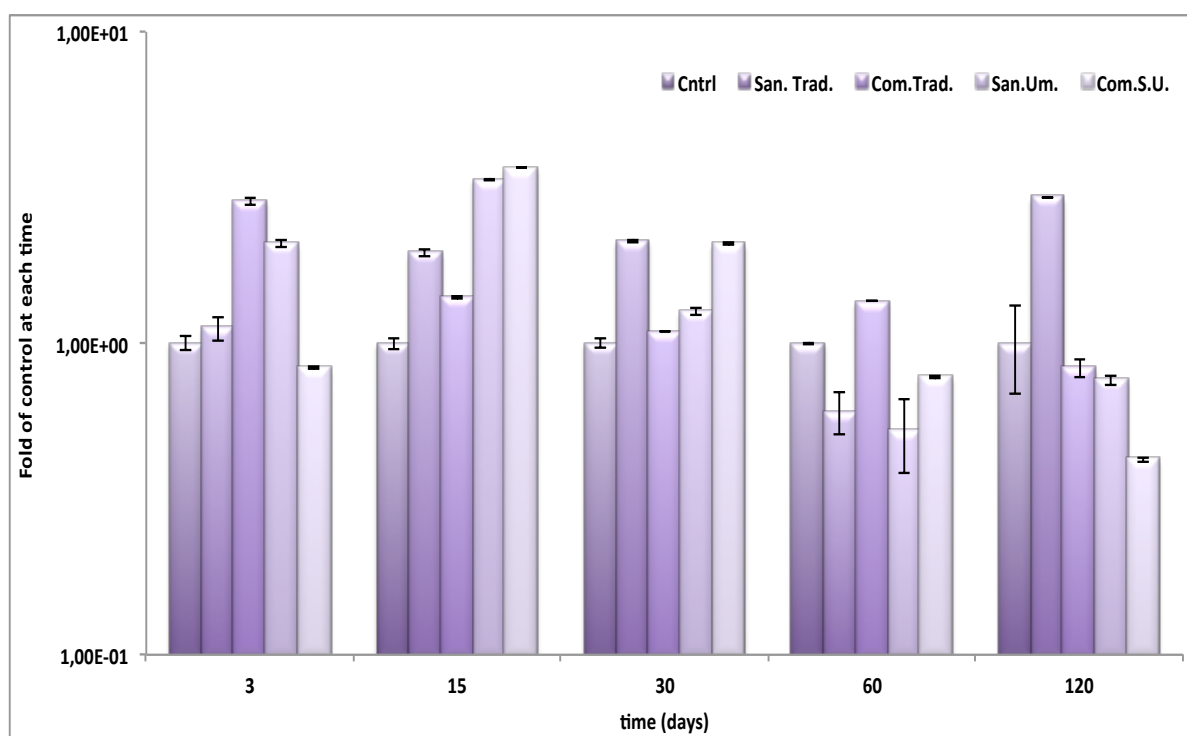


Fig. 19. Abbondanza dei batteri nei suoli controllo e in quelli ammendati con sansa tradizionale (San. Trad.), compost di sansa tradizionale (Com. Trad), sansa umida (San. Um.) e compost di sansa umida (Com S.U.) dopo 3, 15, 30, 60 e 120 giorni dallo spandimento. I valori, calcolati normalizzando il numero di copie del gene 16S rispetto al controllo di ciascun tempo, sono espressi come cambiamento logaritmico (in base 10).

4.1.3 Effetti sulla comunità fungina del suolo.

L'analisi della biodiversità fungina è stata eseguita, come per i batteri, utilizzando un approccio coltura-indipendente con l'analisi dei profili di comunità ottenuti attraverso le analisi DGGE di campioni di suolo raccolti dopo 3, 15, 30, 60 e 120 giorni lo spandimento di sansa tradizionale e sansa umida e dei rispettivi compost (Fig. 20).

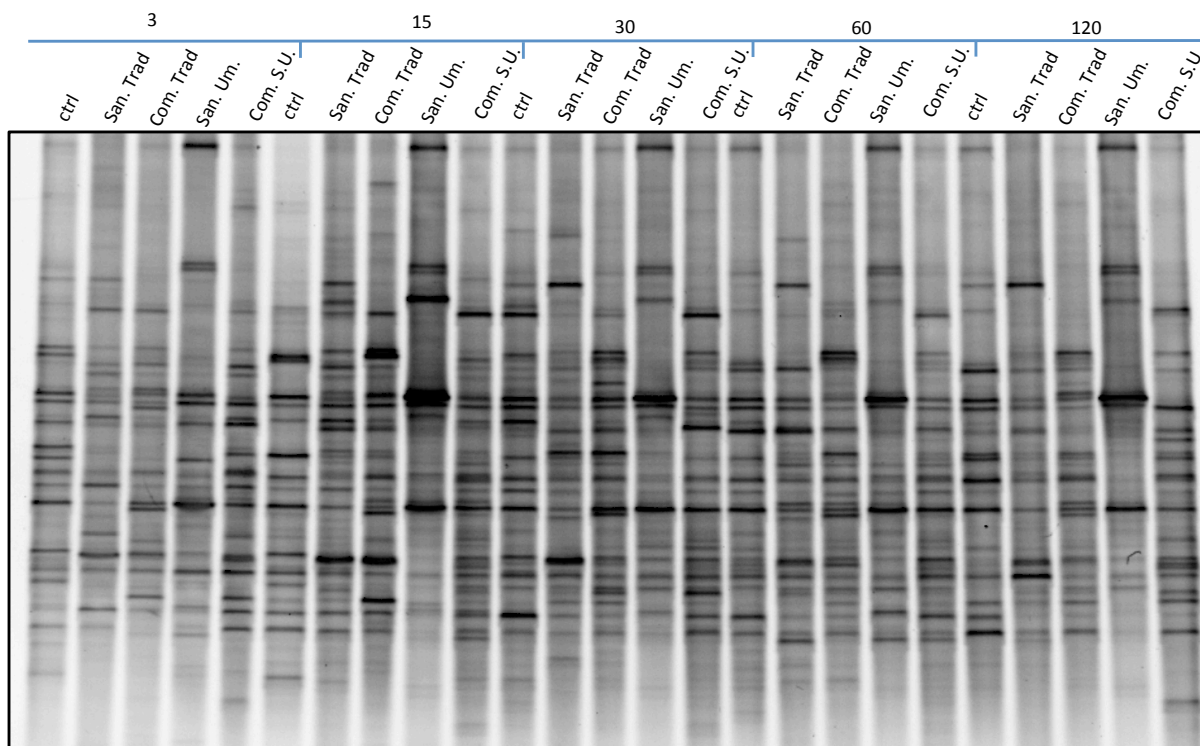


Fig. 20. Fingerprints DGGE delle comunità fungine presenti nei suoli controllo (ctrl) e in quelli ammendati con sansa tradizionale (San. Trad.), compost di sansa tradizionale (Com. Trad), sansa umida (San. Um.) e compost di sansa umida (Com S.U.) dopo 3, 15, 30, 60 e 120 giorni dallo spandimento.

Dalla semplice osservazione dei *fingerprints*, è possibile accorgersi come, a differenza di quanto avveniva nel caso dei batteri, le comunità fungine sembravano subire profonde modificazioni in seguito all'aggiunta delle sanse, sia tal quali sia compostate. Queste modificazioni, tuttavia, non riguardavano la ricchezza in specie fungine, come evidenziato dal calcolo degli indici ecologici riportati in tabella 13. I valori degli indici di *Richness* (S), di Shannon-Weaver (H) e di Simpson (D) erano, infatti, molto simili a quelli nel suolo controllo sia subito dopo lo spandimento degli ammendanti (3 giorni) che durante tutta la durata della prova. Questa evidenza suggeriva che il palese impatto degli ammendanti sulle comunità

fungine non riguardava la biodiversità in specie, che rimaneva pressoché invariata, ma semmai la struttura della comunità.

Tab. 13. Indici ecologici di biodiversità ottenuti dall'analisi dei profili DGGE delle comunità fungine del suolo. *Richeness* (S), indice di Shannon-Weaver (H), indice di dominanza di Simpson (D), *Evenness* (E).

TESI	Species Richness (S)	Shannon-Weaver index (H)	Simpson Index (D)	Evenness (E)
Ctrl 3	16	2,699	0,072	0,974
San.Trad.3	16	2,649	0,079	0,956
Com.Trad.3	13	2,495	0,087	0,973
San.Um.3	14	2,476	0,094	0,938
Com.S.U. 3	18	2,809	0,064	0,972
Ctrl 15	14	2,551	0,084	0,967
San.Trad.15	19	2,884	0,059	0,980
Com.Trad.15	19	2,805	0,067	0,953
San.Um.15	14	2,243	0,133	0,850
Com.S.U. 15	15	2,613	0,081	0,965
Ctrl 30	16	2,694	0,072	0,972
San.Trad.30	16	2,662	0,079	0,960
Com.Trad.30	16	2,720	0,069	0,981
San.Um.30	15	2,538	0,089	0,937
Com.S.U. 30	15	2,635	0,077	0,973
Ctrl 60	14	2,536	0,085	0,961
San.Trad.60	13	2,496	0,087	0,973
Com.Trad.60	11	2,321	0,105	0,968
San.Um.60	14	2,492	0,092	0,944
Com.S.U. 60	13	2,493	0,088	0,972
Ctrl 120	13	2,457	0,093	0,958
San.Trad.120	12	2,322	0,114	0,934
Com.Trad.120	11	2,313	0,106	0,965
San.Um.120	8	1,924	0,169	0,925
Com.S.U. 120	14	2,552	0,084	0,967

L'effetto degli ammendanti sulle comunità fungine del suolo era evidente quando si esaminava la struttura delle comunità attraverso l'analisi numerica dei *fingerprints* DGGE che permetteva la computazione degli indici di similarità di *Dice* tra le comunità dei campioni di suolo analizzati e la conseguente costruzione dei dendrogrammi di similarità (Fig. 21).

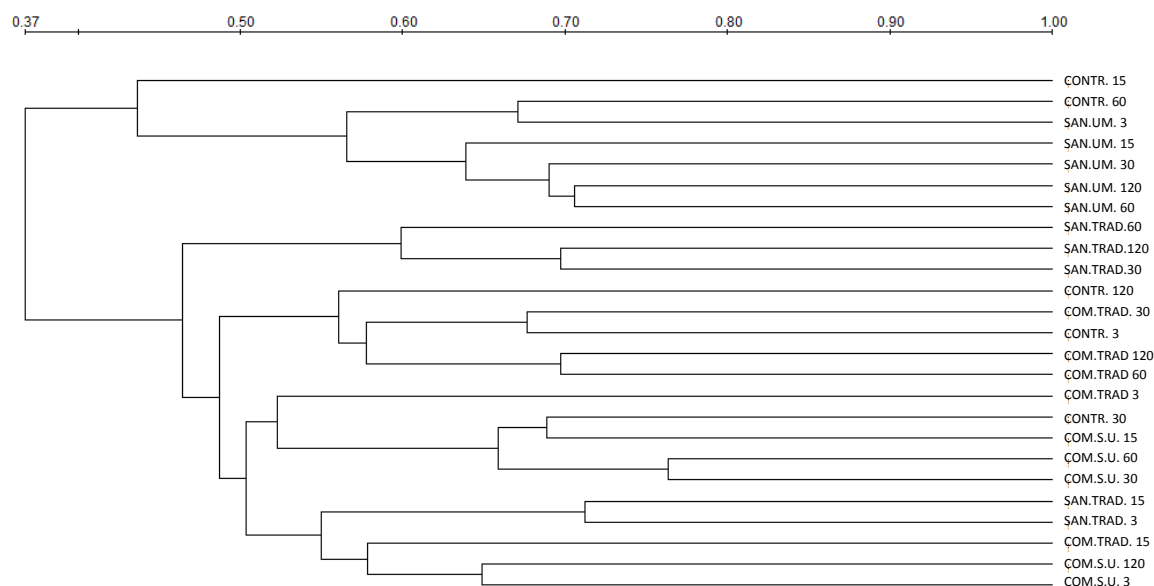


Fig. 21. Dendrogramma elaborato dalle similarità tra i fingerprints DGGE delle comunità fungine nel suolo dei diversi campioni (CONTR = controllo; SAN.TRAD. = Sansa tradizionale; COM.TRAD. = Compost di sansa tradizionale; SAN.UM. = Sansa umida; COM.S.U. = Compost di sansa umida), costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*).

Dopo 3 giorni dallo spandimento si notava una bassa similarità fra i profili di comunità dei suoli ammendati e quello relativo alla comunità del suolo controllo. In particolare, l'utilizzo della sansa umida e del suo prodotto di compostaggio produceva effetti maggiori (similarità con il controllo del 37,2 e 48,5%) che la sansa tradizionale e il suo compost (54 e 57,7%). Le differenze tra le comunità fungine presenti nei suoli ammendati e quella del suolo controllo rimanevano alte per tutta la durata della prova, soprattutto nel caso dell'utilizzo delle sanse (similarità medie pari a 44,42 e 41,9% per quella tradizionale e quella umida, rispettivamente). Le comunità fungine nei suoli trattati con i due compost, infatti, mostravano capacità di resilienza maggiori, come si evince dalle similarità con il controllo che erano più alte (57,8 e 49% per il compost da sansa tradizionale e quello da sansa umida, rispettivamente) che nel caso dell'utilizzo delle sanse (43,8 e 33,5%). E' comunque qui importante rilevare che la capacità di resilienza mostrata dalle comunità fungine era, in ogni caso, notevolmente inferiore a quella rilevata per le comunità batteriche, come illustrato nel paragrafo precedente.

I marcati effetti che i due tipi di sanse avevano sulla struttura della comunità fungina, sono anche indicati dal fatto che nel dendrogramma di similarità, mostrato in figura 21, è possibile evidenziare la formazione di due *cluster* distinti: uno raggruppante i profili corrispondenti ai campioni di suolo ammendato con sansa umida a partire dal giorno 15 (con similarità

superiore al 65%) ed uno raggruppante quelli dei campioni di suolo ammendato con sansa tradizionale a partire dal giorno 30 (con similarità superiore al 60%). La formazione di questi *cluster*, inoltre, indica come l'impatto delle due sanse non causasse solo effetti marcati ma anche duraturi nel tempo. Le dinamiche delle comunità in ciascun campione, elaborate grazie alla *moving window analysis* (MWA), confermano questa osservazione. Infatti, nei grafici riportati in figura 22, si può osservare come i cambiamenti nei profili delle comunità che occorreano ad intervalli di tempo successivi fossero, nei suoli ammendati con le sanse, più bassi che nel suolo controllo e in quelli ammendati con compost.

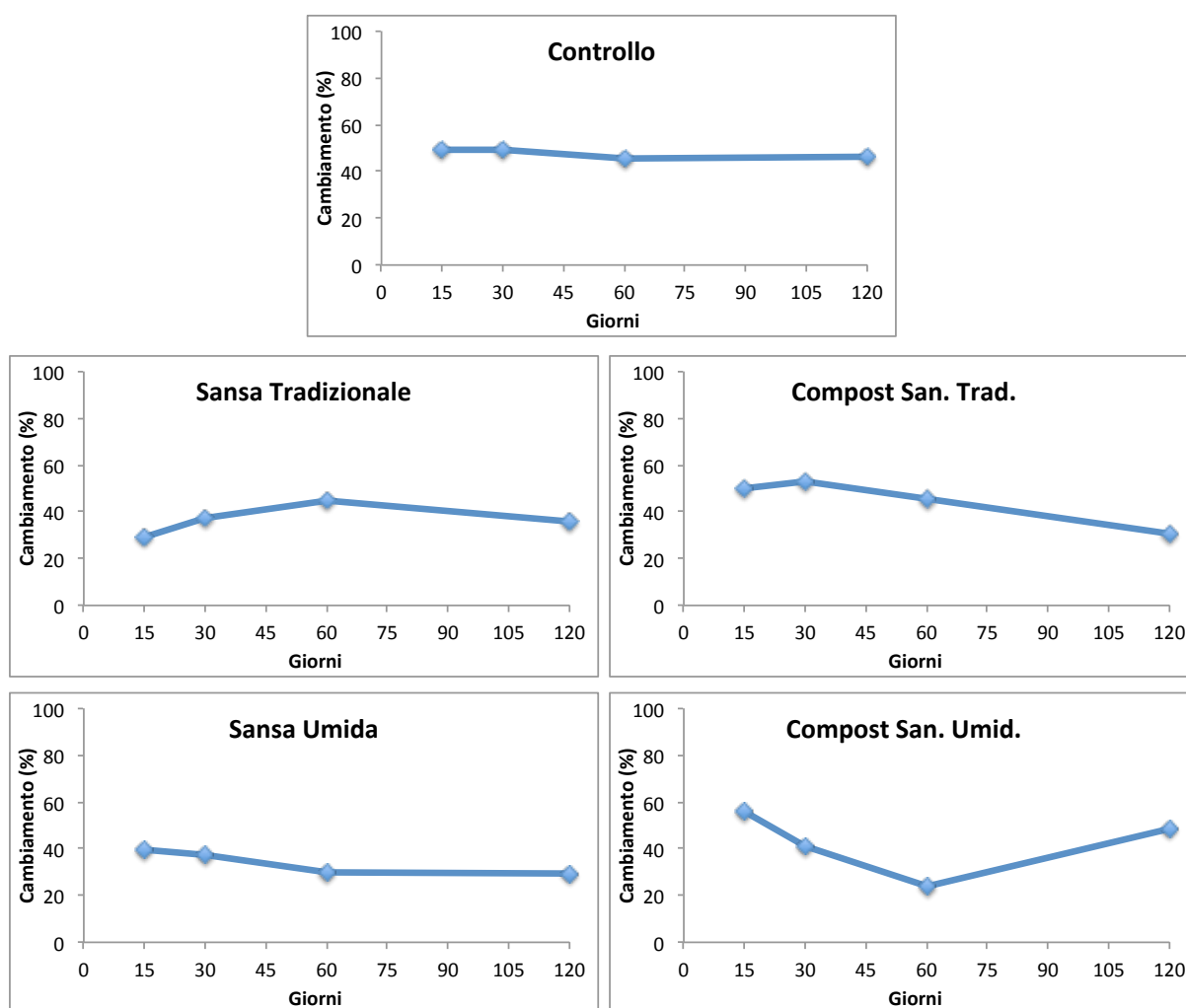


Fig. 22. *Moving window analyses* (MWA) delle dinamiche delle comunità fungine del suolo controllo e quelle dei suoli ammendati con sansa umida, compost di sansa umida, sansa tradizionale e compost di sansa tradizionale.

L'effetto dell'aggiunta di scarti oleari sulla comunità fungina si è evidenziato anche rispetto all'abbondanza dei funghi attraverso l'analisi qPCR della sequenza relativa allo spaziatore ITS (*Internal Transcribed Spacer*), riportata in figura 23.

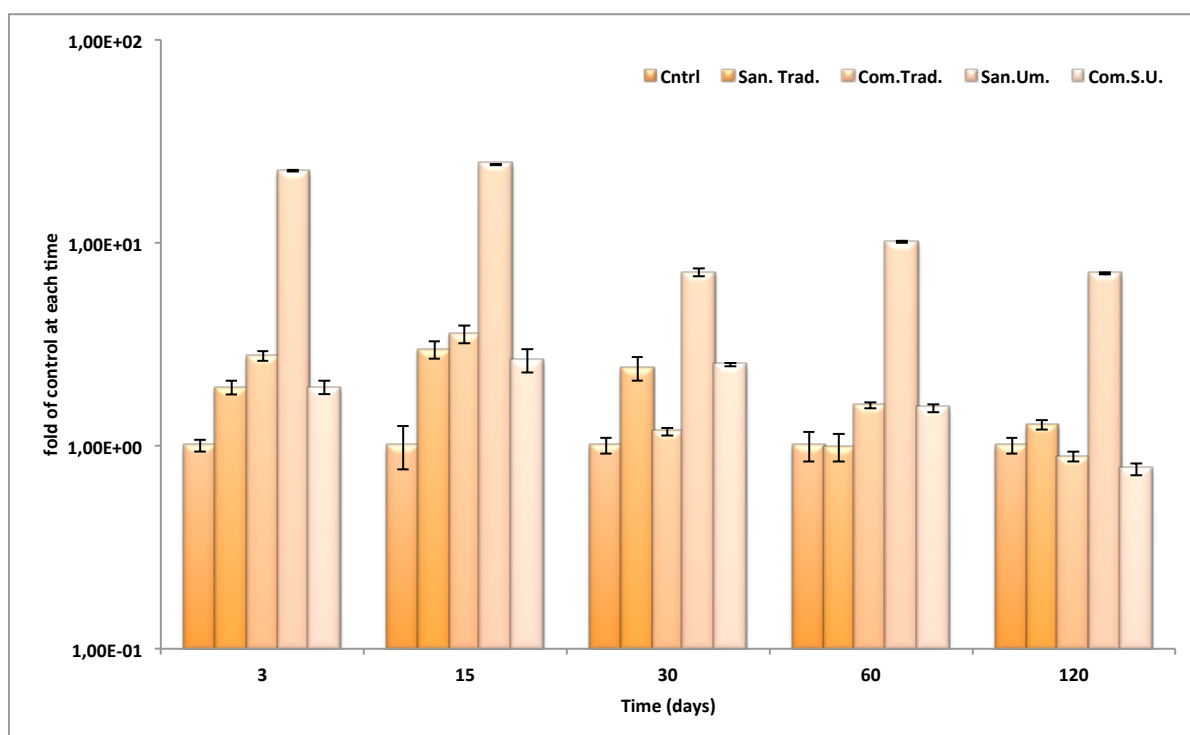


Fig. 23. Abbondanza dei funghi nei suoli controllo (Cntrl.) e in quelli ammendati con sansa tradizionale (San. Trad.), compost di sansa tradizionale (Com. Trad), sansa umida (San. Um.) e compost di sansa umida (Com S.U.) dopo 3, 15, 30, 60 e 120 giorni dallo spandimento. I valori, calcolati normalizzando il numero di copie del gene 16S rispetto al controllo di ciascun tempo, sono espressi come cambiamento logaritmico (in base 10).

Come già osservato nel caso dei batteri, l'ammendamento con le sanse e i rispettivi compost non presentava effetti tossici per i funghi. Inoltre, l'aggiunta della sansa umida al suolo produceva un incremento del numero di funghi, sia rispetto al controllo che rispetto agli altri trattamenti. Dopo tre giorni dall'ammendamento si osservava un incremento del numero di copie di circa 22 volte. Questo aumento risultava essere evidente fino al termine della sperimentazione.

4.2 Prova di coltivazione in vaso di piante di olivo (*Olea europaea*) con substrati da invasatura a base di sansa umida tal quale e compostata.

Nell'ottica della definizione di strategie di valorizzazione degli scarti oleari, è stata implementata una prova di coltivazione in vaso di piante di olivo (*Olea europaea*) utilizzando substrati da invasatura a base di sansa umida tal quale e compostata. Questo tipo di sansa, utilizzata anche nella prova sperimentale precedente di spandimento in campo, rappresenta il sottoprodotto principale di un innovativo sistema di estrazione a due fasi (Pieralisi DMF) ed è caratterizzata da un'umidità più elevata rispetto alla sansa tradizionale. Il suo compostaggio, quindi, ne può permettere la trasformazione in ammendante di qualità.

Nei paragrafi successivi saranno illustrati i risultati ottenuti dalle indagini degli effetti che questi substrati avevano sulla crescita delle piante coltivate e sulle dinamiche delle popolazioni microbiche dell'ecosistema suolo-pianta. In particolare, saranno affrontati gli effetti sulle comunità batteriche e fungine del suolo e della rizosfera dopo 30, 60, 120 e 270 giorni dall'invasatura delle piante. Inoltre, per approfondire le popolazioni microbiche che potevano essere coinvolte negli effetti indotti dall'utilizzo dei diversi substrati è stata investigata, dopo 30 giorni di coltivazione, la composizione delle comunità batteriche di suolo e rizosfera e di quelle fungine della rizosfera.

4.2.1 Effetti sulla crescita della pianta

Prima di illustrare le *performances* delle piante, nella tabella 14 vengono riportate le caratteristiche chimiche della sansa umida tal quale e del rispettivo compost. Questa caratterizzazione mette in evidenza che i valori di umidità, rapporto C/N, fenoli e del Carbonio organico totale erano più elevati prima del processo del compostaggio. Invece, i valori di conducibilità elettrica, pH e azoto (TKN) aumentavano dopo che la sostanza organica era trasformata.

Tab. 14. Caratteristiche chimiche degli ammendanti utilizzati per la formulazione dei substrati da invasatura

Parametro	Sansa Umida	Compost San. Um.
Umidità (%)	78,1	38,4
pH	5,1	8,1
EC (dS m ⁻¹)	2,6	3,3
TOC (g kg ⁻¹)	524,3	473,0
TKN (g kg ⁻¹)	16,2	29,0
C/N	32,4	16,6
Fenoli* (mg g ⁻¹)	31,7	6,0

I rilievi agronomici sulle piante di olivo sono stati effettuati dopo 120 e 270 giorni dall'inizio della prova. In particolare sono state eseguite delle misure relative all'altezza della pianta (Fig. 24) e, da queste, sono stati elaborati i tassi relativi di crescita (*relative growth rate*, RGR).

Dai risultati si osservava che dopo 120 giorni dall'invasamento, le piante controllo, coltivate cioè in un substrato a base di torba raggiungevano un'altezza media di 56,5 cm, mentre il substrato in cui parte della torba era sostituita con la sansa presentava un forte rallentamento della crescita, con valori medi che non superavano i 23,7 cm. Tuttavia, quando la sansa era utilizzata previo compostaggio, il substrato così formulato permetteva una crescita maggiore (40,2 cm), seppur ancora più bassa del controllo.

Alla fine della sperimentazione (270 giorni), le piante coltivate in presenza di sansa continuavano a presentare valori molto inferiori rispetto alle piante controllo (64,4 e 118,7 cm, rispettivamente). Al contrario, quelle coltivate nel substrato a base di compost recuperavano lo svantaggio nella crescita che si evidenziava a metà della prova, raggiungendo un'altezza di 113,9 cm, valore non significativamente differente da quello delle piante cresciute nel substrato a base di torba.

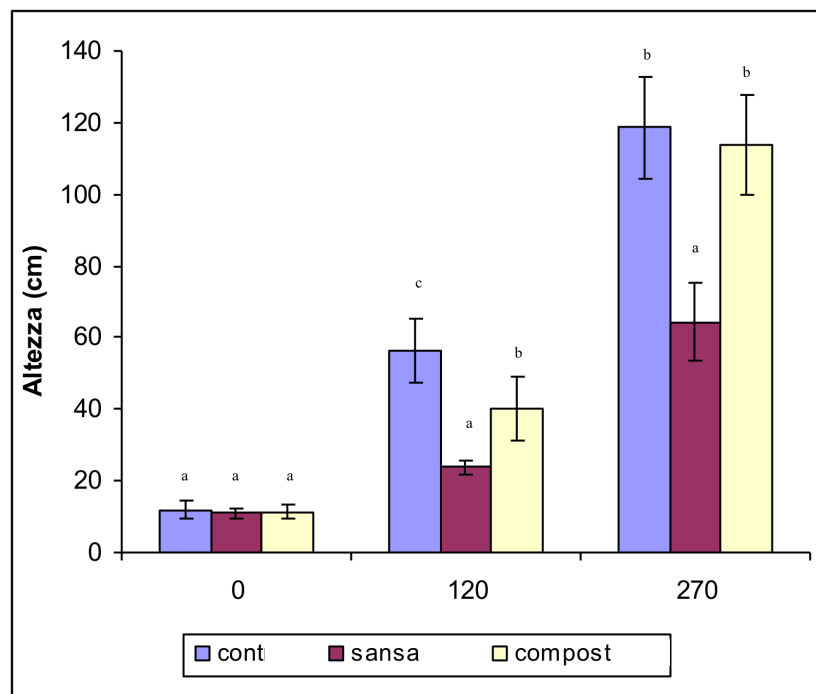


Fig. 24. Effetti dei substrati da invasatura a base di torba (cont) di sansa e di compost sull'altezza delle piante all'inizio (0 giorni), dopo 120 e 270 giorni dall'invasatura. Le barre di errore indicano le deviazioni standard. Per ogni tempo, la stessa lettera indica l'assenza di differenze significative ($P < 0,05$; Duncan Test)

L'analisi dei tassi relativi di crescita permetteva di mettere in evidenza come la scarsa *performance* agronomica ottenuta dal substrato a base di sansa tal quale, fosse dovuta principalmente al forte rallentamento della crescita durante la prima fase di coltivazione (0 - 120 giorni), in cui le piante coltivate in presenza di sansa presentavano valori di RGR molto inferiori a quelle controllo (0,0064 e 0,0130, rispettivamente). Nel caso del compost, invece, la crescita nella prima fase era solo parzialmente rallentata, come dimostrato da valori di RGR di 0,0106. Nella seconda fase (120 - 270 giorni) sia la sansa che il compost presentavano

valori di RGR più alti rispetto al controllo (0,0066, 0,0069 e 0,0049, rispettivamente). Questi tassi di crescita, tuttavia, permettevano solo alle piante coltivate in presenza di compost di recuperare completamente l'esiguo svantaggio iniziale rispetto a quelle crescite nel substrato controllo.

4.2.2 Effetti sulle dinamiche della comunità batterica di suolo e rizosfera

La figura 25 riporta i *fingerprint* DGGE delle comunità batteriche presenti nei singoli ingredienti e nel suolo e nella rizosfera di piante sacrificate dopo 30, 60, 120 e 270 giorni dopo l'invasatura in substrati con solo torba o con sansa umida e relativo compost.

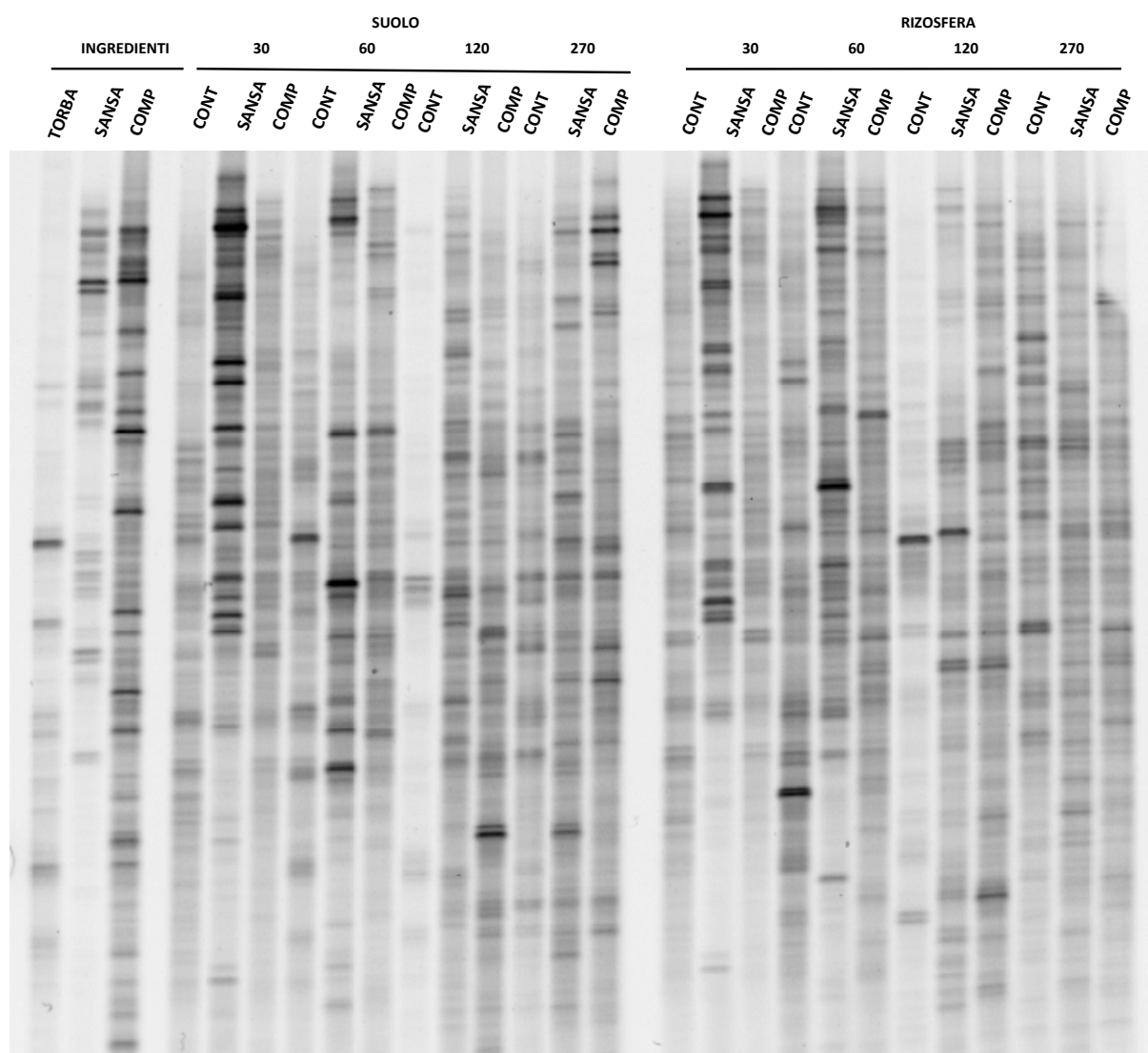


Fig. 25. *Fingerprints* DGGE delle comunità batteriche presenti negli ingredienti utilizzati per la formulazione dei substrati da invasatura: torba, sansa e compost (comp) e delle comunità presenti nel suolo e nella rizosfera dopo 30, 60, 120 e 270 giorni dall'invasatura con substrati a base di torba (cont), di sansa (sansa) e di compost (comp).

L'analisi DGGE evidenziava che le popolazioni batteriche presenti nei singoli ingredienti utilizzati per formulare i diversi substrati da invasatura mostravano comunità più ricche

rispetto alla torba. Infatti, andando ad analizzare gli indici di biodiversità calcolati dai *fingerprint* di ciascun campione, come la Richness (S) e l'indice di Shannon-Weaver (H), sia la sansa paté tal quale sia quella compostata mostravano comunità batteriche più ricche di quella presente nella torba (Tab. 15). In particolare, la sansa tal quale e quella compostata presentavano valori di *Richness* pari a 16 e 27 rispettivamente, e dei valori di Shannon-Weaver pari a 2,591 e 3,088, mentre la torba aveva valori di S e H uguali a 11 e 2,007, rispettivamente. Inoltre, i dati relativi all'indice di dominanza di Simpson sottolineano ulteriormente questa evidenza, infatti esso diminuiva nelle due matrici (0,09 e 0,053 per sansa paté fresca e compost paté, rispettivamente) rispetto al controllo che presentava un indice di dominanza pari a 0,19.

Tab. 15. Indici ecologici di biodiversità ottenuti dall'analisi dei profili DGGE delle comunità batteriche del suolo e della rizosfera. *Richness* (S), indice di Shannon-Weaver (H), indice di dominanza di Simpson (D), *Evenness* (E).

COMPARTO	TEMPO	CAMPIONE	Species Richness (S)	Shannon-Weaver index (H)	Simpson Index (D)	Evenness (E)
	INGREDIENTI	TORBA	11	2,007	0,190	0,837
		SANSA	16	2,591	0,090	0,935
		COMPOST	27	3,088	0,053	0,937
SUOLO	30 giorni	CTRL	18	2,756	0,071	0,953
		30% SANSA	25	3,007	0,057	0,934
		30% COMPOST	18	2,599	0,116	0,990
	60 giorni	CTRL	14	2,395	0,119	0,908
		30% SANSA	20	2,726	0,080	0,910
		30% COMPOST	17	2,642	0,084	0,933
	120 giorni	CTRL	18	2,599	0,212	0,846
		30% SANSA	27	3,175	0,047	0,963
		30% COMPOST	24	2,879	0,079	0,906
	270 giorni	CTRL	18	2,599	0,101	0,937
		30% SANSA	23	3,030	0,053	0,966
		30% COMPOST	22	2,885	0,067	0,933
RIZOSFERA	30 giorni	CTRL	19	2,987	0,055	0,966
		30% SANSA	22	2,937	0,061	0,950
		30% COMPOST	20	2,915	0,059	0,973
	60 giorni	CTRL	18	2,546	0,115	0,881
		30% SANSA	26	3,086	0,054	0,947
		30% COMPOST	22	2,521	0,091	0,955
	120 giorni	CTRL	19	2,599	0,392	0,705
		30% SANSA	18	2,546	0,103	0,899
		30% COMPOST	21	2,893	0,065	0,950
	270 giorni	CTRL	18	2,554	0,089	0,943
		30% SANSA	24	2,949	0,055	0,984
		30% COMPOST	20	2,879	0,120	0,920

L'analisi DGGE mostrava che sostituendo la torba con la sansa pat , sia tal quale che compostata, nei substrati da invasatura, la comunit  batterica del sistema suolo-pianta subiva profonde alterazioni sia in termini di diversit , come dimostrato dall'elaborazione degli indici ecologici di biodiversit , che di composizione, come illustrato dalle similarit  tra i diversi *fingerprint*.

Gli effetti sugli indici di biodiversit  risultavano generalmente pi  marcati nel caso di utilizzo della sansa tal quale che di quella compostata. Dopo 30 giorni dall'invasatura, in particolare, in entrambi i comparti i valori S e H (pari a 18 e 2,756 e a 19 e 2,987, rispettivamente nel suolo e nella rizosfera delle piante controllo) aumentavano quando veniva utilizzata sansa tal quale al posto della torba (25 e 3,007 nel suolo; 22 e 2,937 nella rizosfera). Al contrario, quando veniva utilizzato il compost di sansa i valori S e H erano simili a quelli del controllo (18 e 2,599 nel suolo; 20 e 2,915 nella rizosfera). L'effetto di stimolazione della biodiversit  da parte della sansa, era osservabile per tutta la durata della prova sia nei campioni di suolo che in quelli di rizosfera. Questi effetti dell'utilizzo della sansa rispetto al compost, venivano confermati anche dall'elaborazione dell'indice di dominanza di Simpson, mentre non si apprezzavano effetti significativi su i valori di *Eveness*.

La struttura della comunit  batterica era influenzata, anche se in misura diversa, sia dal trattamento con la sansa pat  che da quello con il compost, come evidenziato dai profili DGGE e dall'elaborazione dei valori di similarit , basati sul coefficiente di Dice, tra i vari campioni.

Dopo 30 giorni la sansa aveva un grande impatto sulle popolazioni batteriche sia nel suolo che nella rizosfera (9,9% e 20,9% di similarit  con il controllo, rispettivamente), mentre il compost mostrava degli effetti pi  limitati (39,3% e 34% di similarit  con il controllo, rispettivamente). L'impatto della sansa rimaneva sempre molto marcato durante le restanti fasi iniziali della coltivazione (60 e 120 giorni), con bassi valori di similarit  rispetto al controllo osservati nel suolo (14,1% e 15,3%) e, soprattutto, nella rizosfera (7% - 2,5%). Il compost, invece, mostrava effetti meno marcati, o comunque paragonabili a quelli della sansa (11,5% e il 12,3% nel suolo; 15,8% e 16,1% nella rizosfera). Al termine della coltivazione (270 giorni), gli effetti di sansa e compost si attenuavano leggermente mostrando valori di similarit  con il controllo, seppur ancora molto limitati, pi  alti sia nel suolo (24,8% e 32,8%) che nella rizosfera (18,5 e 18,1%).

Questi marcati effetti da parte della sansa, soprattutto se utilizzata tal quale, erano evidenziati anche dalle analisi *moving window analysis* (Fig. 26).

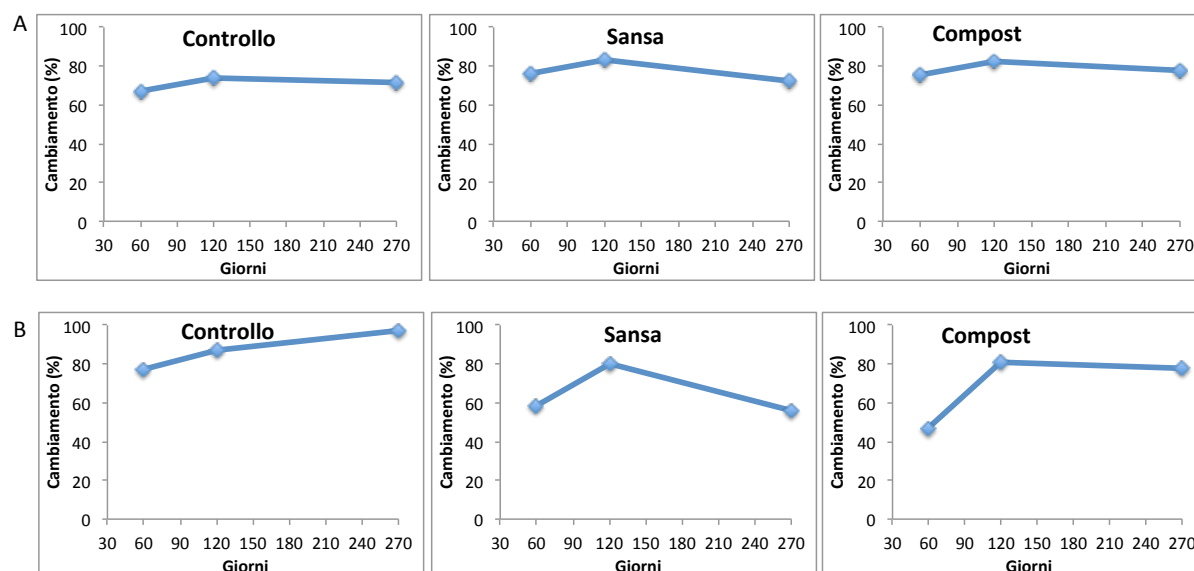


Fig. 26. *Moving window analyses* (MWA) delle dinamiche delle comunità batteriche del suolo (A) e della rizosfera (B) relativi ai substrati a base di torba (controllo), a base di sansa (Sansa) e a base di compost (Compost)

Da questa analisi evinceva che le popolazioni batteriche del suolo presenti nelle piante coltivate in presenza di sansa tal quale e compostata erano caratterizzate da un'elevata dinamicità, inoltre, nel primo intervallo di tempo considerato (30-60 giorni), i tassi di cambiamento delle piante trattate (76,1% e 75,5% per sansa e compost, rispettivamente) erano superiori a quello della comunità batterica della pianta controllo (67,2%) e questo accadeva anche nel periodo successivo (60-120 giorni). Queste differenze con la comunità del controllo si attenuavano nell'ultimo periodo di coltivazione (120-270 giorni), tuttavia i valori percentuali di cambiamento rimanevano sempre molto alti. Effetti meno marcati, invece, si osservavano per le popolazioni batteriche della rizosfera. Questo effetto nel suolo suggerisce che le popolazioni batteriche delle piante coltivate in presenza di sansa e compost erano in continua evoluzione soprattutto nella prima metà della prova (dopo 120 giorni), periodo durante il quale si osservavano i maggiori effetti da parte di questi substrati sulla crescita della pianta.

Nell'insieme questi dati mettevano in evidenza come suolo e rizosfera provenienti dai differenti substrati da invasatura presentassero soltanto un basso numero di popolazioni batteriche in comune ad indicare chiaramente che sostituendo la torba con scarti di frantoio, specialmente se non compostati, alterava il microbiota del sistema suolo-pianta di suolo. Questi effetti, comunque, erano dovuti solo in parte all'apporto di popolazioni batteriche

esogene provenienti dagli ingredienti utilizzati per la formulazione dei diversi substrati. I valori di similarità tra le comunità presenti negli ingredienti e quelle del suolo prelevato dai rispettivi substrati da invasatura dopo 30 giorni erano, infatti, piuttosto bassi (20,4% e 32,8% nel caso della sansa tal quale e di quella compostata, rispettivamente). Questi effetti erano ancora più evidenti nella rizosfera, dove tali valori di similarità erano ancora più bassi (13,7% e 16% per sansa e compost, rispettivamente).

La valutazione dell'abbondanza dei batteri nei campioni di suolo e rizosfera, effettuata grazie alla quantificazione (qPCR) del numero di copie del frammento genico 16S rRNA, mostrava come l'utilizzo dei diversi substrati da invasatura non avesse effetti deleteri sulla crescita dei batteri (Fig. 27). Al contrario, era possibile apprezzare come, rispetto al controllo con sola torba, la sansa e, in misura minore, il compost, avessero un effetto di stimolazione della crescita batterica. Questi effetti, tuttavia, erano di entità limitata (fino ad un massimo di 50 volte rispetto al controllo) e avvenivano solo nella fase iniziale della prova (fino a 120 giorni nel suolo e 60 giorni nella rizosfera) mentre dopo 270 giorni non c'erano differenze nei diversi substrati.

Le evidenze fin qui esposte dimostravano come l'utilizzo di sansa e compost, al posto della torba nei substrati da invasatura per la coltivazione di piante di olivo, avesse un marcato effetto sulle dinamiche dei batteri nel sistema suolo-pianta. In particolare, il fatto che la sansa tal quale causasse, rispetto alla sansa compostata e specialmente nelle fasi iniziali di coltivazione in vaso, la più evidente alterazione della crescita e della diversità delle popolazioni batteriche di suolo e rizosfera, suggeriva una possibile relazione con il rallentamento osservato nella crescita della pianta.

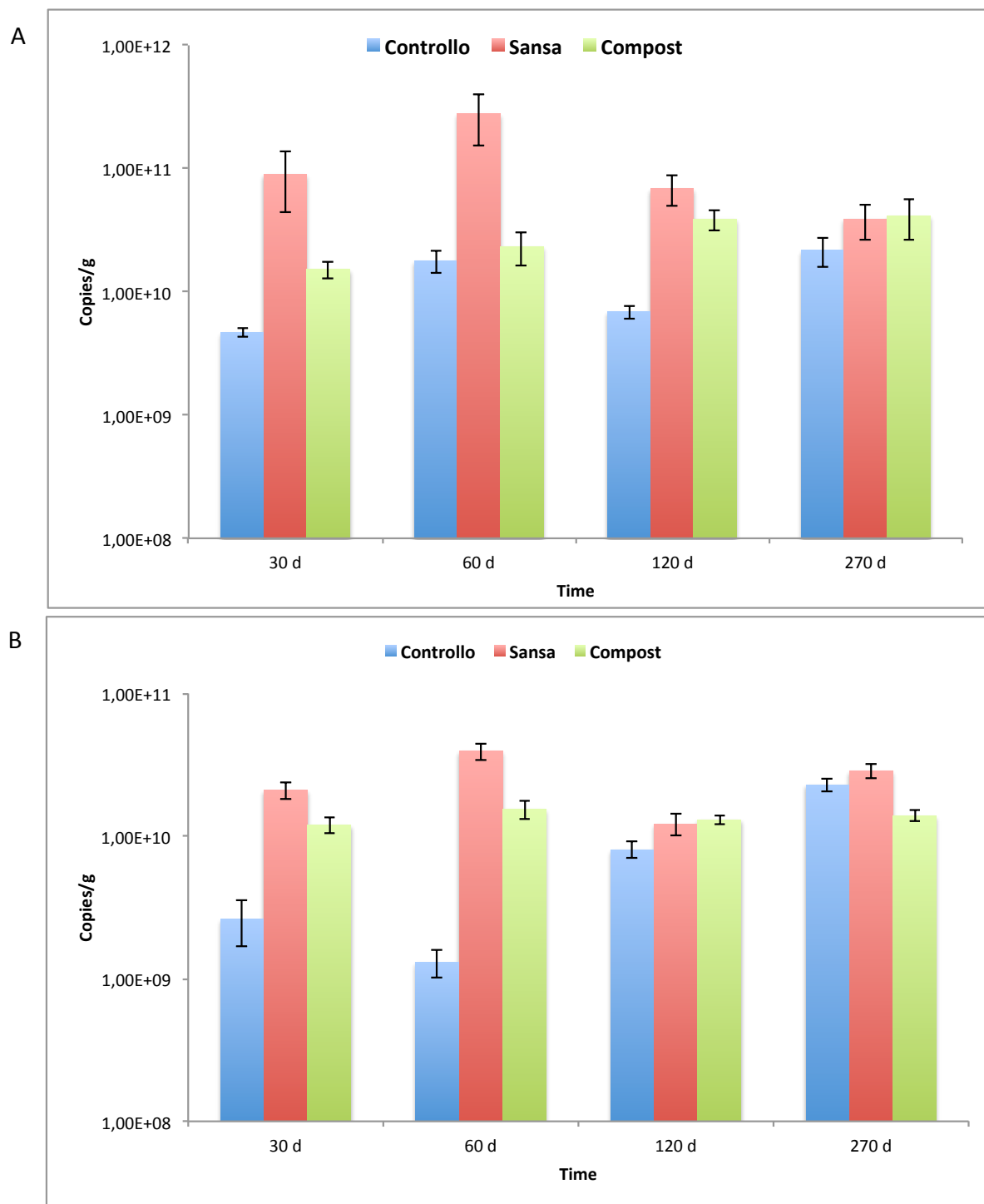


Fig. 27. Abbondanza dei batteri nel suolo (A) e nella rizosfera (B) relativi ai substrati a base di torba (controllo), a base di sansa (Sansa) e a base di compost (Compost) dopo 30, 60, 120 e 270 giorni dall'invasatura.

