

IMPIEGO DI ANTAGONISTI MICROBICI NELLA LOTTA CONTRO I MARCIUMI DELLA FRUTTA IN POST-RACCOLTA NELL'AMBITO DEL PROGETTO ORTOFRULOG

A. AMBRICO, M. TRUPO, R. BALDUCCHI, S. PALAZZO, T. LOGROIO

ENEA - Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Divisione Biotecnologie e Agroindustria
Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi
Centro Ricerche Trisaia, Matera

R. ALBERGO, F. LIUZZI, I. DE BARI

ENEA - Dipartimento Tecnologie Energetiche
Divisione Bioenergia, Bioraffineria e Chimica Verde
Laboratorio Tecnologie e Processi per le Bioraffinerie e la Chimica Verde
Centro Ricerche Trisaia, Matera

S. CANESE

ENEA - Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Supporto Tecnico Strategico
Centro Ricerche Casaccia, Roma



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

IMPIEGO DI ANTAGONISTI MICROBICI NELLA LOTTA CONTRO I MARCIUMI DELLA FRUTTA IN POST-RACCOLTA NELL'AMBITO DEL PROGETTO ORTOFRULOG

A. AMBRICO, M. TRUPO, R. BALDUCCHI, S. PALAZZO, T. LOGROIO

ENEA - Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Divisione Biotecnologie e Agroindustria
Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi
Centro Ricerche Trisaia, Matera

R. ALBERGO, F. LIUZZI, I. DE BARI

ENEA - Dipartimento Tecnologie Energetiche
Divisione Bioenergia, Bioraffineria e Chimica Verde
Laboratorio Tecnologie e Processi per le Bioraffinerie e la Chimica Verde
Centro Ricerche Trisaia, Matera

S. CANESE

ENEA - Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Supporto Tecnico Strategico
Centro Ricerche Casaccia, Roma

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

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

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

IMPIEGO DI ANTAGONISTI MICROBICI NELLA LOTTA CONTRO I MARCIUMI DELLA FRUTTA IN POST-RACCOLTA NELL'AMBITO DEL PROGETTO ORTOFRULOG

A. AMBRICO, M. TRUPO, R. BALDUCCHI, S. PALAZZO, T. LOGROIO, R. ALBERGO, F. LIUZZI, I. DE BARI, S. CANESE

Riassunto

I prodotti ortofrutticoli sono caratterizzati da un'elevata deperibilità soprattutto durante la fase del post-raccolta. In questo lavoro sono state condotte delle ricerche volte a valutare l'efficacia di alcuni microrganismi antagonisti per contrastare e limitare l'insorgenza di malattie fungine che interessano la frutta durante la fase di conservazione e trasporto. Sono stati saggiati i lieviti *Pichia guilliermondii* ceppo CTR-2 e *Pichia anomala* ceppo GR-2001 ed un batterio *Bacillus subtilis* ceppo ET-1 contro *Penicillium digitatum* su frutti di mandarino e contro *Botrytis cinerea* su frutti di fragola ed uva. I frutti sono stati trattati con sospensioni cellulari del lievito (10^7 CFU/ml) e con il supernatante ottenuto dalla crescita di *B. subtilis* in coltura liquida agitata. In seguito, i frutti sono stati artificialmente inoculati con sospensioni conidiche dei patogeni (10^4 conidi/ml) e incubati a 20 °C con un'umidità relativa del 90%. Alla comparsa dei sintomi è stato rilevato il numero dei frutti con marciumi ed i dati sono stati sottoposti ad elaborazione statistica mediante analisi della varianza. Le percentuali di frutti infetti delle tesi protette con il supernatante di *B. subtilis* e con la sospensione cellulare di *P. guilliermondii*, sono state rispettivamente, su mandarino del 20% e 15%, su fragola del 34% e 56% e su uva 15% e 40%. La percentuale di frutti infetti nelle tesi testimoni è risultata di circa il 100%. Dall'analisi HPLC del supernatante di *B. subtilis* ottenuto dalla coltura in High Medium broth è stata individuata una elevata quantità di iturina: noto metabolita secondario ad attività antifungina.

Parole chiave: Post-raccolta, Controllo biologico, Antagonisti microbici, Iturina.

Fruits and vegetables are afflicted by economically important postharvest diseases. In this study some antagonistic microorganisms against fungal diseases during fruits storage were evaluated. The antagonist activity of Pichia guilliermondii, Pichia anomala and Bacillus subtilis strains was tested against Penicillium digitatum on citrus fruits and Botrytis cinerea on strawberries and grape fruits. The fruits were treated with cell suspensions of P. guilliermondii (10^7 CFU/ml) and with cell-free culture fluid of B. subtilis. After treatment, the fruits were artificially inoculated with conidial suspensions of the pathogens (10^4 - 10^5 conidia/ml). All fruits were stored at 20 °C and 90 % relative humidity and their quality was assessed daily for the development of rots. Three replicates of each treatment were done and the data were statistically analysed using analysis of variance. For citrus fruits, strawberry and grape fruits treated with B. subtilis supernatant it was observed a percentages of infected fruits of 20%, 34%, and 15%, respectively. Concerning the citrus fruits, namely strawberry and grape fruits treated with yeast cell suspensions, it was observed a percentages of infected fruits of 15% , 56% and 40%, respectively. The percentage of infected fruits in the control test was 100 %. HPLC analysis of the supernatant from the B. subtilis culture indicated an high amount of iturin. It belongs to a category of bioactive compounds, biosurfactants, that are well known for a wide spectrum of antifungal activity.

Keywords: Postharvest, Biological control, Antagonist, Iturine.

INDICE

RIASSUNTO.....	3
1. SINTESI DEL PROGETTO ORTOFRULOG	7
2. SCOPO DELLA RICERCA	8
3. INTRODUZIONE	9
3.1. Antagonisti saggiati	12
4. MATERIALI E METODI	14
4.1. Microrganismi utilizzati e condizioni di crescita in laboratorio	14
4.2. Saggi di antagonismo in vitro	15
4.3. Messa a punto del processo di crescita in beuta	15
4.4. Analisi quantitativa e qualitativa dei metaboliti secondari mediante HPLC	17
4.5. Monitoraggio della crescita cellulare dell'isolato ET-1 e della produzione di Iturina	18
4.6. Messa a punto del processo di crescita su scala di laboratorio	19
4.7. Scale up e downstream di processo	21
4.8. Liofilizzazione e Packaging.....	22
4.9. Prove di lotta biologica in vivo.....	24
4.10 Prove simulative di lotta biologica presso azienda ortofrutticola.....	27
5. RISULTATI	29
5.1. Saggi di antagonismo in vitro dell'isolato ET-1 di <i>B. subtilis</i>	29
5.2. Messa a punto del processo di crescita in beuta	30
5.3. Analisi quantitativa e qualitativa dei metaboliti secondari mediante HPLC	33
5.4. Monitoraggio della crescita cellulare dell'isolato ET-1 e della produzione di Iturina	35
5.5. Messa a punto del processo di crescita su scala di laboratorio	36
5.6. Scale up e downstream di processo	37
5.7. Liofilizzazione.....	38
5.8. Prove di lotta biologica in vivo.....	40
5.9. Prove simulative di lotta biologica presso azienda ortofrutticola.....	44
4. DISCUSSIONE	46
BIBLIOGRAFIA	50

1. SINTESI DEL PROGETTO ORTOFRULOG

La produzione ortofrutticola del Mezzogiorno d'Italia costituisce una delle più importanti filiere del *Made in Italy*. In questi ultimi anni, l'organizzazione del settore agro-alimentare, ed in particolare quello dell'ortofrutta, è interessata da importanti dinamiche evolutive determinate principalmente dal ruolo dominante della Grande Distribuzione Organizzata (GDO), dal mutamento delle abitudini alimentari dei consumatori e dalla crescente globalizzazione dell'economia. In maniera diversa, tutti questi fattori hanno spinto i vari attori delle filiere agro-alimentari ad aumentare la "domanda di nuove tecnologie avanzate" necessarie a produrre prodotti con alti standard qualitativi.

A fronte di questo contesto di riferimento, è stato proposto il Progetto ORTOFRULOG "Piattaforma logistica innovativa per le produzioni ortofrutticole nazionali destinate ai mercati interni ed esteri" finanziato dal Ministero dello Sviluppo Economico nell'ambito del bando Industria 2015 "Nuove Tecnologie per il Made in Italy". Il Progetto ORTOFRULOG ha come obiettivo la realizzazione di un prototipo di piattaforma logistica innovativa basata sull'utilizzo delle "Information Communication Technologies" (ICT), per le produzioni ortofrutticole nazionali destinati ai mercati interni ed internazionali. Tale prototipo di piattaforma logistica mira al miglioramento della competitività del comparto ortofrutticolo nazionale mediante la valorizzazione delle merci trasportate, la massimizzazione della soddisfazione del cliente e la tutela dell'ambiente.

I partner di questo Progetto hanno contribuito, ognuno per le proprie competenze, al conseguimento dei seguenti obiettivi specifici:

- Piattaforma logistica ICT based. È stato standardizzato l'utilizzo delle tecnologie hardware e software al fine di monitorare in tempo reale i parametri critici per la frutta in post raccolta.
- Sistemi innovativi per il packaging. Sono stati progettati nuovi imballi in grado di adattarsi al prodotto trasportato, di soddisfare le esigenze del mercato di destinazione, di garantire la massima igiene e di offrire il minor impatto economico ed ambientale.
- Sistemi innovativi per la valutazione e gestione della qualità dei prodotti. Sono stati realizzati prototipi di sensori per la misura e monitoraggio dei principali parametri di qualità da impiegare durante il trasporto. Inoltre, sono stati sviluppati innovativi sistemi biologici e fisici per la difesa dei prodotti in post-raccolta e trasporto.
- Validazione del prototipo. Il prototipo di piattaforma logistica, al termine delle attività sperimentali, è stato validato mediante approccio di tipo simulativo.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Nell'ambito degli obiettivi realizzativi del progetto Ortofrulog sono stati condotte delle ricerche presso il Laboratorio di Bioprodotti e Bioprocessi SSPT-BIOAG del Centro Ricerche ENEA di Trisaia allo scopo di individuare nuove strategie di lotta mediante l'utilizzo di antagonisti microbici contro i marciumi della frutta in post-raccolta. Le principali attività di ricerca hanno riguardato:

- la valutazione *in vitro* ed *in vivo* dell'efficacia di specifici *antagonisti* microbici contro *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. e *Botrytis cinerea* Pers. responsabili di gravi alterazione in post-raccolta;
- l'individuazione di protocolli di crescita in beuta e in bioreattore da laboratorio su substrato liquido per massimizzare la produzione di biomassa cellulare e metaboliti secondari degli antagonisti microbici;
- lo scale-up e downstream di processo;
- la validazione dei risultati delle prove *in vivo* presso un magazzino ortofrutticolo.

3. INTRODUZIONE

I prodotti ortofrutticoli durante tutte le fasi produttive sono esposti a microrganismi in grado di provocare malattie con effetti negativi sulla qualità e quantità. Per quanto riguarda la fase del post-raccolta, sebbene negli ultimi anni lo sviluppo di moderne tecniche di conservazione ha permesso di prolungare la *shelf-life* dei prodotti ortofrutticoli, si registrano ugualmente ingenti perdite di prodotto a causa dello sviluppo di marciumi parassitari. Le perdite in questa fase, infatti, ammontano a circa il 20-25% della produzione agricola mondiale e nel caso dell'Italia oscillano mediamente intorno al 10% del prodotto commercializzato (Droby, 2006).

Per proteggere le piante ed i frutti dalla moltitudine di organismi fitopatogeni, solitamente vengono utilizzati prodotti chimici di sintesi (Lorito *et al.*, 2003). I numerosi formulati chimici presenti in commercio differiscono fra di loro per principio attivo, meccanismo d'azione, tipologia di penetrazione nella pianta, meccanismo di trasformazione biologica e destino ambientale (Tormena, 2010).

Gli effetti dei formulati chimici sulla salute dell'uomo e sull'ambiente possono essere diversi, soprattutto se l'impatto è calcolato sulle esposizioni di medio e lungo periodo. Nell'uomo, oltre ai sintomi immediati, derivanti dal contatto diretto ed accidentale con queste sostanze, le esposizioni più lunghe possono provocare malattie croniche e possibili effetti cancerogeni (Salvi *et al.*, 2003). Quindi, oltre all'esposizione diretta per chi usa i pesticidi durante le operazioni agricole, non è da sottovalutare l'esposizione indiretta per chi vive o frequenta l'ambiente circostante a quello in cui vengono impiegate tali sostanze e per chi consuma il prodotto ortofrutticolo trattato (Kamel e Hoppin, 2004).

Ne deriva la necessità di affrontare il tema dell'uso sostenibile degli agrofarmaci in agricoltura, in base al principio di precauzione per preservare la salute dell'uomo, il benessere degli animale e i delicati equilibri degli ecosistemi e dell'ambiente (Tormena, 2010).

Con decreto ministeriale del 22 gennaio 2014 è stato adottato il Piano di Azione Nazionale (PAN) per l'uso sostenibile dei prodotti fitosanitari in accordo con la direttiva 2009/128/CE recepita con il decreto legislativo 14 agosto 2012, n. 150.

Il PAN definisce gli obiettivi, le misure, le modalità e i tempi necessari alla conversione delle aziende ad un sistema di produzione razionale e rispettoso dell'ambiente. Inoltre, promuove lo sviluppo e l'introduzione della difesa integrata e di metodi di difesa alternativi, al fine di ridurre la dipendenza dai prodotti fitosanitari.

Gli obiettivi del Piano riguardano diversi settori riassumibili in quattro gruppi principali: 1) protezione degli utilizzatori dei prodotti fitosanitari e della popolazione interessata; 2) tutela dei

consumatori; 3) salvaguardia dell'ambiente acquatico e delle acque potabili; 4) conservazione della biodiversità e degli ecosistemi.

Accanto all'uso sostenibile dei prodotti chimici di sintesi, un valido mezzo di difesa ecocompatibile per la protezione delle piante e dei prodotti è rappresentato dalla lotta biologica con antagonisti microbici, "biocontrol agents" (BCA) (Alabouvette et al., 2006; Ianiri, 2011; Mari *et al.*, 2007; Pritts, 2000). La lotta biologica consiste nell'utilizzare organismi viventi, o molecole derivate da essi, con la finalità di limitare e controllare la crescita di organismi patogeni o parassiti e contenere o evitare i danni provocati dall'attività di tali organismi nocivi, dimostrandosi quindi come uno tra i mezzi tecnicamente più promettenti nell'agricoltura ecocompatibile (Iannizzotto, 2007).

La possibilità d'impiego di microrganismi per il controllo di patogeni inizia con gli studi di William Roberts, il quale nel 1874 dimostrò l'azione antagonista tra colture liquide di *Penicillium glaucum* e la contaminazione batterica. Però le prime conoscenze sui meccanismi d'azione del biocontrollo risalgono al 1987 grazie a Baker che descrisse l'ecologia e la fisiologia del micoparassitismo (Tormena, 2010). I microrganismi antagonisti hanno la capacità di contenere o di ostacolare lo sviluppo di miceti patogeni mediante diversi meccanismi di azione che possono ricondursi a tre tipologie principali (Ianiri, 2011) :

1) l' *antibiosi*: la capacità di produrre metaboliti secondari tossici dotati di attività antimicrobica ed inibitoria nei confronti di microrganismi fitopatogeni (Irtwange, 2006). I meccanismi tramite cui questo tipo di antagonismo si manifesta sono:

- emissione nel substrato di molecole organiche a basso peso molecolare, come antibiotici e batteriocine, molte delle quali sono prodotte da microrganismi presenti nel terreno e che, a concentrazioni limitate, hanno effetti deleteri sulla crescita e sull'attività dei patogeni. Una caratteristica molto comune tra i microrganismi è la capacità di rilasciare metaboliti secondari ad attività antibiotica (Madigan e Martinko, 2006). Degli esempi sono la gliovirina e la gliotossina prodotte da *Trichoderma* spp. (Vinale, 2007), oppure i vari lipopeptidi prodotti da *Bacillus* spp. attivi contro differenti patogeni, tra cui *Botrytis cinerea* (Tormena, 2010; Ongena e Jacques, 2007);
- produzione di proteasi: alcuni agenti di controllo biologico hanno la capacità di produrre molecole con attività proteolitica che inattivano gli enzimi che agiscono nel processo di patogenesi. Questa modalità di biocontrollo è stata dimostrata in diversi lavori nei quali si è notato che, il limitato sviluppo della malattia sembra dovuto alla presenza di proteine che diminuiscono l'attività degli enzimi del patogeno (Elad, 2000) e che provocano, di conseguenza, l'accumulo di oligogalatturonani di dimensioni maggiori che possono stimolare più facilmente l'attivazione della resistenza indotta nella pianta (Zimand *et al.*, 1996). Uno degli esempi in cui è stata mostrata l'attività proteolitica degli agenti di biocontrollo è l'attività di *Trichoderma viride* coinvolto nel biocontrollo di *Sclerotium rolfsii* (Tormena, 2010).

