



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

Relazione conclusiva del progetto:

**"APPLICAZIONI DELLA TECNOLOGIA EM PER IL PRATO SPORTIVO E PER LE
COLTURE DI POMODORO E FRUMENTO"**

Responsabile scientifico: Prof. Giovanni Dinelli

Oggetto della ricerca

La ricerca effettuata ha permesso di definire il contributo dei microrganismi effettivi, isolati e sviluppati dal Prof. Teruo Higa, nel facilitare la radicazione di essenze da prato sportivo, nonché la produzione, la qualità del prodotto e la resistenza naturale ai patogeni di pomodoro e frumento.

1. TAPPETI ERBOSI AD USO SPORTIVO

La gestione degli impianti sportivi è un'attività di grande interesse economico e in continua evoluzione. Oggigiorno, i rotoli erbosi rappresentano l'approccio tecnico più diffuso per gli impianti sportivi professionali, specialmente laddove sia richiesta un'elevata qualità della superficie, associata ad una forte intensità di utilizzo (stadi, campi di allenamento, tee e green dei campi da golf). Attualmente, l'utilizzo dei rotoli erbosi consiste essenzialmente nella realizzazione di una particolare stratigrafia di materiale inerte, ricoperto da membrane in PVC e polietilene, sulle quali trovano posto le cellule che ospitano la rete di adduzione dell'acqua. L'utilizzo di un substrato inerte e le frequenti fertirrigazioni costituiscono le cause principali di una scarsa radicazione del tappeto erboso e dei relativi problemi tecnici e manutentivi (Jordan *et al.*, 2003).

L'obiettivo principale della ricerca è stato quello di migliorare le condizioni di crescita dell'apparato radicale dei tappeti erbosi, in particolare cercando di incrementare lo stimolo alla radicazione delle specie utilizzate, senza modificare il sistema di supporto normalmente in uso.

La ricerca è stata condotta utilizzando una delle specie prevalentemente in uso per la realizzazione dei tappeti erbosi ad uso sportivo, ovvero il *Lolium perenne*.

Tale specie è stata posta a crescere in vasi di dimensioni 10 x 10 cm, contenenti uno strato basale di perlite e un substrato di coltura costituito da pomice e sabbia (50:50). I vasi sono stati posti in cella climatizzata con 12 h di fotoperiodo e temperatura 22°C/16°C. Dopo l'emergenza si è proceduto al diradamento, lasciando in ogni vaso (8 per replica) 150 piante.

ALMA MATER STUDIORUM • UNIVERSITA' DI BOLOGNA



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

Per quanto riguarda il sistema di irrigazione, è stato utilizzato un sistema ad idroponica a circolo chiuso che favorisce condizioni di pH e umidità del substrato ottimali per la crescita delle piante.

Tabella I: Trattamenti applicati e loro sigla identificativa.

N° TESI	TRATTAMENTO	SIGLA IDENTIFICATIVA
1°	Controllo (Hoagland)	C+H
2°	Batteri commerciali + Hoagland	BATT non filt+H
3°	Batteri commerciali (centrifugati e filtrati) + Hoagland	BATT filt+H
4°	Fitormoni + Hoagland	FITO+H
5°	Bokashi 2 FI	BOK
6°	Bokashi 2 FI + Hoagland	BOK+H
7°	EM-1 attivato (1:1000) + Bokashi-2 FI	EM+BOK
8°	EM-1 attivato (1:1000) + Bokashi-2 FI + Hoagland	EM+BOK+H
9°	Em-1 attivato (1:500)	EM
10°	Em-1 attivato (1:500) + Hoagland	EM+H
11°	EM1 attivato (1:500) + polvere di ceramica + Hoagland	EMX+H

Per lo svolgimento della prova sono stati definiti undici diversi trattamenti, replicati due volte, secondo quanto riportato in Tabella I.

Delle due repliche predisposte per ciascun trattamento, una è stata seminata utilizzando semi imbibiti per 3 ore nella rispettiva soluzione di trattamento (identificati in Tabella I con la dicitura "I"), mentre per l'altra replica sono stati utilizzati semi non imbibiti (identificati in Tabella I con la dicitura "NI").