4.2.3 Effetti sulla composizione della comunità batterica di suolo e rizosfera dopo 30 giorni.

Lo studio degli effetti dei diversi substrati da invasatura sul microbiota dell'ecosistema suolo-pianta, oltre che essere stato affrontato attraverso l'analisi DGGE e qPCR delle dinamiche della comunità batterica, è stato anche approfondito grazie all'utilizzo della metodica del sequenziamento di nuova generazione (NGS) del gene rRNA 16S con tecnologia Illumina. Questo approccio, che negli ultimi anni sta prendendo sempre più campo nell'ecologia microbica, è in grado di fornire informazioni accurate circa l'identificazione tassonomica delle popolazioni microbiche presenti in un dato campione (Claesson et al. 2010). In questa prova in vaso, i dati precedentemente illustrati dimostravano come 30 giorni di coltivazione in substrati da invasatura con il parziale utilizzo di sansa, sia tal quale che compostata, al posto della torba, comportassero forti modificazioni delle comunità batteriche di suolo e rizosfera e come queste, a sua volta, potessero influenzare la crescita della pianta. Sulla base di questa informazione, quindi, sono stati portati avanti degli approfondimenti sulla composizione della comunità batterica nel suolo e nella rizosfera con analisi NGS Illumina per comprendere quali popolazioni batteriche fossero maggiormente modificate dopo 30 giorni dall'inizio della prova.

Dopo il sequenziamento, per ogni campione venivano selezionate in modo casuale 10000 sequenze, alle quali veniva assegnata una identificazione fino al livello tassonomico più basso per il quale era possibile avere nel database RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu>) un livello di *confidence* di almeno il 50%. Per ogni diverso livello tassonomico è, quindi, possibile conoscere l'abbondanza relativa di ogni *taxon*, calcolata sulla base della quantità di sequenze in un determinato campione che venivano assegnate al *taxon* stesso.

In figura 28 sono mostrate le *heat map* relative ai profili di distribuzione dei *taxon* più abbondanti nei ranghi tassonomici di phylum, classe, ordine, e famiglia. Questa elaborazione, oltre che fornire informazioni sull'abbondanza di ciascun *taxon*, permetteva di raggruppare i campioni analizzati in dendrogrammi di similarità, basati sul calcolo delle distanze tra i profili di distribuzione delle popolazioni batteriche presenti nei diversi campioni. Da questi risultati si evinceva che effetti molto marcati sulla biodiversità erano evidenti quando veniva utilizzata la sansa, mentre tra controllo e substrato contenente il compost paté erano presenti differenze più basse. Inoltre, non si osservavano differenze nei due comparti del suolo e della rizosfera.

A livello di *phylum*, come illustrato nelle figure 29 e 30, il gruppo più abbondante in assoluto ed indipendentemente dal trattamento, era costituito dai *Proteobacteria*.

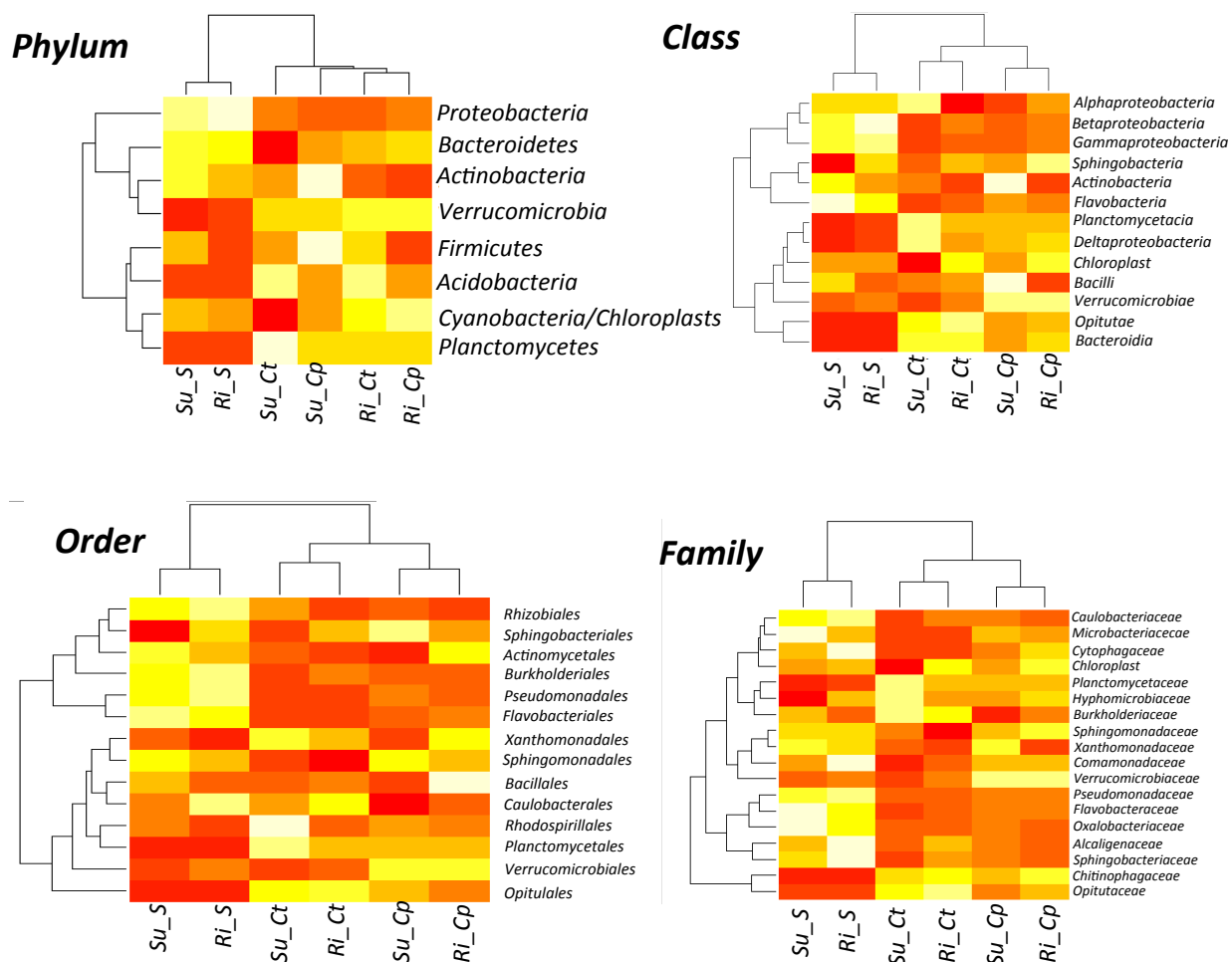


Fig. 28. Heat maps relative ai profili di distribuzione dei *taxon* più abbondanti nei ranghi tassonomici di *phylum*, classe, ordine, e famiglia e dendrogrammi basati sul calcolo delle distanze di Bray-Curtis tra i profili di distribuzione delle popolazioni batteriche presenti dopo 30 giorni nei campioni di suolo (Su) e rizosfera (Ri) relativi al substrato controllo (Ct), a base di sansa (S) e a base di compost (Cp).

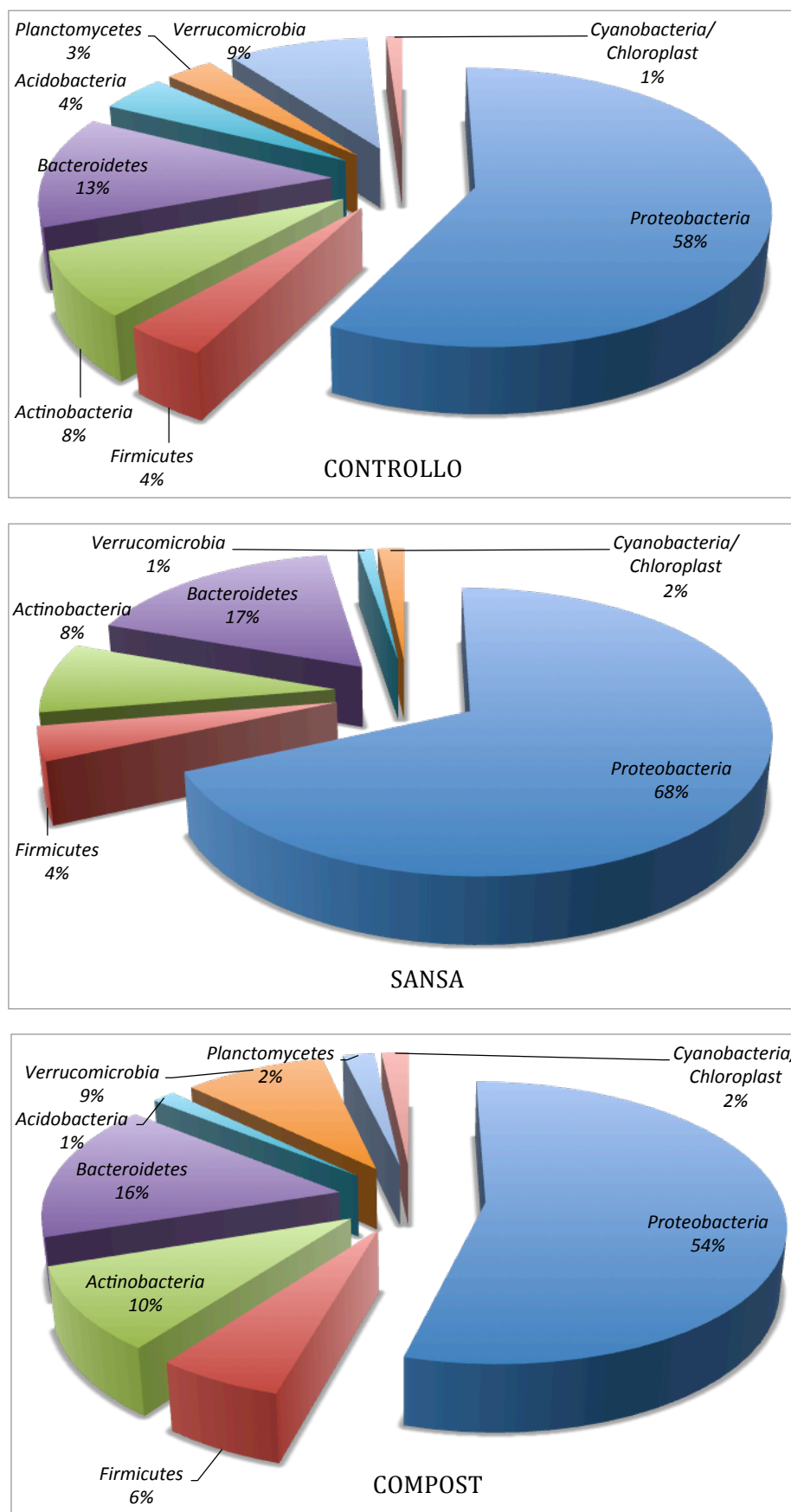


Fig. 29. Distribuzione dei Phyla batterici più abbondanti nel suolo dopo 30 giorni

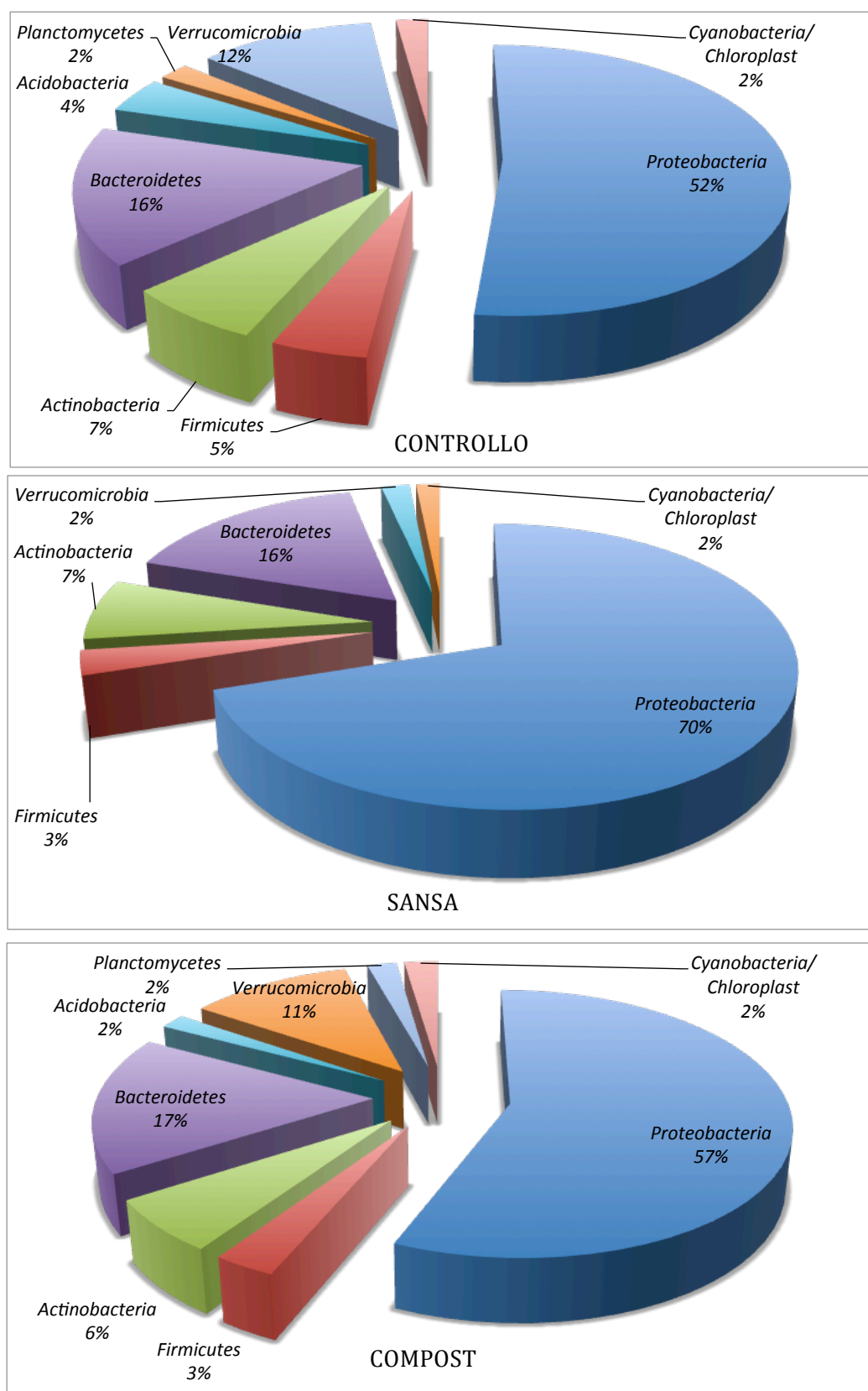


Fig. 30. Distribuzione dei Phyla batterici più abbondanti nella rizosfera dopo 30 giorni

Questi presentavano, infatti, nei vasi controllo un'abbondanza relativa del 58% e 52% nel suolo e nella rizosfera, rispettivamente. La presenza della sansa tal quale all'interno del substrato da invasatura causava un incremento di questo gruppo che raggiungeva valori pari al 68% nel suolo e al 70% nella rizosfera. Quando la sansa, invece, veniva utilizzata dopo compostaggio, questi valori tornavano ad essere molto simili a quelli dei vasi controllo (54% e 57% per suolo e rizosfera rispettivamente).

Dopo il *taxon* dei *Proteobacteria*, i gruppi più abbondanti erano i *Bacteroidetes*, i *Firmicutes*, gli *Actinobacteria*, i *Verrucomicrobia*, gli *Acidobacteria*, i *Planctomycetes* ed in ultimo anche il gruppo dei *Cloroplasti/Cianobacteria*.

E' interessante notare che i *Verrucomicrobia* subivano una drastica riduzione quando la sansa pat  veniva utilizzata, passando, rispetto al controllo, dal 9% all'1% e dal 12% al 2% nel suolo e nella rizosfera rispettivamente. Tuttavia, quando la sansa veniva compostata questi valori tornavano ad essere simili a quelli del controllo (9% e 11% per suolo e rizosfera, rispettivamente). Inoltre, l'effetto della sansa tal quale era evidenziato anche dal fatto che *Acidobacteria* e *Planctomycetes*, gi  poco abbondanti nei campioni controllo, divenivano completamente assenti in questi substrati da invasatura.

I phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Chloroplast/Cianobacteria* non erano influenzati dalla composizione del substrato di invasatura, come dimostrato dai valori di abbondanza relativa piuttosto simili nei tre trattamenti.

Anche a livello di ordine (Fig. 31) si poteva osservare come gli effetti dati dai diversi substrati da invasatura fossero molto simili nel suolo e nella rizosfera e come molte popolazioni fossero stimulate dall'impiego della sansa, mentre altre ne fossero inibite.

Gli ordini *Burkholderiales*, *Flavobacteriales* e *Pseudomonadales* subivano un forte incremento quando vi era la sansa tal quale all'interno del substrato da invasatura, mentre l'effetto opposto si osservava per le *Rhodocyclales*, le *Sphingobacteriales*, le *Xanthomonadales*, le *Rhodospirillales* e le *Planctomycetales*, le quali venivano fortemente inibite dall'aggiunta di sansa. In altri casi pi  estremi, invece, come quello delle *Opitulales*, la sansa aveva un effetto talmente inibitorio che questa popolazione scompariva.

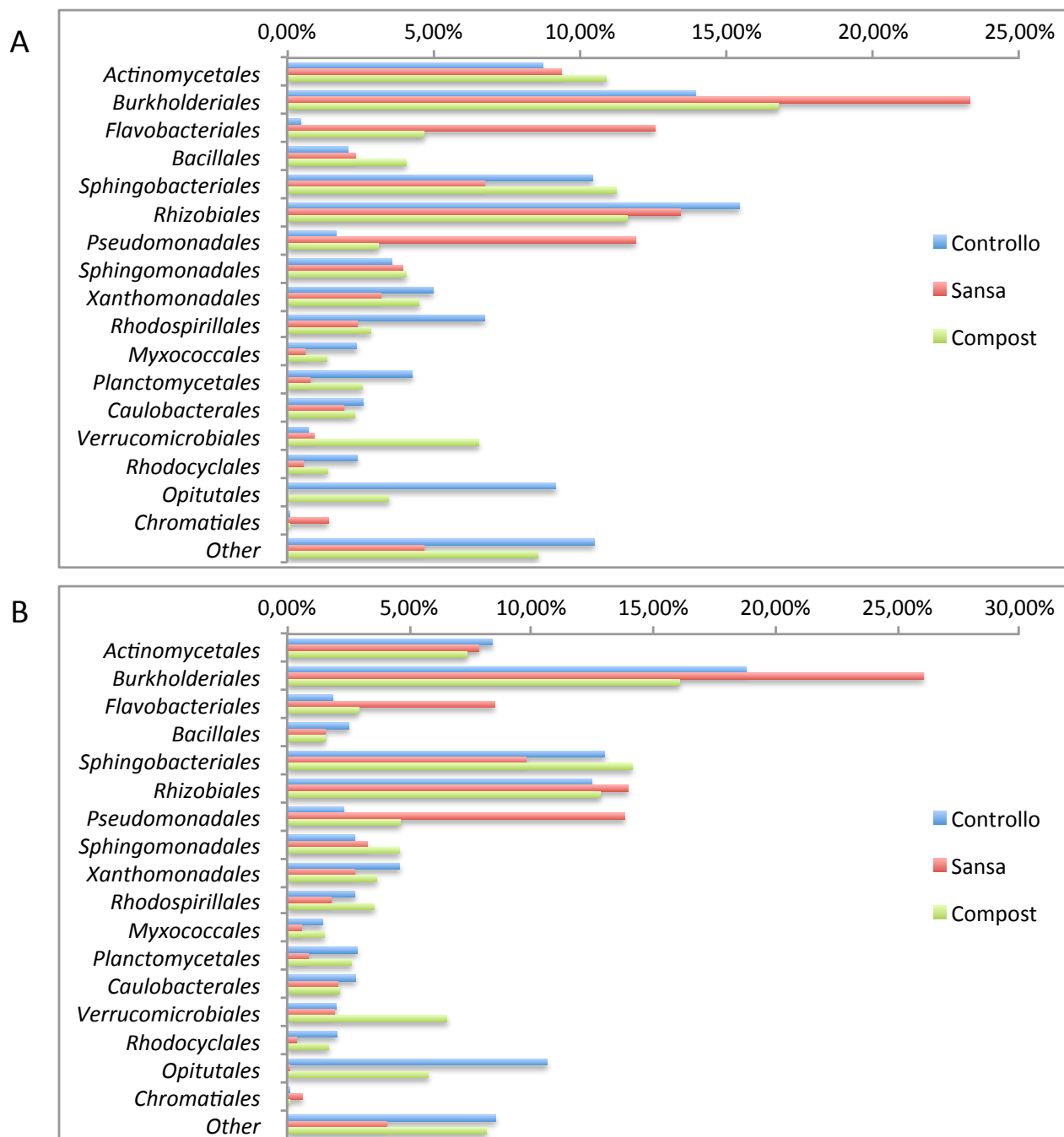


Fig. 31. Distribuzione degli ordini batterici più abbondanti nel suolo (A) e nella rizosfera (B).

Quando il compost di sansa veniva utilizzato in sostituzione della torba, invece, si osservavano degli effetti molto simili a quelli prodotti dal substrato controllo, come ad esempio nel caso delle *Pseudomonadales*, delle *Sphingobacteriales*, delle *Xanthomonadales*, e delle *Burkholderiales*. Nel caso invece delle *Flavobacteriales*, il compost aveva un effetto di stimolazione rispetto al controllo anche se questo risultava essere molto inferiore a quello prodotto dalla sansa tal quale, mentre per le *Verrucomicrobiales* il compost risultava essere la matrice maggiormente stimolante sia rispetto al controllo che rispetto alla sansa.

All'interno della classe dei *Betaproteobacteria*, le famiglie più abbondanti erano date dalle *Oxalobacteriaceae*, dalle *Burkholderiaceae* e dalle *Comamonadaceae* e dalle *Alcaligenaceae*. (Fig. 32). In particolare, le *Oxalobacteriaceae* e le *Alcaligenaceae* erano stimolate dalla sansa mentre per i vasi controllo e quelli con compost si osservavano delle abbondanze inferiori e simili tra loro. Le *Comamonadaceae* invece erano più abbondanti nei substrati contenenti le matrici sansa tal quale e compostata rispetto alle piante controllo.

All'interno della classe dei *Gammaproteobacteria*, le famiglie maggioritarie erano rappresentate dalle *Pseudomonadaceae*, le quali erano maggiormente stimolate dalla sansa pat  tal quale; le *Xanthomonadaceae* invece, erano particolarmente inibite da questo trattamento, mentre abbondanze simili si riscontravano nelle piante controllo ed in quelle coltivate in presenza di sansa tal quale compostata (Fig. 33).

Per quanto riguarda la classe degli *Alphaproteobacteria* tra le famiglie pi  abbondanti si trovavano le *Sphingomonadaceae*, le *Hyphomicrobiaceae* e le *Caulobacteriaceae* che presentavano valori di abbondanza simili tra le tre tipologie di substrato da invasatura (Fig. 34). All'interno di questa classe si trovavano anche le *Rhizobiaceae* che erano notevolmente stimolate dalla presenza di sansa tal quale.

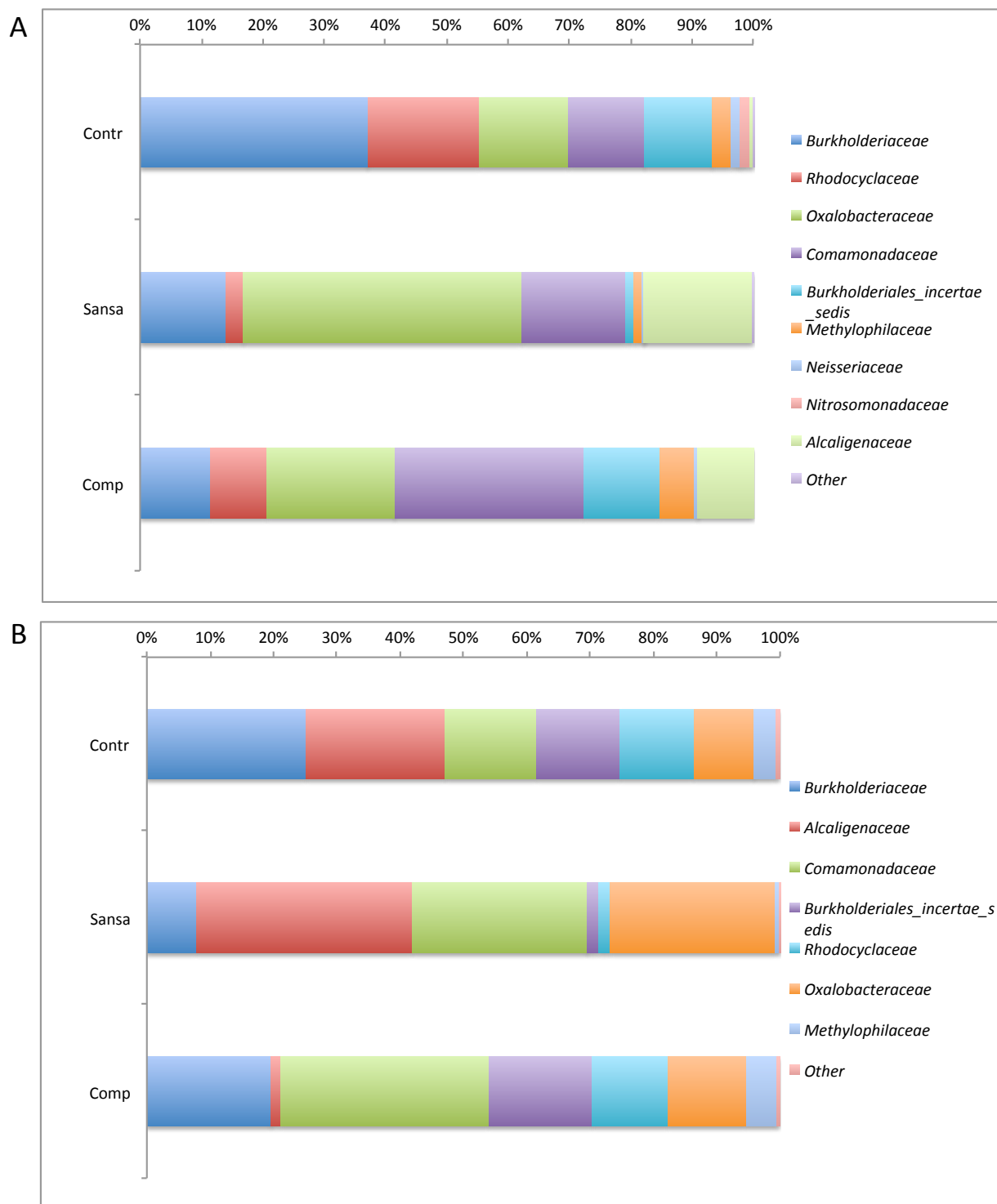


Fig. 32. Distribuzione delle famiglie più abbondanti, appartenenti alla classe *Betaproteobacteria*, presenti nel suolo (A) e nella rizosfera (B).

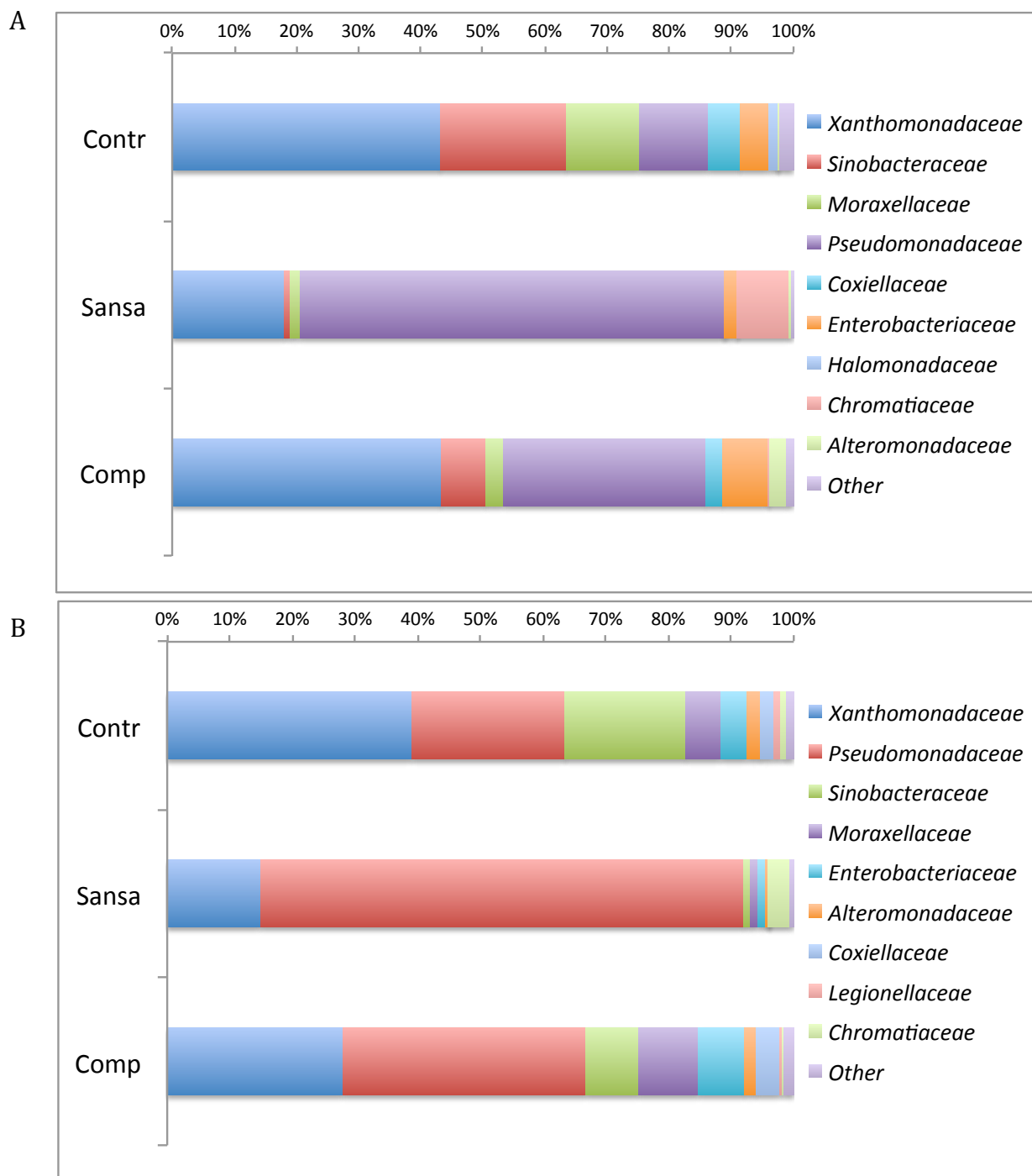


Fig. 33. Distribuzione delle famiglie più abbondanti, appartenenti alla classe *Gammaproteobacteria*, presenti nel suolo (A) e nella rizosfera (B).

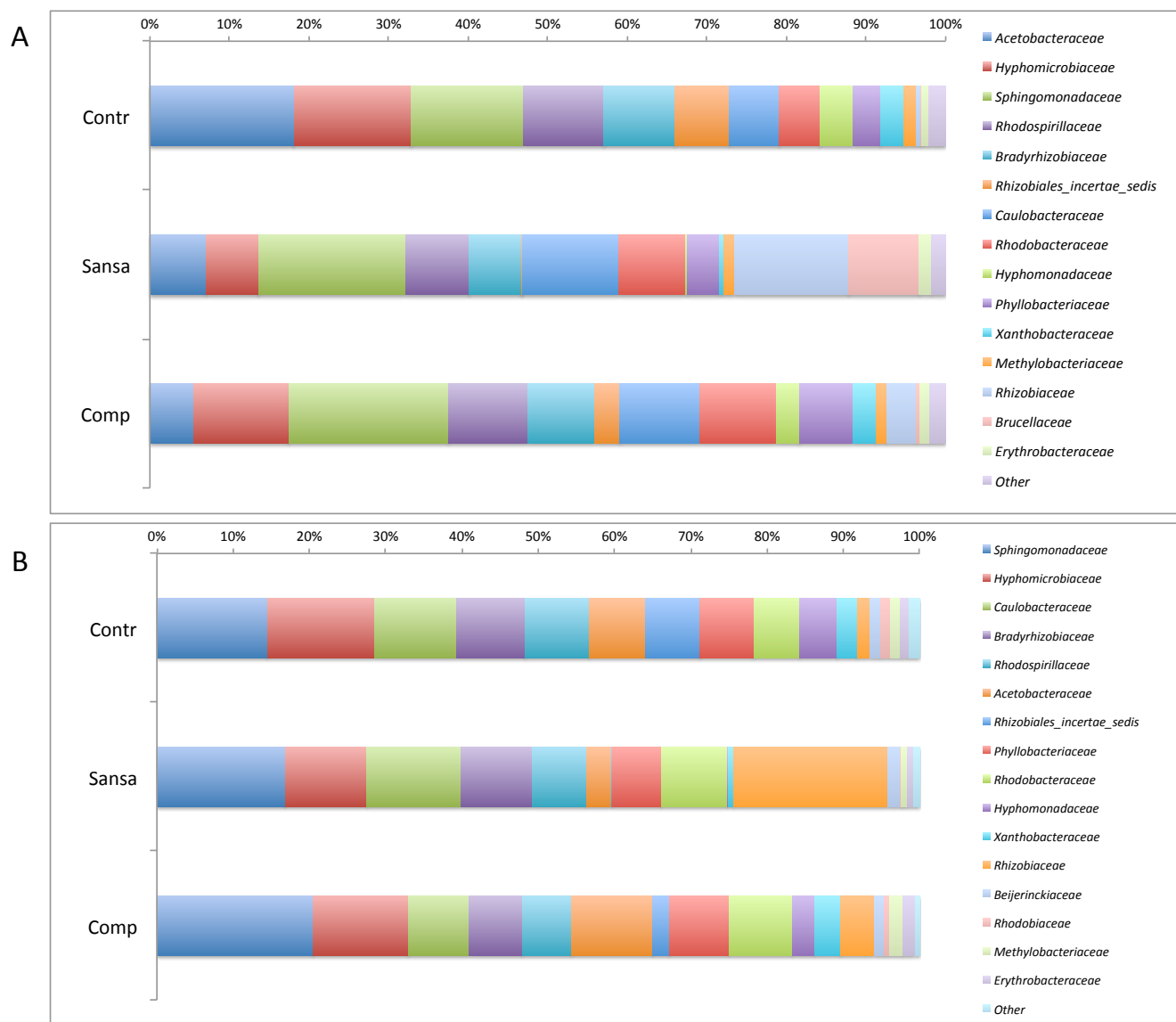


Fig. 34. Distribuzione delle famiglie più abbondanti, appartenenti alla classe *Alfaproteobacteria*, presenti nel suolo (A) e nella rizosfera (B).

La classe dei *Bacteroidetes* (Fig. 35) presentava, invece, tra le famiglie più abbondanti, le *Chitinophagaceae*, le *Sphingobacteriaceae*, le *Flavobacteriaceae* e le *Cytophagaceae*. Mentre queste ultime insieme alle *Sphingobacteriaceae* presentavano dei valori piuttosto simili in tutte le tesi, le *Chitinophagaceae* venivano fortemente inibite dalla sansa tal quale, presentando abbondanze simili nel controllo e nelle piante coltivate con compost pat . Al contrario, le *Flavobacteriaceae* erano stimulate dalla sansa pat  tal quale, mentre valori pi  bassi e tra loro simili erano quelli relativi alle altre due tesi.

Infine la classe delle *Verrucomicrobia* (Fig. 36) era dominata essenzialmente dalle famiglie delle *Opitutaceae* e da quella delle *Verrucomicrobiaceae*. In particolare, le *Opitutaceae*, che erano la famiglia di *Verrucomicrobia* predominante (80% di questa classe) nelle piante controllo, venivano drasticamente ridotte quando la sansa tal quale sostituiva parzialmente la torba, fino a scendere al di sotto del 2% nella rizosfera, e a scomparire totalmente nel suolo. In questi campioni la famiglia predominante diventava, quindi, quella delle *Verrucomicrobiaceae*. Nei vasi con compost pat  si instaurava una situazione intermedia in cui le due famiglie avevano abbondanze abbastanza simili, con una leggera predominanza di *Verrucomicrobiaceae* (65% e 53% nel suolo e nella rizosfera rispettivamente).

Scendendo a livello di genere, ed in particolare analizzando i generi che componevano le famiglie pi  abbondanti sopra descritte, era possibile apprezzare le differenze apportate dalle sansa tal quale e dopo compostaggio, che si notavano nei ranghi superiori. All'interno delle *Alcaligenaceae*, tra i generi pi  abbondanti si trovava *Kerstersia*, il quale mostrava un'abbondanza relativa pari al 36% circa nella rizosfera delle piante controllo, mentre veniva drasticamente ridotto quando la sansa tal quale e compostata sostituivano la torba (Fig. 37). A livello del suolo, questo genere mostrava una dinamica differente, essendo presente (25%) soltanto quando la sansa veniva utilizzata a seguito del compostaggio. La sansa compostata, inoltre, stimolava anche il genere *Derxia* nella rizosfera, il quale da solo rappresentava pi  di un terzo (33,33%) dell'abbondanza totale dei generi appartenenti alle *Alcaligenaceae*, mentre nel suolo questo taxon era assente. Il genere *Achromobacter* risultava essere il gruppo pi  abbondante sia nel suolo che nella rizosfera quando la sansa tal quale veniva utilizzata, tuttavia subiva una notevole riduzione quando si utilizzava il rispettivo compost oppure quando soltanto la torba era presente nel substrato da invasatura.

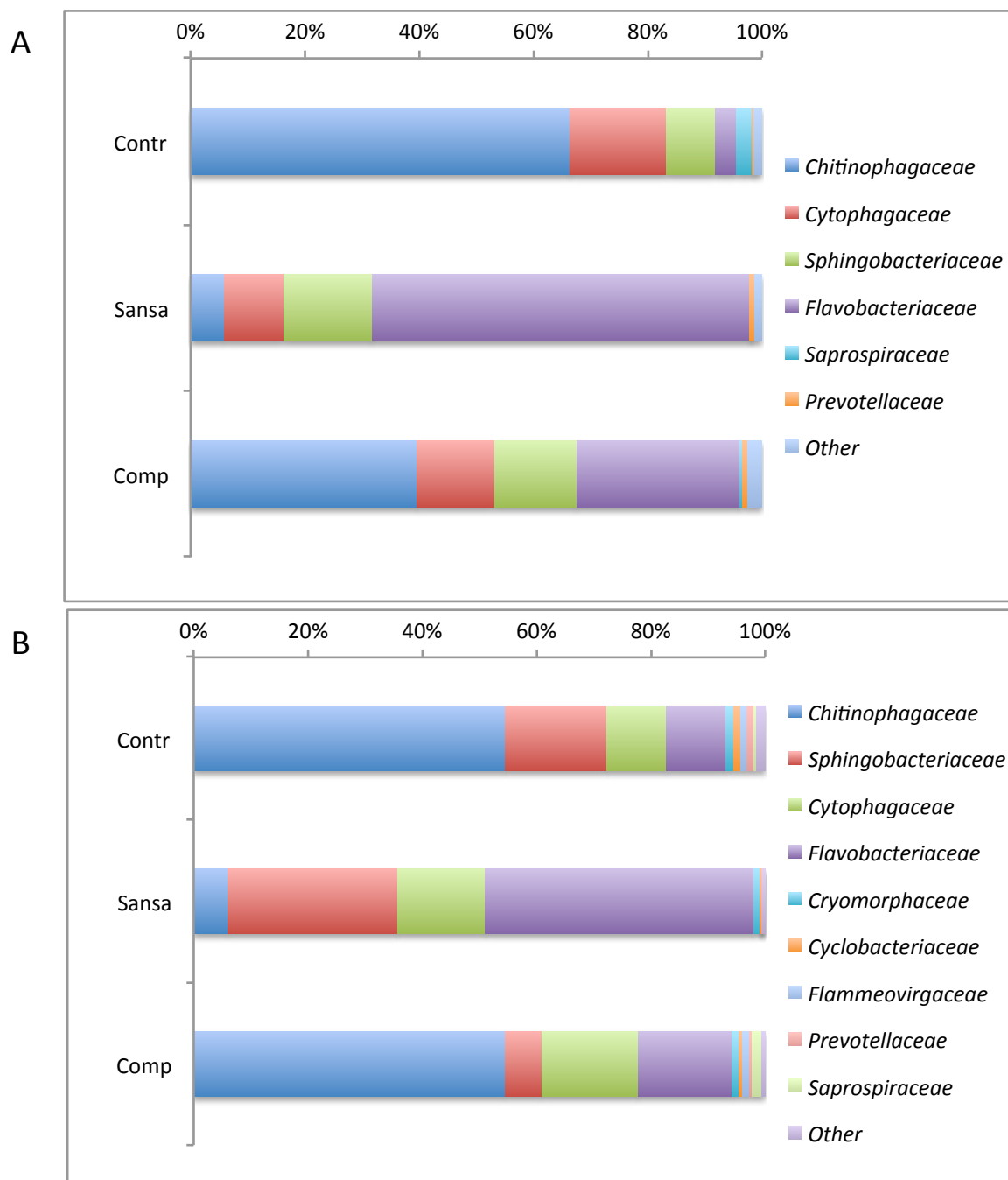


Fig. 35. Distribuzione delle famiglie più abbondanti, appartenenti alla classe *Bacteroidetes*, presenti nel suolo (A) e nella rizosfera (B).

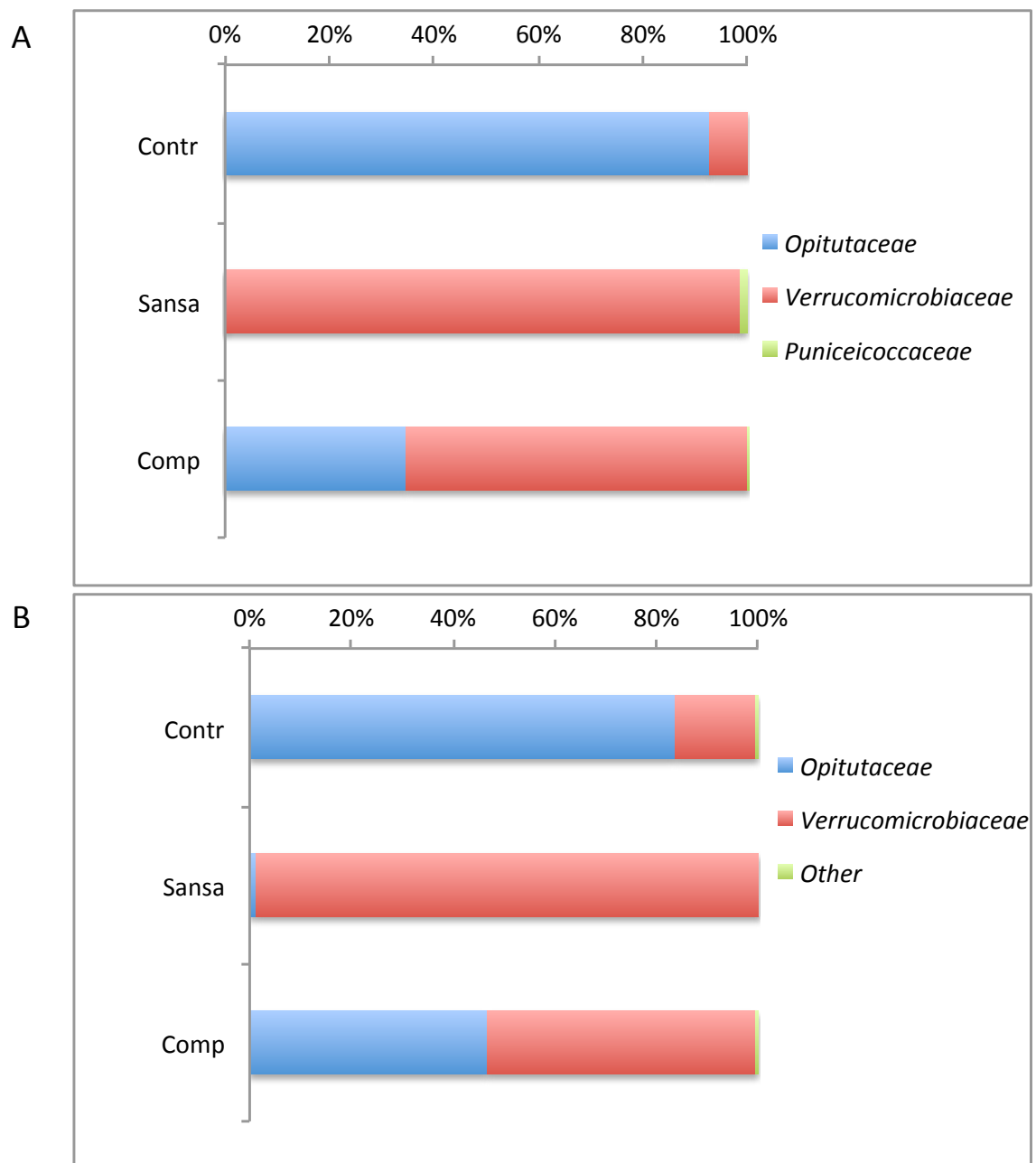


Fig. 36. Distribuzione delle famiglie più abbondanti appartenenti alla classe *Verrucomicrobia* presenti nel suolo (A) e nella rizosfera (B).