2) la *competizione per il substrato*: gli antagonisti competono con i patogeni per le sostanze nutritive e per i siti da colonizzare. Questo è un fenomeno che si sviluppa tra diverse popolazioni di individui che convivono nella stessa nicchia ecologica, che hanno le stesse esigenze fisiologiche e dispongono di limitate risorse trofiche. La competizione per il substrato consiste in una concorrenza vera e propria nell'utilizzazione delle sostanze nutritive essenziali, quali carboidrati e aminoacidi, e nel consumo dell'ossigeno (Spadaro e Gullino, 2004). Riducendo il substrato nutritivo, diminuisce la possibilità di successo dell'infezione da parte del patogeno ed è per questo che è molto importante che l'antagonista colonizzi precocemente le ferite le quali sono la principale via d'accesso per la penetrazione dei patogeni nel tessuto vegetale. Tale precoce colonizzazione delle ferite è favorita dalla capacità dell'antagonista di resistere allo stress ossidativo che si verifica in seguito al ferimento del tessuto (Castoria *et al.*, 2003). I lieviti sono capaci di assumere i nutrienti in soluzione più rapidamente ed in maggiore quantità rispetto ai conidi in germinazione dei funghi patogeni e quindi si avrà la dominanza di un gruppo microbico e la scomparsa dell'altro. *Pichia guilliermondii* è un esempio di lievito capace di agire attraverso il meccanismo della competizione per lo spazio ed i nutrienti contro i funghi patogeni del post-raccolta (Carpanelli, 2000).

3) il *parassitismo*: capacità dell'antagonista di attaccare/parassitare direttamente il patogeno. I micoparassiti si dividono in necrotrofi e biotrofi. I primi, ottengono i loro nutrienti da cellule morte dell'ospite dopo averlo ucciso, invece i biotrofi non uccidono l'ospite (Ait-Lahsen *et al.*, 2001). Per esempio, il parassitismo di *Trichoderma* spp. è di tipo necrotrofico in quanto conduce alla distruzione e morte del fungo ospite (Janisiewicz and Korsten, 2002, Rodriguez-Kabana *et al.*, 1978). In questo processo il meccanismo d'azione è regolato da enzimi litici, quali, chitinasi, glucanasi e proteasi, capaci di degradare la parete cellulare consentendo, quindi, la completa colonizzazione del fungo ospite.

In Italia alcuni formulati commerciali a base microrganismi antagonisti autorizzati e disponibili sul mercato sono:

- ◆ **AQ10** a base del fungo *Ampelomyces quisqualis* (Ecogen Inc.,USA) contro il fungo *Uncinula necator* agente del mal bianco della vite (Benuzzi e Baldoni, 2000);
- ◆ **Trianium-P** a base del fungo *Trichoderma harzianum* T-22, selezionato in Israele contro il fungo *Botrytis cinerea* agente della muffa grigia della vite e di svariate colture;
- ◆ **Botector** a base di *Aureobasidium pullulans* utilizzato in Italia per il controllo del Colpo di fuoco batterico delle pomacee (*Erwinia amilovora*), della Muffa grigia della vite (*Botrytis cinerea*) e delle malattie fungine che si sviluppano durante la conservazione delle mele;
- ◆ **Contans** basato su *Coniothyrium minitans* impiegato con successo nei diversi disciplinari di agricoltura ecocompatibile contro i marciumi dovuti ai funghi appartenenti alla famiglia delle sclerotinacee;

- ◆ **Mycostop** a base dell'attinomicete *Streptomyces griseoviridis*, ceppo K61, (Verdera Oy, Finlandia) contro patogeni fungini del suolo di molte piante orticole;
- ◆ **Tellus** contiene *Trichoderma asperellum* ceppo ICC012 e *Trichoderma gamsii* ceppo ICC 080 ed è particolarmente indicato nella prevenzione degli attacchi di funghi parassiti dell'apparato radicale e del colletto quali :
- ◆ **Serenade** contenente *Bacillus subtilis* QST-713 messo a punto in California dagli scienziati dell'AgraQuest nel 2000 ed ha come bersaglio alcune fitopatie che colpiscono l'apparato aereo quali cercospora della barbabietola, moniliosi, oidio, peronosspore e colpo di fuoco batterico;
- ◆ **Amylo-x** fungicida e battericida microbiologico a base di *Bacillus amyloliquefaciens*, ceppo D747 utilizzato su uva, fragola, pero e melo.

Nonostante molti siano i ceppi di microrganismi isolati e selezionati per le loro attività antagonistiche verso funghi fitopatogeni pochi sono quelli utilizzati nella pratica in quanto per una corretta strategia di applicazione sono necessari considerevoli studi in merito alla formulazione e registrazione (Sharma *et al.*, 2009).

3.1. Antagonisti saggiati

Pichia guilliermondii Wick

Questo microrganismo antagonista è un lievito appartenente all'ordine degli *Ascomycota*, alla famiglia *Saccharomycetaceae*; è il teleomorfo di *Candida guilliermondii*. È caratterizzato da cellule di forma ellissoidale od ovoidali le quali possono essere singole, unite in coppia o possono formare brevi catene (Figura 1). In alcune condizioni particolari è in grado di differenziare pseudoife. Si riproduce per gemmazione (riproduzione agamica) o tramite produzione di ascospore dalla tipica forma di “cappello”. L'asco è di colore ialino contenente uno o quattro spore (Wickerham, 1966).

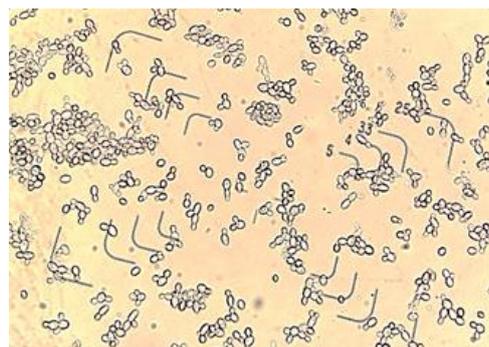


Figura 1: *Pichia guilliermondii* Wick

***Pichia anomala* Hansen**

P. anomala è un lievito appartenente all'ordine degli *Ascomycota* e alla famiglia *Saccharomycetaceae*. Ha cellule sferoidali o leggermente allungate ($2,0-5,0 \times 3,0-6,0 \mu\text{m}$). Le cellule sono singole o unite in piccoli gruppi (Figura 2). In colture artificiali in piastra forma pseudoife costituite da catene di cellule ovoidali o cilindriche. La riproduzione asessuata è la gemmazione bilaterale. Forma degli aschi contenuti da 2 a 4 ascospore a forma di “cappello”. È un lievito ubiquitario ritrovato in diverse regioni del mondo in diverse matrici organiche (Kurtzman, 2000).

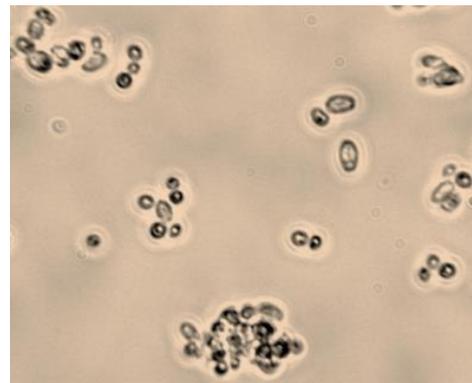


Figura 2: *Pichia anomala* Hansen

***Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn**

B. subtilis è un batterio appartenente al phylum *Firmicutes* (Ludwing *et al.*, 2008), alla classe *Bacilli*, all'ordine *Bacillales*, alla famiglia *Bacillaceae* e al genere *Bacillus* (Figura 3). Le cellule di questo batterio sono a forma di bastoncino ($0,4 \times 0,5 - 1,5 \times 2,5 \mu\text{m}$ dopo 24 ore di crescita su substrato agarizzato) caratterizzate da numerosi flagelli differenziati durante alcune fasi vitali.

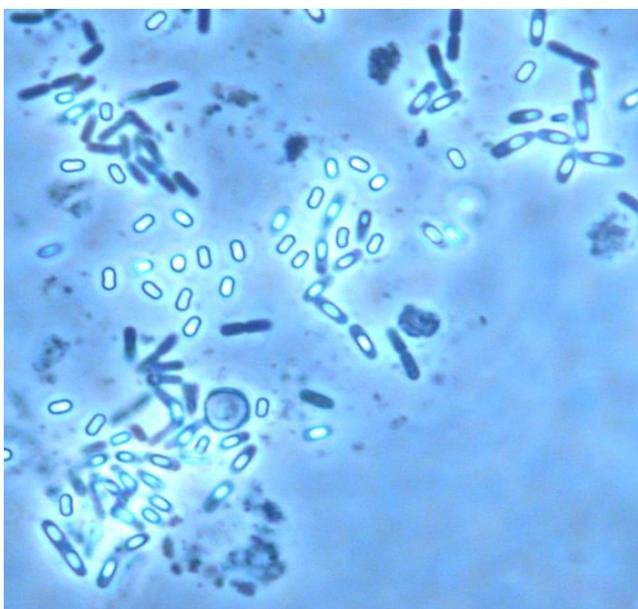


Figura 3: Cellule vegetative, endospore e spore di *Bacillus subtilis*

Risulta positivo alla colorazione di Gram. Ha la capacità di formare la spora che gli permette di tollerare condizioni ambientali estreme (disidratazione, radiazione UV e solvente organici). Le spore si differenziano al centro o verso una delle estremità della cellula (endospore), successivamente vengono liberate ed assumono una forma ovale ($0,5 \times 0,75 \mu\text{m}$). *B. subtilis* è considerato un batterio aerobico (Ford and Lawrence, 1916).

Molte specie e ceppi del genere *Bacillus* producono un gran numero di sostanze ad azione antimicrobica. In particolare, *B. subtilis* è uno dei più importanti produttori del genere *Bacillus* ed i suoi metaboliti secondari mostrano attività antifungina e/o antibatteriche contro numerosi microrganismi fitopatogeni (Chung *et al.*, 2008; Tabbene *et al.*, 2009).

4. MATERIALI E METODI

4.1. Microrganismi utilizzati e condizioni di crescita in laboratorio

Per questa ricerca sono stati usati i lieviti *Pichia guilliermondii* ceppo CTR-2 e *Pichia anomala* ceppo GR-2001 isolati dalla superficie di frutti di agrumi e selezionati dal Centro Ricerche A.A.T. (Agroindustry Advanced Technologies S.p.A.) per la loro elevata attività antagonista verso i funghi fitopatogeni (De Corato *et al.*, 2006) (Figura 4a e 4b). Inoltre, è stato utilizzato il ceppo ET-1 di *Bacillus subtilis* (Figura 4c) isolato dal terreno presso il Laboratorio SSPT-BIOAG-PROBIO del Centro Ricerche ENEA - Trisaia (Ambrico *et al.*, 2010).

Gli isolati degli antagonisti sono stati allevati in coltura pura in capsule Petri del diametro di 9 cm. Per i lieviti è stato utilizzato un terreno nutritivo agarizzato a base di Patata, Destrosio, Agar (PDA, Sigma), mentre per il batterio è stato utilizzato un substrato a base di Estratto di carne, Peptone, Agar (NA, Difco).

Per mantenere inalterate le caratteristiche di purezza e vitalità tutti i campioni sono stati conservati a -20°C in una soluzione di glicerolo al 10%.

Prima di effettuare i saggi, gli isolati venivano seminati per striscio in capsule Petri e mantenute a 25°C per 3-4 giorni al buio fino alla formazione di colonie singole.

I funghi fitopatogeni utilizzati nelle prove (*B. cinerea* e *P. digitatum*) sono stati isolati presso il Laboratorio SSPT-BIOAG-PROBIO, allevati su PDA a 25 °C e conservati presso la nostra micoteca a +4°C.

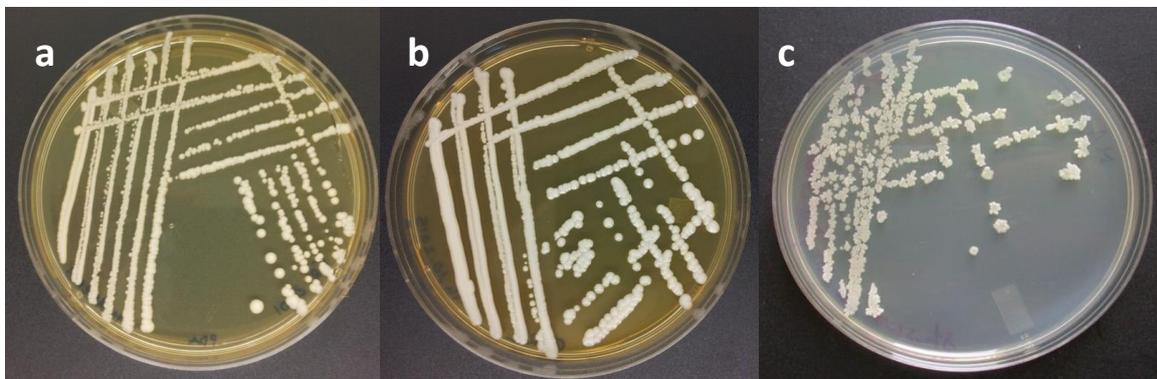


Figura 4: Piastre Petri di *Pichia guilliermondii* ceppo CTR-2 (a), *Pichia anomala* ceppo GR-2001 (b) e *Bacillus subtilis* ceppo ET-1 (c).

4.2. Saggi di antagonismo in vitro

Per l'isolato batterico ET-1 sono stati condotti dei saggi preliminari *in vitro* per valutare l'attività antagonistica nei confronti di *B. cinerea* e *P. digitatum*. Singole colonie batteriche sono state prelevate con un'ansa e strisciate su PDA addizionato con $MnCl_2$ secondo due linee lungo i bordi delle piastre a circa 3 cm dal centro. Cubetti di substrato (0,1 cm), prelevati dal margine della colonia fungina di *B. cinerea* e *P. digitatum*, sono stati adagiati al centro delle capsule Petri. Le piastre sono state poste ad incubare a 25 °C per 5 giorni. Per ogni fungo sono state effettuate 5 repliche. La percentuale di inibizione della crescita miceliare (ICM) è stata calcolata utilizzando la seguente formula: $\%ICM = [(DMA - DE) / DMA] \times 100$; ove: DE = diametro medio delle colonie cresciute in presenza dell'isolato ET-1, DMA = diametro medio delle colonie cresciute in assenza del batterio (Whipps, 1987).

4.3. Messa a punto del processo di crescita in beuta

Sono state condotte delle prove di crescita in coltura liquida agitata in beuta al fine di ottimizzare i valori dei principali parametri di crescita (composizione del substrato, pH, velocità di agitazione e tempo di incubazione) per ottenere la maggior quantità di biomassa cellulare e per il solo isolato batterico ET-1 valutare anche la produzione di metaboliti secondari ad attività antifungina saggiata nei confronti di *P. digitatum*.

Per ogni ceppo sono state preparate beute da litro del tipo Baffled Shaker contenente 150 ml di un substrato liquido di diversa composizione. Il pH del substrato è stato portato a $6,5 \pm 0,2$ con aggiunta di NaOH o HCl e successivamente sterilizzato in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Lieviti

Colonie pure dei due ceppi di lieviti cresciuti su capsule di PDA per 4-5 giorni sono state prelevate con un'ansa e stemperate nei diversi substrati liquidi sterili (Tabella 1) ed in seguito le beute sono state poste in un incubatore ad agitazione orbitale per 36 ore a 25 °C a 130 rpm (Figura 5). L'incremento di biomassa cellulare per entrambi i lieviti è stato monitorato ogni 2 ore mediante la tecnica delle diluizioni decimali.

Tabella 1: Substrati utilizzati nelle prove di crescita in coltura liquida agitata per gli isolati CTR-2 e GR-2001. Le quantità si riferiscono ad un volume finale di 150 ml.

Numero progressivo substrato e/o terreni	Glucosio/ g	Peptone / g	Scotta del latte /ml	Ammonio solfato/ g	Estratto di lievito /g	Saccarosio/g	Potassio fosfato biacido/ g
1	3	3	-	-	1,5	-	-
2	0,54	-	-	0,75	0,15	-	0,45
3	0,54	-	-	0,75	-	-	0,45
4	-	-	-	0,75	0,15	0,75	0,45
5	-	-	150	-	-	-	-



Figura 5: Incubatore – agitatore utilizzato nelle prove in beuta orbitale.