I trattamenti sono stati effettuati a cadenza settimanale per una durata complessiva della prova di cinque settimane. A 6 giorni da ciascun trattamento (DAT), ovvero a 6, 13, 20, 27 e 34 DAT, sono stati effettuati i rilievi morfologici: si è prima proceduto con la misurazione dell'altezza fogliare,

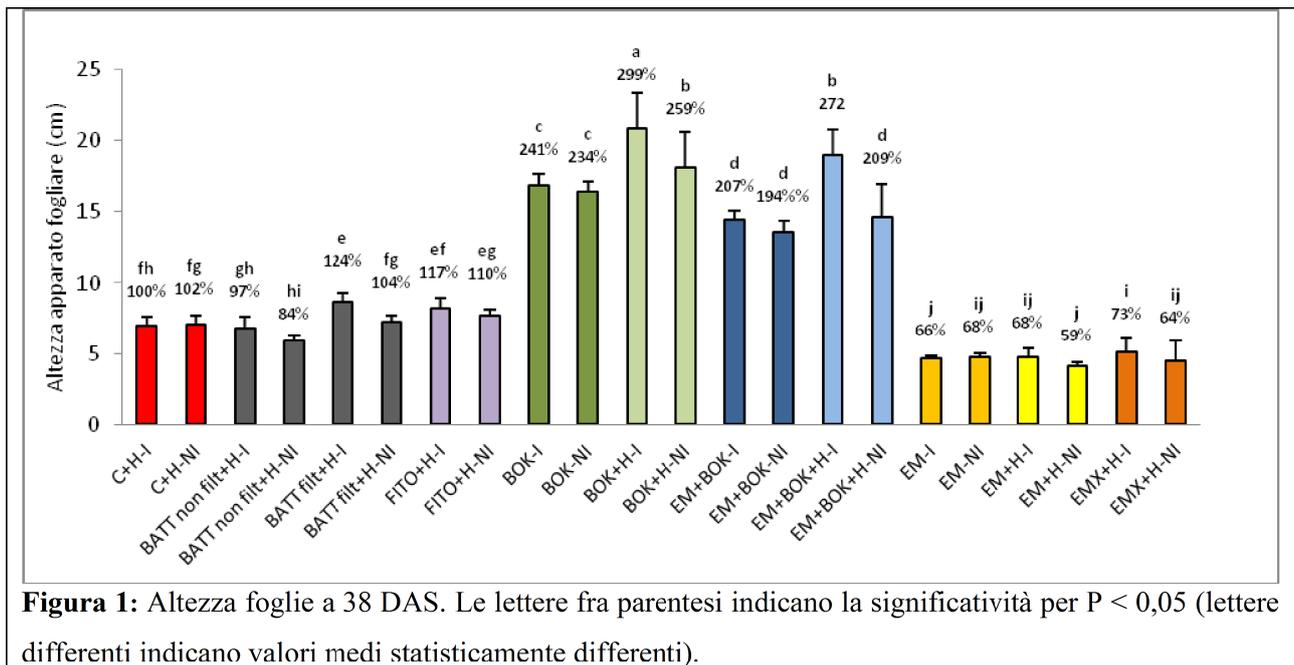


DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

successivamente è stato effettuato un taglio ad un'altezza prefissata di 4 cm, ed è stato quindi determinato il peso fresco e secco della biomassa fogliare asportata.

L'efficacia dei trattamenti è stata determinata valutando i parametri di seguito illustrati.

La lunghezza delle foglie misurata al momento del 5° ed ultimo taglio, ovvero a 38 giorni dalla semina (38 DAS), ha evidenziato una significativa incidenza dei prodotti EM-RO nella morfologia



dell'apparato fogliare (Figura 1). I trattamenti con Bokashi e con EM1+Bokashi hanno indotto uno sviluppo di circa 2,5 – 3 volte superiore rispetto al controllo. Per tutti i trattamenti contenenti EM-1 attivato (EM-I; EM-NI; EM+H-NI; EM+H-I). È quindi possibile ipotizzare che l'effetto di stimolazione dell'apparato fogliare sia dovuto in larga parte alla presenza del Bokashi 2 FI, da solo o in associazione con EM-1. È inoltre interessante notare come in tutti i trattamenti, eccezion fatta per il controllo (C) ed EM-1, via sia un effetto positivo determinato dall'imbibizione del seme prima della semina.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