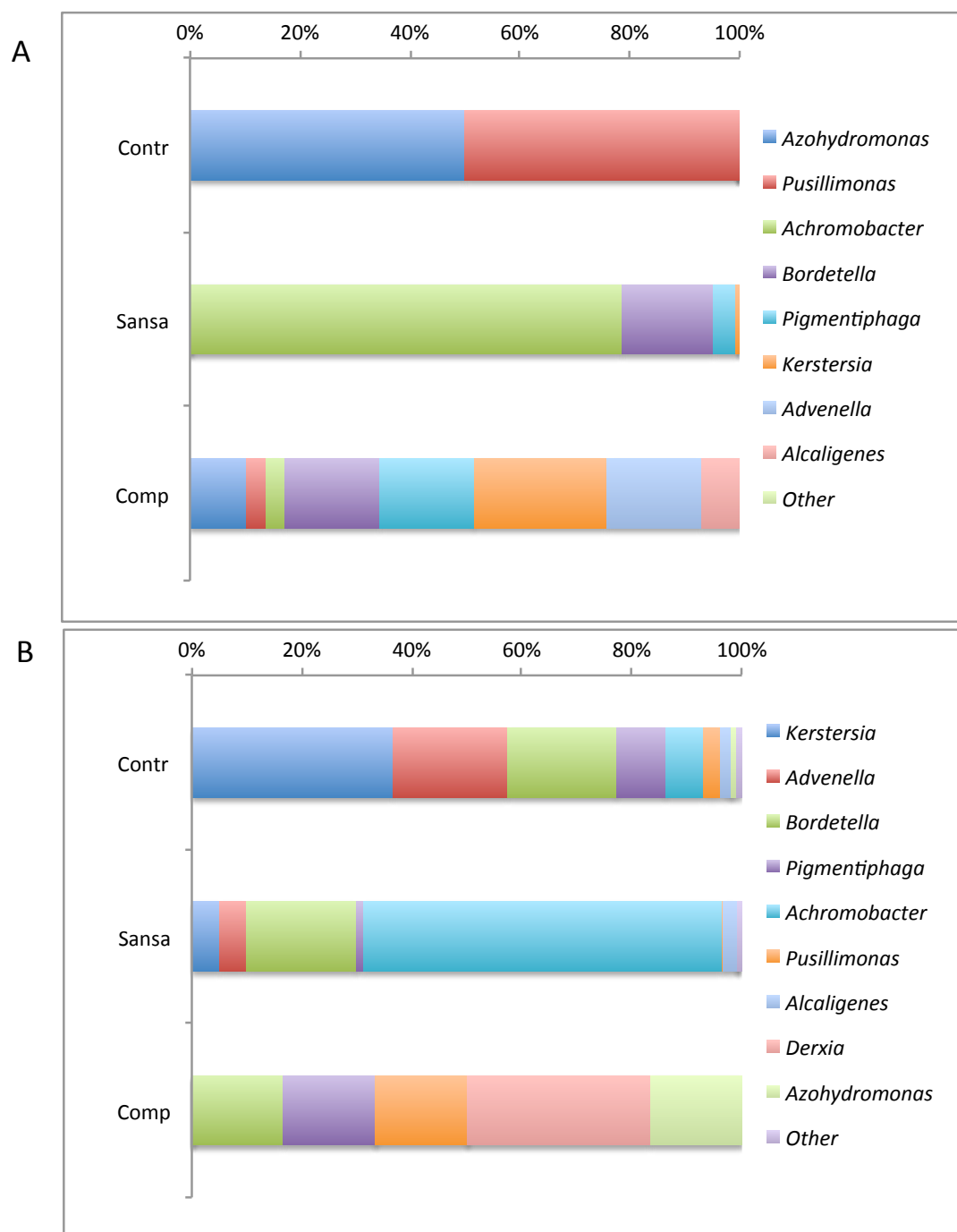


Fig. 37. Distribuzione dei generi più abbondanti appartenenti alla famiglia *Alcaligenaceae* presenti nel suolo (A) e nella rizosfera (B).

Il genere *Bordetella*, invece, era sempre presente a livello della rizosfera indipendentemente dalle tesi con un valore pari al 20% circa, tuttavia questo non accadeva quando si analizzava la biodiversità batterica del suolo, che indicava un'abbondanza pari a circa il 17% soltanto quando la torba veniva rimpiazzata dai due ingredienti, mentre scompariva nelle piante controllo. Queste, infatti, presentavano una struttura batterica costituita soltanto dai generi *Azohydromonas* e *Pusillimonas*, questi ultimi poco abbondanti sia nel suolo delle altre piante come anche in tutte le tesi a livello della rizosfera.

Tra i batteri della famiglia delle *Oxalobacteriaceae*, i generi *Herbaspirillum*, *Massilia* e *Telluria* erano molto abbondanti (Fig. 38). In particolare, il primo era stimolato nella rizosfera e nel suolo delle piante controllo e di quelle coltivate con sansa compostata presentando tutti dei valori che si aggiravano attorno al 34% per il suolo e 45% per la rizosfera, mentre la sansa utilizzata tal quale ne causava una riduzione. Il genere *Telluria* presentava un andamento simile, mentre *Massilia* era presente in tutte le piante, in entrambi i comparti del suolo e della rizosfera, in maniera costante.

Analizzando la composizione della famiglia delle *Burkholderiaceae*, i generi *Burkholderia* e *Ralstonia* erano predominanti (Fig. 39). In particolare, i batteri del genere *Burkholderia* presentavano un'abbondanza superiore all'80% nella rizosfera delle piante controllo, questo valore scendeva significativamente quando la torba veniva sostituita con la sansa tal quale e compostata (12% e 22% rispettivamente). Nel suolo la dinamica di questo genere era simile a quella relativa alla rizosfera anche se nel controllo esso presentava un'abbondanza inferiore, del 49% circa. Il genere *Ralstonia*, invece, era molto abbondante in ogni tesi specialmente nel suolo. In generale, la sostituzione della torba causava nelle *Burkholderiaceae* un aumento della biodiversità sia nel suolo che nella rizosfera, introducendo nuovi generi o causando un incremento di quelli presenti nel controllo in modesta quantità, è il caso ad esempio dei generi *Wautersia* e *Cupriavidus*.

La famiglia delle *Pseudomonadaceae* era dominata quasi esclusivamente dal genere *Pseudomonas* con valori superiori all'80% sia nel suolo che nella rizosfera delle piante coltivate con sansa tal quale, il compostaggio causava una diminuzione di questo valore (70%) nella rizosfera e nel suolo, il quale era molto simile a quello delle piante controllo (Fig. 40).

Similmente a quanto accadeva per le *Pseudomonadaceae*, anche le *Rhizobiaceae* erano essenzialmente dominate da un solo genere: *Rhizobium*, il quale presentava dei valori superiori all'80% nelle piante in cui la torba veniva sostituita dalla sansa, sia tal quale che

compostata (Fig 41). Nel caso in cui solo la torba veniva utilizzata, questi valori scendevano fino al 78% nella rizosfera, e al 43% nel suolo, perché anche i generi *Sinorhizobium* e *Kaistia* erano presenti.

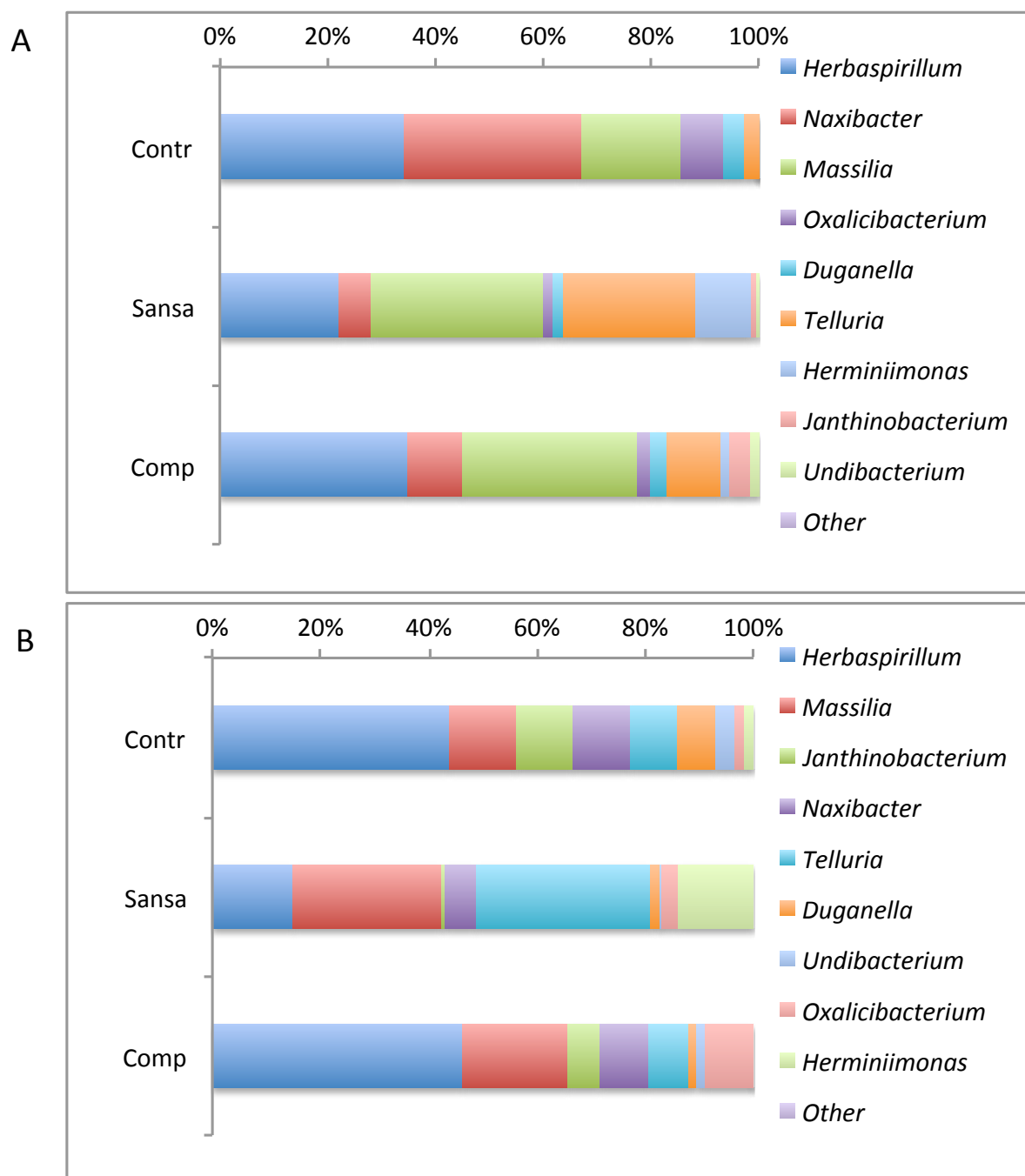


Fig. 38. Distribuzione dei generi più abbondanti appartenenti alla famiglia *Oxalobacteriaceae* presenti nel suolo (A) e nella rizosfera (B).

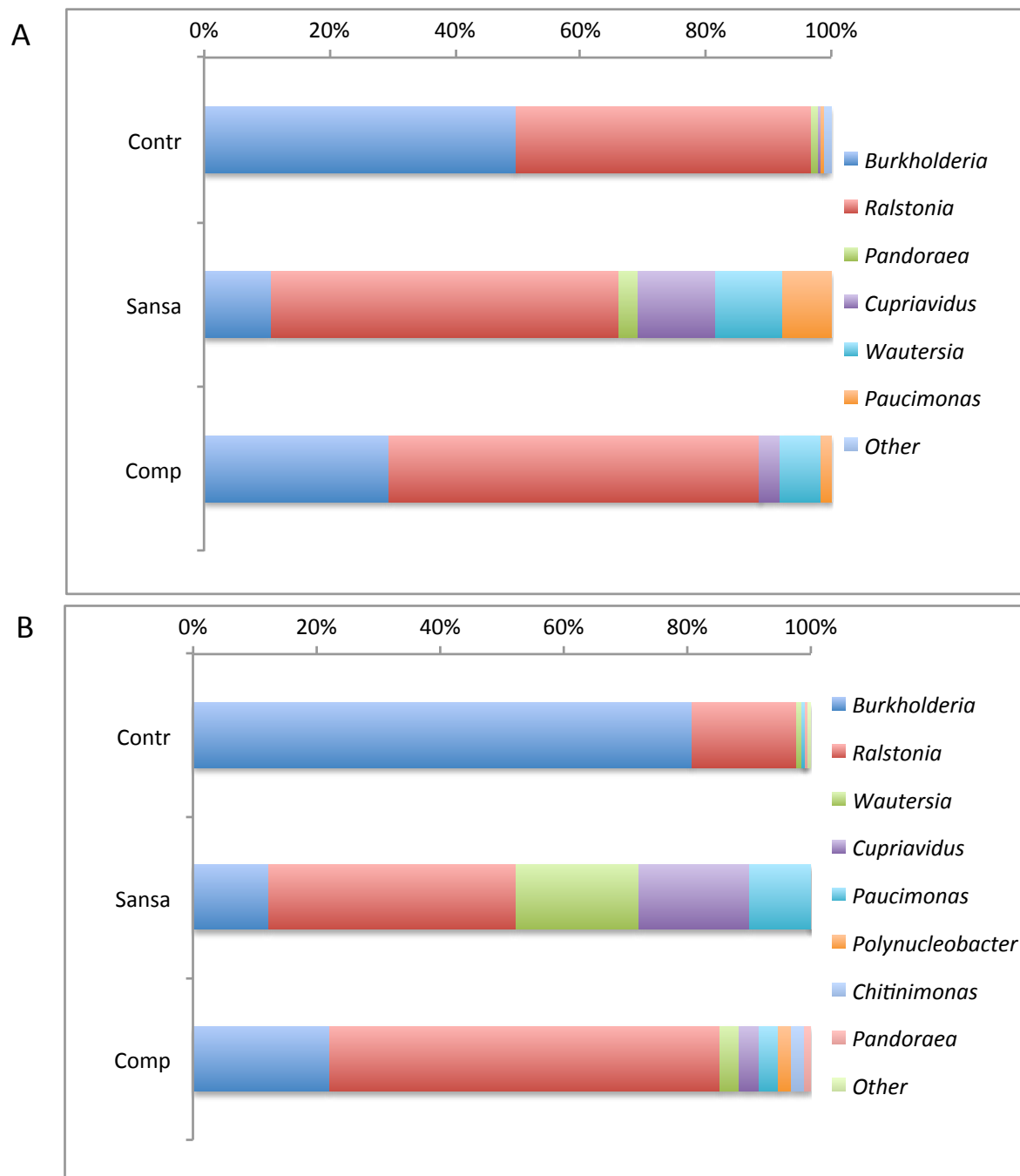


Fig. 39. Distribuzione dei generi più abbondanti appartenenti alla famiglia *Burkholderiaceae* presenti nel suolo (A) e nella rizosfera (B).

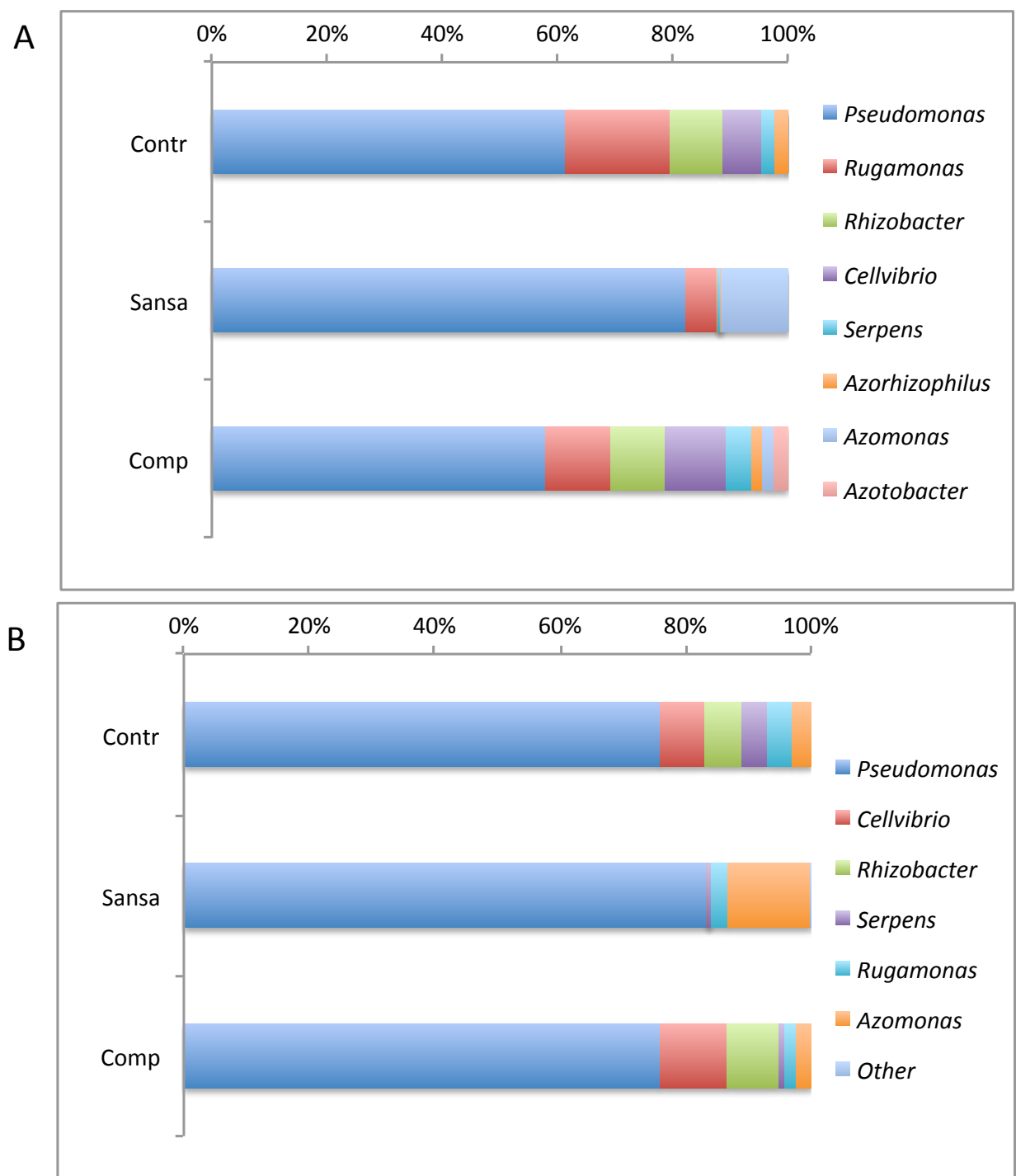


Fig. 40. Distribuzione dei generi più abbondanti appartenenti alla famiglia delle *Pseudomonadaceae* presenti nel suolo (A) e nella rizosfera (B).

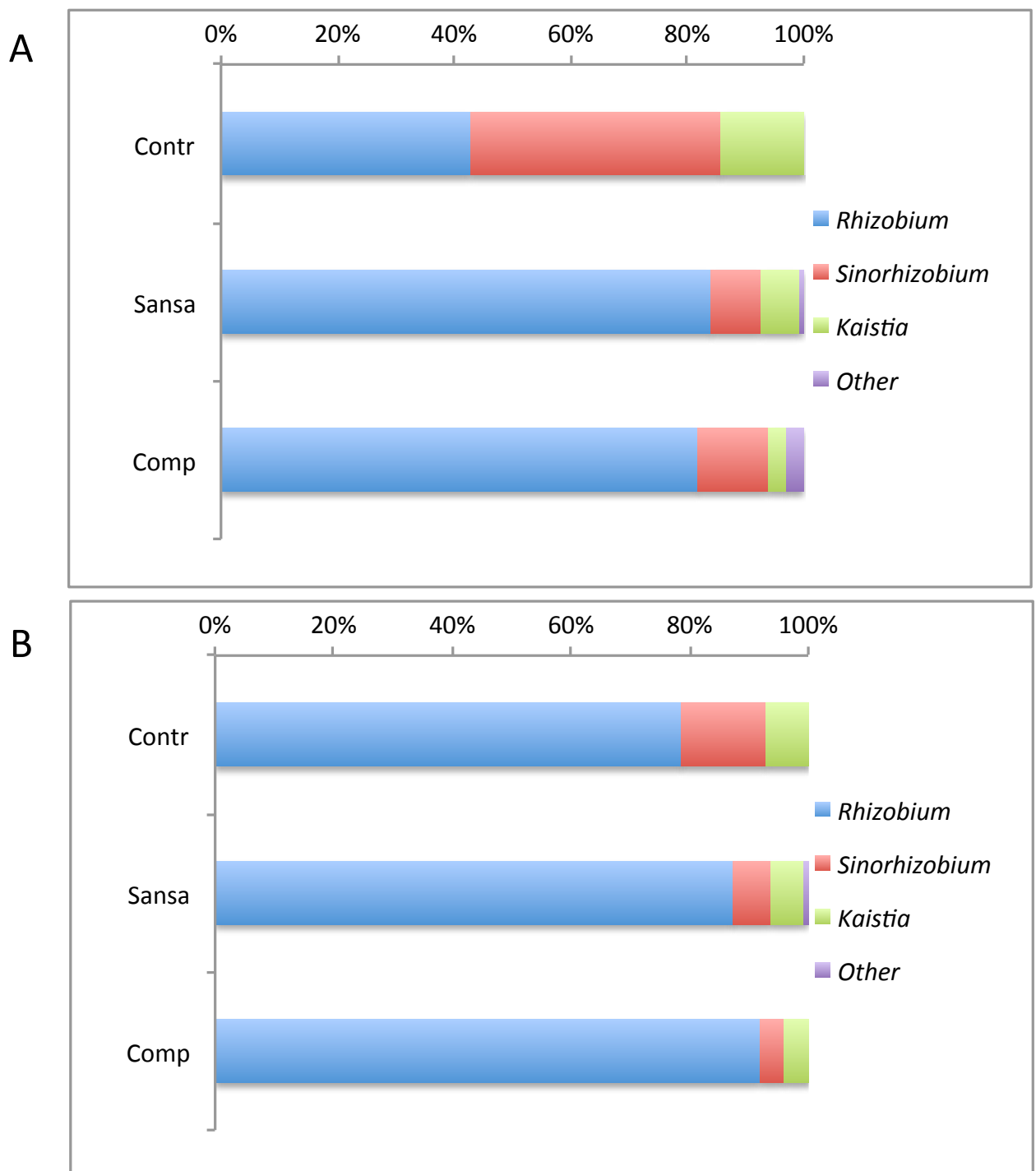


Fig. 41. Distribuzione dei generi più abbondanti appartenenti alla famiglia *Rhizobiaceae* presenti nel suolo (A) e nella rizosfera (B).

Per quanto riguarda la famiglia delle *Flavobacteriaceae*, i generi più abbondanti erano *Flavobacterium* e *Gilvibacter*, (Fig. 42). Il primo, infatti, rappresentava oltre il 90% della comunità batterica di questa famiglia sia nel suolo che nella rizosfera delle piante controllo e

quelle coltivate con sansa compostata, mentre valori notevolmente più bassi (30%) venivano registrati quando la sansa veniva utilizzata tal quale, quest'ultima infatti causava un incremento del genere *Gilvibacter* che negli altri due casi era quasi assente.

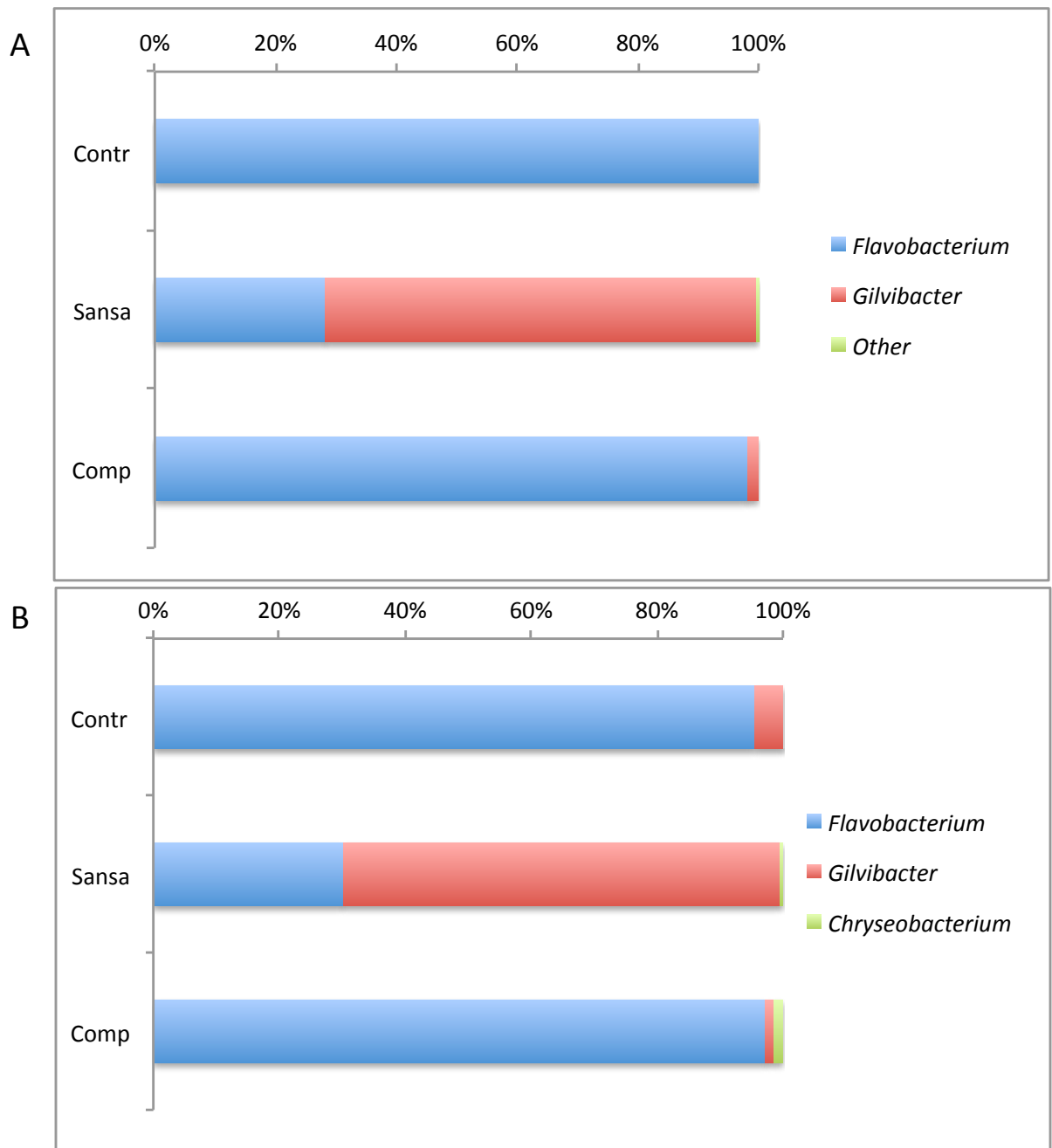


Fig. 42. Distribuzione dei generi più abbondanti appartenenti alla famiglia *Flavobacteriaceae* presenti nel suolo (A) e nella rizosfera (B).

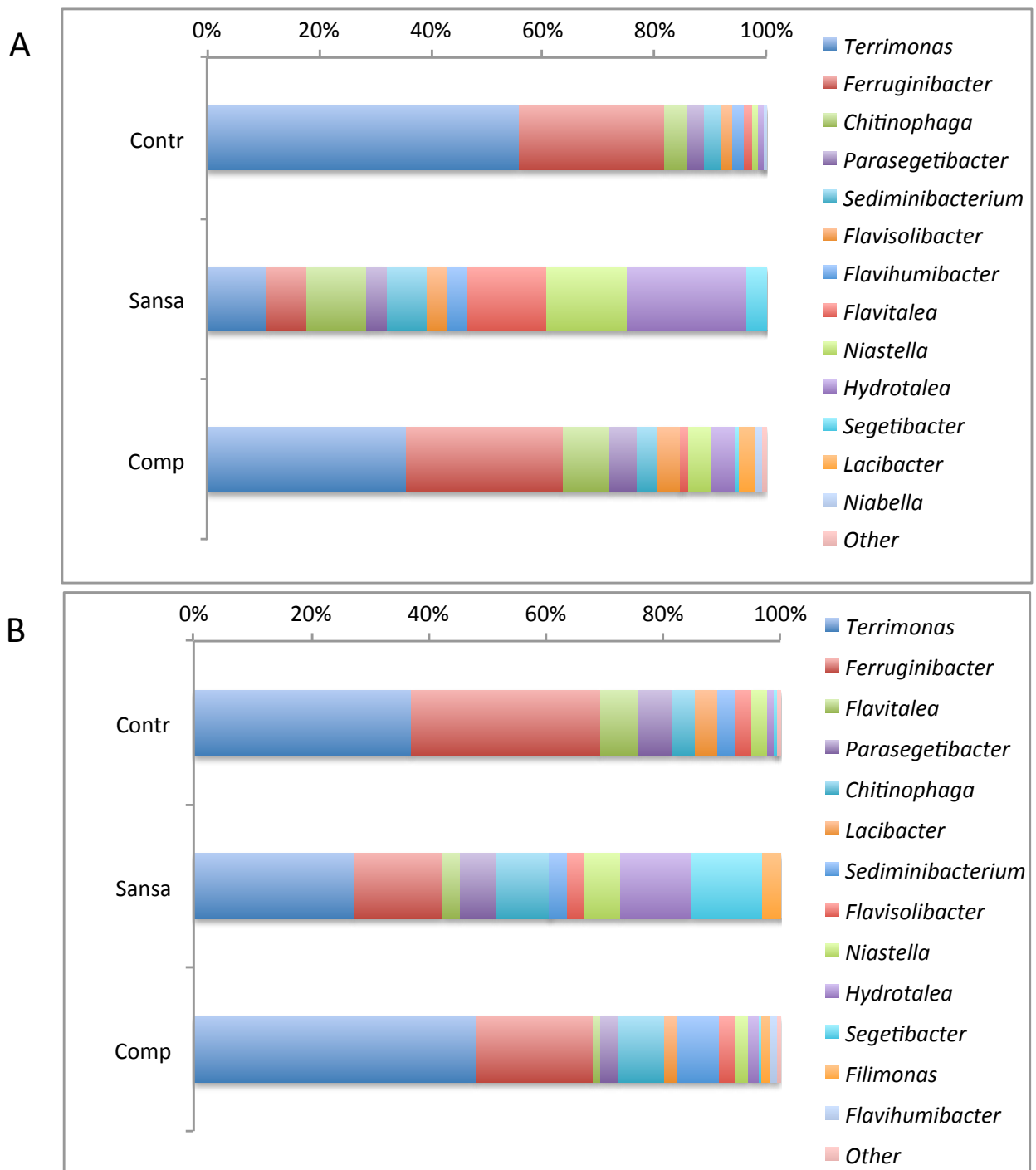


Fig 43. Distribuzione dei generi più abbondanti appartenenti alla famiglia *Chitinophagaceae* presenti nel suolo (A) e nella rizosfera (B).

Le *Chitinophagaceae* erano costituite da una più ampia biodiversità, indipendentemente dal substrato utilizzato, rispetto alle famiglie precedenti, infatti, molti generi erano presenti come *Terrimonas*, *Ferruginibacter*, *Chitinophaga*, e *Hydrotalea* (Fig. 43).

Infine, nelle *Opitutaceae*, il genere *Opitutus* era l'unico rappresentante, il quale, dunque, presentava delle dinamiche identiche a quelle descritte per la famiglia cui appartiene, ovvero veniva fortemente stimolato quando la torba veniva utilizzata da sola o quando era parzialmente sostituita dalla sansa compostata, mentre la sansa tal quale ne causava una drastica riduzione.

4.2.4 Effetti sulle dinamiche della comunità fungina di suolo e rizosfera.

L'analisi DGGE dei funghi presenti nei singoli ingredienti (torba, sansa umida e compost da sansa umida) e nel suolo e rizosfera delle piante coltivate con i substrati da essi derivanti, sono riportate in figura 44, mentre la tabella 16 riporta gli indici ecologici di diversità *Richness* (S), *Shannon-Weaver* (H), *Simpson* (D) e *Evenness* (E).

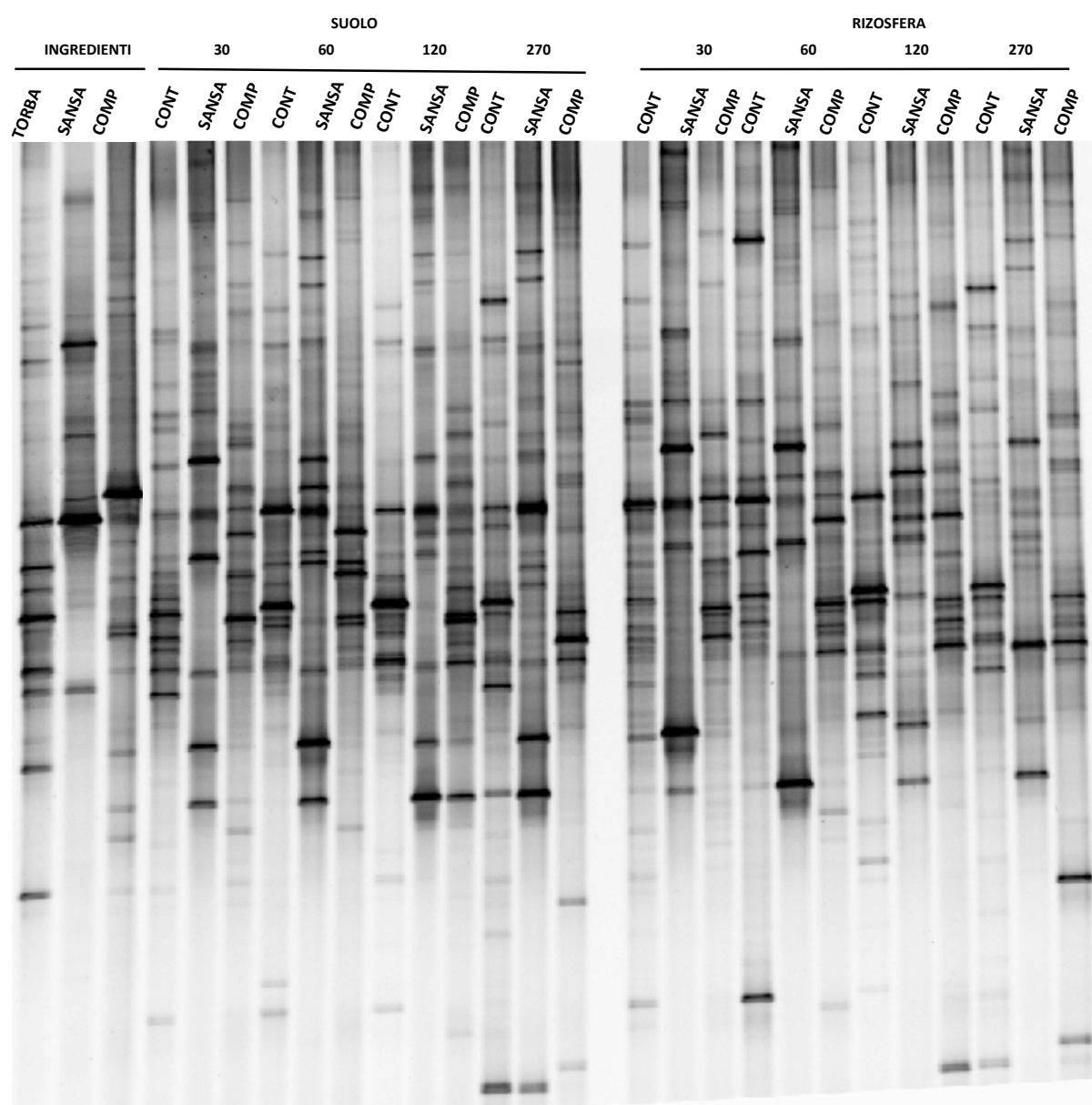


Fig. 44. Fingerprints DGGE delle comunità fungine presenti negli ingredienti utilizzati per la formulazione dei substrati da invasatura (torba, sansa e compost) e nel suolo e nella rizosfera dopo 30, 60, 120 e 270 giorni dall'invasatura con substrati a base di torba (cont), di sansa (sansa) e di compost (comp).

Tab. 16. Indici ecologici di biodiversità ottenuti dall'analisi dei profili DGGE delle comunità fungine presenti negli ingredienti utilizzati per la formulazione dei substrati da invasatura e nel suolo e rizosfera di piante coltivate con substrati a base di torba (ctrl), sansa e compost. *Richness* (S), indice di Shannon-Weaver (H), indice di dominanza di Simpson (D), *Evenness* (E).

COMPARTO	TEMPO	CAMPIONE	Species Richness (S)	Shannon-Wievers index (H)	Simpson Index (D)	Evenness (E)
COMPARTO	INGREDIENTI	TORBA	11	1,460	0,102	0,609
		SANSA	8	1,879	0,171	0,904
		COMPOST	12	2,359	0,107	0,949
SUOLO	30 giorni	CTRL	16	2,669	0,076	0,963
		30% SANSA	14	2,412	0,104	0,914
		30% COMPOST	13	2,449	0,095	0,955
	60 giorni	CTRL	10	2,182	0,125	0,948
		30% SANSA	14	2,510	0,088	0,951
		30% COMPOST	9	2,078	0,135	0,946
	120 giorni	CTRL	8	1,896	0,171	0,912
		30% SANSA	11	2,244	0,124	0,936
		30% COMPOST	9	2,067	0,144	0,941
	270 giorni	CTRL	11	2,285	0,111	0,953
		30% SANSA	14	2,437	0,102	0,923
		30% COMPOST	8	1,939	0,161	0,932
RIZOSFERA	30 giorni	CTRL	16	2,648	0,080	0,955
		30% SANSA	8	2,023	0,138	0,973
		30% COMPOST	10	2,131	0,133	0,926
	60 giorni	CTRL	11	2,215	0,121	0,924
		30% SANSA	7	1,857	0,167	0,954
		30% COMPOST	8	1,954	0,157	0,940
	120 giorni	CTRL	9	2,037	0,143	0,927
		30% SANSA	11	2,280	0,111	0,951
		30% COMPOST	11	2,291	0,110	0,955
	270 giorni	CTRL	10	2,132	0,136	0,926
		30% SANSA	10	2,096	0,145	0,910
		30% COMPOST	7	1,821	0,181	0,936

I singoli ingredienti utilizzati per formulare i substrati da invasatura erano caratterizzati da una differente biodiversità. La torba sembrava avere una ricchezza in popolazioni più elevata rispetto a quella della sansa (S pari a 11 e 8, rispettivamente). Il processo di compostaggio sembrava, similmente a quanto accadeva per i batteri, apportare alla sansa una maggiore *Richness* (12). Anche i valori di H confermavano la stessa indicazione (1,460 e 0,102 per la torba, 1,879 e 0,171 per la sansa e 2,359 e 0,107 per il compost).

L'effetto dell'aggiunta delle due matrici all'interno del substrato si osservava sia per il suolo che per la rizosfera, anche se con modalità diverse. Dopo 30 giorni dall'invasatura le comunità fungine nel suolo con sansa e compost presentavano valori S e H simili al controllo (16 e 2,669, 14 e 2,412, 13 e 2,449, rispettivamente). Tuttavia, l'effetto dell'utilizzo della sansa era evidente da 60 giorni in poi, quando i valori S e H erano sempre superiori a quelli del controllo. Il compost, al contrario, continuava a presentare valori simili a quelli del substrato controllo. I valori dell'indice D confermavano questa evidenza.

L'effetto dei trattamenti sui funghi della rizosfera era, invece, differente: dopo 30 e 60 giorni il substrato da invasatura con sansa sembrava inibire la biodiversità fungina, con valori di S e H che passavano, rispettivamente, da 16 a 8 e da 2,648 a 2,023 (dopo 30 giorni) e da 11 a 7 e da 2,215 a 1,857 (dopo 60 giorni). Come nel caso del suolo, la presenza di compost non sembrava alterare la biodiversità fungina della rizosfera rispetto al controllo.

In entrambi i comparti, l'indice E presentava, invece, valori molto elevati e poco variabili, ad indicare che i trattamenti non pregiudicavano l'uniforme distribuzione delle popolazioni fungine all'interno delle comunità.

I due dendrogrammi di similarità riportati in figura 45 e 46 permettono di comprendere se la sansa e il compost inducessero modificazioni a livello delle strutture delle comunità fungine del suolo e della rizosfera.

Per prima cosa è importante notare come ci fosse una bassa similarità tra le comunità fungine nei singoli ingredienti e quelle dei substrati dopo 30 giorni dall'invasatura (inferiore al 20% nel suolo e inferiore al 9% nella rizosfera). Come nel caso dei batteri, quindi, anche per i funghi possiamo ipotizzare che l'eventuale impatto di sansa e compost sulla struttura della comunità era solo limitatamente ascrivibile alla colonizzazione da parte di popolazioni microbiche presenti negli ingredienti.

Era comunque possibile notare come la presenza di sansa o di compost nel substrato da invasatura avesse, per tutta la durata della prova, un forte impatto sulla comunità fungina del suolo, come dimostrato dai valori di similarità con il controllo sempre inferiori al 35%. Anche alla fine della coltivazione in vaso (270 giorni) le similarità con il controllo si mantenevano basse (27.5 e 31.9% per sansa e compost, rispettivamente) ad indicare una limitata capacità di resilienza dei funghi del suolo, come già osservato nella sperimentazione in campo descritta nei paragrafi precedenti.

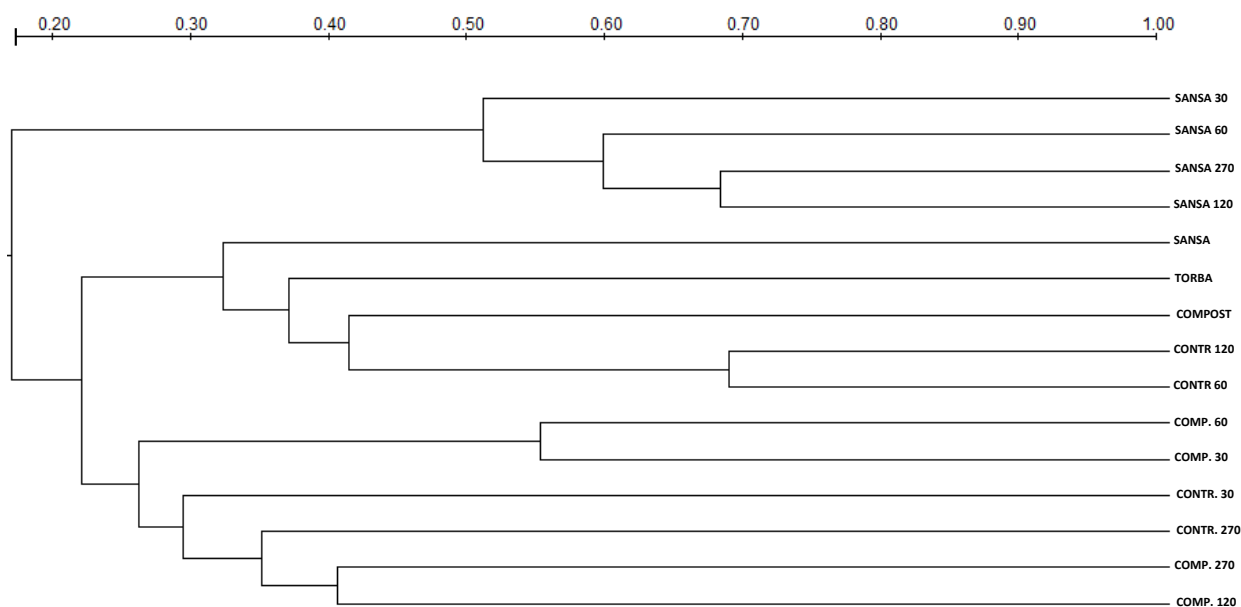


Fig. 45. Dendrogramma generato usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*) dalla matrice di similarità tra le comunità fungine presenti nei singoli ingredienti (torba, sansa e compost) e nei campioni di suolo prelevati dai substrati a base di torba (contr.), sansa (sansa) e compost (comp.) dopo 30, 60, 120 e 270 giorni dall'invasatura.

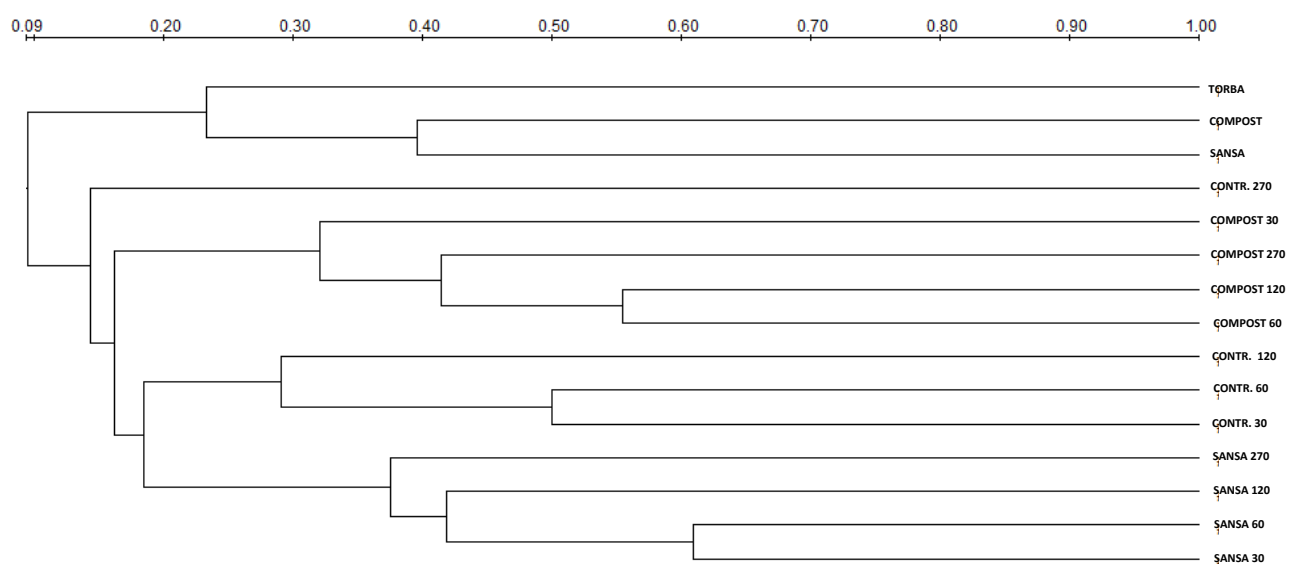


Fig. 46. Dendrogramma generato usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*) dalla matrice di similarità tra le comunità fungine presenti nei singoli ingredienti (torba, sansa e compost) e nei campioni di rizosfera prelevati dalle piante coltivate in substrati a base di torba (contr.), sansa (sansa) e compost (comp.) dopo 30, 60, 120 e 270 giorni dall'invasatura.

Le modificazioni apportate dalla sansa alla comunità fungina del suolo sembravano, inoltre, essere mantenute nel tempo e portare, quindi, a una struttura di comunità che manteneva una certa stabilità, nel proseguo della coltivazione, come indicato dal fatto che i *fingerprint* DGGE relativi a questo trattamento si venivano a raggruppare in un *cluster* distinto nel dendrogramma e avessero una similarità media superiore al 60%. Questa indicazione era anche confermata dalla *moving window analysis* (MWA) riportata in figura 47. Nel primo intervallo considerato (30-60 giorni), infatti, il tasso di cambiamento di questa comunità presentava valori ben più bassi (42,3%) rispetto al controllo (76,4%), che continuavano a rimanere tali nei due periodi seguenti (41,80% tra 60 e 120 giorni e 31,20% tra 120 e 270 giorni). Nel caso del substrato con compost, invece, seppur tale valore fosse basso nel primo periodo (43,7%), tendeva a risalire nei due periodi seguenti (66,5 e 57,8%), ad indicare una maggiore dinamicità della comunità fungina nel suolo di questo substrato.