Batterio

Il ceppo ET-1 è stato inoculato in beute contenenti differenti tipi di substrato liquido (Tabella 2) partendo da colonie di 5-6 giorni cresciute su piastre di NA con aggiunta di 5 µg/ml di MnCl₂. Le beute sono state incubate per 70 ore, alla temperatura di 25 °C e a 130 rpm. Alla fine del periodo di incubazione, per valutare la quantità di biomassa cellulare, è stata effettuata, mediante la tecnica delle diluizioni decimali, la conta vitale sia delle cellule totali che del numero di spore presenti nel brodo colturale. Il numero di spore è stato valutato sottoponendo le diluizioni decimali, prima di essere piastrate su NA, ad un trattamento termico per 15 minuti a 75 °C (“pastorizzazione”) per eliminare le cellule vegetative. Al fine di valutare la produzione di metaboliti secondari dopo 70 ore di incubazione, tutti i brodi di coltura sono stati centrifugati a 13.000 x g per 15 minuti a 4 °C. Diluizioni seriali dei relativi supernatanti con aggiunta di PDA sono state sterilizzate a 100 °C per

15 minuti. In ogni piastra sono stati inoculati per spatolamento 100 µl di una sospensione di $1,3 \cdot 10^3$ conidi/ml di *P. digitatum*. Dopo 3-4 giorni di incubazione a 26 °C è stato contato il numero delle unità formanti colonie (CFU) sulle piastre con le diluizioni seriali dei diversi supernatanti e sulle piastre del Testimone. L'effetto di inibizione sulla germinabilità dei conidi è stato calcolato utilizzando la seguente formula: $\%IGC = [(CFUT - CFUS) / CFUT] \times 100$; ove: CFUT = unità formanti colonie contate sulle piastre del Testimone, CFUS = unità formanti colonie contate sulle piastre con aggiunta del Supernatante.

Tabella 2: Substrati utilizzati nelle prove di crescita in coltura liquida agitata per l'isolato ET-1 di *B. subtilis*. Le quantità si riferiscono ad un volume finale di 150 ml.

Numero progressivo substrato e/o terreni	Potato Dextrose broth / g	Latte scremato / g	Scotta del latte /ml	Caseina Ac. Digest / g	Estratto di lievito /g	Estratto di patate / g	Glucosio / g	Peptone /g	MnCl ₂ /mg
1	3,6	-	-	0,3	0,3	-	-	-	0,75
2	3,6	-	150	-	0,3	-	-	-	0,75
3	3,6	1,5	-	-	0,3	-	-	-	0,75
4	3,6	-	-	3	1	-	-	-	0,75
5	3,6	-	-	1,5	1	-	-	1,5	-
6	3,6	-	-	0,3	0,3	-	3	-	-
7	-	1,5	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	150	-	-	-	-	-	-
9	3,6	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	30	3	-	-
11	3,6	-	-	1,5	-	-	-	1,5	0,75
12	-	-	150	-	0,3	-	-	-	0,75
13	-	1,5	-	0,3	0,3	30	-	-	0,75
14	-	-	-	0,3	0,3	30	3	-	0,75
15	-	1,5	-	-	0,3	30	3	-	0,75
16	-	-	15	-	0,3	27	3	-	0,75
17	-	-	15	-	0,3	27	-	-	0,75

4.4. Analisi quantitativa e qualitativa dei metaboliti secondari mediante HPLC

Aliquote di due supernatanti per i quali è stata osservata l'inibizione del 95% dei conidi di *P. digitatum* alle diluizioni seriali di 1:128 e 1:1, rispettivamente ottenuti nei substrati 14 e 6, sono stati analizzati mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Le corse cromatografiche sono state condotte mediante un HPLC (HP) composto da una pompa quaternaria (G1311A), un comparto colonna Colcom (G1316A) e da un rivelatore DAD (G1315) (Figura 6).

La separazione è stata condotta alla temperatura di esercizio di 30 °C, su una colonna a fase inversa Alltima C18 (5 micron) utilizzando come eluente in modalità isocratica una soluzione 3,8 mM di acido trifluoroacetico e acetonitrile (70:30 v/v) al flusso di 1 ml/min per una durata totale di 70 minuti. La lunghezza d'onda di rivelazione utilizzata è stata di 210,8 nm. Venti microlitri di una soluzione acquosa di Iturina (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 252,49 ppm è stata utilizzata come standard di riferimento e 20 µL dei due campioni sono stati iniettati tal quale. Inoltre, è stato utilizzato uno standard interno ottenuto addizionando 10 µl di una soluzione acquosa di Iturina alla concentrazione di 252,49 ppm a 10 µl del supernatante 14.



Figura 6: HPLC mod. HP serie 1100 utilizzato per le analisi quantitative e qualitative.

4.5. Monitoraggio della crescita cellulare dell'isolato ET-1 e della produzione di Iturina

Il ceppo ET-1 è stato inoculato in beute contenenti 150 ml del substrato numero 14 (definito High Medium) partendo da colonie di 5 giorni. Le beute sono state incubate per 70 ore, alla temperatura di 25 °C e a 130 rpm. Ad intervalli regolari sono stati effettuati i campionamenti per monitorare il numero delle cellule vitali totali ed il numero delle endospore e/o spore prodotte nel corso della crescita. Contemporaneamente è stata quantificata la produzione dell'iturina presente nel supernatante mediante cromatografia liquida HPLC seguendo la metodologia descritta al punto 2.4.

4.6. Messa a punto del processo di crescita su scala di laboratorio

Lieviti

Le prove di crescita sono state condotte in tre repliche per entrambi i lieviti, utilizzando tecniche di allevamento in coltura liquida in “batch”. Allo scopo è stato utilizzato un fermentatore modello BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL “BIOSTAT B”, costituito da un vessel di vetro Pyrex della capacità di 5 litri e di un sistema a sonde per il controllo e regolazione del pH e temperatura.

Per poter individuare i fattori di crescita più idonei alla produzione di biomassa sono stati utilizzati i terreni di coltura 4 e 5 che sono risultati in beuta i più idonei fra quelli saggiati sia da un punto di vista tecnico che economico rispetto al substrato numero 1 di riferimento.

Al fine di preparare una coltura “starter”, una colonia pura di 2-3 giorni dei ceppi CTR-2 e GR-2001 è stata stemperata in 150 ml di Yeast-Peptide-Dextrose broth (YPD-broth) sterile contenuti in beute da 1 litro. Le beute sono state poste in agitazione per 24 ore a 110 rpm a 25 °C. La biomassa cellulare è stata separata dal liquido colturale per centrifugazione a 5.000 rpm per 5 minuti a 4°C. Il pellet di cellule ottenuto, dopo due successivi lavaggi in soluzione fisiologica, è stato risospeso con una aliquota di brodo sterile e inoculato nel vessel contenente 4 litri di brodo colturale.

La crescita dei lieviti è stata condotta a 25 °C garantendo una adeguata ossigenazione del liquido colturale con apporto di aria microfiltrata. Il brodo di coltura era mantenuto in costante agitazione mediante un agitatore meccanico a pale. Il pH è stato monitorato durante tutta la prova e mantenuto costante a $6,0 \pm 0,1$ mediante aggiunta di acido e base sterili.

Aliquote del brodo colturale sono state campionate periodicamente e sottoposte ad analisi microscopica per accertare l'assenza di contaminanti e/o anomalie.

Alla fine della fase esponenziale di crescita (circa dopo 30 ore dall'inoculazione) il brodo di coltura è stato centrifugato. Una frazione del pellet cellulare è stato portato a secco e pesato al fine di esprimerne la resa di biomassa per litro di brodo.

Batterio

Anche per il ceppo ET-1 di *B. subtilis* le prove di crescita in scala laboratorio sono state condotte in tre repliche utilizzando un fermentatore modello BBI Biostat B, al cui vessel da 5 litri è stato collegato, tramite tubazioni, un sistema di raccolta della schiuma prodotta durante la crescita del batterio (Figura 7).

Lo “starter” è stato preparato a partire da colonie isolate di ET-1 prelevate da piastre di NA e stemperate in 150 ml di Nutrient Broth. Dopo 72 ore di crescita in coltura agitata a 25 °C il brodo di coltura è stato centrifugato ed il pellet di biomassa cellulare batterica recuperato è stato inoculato

nel vessel del bioreattore contenente 4 litri di High medium, precedentemente sterilizzato in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

La crescita del batterio è stata condotta a 25 e 35 °C garantendo una adeguata ossigenazione (3,0 l/min) del liquido colturale insufflando aria microfiltrata e mantenendo il pH stabile a $7\pm 0,3$. Il brodo di coltura è stato tenuto in costante agitazione mediante un agitatore meccanico a pale. La schiuma in eccesso è stata recuperata nel sistema di raccolta come descritto in precedenza. Da sottolineare che durante la crescita è stato evitato l'uso di sostanze anti schiuma per non perturbare l'ambiente di crescita del batterio.

Aliquote del brodo di coltura sono state periodicamente campionate e sottoposte ad analisi microscopica per accertare l'assenza di contaminanti e/o anomalie colturali.

Alla fine della fase esponenziale di crescita (circa dopo 72 ore dall'inoculazione) e dopo la formazione delle spore, il brodo di coltura è stato centrifugato ed una frazione del pellet cellulare è stata portata a secco e pesata al fine di esprimerne la resa di biomassa per litro di brodo. Un'aliquota del supernatante è stata saggiata per valutare l'effetto di inibizione sulla germinazione dei conidi di *P. digitatum* e per quantificare la concentrazione di iturina.

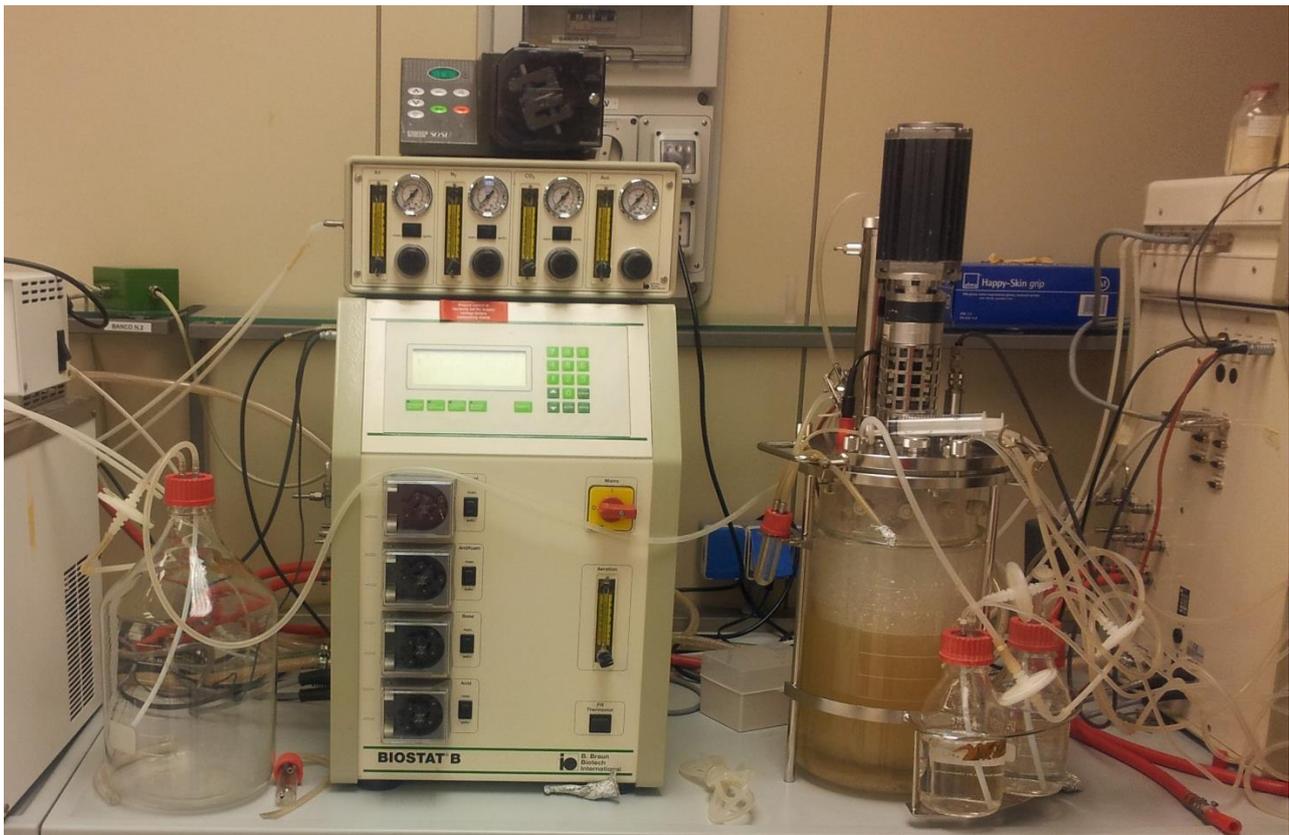


Figura 7: Fermentatore usato per le prove di crescita del batterio ET-1 su scala da laboratorio. Nel vessel del bioreattore si nota la presenza di abbondante produzione di schiuma raccolta attraverso tubazione nella bottiglia da 5 l presente sulla sinistra.

4.7. Scale up e downstream di processo

Gli stessi parametri di processo individuati durante le prove su scala laboratorio sono stati adottati per tutti e tre i microrganismi al fine di produrre biomassa cellulare e metaboliti secondari (nel caso dell'isolato ET-1) su larga scala. Nello specifico, per gli isolati CRT-2 e GR-2001 sono state effettuate due prove di crescita in un fermentatore modello BBI Biostat D-500 costituito da un vessel in acciaio di 500 litri (Figura 8). Le fermentazioni sono state condotte utilizzando il substrato 4 a pH $6,0 \pm 0,1$, alla temperatura di 25 ± 1 °C ed un'aerazione di 15 l/min.

Mentre per l'isolato ET-1 le prove di crescita sono state effettuate in un fermentatore modello BBI Biostat D-50 dotato di un vessel in acciaio di 75 litri. È stato utilizzato il substrato High Medium a pH $7,0 \pm 0,2$, alla temperatura di 25 ± 1 °C, un'aerazione di 5 l/min e con una agitazione di 70 RPM. La schiuma in eccesso prodotta è stata controllata mediante un dispositivo meccanico in testa al fermentatore azionato automaticamente da un sensore di schiuma.

Alla fine delle fermentazioni, la biomassa cellulare è stata separata dal sovrantante mediante un separatore centrifugo autopulente a piatti modello SE111BIOV della SEITAL. Nel caso dei lieviti è stata recuperata esclusivamente la biomassa cellulare, mentre per il batterio sono stati recuperati sia la biomassa che il sovrantante chiarificato contenente i metaboliti prodotti (Figura 9).



Figura 8: Impianto di Fermentazione utilizzato per lo scale up del processo.



Figura 9: Separatore centrifugo autopulente a piatti SEITAL

4.8. Liofilizzazione e Packaging

Il pellet ottenuto per centrifugazione del brodo colturale è stato sottoposto a due cicli di lavaggio con soluzione fisiologica ed infine risospeso in acqua sterile fino ad ottenere una massa fluida. Successivamente, questa massa fluida è stata trasferita in capsule Petri ed è stata processata in una unità di liofilizzazione in scala laboratorio Modello Christ Loc-1M (Figura 10) adottando le condizioni operative indicate in Tabella 3.



Figura 10: Liofilizzatore Modello Christ Loc-1M utilizzato per la liofilizzazione dei ceppi di batteri e lieviti.

Tabella 3: Protocollo adottato per la liofilizzazione dei microrganismi antagonisti

CICLO DI LIOFILIZZAZIONE PER LIEVITI		T(°C)	t (min)	Pressione (mtoor)	R/H
THERMAL TREATMENT	STEP 1	-10	0		H
	STEP 2	-20	0		H
	STEP 3	-30	180		H
Total time thermal treatment			180		
	Freeze Temperature	-30	X ₁		
FREEZE	Additional freeze		20		
	Condenser set point	-45	X ₂		
	Vacuum set point		X ₃	350	
Total time thermal treatment			20+X ₁ +X ₂ +X ₃		
	STEP 1	-30	300	350	H
	STEP 2	-20	420	300	H
	STEP 3	-10	600	300	H
DRYING	STEP 4	0	720	250	H
	STEP 5	10	600	250	H
	STEP 6	20	420	200	H
	STEP 7	30	300	200	H
Total time drying			3360		
POST HEAT		30	1000	150	H
TOTAL TIME			4360+20+X ₁ +X ₂ +X ₃		

Al termine del processo di liofilizzazione i ceppi dei lieviti e del batterio sono stati raccolti, pesati e confezionati sottovuoto in buste di alluminio sterili (Figura 11). La biomassa liofilizzata è stata utilizzata nelle prove di lotta biologica in vivo sulla frutta.



Figura 11: Buste di alluminio contenenti culture liofilizzate degli antagonisti microbici.

La vitalità delle cellule liofilizzate è stata valutata subito dopo la liofilizzazione e dopo 2 e 6 mesi di conservazione a due differenti temperature (+4 °C e +25 °C). A tale fine, 20 mg di liofilizzato degli isolati CTR-2, GR-2001 e ET-1 sono stati risospesi in 1 ml di acqua demineralizzata sterile e diluizioni decimali sono state piastrate su terreno agarizzato. Le piastre sono state incubate fino alla comparsa delle colonie ed il risultato è stato espresso come Unità Formanti Colonie per 100 mg di liofilizzato (CFU/100 mg).