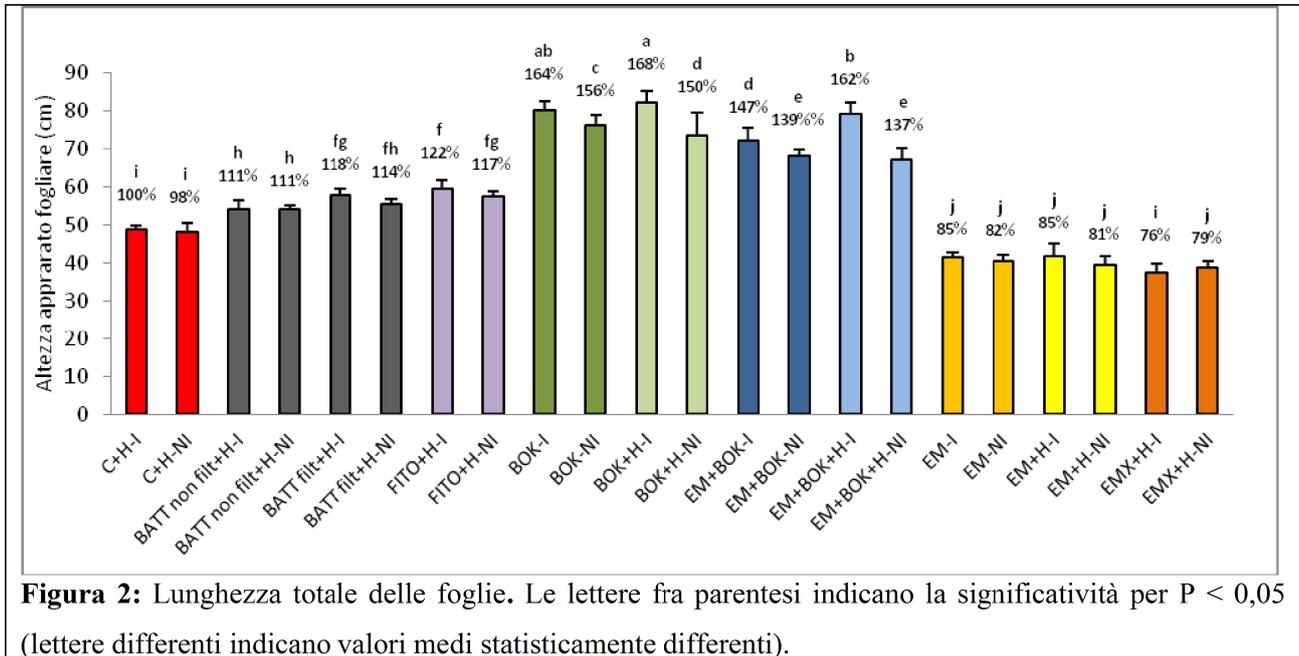


Figura 2: Lunghezza totale delle foglie. Le lettere fra parentesi indicano la significatività per $P < 0,05$ (lettere differenti indicano valori medi statisticamente differenti).

La lunghezza totale delle foglie è stata calcolata come la somma dell'altezza delle foglie precedente ad ogni taglio nell'arco dell'intera durata della prova (5 settimane). Anche per il parametro "altezza totale", si osserva lo stesso andamento già discusso precedentemente (Figura 2). In questo caso, le differenze tra i diversi trattamenti risultano meno marcate, ovvero nel caso del trattamento con Bokashi 2 FI (da solo o in associazione con EM-1) si osservano incrementi medi di circa il 50%, mentre per i trattamenti contenenti EM-1 (da solo o in associazione con la polvere di ceramica EM-X Super Cera C Hakko) i decrementi medi si attestano attorno al 19%. Tale attenuazione rispetto ai dati precedentemente illustrati e relativi all'ultimo taglio (ovvero a 38 DAS), è motivata dal fatto che nelle prime settimane della prova i trattamenti effettuati non avevano ancora raggiunto la loro completa efficacia.

1.2 Peso della biomassa fogliare

In accordo ai dati relativi all'altezza fogliare, tutti i trattamenti contenenti al loro interno Bokashi 2 FI hanno assicurato una produzione di biomassa fogliare fresca e secca statisticamente superiore agli altri trattamenti, con incrementi medi rispettivamente di 3,3 e 2,2 volte superiori rispetto al