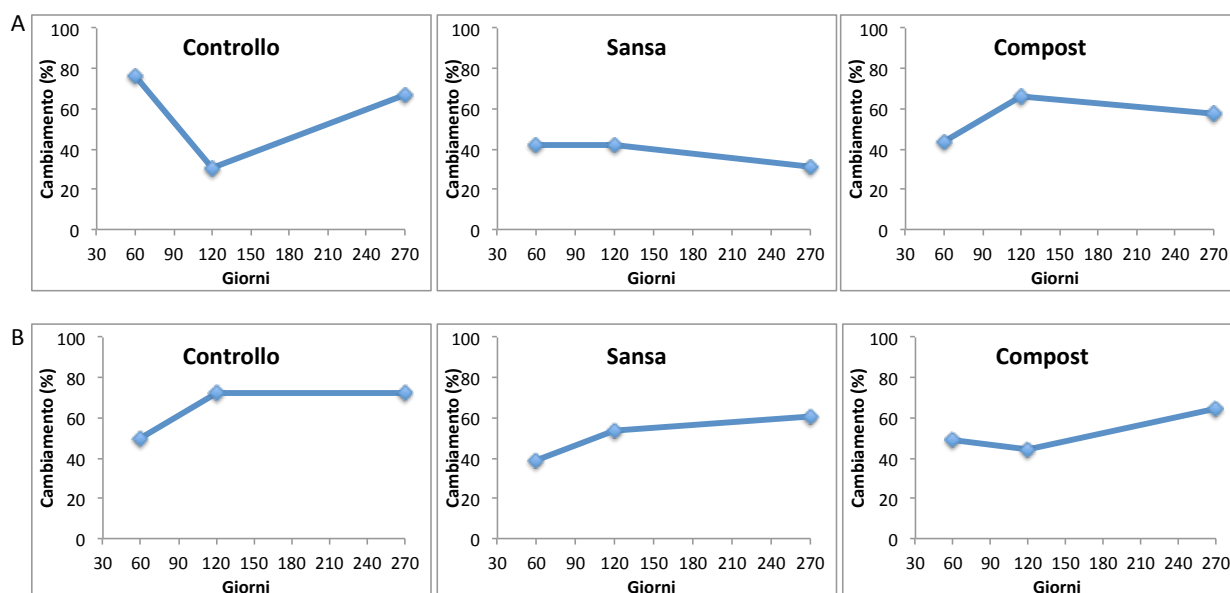


Fig. 47. *Moving window analyses* calcolata in base alle dinamiche delle comunità fungine del suolo (A) e della rizosfera (B) relativi ai substrati a base di torba (controllo), a base di sansa (Sansa) e a base di compost (Compost)

Per quanto concerne la comunità fungina della rizosfera, gli effetti di sansa e compost erano ancora più marcati. La presenza di questi ingredienti, infatti, causava un forte impatto sulla comunità fungina del suolo, come indicato dalla similarità con il controllo che, seppur inizialmente presentasse valori intermedi (41,2 e 33% nella sansa e nel compost, rispettivamente), scendeva nel corso della coltivazione fino a raggiungere valori molto bassi dopo 270 giorni (2,8 e 11,9%). Nella rizosfera, quindi, i funghi mostravano una capacità di

resilienza più bassa rispetto a quanto osservato nel suolo, come già osservato nel paragrafo precedente per i batteri.

I marcati effetti di sansa e compost sui funghi della rizosfera erano, inoltre, confermati dal dendrogramma di similarità, in cui i *fingerprint* che si riferivano delle piante coltivate nei vasi con questi due ingredienti, formavano due *cluster* separati e distinti dai profili dei campioni prelevati dai substrati con torba (Fig. 46). A differenza di quanto osservato per i funghi nel suolo, tuttavia, in questo comparto, la MWA indicava come la dinamicità della comunità non fosse compromessa dall'utilizzo di substrati contenenti ingredienti diversi dalla torba (Fig. 47). In particolare, nel caso dell'utilizzo della sansa il tasso di cambiamento, seppur simile nel primo periodo (38,7% nell'intervallo 30-60 giorni) a quello rilevato nel suolo, tendeva a salire durante la coltivazione (53,8% tra 60 e 120 giorni), raggiungendo nell'ultimo periodo (120-270 giorni) valori molto più elevati (60,9%), seppur inferiori a quelli del controllo (72,4%).

L'analisi quantitativa sull'abbondanza della microflora fungina, eseguita attraverso la quantificazione assoluta (qPCR) delle copie del frammento ITS, confermava i rilevanti effetti causati dalla sostituzione della torba con sansa e compost (Fig. 48). Entrambi gli ingredienti, infatti, non inibivano la biomassa fungina ma, al contrario, la stimolavano. La sansa, in particolare, induceva un forte aumento della crescita fungina sia nel suolo che nella rizosfera durante il primo periodo di coltivazione (30 giorni) con un aumento del numero di copie di circa 1000 volte rispetto al controllo. Questo effetto si manteneva intenso (circa 100 volte più del controllo) per tutto il periodo della sperimentazione, specialmente nella rizosfera. Gli effetti del compost, seppur presenti, erano meno evidenti. La crescita fungina era, infatti, stimolata maggiormente nella rizosfera ma soltanto fino a 60 giorni, dopodiché questo effetto sembrava indebolirsi.

Come già illustrato nel caso delle comunità batteriche, anche nel caso dei funghi le evidenze sperimentali raccolte indicavano che l'aggiunta di sansa e compost nei substrati da invasatura provocava profonde modificazioni delle comunità presenti nel suolo e nella rizosfera delle piante di olivo, mostravano una bassa capacità di resilienza alle modificazioni. Anche in questo caso, la sansa tal quale sembrava indurre, soprattutto nel suolo, effetti più marcati e persistenti rispetto alla sansa compostata. Inoltre, la sansa induceva una forte e persistente stimolazione della crescita dei funghi. Anche in questo caso, quindi, le evidenti alterazioni della crescita e della diversità delle popolazioni fungine suggerivano una possibile relazione con il rallentamento nella crescita della pianta causato dalla sansa.

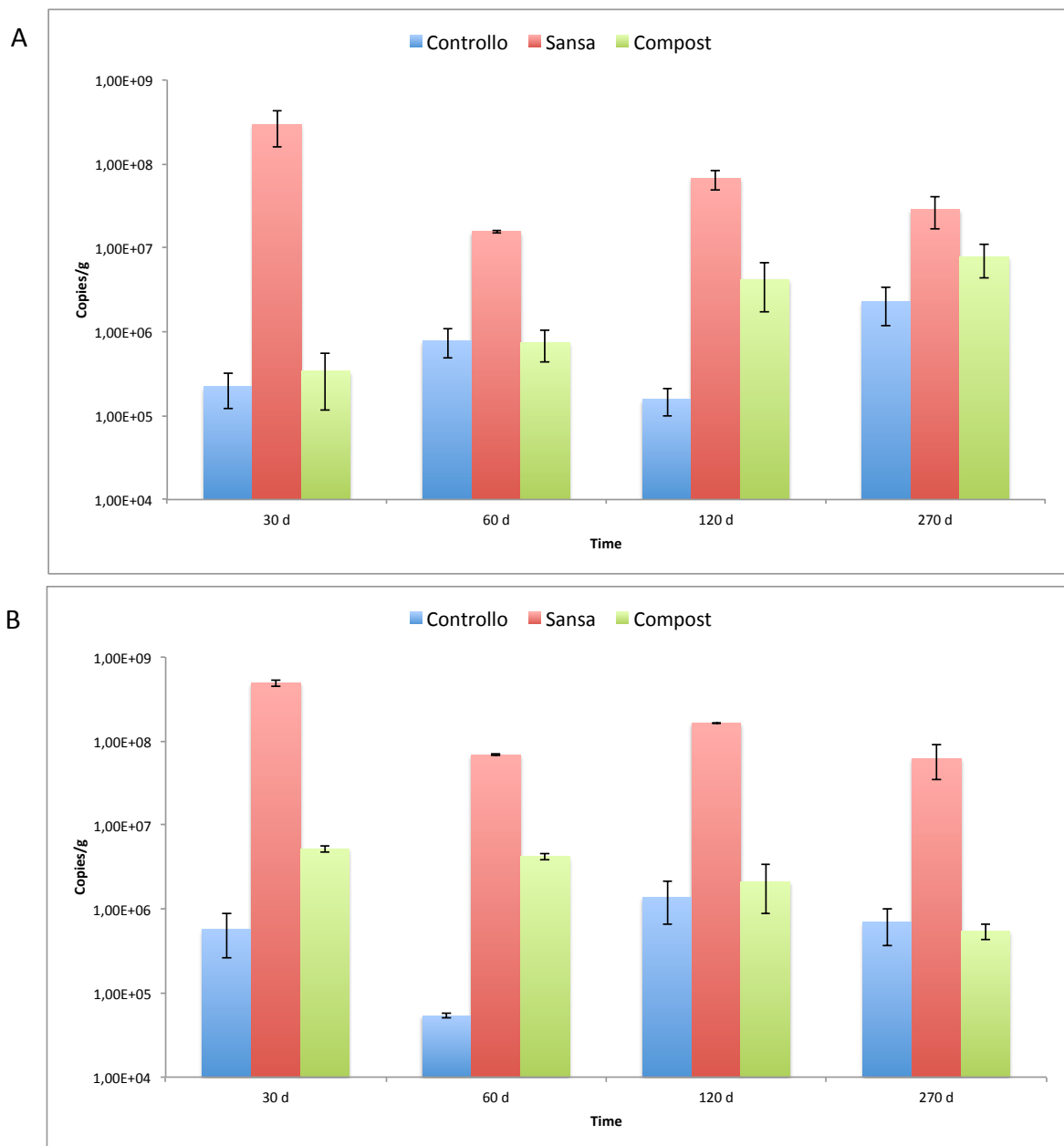


Fig. 48. Abbondanza, espressa come numero di copie del frammento ITS, dei funghi nel suolo (A) e nella rizosfera (B) relativi ai substrati a base di torba (controllo), a base di sansa (sansa) e a base di compost (compost) dopo 30, 60, 120 e 270 giorni dall'invasatura.

4.2.5 Effetti sulla composizione della comunità fungina della rizosfera dopo 30 giorni.

Le analisi DGGE delle dinamiche della comunità fungina, prima illustrate, avevano indicato come questa venisse fortemente modificata, in particolare nella rizosfera, quando sansa e compost sostituivano parzialmente la torba nei substrati da invasatura. Inoltre, nel caso dei batteri, era stato possibile dimostrare come questi effetti fossero più marcati quando la sansa veniva impiegata tal quale che dopo compostaggio. Nel caso dei funghi della rizosfera, tuttavia, le analisi di similarità mostravano che anche il compost aveva un forte effetto sulle struttura della comunità. Con l'obiettivo di approfondire gli effetti di sansa e compost sulla composizione della comunità fungina della rizosfera dopo 30 giorni, ed in particolare di identificare quali fossero le popolazioni fungine coinvolte, è stato, quindi, implementato un approccio coltura-indipendente basato sul clonaggio/sequenziamento del frammento genico del 18S. Per ogni campione di rizosfera relativo a controllo, substrato contenente 30% sansa tal quale e 30% di sansa compostata, è stata costruita una libreria da cui sono stati *screenati* almeno 100 cloni, al fine di rilevare i gruppi di cloni con lo stesso profilo di restrizione. Il frammento 18S del clone rappresentante di ogni gruppo era, quindi, sequenziato e le sequenze ottenute venivano allineate fra loro per individuare le OTU (*operational taxonomic units*), raggruppando sequenze che presentavano fra loro una similarità superiore al 97%. Si sono ottenute, così, un totale di 53 OTU. La sequenza di 530 pb relativa ad ogni OTU, infine, veniva confrontata direttamente con quelle presenti in GeneBank usando BlastN in modo da individuare il “*closest match*”, ovvero la sequenza presente nei database più simile e, quindi, identificare la popolazione fungina corrispondente (Tab. 17). Inoltre, L'albero filogenetico, riportato in figura 49, evidenzia le relazioni filogenetiche tra le popolazioni fungine presenti nei campioni analizzati.

E' possibile, per prima cosa, osservare che la maggioranza delle popolazioni fungine trovate ricadeva all'interno del phylum *Ascomycota* e soltanto una minoranza si suddividevano fra *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* e *Zygomycota*.

E' inoltre evidente come la sansa producesse un impatto sulla biodiversità fungina, in termine di ricchezza di specie diverse, paragonabile a quanto già rilevato dall'analisi degli indici ecologici calcolati dai profili DGGE e illustrati nel paragrafo precedente. Infatti, la comunità fungina della rizosfera appartenente alle piante controllo presentava i valori di *Richness* più elevati (20 OTU) di quella della sansa tal quale (9 OTU). Il substrato contenente sansa

compostata, invece, a differenza di quanto riscontrato con la DGGE, presentava un aumento della biodiversità, con un numero di OTU pari a 30.

OTU	PHYLUM	CLASSE	ORDINE	FAMIGLIA	Closest match	% Identità	Lunghezza (bp)	ACCESSION	Numero di cloni		
									CONTR	SANSA	COMP
1	Ascomycota	Dothideomycetes	Glomerellales	Plectosphaerellaceae	Plectosphaerella sp. s185	94	534	HQ871884	1		
2					Plectosphaerellaceae sp.	99	532	JQ007579	1		
3					Plectosphaerella sp.	96	532	HQ871886			
4					Uncultured Plectosphaerella clone ST4H1	96	534	JQ007579	1		
5			Xylariales	Xylariaceae	Rosellinia necatrix	98	533	AY083805	11		
6			Diaporthales		Diaporthe phaeosolorum	95	532	F1392654	1		
7			Coniochaetales		Coniochaeta mutabilis	99	533	HQ263116		1	
8					Coniochaeta mutabilis	96	531	HQ263116	1		
9			Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium oxysporum	100	529	HQ871889	1	1	
10					Stachybotrys chartarum	96	532	JN939036	1	1	
11					Stachybotrys chartarum	99	531	JN939036	1	17	
12					Stachybotrys chartarum	94	533	KC787690	2		
13		Sordariomycetes	Chaetomiaceae	Thielavia australiensis	98	533	JQ067908		1		
14				Miceliophthora himmlaea	92	532	JQ067909		1		
15				Sordaria fimicola	99	533	AY545724		44		
16				Sordaria macrospora	100	532	AY641007		8		
17			Sordariales	Sordariaceae	Sordaria macrospora	97	530	AY641007		1	
18					Sordaria fimicola	98	532	AY545724			
19					Lasiosphaeria hispida	99	533	JN938616	3		
20					Cercophora caudata	99	532	DQ368659		1	
21			Ophiostomales	Ophiostomataceae	Ophiostoma stenoceras	97	534	F1176850	1		
22			Microascales	Microasaceae, mitosporic Microasaceae	Graphium sp.	97	532	KF542902		1	
23		Sordariomycetidae Inaeete seeds	Annulatascaceae	Asciendous austriacus	97	533	GQ996542		2		
24				Davidiellaceae sp.	95	535	GU250343	7			
25				Davidiellaceae sp.	99	532	GU250343	1			
26				Sparormiaceae	Preussia feniculata	99	532	GU296187		7	
27				Pleosporaceae	Alternaria alternata group	97	534	JN088533		1	
28				Eurotiales	Aspergillaceae	Monascus pilosus	99	532	JN940456		1
29		Eutotiomyces	Trichocomaceae	Sageniella humicola	99	529	GQ169322	4	1		
30				Capronia semilimera	99	534	JN941209		1		
31				Hyaloscypha albobyalina	99	532	EJ940075	9			
32				Albotricha sp.	99	534	JN938732		1		
33		Leotiomycetes	Helotiales	Hyaloscypha aureliella	98	532	EJ940077	1			
34				Ceuthospora sp.	99	532	KF493735	2			
35				Exochalara longissima	97	532	HQ609484	1			
36				Fabrella tsugae	96	532	AF106015		2		
37			Hemiphacidiaceae Helotaceae	Chlorocibaria spathulata	96	534	JN939867		1		
38				Cephalophora sp.	98	524	AB001109		1		
39				Lasiobolus ciliatus	99	533	DQ464532	4			
40				Desmazierella acicola	97	531	AF104341	3			
41		Pezizomycetes	Pezizales	Isidaphanus carneus	94	534	US3380		1		
42	Peziza vesiculosa			99	534	NG_012434		1			
43	Peziza vesiculosa			98	533	NG_012434		1			
44	Rhizina undulata			97	531	U42664		1			
45	-	Sebacinales Agaricomycetes	Slimacomyces isola	94	533	AB620069		2			
46			Prifformospora indica	98	533	AY293147	1				
47			Coprinus comatus	96	532	NG_016488		1			
48			Uncultured Boletaceae	97	532	EF023509	1				
49	Chytridiomycota	-		Rhizoctonia sp.	100	533	FJ515314		3		
50				Rhizophlyctis rosea	99	532	NG_017175		1		
51				Uncultured Jungus clone BAVG18S.21	93	533	HQ404537	1			
52	Zygomycota	-		Mortierella lignicola	97	532	HQ667510	1			
53				Uncultured Jungus clone KAVG1118S.16	97	530	JN863193		1		

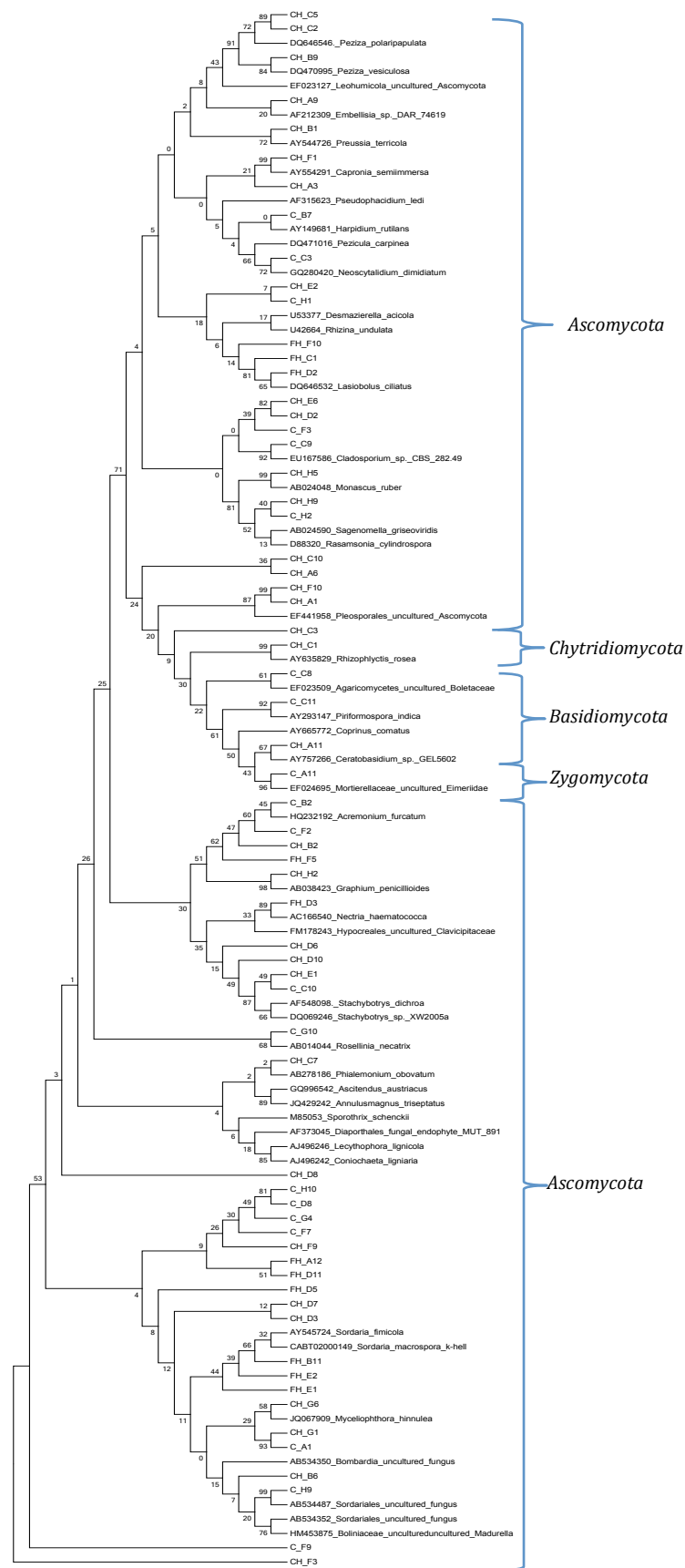


Fig. 49. Albero filogenetico relativo ai cloni sequenziati ottenuti dai campioni di rizosfera delle piante coltivate con solo torba (C), sansa (FH) e compost di sansa (CH).

Per quanto riguarda la struttura delle comunità, che può essere dedotta dall'identificazione delle popolazioni fungine, è interessante notare come soltanto un numero molto limitato di popolazioni fossero condivise fra le diverse comunità, indicando, come già rilevato dall'analisi DGGE, una bassa similarità tra le comunità della rizosfera delle piante cresciute in substrati diversi. In particolare, solo 3 OTU erano condivise tra le comunità delle piante controllo e quelle coltivate con compost e tra quest'ultime e quelle coltivate con la sansa. Inoltre, nessuna OTU era condivisa tra piante coltivate con sola torba e quelle con substrati contenenti sansa, confermando quindi il marcato effetto di questo ingrediente sulla struttura della comunità.

In figura 50 vengono mostrate le composizioni delle comunità, a livello di classe, relative alla rizosfera dei tre campioni, e, soltanto per la classe più abbondante, ovvero quella dei *Sordariomycetes*, viene mostrata la composizione anche a livello di ordine.

All'interno delle piante controllo si poteva osservare che quasi metà (47%) dei funghi presenti era costituita da *Sordariomycetes*, che, in ordine di abbondanza, venivano seguite da *Leothiomycetes*, *Dothideomycetes*, *Euromycetes* e *Agaricomycetes*, quest'ultimo unico rappresentante dei *Basidiomycota*. Inoltre, le *Sordariomycetes* erano costituite principalmente dall'ordine delle *Xylariales* (44%), seguite in modo equo (12%) da *Glomerellales*, *Coniochaetales*, *Hypocreales* e *Sordariales*.

La rizosfera presente nelle piante coltivate con substrato contenente sansa presentava una composizione della comunità fungina completamente diversa, infatti essa era rappresentata soltanto da *Ascomycota*, e, in particolare, da due sole classi date da *Sordariomycetes* e *Pezizomycetes*, con valori di abbondanza relativa pari a 88% e 12%, rispettivamente. Inoltre, le *Sordariomycetes*, in questo caso, erano costituite quasi esclusivamente (91%) dall'ordine *Sordariales*, evidenziando dunque una riduzione della biodiversità.

Quando le piante erano coltivate con sansa compostata, si osservava un aumento della biodiversità, infatti nella comunità venivano introdotte delle classi che in parte erano già presenti nelle piante controllo (*Sordariomycetes*, *Leothiomycetes*, *Dothideomycetes*, *Euromycetes* e *Agaricomycetes*) e di nuove come le *Chytridiomycetes* oppure la classe delle *Pezizomycetes*, in comune con le piante coltivate con 30% di sansa tal quale. Inoltre, a livello di ordine, i due gruppi più abbondanti erano dati dalle *Sordariales* e dalle *Hypocreales*.

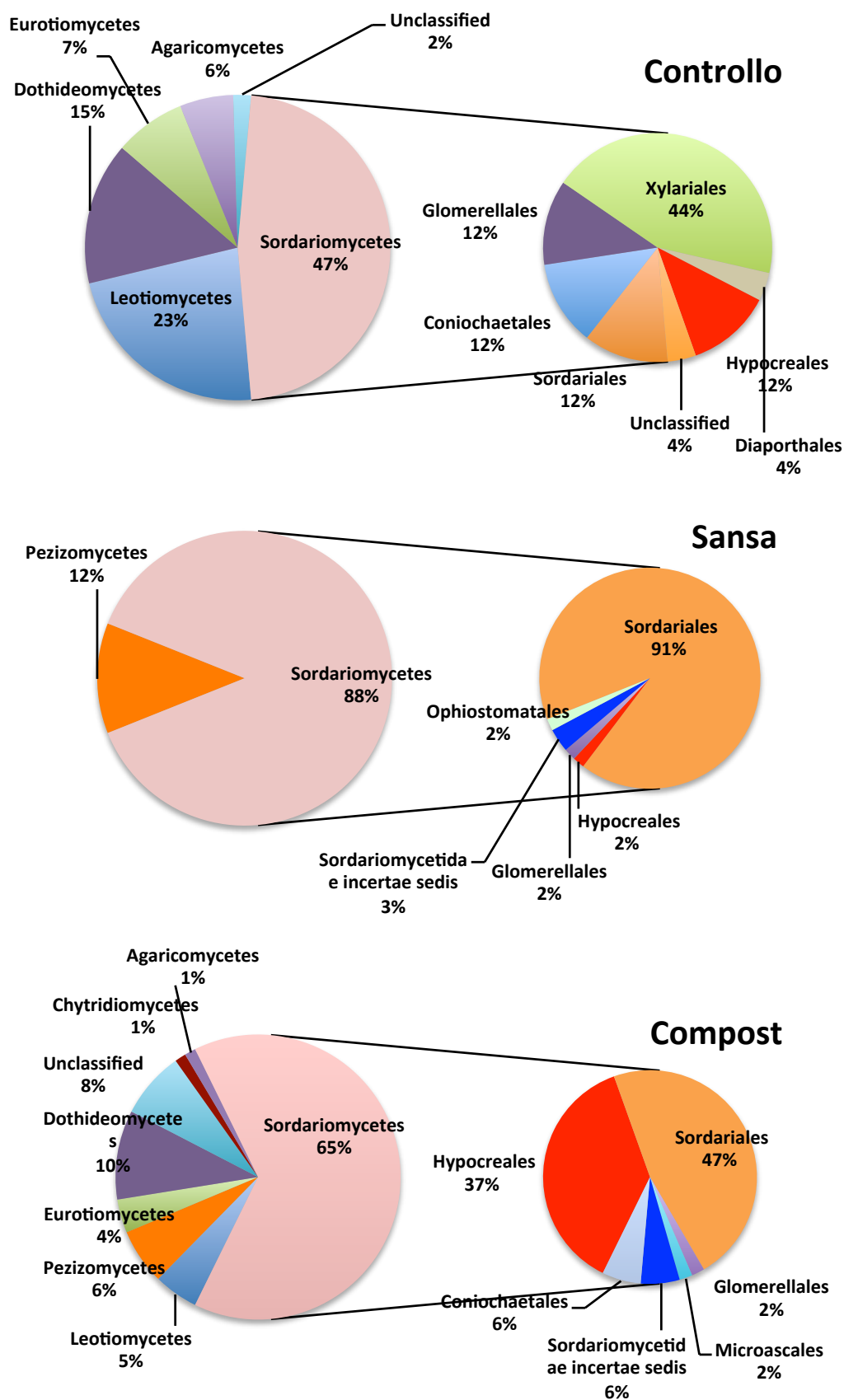


Fig. 50. Distribuzione percentuale dei cloni secondo la loro assegnazione a livello di Classe e a livello di Ordini appartenenti alla Classe dei *Sordariomycetes*.

A livello di genere, all'interno delle piante controllo le specie *Rosellinia necatrix* ed i generi appartenenti alla famiglia delle *Davidiellaceae* erano i più abbondanti, mentre, quando la torba veniva sostituita parzialmente dalla sansa tal quale, la specie più abbondante era *Sordaria fimicola*, la quale era esclusiva delle sole piante coltivate con la sansa non compostata.

Il compostaggio della sansa produceva, come già detto, un incremento della biodiversità, infatti anche a livello di genere si osservava la comparsa di nuovi *taxa* non presenti negli altri due trattamenti, tra i più abbondanti si trovavano *Stachybotrys chartarum*, *Sordaria macrospora* e *Preussia feniculata*. Quindi, l'identificazione delle specie fungine presenti nella rizosfera evidenziava che la sansa tal quale influenzava profondamente la composizione della comunità, riducendone la biodiversità e favorendo lo sviluppo di determinate specie potenzialmente responsabili, almeno in parte, degli effetti sulla crescita della pianta.

4.3 Prova di coltivazione in aziende florovivaistiche con substrati da invasatura a base di compost di sansa.

Una seconda sperimentazione in vaso, condotta su larga scala presso aziende florovivaistiche, si inseriva nel progetto di ricerca SAN-SOIL, finanziato dalla Regione Toscana e dall'Unione Europea (Fig. 51). Nella stessa ottica di valorizzazione di scarti oleari che caratterizzava la prova in vaso precedentemente illustrata, questa prova aveva lo scopo di valutare la possibilità di utilizzare un compost prodotto da una miscela di sansa tradizionale e acque di vegetazione come substrato da invasatura in parziale o totale sostituzione della torba. In particolare, sono stati valutati gli effetti dell'utilizzo di questo prodotto, dopo 6 e 12 mesi di coltivazione, sulla crescita di tre piante ornamentali (*Cupressus sempervirens* "Pyramidalis", *Viburnum lucidum* e *Prunus laurocerasus* "Novita") e sulle popolazioni autoctone batteriche e fungine del suolo e di quelle endofitiche delle radici. Prima di illustrare gli effetti sulla crescita delle piante e sui microrganismi, saranno presentati i risultati relativi al monitoraggio del processo di compostaggio ed alle dinamiche delle popolazioni batteriche coinvolte.



Fig. 51. Coltivazione in substrati sperimentali presso un vivaio partecipanti al progetto SAN-SOIL.

4.3.1 Monitoraggio del processo di compostaggio

Nell'ambito della prova di coltivazione su larga scala l'Istituto per i Sistemi Agricoli e Forestali del Mediterraneo del Consiglio Nazionale delle Ricerche si è occupato del monitoraggio del processo di compostaggio di una miscela di scarti oleari costituita da sansa tradizionale e acque di vegetazione cui venivano aggiunti delle componenti igroscopiche date da cascame di lana e paglia, e, come materiale strutturante, i residui della potatura dell'olivo. Il prodotto ottenuto da questo processo, poi, era impiegato nella formulazione di substrati da invasatura in parziale o totale sostituzione della torba per la coltivazione in vaso di piante ornamentali all'interno di aziende florovivaistiche.

Il processo aveva una durata totale di 252 giorni, durante i quali poteva essere riconosciuta una prima fase attiva (o biossidativa) che aveva luogo fino a 120 giorni all'interno di sacchi "big bags" (Fig. 52). Successivamente questi venivano aperti e la miscela contenuta era lasciata all'aria e rimescolata meccanicamente. Questa seconda fase di *curing* portava alla maturazione della miscela che, appunto, terminava dopo 252 giorni.



Fig. 52. Big bags contenenti la miscela sperimentale durante la fase attiva di compostaggio.

Le caratteristiche chimiche degli ingredienti utilizzati per la miscela sperimentale di compostaggio evidenziavano l'elevata presenza di fenoli (16,2%) associata ad un'alta salinità (alti valori di conducibilità elettrica) per le acque di vegetazione, caratteristiche che avrebbero reso tali scarti particolarmente fitotossici se usati tal quali. Inoltre, l'elevato contenuto di azoto del casame di lana (9,9%), associato alla sua elevata igroscopicità, rendevano tale scarto particolarmente adatto alla formulazione della miscela di compostaggio.

Durante il processo sono stati monitorati gli andamenti di temperatura e concentrazione di ossigeno (Fig. 53).

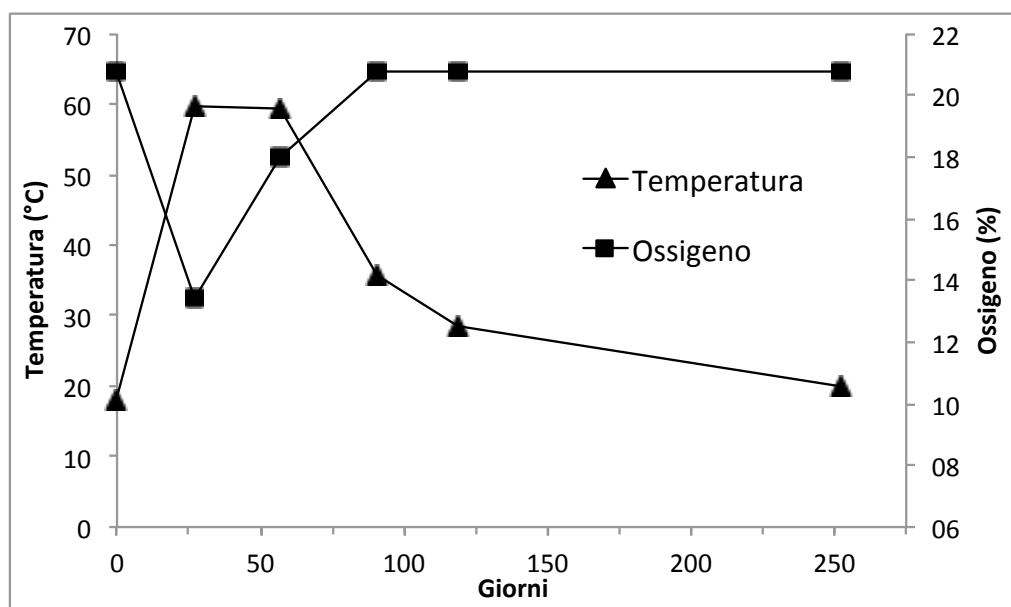


Fig. 53. Temperatura e concentrazione di ossigeno nella miscela di compostaggio durante il processo.

Durante i primi 120 giorni, la temperatura all'interno della miscela subiva un iniziale incremento fino a 60 giorni sfiorando il valore di 60°C, successivamente questo valore scendeva a 30 °C, mostrando quindi un trend tipico della fase termofila o biossidativa del compostaggio. Il graduale raffreddamento della massa indicava l'inizio della fase di *curing* (apertura dei sacchi) in cui la temperatura scendeva sotto i 30°C fino a raggiungere una temperatura di circa 20°C, valore simile alla temperatura esterna dell'aria. Inoltre, il *trend* relativo all'ossigeno indicava che il processo di trasformazione della sostanza organica avveniva in condizioni aerobiche, infatti, i valori di ossigeno, dopo aver subito un brusco calo nei primi 20 giorni, tornavano ad aumentare fino a stabilizzarsi per tutta la restante durata del processo.

In tabella 18 sono riportate le caratteristiche chimiche e fisiche della miscela durante il processo di compostaggio.

Tab. 18. Caratteristiche chimico-fisiche della miscela durante il processo di compostaggio.

Parametro	Giorno di compostaggio					
	0	27	57	91	119	252
pH	5.90	6.74	7.60	8.14	7.96	8.06
EC (dS/m)	1.29	1.45	2.20	2.30	1.91	2.96
Ceneri (%)	4.9	6.6	7.4	7.5	9.1	10.6
C/N	18.0	19.3	15.3	17.1	12.9	12.2
Fenoli (g/Kg)	6.7	5.8	5.7	0.6	0.2	0.3
Indice germinabilità (%)	54.2	9.5	22.1	26.7	43.1	69.0

I valori del rapporto C/N diminuivano nel corso del processo (da 18 a 12,2) indicando un'avvenuta mineralizzazione e umificazione del carbonio organico presente nella miscela iniziale. Inoltre si osservava anche una evidente degradazione dei fenoli totali che, all'inizio del processo, presentavano un valore di 6,7 g/Kg, mentre, dopo 252 giorni, soltanto 0,3 g/Kg rimaneva all'interno del cumulo. La maturazione del processo si evinceva anche dall'innalzamento del pH e dell'indice di germinabilità, i quali passavano da valori pari a 5,9 e 54,2% rispettivamente, a 8,06 e 69%.

Durante il compostaggio sono stati approfonditi gli aspetti microbiologici legati al processo monitorando le dinamiche delle popolazioni batteriche coinvolte nella trasformazione della sostanza organica. In figura. 54 è presentata l'analisi DGGE dei batteri presenti durante il processo di compostaggio della miscela sperimentale. La complessità dei *fingerprints* e le differenze rilevate nei diversi giorni di campionamento indicano chiaramente la presenza di una comunità molto ricca e complessa caratterizzata da un rapido susseguirsi di popolazioni batteriche diverse.

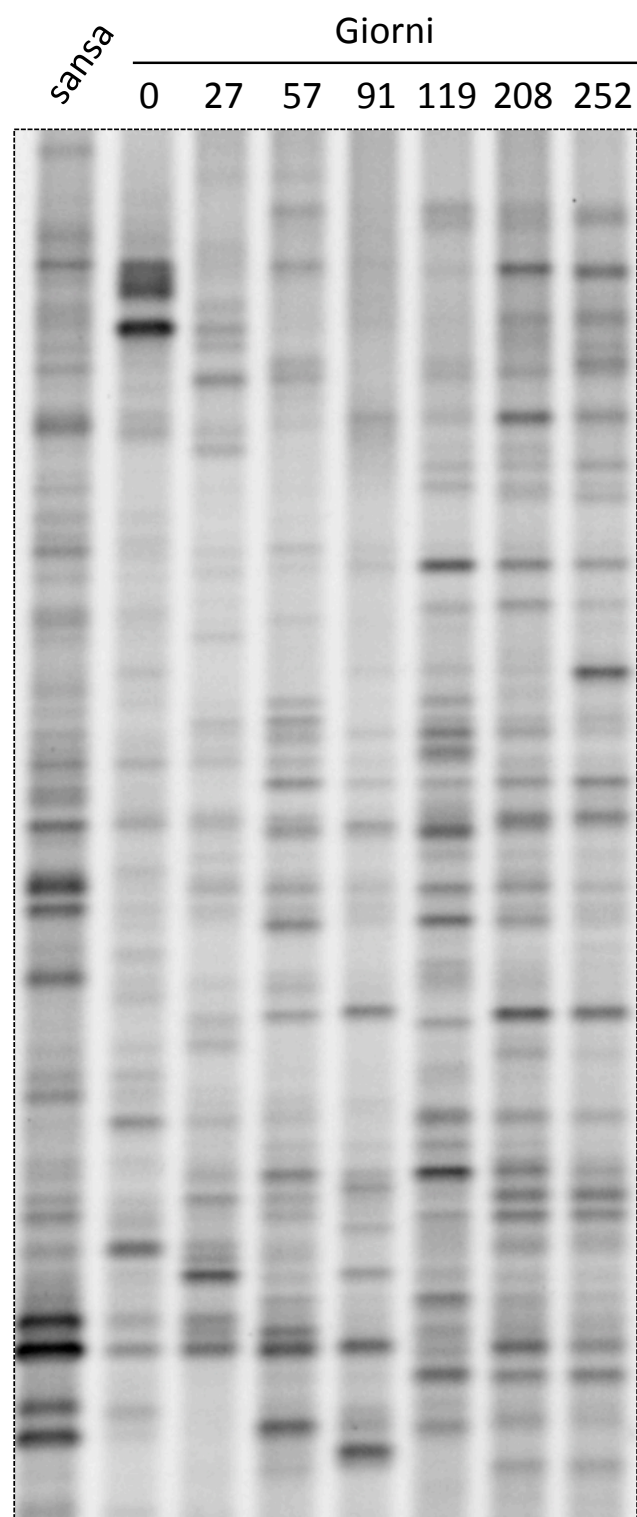


Fig. 54. *Fingerprints* DGGE delle comunità batteriche presenti nella sansa e durante il compostaggio.

Dall'elaborazione degli indici di biodiversità che caratterizzano la comunità ad ogni tempo, riportati in tabella 19, si evince come la sansa fosse caratterizzata da una elevata biodiversità indicata da valori di *Richness* (S) e Shannon-Weaver (H) molto elevati (25 e 2,974, rispettivamente). Questa ricchezza di popolazioni batteriche veniva meno all'inizio del processo, quando questi valori scendevano bruscamente, fino a 16 e 2,439, per poi variare continuamente durante tutta la restante fase termofila (0-119 giorni), indicando una rapida successione delle popolazioni batteriche. La fase di raffreddamento (120-252 giorni), invece, era caratterizzata da una stabilizzazione della comunità che si evidenziava dagli identici valori di S (25) e dai simili valori di H (3,104 e 3,055) registrati dopo 208 e 252 giorni, rispettivamente.

Tab. 19. Indici di biodiversità della comunità batterica presente nella sansa e durante il compostaggio.

Indice	Sansa	Giorni						
		0	27	57	91	119	208	252
<i>Richness</i>	25	16	20	15	14	21	25	25
<i>Shannon-Weaver</i>	2.974	2.439	2.760	2.576	2.406	2.842	3.104	3.055
<i>Simpson</i>	0.012	0.033	0.066	0.085	0.107	0.069	0.050	0.055
<i>Evenness</i>	0.924	0.880	0.921	0.951	0.912	0.934	0.964	0.949

Il dendrogramma elaborato sulla base delle similarità tra i *fingerprints* DGGE, illustrato in figura 55, conferma che la miscela di compostaggio all'inizio del processo era caratterizzata da una comunità che solo in parte rispecchiava quella della sansa (similarità poco superiore al 50%). Inoltre nei primi 57 giorni del compostaggio, corrispondenti all'inizio della fase termofila, si assisteva ad un rapido e drastico cambiamento della struttura della comunità, con una similarità rispetto alla miscela iniziale inferiore al 20%. La comunità tendeva quindi alla stabilizzazione, fino ad arrivare negli ultimi due mesi di processo a valori di similarità superiori al 90%.

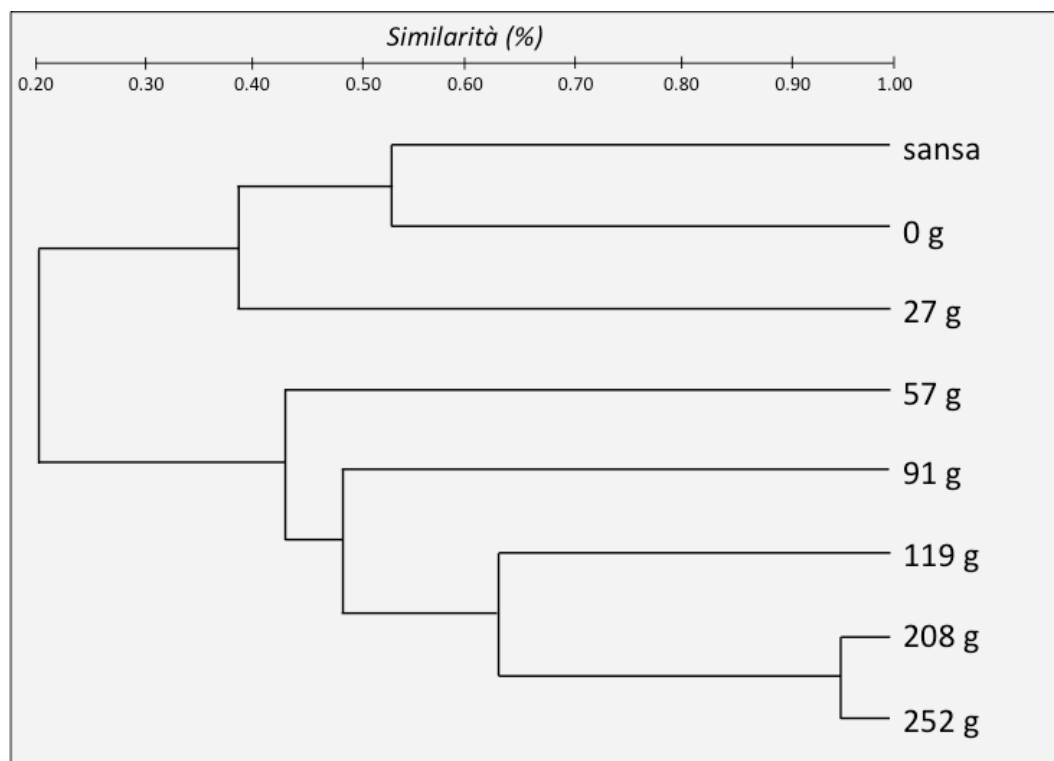


Fig. 55. Dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* DGGE delle comunità batteriche presenti nella sansa e durante il processo di compostaggio, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*). *Fingerprints*.

I sequenziamenti di nuova generazione su piattaforma Illumina sono stati eseguiti allo scopo di identificare le popolazioni batteriche che avevano un ruolo attivo nella degradazione della sostanza organica presente nella miscela iniziale, in particolare, quindi, sono stati analizzati i campioni prelevati durante la fase termofila del processo.

Per ogni campione venivano selezionate in modo casuale 10000 sequenze, alle quali veniva assegnata una identificazione fino al livello tassonomico più basso per il quale era possibile avere nel database RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu>) un livello di *confidence* di almeno il 50%. Per ogni diverso livello tassonomico è, quindi, possibile conoscere l'abbondanza relativa di ogni *taxon*, calcolata sulla base della quantità di sequenze in un determinato campione che venivano assegnate al *taxon* stesso. Nelle figure 56 e 57 sono mostrate le distribuzioni percentuali delle classi e degli ordini più abbondanti.

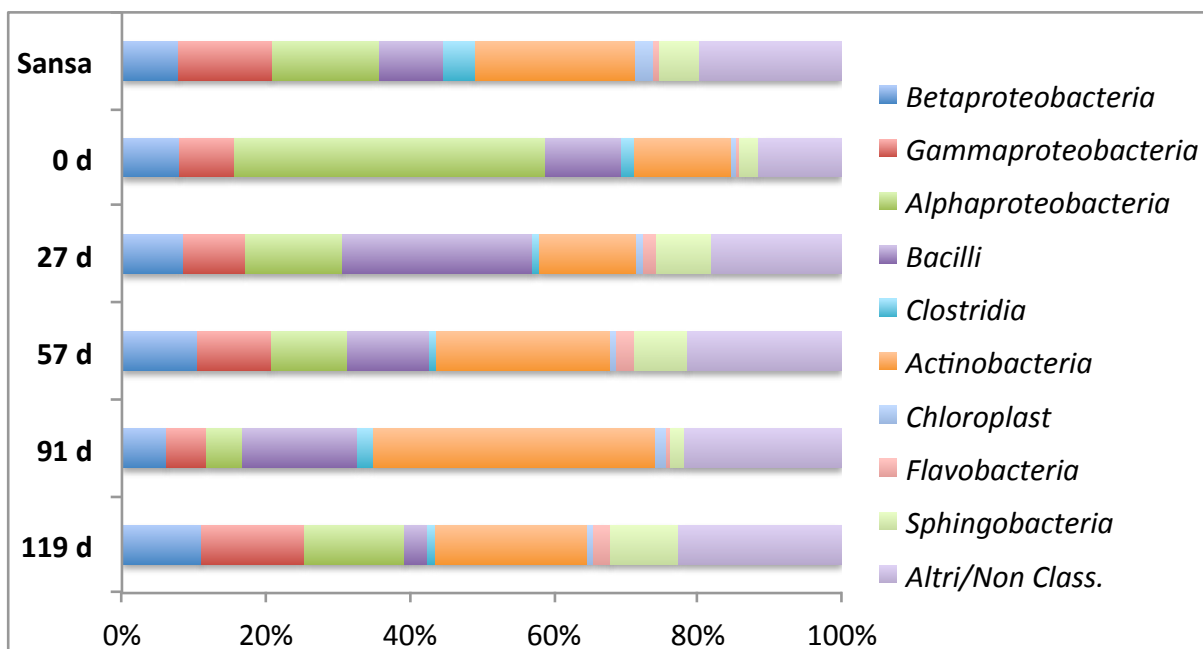


Fig. 56. Distribuzione delle classi batteriche più abbondanti presenti nella sansa e nella miscela di compostaggio durante il processo.