4.9. Prove di lotta biologica in vivo

Per le prove *in vivo* si è ritenuto opportuno orientare le attività sperimentali prevalentemente verso i seguenti prodotti frutticoli: Fragola, Uva e Mandarino poiché essi rivestono una grande rilevanza commerciale per l'area del Metapontino, in quanto sono apprezzati nei mercati nazionali ed internazionali, e poiché sono spesso soggetti a fenomeni di rapida deperibilità durante le varie fasi del post raccolta.

Fragola

Le prove sono state condotte utilizzando fragole varietà "Candonga" raccolte in campi a conduzione biologica. I frutti sono stati sottoposti a lavaggio e disinfezione superficiale per immersione in una soluzione di ipoclorito di sodio al 0,1% per 1 minuto. Sono state allestite 6 tesi costituite da 15 frutti per 3 ripetizioni (Figura 12). *Tesi 1*: Frutti trattati con sospensione di spore dell'isolato ET-1 alla concentrazione 10^8 CFU/ml; *Tesi 2*: Frutti trattati con il supernatante tal quale dell'isolato ET-1. *Tesi 3*: Frutti trattati con sospensione di lievito ceppo CTR-2 (10^7 CFU/ml); *Tesi 4*: Frutti trattati con sospensione di lievito ceppo GR-2001 (10^7 CFU/ml); *Tesi 5*: Frutti trattati con Pyraclostrobin + Boscalid (SIGNUM[®] 1,8 g/l); *Tesi 6*: Frutti trattati con acqua sterile. I trattamenti per tutte le tesi sono stati effettuati per immersione prima dell'inoculazione del patogeno. Sui frutti di fragola di tutte le tesi è stata nebulizzata una sospensione conidica di *B. cinerea* (10^4 CFU/ml). I frutti sono stati adagiati in vaschette di plastica (30x40 cm) e mantenuti a temperatura di 20 °C fino alla comparsa dei sintomi. I rilievi hanno riguardato la presenza di infezione sul frutto.



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 12: Allestimento della prova di lotta biologica su fragola: Lavaggio e disinfezione superficiale (a); Trattamento per immersione dei frutti (b); Sistemazione frutti (c); Nebulizzazione della sospensione conidica di *B. cinerea*.

Uva

Per queste prove è stata utilizzata uva bianca raccolta da un vigneto coltivato con tecniche di agricoltura integrata della varietà “Italia”. Sono state allestite 6 tesi costituite da 15 acini per 5 ripetizioni (Figura 13). *Tesi 1*: Frutti trattati con sospensione di spore dell’isolato ET-1 alla concentrazione 10^8 CFU/ml; *Tesi 2*: Frutti trattati con il supernatante dell’isolato ET-1; *Tesi 3*: Frutti trattati con sospensione di lievito ceppo CTR-2 (10^7 CFU/ml); *Tesi 4*: Frutti trattati con sospensione di lievito ceppo GR-2001 (10^7 CFU/ml); *Tesi 5*: Frutti trattati con Kresoxim-metile + Boscalid (Collis[®] 0,4 g/1 l); *Tesi 6*: Frutti trattati con acqua sterile.

Gli acini di uva sono stati staccati dal grappolo con delle forbici per evitare di creare ferite nel punto di innesto del peduncolo; in seguito gli acini sono stati immersi in una soluzione di ipoclorito di sodio al 0,1% di cloro attivo per 1 minuto. Con un bisturi sterile è stata praticata una ferita superficiale di 3 mm circa di lunghezza. I trattamenti per tutte le tesi sono stati effettuati per

immersione prima dell'inoculazione del patogeno. Venti microlitri di una sospensione conidica di *B. cinerea* alla concentrazione di $3,8 \cdot 10^4$ CFU/ml sono stati distribuiti sulla ferita. I frutti sono stati adagiati in alveoli e posti ad incubare a 20°C con umidità relativa superiore all'85%. I rilievi sono stati effettuati alla comparsa dei primi sintomi della malattia ed hanno riguardato la presenza di infezione nel punto di ferita.



Lavaggio e disinfezione superficiale



Incisione acino con bisturi



Trattamento per immersione



Inoculazione

Figura 13: Allestimento della prova di lotta biologica su uva bianca della varietà "Italia"

Mandarino

Le prove sono state condotte utilizzando frutti di mandarino varietà tardivo di Ciaculli. Sono state allestite 4 Tesi costituite da 10 frutti con 4 ripetizioni (Figura 14). *Tesi 1*: Frutti trattati con il supernatante costituito dal liquido di coltura dell'isolato ET-1; *Tesi 2*: Frutti trattati con una sospensione di lievito *P. guilliermondii* (CTR-2) alla concentrazione di $1,6 \cdot 10^7$ CFU/ml; *Tesi 3*:

Frutti trattati con una soluzione di Imazalil (2 ml/l) utilizzato come riferimento chimico; *Tesi 4*: Frutti trattati con acqua. Tutti i frutti sono stati sottoposti a lavaggio e disinfezione superficiale per immersione in una soluzione di ipoclorito di sodio al 0,1% di cloro attivo per 1 minuto. Con un bisturi sterile sono state praticate due ferite superficiali di 0,5 cm di lunghezza su due lati del frutto in prossimità del peduncolo.

I trattamenti per tutte le tesi sono stati effettuati per immersione prima dell'inoculazione del patogeno. Tutti i frutti sono stati inoculati distribuendo su ogni ferita 20 µl di una sospensione conidica di *P. digitatum* alla concentrazione di $2,3 \cdot 10^4$ CFU/ml.

I frutti di ogni tesi sono stati sistemati in contenitori di plastica separati e mantenuti a temperatura di 20 ± 2 °C. I rilievi sono stati effettuati alla comparsa dei primi sintomi della malattia ed hanno riguardato la presenza di infezione sul frutto.



Figura 14: Allestimento della prova di lotta biologica su mandarino.

4.10 Prove simulative di lotta biologica presso azienda ortofrutticola

Presso le strutture dell'O.P. ARCA FRUIT di Bisceglie (BT), partner del Progetto, sono state condotte, per due anni successivi, prove simulative di lotta biologica impiegando i liofilizzati del lievito CTR-2 e del batterio ET-1 su uva e fragola artificialmente inoculate, al fine di validare i protocolli di difesa messa a punto in laboratorio (Figura 15). I frutti di fragole e di uva sono stati conservati a 4°C nelle celle frigorifere della struttura, rispettivamente, per 20 e 45 giorni.



Figura 15: Prove simulate di lotta biologica su fragola e uva condotte presso l' O.P. Arca Fruit di Bisceglie.

Analisi statistiche

I risultati delle prove sono stati sottoposti ad elaborazione statistica mediante analisi della varianza (Anova, Duncan) con l'ausilio del software "SAS System for Microsoft Windows 9.4; SAS Institute, Cary,NC, USA". I valori medi sono considerati significativamente differenti per $P \leq 0,05$.

5. RISULTATI

5.1. Saggi di antagonismo *in vitro* dell'isolato ET-1 di *B. subtilis*

Dai saggi *in vitro* è risultata una significativa riduzione dello sviluppo della colonia fungina. L'inibizione è avvenuta senza il contatto diretto dei due microrganismi in quanto il batterio ET-1 ha prodotto e rilasciato nel substrato agarizzato delle sostanze ad azione antifungina. In particolare è stato calcolato un ICM del 62% e del 68% rispettivamente nelle prove condotte con *B. cinerea* e *P. digitatum* (Fig. 16a, 16b). Da osservazioni microscopiche del margine di accrescimento della colonia di entrambi i funghi è emersa un'anomala presenza di ife corte, tozze, variamente ramificate e molto fitte.

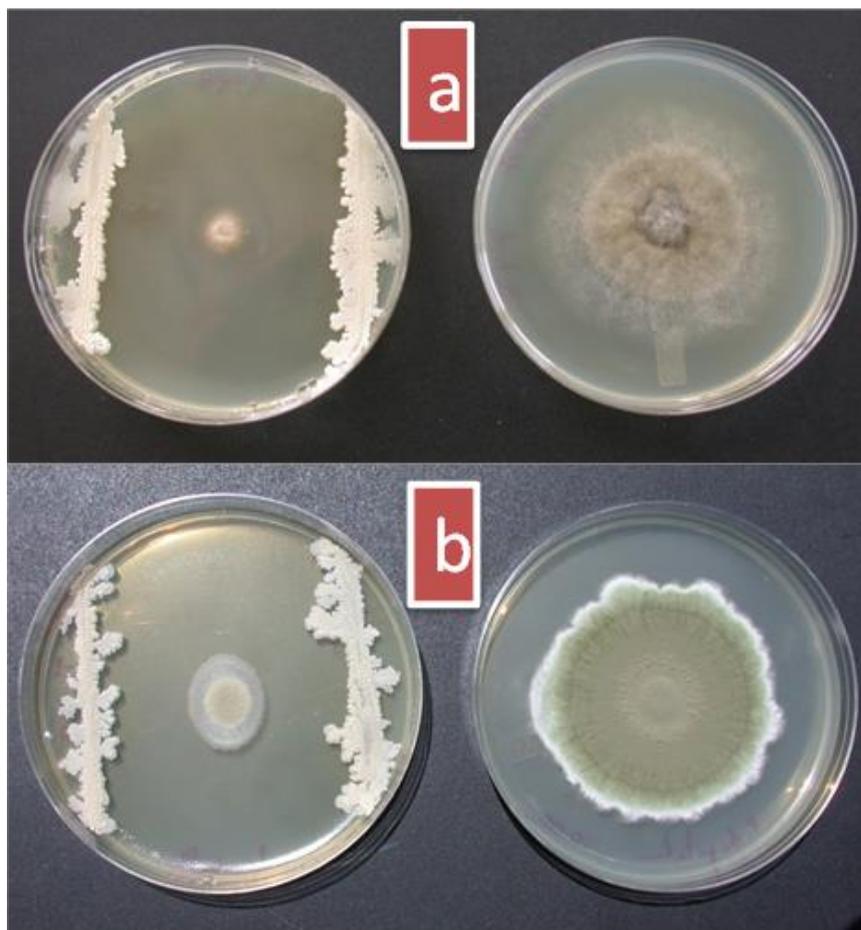


Figura 16: Effetto di inibizione dell'isolato ET-1 di *B. subtilis* sulla crescita miceliare di *B. cinerea* (a) e di *P. digitatum* (b)

5.2. Messa a punto del processo di crescita in beuta

Lieviti

La composizione del liquido di coltura ha influenzato lo sviluppo dei due lieviti saggiati. Per il ceppo CTR-2 tutti i terreni di coltura, ad eccezione del substrato 3, hanno dato risultati soddisfacenti in termini di biomassa cellulare anche se con differenti cinetiche di crescita (Figura 17). Infatti, nel substrato 1 il ceppo CTR-2 ha raggiunto la fase stazionaria dopo 22 ore dall'inoculazione circa 6 - 8 ore prima rispetto ai terreni 2, 4 e 5. Da un punto di vista economico i terreni 4 e 5 sono da ritenersi più validi rispetto ai terreni 1 e 2 considerati i costi dei singoli componenti. Il substrato 3 è sicuramente da scartare in quanto presenta un'anomala curva di crescita caratterizzata dall'assenza della fase esponenziale, nonostante sia costituito da componenti simile al substrato 2 ad eccezione dell'estratto di lievito.

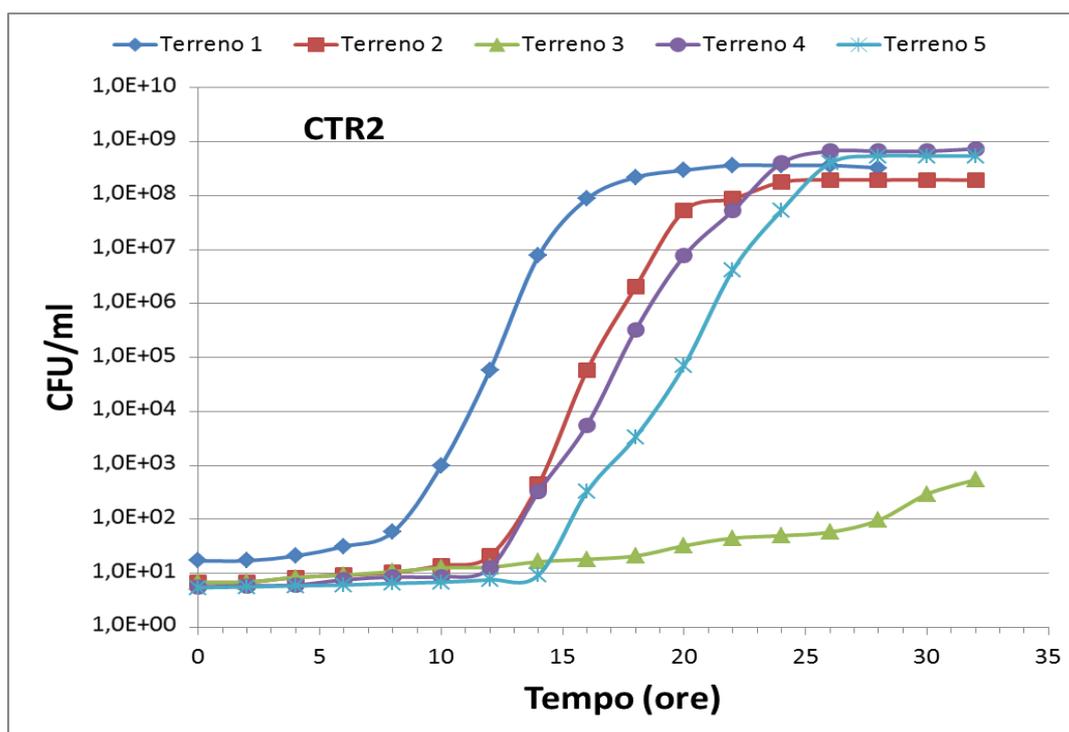


Figura 17: Curve di crescita del ceppo CTR-2 allevato in coltura liquida agitata su substrati di diversa composizione.

L'efficacia dei terreni 1, 2, 4 e 5 sono confermati anche dai risultati dei saggi effettuati sul ceppo GR-2001 e riportati in Figura 18. Anche in questo caso è evidente che il microrganismo raggiunge il massimo numero di cellule vitali solo dopo 23 ore dall'inoculazione quando cresce nel terreno 1 mentre, quando cresce nei terreni 4 e 5, la stessa concentrazione di cellule viene raggiunta dopo 28 e 32 ore d'incubazione rispettivamente. Risulta confermata la scarsa efficacia del substrato 3.

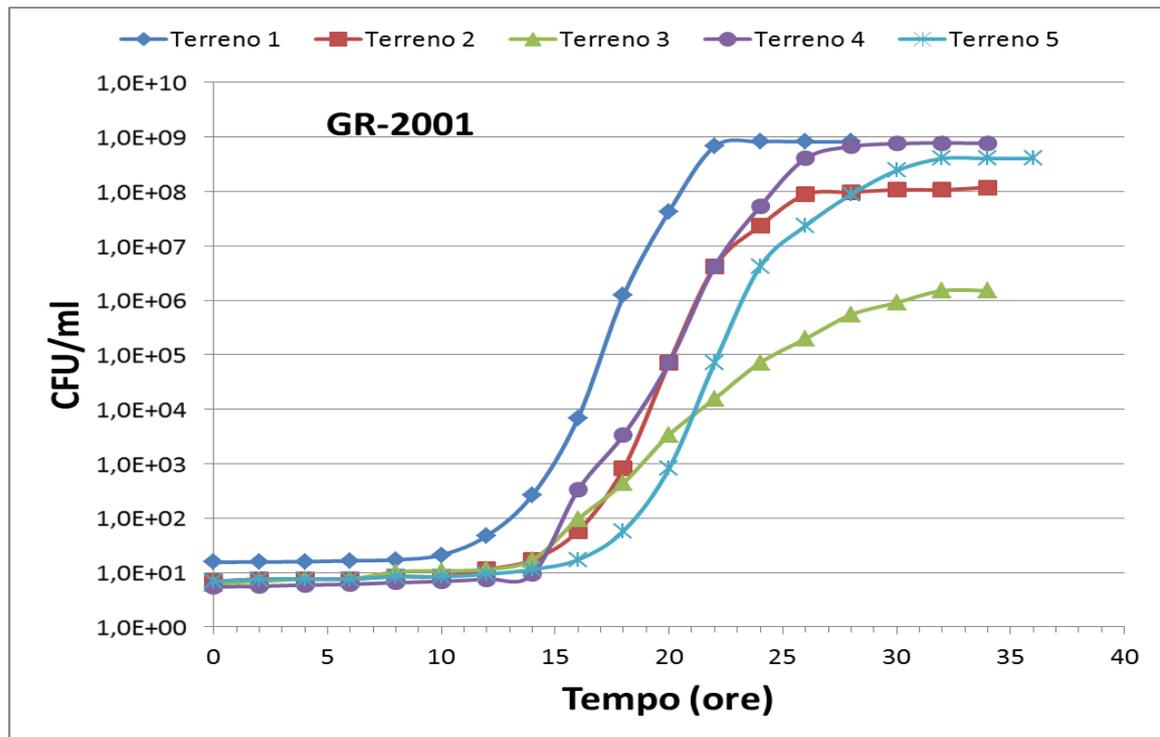


Figura 18: Curve di crescita del ceppo GR-2001 allevato in coltura liquida agitata su substrati di diversa composizione.