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

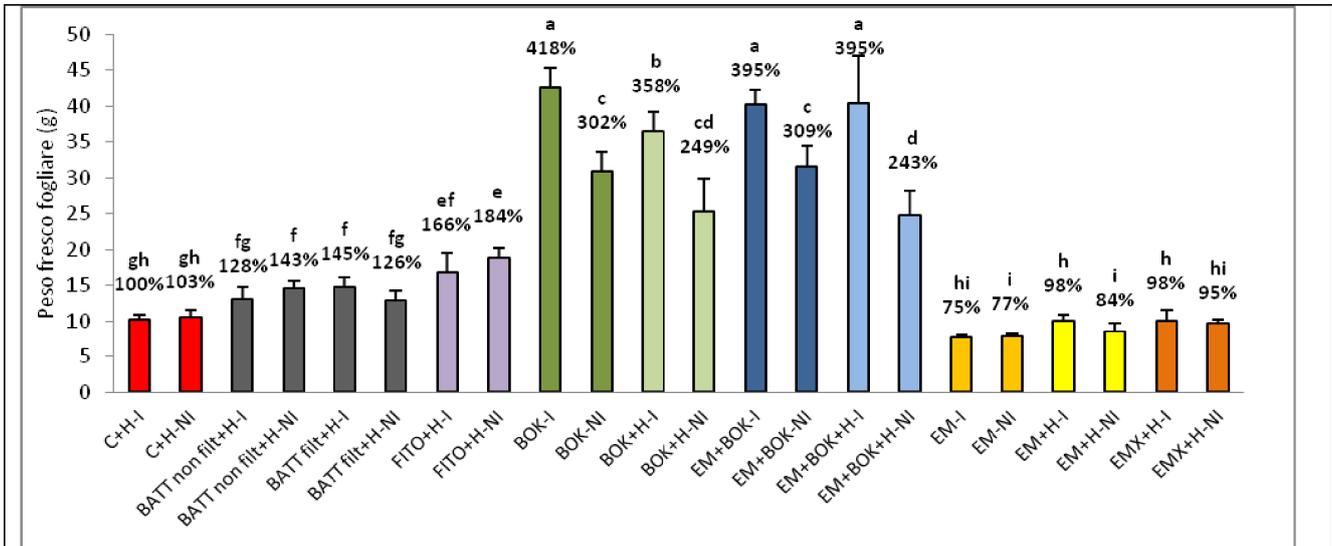


Figura 3. Peso fresco totale della biomassa fogliare. Le lettere fra parentesi indicano la significatività per $P < 0,05$ (lettere differenti indicano valori medi statisticamente differenti).

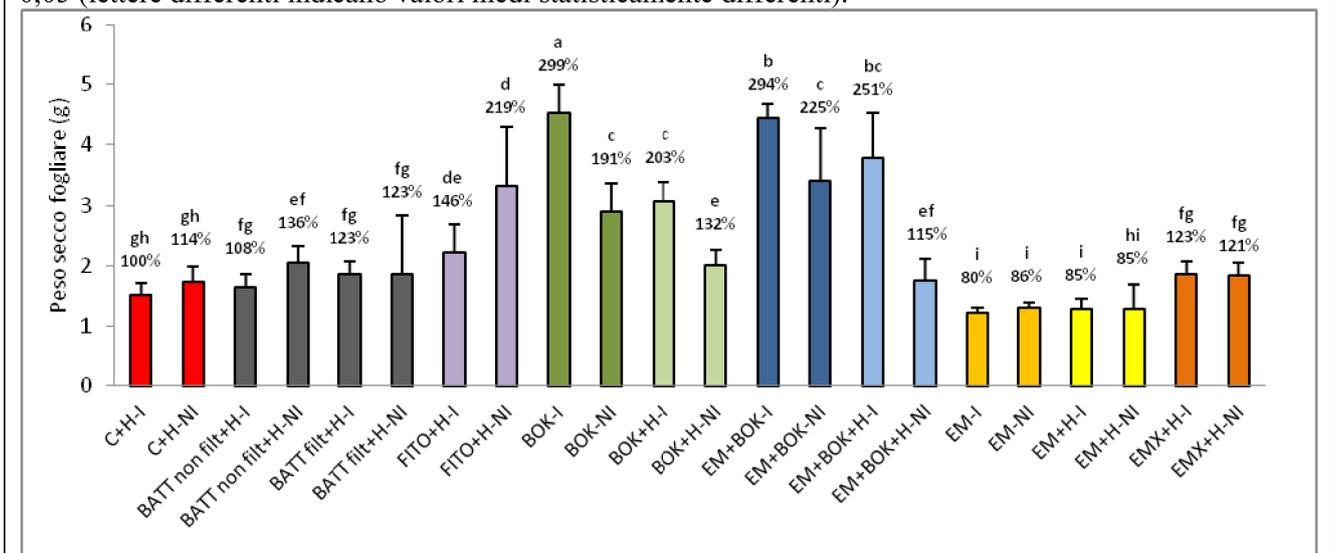


Figura 4. Peso secco totale della biomassa fogliare. Le lettere fra parentesi indicano la significatività per $P < 0,05$ (lettere differenti indicano valori medi statisticamente differenti).

controllo (Figura 3 e 4).