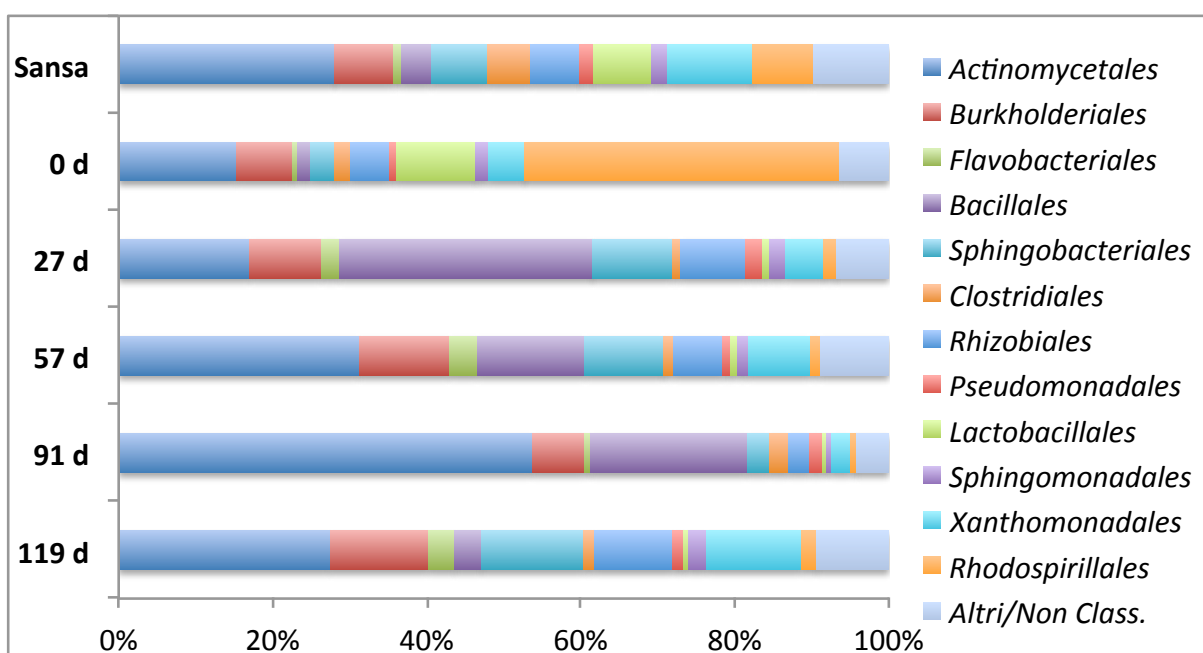


Fig. 57. Distribuzione degli ordini batterici più abbondanti presenti nella sansa e nella miscela di compostaggio durante il processo.

La classe degli *Actinobacteria* risultava essere molto abbondante nella sansa (22,3%) ma mostrava poi una consistente riduzione nella miscela di compostaggio e all'inizio della fase attiva/termofila del processo (13,5%), per poi aumentare di nuovo e diventare predominante durante la fase mesofila di *curing* (39,2%). È interessante notare tuttavia che, mentre nella sansa e nella miscela iniziale la maggior parte degli *Actinobacteria* apparteneva alla famiglia delle *Microbacteriaceae*, durante la fase termofila il compost era caratterizzato da una distribuzione equa di *Microbacteriaceae*, *Nocardiopsaceae* e *Streptosporangiaceae*. L'inizio della fase di maturazione, invece, era caratterizzato da una transitoria abbondanza di *Pseudonocardiaceae*, per lo più rappresentato da microrganismi moderatamente alofili del genere *Prauserella*.

La sansa e la miscela di compostaggio al tempo zero erano anche caratterizzate da un'abbondanza di batteri appartenenti alle classi dei *Gammaproteobacteria*, principalmente dell'ordine delle *Xanthomonadales*, degli *Alphaproteobacteria*, ordini *Rhizobiales* e *Rhodospirillales*, dei *Bacilli*, ordine *Lactobacillales*, e *Betaproteobacteria*, ordine *Burkholderiales*. Le *Rhodospirillales*, in particolare, erano l'ordine largamente più abbondante nella miscela all'inizio del compostaggio (40,9%), quasi esclusivamente rappresentate dalla famiglia delle *Acetobacteraceae* e principalmente da batteri acetici aerobici del genere *Acetobacter*.

Durante la fase attiva (27 giorni dall'inizio del processo), quando la temperatura raggiungeva e superava i 60°C, la classe più abbondante era quella dei *Bacilli*, in particolare quelli termofili e sporigeni appartenenti al genere *Geobacillus*.

L'inizio della fase di maturazione del compost, dopo 119 giorni dall'inizio del processo, era caratterizzato da una distribuzione abbastanza omogenea di batteri che appartenevano agli ordini *Actinomycetales* (27,5%), *Sphingobacteriales* (13,2%), *Burkholderiales* (12,7%), *Xanthomonadales* (12,2%) e *Rhizobiales* (10,2%). Questa ultima osservazione confermava i dati ottenuti dall'analisi DGGE in cui si osservava una stabilizzazione della comunità durante la fase di maturazione del cumulo.

Il monitoraggio chimico-fisico e microbiologico portato avanti durante il compostaggio confermava che durante il processo di maturazione aerobica cui era sottoposta la miscela a base di sansa, avvenivano grandi modificazioni della sostanza organica mediate da un susseguirsi di popolazioni batteriche specializzate. Il risultato era la trasformazione dello scarto di frantoio in un ammendante di qualità che appariva, quindi, idoneo per l'impiego agronomico previsto nella formulazione di substrati da invasatura.

4.3.2. Effetti sulla crescita della pianta

Il progetto SAN-SOIL prevedeva una sperimentazione su larga scala, condotta presso aziende floro-vivaistiche toscane, che esaminasse la possibilità di utilizzare il compost di sansa, caratterizzato nel paragrafo precedente, per la sostituzione della torba nella formulazione di substrati da invasatura da utilizzare nella coltivazione di piante ornamentali. In particolare, sono stati preparati 8 substrati sperimentali contenenti solo torba (controllo) o con quantità crescenti di compost in sostituzione della torba (33, 66 e 100%), con e senza l'aggiunta di concime chimico. Nel quadro del presente lavoro di tesi è stata approfondita la sperimentazione su tre varietà di piante ornamentali (*Cupressus sempervirens* "Pyramidalis", *Viburnum lucidum* e *Prunus laurocerasus* "Novita") che sono state coltivate per una durata totale di 12 mesi. I rilievi agronomici per determinare la crescita delle piante erano eseguiti dopo 6 e 12 mesi dall'invasatura delle piante, misurando i pesi freschi della parte epigea. In figura 58 sono riportati i rilievi dopo 6 mesi di coltivazione.

Nei substrati formulati con concime minerale, la sostituzione della torba con il 33 e il 66% di compost di sansa portava ad una significativa stimolazione della crescita di *Cupressus*, con un incremento della biomassa rispettivamente pari al 67 e al 101% del controllo. Quando invece la concimazione minerale non era effettuata, le medesime quantità di compost non portavano a incremento significativo della crescita rispetto alle piante coltivate con sola torba.

Per quanto riguarda *Viburnum*, sia in presenza di concime che in sua assenza, la sostituzione della torba con il 33 ed il 66% di compost produceva una significativa stimolazione della crescita. In particolare, l'incremento di biomassa rispetto al controllo era più elevato nelle tesi concimate (42 e 46%) che in quelle non concimate (24% e 26%).

Le piante di *Prunus* presentavano un aumento significativo della biomassa solo quando la torba era sostituita per il 66% da compost, con incrementi maggiore quando veniva effettuata la concimazione (65%) che in assenza di questa (32%).

E' interessante notare che la completa sostituzione della torba con compost, seppur non stimolasse significativamente la crescita delle piante, non portava ad un rallentamento evidente della produzione di biomassa vegetale in nessuna delle varietà di piante ornamentali utilizzate durante la sperimentazione del progetto SAN-SOIL. Questo dato suggerisce che il compost di sansa può rappresentare un ideale sostituto della torba per la formulazione dei substrati da invasatura utilizzati nella coltivazione di piante su scala industriale.

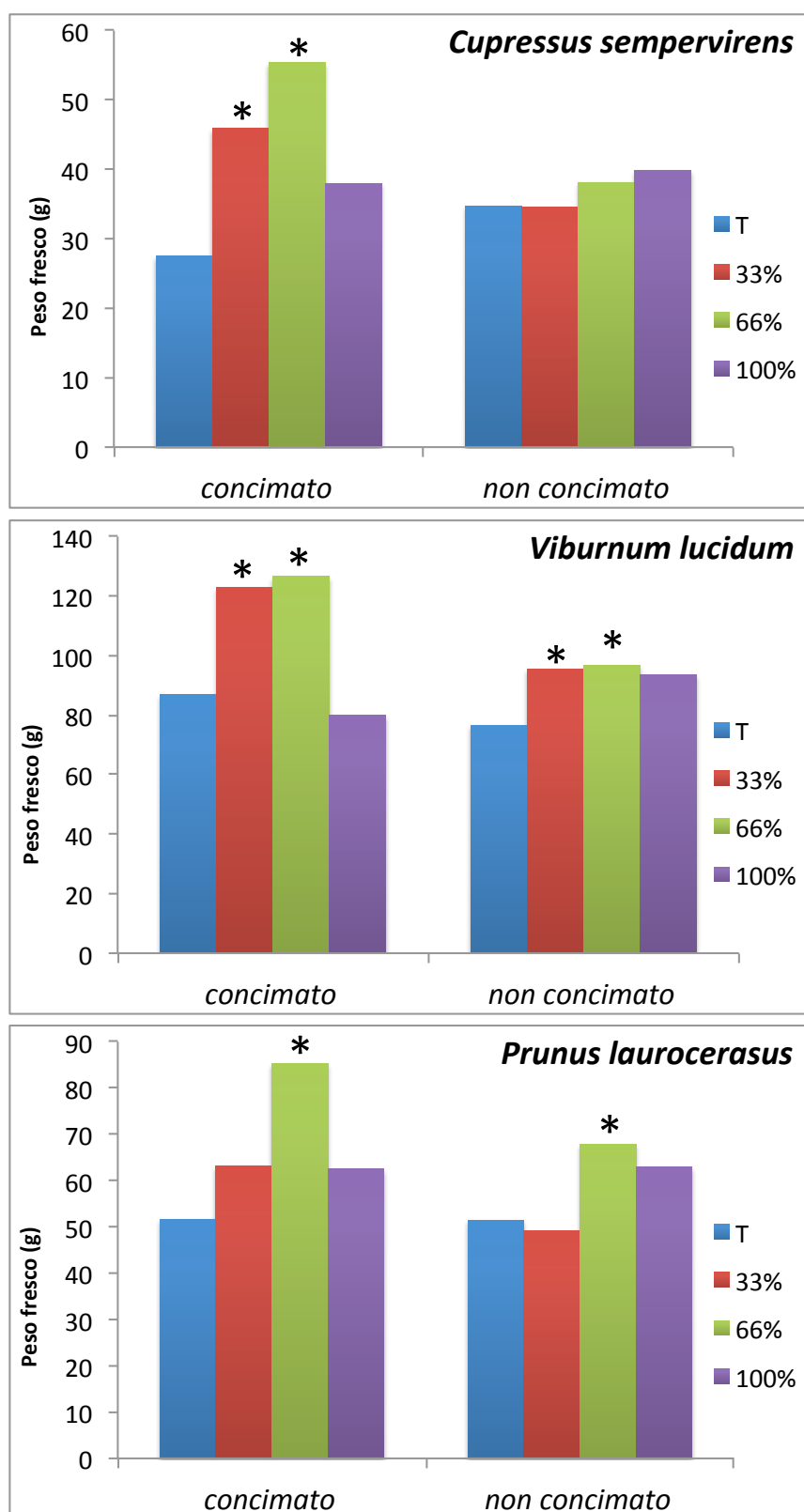


Fig. 58. Effetti dei substrati da invasatura con solo torba (T) o con quantità crescenti di compost (33, 66 e 100% di sostituzione della torba), con e senza concime, sul peso fresco delle piante dopo 6 mesi di coltivazione. L'asterisco indica differenza significativa rispetto al substrato controllo contenete solo torba. ($P < 0,05$; LSD FisherTest).

Solo nel caso delle piante di *Viburnum* veniva monitorata la crescita fino a 12 mesi dall'invasatura (Fig. 59). Dopo questo periodo di coltivazione in vaso con i substrati sperimentali la maggior parte di questi non presentavano differenze di crescita rispetto al controllo, ad indicare che le piante avevano ormai raggiunto il *plateau* di crescita nei contenitori utilizzati. Unica eccezione era rappresentata da quella della substrato contenente il 33% di compost in presenza di concime minerale in cui la biomassa della pianta risultava significativamente più elevata del controllo anche dopo 12 mesi.

Dati simili si ottenevano per tutte le altre varietà di piante ornamentali incluse nella sperimentazione del progetto SAN-SOIL, a sottolineare il successo della strategia di utilizzo del compost di sansa nella formulazione di substrati da invasatura al posto della torba. In particolare, i substrati con 33 e 66% di compost risultavano particolarmente interessanti perché, oltre a consentire un parziale risparmio di torba, permettevano il raggiungimento di livelli di crescita tali da poter immettere le piante sul mercato in tempi più brevi rispetto al substrato tradizionalmente utilizzato.

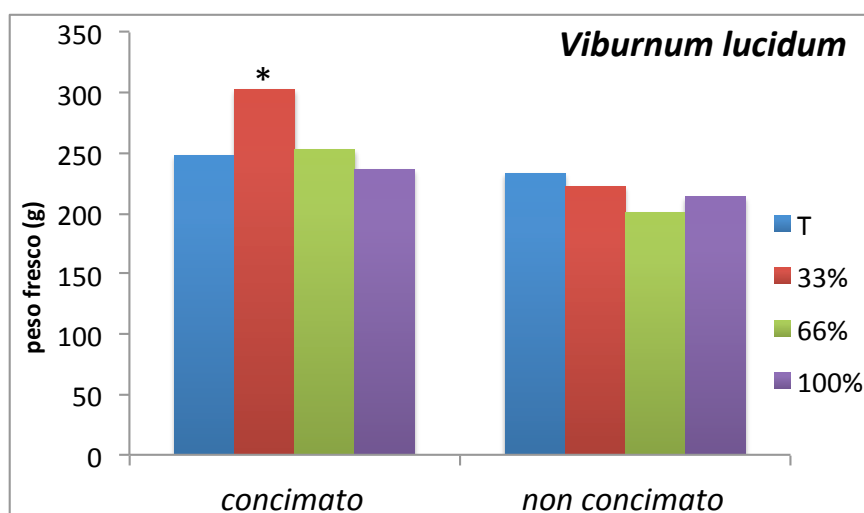


Fig. 59. Effetti dei substrati da invasatura con solo torba (T) o con quantità crescenti di compost (33, 66 e 100% di sostituzione della torba), con e senza concime, sul peso fresco delle piante dopo 12 mesi di coltivazione. L'asterisco indica differenza significativa rispetto al substrato controllo contenete solo torba. ($P < 0,05$; LSD FisherTest).

4.3.3 Effetti sulle comunità batteriche di suolo e radici.

L'analisi della comunità batterica del suolo e di quella endofitica delle radici è stata affrontata utilizzando, come per le prove precedenti, un approccio coltura-indipendente. In questa prova si osservava come la sostituzione della torba con quantità crescenti di compost di sansa avesse un forte impatto sulla biodiversità batterica delle tre piante ornamentali.

Nelle figure 60, 61 e 62 vengono riportate le analisi DGGE delle comunità batteriche del suolo relative alle tre varietà di piante ornamentali prese in esame (*Cupressus sempervirens* "Pyramidalis", *Viburnum lucidum* e *Prunus laurocerasus* "Novita"). In ciascuna figura, nel pannello A sono presentate le immagini dei *fingerprint* DGGE relative ai substrati da invasatura con solo la torba (tesi controllo) e con compost di sansa in quantità crescenti (33, 66 e 100% di sostituzione della torba) sia con concimazione chimica che senza. Il pannello B riporta gli indici ecologici di biodiversità *Richness* (S) e *Shannon-Weaver* (H) elaborati analizzando i *fingerprint* di ciascuna comunità batterica. Il dendrogramma di similarità riportato nel pannello C, infine, permette il confronto tra le comunità presenti nei diversi campioni.

L'analisi di *Cupressus* evidenziava che le comunità erano caratterizzate da profili molto ricchi. Inoltre, dal calcolo degli indici ecologici, si evinceva come la sostituzione della torba con quantità crescenti di compost, sia in presenza che in assenza di concimazione, provocasse un incremento della biodiversità. Questo effetto era più marcato nel caso dell'utilizzo del 100% di compost e quando il concime minerale veniva aggiunto ai substrati (valori di S e di H che crescevano da 8 a 22 e da 1,890 a 2,888,). In assenza di concimazione, invece, l'incremento maggiore si osservava con l'utilizzo del 66% di compost e limitatamente ai valori di S che crescevano da 15 a 21.

Le medesime analisi condotte su i campioni di suolo prelevati dalla coltivazione di *Viburnum* e di *Prunus*, invece, mostravano risultati molto differenti. Gli indici di diversità S e H, infatti, presentavano una forte riduzione, rispetto al controllo, nelle tesi sperimentali in cui era presente compost di sansa, indipendentemente dalla presenza di concime minerale. Nel caso di *Viburnum*, la *Richness*, pari a 21 e 28 nel suolo controllo, rispettivamente con e senza concime, diminuiva fino a 13, quando la torba era sostituita per il 66%, e fino a 17, quando la torba era completamente rimpiazzata da compost. L'indice di Shannon-Weaver presentava la stessa tendenza, con valori che calavano da 2,896 a 2,521 e da 3,242 a 2,710 negli stessi campioni.

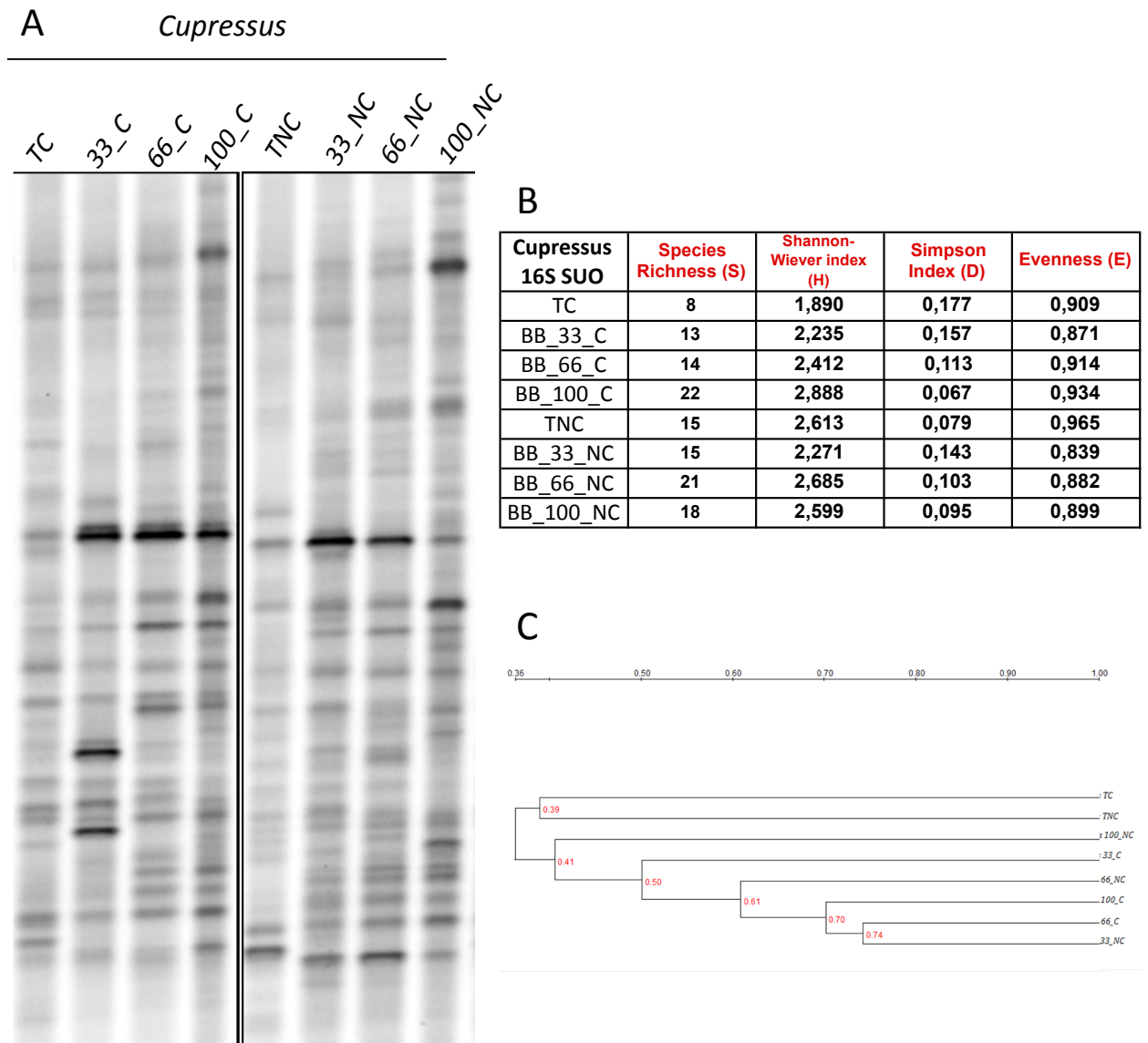


Fig. 60. A *fingerprints* DGGE delle comunità batteriche presenti nei suoli di piante di *Cupressus* coltivate, con e senza concimazione chimica, in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%). B, indici ecologici di biodiversità elaborati analizzando i *fingerprint* di ciascuna comunità batterica riportati in A. C, dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* riportati in A, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*).

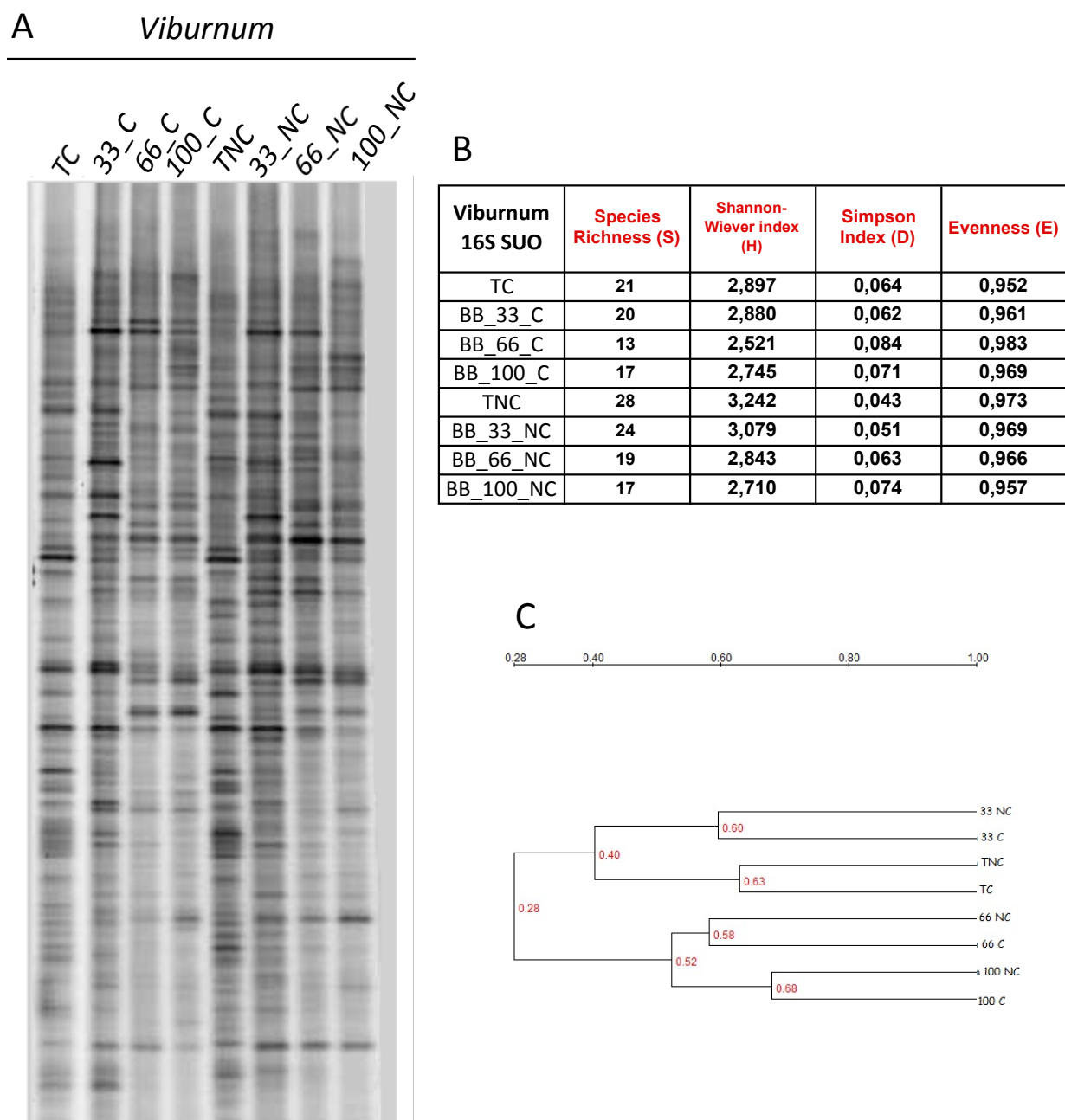


Fig. 61. A *fingerprints* DGGE delle comunità batteriche presenti nei suoli di piante di *Viburnum* coltivate, con e senza concimazione chimica, in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%). B, indici ecologici di biodiversità elaborati analizzando i *fingerprint* di ciascuna comunità batterica riportati in A. C, dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* riportati in A, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*).

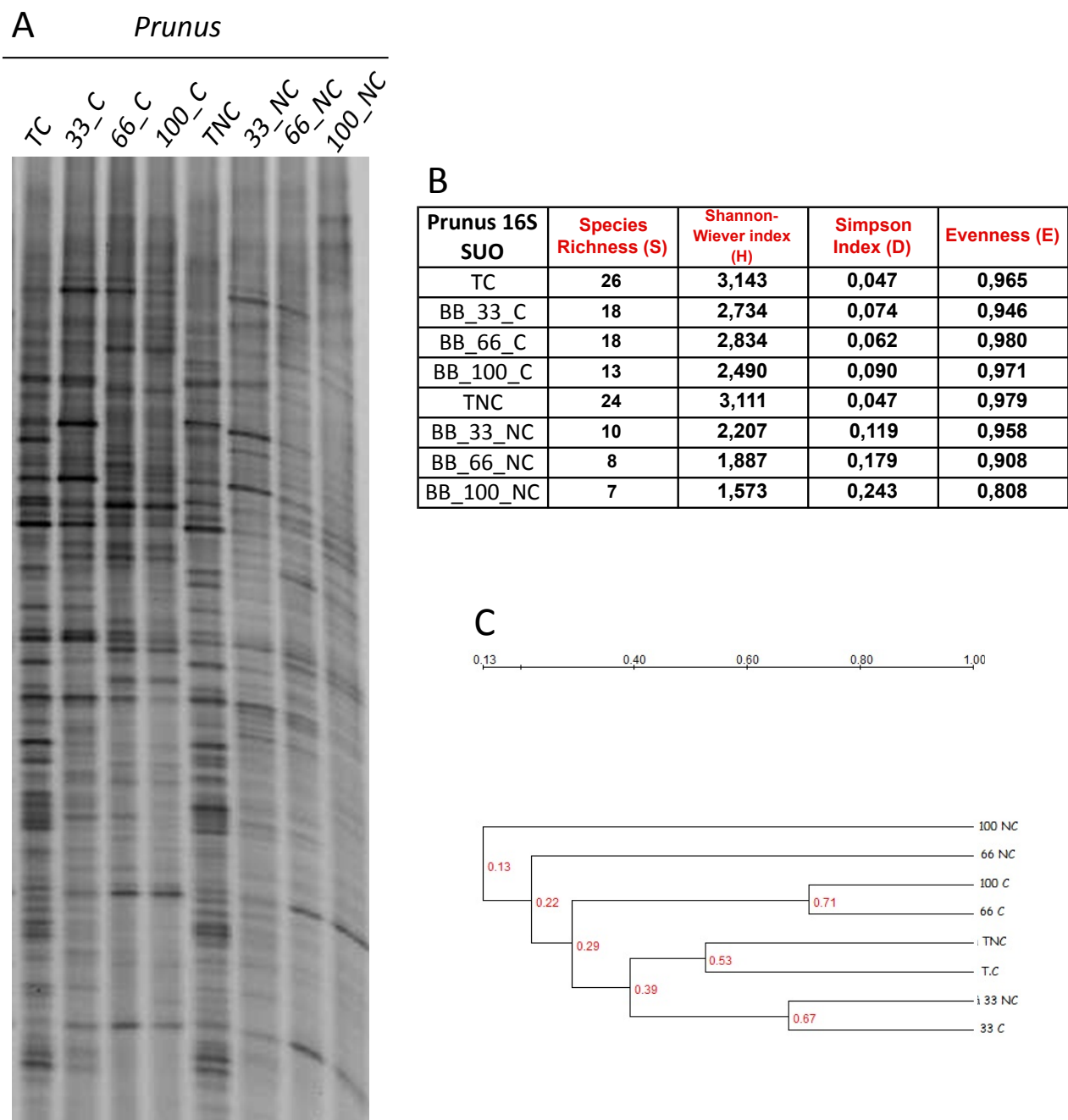


Fig. 62. A *fingerprints* DGGE delle comunità batteriche presenti nei suoli di piante di *Prunus* coltivate, con e senza concimazione chimica, in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%). B, indici ecologici di biodiversità elaborati analizzando i *fingerprint* di ciascuna comunità batterica riportati in A. C, dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* riportati in A, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*).

Nel caso di *Prunus*, in assenza di concimazione minerale i valori di S e H relativi al controllo (24 e 3,111) scendevano notevolmente raggiungendo livelli minimi quando la torba veniva sostituita con il 100% di compost (7 e 1,573).

L'utilizzo di compost in quantità crescenti nella formulazione dei substrati da invasatura causava, quindi, effetti sulla biodiversità batterica del suolo che variavano nelle diverse piante ornamentali prese in esame. Dai grafici di correlazione riportati in figura 63, si evince infatti che mentre nel caso di *Cupressus* sembrava esserci una, seppur debole, correlazione positiva tra quantità di compost e indici di biodiversità, nel caso di *Viburnum* e *Prunus* l'utilizzo di quantità di compost crescenti portava ad una riduzione dei valori S e H.

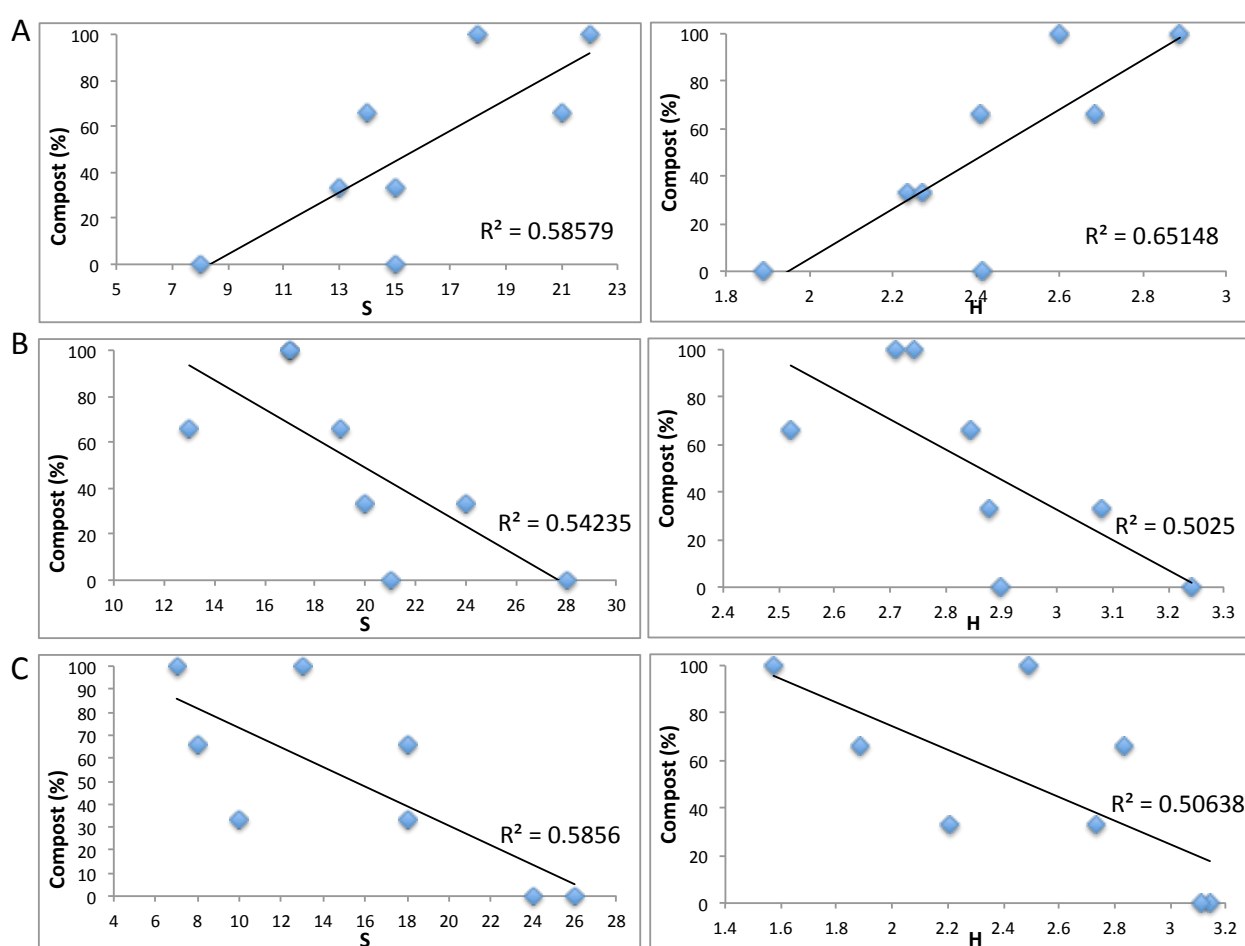


Fig. 63. Correlazione tra percentuale di compost utilizzata nella formulazione dei substrati da invasatura e indici di biodiversità (S e H) delle comunità batteriche presenti nel suolo di piante di *Cupressus* (A), *Viburnum* (B) e *Prunus*, (C). (n=8, p<0,05).

L'analisi numerica dei *fingerprint* DGGE permetteva di computare le similarità percentuali tra le comunità microbiche (indici di Dice) e quindi di costruire i dendrogrammi di similarità che raggruppano i campioni in cui l'utilizzo di substrati diversi portava a strutture della comunità simili tra loro.

Nel caso di *Cupressus*, solo i due suoli controllo (con e senza concime) presentavano una similarità che, seppur limitata (39%), permetteva di individuare un *cluster* all'interno del dendrogramma. Tuttavia, non era possibile evidenziare altri raggruppamenti in base alla presenza o assenza di concime o in base alla quantità di compost utilizzato.

Per quanto riguarda *Viburnum*, invece, si osservava un chiaro effetto dovuto alla quantità di compost utilizzato nella formulazione del substrato. Le comunità batteriche dei suoli relativi ai due substrati contenenti la stessa quantità di compost con e senza concimazione formavano, infatti, sempre *cluster* distinti e presentavano alti valori di similarità (compresi tra il 58,3 e il 68%).

Nel caso di *Prunus* si osservavano comunità simili nelle piante coltivate con sola torba e con il 33% di compost (similarità del 53 e del 67%, rispettivamente). L'utilizzo di quantità più elevate non portava, invece al raggruppamento in *cluster*. Al contrario, effetti simili sulle comunità batteriche (70,9%) si riscontravano solo nei substrati con 66 e 100% di compost con concime minerale.

L'analisi dei *cluster* rappresentati nei dendrogrammi, indicava quindi che la comunità batterica del suolo nelle tre varietà non sembrava essere influenzata dalla concimazione minerale. Solo in *Viburnum*, inoltre, sembrava rispondere agli *input* derivanti dalle diverse quantità di compost presenti nel substrato da invasatura.

Un simile approccio analitico, basato sui *fingerprint* DGGE, è quindi stato utilizzato per la definizione degli effetti sulle comunità dei batteri endofitici delle radici (Fig. 64, 65 e 66).

I *fingerprints* relativi agli endofiti delle radici di *Cupressus* ed i relativi indici di biodiversità mostravano come queste popolazioni fossero differentemente influenzate sia dalla presenza di compost che dalla presenza del concime minerale. Infatti, quando il concime veniva aggiunto al substrato, si osservava un calo della biodiversità con un valore di *Richness* che passava da 14 nel controllo, a 7 quando la torba veniva sostituita per il 66% da compost. Anche i valori di Shannon-Weaver seguivano lo stesso *trend* passando da un valore pari a 2,453 nel controllo a 1,865 in presenza del 66% di compost. Al contrario, quando il concime era assente, il compost di sansa sembrava stimolare le popolazioni endofitiche con un aumento del valore

dell'indice S da 11 nel controllo, a 14 in corrispondenza del substrato con solo compost. Un simile effetto si aveva sull'indice H che passava da 2,217 a 2.438.

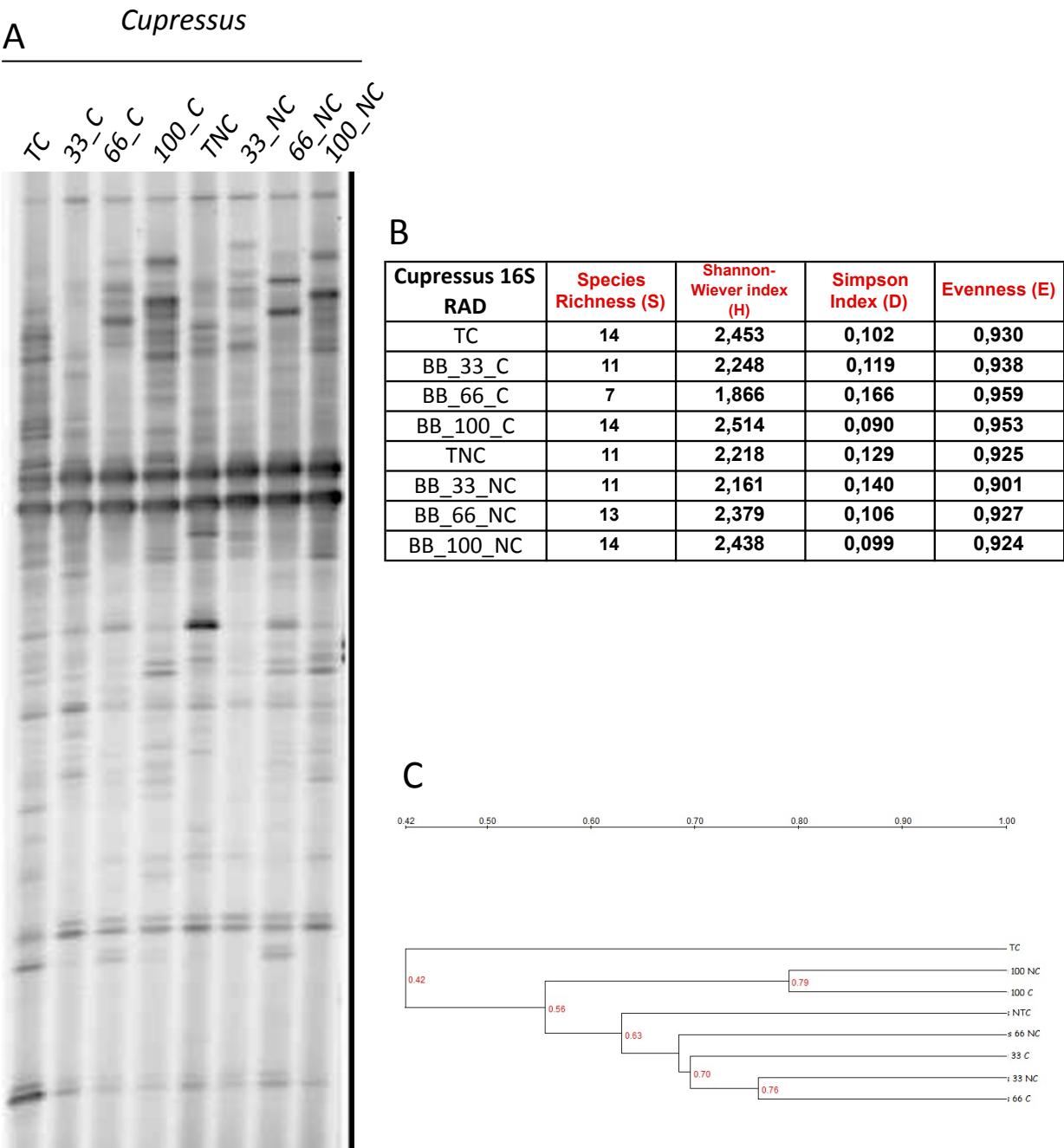
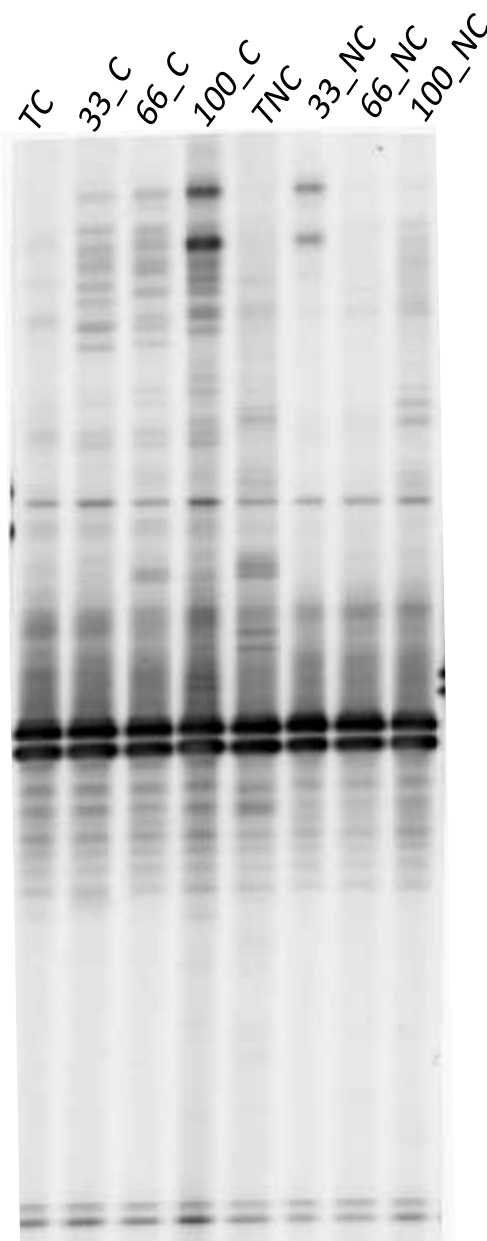


Fig. 64. A *fingerprints* DGGE delle comunità batteriche endofitiche delle radici prelevate dalle piante di *Cupressus* coltivate, con e senza concimazione chimica, in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%). B, indici ecologici di biodiversità elaborati analizzando i *fingerprint* di ciascuna comunità batterica riportati in A. C, dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* riportati in A, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*)

A *Viburnum*



B

Viburnum 16S RAD	Species Richness (S)	Shannon-Wiener index (H)	Simpson Index (D)	Evenness (E)
TC	10	2,055	0,146	0,892
BB_33_C	16	2,533	0,097	0,914
BB_66_C	15	2,470	0,106	0,912
BB_100_C	14	2,461	0,097	0,933
TNC	12	2,263	0,127	0,911
BB_33_NC	9	1,994	0,159	0,908
BB_66_NC	7	1,734	0,208	0,891
BB_100_NC	11	2,194	0,021	0,915

C

0.58 0.70 0.80 1.00

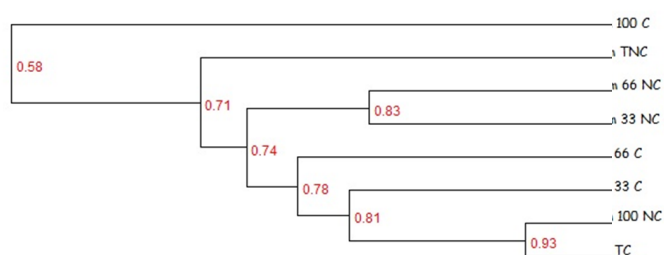


Fig. 65. A *fingerprints* DGGE delle comunità batteriche endofitiche delle radici prelevate dalle piante di *Viburnum* coltivate, con e senza concimazione chimica, in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%). B, indici ecologici di biodiversità elaborati analizzando i *fingerprint* di ciascuna comunità batterica riportati in A. C, dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* riportati in A, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*)

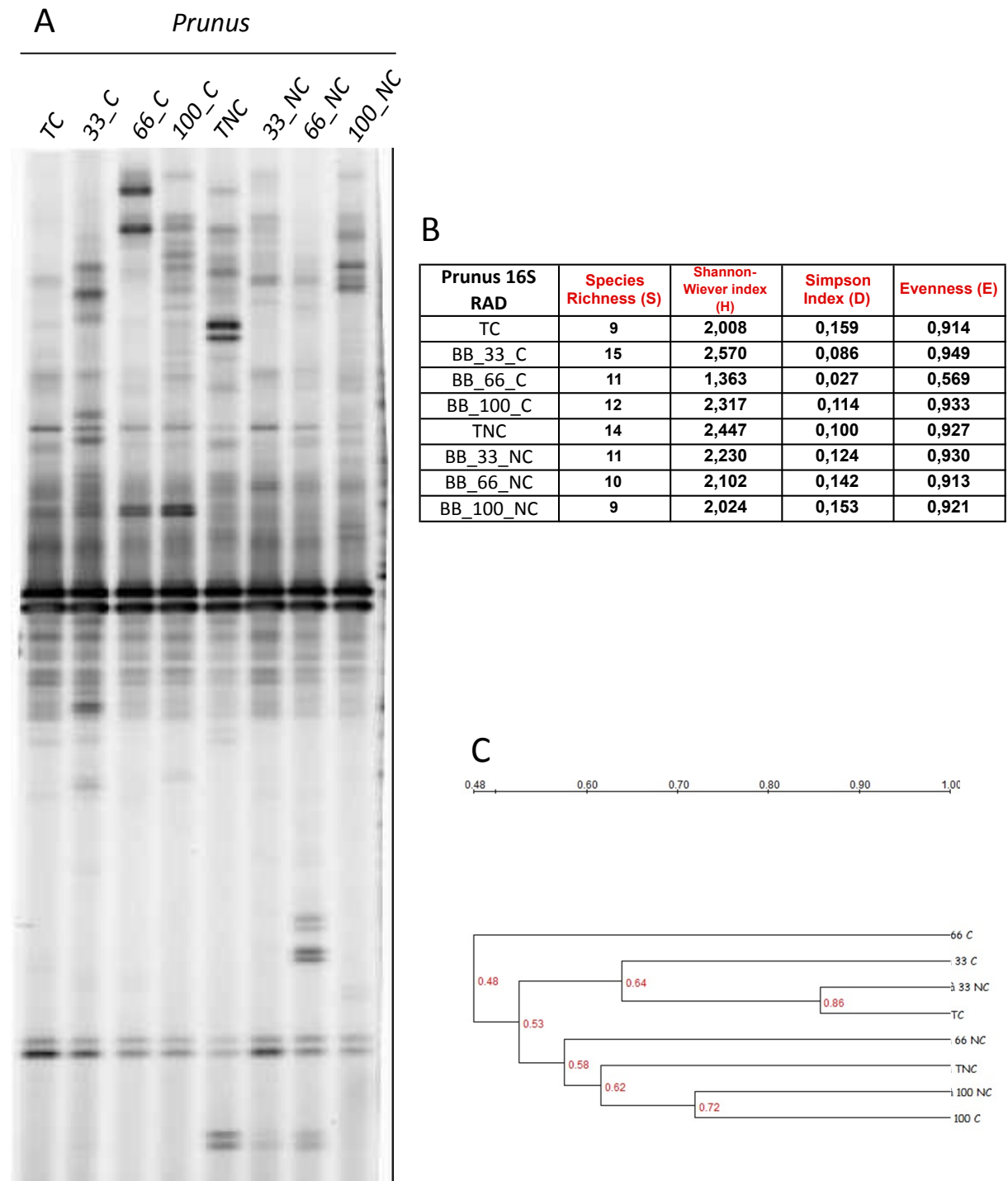


Fig. 66. A *fingerprints* DGGE delle comunità batteriche endofitiche delle radici prelevate dalle piante di *Prunus* coltivate, con e senza concimazione chimica, in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%). B, indici ecologici di biodiversità elaborati analizzando i *fingerprint* di ciascuna comunità batterica riportati in A. C, dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* riportati in A, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*)

Per quanto riguarda *Viburnum*, gli effetti della sostituzione della torba con quantità crescenti di compost erano differenti. Quando si procedeva con la concimazione minerale, la biodiversità della comunità veniva stimolata dai substrati contenenti compost, presentando dei valori di S e H sempre più elevati rispetto al controllo. In particolare, quando la torba veniva sostituita per il 33% da compost, le popolazioni endofitiche presentavano i più alti valori di S e H pari a 16 e 2,533, rispettivamente, mentre i valori relativi al controllo erano 10 e 2,055. L'effetto opposto si aveva in assenza di concime: la diversità delle comunità batteriche diminuiva rispetto a quelle delle radici appartenenti alle piante controllo, con gli indici S e H che raggiungevano valori minimi quando la torba era sostituita con il 66% di compost (indici S e H pari a 12 e 2,262 nel controllo e pari a 7 e 1,734 nel 66% compost).