Batterio

Sono stati saggiati 17 substrati costituiti da differenti componenti che di volta in volta si alternavano tra loro. In Tabella 4 sono riportati i valori dei CFU/ml registrati dopo 70 ore di incubazione e le diluizioni seriali dei rispettivi supernatanti per le quali è stato osservato un effetto di inibizione della germinabilità dei conidi di *P. digitatum* maggiore o uguale al 95% (Figura 19).

Tabella 4: Effetto dei substrati sulla carica cellulare e sulla inibizione della germinazione conidica

Numero progressivo substrato	Numero di CFU/ml rilevato nella fase stazionaria di crescita	Diluizione seriale con un effetto di inibizione sulla germinazione dei conidi superiore al 95 %
1	$5,7 \cdot 10^8$	1:32
2	$5,2 \cdot 10^7$	1:4
3	$1,9 \cdot 10^8$	1:32
4	$1,2 \cdot 10^7$	1:1
5	$5,0 \cdot 10^7$	1:1
6	$6,6 \cdot 10^8$	1:1
7	$2,3 \cdot 10^7$	1:1
8	$1,9 \cdot 10^7$	1:1
9	$1,9 \cdot 10^7$	1:1
10	$5,0 \cdot 10^8$	1:1
11	$3,3 \cdot 10^8$	1:2
12	$2,8 \cdot 10^7$	1:1
13	$6,5 \cdot 10^8$	1:16
14	$0,9 \cdot 10^9$	1:128
15	$3,6 \cdot 10^8$	1:32
16	$5,0 \cdot 10^8$	1:32
17	$6,9 \cdot 10^7$	1:4

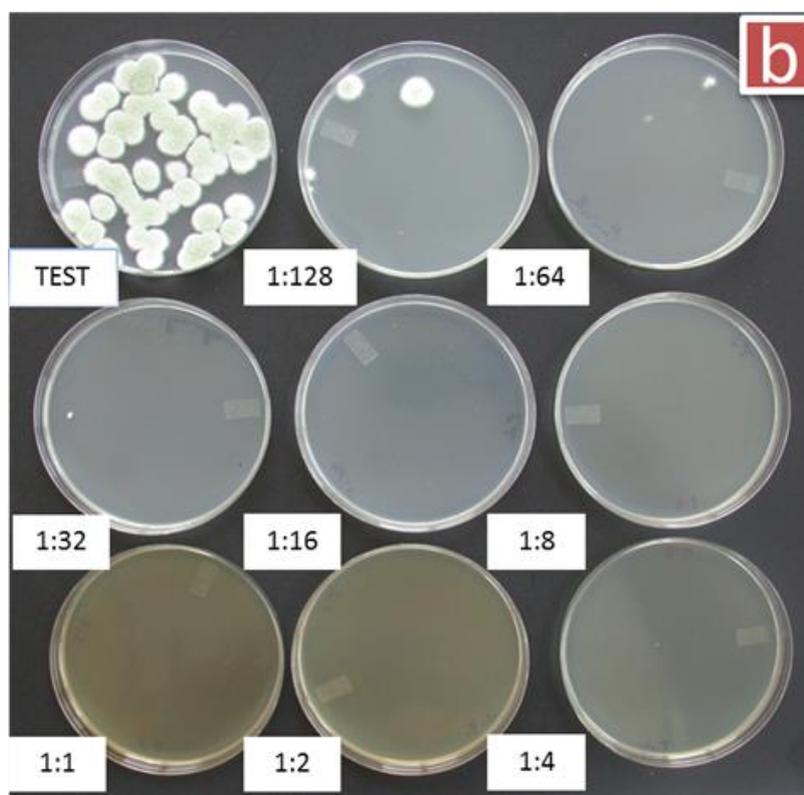


Figura 19: Valutazione dell'effetto di inibizione sulla germinazione dei conidi di *P. digitatum* rilevate nelle diluizioni seriali del supernatante ottenuto allevando l'isolato ET-1 nel substrato 14.

Dall'analisi dei dati riportati in tabella 4 è possibile evidenziare che in tutti i substrati in cui era assente il cloruro di manganese la produzione dei metaboliti secondari con attività antifungina è stata molto bassa in quanto l'effetto di inibizione sulla germinabilità del 95% dei conidi è stato osservato solo alle diluizioni seriali 1:1. Ottimi risultati sono stati ottenuti sostituendo il Potato Dextrose broth con l'estratto di patate ottenuto dalla cottura delle patate decorticate ed il glucosio. Infatti, il supernatante derivante dal substrato numero 1 era in grado di inibire le germinabilità del 95% dei conidi di *P. digitatum* alla diluizione seriale 1:32 mentre nel substrato numero 14, introducendo l'estratto di patate, il 95% di inibizione è stato osservato alla diluizione 1:128. Altro dato rilevante è l'influenza negativa di alte concentrazioni di proteine nel substrato, derivanti dal latte e da estratti di carne, sulla produzione di metaboliti secondari ad attività antifungina. Infatti, nei terreni numero 4, 11 e 12 l'inibizione del 95% è stata osservata rispettivamente alle diluizioni 1:1, 1:2 e 1:1.

Anche la concentrazione delle cellule e delle spore batteriche rilevata nella fase stazionaria è stata influenzata dalla composizione dei substrati. Infatti, si passa da $1,9 \cdot 10^7$ CFU/ml ottenuta con i substrati numero 8 e 9 ad una concentrazione di $0,9 \cdot 10^9$ CFU/ml nel substrato numero 14.

5.3. Analisi quantitativa e qualitativa dei metaboliti secondari mediante HPLC

Il protocollo analitico applicato ai due campioni presi in esame (14 e 6) ha permesso l'identificazione di iturina e la sua quantificazione. Infatti, analizzando i tempi di ritenzione dello standard dell'iturina (sia interno che esterno) è stato osservato un picco principale a 52 minuti e lo stesso picco ben isolato, ma con aree differenti, è stato osservato nel supernatante di entrambi i substrati (Figura 20). Dal confronto delle aree dei picchi è stata determinata una concentrazione di iturina di 195,5 mg/l e 1,6 mg/l rispettivamente nei substrati 14 e 6.

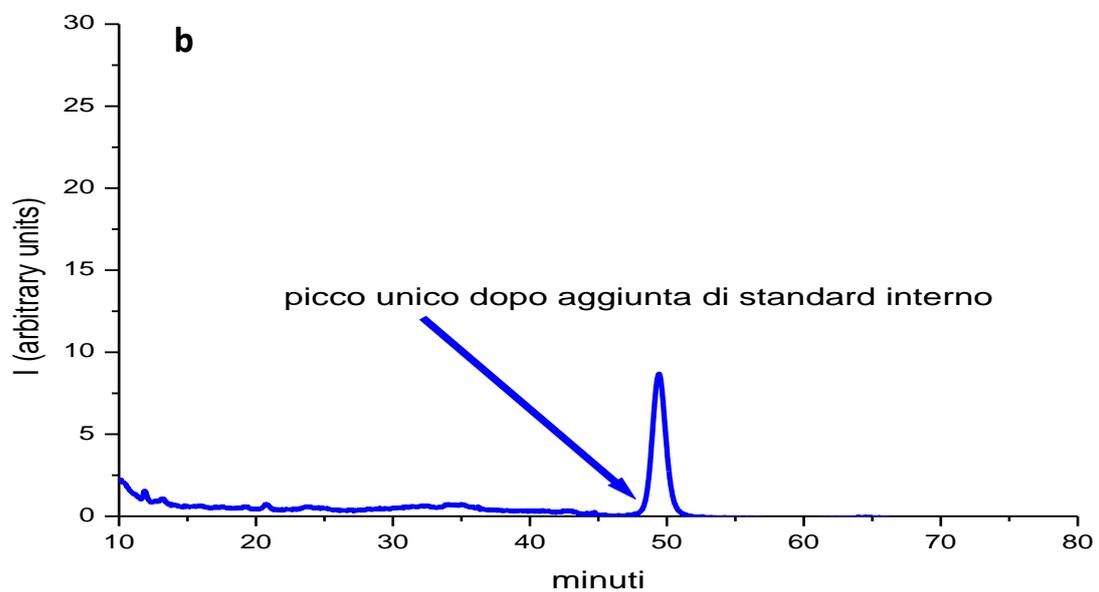
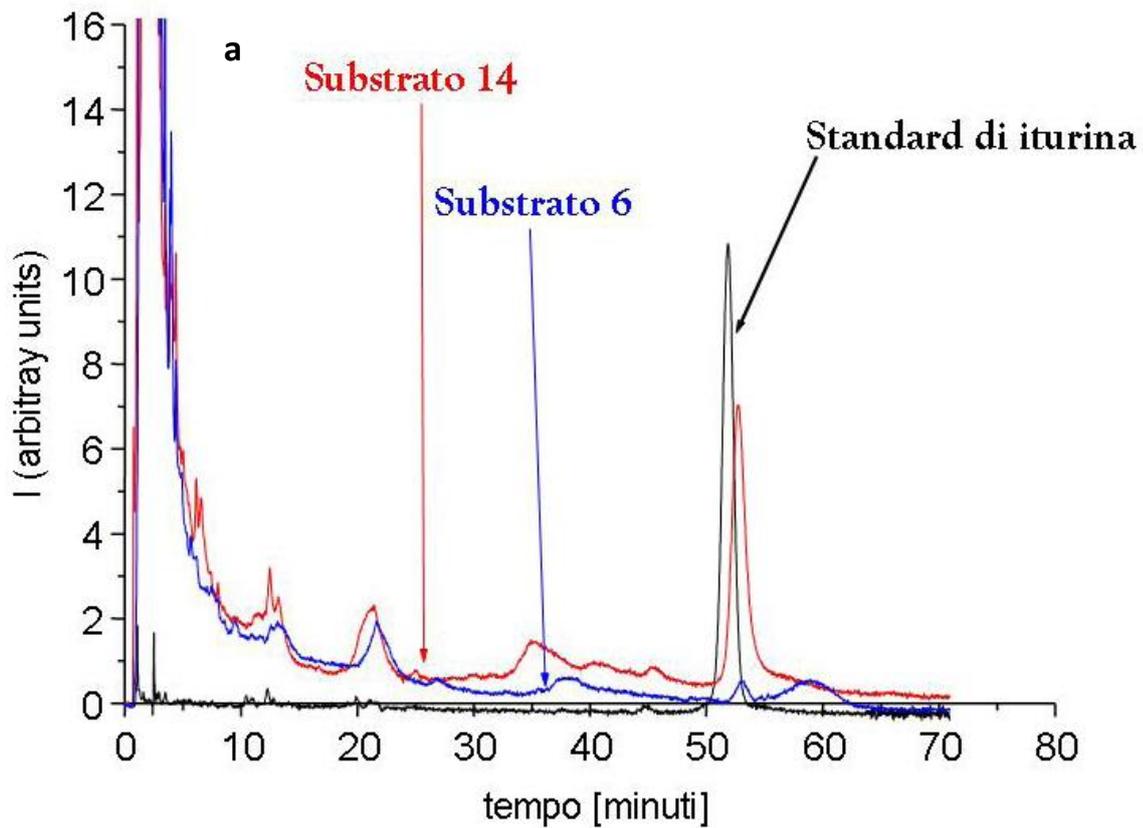


Figura 20: Cromatogramma dello standard di iturina (Sigma), del substrato 14 e del substrato 6 (a); Cromatogramma dello standard interno (b)

5.4. Monitoraggio della crescita cellulare dell'isolato ET-1 e della produzione di Iturina

Le cellule totali dell'isolato ET-1 costituite da spore e cellule vegetative raggiungono il numero massimo dopo circa 32 ore dall'inoculazione, mentre il numero delle spore inizia ad aumentare dopo 15 ore dall'inoculazione e continua a crescere per circa 30 ore fino a raggiungere una concentrazione di $0,86 \cdot 10^9$ spore/ml. Il monitoraggio nel tempo dell'iturina ha permesso di accertare che la produzione inizia verso la fine della fase esponenziale ed avvio sporulazione (dopo 27 ore $1,52 \mu\text{g/ml}$). Il valore di iturina cresce velocemente nell'intervallo tra la 44esima e 55esima ora corrispondente alla fase esponenziale di sporulazione. Dopo 62 ore di incubazione la quantità di iturina rilevata è stata di $195,5 \mu\text{g/ml}$ (Figura 21).

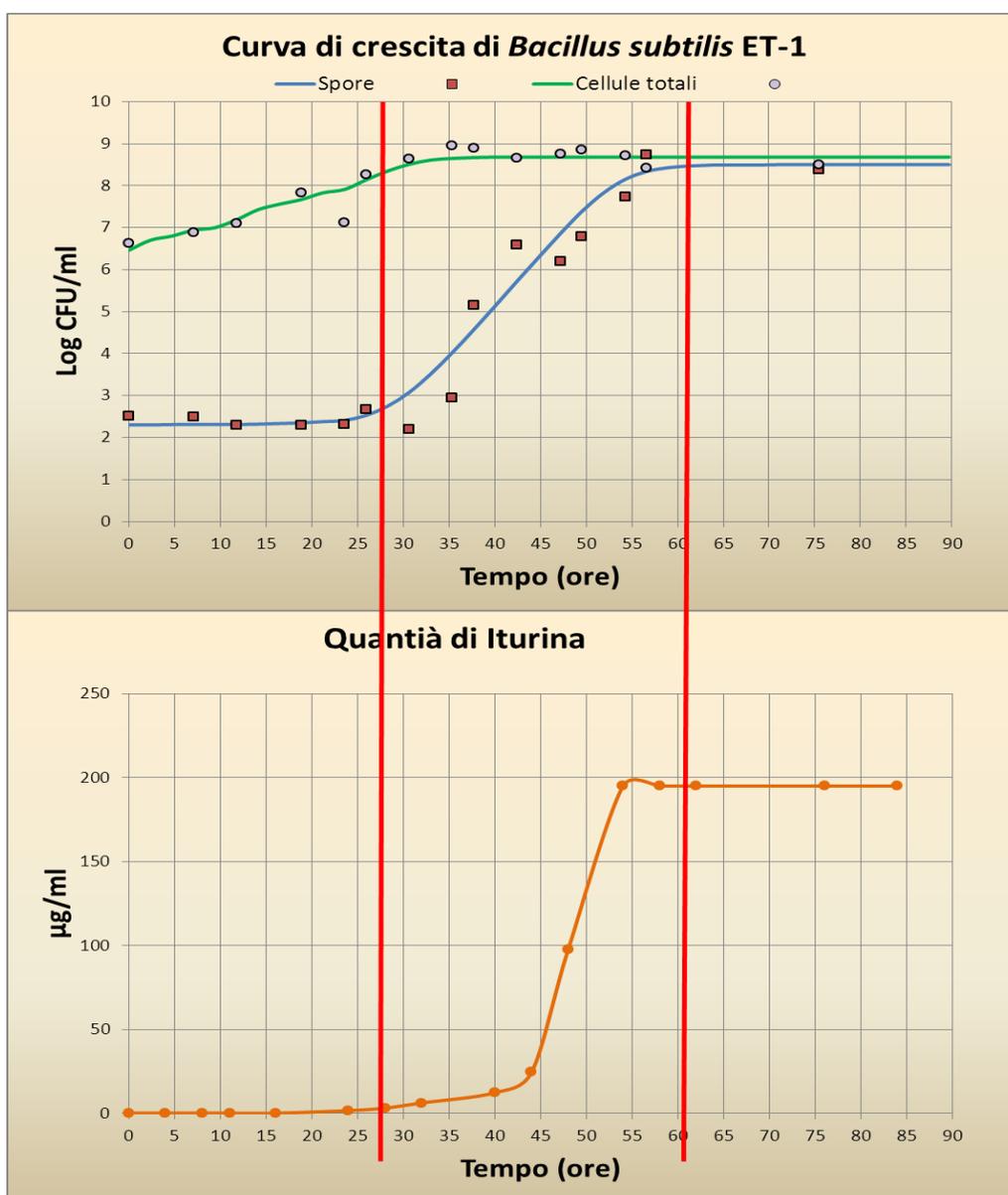


Figura 21: Confronto tra le curve di crescita e la quantità di Iturina prodotta dal ceppo ET-1

5.5. Messa a punto del processo di crescita su scala di laboratorio

Lieviti

Le rese medie unitarie in biomassa secca dei due ceppi CTR-2 e GR-2001, ottenute in un sistema fermentativo da laboratorio sono risultate non significativamente differenti a seconda che si impieghi il substrato 4 o il substrato 5 costituito da scotta del latte (Tabella 5). Per l'isolato CTR-2 la resa media ottenuta dalla crescita in fermentatore da 5 litri è risultata di 3,45 g/l con il substrato 4 e di 3,15 g/l con il substrato 5, valori non statisticamente differenti. Per l'isolato GR-2001 la resa in biomassa secca è risultata di 2,98 g/l e 2,80 g/l rispettivamente nei substrati 4 e 5. Dalla Tabella 6 è possibile osservare che l'isolato CTR-2 risulta più produttivo in termini di biomassa secca di quanto non lo sia l'isolato GR-2001 in entrambi di substrati saggiati.