Così come precedentemente illustrato per l'altezza fogliare, anche per il peso fresco e il peso secco si osservano differenze significative tra le repliche imbibite (I) e le repliche non imbibite (NI), in particolare per i trattamenti che interessano il Bokashi 2 FI. Tale osservazione risulta in generale accordo con quanto riportato da diverse pubblicazioni scientifiche, le quali dimostrano che trattamenti di idratazione del seme (*seed priming*) possono migliorare la velocità e l'uniformità di



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

germinazione, consentendo così l'attivazione dei processi metabolici pre-germinativi (Rush, 1991; Caseiro *et al.*, 2004).

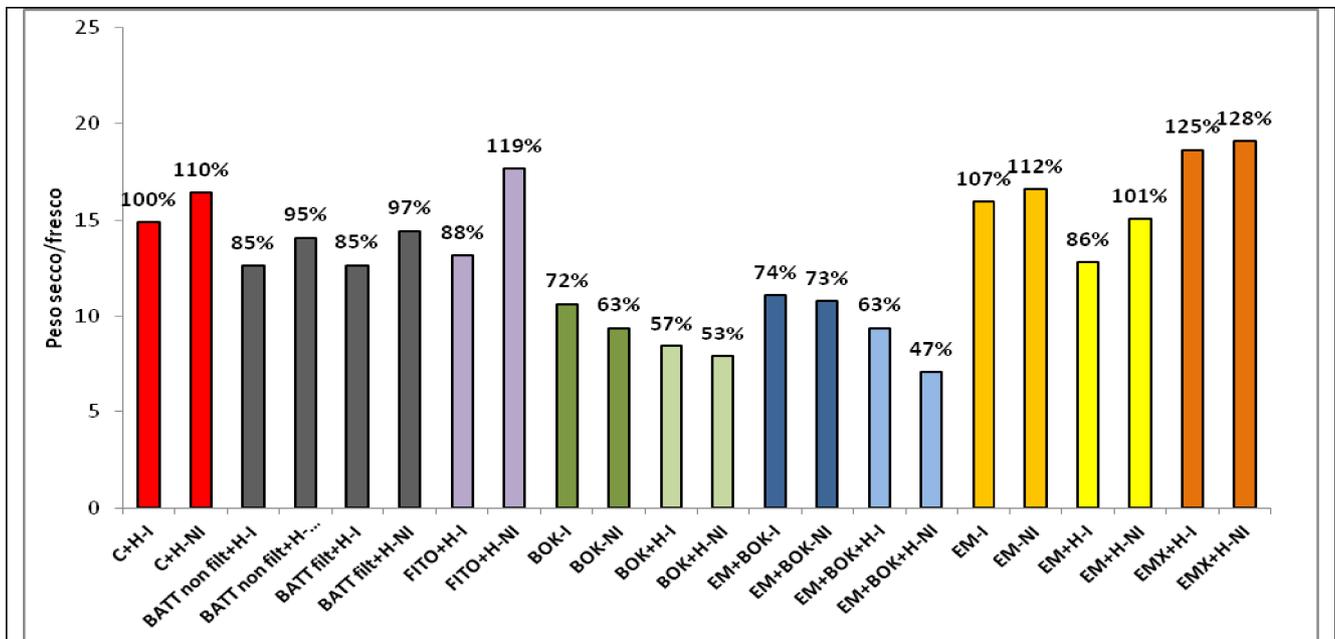


Figura 5. Rapporto % tra il peso secco e il peso fresco dell'apparato fogliare.

Infine, come è possibile osservare dalla Figura 5, i trattamenti con EM-1 hanno assicurato un incremento del rapporto peso secco su peso fresco del 10% rispetto al controllo. Tutti i trattamenti con Bokashi 2 FI hanno invece indotto una diminuzione del rapporto tra il 28 e il 53%. Una maggior presenza di sostanza secca contenuta nelle foglie trattate con EM-1 potrebbe apportare un beneficio qualora si necessiti di essenze prative in grado di resistere a forti sollecitazioni meccaniche come nel caso di tappeti erbosi da utilizzare in stadi da calcio (Canaway, 1985; Lucas *et al.*, 1995). Viceversa il minor rapporto tra sostanza secca e fresca determinato nei trattamenti contenenti Bokashi 2 FI potrebbe assicurare una maggiore resistenza alla trazione e compressione, grazie ad una maggiore turgidità cellulare (Barrs and Weatherley, 1962; Jarvis and McCann, 2000).