Anche in *Prunus* le comunità endofitiche presentavano un *trend* simile. In presenza di concime, infatti, si registrava un incremento degli indici S e H con valori massimi (15 e 2,570) quando la torba veniva sostituita per il 33% da compost di sansa, mentre i valori del controllo erano 9 e 2,008. In assenza di concimazione, invece, similmente a quanto accadeva in *Viburnum*, la biodiversità degli endofiti era inibita dal compost: i valori S e H passavano da 14 e 2,447 nel controllo, a 9 e 2,023 quando soltanto il compost era utilizzato nella formulazione del substrato.

Nel caso dei batteri endofitici presenti nelle radici non era quindi possibile trovare, in nessuna pianta analizzata, una chiara correlazione tra la quantità di compost utilizzato nella formulazione dei substrati da invasatura e i valori degli indici di biodiversità.

L'analisi della similarità fra profili DGGE, rappresentata graficamente con i dendrogrammi riportati nei pannelli C di ciascuna figura, evidenziava che solo in alcuni casi substrati da invasatura diversi presentavano comunità batteriche simili.

Nel caso di *Cupressus* era possibile osservare una similarità di quasi l'80% tra le comunità endofitiche delle piante coltivate con solo compost. Inoltre, l'unico altro *cluster* che poteva essere definito da una similarità superiore al 70% era quello che raggruppava i campioni prelevati da i substrati con 33 e 66% di compost, indipendentemente dalla concimazione.

In *Viburnum* il dendrogramma illustrava come non si avessero comunità molto differenti fra radici delle piante controllo e quelle coltivate con compost. Tuttavia, è interessante notare che i due substrati con 33 e 66% di compost, in presenza di concime, venivano a trovarsi nel medesimo *cluster* ed erano quindi caratterizzati da comunità endofitiche molto simili (78,4%). Stessa cosa avveniva nel caso delle comunità endofitiche delle piante coltivate con 33 e 66% di compost in assenza di concime (similarità del 82,5%).

In *Prunus* si osservavano delle similarità elevate tra le comunità presenti nelle radici delle piante che erano coltivate con solo compost (72%), sia in assenza che in presenza di concime. L'analisi delle similarità tra le comunità batteriche presenti nei campioni prelevate dai diversi substrati da invasatura, permetteva di ipotizzare se ci fossero possibili relazioni tra gli effetti dell'utilizzo di compost sui batteri del suolo o su quelli endofitici delle radici e la crescita della pianta. Per prima cosa, è importante notare che l'utilizzo del compost aveva effetti maggiori sulla struttura della comunità del suolo che su quella degli endofiti radicali. Dalla tabella 20 è infatti possibile evincere che il *range* di similarità tra le comunità presenti nei campioni prelevati dai substrati con compost e i rispettivi controlli con solo torba, fosse più basso nel suolo (14,3–53,9%) che nelle radici (37,2–83,4%).

Tab. 20. Effetti dei substrati contenenti compost sulla crescita della pianta e sulle comunità batteriche del suolo ed endofitiche delle radici.

Campione		Crescita (differenza peso con controllo)	Effetti sulla comunità (similarità con controllo)	
			Batteri Suolo	Batteri Radici
<i>Cupressus</i>	33_C	+ 67% (*)	32,7	51,0
	66_C	+ 101% (*)	39,5	37,2
	100_C	+ 38%	38,4	42,3
	33_NC	0%	43,4	61,2
	66_NC	+ 10%	32,1	60,7
	100_NC	+ 15%	30,0	58,1
<i>Viburnum</i>	33_C	+ 42% (*)	46,2	83,4
	66_C	+ 46% (*)	15,4	78,4
	100_C	- 8%	15,2	63,1
	33_NC	+ 24% (*)	38,0	64,8
	66_NC	+ 26% (*)	29,1	73,4
	100_NC	+ 22%	17,7	75,3
<i>Prunus</i>	33_C	+ 22%	53,9	63,6
	66_C	+ 65% (*)	38,1	46,8
	100_C	+ 21%	26,8	61,4
	33_NC	- 4%	26,2	44,8

	66_NC	+ 32% (*)	21,7	51,3
	100_NC	+ 22%	14,3	66,4

(*) indica un incremento di peso significativo ($p < 0,05$)

Limitando quest'analisi ai soli trattamenti che portavano ad un significativo incremento in peso della pianta, si osserva che la media delle similarità era significativamente inferiore nel suolo (32,6%) che nelle radici (60,8%). Tuttavia, solo nel caso dei batteri endofitici era possibile notare che le strutture delle comunità corrispondenti ai trattamenti che portavano ad incrementi di peso significativi mostravano alte similarità e quindi si raggruppavano nel medesimo *cluster*, come ad esempio il caso di *Cupressus* (33 e 66%, concimato) e *Viburnum* (33 e 66%, concimato e non). Inoltre, nel caso dei batteri endofitici, era possibile rilevare una significativa correlazione (negativa) tra gli incrementi di peso e le similarità delle comunità batteriche rispetto al controllo (Fig. 67) che indicava come all'aumentare dell'impatto dei compost su queste comunità batteriche ci fosse una stimolazione della crescita della pianta. Questa evidenza sperimentale permetteva di ipotizzare che l'utilizzo di compost, seppur causasse un impatto limitato sulla struttura della comunità batteriche delle radici, inducesse delle modificazioni che potevano avere un ruolo nel mediare gli effetti positivi per la crescita delle piante. Al contrario, nel suolo, dove l'utilizzo del compost causava forti modificazioni della biodiversità e della struttura della comunità batterica, non era possibile mettere in evidenza una chiara relazione tra tali modificazioni e gli effetti benefici sulla crescita della pianta.

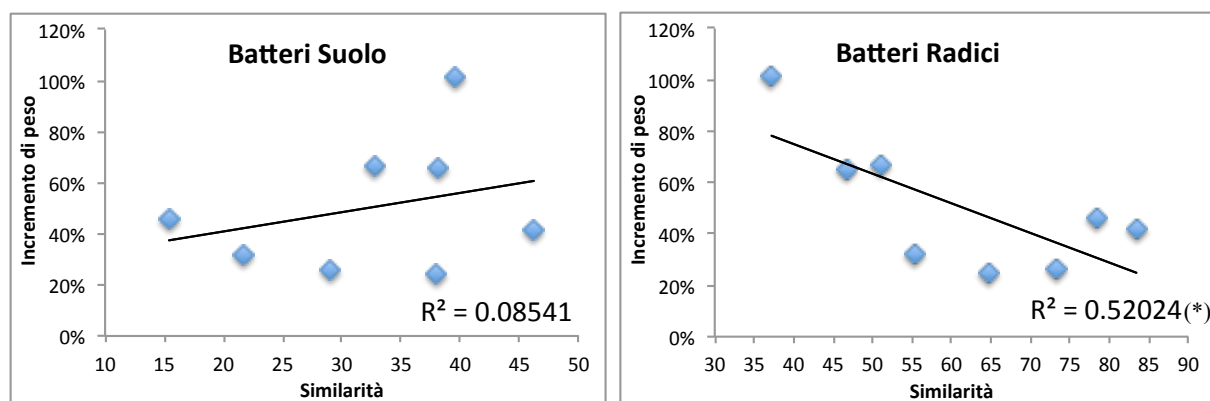


Fig. 67. Correlazione tra gli incrementi in peso delle piante (solo valori significativamente diversi dal controllo) e similarità tra le comunità batteriche presenti nel suolo e nelle radici delle medesime piante

coltivate con i substrati sperimentali rispetto a quelle coltivate nel substrato controllo. (*) indica significatività ($n=8$, $p<0,05$).

Le analisi qPCR del frammento genico del 16S (Fig. 68) non mostravano differenze rilevanti nel numero di batteri fra substrati controllo e quelli contenenti compost di sansa confermando, quindi, che la sostituzione della torba con i compost di sansa non aveva effetti inibitori nella crescita della microflora.

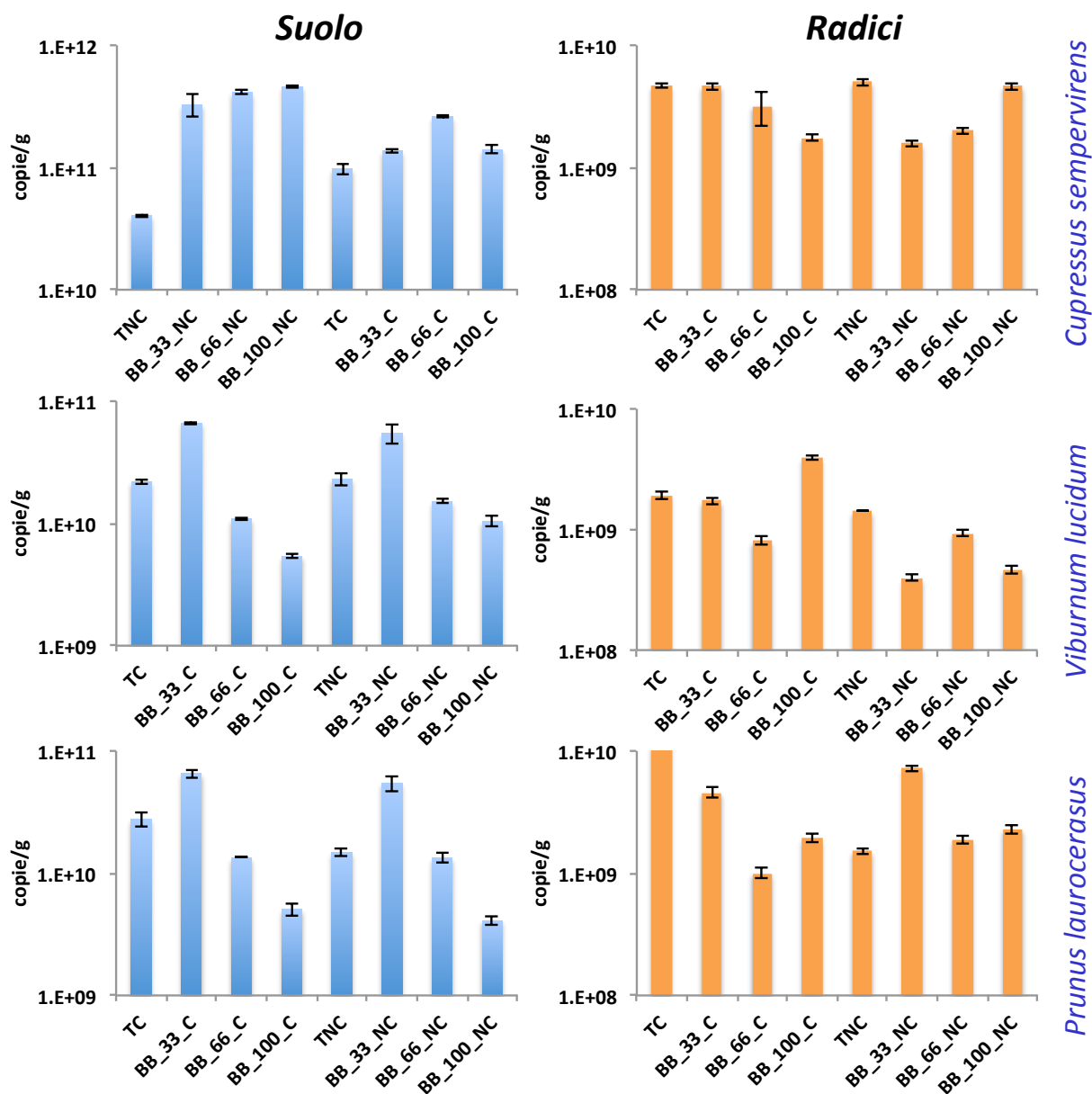


Fig. 68. Abbondanza dei batteri, espressa come copie del gene 16S rRNA, presenti nel suolo e all'interno delle radici di piante coltivate, con e senza concimazione chimica (C e NC), in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%).

Dopo un anno di coltivazione sono stati approfonditi gli effetti del compost di sansa sulle popolazioni batteriche di suolo e radici di *Viburnum* (Fig. 69 e 70). Da questi ulteriori risultati si osservava che, a differenza di quanto accadeva dopo 6 mesi, la biodiversità della comunità del suolo veniva stimolata dal compost con un aumento, rispetto al substrato controllo, dei valori degli indici di biodiversità S e H. Nel comparto delle radici, invece, si confermava il *trend* che si osservava a metà della sperimentazione.

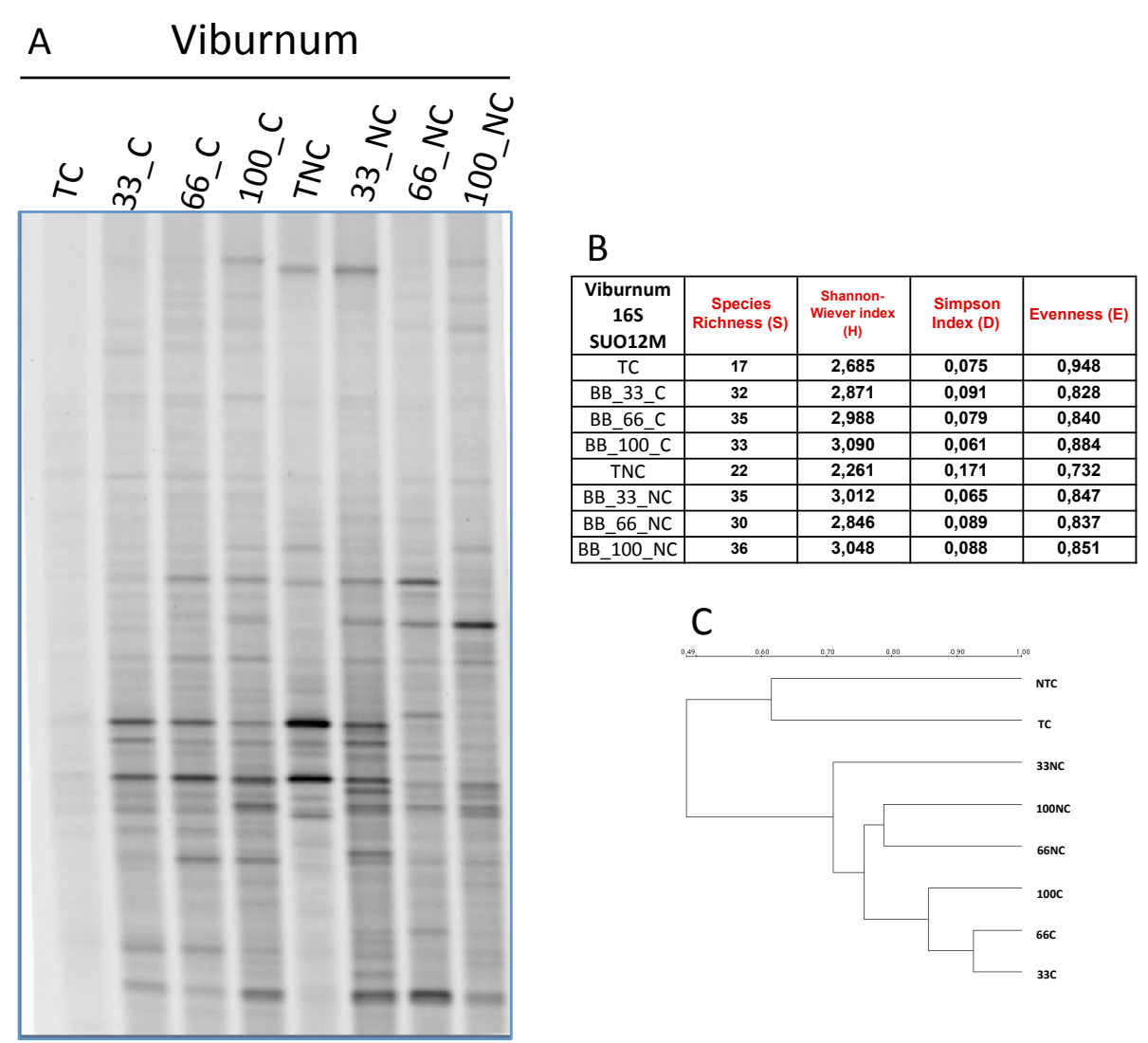


Fig. 69. A *fingerprints* DGGE delle comunità batteriche del suolo delle piante di *Viburnum* coltivate per 12 mesi, con e senza concimazione chimica, in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%). B, indici ecologici di biodiversità elaborati analizzando i *fingerprints* di ciascuna comunità batterica riportati in A. C, dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* riportati in A, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*)

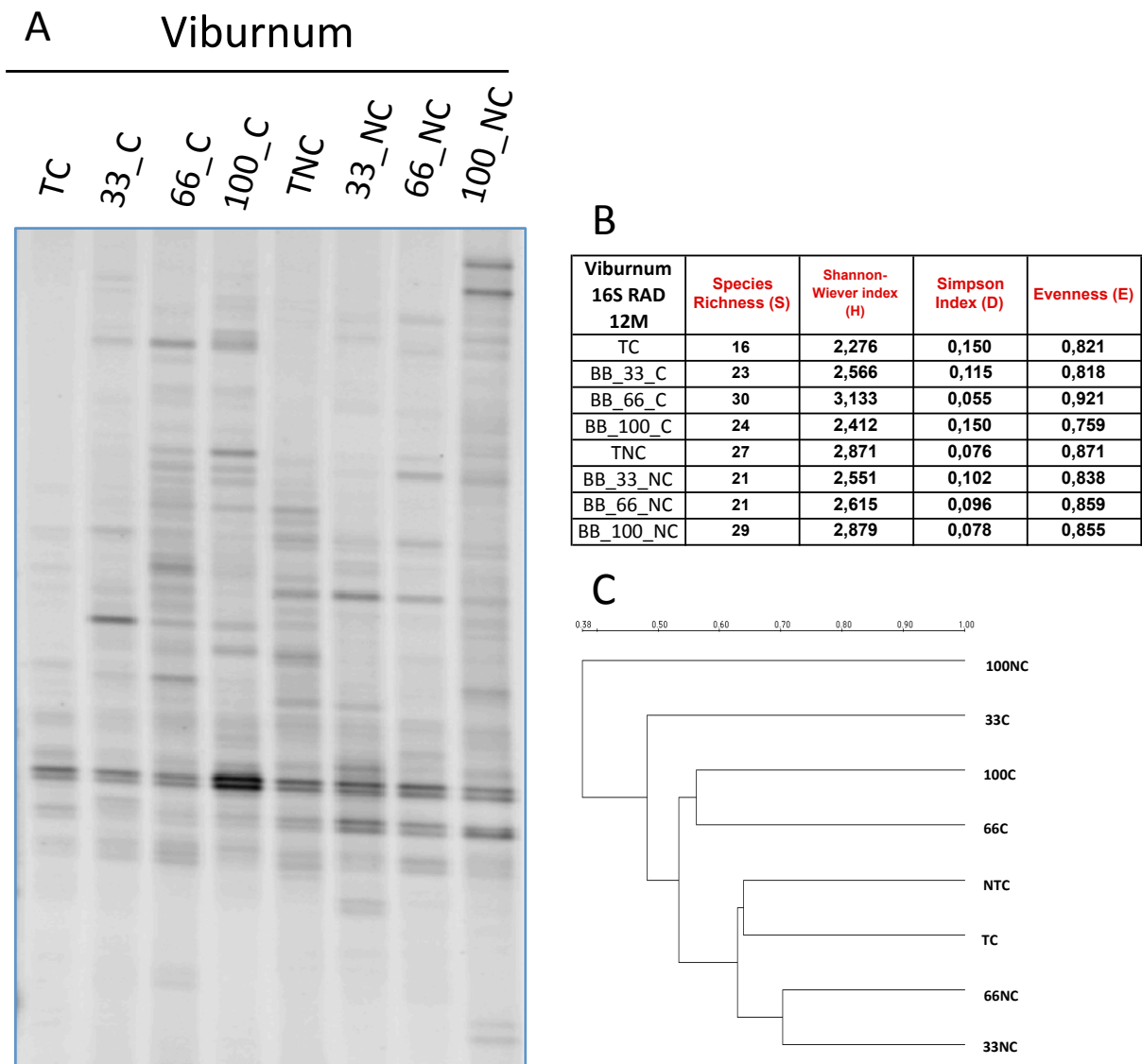


Fig. 70. A *fingerprints* DGGE delle comunità batteriche endofitiche delle radici prelevate dalle piante di *Viburnum* coltivate per 12 mesi, con e senza concimazione chimica, in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%). B, indici ecologici di biodiversità elaborati analizzando i *fingerprints* di ciascuna comunità batterica riportati in A. C, dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* riportati in A, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*)

4.3.4 Effetti sulle comunità fungine di suolo e radici.

Lo studio degli effetti della sostituzione della torba con compost di sansa sulla comunità fungina del suolo e delle radici è stato approfondito, come per le popolazioni batteriche, attraverso il medesimo approccio molecolare utilizzato per quelle fungine.

Nelle figure 71, 72 e 73 vengono mostrati i *fingerprint* di comunità relativi alle popolazioni fungine del suolo di *Cupressus sempervirens*, *Viburnum lucidum* e *Prunus laurocerasus* (pannello A), gli indici ecologici di biodiversità (pannello B) e l'analisi di similarità fra profili rappresentata dai dendrogrammi (pannello C).

L'analisi di *Cupressus* evidenziava che la presenza di compost all'interno dei substrati da invasatura influenzava la biodiversità, incrementando i valori di *Richness* (S) e Shannon-Weaver (H) che passavano, in presenza di concimazione, da 29 e 3,056 rispettivamente nel suolo controllo, ad un massimo di 35 e 3,183 in corrispondenza del substrato in cui la torba era stata sostituita per il 66% dal compost di sansa. Un effetto ancora più marcato si osservava per le tesi non concimate in cui l'aumento dei valori degli indici ecologici era ancora più evidente, infatti i valori di S e H passavano da 11 e 2,061 del controllo, a 40 e 3,358 quando la torba era sostituita dal 66% di compost.

Nel caso di *Viburnum*, gli effetti dell'aggiunta di differenti quantità di compost di sansa causavano una stimolazione della biodiversità delle popolazioni fungine soltanto nel caso in cui veniva effettuata la concimazione, in particolare, questo era vero solo quando la torba veniva sostituita per il 33% e il 66% da compost presentando valori S e H più elevati (S pari a 19 per entrambe le tesi sperimentali e H pari a 2,799 e 2,763) rispetto al controllo (12 e 2,274). Questa stimolazione, invece, era assente in tutte le tesi quando il concime non veniva aggiunto al substrato.

A differenza delle altre due varietà, l'analisi della comunità fungina presente nel suolo di *Prunus*, indicava che i substrati da invasatura non influivano in nessun caso sulle dinamiche delle popolazioni autoctone, mostrando degli indici ecologici i cui valori non differivano da quelli del controllo. L'unica eccezione era data dal substrato in cui era presente il 33% di compost in sostituzione della torba, in assenza di concime, che presentava dei valori di *Richness* e di Shannon (9 e 1,773, rispettivamente) inferiori a quelli del suolo controllo (14 e 2,423).

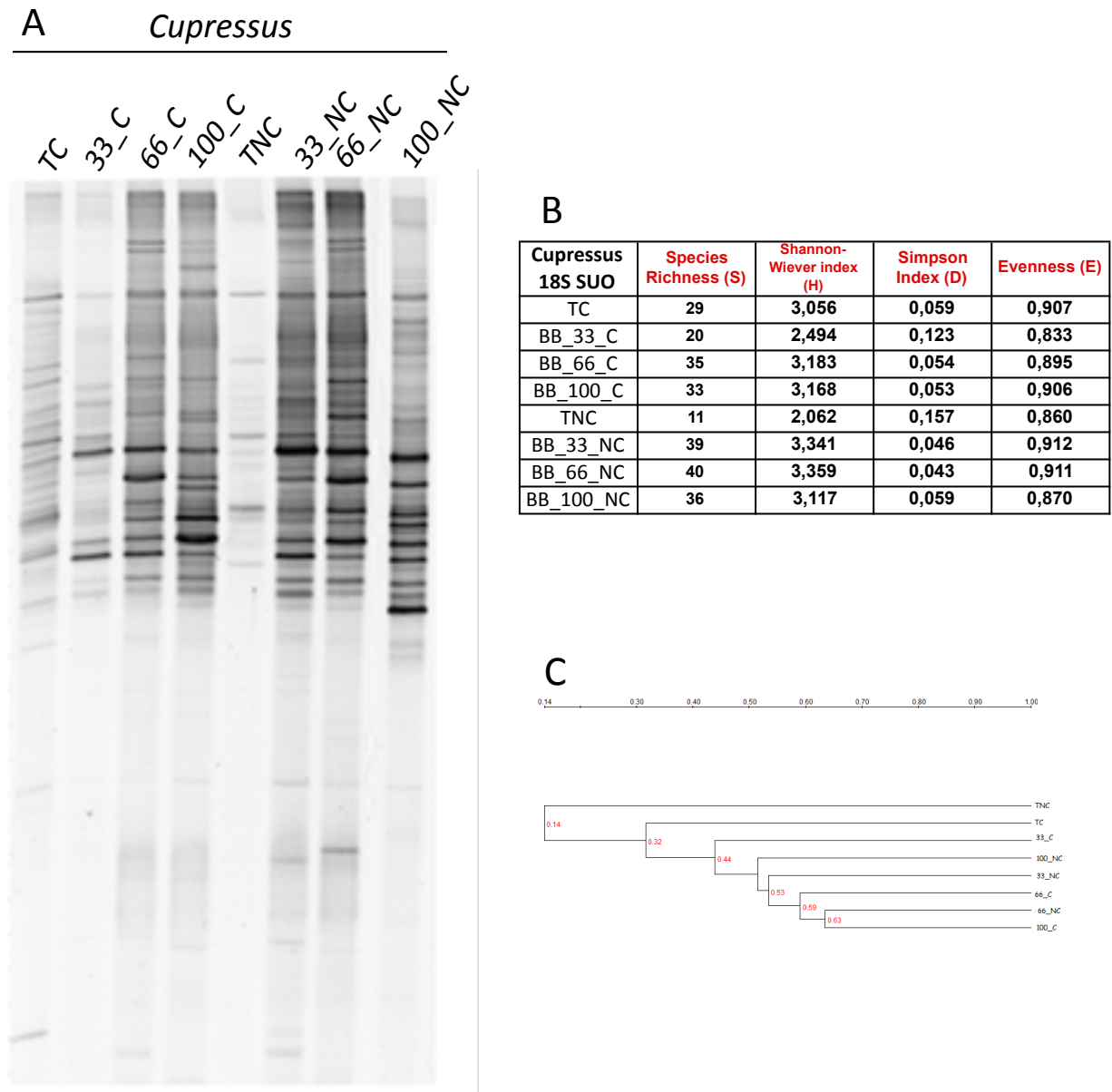


Fig. 71. A, *fingerprints* DGGE delle comunità fungine presenti nei suoli di piante di *Cupressus* coltivate, con e senza concimazione chimica, in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%). B, indici ecologici di biodiversità elaborati analizzando i *fingerprints* di ciascuna comunità batterica riportati in A. C, dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* riportati in A, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*).

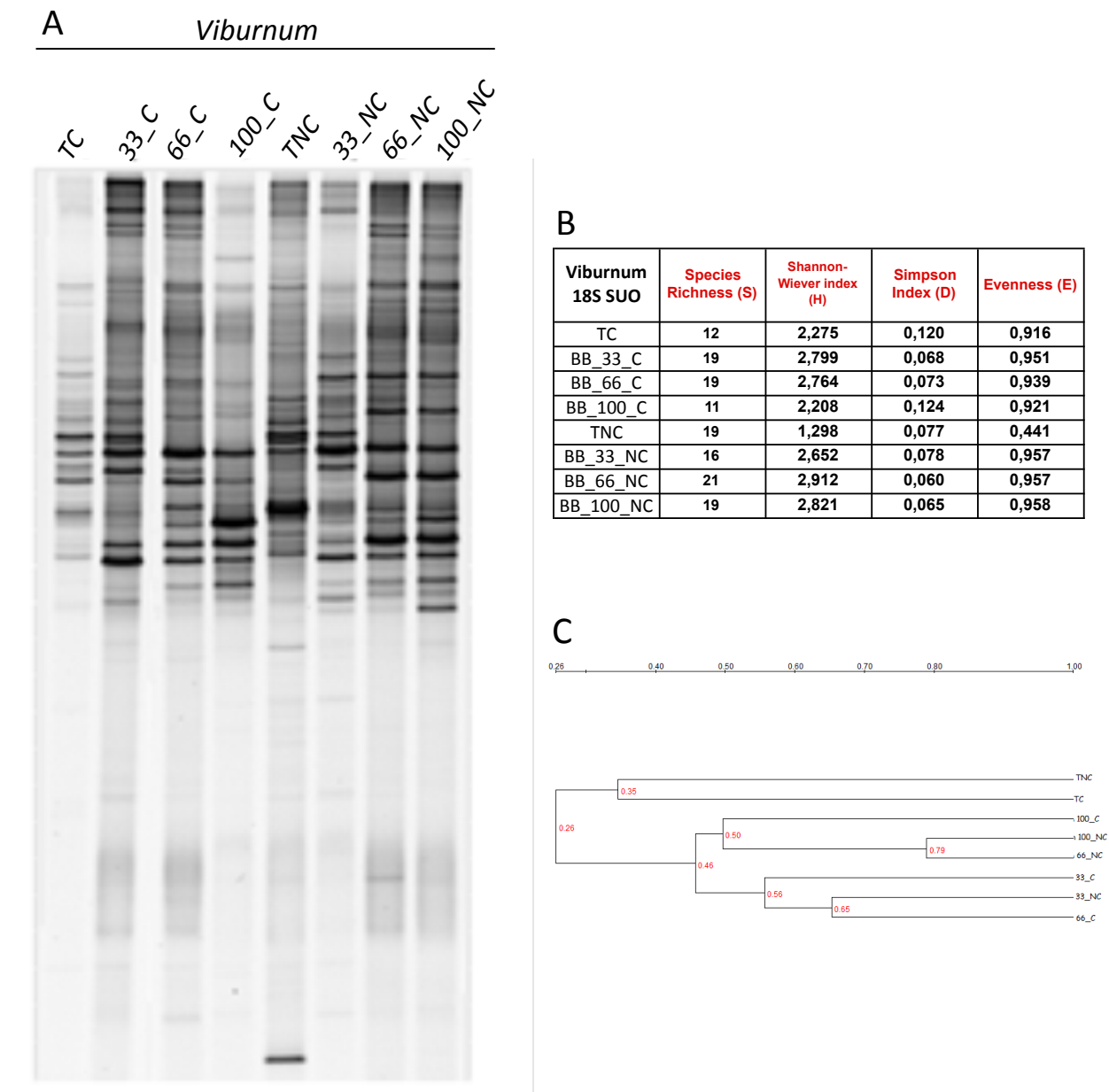


Fig. 72. A, *fingerprints* DGGE delle comunità fungine presenti nei suoli di piante di *Viburnum* coltivate, con e senza concimazione chimica, in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%). B, indici ecologici di biodiversità elaborati analizzando i *fingerprints* di ciascuna comunità batterica riportati in A. C, dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* riportati in A, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*).

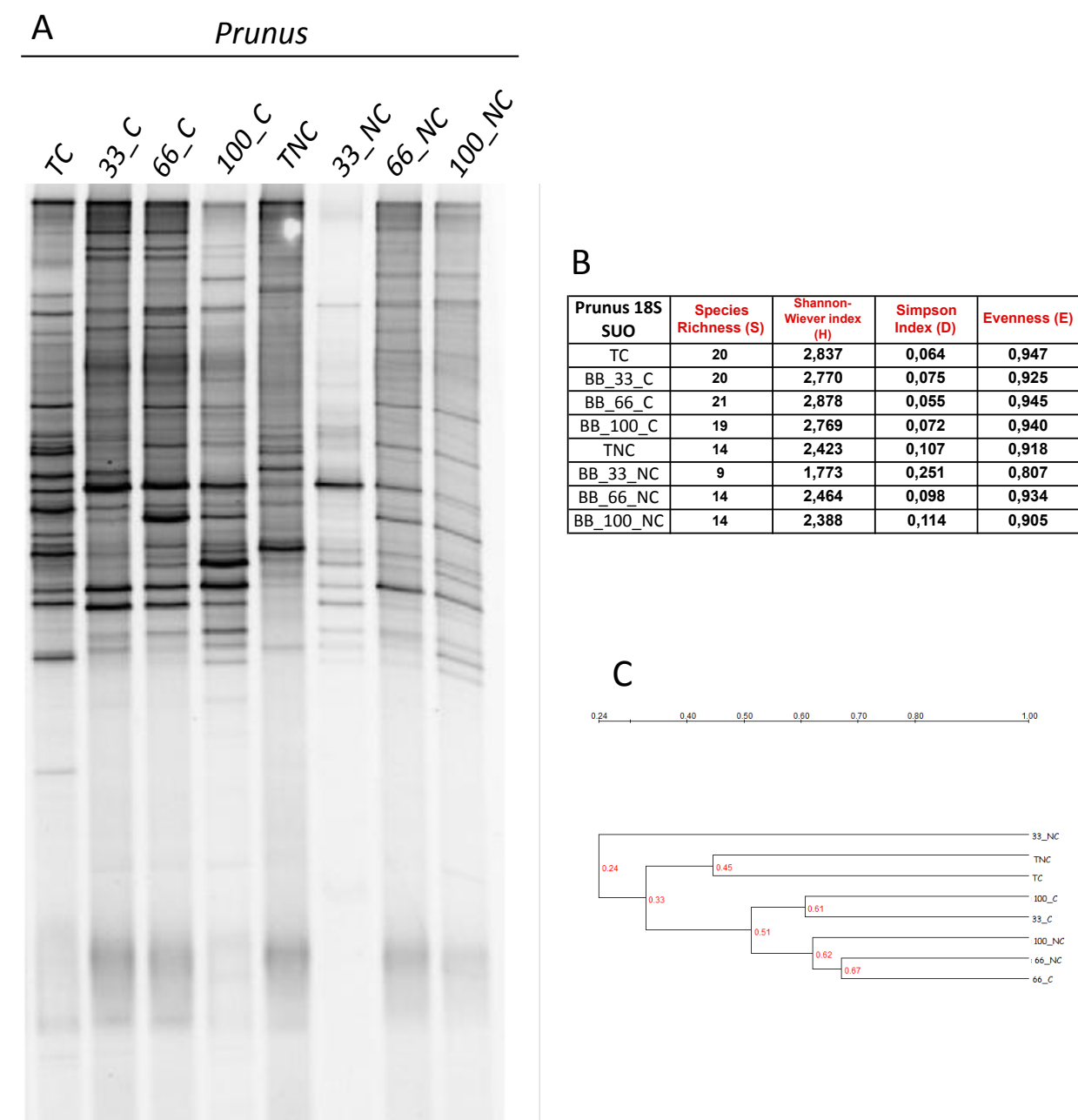


Fig. 73. A, *fingerprints* DGGE delle comunità fungine presenti nei suoli di piante di *Prunus* coltivate, con e senza concimazione chimica, in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%). B, indici ecologici di biodiversità elaborati analizzando i *fingerprints* di ciascuna comunità batterica riportati in A. C, dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* riportati in A, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*).

L'analisi della similarità fra profili delle comunità era rappresentata dai dendrogrammi presentati nei pannelli C delle tre figure. In *Cupressus* si evidenziava che la comunità presente nel suolo delle piante controllo era molto diversa, specialmente in assenza di concime, da tutte le altre. Inoltre, le comunità presenti nel suolo di piante coltivate con diverse quantità di compost presentavano similarità limitate (da un minimo del 44% ad un massimo del 63%). Nel caso di *Viburnum* si osservava che le comunità presenti nel suolo delle piante controllo erano molto differenti da quelle presenti nelle piante coltivate in presenza di compost (similarità pari al 26%). Tra quest'ultime, tuttavia, le similarità erano limitate (tra il 45 e il 65%), fatta eccezione per i substrati con 66 e 100% di compost, senza concime, che presentavano una similarità del 79%. La situazione era simile in *Prunus*, dove le tesi con compost presentavano una similarità con quelle controllo del 33% e tra loro similarità comprese tra il 51 e il 67%. Unica eccezione era rappresentata dal suolo in cui era presente 33% di compost, senza di concimazione, il cui profilo DGGE aveva una bassa similarità (24%) con tutti gli altri.

L'analisi DGGE relativa alle popolazioni fungine delle radici è mostrata nelle figure 74, 75 e 76.

Gli indici di biodiversità delle popolazioni fungine presenti nelle radici delle piante cresciute in presenza dei substrati con compost non mostravano grandi variazioni rispetto al controllo e tra loro, ad indicare come l'utilizzo di quantità crescenti di compost non avesse un impatto sul numero di specie endofitiche. Unica eccezione, le radici delle piante di *Prunus* coltivate con il 33% e 66% di compost in assenza di concime, in cui il valore degli indici S e H cresceva: da 6 e 1,644 nel controllo a 15 e 2,400 e 13 e 2,287.

I dendrogrammi di similarità erano mostrati nei pannelli C delle figure sopra presentate. In *Cupressus* si osservava un'elevata similarità fra le comunità endofitiche delle piante coltivate, indipendentemente dalla concimazione, con il 33% di compost (69%) che formavano un cluster distinto. E', inoltre interessante notare che in questa pianta, quando veniva utilizzato il substrato con il 66% di compost, con concimazione, la comunità endofitica rimaneva alquanto simile al controllo (50,4%). In *Viburnum*, si potevano osservare due *cluster* che raggruppavano le comunità di piante coltivate con compost: quello formato dai profili relativi ai substrati 33 e 66% di compost con concime (similarità del 41%) e quello con 100% compost (similarità del 48%). In *Prunus* le comunità presenti nelle piante coltivate con substrati controllo formavano un *cluster* distinto con basse similarità con tutti gli altri profili

(inferiore al 15%). Inoltre, le comunità endofitiche delle piante coltivate con solo compost e quelle con 33 e 66% di compost formavano due *cluster* ben distinti.

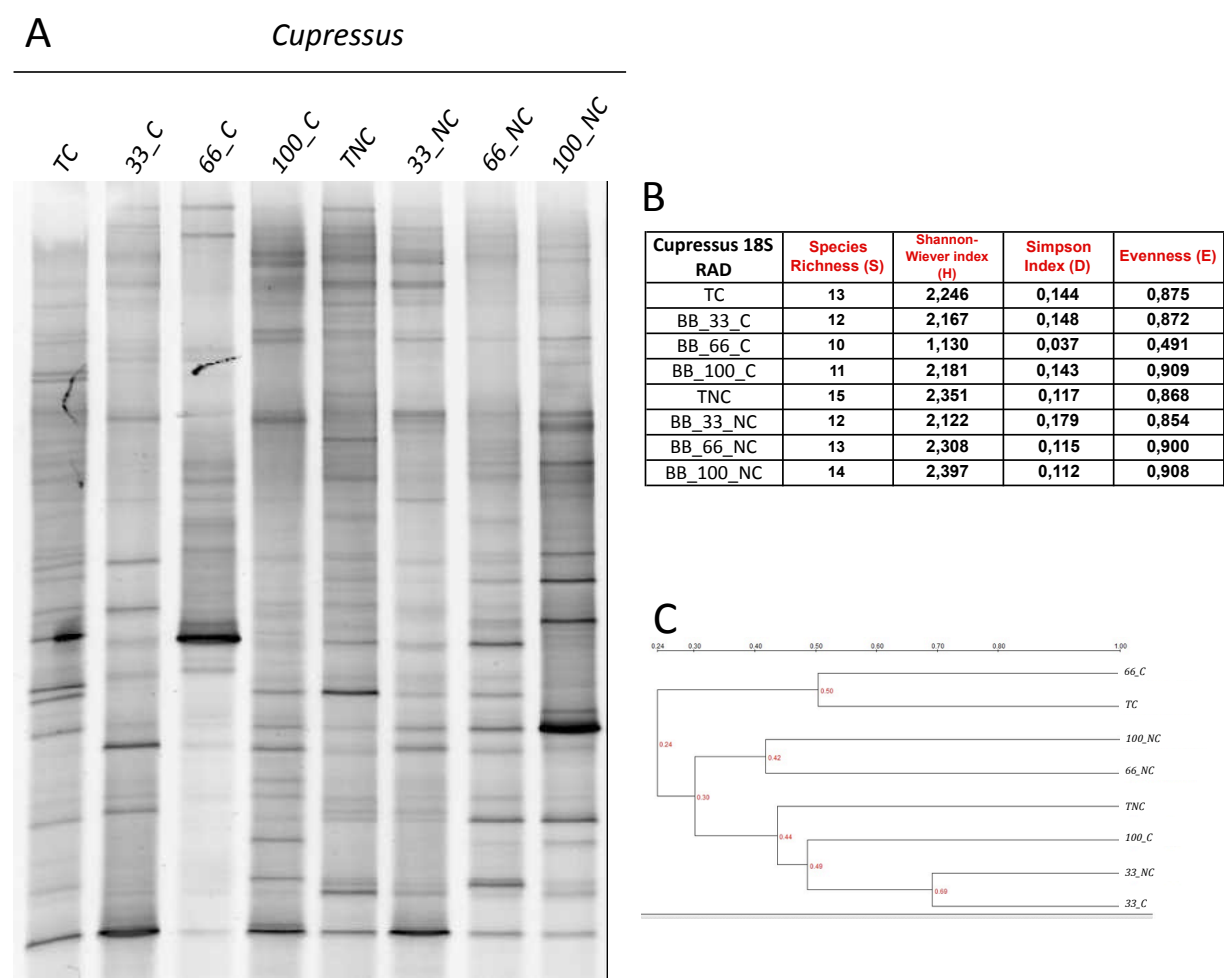


Fig. 74. A *fingerprints* DGGE delle comunità fungine endofitiche delle radici prelevate dalle piante di *Cupressus* coltivate, con e senza concimazione chimica, in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%). B, indici ecologici di biodiversità elaborati analizzando i *fingerprint* di ciascuna comunità batterica riportati in A. C, dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* riportati in A, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*)

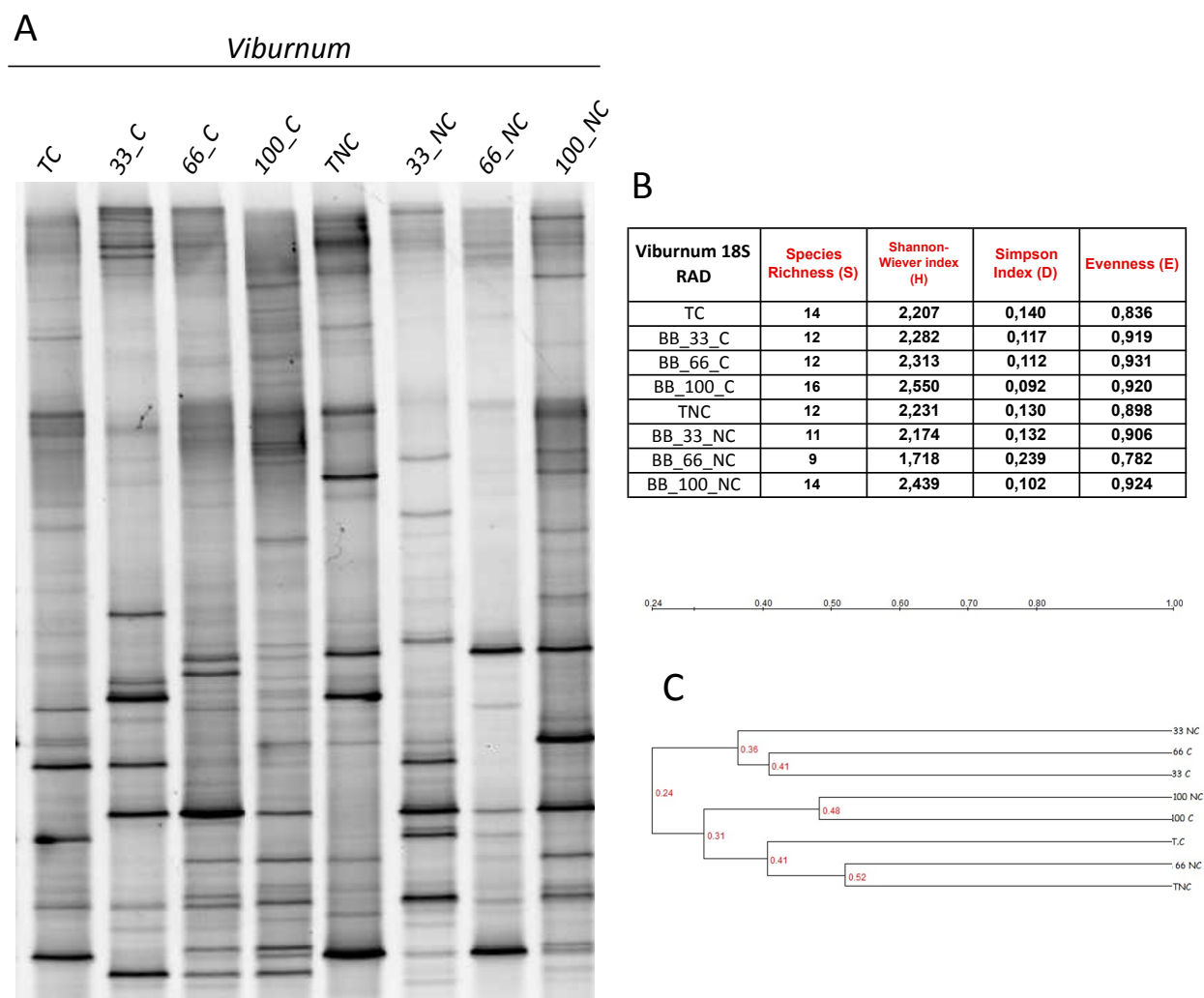


Fig. 75. A *fingerprints* DGGE delle comunità fungine endofitiche delle radici prelevate dalle piante di *Viburnum* coltivate, con e senza concimazione chimica, in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%). B, indici ecologici di biodiversità elaborati analizzando i *fingerprint* di ciascuna comunità batterica riportati in A. C, dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* riportati in A, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*)

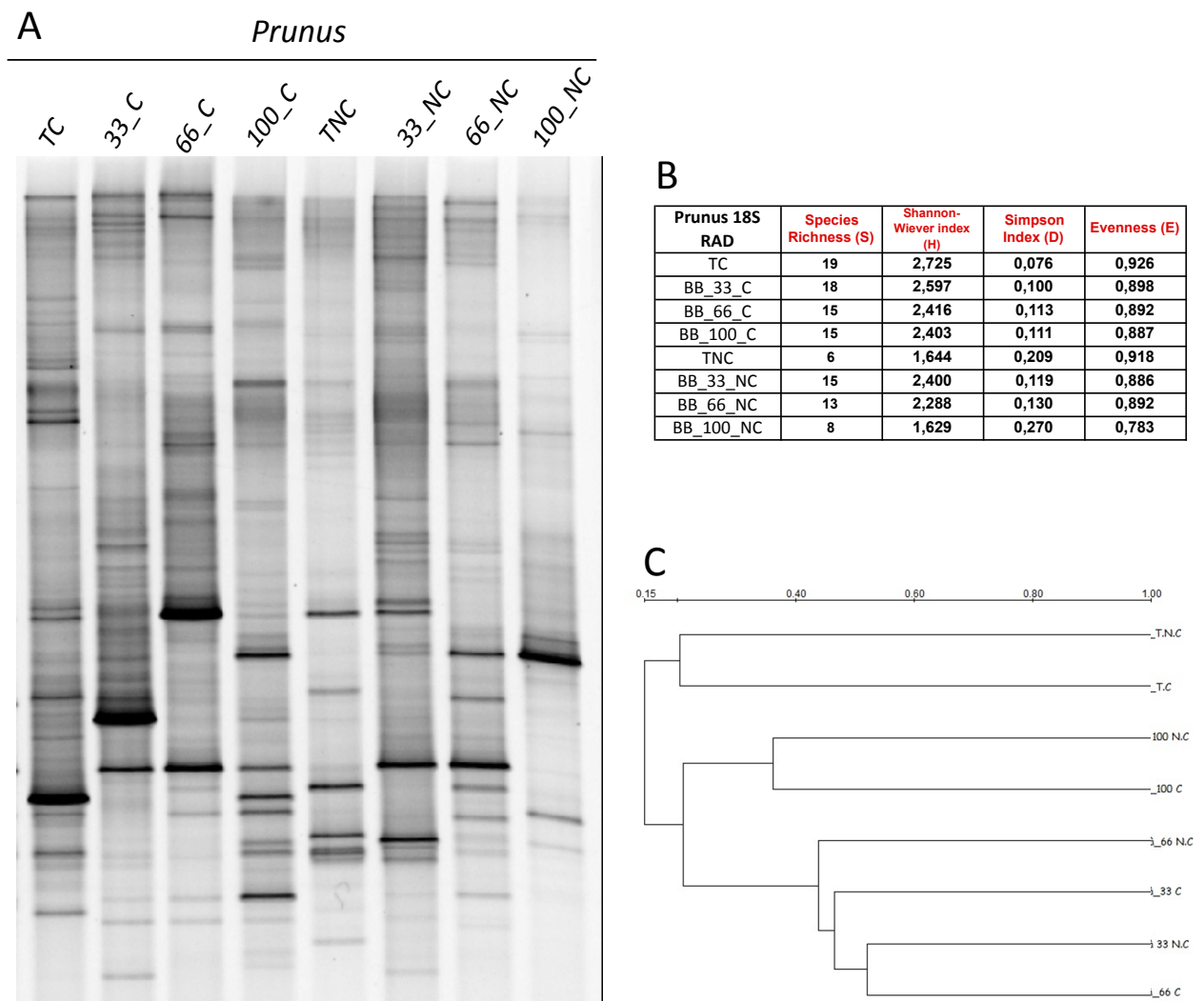


Fig. 76. A *fingerprints* DGGE delle comunità fungine endofitiche delle radici prelevate dalle piante di *Prunus* coltivate, con e senza concimazione chimica, in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%). B, indici ecologici di biodiversità elaborati analizzando i *fingerprints* di ciascuna comunità batterica riportati in A. C, dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* riportati in A, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*)

Per valutare l'esistenza di possibili relazioni tra gli effetti dell'utilizzo di compost sulle comunità fungine del suolo o su quelle delle radici e la crescita della pianta, è utile analizzare se i substrati da invasatura che portavano ad un significativo aumento della biomassa vegetale avessero comunità fungine simili tra loro e comunque differenti rispetto al controllo (Tab. 21) e agli altri substrati.