Tabella 5: Rese unitarie medie della biomassa secca dei due ceppi di lievito prodotta in fermentatore con due terreni nutritivi

Isolato	CTR-2	GR-2001
Substrato 4	3,45 g/l a*	2,98 g/l a
Substrato 5	3,15 g/l a	2,80 g/l a

*Nelle colonne i valori contrassegnati con le stesse lettere non differiscono statisticamente per $P \geq 0,05$ (test di Duncan)

Batterio

Sono state rilevate le rese medie di biomassa secca e la concentrazione di iturina dell'isolato ET-1 allevato in fermentatore da 5 litri a due differenti temperature. La biomassa secca ottenuta a 25 °C è risultata di 1,65 g/l non statisticamente differente dal peso della biomassa (1,55 g/l) ottenuta alla temperatura di 35 °C. La temperatura di crescita ha, invece, fortemente influenzato la produzione di iturina e la relativa attività inibente su *P. digitatum* dei supernatanti. Infatti, la concentrazione di iturina nel supernatante prodotta dopo 70 ore di incubazione dall'isolato ET-1 a 25 °C e 35 °C è stata rispettivamente di 195,5 µg/ml e 35,5 µg/ml, valori statisticamente differenti. Nei biosaggi, l'effetto di inibizione del 95% della germinazione dei conidi è stato ottenuto nelle diluizioni 1:128 e 1:16 alla temperatura di 25 e 35 °C rispettivamente (Tabella 6).

Tabella 6: Determinazione delle rese di iturina e biomassa secca dell'isolato ET-1 ottenute nel fermentatore a due differenti temperature

Temperatura	Biomassa secca	Iturina ($\mu\text{g/ml}$)	Diluizione seriale con un effetto di inibizione sulla germinazione dei conidi superiore al 95 %
25 °C	1,65 g/l a*	195,5 a	1:128
35 °C	1,55 g/l a*	35,5 b	1.:16

*Nelle colonne i valori contrassegnati con le stesse lettere non differiscono statisticamente per $P \geq 0,05$ (test di Duncan)

5.6. Scale up e downstream di processo

Il processo di fermentazione per i lieviti e per l'isolato ET-1 di *B. subtilis* su scala pre-industriale ha permesso di ottenere rese, in termini di biomassa e iturina, simili a quanto ottenute nei bioreattori da banco. Infatti, per i lieviti la biomassa secca ottenuta processando 300 litri di brodo colturale è stata di circa 1 Kg. Per l'isolato ET-1 sono stati processati 50 litri di brodo colturale recuperando, a valle del separatore centrifugo, sia la biomassa cellulare sia il chiarificato nel quale è stata rilevata una concentrazione di Iturina di 190,6 mg/l (Figura 22).



Figura 22: Campioni prelevati durante processo di centrifugazione dell'isolato ET-1 (sinistra); Schema sinottico di processo della separazione (destra).

5.7. Liofilizzazione

Il processo di liofilizzazione non ha determinato effetti negativi sulla vitalità media dei lieviti e del batterio. Infatti, per l'isolato CTR-2 il numero di unità formanti colonie per 100 mg di biomassa prima e dopo il processo di liofilizzazione è risultato rispettivamente di $2,93 \cdot 10^{10}$ e $0,88 \cdot 10^{10}$. La vitalità media dell'isolato GR-2001 rilevata prima del processo di liofilizzazione è risultata di $8,33 \cdot 10^8$ CFU/100 mg mentre successivamente è risultata di $2,83 \cdot 10^8$ CFU/100 mg. Per l'isolato ET-1 di *B. subtilis* la vitalità media, prima e dopo la liofilizzazione, è risultata rispettivamente di $6,80 \cdot 10^9$ CFU/100 mg e di $3,11 \cdot 10^9$ CFU/100 mg (Figura 23).

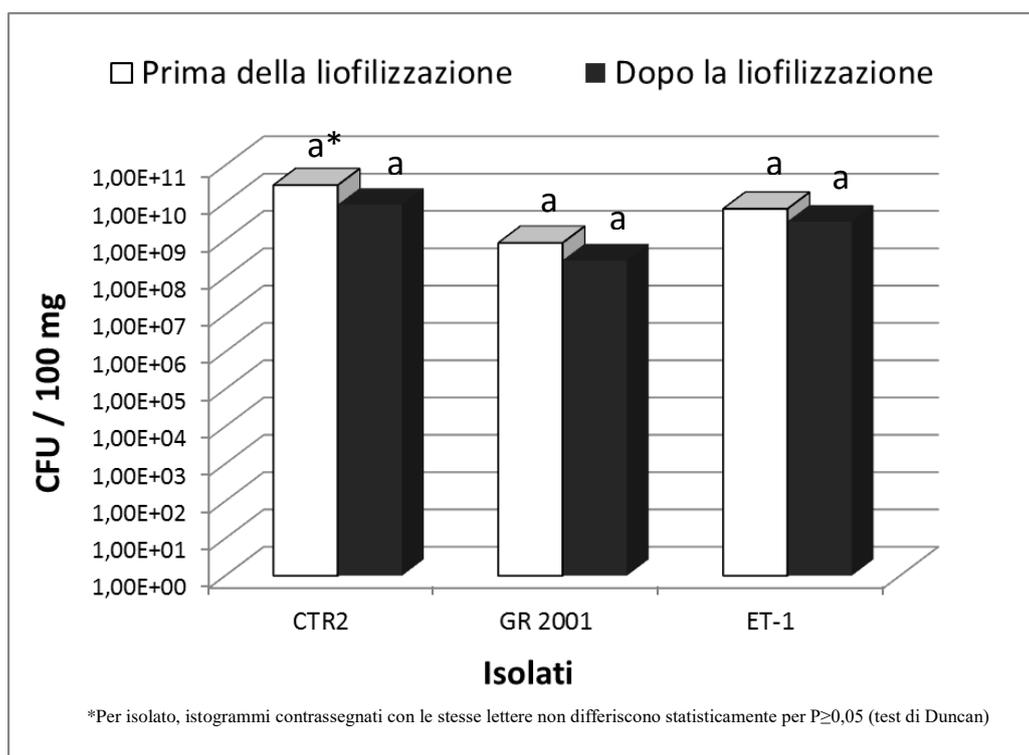


Figura 23- Vitalità media rilevata nei 3 isolati prima e dopo il processo di liofilizzazione

Le analisi sulla vitalità media dei 3 liofilizzati conservati alle due diverse temperature (25 °C e 4 °C) effettuate dopo 2 e 6 mesi hanno dato risultati differenti. Alla temperatura di conservazione di 25 °C la vitalità dei liofilizzati dei due isolati di lieviti, in entrambi i periodi di osservazione, è risultata fortemente compromessa. Infatti, è stata registrata una progressiva riduzione della vitalità media rispetto al tempo zero di 2 unità logaritmiche dopo 2 mesi e di 6 unità logaritmiche dopo 6 mesi. Mentre per il batterio, alla stessa temperatura, è stato osservato una riduzione statisticamente significativa solo dopo 6 mesi di conservazione (Figura 24).

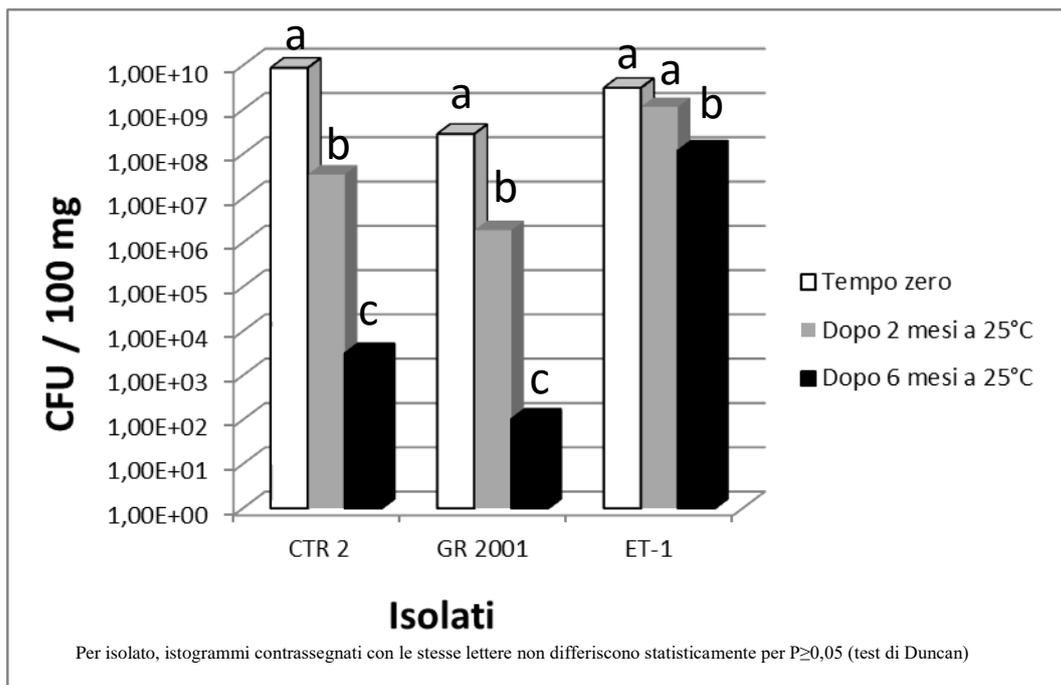


Figura 24- Vitalità media rilevata nei 3 isolati dopo 2 e 6 mesi di conservazione a 25 °C

Dopo due mesi alla temperatura di conservazione di 4°C la vitalità media, dei liofilizzati di entrambi i lieviti, non ha subito variazioni statisticamente significative rispetto a quella rilevata immediatamente dopo il processo di liofilizzazione. Viceversa, dopo 6 mesi la vitalità media si è ridotta ed è risultata di $3,2 \cdot 10^6$ CFU/100mg e di $4,6 \cdot 10^3$ CFU/100mg rispettivamente per i liofilizzati degli isolati CTR-2 e GR-2001. Le analisi sul liofilizzato dell'isolato ET-1 hanno evidenziato che la temperatura di 4 C° ha permesso di preservare la vitalità del liofilizzato per tutto il periodo di osservazione (Figura 25).

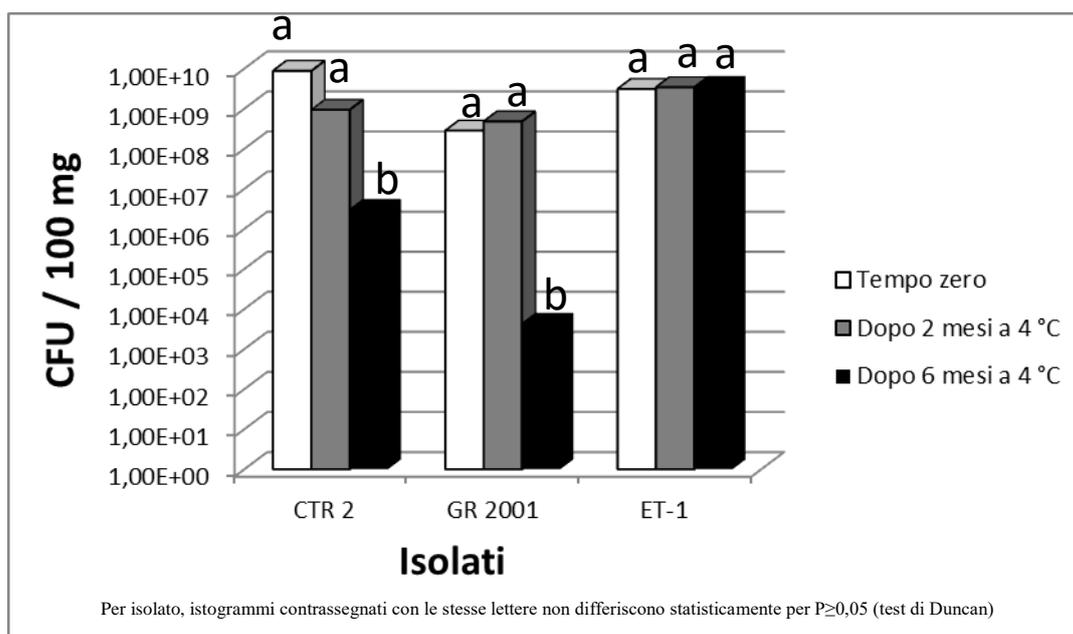


Figura 25- Vitalità media rilevata nei 3 isolati dopo 2 e 6 mesi di conservazione a 4 °C

5.8. Prove di lotta biologica in vivo

Fragola

I dati riportati in Figura 26 sono stati ottenuti nella prova di lotta contro *B. cinerea* effettuata con l'applicazione dei microrganismi antagonisti sui frutti di fragola. Dopo 7 giorni dall'inoculazione, i frutti della tesi protetta con antibiotico chimico non presentavano sintomi di malattia, mentre la percentuale di frutti con botrite rilevata nella tesi trattata con acqua è stata del 100% con abbondante produzione di rami conidiofori e conidi. La percentuale di frutti infetti delle tesi protette con il supernatante è stata del 34%, valore statisticamente differente da quello rilevato nel testimone inoculato. L'applicazione dei lieviti CTR-2 e GR-2001 ha statisticamente contenuto le infezioni di *B. cinerea* rispetto al testimone inoculato e la percentuale di frutti colpiti dalla malattia è risultata del 56% e del 63% rispettivamente. La percentuale dei frutti di fragola trattati con la sospensione di spore di ET-1 sono risultate inferiori numericamente ma statisticamente non significative rispetto al controllo inoculato (Figura 27).

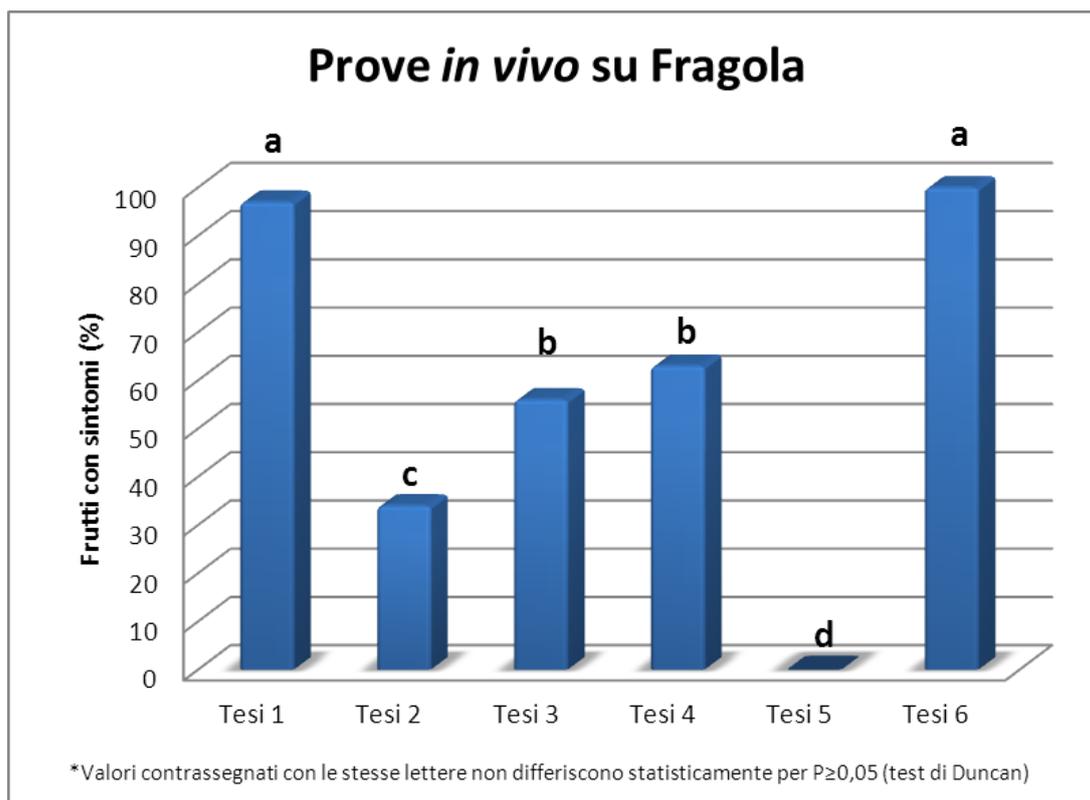


Figura 26: Prove di lotta *in vivo* su fragola. Tesi 1: Frutti trattati con sospensione di spore dell'isolato ET-1. Tesi 2: Frutti trattati con il supernatante. Tesi 3: Frutti trattati con sospensione di lievito ceppo CTR-2; Tesi 4: Frutti trattati con sospensione di lievito ceppo GR-2001; Tesi 5: Frutti trattati con Signum; Tesi 6: Frutti trattati con acqua sterile.



Figura 27: Esito delle infezioni artificiali su frutti di fragola inoculate con *B. cinerea*. Frutti trattati: con acqua (a), con il supernatante dell'isolato ET-1 (b), con l'isolato CTR-2 (c) e con Signum (d).

Uva

L'analisi dei risultati ottenuti durante la prova di lotta condotta sull'uva contro *B. cinerea* utilizzando i diversi preparati biologici ha messo in evidenza significativi effetti di protezione. La percentuale di frutti con sintomi rilevata, dopo 9 giorni di incubazione a 20 °C, è stata del 40% nella tesi trattata con l'isolato CTR-2 e del 68% in quella protetta con l'isolato GR-2001. Quando è stato utilizzato il supernatante, la percentuale di frutti colpiti è risultata (15%) statisticamente differente da quella rilevata sul testimone (100%) e le ferite con sintomi non presentavano la tipica efflorescenza grigiastra costituita dal micelio e dalle strutture riproduttive del fungo. Il trattamento con le spore dell'isolato ET-1 non ha consentito di ottenere alcun effetto di protezione infatti, la percentuale di frutti con sintomi è stata pari al 93%, valore statisticamente non differente da quello rilevato sul testimone trattato solo con acqua. I frutti trattati con antibiotico non hanno presentato sintomi di malattia per tutto il periodo di osservazione (Tabella 8 e Figura 28).

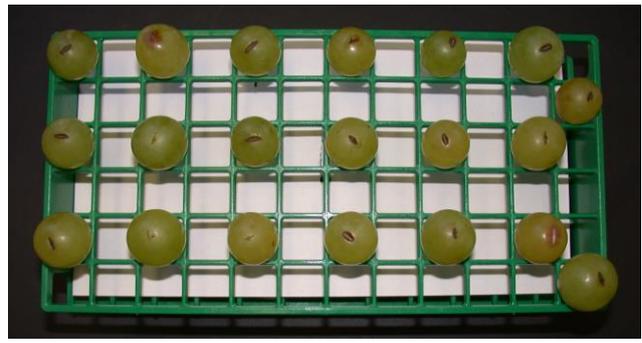
Tabella 8: Efficacia degli antagonisti microbici contro *B. cinerea* su acini di uva.

Tesi	Percentuale di frutti con sintomi	
1 - Spore dell'isolato ET-1	93%	a*
2 - Supernatante dell'isolato ET-1	15%	c
3 - <i>Pichia guilliermondi</i> CTR-2	40%	b
4 - <i>Pichia anomala</i> GR-2001	68%	ab
5 - Testimone protetto con prodotto chimico	0%	d
6 - Test protetto con acqua	100%	a

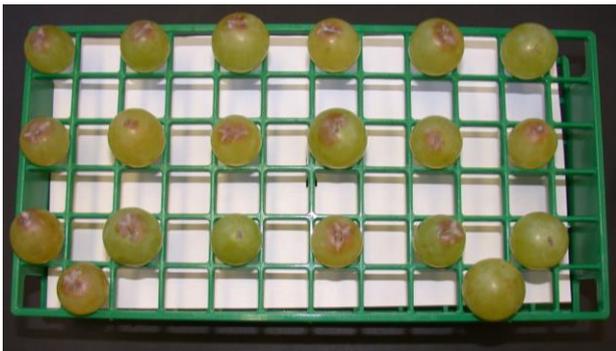
*Nelle colonne i valori contrassegnati con le stesse lettere non differiscono statisticamente per $P \geq 0,05$ (test di Duncan)



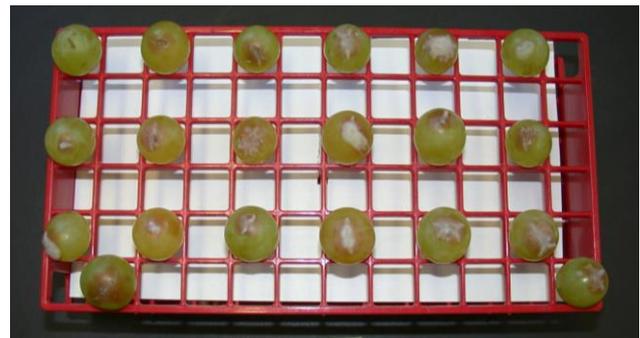
1 - Spore dell'isolato ET-1



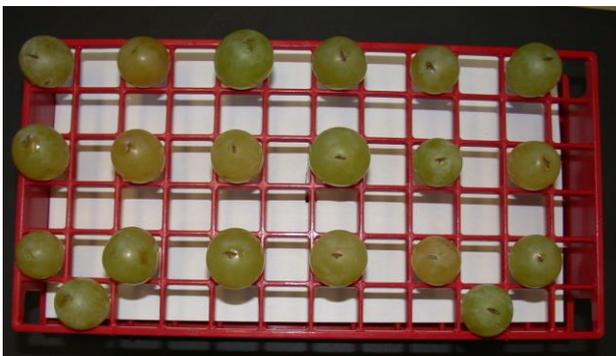
2 - Supernatante dell'isolato ET-1



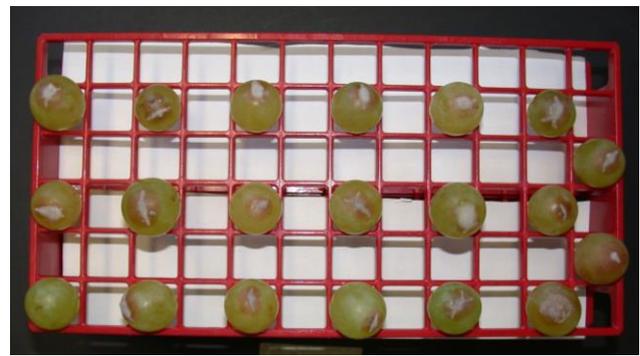
3 - *Pichia guilliermondii* CTR-2



4 - *Pichia anomala* GR-2001



5 - Testimone protetto con prodotto chimico



6 - Test protetto con acqua

Figura 28: Esito delle infezioni artificiali di *B. cinerea* su uva

Mandarino

In Tabella 9 sono riportati i risultati della prova condotta su frutti di mandarino varietà “Tardivo di Ciaculli”. La percentuale di ferite con sintomi rilevata sui frutti protetti con il lievito antagonista CTR-2 e con il supernatante dell'isolato ET-1 è risultata rispettivamente del 15% e 20%, mentre sui frutti protetti solo con acqua la percentuale è stata del 95%.

Il trattamento con il prodotto chimico ha consentito di controllare completamente la malattia (Figura 29).

Tabella 9 : Effetto di protezione dei trattamenti con antagonisti microbici contro *P. digitatum* su frutti di mandarino

Tesi	Percentuale di ferite con sintomi
1 - Supernatante dell'isolato ET-1	20% b*
2 - <i>Pichia guilliermondi</i> CTR-2	15% b
3 - Testimone protetto con prodotto chimico	0% c
4 - Test protetto con acqua	95% a

*Nelle colonne i valori contrassegnati con le stesse lettere non differiscono statisticamente per $P \geq 0,05$ (test di Duncan)

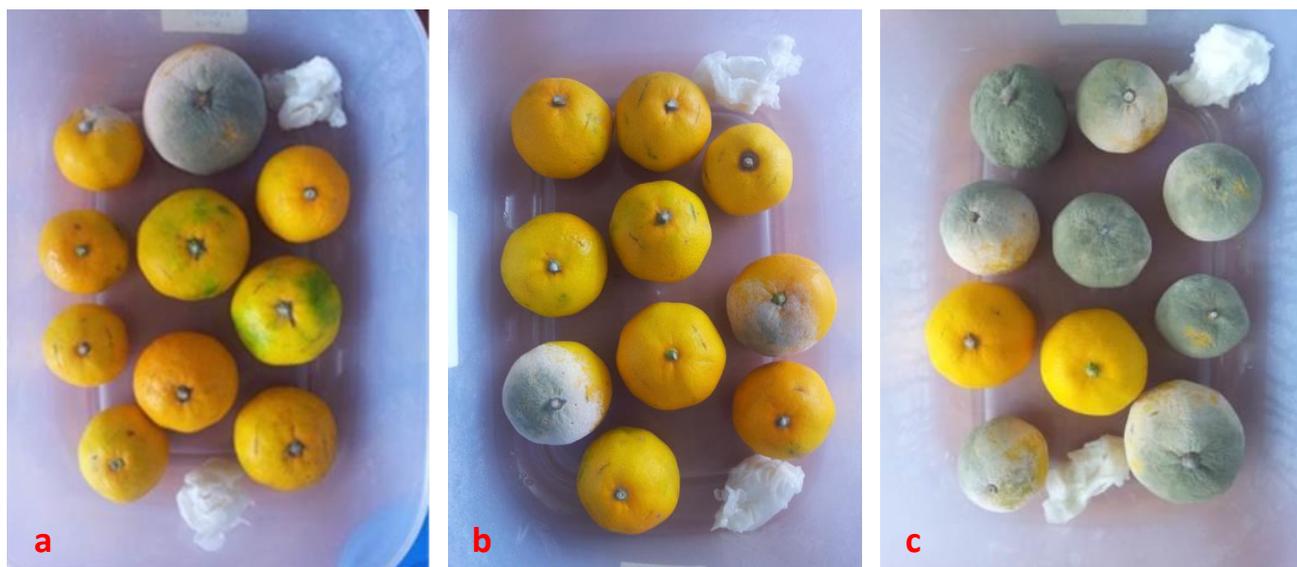


Figura 29: Esito delle infezioni artificiali di *P. digitatum* su mandarini trattati con CTR-2 (a) e supernatante dell'isolato ET-1 (b). Frutti della tesi testimone trattati con acqua (c).

5.9. Prove simulative di lotta biologica presso azienda ortofrutticola

I risultati delle prove effettuate su uva e fragola presso l'O.P. Arca Fruit di Bisceglie hanno riconfermato l'efficacia dei due liofilizzati saggiati nel controllo della *B. cinerea*. Nelle condizioni

sperimentali adottate, sui frutti inoculati artificialmente è stata osservata una significativa riduzione dell'incidenza della malattia quando trattati con gli antagonisti microbici rispetto ai frutti non trattati.



Figura 30: Effetto dei trattamenti sul contenimento della muffa grigia mediante l'isolato CTR-2 su uva (a) e l'isolato ET-1 su fragola (b). Testimoni non trattati (c – d).

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

A livello industriale i problemi più rilevanti, dal punto di vista tecnico-economico per la produzione di preparati microbiologici, sono rappresentati dall'acquisizione dei substrati di crescita per le fermentazioni e dall'incidenza dei costi energetici di processo. È evidente quindi l'importanza di individuare, prima su scala di laboratorio e poi su scala pilota e pre-industriale, i parametri migliori per ottimizzare rese, costi e tempi per la produzione su larga scala di lieviti antagonisti (temperatura, pH, umidità, fonte di carbonio, ossigenazione, micro e macroelementi, esigenze nutritive particolari, ecc.) (De Corato 2006; Wraight *et al.*, 2001). Da tali considerazioni si è voluto individuare un substrato costituito da elementi semplici ed economici in alternativa ad uno molto costoso (YPD). Il terreno minimo (terreno 4) e il terreno costituito da scotta di latte (terreno 5) hanno consentito entrambi di ottenere rese medie in biomassa secca superiori a 3 g/l in un sistema fermentativo da laboratorio in cui i parametri di crescita possono essere riproducibili e standardizzati. È da sottolineare che nel caso dei substrati minimi minerali è fondamentale l'aggiunta di estratto di lievito per consentire uno sviluppo adeguato di entrambi i ceppi. Infatti, in assenza di estratto di lievito è stata rilevata un'anomala curva di crescita ed in particolare nel caso del CTR-2 non è stata osservata la fase esponenziale neanche dopo 35 ore dall'inoculazione.

Il migliore substrato di crescita (High Medium) per l'isolato ET-1 di *B. subtilis* è stato selezionato in funzione sia della resa in CFU/ml, ottenuta alla fine della fase esponenziale di crescita, sia della più alta quantità di sostanze ad azione antifungina presente nel brodo colturale.

In letteratura sono riportate diverse segnalazioni in cui sono descritte le proprietà degli isolati di *Bacillus subtilis* utilizzati come agenti di biocontrollo di malattie delle piante (Shoda, 2000). Una delle caratteristiche di questi isolati è rappresentata dall'elevato numero di metaboliti secondari con un ampio spettro antimicrobico che consente al batterio di competere e sopravvivere in diversificati habitat in presenza di altri microrganismi (Stein, 2005). Nel lavoro svolto è stato accertato che il supernatante dell'isolato ET-1 di *B. subtilis* è in grado di inibire la germinazione dei conidi e la crescita miceliare di *P. digitatum* e *B. cinerea*. L'analisi HPLC del liquido colturale ha permesso l'identificazione di iturina, un metabolita secondario dai ben noti effetti antimicotici attivo contro diversi funghi fitopatogeni. L'efficienza di biocontrollo, strettamente correlata alla presenza di iturina, consentono di ipotizzare che l'antibiosi giochi un ruolo chiave nell'effetto di protezione di questo ceppo nei confronti di funghi fitopatogeni così come è stato già ipotizzato da diversi ricercatori in altri binomi antagonista - patogeno (Romero *et al.*, 2007).

Le ricerche condotte in questo lavoro hanno rilevato la necessità di introdurre lo ione bivalente Mn^{2+} nel substrato di coltura al fine di ottenere un incremento di Iturina nel corso della crescita

dell'isolato ET-1. I risultati sono in linea con quanto pubblicato da Wei and Chu (2002) i quali rilevano un forte incremento di produzione di surfactina in *B. subtilis* isolato ATCC 21332 con l'aggiunta di $MnSO_4$ nel brodo colturale. In altri lavori è stata valutata la produzione di iturina in diversi ceppi di *B. subtilis* in seguito all'aggiunta di alcuni ioni bivalenti nel substrato liquido; anche in questi casi la presenza di Mn^{2+} ha indotto un incremento di questo metabolita secondario alla fine della fase esponenziale di crescita del batterio (Rahman *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2011). Altro parametro importante, rilevato in questo lavoro, in grado di influire non tanto sulla produzione di biomassa secca ma soprattutto sulla produzione di iturina, è la temperatura di crescita del *B. subtilis* isolato ET-1. Infatti, è stato rilevato un incremento della concentrazione di iturina di circa 5 volte variando la temperatura da 35 a 25 °C. In letteratura sono riportati esempi in cui la temperatura influisce molto sulla produzione di iturina anche se l'optimum di crescita non sempre coincidono con quanto riscontrato in questa ricerca. Infatti, Mizumoto and Shoda (2007) ottengono la massima produzione di iturina facendo crescere il ceppo di *B. subtilis* RB14-CS alla temperatura di 25 °C, mentre Pryor *et al.* (2007), osservano un incremento di produzione di sostanze antifungina a 27 °C. Pathak (2011) rileva un maggior effetto dell'attività antifungina a 30 °C ma superata questa temperatura la produzione di iturina tende a ridursi fino a dimezzarsi a temperature prossime ai 35 °C.

Con lo scale up di processo, utilizzando i substrati selezionati e adottando i parametri di crescita precedentemente standardizzati, a valle di tutti i processi di downstream è stato possibile riprodurre le stesse rese in termini di biomassa secca e di concentrazione di iturina nel caso del dell'isolato ET-1.

Durante il processo di liofilizzazione i ceppi dei microrganismi antagonisti utilizzati in questi studi hanno mantenuto entro valori accettabili la vitalità delle cellule. Miglioramenti sulla vitalità delle cellule nella fasi di liofilizzazione potrebbero essere ottenute aggiungendo nel liquido di coltura sostanze protettive. Cellule di *B. amyloliquefaciens* coltivate in terreni liquidi modificati con glicerolo non solo acquisiscono una migliore tolleranza alle basse temperature ma in generale mostrano una migliore sopravvivenza in condizioni di qualunque stress termico (Sartori *et al.*, 2012). Teixidò e collaboratori (2006) suggeriscono che aggiungendo NaCl e glicerolo per modificare il potenziale osmotico dei substrati liquidi di crescita è possibile migliorare la tolleranza allo stress in microrganismi durante il processo di liofilizzazione senza compromettere la loro capacità di biocontrollo e senza alterare le prestazioni degli antagonisti in condizioni di pieno campo. In linea con i risultati ottenuti in altri studi (Ale *et al.*, 2015; Florent *et al.*, 2015; Korsten and Cook 1999), la temperatura di conservazione dei liofilizzati a 4 °C ha preservato nel tempo la vitalità e la funzionalità dei microrganismi.