Tab. 21. Effetti dei substrati contenenti compost sulla crescita della pianta e sulle comunità fungine del suolo ed endofitiche delle radici.

Campione		Crescita (differenza peso con controllo)	Effetti sulla comunità (similarità con controllo)	
			Funghi Suolo	Funghi Radici
<i>Cupressus</i>	33_C	+ 67% (*)	33,0	23,2
	66_C	+ 101% (*)	39,0	50,4
	100_C	+ 38%	32,4	18,5
	33_NC	0%	22,5	54,1
	66_NC	+ 10%	7,8	42,5
	100_NC	+ 15%	10,1	17,9
<i>Viburnum</i>	33_C	+ 42% (*)	34,5	21,6
	66_C	+ 46% (*)	31,5	15,6
	100_C	- 8%	20,2	27,9
	33_NC	+ 24% (*)	42,9	8,5
	66_NC	+ 26% (*)	17,3	52,1
	100_NC	+ 22%	14,8	37,7
<i>Prunus</i>	33_C	+ 22%	50,6	13,1
	66_C	+ 65% (*)	37,8	11,5
	100_C	+ 21%	31,5	29,4
	33_NC	- 4%	15,9	27,4
	66_NC	+ 32% (*)	28,6	14,5
	100_NC	+ 22%	25,7	2,1

(*) indica un incremento di peso significativo ($p < 0,05$).

In realtà, questa evenienza si verificava in modo abbastanza chiaro solo in un numero molto limitato dei casi analizzati. In particolare, nel caso dei funghi presenti nel suolo di *Viburnum* le comunità relative a tre substrati che stimolavano significativamente la crescita della pianta (33 e 66% concimati e 33% non concimato) avevano similarità con il controllo paragonabili (comprese tra il 31,5 e il 42,9%) e comunità simili tra loro, come testimoniato dall'appartenenza allo stesso *cluster* nel dendrogramma. Tuttavia, nella medesima pianta, le comunità dei funghi endofitici presentavano un comportamento simile solo per due substrati che stimolavano significativamente la crescita (33 e 66% concimati). Quindi, a differenza di quanto osservato per i batteri endofitici, non era possibile trovare una chiara correlazione tra l'impatto sulla struttura delle comunità e la stimolazione della crescita delle piante.

Gli effetti della sostituzione della torba sulla crescita dei funghi presenti nel suolo e nelle radici, erano analizzati con la quantificazione qPCR del frammento genico ITS (Fig. 77). Come osservato nel caso dei batteri, i funghi non erano inibiti dall'utilizzo di compost. Tuttavia, il compost non sembrava nemmeno stimolare la crescita in modo rilevante.

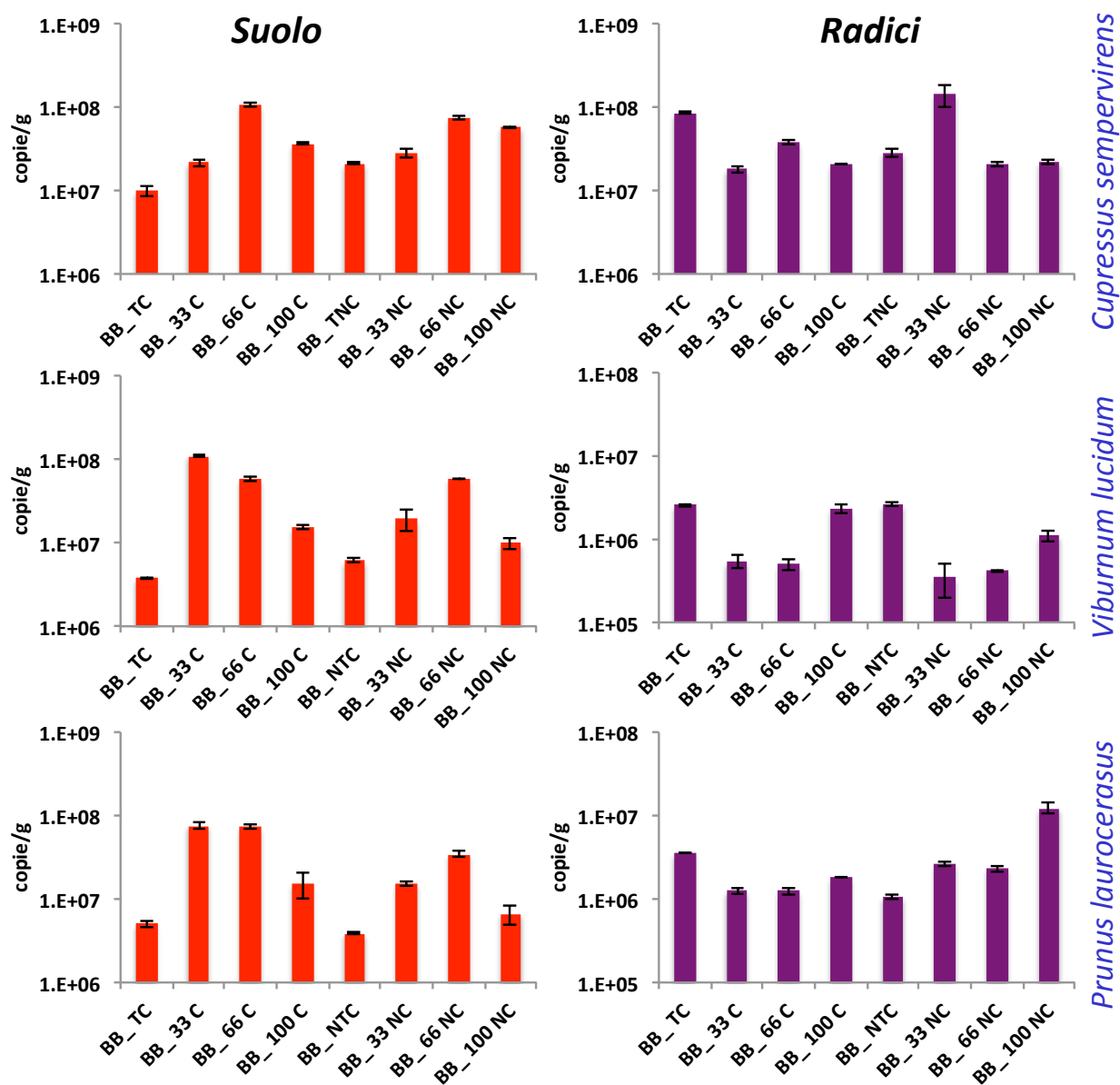


Fig. 77. Abbondanza dei funghi, espressa come copie del frammento ITS, presenti nel suolo e all'interno delle radici di piante coltivate, con e senza concimazione chimica (C e NC), in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%).

Dopo 12 mesi dall'invasatura, era stata approfondita l'influenza di questi substrati solo nelle piante della varietà *Viburnum* (Fig. 78 e 79). Gli indici di biodiversità indicavano che solo nei substrati in cui la torba veniva sostituita per 33% e il 66% da compost, in assenza di concimazione, era possibile osservare effetti significativi sulle comunità fungine presenti nel suolo, in cui i valori di S e H aumentavano rispetto al controllo. Nelle radici, invece, non si evidenziavano differenze quando veniva utilizzato il compost al posto della torba, similmente a quanto accadeva dopo 6 mesi.

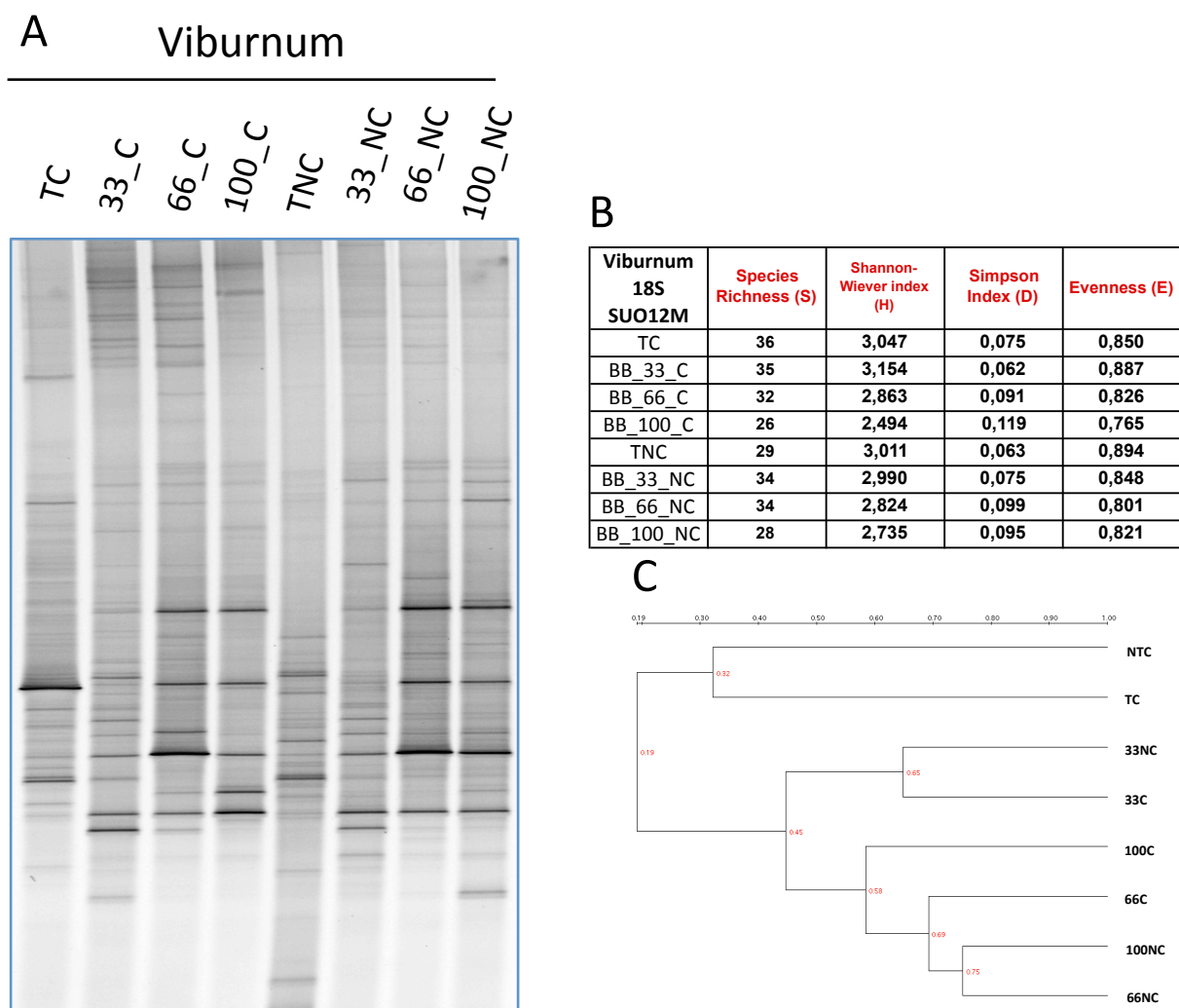
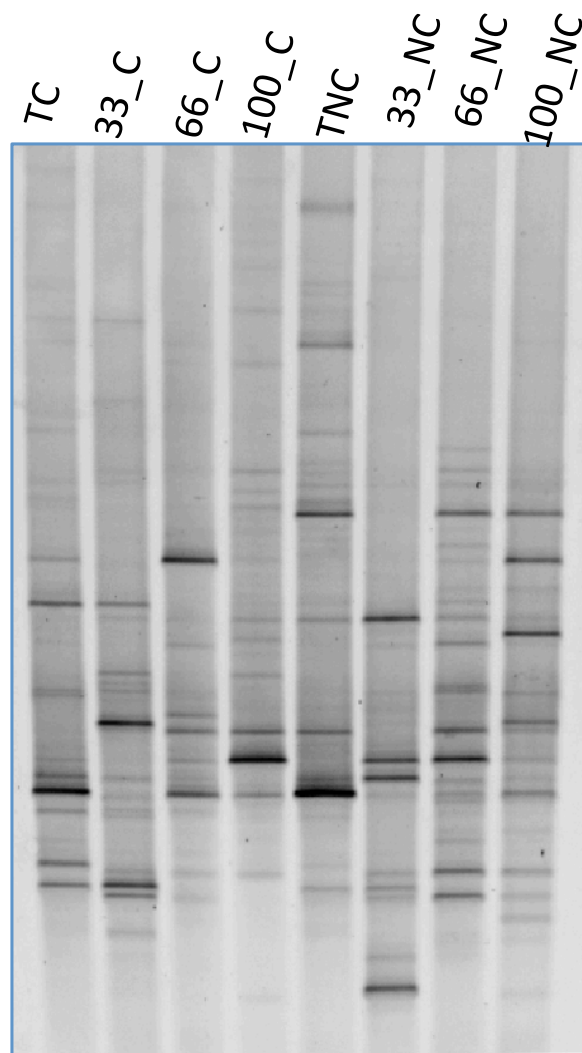


Fig. 78. A *fingerprints* DGGE delle comunità fungine del suolo delle piante di *Viburnum* coltivate per 12 mesi, con e senza concimazione chimica, in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%). B, indici ecologici di biodiversità elaborati analizzando i *fingerprints* di ciascuna comunità batterica riportati in A. C, dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* riportati in A, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*)

A Viburnum



B

Viburnum 18S RAD12M	Species Richness (S)	Shannon- Wiener index (H)	Simpson Index (D)	Evenness (E)
TC	18	2,362	0,132	0,817
BB_33_C	16	2,324	0,138	0,838
BB_66_C	11	1,903	0,198	0,794
BB_100_C	16	2,149	0,198	0,775
TNC	19	2,344	0,143	0,796
BB_33_NC	12	1,996	0,167	0,803
BB_66_NC	20	2,608	0,096	0,871
BB_100_NC	18	2,457	0,112	0,850

C

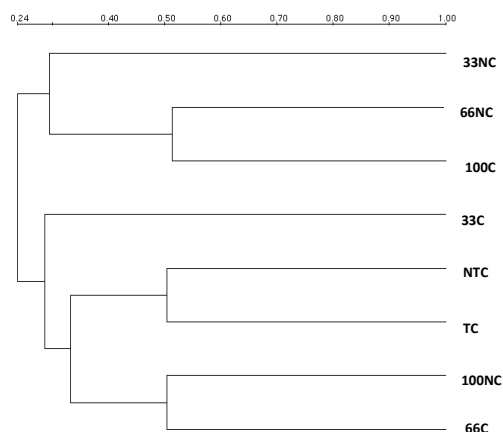


Fig. 79. A *fingerprints* DGGE delle comunità fungine endofitiche delle radici prelevate dalle piante di *Viburnum* coltivate per 12 mesi, con e senza concimazione chimica, in substrati da invasatura con solo torba (TC e TNC) e con compost di sansa in sostituzione della torba in quantità crescenti (33_C e 33_NC = 33%; 66_C e 66_NC = 66%; 100_C e 100_NC = 100%). B, indici ecologici di biodiversità elaborati analizzando i *fingerprints* di ciascuna comunità batterica riportati in A. C, dendrogramma di similarità tra i *fingerprints* riportati in A, costruito usando il metodo WPGMA (*Weighted Pair Group Method with Arithmetic means*)

5. DISCUSSIONE

Il presente lavoro di Dottorato ha preso in esame gli aspetti microbiologici del riciclo e valorizzazione dei sottoprodotti derivanti dalle attività agro-industriali ed in particolare quelli prodotti dall'industria olearia. Nel bacino del Mediterraneo l'attività di estrazione dell'olio d'oliva genera una grande quantità di scarti che possono rappresentare, se non smaltiti in modo corretto, una fonte di contaminazione ambientale (Roig et al. 2009). E', quindi, necessario definire e ottimizzare strategie di smaltimento e riciclo in grado di valorizzare questi scarti trasformandoli in risorsa (Federici et al. 2009). Il riutilizzo in agricoltura dei sottoprodotti di frantoio, come il diretto spandimento in campo, è una pratica diffusa e regolamentata da appropriate norme stabilite dai governi nazionali. Molti sottoprodotti agro-industriali, incluse le sanse, possono inoltre essere sottoposti al processo di compostaggio, trasformandoli in ammendante organico ricco di nutrienti per il suolo (Albuquerque et al. 2007, Ntougias et al. 2013). La trasformazione delle sanse in compost di qualità rappresenta la trasformazione di questo scarto in un prodotto a valore aggiunto, perché può essere utilizzato, non solo come semplice ammendante agrario, ma come substrato da invasatura nella coltivazione di piante su larga scala effettuata dalle aziende del settore floro-vivaistico in sostituzione della torba o di altro materiale organico-minerale (Papafotiou et al. 2004, Altieri et al. 2010). Questo può contribuire a ridurre i crescenti problemi economico - ambientali connessi all'impiego della torba e all'utilizzo di concimi chimici.

Le comunità microbiche del suolo giocano un ruolo chiave nel corretto funzionamento dell'ecosistema suolo-pianta, come, ad esempio, nella disponibilità dei nutrienti, nel mantenimento della struttura del suolo e nella difesa dai patogeni.

Nell'ottica, quindi, della definizione di strategie ottimali per il riciclo e valorizzazione degli scarti di frantoio, assumeva grande importanza verificare, da un punto di vista microbiologico, se la loro incorporazione nel suolo potesse avere conseguenze negative o se, al contrario, questa potesse contribuire al miglioramento delle suddette funzioni. Durante il lavoro di tesi di dottorato sono quindi stati studiati gli effetti degli scarti di frantoi oleari, sia tal quali che compostati, sulle comunità batteriche e fungine presenti nell'ecosistema suolo-pianta. In particolare, sono state approfondite tre sperimentazioni che utilizzavano sia sansa tradizionale, prodotta dal sistema estrattivo continuo a 3 fasi, sia sansa umida, prodotta dal

sistema estrattivo a 2 fasi, e i rispettivi prodotti di compostaggio: una prova di ammendamento del suolo basata sullo spandimento in pieno campo di sanse e compost (discussa nel paragrafo 5.1) e due prove di coltivazione di piante in vaso in cui la sansa e/o il compost erano utilizzati in sostituzione della torba per la formulazione dei substrati da invasatura (discusse nel paragrafo 5.2). Inoltre, nel corso di una di queste prove di coltivazione in vaso è anche stato preventivamente caratterizzato da un punto di vista chimico e microbiologico il processo di produzione del compost utilizzato per la formulazione dei substrati da invasatura.

5.1 Prova di spandimento di sanse e compost in campo.

Il primo caso di riciclo degli scarti di frantoio preso in esame, è stato quello dello spandimento in un oliveto di una sansa tradizionale e una sansa umida insieme ai rispettivi compost. La pratica dello spargimento di sanse in pieno campo, consentita e regolamentata dalla legge Italiana, rappresenta un approccio semplice e conveniente per lo smaltimento delle sanse prodotte dai frantoi durante il periodo di produzione di olio d'oliva e, allo stesso tempo, per il miglioramento della qualità del suolo. Durante il lavoro di tesi sono stati investigati gli effetti che questi scarti avevano sulle caratteristiche chimiche e sulle dinamiche delle comunità microbiche del suolo.

In base alle evidenze sperimentali prodotte durante il lavoro di tesi, è possibile per prima cosa affermare che non vi erano effetti inibitori della crescita e della biodiversità batterica, in contrasto, dunque, con i noti effetti anti-microbici dei reflui oleari dovuti al loro elevato contenuto in fenoli (Roig *et al.* 2006). L'assenza di effetti inibitori è supportata anche da Sampedro *et al.* 2009 che hanno evidenziato che la riduzione dei batteri coltivabili in seguito ad aggiunta di sottoprodotto oleario secco al suolo a livello di microcosmo era limitato soltanto alle prime 48 h di incubazione.

I dati qui presentati circa l'effetto a brevissimo termine di questi sottoprodotti sulla microflora batterica in pieno campo sono in accordo con quanto già evidenziato in precedenza da Nasini *et al.* 2013. Utilizzando un approccio colturale, infatti, si dimostrava come a lungo termine (6 mesi dopo l'ammendamento) non vi fossero effetti sulle popolazioni batteriche del suolo in seguito allo spargimento in un oliveto di una sansa tradizionale a tre fasi.

Numerosi studi hanno approfondito gli effetti di vari scarti organici e di reflui agro-industriali sulla struttura della comunità microbica del suolo impiegando differenti approcci analitici (Ros *et al.*, 2006, Bastida *et al.*, 2008 Gelsomino *et al.* 2006, Cytryn *et al.* 2011).

Blagodatskaya and Kuzyakov (2008) suggeriscono che i potenziali cambiamenti da un punto di vista chimico e microbiologico nel suolo potrebbero avvenire durante i primi giorni dopo l'applicazione di ammendanti organici. È questo il cosiddetto *priming effect*, ovvero un cambiamento a breve termine del *turnover* della sostanza organica del suolo causata da trattamenti, di solito costituiti da aggiunta di carbonio organico.

In questa prova si evidenziava che, dopo 3 giorni, i valori di WEOC, TRS e TPC dei suoli ammendati erano notevolmente più alti di quelli relativi al suolo controllo, in particolare la

sansa tradizionale era quella che nel brevissimo periodo apportava più carbonio organico e zuccheri prontamente disponibili, i quali, già dopo 15 giorni, risultavano essere quasi del tutto consumati. Questo suggeriva che le popolazioni batteriche e fungine, come mostrato dalle analisi molecolari, immediatamente rispondevano a questo apporto di sostanza organica, la quale causava un'alterazione della biodiversità, che, già dopo 15 giorni e almeno per quanto concerne i batteri, raggiungeva un equilibrio, non mostrando alcuna differenza con il suolo controllo.

A tale proposito, il verificarsi del *priming effect*, che può differire secondo l'ammontare e la disponibilità di carbonio, suggerisce che le sostanze facilmente disponibili aggiunte al suolo forniscono carbonio e altre risorse energetiche alla microflora residente. In particolare, Kotsou *et al.* 2004 sostengono che i primi microrganismi che vengono influenzati dall'apporto di sostanza organica sono i microrganismi copiotrofi o r-strateghi, che rappresentano i primi colonizzatori ed utilizzatori dell'ammendante organico aggiunto al suolo (Kuzyakov 2010).

E' interessante notare, in questa prova di spandimento, che la sansa paté presentava i più bassi valori di WEOC, TRS e TPC subito dopo 3 giorni. Questo fatto suggeriva che la sostanza organica contenuta in questa matrice veniva prontamente degradata dalla microflora residente del suolo e, quindi dalle popolazioni batteriche e fungine, le quali erano immediatamente stimulate da questo tipo di scarto, come veniva evidenziato dalle analisi microbiologiche molecolari. Tuttavia, mentre i batteri erano in grado di ristabilire l'equilibrio iniziale subito dopo 15 giorni, l'alterazione della comunità fungina da parte dei due tipi di sansa tal quale continuava a rimanere per tutta la durata della prova, suggerendo come le popolazioni fungine rispondessero diversamente da quelle batteriche.

A tal proposito, la notevole influenza dei sottoprodotti oleari sulla comunità fungina del suolo, evidenziata in questo lavoro, nel complesso, trova riscontro anche in altri lavori. Ad esempio, Moreno *et al.* 2013 avevano valutato l'effetto dell'aggiunta di acqua di vegetazione a dosi elevate ad un suolo. Dall'analisi dei *biomarker PLFAs* si evidenziava un incremento a breve termine del rapporto funghi/batteri, in particolare subito dopo 3 ore dall'aggiunta del sottoprodotto e questo incremento rimaneva stabile per tutto il restante periodo della prova (97 giorni). Queste evidenze suggeriscono come le sostanze contenute all'interno delle acque di vegetazione, e più in generale nei sottoprodotti dei frantoi oleari, siano preferenzialmente utilizzate come substrati dalle popolazioni fungine portando ad un aumento del loro numero, ma anche ad un cambiamento nella biodiversità.

Altri autori riportano che i funghi hanno la capacità riconosciuta di secernere l'enzima polifenol-ossidasi che ha un ruolo-chiave nella degradazione dei polifenoli, operando dunque un processo di detossificazione di questo tipo di sottoprodotto (Mekki *et al.*, 2006; Mechri *et al.*, 2007; Di Serio *et al.*, 2008).

Inoltre, Di Serio *et al.* 2008 riportano che l'applicazione di scarti oleari al suolo causava l'aumento dell'attività di respirazione rispetto al controllo, aspetto intimamente connesso con i processi di decomposizione della sostanza organica. Infatti, l'incremento dell'attività di respirazione indica l'elevata abilità dei microrganismi a degradare ed utilizzare la sostanza organica che viene apportata con l'aggiunta dell'ammendante.

Ancora in accordo con quanto riscontrato in questo lavoro, Mechri *et al.* 2008 riportano un incremento del valore del rapporto tra funghi/batteri dopo un anno circa che sottoprodotti di frantoio oleario erano aggiunti ad un suolo, confermando ancora come tale sottoprodotto rappresenti un adeguato substrato per le popolazioni fungine. D'altro canto, altri autori, come Pierantozzi *et al.* (2013), hanno ottenuto risultati in parte discordanti dal presente lavoro in seguito alla valutazione dell'effetto di basse dosi di acque di vegetazione applicate in campo con campionamenti dopo 10, 30 e 90 giorni. Essi, infatti, riscontravano ugualmente un effetto sulla comunità microbica del suolo, ma soltanto nella struttura della comunità batterica, mentre non osservavano cambiamenti significativi nella biomassa fungina. Già in precedenza, Jarboui *et al.* 2008 avevano ancora riscontrato, rispetto al controllo, una diminuzione del rapporto tra le biomasse funghi/batteri presenti in un suolo a cui erano state aggiunte acque di vegetazione.

La prova di spandimento in campo evidenziava, dunque, che l'apporto di sostanza organica al suolo dovuto all'aggiunta delle sanse, sia tal quali che compostate, produceva un effetto sulla struttura e sull'abbondanza della microflora autoctona, in particolare i batteri ne venivano influenzati in modo transitorio, mentre i funghi subivano un effetto più marcato che perdurava per tutta la prova, indicando un loro differente ruolo nella degradazione della sostanza organica e quindi nel complesso processo del *priming effect*.

5.2 Prove di coltivazione in vaso di piante di olivo (*Olea europaea*) e di piante ornamentali con substrati da invasatura a base di sansa umida tal quale e compostata.

In questa parte dell'attività di ricerca è stata presa in esame una strategia di valorizzazione dei sottoprodotti oleari attraverso la loro trasformazione in compost di qualità. Questo approccio, oltre che consentire lo smaltimento delle sanse, produce un materiale con delle caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche che ne fanno un ideale sostituto della torba nella formulazione di substrati da invasatura.

Per prima cosa saranno discussi i dati raccolti durante il processo di compostaggio in *big bags* di sansa umida da frantoio a due fasi, con particolare riferimento al monitoraggio delle modificazioni chimico-fisiche della miscela e alla caratterizzazione delle dinamiche delle popolazioni batteriche presenti nelle diverse fasi del processo e coinvolte nella trasformazione della sostanza organica (paragrafo 5.2.1).

Saranno, quindi, discussi i risultati ottenuti nel corso di due prove sperimentali in cui la sansa tal quale e il compost di sansa, sono stati utilizzati come ingredienti, in sostituzione della torba, per la formulazione di substrati da invasatura (paragrafo 5.2.2). In particolare, saranno esaminati gli effetti osservati sulla crescita della pianta e sulle comunità batteriche e fungine presenti nel sistema suolo-pianta.

5.2.1 Monitoraggio del processo di compostaggio

Il processo del compostaggio è stato implementato a partire da una miscela di sansa ed acque di vegetazione derivanti dall'attività del frantoio PAM, sito in Pistoia, uno dei partners coinvolti nel progetto di ricerca SAN-SOIL. Lo scopo di tale azione era la formulazione di substrati da invasatura che contenessero il compost così ottenuto in parziale o totale sostituzione della torba per la coltivazione in vaso di piante ornamentali all'interno di aziende florovivaistiche. Dati gli obiettivi del progetto, assumeva grande importanza l'ottimizzazione del processo di trasformazione organica della miscela sperimentale in modo che questa potesse apportare benefici alla pianta da allevare.

Il processo di compostaggio aveva avuto una durata totale di 252 giorni, durante i quali una prima fase attiva (o biossidativa) era stata condotta in modo statico mantenendo la miscela di compostaggio per i primi 120 giorni di processo all'interno dei *big bags*. Dopo la loro apertura si realizzava una seconda fase (*curing*) che durava per tutta il restante periodo (120-252 giorni) in cui la miscela era lasciata all'aria e rimescolata meccanicamente.

Secondo alcuni autori una lunga fase termofila sembrerebbe tipica dei processi di trasformazione degli scarti oleari (Cayuela et al., 2006; Hachicha et al., 2009a,b). Inoltre, l'elevata attività metabolica che avveniva durante questa fase era evidenziata dall'andamento dell'ossigeno il cui valore calava bruscamente dopo i primi 40 giorni del processo per poi risalire gradualmente e stabilizzarsi da 100 giorni in poi. E' qui interessante notare che i valori della concentrazione di ossigeno oscillavano da un minimo del 10% ad un massimo del 20% per tutta la durata del processo, indicando, quindi, che la trasformazione degli scarti oleari avveniva in condizioni idonee per il metabolismo aerobico (Kulcu and Yaldiz, 2004), e in linea con i valori ottimali per il compostaggio (15–20%) (Bernal et al., 2009).

I valori di pH, che salivano progressivamente durante il processo, raggiungevano l'alcalinità dopo 91 giorni indicando la mineralizzazione dell'azoto organico. Successivamente questo valore diminuiva lievemente per stabilizzarsi dopo 252 giorni. L'avvenuta mineralizzazione della sostanza organica, e in particolare del carbonio, era invece evidenziata dall'abbassamento del valore relativo al rapporto C/N.

La fase di maturazione del processo era, inoltre, evidenziata dall'aumento dell'indice di germinabilità il quale indicava la progressiva diminuzione della tossicità iniziale della miscela dovuta alla presenza di fenoli, sottolineando, quindi, che il compost così ottenuto poteva essere considerato maturo (Altieri and Esposito, 2010).

L'approfondimento delle dinamiche delle comunità batteriche durante il processo del compostaggio indicava, similmente a quanto riportato da altri autori come Ryckeboer et al., 2003, che la successione di differenti popolazioni microbiche gioca un ruolo essenziale durante la fase termofila dell'ossidazione della sostanza organica e che la struttura della comunità riflette l'ambiente creatosi all'interno del cumulo in cui avvengono le reazioni di trasformazione ossidativa.

L'analisi delle dinamiche delle popolazioni batteriche effettuata attraverso la tecnica della DGGE indicava che la sansa era caratterizzata da una elevata biodiversità e che questa ricchezza di popolazioni batteriche diminuiva all'inizio del processo per poi risalire durante la restante fase termofila. Durante questa fase, inoltre, la struttura della comunità subiva continue variazioni ad indicare una elevata dinamicità caratterizzata dalla rapida successione di popolazioni batteriche molto diverse tra loro. La fase di raffreddamento, invece, era caratterizzata da una stabilizzazione della comunità batterica, evidenziata dall'assestamento dei valori degli indici ecologici e dall'elevata similarità tra i *fingerprints* DGGE, ad indicare che i microrganismi avevano completato la trasformazione della sostanza organica e quindi il compost stava raggiungendo la sua maturazione.

E' ben noto, grazie a numerosi studi condotti con approcci microbiologici tradizionali quali la coltivazione e l'isolamento di microrganismi in terreni di coltura, che le diverse fasi di compostaggio sono caratterizzate da un'ampia diversità batterica che rispecchia l'elevata attività metabolica che caratterizza questo processo (Ryckeboer et al., 2003). Le dinamiche del microbiota sono, inoltre, state investigate in molteplici processi di compostaggio attraverso metodiche molecolari quali la PCR-DGGE. Ad esempio Takaku et al. (2006) riportavano che durante il compostaggio di rifiuti domestici, quando la temperatura nella fase termofila aumentava, si osservava un numero inferiore di bandeggi, mentre Novinscak et al. (2009) osservavano un incremento della ricchezza dei *fingerprints* DGGE solo al termine della fase termofila del compostaggio di rifiuti industriali. Solo pochi lavori, però, hanno utilizzato questo approccio per caratterizzare il compostaggio delle sanse. Vivas et al. (2009) hanno caratterizzato con la DGGE le differenze tra compostaggio e vermicompostaggio di sanse, trovando che solo nel secondo caso c'era un forte effetto sulle comunità microbiche coinvolte. Nel 2011 il nostro laboratorio ha monitorato le dinamiche delle popolazioni batteriche durante il compostaggio dinamico (cumulo rivoltato) di una sansa umida molto simile a quella processata con il sistema statico in *big bags* (Federici et al., 2011) trovando risultati molto simili. Anche in quel caso, infatti, la fase termofila era risultata quella

caratterizzata dalla più elevata biodiversità e da forti dinamiche della struttura della comunità, caratteristiche, quindi, che potrebbero essere peculiari del compostaggio degli scarti di frantoio.

Alla luce di queste indicazioni, durante questa tesi di dottorato, è stata implementata un'analisi delle comunità batteriche basata su i sequenziamenti di nuova generazione (NGS Illumina) dei frammenti genici 16S rRNA, proprio per identificare le popolazioni batteriche coinvolte.

Dall'analisi dei dati NGS, si evinceva che il raggruppamento *Actinobacteria* risultava essere molto abbondante nella sansa per poi diminuire notevolmente all'inizio della fase attiva/termofila del processo. Tuttavia, nel corso di questa fase attiva si registrava un ulteriore aumento fino a diventare predominante durante la fase mesofila di *curing*. Questa particolare dinamica degli *Actinobacteria* risulta essere molto interessante, infatti già Federici et al. 2011 avevano isolato dalla fase termofila del compostaggio di scarti oleari solidi differenti specie batteriche la maggior parte delle quali apparteneva agli *Actinobacteria*. Questi batteri infatti sono in grado di tollerare elevate temperature e pH oltre che di degradare sostanze chimicamente complesse come la lignina e la cellulosa (Ryckeboer et al., 2003; Tuomela et al., 2000).

Anche le dinamiche del *phylum Proteobacteria* erano interessanti, infatti questi risultavano essere molto abbondanti all'interno della sansa per poi aumentare all'inizio del processo e, quindi, diminuire durante lo svolgimento della fase attiva. A tale proposito, anche Vivas et al. 2009 avevano trovato che lo scarto solido oleario prima di essere sottoposto a compostaggio era dominato dai proteobatteri. La diminuzione dei batteri di questo gruppo durante la fase termofila, benché caratterizzato da una grande vastità di specie, indicava la loro limitata tolleranza alle elevate temperature registrate durante questo periodo.

Il monitoraggio dei processi chimici e delle dinamiche batteriche durante il compostaggio mostrava, in sostanza, che il prodotto finale era idoneo all'impiego agronomico previsto nella formulazione di substrati da invasatura.

5.2.2 Utilizzo di sansa umida tal quale e compostata per la formulazione di substrati da invasatura per la coltivazione in vaso di piante di olivo (*Olea europaea*) e di piante ornamentali.

Le due prove sperimentali qui discusse rientrano, come già detto, nel quadro della definizione di strategie di valorizzazione degli scarti oleari come sostituti della torba nei substrati da invasatura per la coltivazione di piante in vaso. Una prima prova ha riguardato la coltivazione, su piccola scala, di piante di olivo ed ha permesso di valutare gli effetti dell'utilizzo di sansa umida da sistema di estrazione a due fasi (Pieralisi DMF), tal quale o precedentemente sottoposta al processo di compostaggio. A questa, è quindi seguita una prova di coltivazione in vaso di piante ornamentali su larga scala, allestita in aziende vivaistiche nell'ambito del progetto *SAN-SOIL*, in cui la torba è stata sostituita con quantità crescenti di compost di sansa.

Durante la coltivazione in vaso di piante di olivo sono stati valutati gli effetti del substrato controllo (a base di torba) e di due substrati sperimentali (torba sostituita per metà con sansa o compost di sansa) sulla crescita della pianta e sulle dinamiche delle popolazioni batteriche e fungine, monitorate dopo 30, 60, 120 e 270 giorni, sia nel suolo che nella rizosfera. Inoltre, dopo 30 giorni dall'invasatura, sono state identificate le popolazioni batteriche del suolo e della rizosfera e quelle fungine della rizosfera. Di pari passo con l'approfondimento degli effetti sul microbiota sono state monitorate anche le *performances* delle piante a metà (dopo 120 giorni) e al termine (270 giorni) della prova.

Gli effetti sulla crescita della pianta erano evidenti quando nel substrato era utilizzata la sansa tal quale. Infatti, la sostituzione della metà della torba con la sansa, che rappresentava quindi il 30% del substrato totale, causava un forte rallentamento della crescita delle piante di olivo come indicato dai valori relativi all'altezza e al tasso relativo di crescita (RGR) rilevati dopo 120 giorni, molto inferiori a quelli delle piante invasate nel substrato controllo. Nonostante che durante la seconda fase della sperimentazione (120-270 giorni) i valori di RGR delle piante invasate in presenza di sansa fossero paragonabili a quelle degli altri substrati lo svantaggio accumulato durante la prima fase era tale da non poter essere recuperato tanto che le differenze in crescita erano evidenti fino alla fine della prova (dopo 270 giorni). Quando, invece, era utilizzato il compost per sostituire, nella stessa misura, la torba, questi effetti negativi sulla crescita della pianta erano completamente annullati.

Dallo studio degli effetti sulle dinamiche delle popolazioni batteriche, eseguito attraverso il calcolo degli indici ecologici e l'analisi della similarità fra comunità, appariva evidente come il substrato da invasatura a base di sansa umida tal quale avesse un'influenza più marcata sulle dinamiche delle popolazioni piuttosto che quello a base di compost soprattutto durante le fasi iniziali della coltivazione. Questo era evidente, infatti, dagli indici di biodiversità che, dopo 30 giorni in particolare, risultavano più elevati in entrambi i comparti di suolo e rizosfera quando veniva utilizzata sansa tal quale al posto della torba, mentre, quando veniva utilizzato il compost di sansa, i valori erano simili a quelli del controllo. Questo marcato effetto di stimolazione della biodiversità da parte della sansa, era osservabile per tutta la durata della prova sia nei campioni di suolo che in quelli di rizosfera, mentre, da parte della sansa compostata, era meno evidente.

Nell'insieme questi dati mettevano in evidenza come suolo e rizosfera provenienti dai differenti substrati da invasatura presentassero soltanto un basso numero di popolazioni batteriche in comune ad indicare chiaramente che sostituendo la torba con scarti di frantoio, specialmente se non compostati, alterava il microbiota del sistema suolo-pianta di suolo. Proprio queste alterazioni della comunità batterica nel breve periodo sembravano legate al rallentamento iniziale della crescita della pianta.

Questa evidenza era certamente supportata anche dai risultati ottenuti dai sequenziamenti di nuova generazione (NGS) in cui si osservava come, a tutti i livelli tassonomici, la composizione della comunità batterica del suolo e della rizosfera fosse fortemente perturbata quando la sansa umida tal quale veniva impiegata nella formulazione dei substrati da invasatura, mentre alte similitudini venivano riscontrate tra le comunità sviluppatesi dalla coltivazione con substrati a base di torba e quelli a base di sansa compostata. In questa parte dello studio, infatti, è stato trovato che il *phylum Proteobacteria* rappresentava il gruppo più abbondante in assoluto all'interno delle piante, in entrambi i comparti di suolo e rizosfera e indipendentemente dai trattamenti. Tuttavia, quando la sansa umida tal quale veniva utilizzata si verificava un aumento di questo *phylum*, mentre i substrati a base di torba e a base di sansa compostata presentavano abbondanze simili di questo gruppo. Inoltre, i gruppi più abbondanti che seguivano i *Proteobacteria* erano i *Bacteroidetes*, i *Firmicutes*, gli *Actinobacteria*, i *Verrucomicrobia*, gli *Acidobacteria*, i *Planctomycetes* ed in ultimo anche il gruppo dei *Cloroplasti/Cianobacteria*. Risultati simili erano stati trovati anche da Kolton et al. 2011, i quali non solo evidenziavano una maggiore abbondanza dei *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Firmicutes* nelle radici di piante di peperoncino (*Capsicum annuum L.*), ma

anche che questi valori di abbondanza erano simili tra piante coltivate sia in assenza che in presenza di *Biochar*, un ammendante che sta assumendo una crescente importanza nell'ottica della sostenibilità ambientale, similmente al compostaggio di sottoprodotti agro-industriali inquinanti. Queste evidenze suggeriscono come questi *phyla* siano rappresentati da microrganismi che meglio si adattano ad ambienti di nicchia estremamente limitati come quelli del vaso.

I differenti effetti causati dalla sansa tal quale rispetto al controllo e al compost di sansa erano evidenti a livelli tassonomici più bassi, ad esempio gli ordini *Burkholderiales*, *Flavobacteriales* e *Pseudomonadales* subivano un forte incremento quando la sansa tal quale era all'interno del substrato da invasatura. L'ordine *Burkholderiales* (*Betaproteobacteria*) è noto per avere un ruolo di interazione con la fisiologia della pianta intervenendo nel metabolismo della sintesi dei fitormoni (Haischar et al. 2008, Uroz et al. 2010, Hairdoim et al. 2008). All'interno di questo ordine il genere *Achromobacter* (*Alcaligenaceae*) era tra i gruppi maggiormente stimolati dalla sansa umida tal quale, il quale è conosciuto come *plant growth-promoting rhizobacterium*, in particolare per la sua capacità di produrre molecole segnale e nel favorire l'assorbimento di minerali da parte della pianta (Bashan and de-Bashan 2005).

All'interno dei *Burkholderiales*, ad esempio, le *Oxalobacteriaceae*, ed in particolare il genere *Massilia*, erano stimolate dalla presenza di sansa tal quale. Questa famiglia è costituita da batteri aerobi, fortemente competitivi nel suolo, i quali sono capaci di degradare una serie di complesse molecole (Bernard et al. 2007, Ofek et al. 2012). Queste caratteristiche potrebbero spiegare non solo la loro persistenza nell'ambiente del suolo e della rizosfera, ma anche la loro forte stimolazione in presenza della sansa non compostata, notoriamente caratterizzata da molecole chimicamente complesse.

L'ordine *Flavobacteriales*, e al suo interno il genere *Flavobacterium*, era anch'esso favorito nella crescita da parte della sansa tal quale. Membri appartenenti a *Flavobacterium* sono ampiamente distribuiti in natura e svolgono un importante ruolo nella mineralizzazione di una serie di molecole organiche come carboidrati, aminoacidi, proteine e polisaccaridi (Kolton et al. 2011). Queste evidenze potrebbero nuovamente spiegare, come nel caso di *Massilia*, la stimolazione in presenza di sansa non compostata.

Le *Pseudomonadales* invece erano per lo più rappresentate dalla famiglia delle *Pseudomonadaceae* e, in particolare, dal genere *Pseudomonas*. Anche in questo caso la sansa umida non compostata incrementava la crescita di questi gruppi con particolare riferimento a *Pseudomonas*. Esiste una consistente parte della letteratura che sostiene che numerose specie

appartenenti a questo genere faccia parte dei *Plant growth-promoting Rhizobacteria* essendo coinvolte nelle funzioni di bio-controllo nei confronti di determinate fitopatologie. Questi articoli inoltre, riportano che questo genere è considerato uno dei gruppi dominanti il comparto della rizosfera ed un naturale colonizzatore delle radici di olivo (Prieto et al. 2011, Prieto et al. 2009, Mercado-Blanco et al. 2007, Debote et al. 2007, Mercado-Blanco et al. 2004, Berg et al. 2002).

Tra i gruppi inibiti dalla sansa tal quale sono stati trovati gli ordini *Sphingobacteriales*, *Xanthomonadales*, *Rhodospirillales* e *Planctomycetales*. Il gruppo *Sphingobacteriales*, ad esempio, sembra essere coinvolto nell'importante ruolo di biodegradazione di sostanze inquinanti come gli idrocarburi policiclici aromatici (PAHs) (Lladó et al. 2009).