In questo lavoro è stata saggiata l'attività antagonistica di *P. guilliermondii* ceppo CTR-2 e *P. anomala* ceppo GR-2001 in prove *in vivo* su uva, fragole e mandarino, inoculati artificialmente con due funghi responsabili di gravi alterazioni dei frutti in post raccolta. In particolare, l'isolato

CTR-2 applicato su uva e fragola ha consentito di limitare significativamente le infezioni di *B. cinerea* rispetto al testimone non protetto e nel caso del mandarino inoculato con *P. digitatum* soltanto il 15% delle ferite hanno mostrato sintomi di malattia. In altre ricerche è stata valutata l'efficacia del ceppo Z1 di *P. guilliermondii* nei confronti di *P. italicum* variando le condizioni di temperatura ed umidità (Lahlali *et al.*, 2011). Il ceppo Z1 sembrava essere indipendente dalle condizioni ambientali e l'incidenza della malattia è stata ridotta di oltre il 85% in tutte le condizioni saggiate. Inoltre, gli stessi autori hanno rilevato una rapida colonizzazione delle cellule di lievito antagonista Z1 sulle ferite di agrumi durante la prima settimana e successivamente la concentrazione si è stabilizzata intorno a $6,9 \times 10^6$ UFC/ml per 30 giorni. L'effetto di maggior contenimento della malattia è stato ottenuto quando *P. guilliermondii* è stato applicato sui frutti 24 ore prima dell'inoculazione del patogeno (El Guilli *et al.*, 2011). Questi risultati confermano che le generali proprietà antagonistiche di questo lievito sono dovute prevalentemente ad una azione di competizione per le sostanze nutritive e per i siti di infezione (Lahlali *et al.*, 2011). Wisniewski *et al.*, (1991) ha riportato un risultato contrastante ipotizzando il coinvolgimento di enzimi degradativi della parete cellulare fungina quali β -1,3-glucanasi in attività di biocontrollo esercitata da *P. guilliermondii*.

L'isolato GR-2001 applicato sui frutti di fragola e sugli acini di uva ha consentito di limitare le infezioni di *B. cinerea* anche se in maniera meno marcata rispetto all'isolato CTR-2. La minore efficacia dell'isolato GR-2001 potrebbe essere imputata al meccanismo di azione di *P. anomala* che secondo alcuni ricercatori è stato attribuito prevalentemente alla presenza di enzimi litici della parete cellulare e ad una serie di prodotti intermedi del metabolismo dello zucchero come acetato di etile, etanolo, arabitolo, glicerolo che da soli o in varie combinazioni tra di loro agiscono contro i fitopatogeni (Fredlund *et al.*, 2004; Mills *et al.*, 2002). Queste sostanze richiedono del tempo per la loro sintesi a vantaggio del patogeno che colonizza velocemente i tessuti vegetali (Druvefors *et al.*, 2002).

Nelle prove condotte *in vivo* con le spore dell'isolato ET-1 di *B. subtilis*, sia su uva che su fragola, non è stata rilevata una significativa riduzione dell'incidenza della malattia rispetto al testimone inoculato di riferimento. Romero *et al.* (2004) hanno condotto delle ricerche sulla variabilità di comportamento dell'efficacia di isolati di *B. subtilis* in funzione dello stadio di sviluppo della popolazione usata per l'attività di biocontrollo *in vivo* e hanno notato che usando cellule prelevate nella fase di crescita esponenziale ottenevano un effetto di contenimento della malattia statisticamente superiore rispetto a quando venivano utilizzate cellule prelevate nella fase stazionaria (prevalentemente spore). In quest'ultimo caso è stato rilevato che i lipopeptidi ad azione antifungina sono stati prodotti dopo 5 giorni dalla somministrazione delle spore e quindi non presenti per bloccare la germinazione dei conidi del fitoparassita che avviene dopo poche ore dall'inoculazione (Romero *et al.*, 2007). Nei nostri saggi *in vivo* abbiamo ottenuto positivi effetti con l'utilizzo del sovranatante derivante dal processo di separazione della biomassa poiché

caratterizzato da un'alta concentrazione di iturina immediatamente disponibile in grado di inibire lo sviluppo del patogeno.

In generale, nelle prove simulate semi-commerciali per effetto della temperatura di conservazione è stata osservata una riduzione di incidenza della malattia rispetto a quanto osservato nelle prove *in vivo* in laboratorio. È risultato comunque evidente l'effetto di contenimento della muffa grigia ad opera degli antagonisti microbici.

In conclusione, gli obiettivi fissati all'inizio del progetto che prevedevano la valutazione dell'attività di biocontrollo di alcuni di microrganismi antagonisti verso i patogeni responsabili dell'alterazione della frutta in post raccolta e la standardizzazione del processo di produzione della biomassa liofilizzata di questi isolati su scala pre-industriale sono stati pienamente raggiunti.

Promettenti risultati sono stati ottenuti dalla selezione di substrati a basso costo nella produzione di biomassa cellulare che nel caso dell'impiego della scotta di latte ha permesso di valorizzare un prodotto di scarto dell'industria casearia con un ulteriore valore aggiunto alla ricerca. Il processo di produzione individuato per *Bacillus subtilis* isolato ET-1, oltre ad essere utilizzato ai fini della lotta biologica contro i microrganismi patogeni in post raccolta, potrebbe essere anche impiegato per la produzione e recupero di biomolecole per applicazioni ambientali, agroindustriali e farmaceutiche.

Gli ottimi risultati di contenimento della malattia ottenuti nelle condizioni sperimentali, dove gli antagonisti microbici sono stati applicati su frutti artificialmente inoculati, potrebbero ulteriormente migliorare nelle condizioni reali del post raccolta in cui non è presente un'elevata contaminazione del patogeno.

In futuro si potrebbe ampliare il target dei binomi ospite-patogeno, valutare i costi di gestione del processo produttivo e, alla luce delle normative nazionali e comunitarie vigenti in materia di registrazione, prevedere una possibile applicazione commerciale di questi antagonisti microbici.

BIBLIOGRAFIA

- Ait-Lahsen H., Soler A., Rey M., De la Cruz J., Monte E., and Llobell A., (2001). *An Antifungal Exo- α -1,3-Glucanase (AGN13.1) from the Biocontrol Fungus Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology, 67: 5833-5839.
- Alabouvette C., Olivain C., and Steinberg C., (2006). *Biological control of plant diseases: the European situation*. European Journal of Plant Pathology, 114 (3): 329-341.
- Ale C.E., Otero M.C., Pasteris S.E. (2015). *Freeze-Drying of Wine Yeasts and Oenococcus oeni and Selection of the Inoculation Conditions after Storage*. J Bioprocess Biotech 5: 248
- Ambrico A., Trupo M., Lopez L. (2010). *Identification and characterization of Bacillus subtilis ET-1. A strain with antifungal activity against fruit rot pathogens*. Journal of Plant Pathology (2010), 92 (4, Supplement), S4.72.
- Ambrico A., Trupo M., (2011). *Evaluation of the antifungal activity of morphologically distinct colonies of Bacillus subtilis strain ET-1*. Journal of Plant Pathology, 93 (4, Supplement), S4. 25 - S4.62. Edizioni ETS Pisa.
- Benuzzi M. e Baldoni G., (2000). *AQ10, nuovo biofungicida a base di Ampelomyces quisqualis contro l'oidio della vite*. Inf.tore fitopatol., 5: 33-36.
- Carpanelli G., (2000). *Mezzi di lotta biologica: funghi antagonisti*. Istituto Professionale di Stato per l'Agricoltura e l'Ambiente "F.lli Navarra" Malborghetto di Boara (FE).
- Castoria R., Caputo L., De Curtis F., and De Cicco V., 2003. *Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: A possible new mechanism of action*. Phytopathology, 93: 564–572.
- Chung S., Kong H., Buyer J. S., Lakshman D. K., Lydon J., Kim S. D., Roberts D.P., (2008). *Isolation and partial characterization of Bacillus subtilis ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper*. Appl Microbiol Biotechnol 80 (1): 115– 123.

De Corato U., Albergo R., Trupo M., Palazzo S., Nobili S., (2006). *Messa a punto di processi di produzione su scala pre-industriale di lieviti antagonisti per la lotta biologica in post-raccolta*. ENEA – Unità Tecnico-Scientifica Biotecnologie, Protezione della Salute e degli ecosistemi.

Droby S., (2006). *Improving quality and safety of fresh fruit and vegetables after harvest by the use of biocontrol agents and natural materials*. Acta Horticulturae, 709: pg. 45–51.

Druvefors U. Å. , Passoth V., Schnürer J., (2005). *Nutrient Effects on Biocontrol of Penicillium roqueforti by Pichia anomala J121 during Airtight Storage of Wheat*. Appl. Environ. Microbiol.; 71 (4): 1865–1869.

El Guilli, M., Ibriz M., Lahlali R., Jijakli M.H., 2011. Effects of temperature and relative humidity on the in vitro and in vivo radial growth of *Penicillium italicum* and on the biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*, strain Z1. Acta Horticulturae. 905, 31: 233-240.

Elad Y., (2000). *Biological control of foliar pathogens by means of Trichoderma harziarium and potential modes of action*. Crop Protection 19: pg. 709-714.

Ford W. W., Lawrence J. S., (1916). *Studies on aerobic spore-bearing non-pathogenic bacteria: Part I*. Journal of Bacteriology 1 (3): 273.

Fredlund, E., A. Broberg, M. E. Boysen, L. Kenne, and J. Schnürer. 2004. Metabolite profiles of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121 grown under oxygen limitation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64:403–409.

Ianiri G., (2011). *Approcci molecolari per la comprensione dei meccanismi genetici della degradazione della patulina da parte dell'agente di biocontrollo Rhodosporidium kratochvilovae ceppo LS11 e da parte del ceppo IAM 13481 di Sporobolomyces sp.* Università degli Studi del Molise, Facoltà di Agraria, Dipartimento di Scienze animali, vegetali e dell'ambiente (S.A.V.A.).

Iannizzotto M., (2007). *Lotta Biologica*. Istituto Statale di Istruzione Superiore “F. Cucuzza”. Sezione: Istituto Tecnico Agrario – Caltagirone.

Irtwange S.V., (2006). *Application of Biological Control Agents in Pre- and Postharvest Operation*. Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal. Invited Overview No. 3. Vol. VIII.

- Janisiewicz W. J. and Korsten L., (2002). *Biological control of postharvest diseases of fruits*. Annu. Rev. Phytopathol., 40: pg. 411–41.
- Kamel F. e Hoppin J. A., (2004). *Association of Pesticide Exposure with Neurologic Dysfunction and Disease Environmental Health Perspectives*. Volume 112- Number 9.
- Korsten L., Cook N., (1999). *Optimizing culturing conditions for Bacillus subtilis*. South African Avocado Growers' Association Yearbook19: 54-58.
- Kurtzman C.P., (2000). *Four new yeasts in the Pichia anomala clade*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, pg. 395–404.
- Lahlali R., Hamadi Y., Guilli M.E., Jijakli M.H., 2011. Efficacy assessment of *Pichia guilliermondii* strain Z1, a new biocontrol agent, against citrus blue mould in Morocco under the influence of temperature and relative humidity. *Biological Control*. 56, 3: 217-224.
- Lorito M., Woo S., Aloj B., Scala F., (2003) *Lotta biologica in post-raccolta*, Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale.
- Ludwig W., K. Schleifer e William B., Whitman., (2008). *Revised Road Map to the Phylum Firmicutes*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3.
- Madigan M.T. e Martinko J.M., (2006). *Microbiologia generale*. Brock. Biologia dei microorganismi. Volume 1.
- Mari M., Neri F., Bertolini P., (2007). *Novel Approaches to Prevent and Control Postharvest Diseases of Fruit*. Stewart Postharvest Review, 3(6): Article 4. Stewart Postharvest Solutions Ltd., London, UK.
- Mills, D. A., E. A. Johannsen, and L. Cocolin. 2002. Yeast diversity and persistence in *Botrytis*-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4884–4893.
- Mizumoto, S., Shoda, M. (2007). Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid state fermentation by response surface methodology. *Applied Microbiology Biotechnology*, 76,101-108.

N'Guessan F.K., Coulibaly H. W., Alloue-Boraud M.W.A., Cot M., Djè K.M., (2015). *Production of freeze-dried yeast culture for the brewing of traditional sorghum beer, tchapalo*. Food Science & Nutrition JULY 2015: pg. 1-8

Ongena M., Jacques P., (2007). *Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol Trends*. in *Microbiology* Vol.16 N°. 3.

Pathak K.V., (2011). *Purification and Characterization of Antifungal Compounds Produced by Banyan Endophytic Bacilli*. Ph.D. Thesis, Sardar Patel University, Vallabh Vidynagar, India, p 42.

Pritts M., (2000). *Growing strawberries, healthy communities, strong economies and clean environments: what is the role of the researcher?* Acta Hort. 567: 411-417.

Pryor, S.W., Gibson, D.M., Hay, A.G., Gossett, J.M., Walker, L.P. (2007). Optimization of spore and antifungal lipopeptides production during the solid state fermentation of *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 143,63-79.

Rahman M.S., Ano T., Shoda M., (2006). *Second stage production of iturin A by induced germination of Bacillus subtilis RB14*. J. Biotechnol. 125:513-515.

Rahman MS, Zohora U.S., Ano T (2006). Effect of heavy metals on iturin A production in *Bacillus subtilis* Biofilm. BIOMIRROR. Volume 2(10) :1-5(2011).

Rodriguez-Kabana R., Kelley W. D., Curl E. A., (1978). *Proteolytic activity of Trichoderma viride in mixed culture with Sclerotium rolfsii in soil*. Can. J. Microbiol. 24: 487-490

Romero D., De Vicente A., Rakotoaly R., Dufour S., Veening J., Arrebola E., Cazorla F., Kuipers O., Paquot M., Perez-Garcia A., (2007). *The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of Bacillus subtilis toward Podosphaera fusca*. Molecular plant microbe interactions. 20: 430-440.

Romero D., Pérez-García A., Rivera M. E., Cazorla F. M., and De Vicente, A., (2004). *Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus Podosphaera fusca*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64:263-269.

- Salvi R. M., Lara D. R., Ghisolfi E. S., Portela L. V., Dias R. D., Souza D. O., (2003). *Neuropsychiatric Evaluation in Subjects Chronically Exposed to Organophosphate Pesticides*. Toxicological sciences. 72: 267–271.
- Sartori M, Nesci A, Etcheverry M., 2012. Production of *Fusarium verticillioides* biocontrol agents, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Microbacterium oleovorans*, using different growth media: evaluation of biomass and viability after freeze-drying. Food Additives and Contaminants .Vol. 29, No. 2, 287–292.
- Sharma R. R., Singh D., Singh R., (2009). *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonist: A review*. Biological control, 50: 205-221.
- Shoda M., (2000). *Bacterial control of plant diseases*. J. Biosci. Bioeng. 89:515-521.
- Spadaro D. e Gullino M. L., (2004). *State of art and future of biological control of postharvest fruit disease*. Int. J. F. Mic. 91: 185-194.
- Stein T., (2005). *Bacillus subtilis antibiotics: Structures, syntheses and specific functions*. Mol. Microbiol. 56:845-57.
- Tabbene O., Ben S. I., Bouabdallah F., Mangoni M. L., Urdaci M. C., Limam F., (2009). *Production of anti-methicillin-resistant Staphylococcus activity from Bacillus subtilis sp. strain B38 newly isolated from soil*. Appl. Biochem. Biotechnol. 157(3): 407–419.
- Tormena M., (2010). *Controllo biologico di Botrytis cinerea su vite cv. Glera*. Università degli Studi di Padova, Facoltà di Agraria, Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-forestali.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L., Marra R., Wooa S. L., Lorito M.. (2007). *Trichoderma-plant-pathogen interactions*. Soil Biology & Biochemistry 40: 1–10.
- Wei Y.H. and Chu I.M. (2002). Mn^{2+} improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Lett., 24, pp. 479–482
- Whipps J. M., (1987). *Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi*. New Phytologist, 107(1): 127–142.

Wickerham L. J., (1966). *Validation of the species Pichia guilliermondii*. Journal of Bacteriology, 92: 1269.

Wisniewski M., Wilson C., Droby S., Chalutz E., El Ghaouth A., Stevens C. (2007). *Postharvest biocontrol: new concepts and applications*. In: Vincent C., Goettel M. S., Lazarovits G. (eds) Biological Control: A Global Perspective. CABI, Cambridge, MA, USA, pag. 262–273.

Wraight S.P., Jackson M.A., Kock S.L., (2001). *Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents*. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N., editors. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. 1st ed. London: CAB International. Chapter 10. p. 253–288.

Zimand G., Elad Y., Chet I., (1996). *Effect of Trichoderma harzianum on Botrytis cinerea pathogenicity*. Phytopathology 86: 1255-1260.

Edito dall'ENEA
Servizio Promozione e Comunicazione
Lungotevere Thaon di Revel, 76 - 00196 Roma

www.enea.it

Pervenuto il 17.12.2015

Stampato presso il Laboratorio Tecnografico ENEA - C.R. Frascati
Finito di stampare nel mese di gennaio 2016