Lo studio degli effetti sulle popolazioni fungine evidenziava come la sansa tal quale provocasse un'alterazione della struttura della comunità subito dopo 30 giorni, e come questo effetto permanesse per tutto l'arco della prova. Anche il compost di sansa aveva effetti sulla biodiversità introducendo nuove popolazioni all'interno della comunità fungina della rizosfera. Questi risultati, infatti, erano osservabili dalle analisi delle dinamiche di popolazione, in particolare dal calcolo degli indici ecologici e dall'analisi della similarità fra profili DGGE.

Il clonaggio ed il sequenziamento, inoltre, hanno permesso di ottenere l'identificazione delle popolazioni presenti nella rizosfera dopo 30 giorni dall'invasatura dando risultati consistenti con quelli relativi alle dinamiche. Infatti, dai dati ottenuti si evinceva che mentre la comunità fungina della rizosfera appartenente alle piante controllo e quella relativa alla sansa compostata erano rappresentate da 20 e 30 OTU rispettivamente, la sansa paté tal quale presentava soltanto 9 OTU.

Inoltre, è interessante notare come soltanto poche OTU fossero condivise fra le tre comunità, in particolare, le piante controllo condividevano 3 OTU con quelle coltivate in presenza di sansa compostata e, nello stesso numero, anche la sansa tal quale condivideva OTU con il suo rispettivo prodotto di compostaggio. Tuttavia, nessuna OTU veniva condivisa fra piante coltivate con sola torba e quelle con substrati contenenti sansa tal quale, confermando quindi l'evidente squilibrio della comunità che si notava anche con l'analisi DGGE e qPCR. Inoltre, la maggioranza delle specie ritrovate nei tre campioni di rizosfera ricadeva all'interno del phylum *Ascomycota* e soltanto una minoranza si suddividevano fra *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* e *Zygomycota*.

Risultati simili erano stati ottenuti anche da Vujanovic et al. 2007 i quali avevano investigato la rizosfera di pecci registrando un'abbondanza di *Ascomycota* seguiti da *Basidiomycota* e *Zygomycota* suggerendo quindi che i funghi appartenenti a questo *phylum* sono quelli che meglio si adattano ad ambienti così limitati come la rizosfera e che meglio rispondono alle funzioni richieste in questo micro habitat.

L'effetto evidente sulla comunità fungina in seguito all'aggiunta del sottoprodotto oleario è in accordo con quanto riscontrato da altri autori come Karpouzas et al. 2009, i quali avevano valutato l'impatto delle acque di vegetazione sulla microflora fungina della rizosfera e del suolo di piante di peperoncino verde (*Capsicum annuum L.*) coltivate in vaso. Essi avevano osservato un marcato cambiamento dei fingerprint DGGE a seguito del trattamento; in particolare, la comunità dei basidiomiceti veniva fortemente influenzata. Lee et al. (2004), utilizzando un approccio coltura-dipendente, osservavano un incremento di popolazioni sia batteriche sia fungine a livello della rizosfera di piante di lattuga (*Lactuca sativa*) a seguito dell'utilizzo di scarti di cibo come parziali substrati da invasatura.

Per quanto riguarda la prova di coltivazione in vaso delle piante ornamentali *Cupressus sempervirens* "Pyramidalis", *Viburnum lucidum* e *Prunus laurocerasus* "Novita" utilizzando substrati da invasatura contenenti quantità crescenti di compost di sansa, si evidenziava che questi substrati influenzavano la biodiversità batterica e fungina del suolo, come anche la biodiversità endofitica delle radici. Da questa parte dello studio si evinceva, infatti, che mentre la comunità batterica del suolo era notevolmente influenzata dai substrati contenenti compost se confrontata con quella presente nelle piante controllo, la comunità endofitica subiva in maniera più limitata questi effetti. Tuttavia, proprio le modificazioni a livello di comunità che avvenivano in questo comparto erano significativamente correlate agli effetti benefici osservati sulla crescita della biomassa vegetale, infatti più la comunità era differente dal controllo maggiori erano i benefici per la pianta.

Questa evidenza sperimentale permetteva di ipotizzare che l'utilizzo di compost, nonostante causasse un impatto limitato sulla struttura della comunità batteriche delle radici, induceva delle modificazioni che potevano avere un ruolo nel mediare gli effetti positivi per la crescita delle piante. Al contrario, nel suolo, dove l'utilizzo del compost causava forti modificazioni della biodiversità e della struttura della comunità batterica, non era possibile mettere in evidenza una chiara relazione tra tali modificazioni e gli effetti benefici sulla crescita della pianta. E' evidente, quindi, che i microrganismi che vivono in ambienti così limitati come le

radici risultino essere più sensibili alle perturbazioni ricevute dall'esterno come l'aggiunta di sostanza organica se paragonate a quelle che vivono nel suolo, seppur all'interno di un vaso. Analizzando la comunità fungina del suolo e quella endofitica delle radici, non era possibile trovare delle relazioni tra gli effetti sulle due comunità e la crescita della pianta. Questo ultimo dato rafforzava l'ipotesi che l'importante ruolo di mediazione assunto dal microbiota dell'ecosistema suolo-pianta nel favorire lo sviluppo della pianta fosse principalmente svolto dai batteri endofitici delle radici.

In ultima analisi è importante sottolineare che la completa sostituzione della torba con compost non aveva effetto (né positivo né negativo) sulla crescita delle piante in nessuna varietà esaminata, stando ad indicare che gli equilibri che si instaurano all'interno di questo ecosistema sono estremamente delicati poiché coinvolgono componenti sia di tipo biotico che abiotico. Infatti, è lecito supporre che il marcato sbilanciamento di questi equilibri causati dalla sola presenza di compost nel substrato possa avere alterato le normali relazioni che intercorrono fra queste componenti restituendo, quindi, nessun beneficio per la pianta. Quindi le prove di coltivazione in vaso evidenziavano come gli scarti oleari utilizzati tal quali causavano danni alla pianta, mentre il loro compostaggio apportava benefici sottolineando ulteriormente quanto questo processo biotecnologico sia una strategia vincente. E' stato dimostrato inoltre che esiste una connessione tra gli effetti osservati sulle comunità microbiche che abitano i comparti del suolo, delle radici e della rizosfera e le *performances* agronomiche delle piante.

6. CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti durante il presente lavoro di dottorato, è possibile confermare che la pratica dello spandimento in campo delle sanse tal quali non compromette le funzioni del suolo. Inoltre, il compostaggio risultava essere una strategia vincente per la valorizzazione degli scarti oleari. Questo materiale, infatti, rappresentava un ottimo sostituto della torba nel contesto dell'industria florovivaistica dal momento che, nel caso delle prove di coltivazione in vaso, si è dimostrato che esso aveva effetti paragonabili e, in alcuni casi, migliorativi delle *performances* agronomiche delle piante.

Inoltre da questo lavoro si è visto come le popolazioni microbiche presenti nell'ecosistema suolo-pianta, e, più specificamente, nel suolo, nella rizosfera e nelle radici svolgessero un ruolo essenziale nella mediazione degli effetti sulla pianta. Batteri e i funghi rispondevano, però, in maniera differente alla presenza degli scarti, sia freschi che compostati, in tutte le prove affrontate in questo lavoro.

La comunità batterica, soprattutto nella prova di spandimento in campo, dimostrava la capacità di ristabilire l'equilibrio inizialmente impattato in seguito dell'aggiunta degli ammendanti solo transitoriamente. I batteri del suolo, quindi, confermavano di possedere una grande capacità di resilienza. Nella prova di coltivazione di piante di olivo è stato inoltre osservato che la sansa tal quale causava, rispetto alla sansa compostata e specialmente nelle fasi iniziali di coltivazione in vaso, la più evidente alterazione della crescita e della diversità delle popolazioni batteriche di suolo e rizosfera. Questo, infatti, era confermato anche dall'identificazione con approccio NGS delle popolazioni batteriche presenti dopo 30 giorni che confermava lo squilibrio della comunità da parte della sansa tal quale, mentre il compost induceva effetti simili al controllo. Queste evidenze suggerivano, quindi, che esisteva una relazione con il rallentamento osservato nella crescita della pianta dopo questo periodo e che le popolazioni maggiormente stimulate dallo scarto tal quale, nonostante in parte siano note per svolgere funzioni positive all'interno dell'ecosistema suolo-pianta, evidentemente subivano un'alterazione eccessiva che annullava questi noti effetti positivi danneggiando la salute della pianta. Dalla prova di coltivazione su larga scala si è osservato che nel suolo, dove l'utilizzo del compost causava forti modificazioni della biodiversità e della struttura della comunità batterica, non era possibile mettere in evidenza una chiara relazione tra tali modificazioni e gli effetti benefici sulla crescita della pianta. Al contrario nelle radici,

nonostante l'impatto limitato sulla struttura della comunità batteriche, l'utilizzo di compost al posto della torba induceva delle modificazioni che potevano avere un ruolo nel mediare gli effetti positivi per la crescita delle piante.

L'effetto dell'aggiunta dei sottoprodotti oleari sia freschi che compostati sui funghi era differente. Nella prova di spargimento in campo, infatti, si evidenziava che essi mostravano una capacità di resilienza molto inferiore a quella dei batteri dal momento che le differenze tra il suolo ammendato e quello controllo erano evidenti per tutto l'arco della prova sia nella struttura che nell'abbondanza. Nella prova di coltivazione di piante di olivo le evidenze sperimentali raccolte indicavano che l'aggiunta di sansa e compost nei substrati da invasatura provocava profonde modificazioni delle comunità presenti nel suolo e nella rizosfera delle piante di olivo, mostrando, quindi, una bassa capacità di resilienza alle modificazioni. Anche in questo caso, la sansa tal quale sembrava indurre, soprattutto nel suolo, effetti marcati e persistenti, mentre nella rizosfera il compost stimolava la biodiversità introducendo nuove specie, come suggeriva l'identificazione delle popolazioni dopo 30 giorni. Nella prova di coltivazione su larga scala, infine, non c'era una chiara correlazione tra gli effetti sulla comunità sia del suolo che delle radici e la crescita della pianta.

Quindi, è possibile concludere che il compostaggio dei sottoprodotti dei frantoi oleari si è rivelato un ottimo metodo per riciclare e soprattutto valorizzare questa tipologia di scarto agro-industriale, e, in particolare, nell'ambito dell'industria florovivaistica. Inoltre, chiare evidenze supportano la relazione tra il microbiota del sistema suolo-pianta e la salute della pianta, suggerendo l'importanza dell'identificazione delle popolazioni presenti in questo ecosistema per così meglio comprendere quali in particolare sono mediatrici degli effetti descritti.

7. BIBLIOGRAFIA

Aissam H., Penninckx M. J., and Benlemlih M., (2007). “Reduction of phenolics content and COD in olive oil mill wastewaters by indigenous yeasts and fungi,” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, no. 9, pp. 1203–1208,.

Albuquerque J.A., González J., García D., and Cegarra J. (2007). Effects of a compost made from the solid by-product (“alperujo”) of the two-phase centrifugation system for olive oil extraction and cotton gin waste on growth and nutrient content of ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Bioresource technology*, 98(4), 940–5.

Altieri, R., Esposito, A., (2010). Evaluation of the fertilizing effect of olive mill waste compost in short-term crops. *Int. Biodeter. Biodegr.* 64, 124–128.

Altieri, R., Esposito, A., & Baruzzi, G. (2010). Use of olive mill waste mix as peat surrogate in substrate for strawberry soilless cultivation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(7), 670–675. doi:10.1016/j.ibiod.2010.08.003

Altieri, R., Esposito, A., & Nair, T. (2011). Novel static composting method for bioremediation of olive mill waste. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(6), 786–789.

Amann R., (2000). Who is out there? Microbial aspects of biodiversity. *Syst Appl Microbiol*, 23:1-8.

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H., (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59:143- 69.

Amirante P., (1998). Utilizzazione agronomica dei sottoprodotti dell'estrazione olearia: aspetti legislativi, tecnologici e risultati sperimentali. *Rs rifiuti solidi*, vol. XII n. 1

Amirante P., Di Gioacchino L., Di Renzo G.C., (1992). Riciclo delle acque di vegetazione nell'estrazione centrifuga: aspetti qualitativi e quantitativi. *Atti del Congresso Internazionale Olive Oil Quality*, Firenze 1-3 Dicembre, pp. 115-126

Amirante, P., Montel, G.L., (1999). "Tecnologie ed impianti per il compostaggio intra ed interaziendali", in "Il compostaggio in ambito agricolo. Promozione ed impiego del compost in agricoltura biologica", *I Quaderni di Biopuglia* n.5, Istituto Agronomico Mediterraneo Bari, pp.136-141

Bailey K.L., Lazarovits G., (2003). Suppressing soil-borne diseases with residues management and organic amendments. *Soil & Tillage Research* 72: 169-180.

Bastida, F., Kandeler, E., Moreno, J. L., Ros, M., García, C., & Hernández, T. (2008). Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology*, 40(2), 318–329.

Ben Sassi A., Boularbah A., Jaouad A., Walker G., and Bous- Said A. (2006). "A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco," *Process Biochemistry*, vol. 41, no. 1, pp. 74–78,

Ben Sassi A., Ouazzani N., G. Walker M., Ibnsouda S., El Mzibri M., and Boussaid A. (2008) "Detoxification of olive mill wastewaters by Moroccan yeast isolates," *Biodegradation*, vol. 19, no. 3, pp. 337–346,.

Benitez E., Sainz H., and Nogales R., (2005) "Hydrolytic enzyme activities of extracted humic substances during the vermicomposting of a lignocellulosic olive waste," *Bioresource Technology*, vol. 96, no. 7, pp. 785–790,.

Berg G, Roskot N, Steidle A, Eberl L, Zock A, Smalla K (2002) Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl Environ Microbiol* 68:3328–3338

Bernal, M.P., Albuquerque, J.A., Moral, R., (2009). Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresour. Technol.* 100, 5444–5453.

Bernard L, Mougel C, Maron PA, Nowak V, Le ^que J, et al. (2007) Dynamics 've and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from ¹³C-labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environ Microbiol* 9: 752–764.

Blagodatskaya, E., Blagodatsky, S., Dorodnikov, M., Kuzyakov, Y., (2010). Elevated atmospheric CO₂ increases microbial growth rates in soil: results of three CO₂ enrichment experiments. *Global Change Biology* 16, 836e848

Blagodatskaya, E.V., Blagodatsky, S.A., Anderson, T.-H., Kuzyakov, Y., (2007). Priming effects in Chernozem induced by glucose and N in relation to microbial growth strategies. *Applied Soil Ecology* 37, 95e105.

Blagodatskaya, E., & Kuzyakov, Y. (2008). Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. *Biology and Fertility of Soils*, 45(2), 115–131.

Bleve G., Lezzi C., Chiriatti M. A., D'Ostuni I., Tristezza M., Di Venere D., Sergio L., Mita G., Grieco F. (2011). Selection of non- conventional yeasts and their use in immobilized form for the bioremediation of olive oil mill wastewaters, *Bioresource Technology*, vol. 102, 982–989,.

Bonanomi G., Giorgi V., Del Sorbo G., Neri D., Scala F., (2006a). Olive mill residues affect saprophytic growth and disease incidence of foliar and soilborne plant fungal pathogens. *Agriculture Ecosystem and Environment* 115: 194-200.

Bonanomi G., Sicurezza M.G., Caporaso S., Assunta E., Mazzoleni S., (2006b). Phytotoxicity dynamics of decaying plant materials. *New Phytologist* 169: 571-578.

Bowers RM, McLetchie S, Knight R, Fierer N (2011a) Spatial variability in airborne bacterial communities across land-use types and their relationship to the bacterial communities of potential source environments. *ISME J* 5, 601–612.

Bronick, C.J., Lai, R., (2005). Soil structure and management: a review. *Geoderma* 124 (1–2), 3–22.

Brugère J.F., Mihajlovski A., Missaoui M., and Peyret P.,(2009). “Tools for stools: the challenge of assessing human intestinal microbiota using molecular diagnostics,” *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 9, no. 4, pp. 353–365.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Shipley, G. L., (2009). The MIQE Guidelines : Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments SUMMARY :, 622, 611–622.

Callbeck, C. M., Sherry, A., Hubert, C. R. J., Gray, N. D., Voordouw, G., & Head, I. M., (2013). Improving PCR efficiency for accurate quantification of 16S rRNA genes. *Journal of Microbiological Methods*, 93(2), 148–52.

Carlile W.H., (2001) Growing media and the environmental lobby in the UK 1997-2001. ISHS Symposium”Growing Media & Hydroponics”, Alnarp, Sweden, 8-14 September 2001

Cavigelli M.A., Thien S.J., (2003). Phosphorus bioavailability following incorporation of green manure crops. *Soil Science Society American Journal* 67:1186-1194.

Cayuela M. L., Mondini C., Sanchez-Monedero M. A., and Roig A.,(2008). “Chemical properties and hydrolytic enzyme activities for the characterisationof

two-phase olivemillwastes composting". *Bioresource Technology*, vol. 99, 4255–4262.

Cayuela, M.L., Sanchez-Monedero, M.A., Roig, A., (2006). Evaluation of two different aeration systems for composting two-phase olive mill wastes. *Process Biochem.* 41, 616–623.

Chang Y.J., Stephen J.R., Richter A.P., Venosa A.D., Bruggemann J., Macnaughton S.J., (2000). Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: effect of profiling method. *J Microbiol Methods*, 40:19-31.

Chong, C., (2005). Experiences with wastes and composts in nursery substrates. *HortTechnology* 15, 739–747.

Cioni A., (1991). Giornata di studio. Innovazione tecnologica nell'impiantistica olearia ed enologica, Iesi, 27-28 Giugno

Claesson M.J., O'Sullivan O., Wang Q., Nikkila J., Marchesi J.R., Smidt H., de Vos W.M., Ross R.P., O'Toole P.W., (2009). Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS One* 20;4(8):e6669

Claesson, MJ, and O'Toole P.W., (2010). Evaluating the latest high-throughput molecular techniques for the exploration of microbial gut, *Gut Microbes* 1:4, 277-278.

Colwell R.K. and Coddington J.A., (1994). Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philos. Trans. R. Soc. London B*, 345: 101-118

Coventry E., Noble R., Mead A., Whipps J.M., (2005). Suppression of *Allium* white rot (*Sclerotium cepivorum*) in different soils using vegetable wastes. *European Journal of Plant Pathology* 111: 101-112.

Cucci G., Lacolla G., Caranfa L., (2009) Variazioni di alcune caratteristiche di un suolo ammendato con reflui oleari. *Biologi Italiani* 6/2009, pp.60-64.

Cucci G., Rubino P., Caliandro A., (2003). Effects of irrigation water with different salt concentrations and SAR values on soil salinization and sodification. *I.J.A.* 7, 1, 41-48

Cucurachi, A., (1975). Nuovi sistemi di estrazione dell'olio dalle olive. *Ann.Istit. Sperim. Elaiotecnica*, V, 155

Cytryn, E., Kautsky, L., Ofek, M., Mandelbaum, R. T., & Minz, D. (2011). Short-term structure and functional changes in bacterial community composition following amendment with biosolids compost. *Applied Soil Ecology*, 48(2), 160–167.

De Bertoldi, M., (1992). Microbiological features of sludges and by-products composting. In *Atti del Convegno Treatment and re-utilization of farm effluents and sludges*. 10-11-12 dicembre, Lecce, Italy

De Felice M., Gomes T., Catalano M., (1979). Estrazione dell'olio dalle olive con sistemi continui di centrifugazione delle paste. Risultati di ricerche triennali. *Riv. Ital. Sost. Grasse*, 56:361

Debode J, Maeyer KD, Perneel M, Pannecoucq J, Backer GD, Höfte M (2007) Biosurfactants are involved in the biological control of *Verticillium microsclerotia* by *Pseudomonas* spp. *J Appl Microbiol* 103:1184–1196

Dennis P. G., Miller A. J., and Hirsch P. R., (2010). Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology*, 72, 313–327.

Di Gioacchino L., Costantini N., Serraiocco A., (1994). Risultati quali-quantitativi dell'estrazione dell'olio dalle olive con il sistema della centrifugazione e confronto con i processi tradizionali. In: *Atti Congresso Accademia Nazionale dell'Olio*. Le centrifughe a due fasi nell'estrazione dell'olio di oliva: problematiche, prospettive qualitative e implicazioni dell'utilizzazione dei sottoprodotti. Spoleto, 28 Ottobre 1994

Di Gioacchino L., Mascolo A., Solinas M., Angerosa F., (1980). Incidenza dei sistemi di lavorazione delle olive su taluni parametri indicativi delle 112 qualità dell'olio di oliva. Atti del III Congresso Internazionale su: Valore biologico dell'olio di oliva. Chania (Grecia), 8-12 settembre, pp. 627-638

Di Gioacchino L., Solinas M., (1992). Aspetti qualitativi e quantitativi delle produzioni olearie ottenute dalla lavorazione delle olive con i sistemi continui e discontinui. Nota I. Atti del Congresso Internazionale Olive Oil quality, Firenze, 1-3 Dicembre, pp. 315-316

Di Serio, M. G., Lanza, B., Mucciarella, M. R., Russi, F., Iannucci, E., Marfisi, P., & Madeo, a. (2008). Effects of olive mill wastewater spreading on the physico-chemical and microbiological characteristics of soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(4), 403–407.

Eiler A. and Bertilsson S., (2004). Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ Microbiol*, 6: 1228-1243.

El-Latif Hesham A., Khan S., Liu X., Zhang Y., Wang Z., Yang M., (2006). Application of PCR-DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. *Yeast*, 23:879-887.

Ertugrul S., Doñmez G., and Takac S., 2007 “Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity,” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 149, no. 3, pp. 720–724.

Federici E., Leonardi V., Giubilei M.A., Quaratino D., Spaccapelo R., D’Annibale A., Petruccioli M., (2007). Addition of allochthonous fungi to a historically contaminated soil affects both remediation efficiency and bacterial diversity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 203–211.

Federici E., Pepi M., Esposito A., Scargetta S., Fidati L., Gasperini S., Cenci G., Altieri R., (2011). Two-phase olive mill waste composting: community dynamics

and functional role of the resident microbiota. *Bioresource Technology* 102, 10965-10972.

Federici F., Fava F., Kalogerakisc N., and Mantzavinosc D., (2009). Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters. *J Chem Technol Biotechnol* ; 84: 895–900 2009 Society of Chemical Industry.

Fernandez-Gomez M. J., Nogales R., Insam H., Romero E., and Goberna M., (2011). “Role of vermicompost chemical composition, microbial functional diversity, and fungal community structure in their microbial respiratory response to three pesticides,” *Bioresource Technology*, vol. 102, no. 20, pp. 9638–9645.

Fontaine S., Mariotti A., Abbadie L., (2003). The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology & Biochemistry* 35, 837e843.

Forney L.J., Zhou X., Brown C.J., (2004). Molecular microbial ecology: land of the oneeyed king. *Curr Opin Microbiol*, 7:210-220.

Geets J., Cooman M., Wittebolle L., Heylen K., Vanparys B., Vos P., Verstraete W, Boon N., (2007). Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(1), 211–221.

Gelsomino, A., & Cacco, G. (2006). Compositional shifts of bacterial groups in a solarized and amended soil as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(1), 91–102.

Giannoutsou E. P., Meintanis C., and Karagouni A. D., (2004). Identification of yeast strains isolated from a two-phase decanter system olive oil waste and investigation of their ability for its fermentation. *Bioresource Technology*, vol. 93, 301– 306.

Gigliotti, G., Proietti, P., Said-Pullicino, D., Nasini, L., Pezzolla, D., Rosati, L., & Porceddu, P. R. (2012). Co-composting of olive husks with high moisture

contents: Organic matter dynamics and compost quality. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 67(0), 8–14.

Giovannoni S.J., Britschgi T.B., Moyer C.L., Field K.G., (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacteria plankton. *Nature*, 345: 60-63

Glöckner F.O., Zaichikov E., Belkova N., Denissova L., Pernthaler J., Pernthaler A., (2000). Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 66: 5053-5065.

Gomes N.C.M., Heuer H., Schonfeld J., Costa R., Mendonca Hagler L., Smalla K., (2001). Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil*, 232: 167- 180.

Hachicha, S., Cegarra, J., Sellami, F., Hachicha, R., Drira, N., Medhioub, K., Ammar, E., (2009a). Elimination of polyphenols toxicity from olive mill wastewater sludge by its co-composting with sesame bark. *J. Hazard. Mater.* 161, 1131–1139.

Hachicha, S., Sellami, F., Cegarra, J., Hachicha, R., Drira, N., Medhioub, K., Ammar, E., (2009b). Biological activity during co-composting of sludge issued from the OMW evaporation ponds with poultry manure. Physico-chemical characterization of the processed organic matter. *J. Hazard. Mater.* 162, 402–409.

Hagn A., Pritsch K., Ludwig W., Schlöter M. (2003). Theoretical and practical approaches to evaluate suitable primer sets for the analysis of soil fungal communities. *Acta Biotechnol.* 4: 373–381.

Haichar, F. E. Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J., Heulin T., Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*, 2(12), 1221–30.

Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., and Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, 16(10), 463–71. doi:10.1016/j.tim.2008.07.008

Hartmann M., Frey B., Kflliker R., Widmer F., (2005). Semi-automated genetic analyses of soil microbial communities: comparison of T-RFLP and RISA based on descriptive and discriminative statistical approaches. *J. Microb. Meth.* 61, 349–360

Hassan, S., and Mathesius, U., (2012). The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of experimental botany*, 63(9), 3429–44.

He J., Xu Z., Hughes J. (2005). Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes. *Fems Microbiol. Lett.* 247: 91–100.

Heuer H. and Smalla K., (1997). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: van Elsas JD, Wellington EMH, Trevors JT (eds) *Modern soil microbiology*. Dekker, New York, 353-373.

Hiorns W.D., Methé B.A., Nierzwicki Bauer S.A., Zehr J.P., (1997). Bacterial diversity in Adirondack Mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol*, 63: 2957-2960.

Hoitink H.A.J., Boehm M.J., (1999). Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology* 37: 427- 446.

Hughes J.B., Hellmann J.J., Ricketts T.H., Bohannon B.J.M., (2001). Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl Environ Microbiol*, 67: 4399-4406

- Ipsilantis I., Karpouzas D. G., Papadopoulou K. K., and Ehaliotis C., (2009). "Effects of soil application of olive mill wastewaters on the structure and function of the community of arbuscular mycorrhizal fungi," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 41, no. 12, pp. 2466–2476,
- Jarboui, R., Sellami, F., Kharroubi, A., Gharsallah, N., & Ammar, E. (2008). Olive mill wastewater stabilization in open-air ponds: impact on clay-sandy soil. *Bioresource Technology*, 99(16), 7699–708.
- Jardak, T. Rovina, B., Ouled Amor, A. Harrabi, T., (1997). Valorisation de la pulpe de gringos epuises en alimentation animale a l'echelle industrielle".
- Jones C. E., Murphy P. J., and Russell N. J, (2000) "Diversity and osmoregulatory responses of bacteria isolated from two-phase olive oil extraction waste products," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 16, no. 6, pp. 555–561,.
- Karpouzas, D. G., Rousidou, C., Papadopoulou, K. K., Bekris, F., Zervakis, G. I., Singh, B. K., and Ehaliotis, C., (2009). Effect of continuous olive mill wastewater applications, in the presence and absence of nitrogen fertilization, on the structure of rhizosphere-soil fungal communities. *FEMS microbiology ecology*, 70(3), 388–401.
- Kavroulakis N. and Ntougias S. (2011), "Bacterial and -proteobacterial diversity in *Olea europaea* var. *mastoidis*- and *O. europaea* var. *koroneiki*-generated olive mill wastewaters: influence of cultivation and harvesting practice on bacterial community structure," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 27, no. 1, pp. 57–66,
- Klappenbach J.A., Saxman P.R., Cole J.R., Schmidt T.M.; (2001). rrnDB: The ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res*, 29:181-184.
- Kleikemper J., Schroth M.H., Sigler W.V., Schmucki M., Bernasconi S.M., Zeyer J., (2002). Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol*, 68:1516-1523.

Kloepper J. W., and Schroth M. N.,(1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Plant Pathogenic Bacter.* Vol. 2, 879-882

Kolton, M., Meller Harel, Y., Pasternak, Z., Graber, E. R., Elad, Y., & Cytryn, E. (2011). Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), 4924–30.

Kotsou, M., Mari, I., Lasaridi, K., Chatzipavlidis, I., Balis, C., & Kyriacou, A. (2004). The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *Applied Soil Ecology*, 26(2), 113–121.

Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjoback R., Sjogreen B., Strombom L., Stahlberg A. Zoric N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molec Aspects Medic*, 27: 95-125.

Kulcu, R., Yaldiz, O., (2004). Determination of aeration rate and kinetics of composting some agricultural wastes. *Bioresour. Technol.* 93, 49–57.

Kuzyakov Y., Friedel J.K., Stahr K., (2000). Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biol Biochem* 32:1485–1498

Kuzyakov, Y. (2010). Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(9), 1363–1371.

Lane D.J., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L., Pace N.R., (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 6955-6959.

Layton A., McKay L., Williams D., Garrett V., Gentry R., Sayler G., (2006). Development of bacteroides 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Appl Environ Microbiol*, 72: 4214-4224.

Lee, J.-J., Park, R.-D., Kim, Y.-W., Shim, J.-H., Chae, D.-H., Rim, Y.-S., Kim, K.-Y. (2004). Effect of food waste compost on microbial population, soil enzyme activity and lettuce growth. *Bioresource Technology*, 93(1), 21–8.

Lladó, S., Jiménez, N., Viñas, M., & Solanas, A. (2009). Microbial populations related to PAH biodegradation in an aged biostimulated creosote-contaminated soil. *Biodegradation*, 20(5), 593–601.

Lord N.S., Kaplan C.W., Shank P., Kitts C.L., Elrod S.L., (2002). Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment (TRF) pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions. *FEMS Microbiol Ecol*, 42: 327-337.

Macnaughton S., Stephen J.R., Chang Y.J., Peacock A., Flemming C.A., Leung K.T., (1999). Characterization of metal-resistant soil eubacteria by polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis with isolation of resistant strains. *Can J Microbiol*, 45:116-124.

Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer K.H., (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol*, 15:593-600.

Marchesi J.R., Sato T., Weightman A.J., Martin T.A., Fry J.C., Hiom S.J., (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 64: 795-799.

Mattiasson B., (2003). Incomplete degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil inoculated with wood-rotting fungi and their effect on the indigenous soil bacteria. *Environ Toxicol Chem*, 22: 1238-1243

Mazzola M., Granatstein D.M., Elfving D.C., Mullinix K., (2001). Suppression of specific apple root pathogens by *Brassica napus* seed meal amendment regardless of glucosinolate content. *Phytopathology* 91: 673-679.

McKellar M.E., Nelson E.B., (2003). Compost-induced suppression of *Pythium* damping-off is mediated by fatty-acid metabolizing seed-colonizing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 452-460.

Mechri, B., Echbili, A., Issaoui, M., Braham, M., Elhadj, S. Ben, & Hammami, M. (2007). Short-term effects in soil microbial community following agronomic application of olive mill wastewaters in a field of olive trees. *Applied Soil Ecology*, 36(2-3), 216–223.

Mechri, B., Mariem, F. Ben, Baham, M., Elhadj, S. Ben, & Hammami, M. (2008). Change in soil properties and the soil microbial community following land spreading of olive mill wastewater affects olive trees key physiological parameters and the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 152–161.

Mekki, A., Dhouib, A., & Sayadi, S. (2006). Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater. *Microbiological Research*, 161(2), 93–101.

Mercado-Blanco J, Bakker PAHM (2007) Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek* 92:367–389

Mercado-Blanco J, Rodríguez-Jurado D, Hervás A, Jiménez-Díaz RM (2004) Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biol Control* 30:474–486

Millan B., Lucas R., Robles A., García T., de Cienfuegos G. A., and Gálvez A., (2000) “A study on the microbiota from olive- mill wastewater (OMW) disposal lagoons, with emphasis on filamentous fungi and their biodegradative potential,” *Microbiological Research*, vol. 155, no. 3, pp. 143–147,.

Mondini C.,and Sequi P., (2008). Implication of soil C sequestration on sustainable agriculture and environment. *Waste management* (New York, N.Y.), 28(4), 678–84.

Moore-Kucera, J., Dick, R.P., (2008). Application of ¹³C-labeled litter and root materials for in situ decomposition studies using phospholipid fatty acids. *Soil Biology & Biochemistry* 40, 2485-2493.

Moreno, J. L., Bastida, F., Sánchez-Monedero, M. a., Hernández, T., & García, C. (2013). Response of Soil Microbial Community to a High Dose of Fresh Olive Mill Wastewater. *Pedosphere*, 23(3), 281–289.

Morillo, J. a, Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sánchez, M., Ramos-Cormenzana, a, & Russell, N. J. (2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(1), 25–39.

Morrison T.B., Weis J.J., Wittwer C.T., 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24:954-962.

Murray A.E., Preston C.M., Massana R., Taylor L.T., Blakis A., Wu K., DeLong E.F., (1998). Seasonal and spatial variability of bacteria and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl Environ Microbiol*, 64: 2585- 2595.

Muyzer G. and Smalla K., (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 127-141.

Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G., (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 59:695- 700.

Muyzer G., Teske A., Wirsén C.O., (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol*, 164:165-172

- Nakatsu C.H., Torsvik V., Øvreå L., (2000). Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA chain reaction products. *Soil Sci Soc Am J*, 64: 1382-1388
- Nasini, L., Gigliotti, G., Balduccini, M. A., Federici, E., Cenci, G., & Proietti, P. (2013). Effect of solid olive-mill waste amendment on soil fertility and olive (*Olea europaea* L.) tree activity. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 164, 292–297.
- Noble R., Coventry E., (2005). Suppression of soil-borne plant diseases with composts: a review. *Biocontrol Science and Technology* 15: 3-20.
- Nottingham, A.T., Griffiths, H., Chamberlain, P.M., Stott, A.W., Tanner, E.V.J., (2009). Soil priming by sugar and leaf-litter substrates: a link to microbial groups. *Applied Soil Ecology* 42, 183e190.
- Novinscak, A., DeCoste, N.J., Surette, C., Filion, M., (2009). Characterization of bacterial and fungal communities in composted biosolids over a 2 year period using denaturing gradient gel electrophoresis. *Can. J. Microbiol.* 55, 375–387.
- Ntougias S., Ehaliotis C., Papadopoulou K. K., and Zervakis G., (2006a). “Application of respiration and FDA hydrolysis measurements for estimating microbial activity during composting processes,” *Biology and Fertility of Soils*, vol. 42, no. 4, pp. 330–337.
- Ntougias S., Zervakis G. I., Ehaliotis C., Kavroulakis N., and Papadopoulou K. K., (2006b). “Ecophysiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline two-phase olive mill wastes,” *Research in Microbiology*, vol. 157, no. 4, pp. 376–385.
- Ntougias, S., Bourtzis, K., & Tsiamis, G. (2013). Review Article The Microbiology of Olive Mill Wastes.
- Nubel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G., (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 63:3327-3332.

Obied H. K., Bedgood D. R., Prenzler J.r., P. D., and Robards K., (2007). "Bioscreening of Australian olivemillwaste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities," .Food and Chemical Toxicology,vol. 45, 1238–1248.

Odlare M., Arthurson V., Pell M., Svensson K., Nehrenheim E., and Abubaker J., (2011). Land application of organic waste – Effects on the soil ecosystem. Applied Energy, 88(6), 2210–2218.

Ofek, M., Hadar, Y., & Minz, D. (2012). Ecology of root colonizing Massilia (Oxalobacteraceae). PloS One, 7(7), e40117.

Ostos J. C., López-Garrido R., Murillo J. M., and López, R., (2008). Substitution of peat for municipal solid waste- and sewage sludge-based composts in nursery growing media: effects on growth and nutrition of the native shrub Pistacia lentiscus L. Bioresource technology, 99(6), 1793–800.

Otten W., Hall D., Harris K., Ritz K., Young I.M., Gilligan C.A., (2001). Soil physics, fungal epidemiology and the spread of Rhizoctonia solani. New Phytologist 151, 459e468

Papafotiou, M., Phsyhalou, M., Kargas, G., Chatzipavlidis, I., Chronopoulos, J., 2004. Olive-mill wastes compost as growing medium component for the production of poinsettias. Scientia Horticulturae 102, 167e175.

Park J.W. and Crowley D.E., (2006). Dynamic changes in nah Ac gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils. Appl Microbiol Biotechnol, 72: 1322-1329

Paterson, E., Gebbing, T., Abel, C., Sim, A., Telfer, G., (2007). Rhizodeposition shapes rhizosphere microbial community structure in organic soil. New Phytologist 173, 600e610.

Pepi M., Lampariello L.R., Altieri R., Esposito A., Perra G., Renzi M., Lobianco A., Feola A., Gasperini S., Focardi S.E., (2010). Tannic acid degradation by

bacterial strains *Serratia* spp. and *Pantoea* sp. isolated from olive mill waste mixtures. *Int. Biodeter. Biodegr.* 64, 73–80.

Pérez-Piqueres A., Edel-Hermann V., Alabouvette C., Steinberg C., (2006). Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 460-470.

Pierantozzi, P., Torres, M., Verdenelli, R., Basanta, M., Maestri, D. M., & Meriles, J. M. (2013). Short-term impact of olive mill wastewater (OMWW) applications on the physico-chemical and microbiological soil properties of an olive grove in Argentina. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48(5), 393–401.

Powell S.M., Ferguson S.H., Bowman J.P., Snape I., (2006). Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in antarctic soil during bioremediation. *Microb Ecol*, 52: 523-532.

Prieto P, Navarro-Raya C, Valverde-Corredor A, Amyotte SG, Dobinson KF, Mercado-Blanco J (2009) Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its in planta interaction with the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Microbial Biotechnol* 2:499–511

Prieto, P., Schilirò, E., Maldonado-González, M. M., Valderrama, R., Barroso-Albarracín, J. B., & Mercado-Blanco, J. (2011). Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. *Microbial Ecology*, 62(2), 435–45.

Proietti P., Nasini L., Fagiani F.,(2006). Possibili usi della sansa. Residui e sottoprodotti organici una risorsa da valorizzare. *Atti del Workshop Dai residui vegetali zootecnici ed urbani energia per il territorio Palazzo Trinci Foligno*, 25 ottobre 2007

Ragni M., Melodia L., Bozzo F., Colonna M.A., Megna V., Todena F., Vincenti A., (2003): Use of a de-stoned olive pomace in feed for heavy lamb production. Italy. *J. Anim. Sci.*, Vol. 2 (Suppl. 1): 485-487.

Rinsoz T, Duquenne P, Greff-Mirguet G, Oppliger A (2008) Application of real-time PCR for total airborne bacterial assessment: comparison with epifluorescence microscopy and culture-dependent methods. *Atmos Environ* 42, 6767–6774.

Robert M., Chenu C., (1992). In: Stotzky, G., Ballag, J.M. (Eds.), *Interaction between soil minerals and microorganisms*. *Soil Biochem.* 7, 307–403.

Roig, A., Cayuela, M. L., and Sánchez-Monedero, M. A., (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste management* (New York, N.Y.), 26(9), 960–9.

Romo-Sanchez, Alves-Baffi M., Arévalo-Villena M., Ubeda-Iranzo J., and Briones-Pérez A., (2010). “Yeast biodiversity from oleic ecosystems: study of their biotechnological properties,” *Food Microbiology*, vol. 27, no. 4, pp. 487–492.

Ros, M., Pascual, J. a., Garcia, C., Hernandez, M. T., & Insam, H. (2006). Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(12), 3443–3452.

Ryckeboer J., Mergaert J., Vaes K., Klammer S., De Clercq D., Coosemans J., Insam H., Swings J., (2003). A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Ann. Microbiol.* 53, 349–410.

Sabatini N. (2010) Recent patents in olive oil industry: New technologies for the recovery of phenols compounds from olive oil, olive oil industrial by-products and waste waters. *Recent Pat Food Nutr Agric.* 2010 Jun;2(2):154-9. Review.

Sampedro, I., Giubilei, M., Cajthaml, T., Federici, E., Federici, F., Petruccioli, M., & D’annibale, A. (2009). Short-term impact of dry olive mill residue addition to soil on the resident microbiota. *Bioresource Technology*, 100(23), 6098–106.

Sandaa R.A., Torsvik V., Enger Ø., (2001). Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. *Soil Biol Biochem*, 33: 287-295

Scheuerell S.J., Sullivan D.M., Mahaffee W.F., (2005). Suppression of seedling damping-off caused by *Pythium ultimum*, *P. irregulare*, and *Rhizoctonia solani* in container media amended with a diverse range of Pacific Northwest compost sources. *Phytopathology* 95: 306-315.

Schmilewski G., (2000). “Sustainable horticulture with peat-a German case study”, *Peatlands International* 1: 27-30

Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. (2001). A new phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res*, 105: 1413-1421.

Shimizu T., Ohshima S., Ohtani K., Hoshino K., Honjo K., Hayashi H., (2001). Sequence heterogeneity of the ten rRNA operons in *Clostridium perfringens*. *Syst Appl Microbiol*, 24:149-156

Singleton D.R., Furlong M.R., Rathbun S.L., Whitman W.B., (2001). Quantitative comparison of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 67: 4374-4376.

Singleton D.R., Sangaiah R., Gold A., Ball L.M., Aitken M.D., (2006). Identification and quantification of uncultivated Proteobacteria associated with pyrene degradation in a bioreactor treating PAH-contaminated soil. *Environ Microbiol*, 8:1736-1745

Sinigaglia M., Di Benedetto N., Bevilacqua A, Corbo M. R., Capece A., and Romano P., (2010). “Yeasts isolated from olive mill wastewaters from southern Italy: technological characterization and potential use for phenol removal,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 87, no. 6, pp. 2345–2354.

Smalla K., Cresswell N., Mendonca-Hagler L.C., Wolters A., van Elsas J.D.,(1993). Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J Appl Bacteriol*, 74: 78-85.

Smith C.J., Nedwell D.B., Dong L.F., Osborn A.M., (2006). Evaluation of quantitative polymerase chain reaction based approaches for determining gene

copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environ Microbiol*, 5: 804-815.

Šnajdr, J., Valášková, V., Merhautová, V., Cajthaml, T., Baldrian, P., (2008). Activity and spatial distribution of lignocellulose-degrading enzymes during forest soil colonization by saprotrophic basidiomycetes. *Enzyme Microb. Technol.* 43, 186–192

Sparling, G., Vojvodic-Vukovic, M., Schipper, L.A., (1998). Hot-watersoluble C as a simple measure of labile soil organic matter: the relationship with microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1469–1472.

Szczecch M., Smolin'ska U., (2001). Comparison of suppressiveness of vermicomposts produced from animal manures and sewage sludge against *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan var. *nicotianae*. *Journal of Phytopathology* 149: 77-82.

Szczecch M.M., (1999). Suppressiveness of vermicompost against *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Phytopathology* 147: 155-161.

Taccogna G. (2009) Il regime giuridico della sansa derivante dall'estrazione di olio d'oliva nei frantoi, tra rifiuti, sottoprodotti e biomasse.

Takaku, H., Kodaira, S., Kimoto, A., Nashimoto, M., Takagi, M., (2006). Microbial communities in the garbage composting with rice hull as an amendment revealed by culture-dependent and -independent approaches. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 42–50.

Taylor S., Wakem M., Dijkman G., Alsarraj M., and Nguyen M. (2010). A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods (San Diego, Calif.)*, 50(4), S1–5.

Termorshuizen A.J., van Rijn E., van der Gaag D.J., Alabouvette C., Chen Y., Lagerlöf J., Malandrakis A.A., Paplomatas E.J., Rämert B., Ryckeboer J., Steinberg C., Zmora-Nahum S., (2007). Suppressiveness of 18 composts against

7 pathosystems: Variability in pathogen response. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 2461-2477.

Tilston E.L., Pitt D., Groenhof A.C., (2002). Composted recycled organic matter suppresses soil-borne diseases of field crops. *New Phytologist* 154: 731-740.

Tsiamis G., Tzagkaraki G., Chamalaki A., Xypteras N., Andersen G., Vayenas D., Bourtzis K., (2012) "Olive-mill wastewater bacterial communities display a cultivar specific profile," *Current Microbiology*, vol. 64, no. 2, pp. 197–203.

Tuomela M., Vikman A., Hatakka M., Itavaara M.,. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresour. Technol.* 72, 169–183.

Uroz, S., Buée, M., Murat, C., Frey-Klett, P., & Martin, F. (2010). Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environmental Microbiology Reports*, 2(2), 281–8.

Venieri, D., Rouvalis, A. and Iliopoulou-Georgudaki, J. (2010) Microbial and toxic evaluation of raw and treated olive oil mill wastewaters, *Journal of Chemical Technology and Biotechnol- ogy*, vol. 85, no. 10, pp. 1380–1388,.

Vivas A., Moreno B., Garcia-Rodriguez S., and Benitez E., (2009). "Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste". *Bioresource Technology*, vol. 100, no. 3, pp. 1319–1326.

Vujanovic, V., Hamelin, R. C., Bernier, L., Vujanovic, G., & St-Arnaud, M. (2007). Fungal Diversity, Dominance, and Community Structure in the Rhizosphere of Clonal *Picea mariana* Plants Throughout Nursery Production Chronosequences. *Microbial Ecology*, 54(4), 672–684.

Wang, Q, G. M. Garrity, J. M. Tiedje, and J. R. Cole. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 73(16):5261-5267

Watanabe K., Kodama Y., Syutsubo K., Harayama S., (2000). Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Appl Environ Microbiol*, 66: 4803-4809.

Wilson M.S., Bakermans C., Madsen E.L., (1999). In situ, real-time catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. *Appl Environ Microbiol*, 65: 80-87.

Wintzingerode F.V., Gobel U.B., Stackebrandt E., (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev*, 21:213-229.

Y Bashan and L E de-Bashan. (2005). Plant Growth-Promoting. *Encyclopedia of soils in the environment*, 1., 103-115

Ye S.F., Yu J.Q., Peng J.H., Zheng J.H., Zou L.Y., (2004). Incidence of *Fusarium* wilt in *Cucumis sativus* L. is promoted by cinnamic acid, an autotoxin in root exudates. *Plant and Soil* 263: 143-150.

Zhang T. and Fang H.H.P., (2005). 16S rDNA clone library screening of environmental samples using melting curve analysis. *J Chin Inst Chem Eng*.

RINGRAZIAMENTI

Al termine di questi tre anni vorrei ringraziare tutte le persone che mi sono state vicine.

Prima di tutto ringrazio mio padre e mia madre che mi hanno permesso di intraprendere questa strada del dottorato e mia sorella che mi ha sempre sostenuto. Con loro, ringrazio anche la famiglia di mio marito che mi ha accolto come fossi figlia loro.

Inoltre, desidero ringraziare il Dottor Ermanno Federici che in questi tre anni mi ha coinvolto in molti progetti differenti facendomi conoscere molte realtà che hanno arricchito il mio bagaglio umano e culturale.

Dopo quasi 5 anni di frequentazione di questi laboratori, un enorme grazie va a Silvia, con la quale ho condiviso tutto, sia momenti di immensa gioia che di grande fatica, che hanno reso speciale la nostra amicizia. Fare questa esperienza senza di te, non sarebbe stata la stessa cosa.

Un grazie importantissimo va ad Elena, che è sempre venuta in mio aiuto ogni volta che ne ho avuto bisogno non risparmiandosi mai, come solo poche persone sanno fare.

Un grande ringraziamento è per Lilia, che con le sue competenze e con la sua speciale umanità, mi ha aiutato in una parte fondamentale del mio lavoro, anche lei, non risparmiandosi mai.

Un grazie speciale anche a Valentina e Roberta, che mi sono state vicine in questo ultimo periodo, sempre pronte ad aiutarmi.

Infine, un grazie immenso a mio marito Luca, per aver accettato di essere sempre al mio fianco e per avere la costante capacità di farmi rialzare lo sguardo ogni volta che non so in che direzione sto camminando.