1.3 Resistenza allo strappo

La resistenza allo strappo è stata determinata utilizzando un dinamometro meccanico (PCE Instrument) dotato di un sistema di bloccaggio al filo d'erba e di un indicatore che rileva il valore massimo raggiunto.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

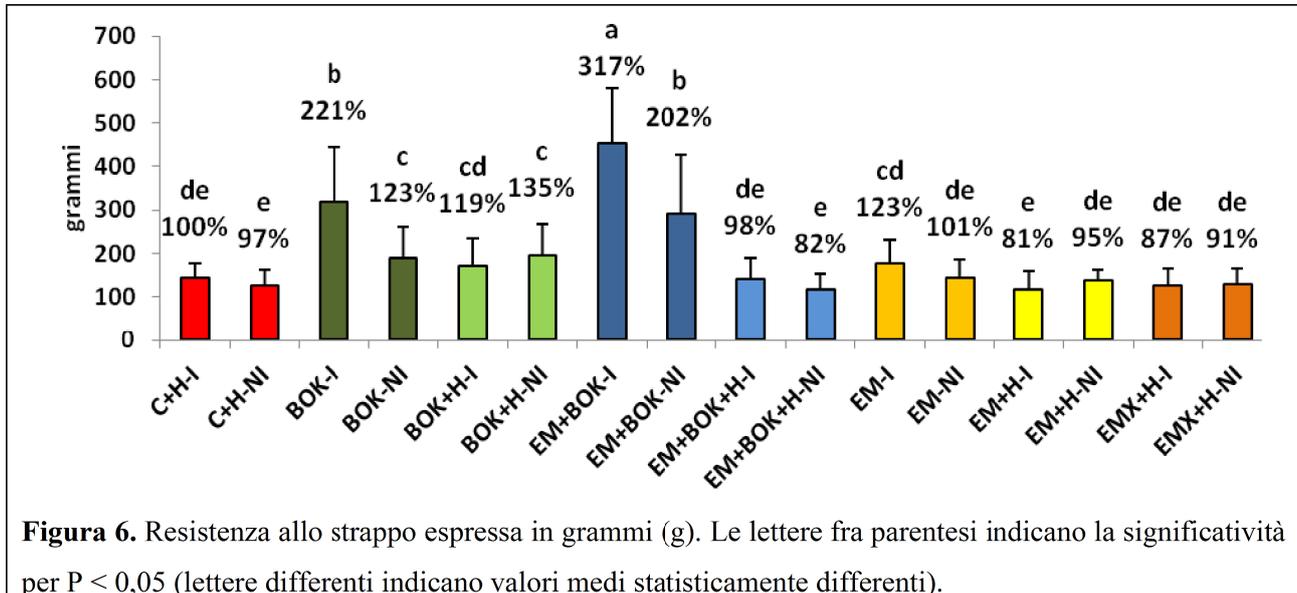


Figura 6. Resistenza allo strappo espressa in grammi (g). Le lettere fra parentesi indicano la significatività per $P < 0,05$ (lettere differenti indicano valori medi statisticamente differenti).

I risultati migliori per quanto riguarda la capacità dei fili d'erba di resistere allo strappo sono stati rilevati nelle piante trattate con EM+Bokashi con semi non sottoposti ad imbibizione preliminare. Questo trattamento ha indotto un aumento nella resistenza allo strappo di 3,2 volte superiore rispetto al controllo (Figura 6). Mediamente i trattamenti contenuti Bokashi inducono una resistenza allo strappo superiore del 60% rispetto al controllo, mentre tutti i trattamenti con EM-1 senza Bokashi non fanno registrare differenze statisticamente significative rispetto al controllo. E' possibile ipotizzare che la grande differenza introdotta dai trattamenti con Bokashi sia dovuta al fatto che essendo un concime (ottenuto anche con l'aggiunta di batteri efficaci) abbia fatto irrobustire i tessuti, conferendo una maggior resistenza allo strappo. I trattamenti con EM-1 hanno invece fatto diminuire la resistenza allo strappo, probabilmente per via di una minor presenza di acqua e quindi di turgidità nei tessuti vegetali.

1.4 Morfologia dell'apparato radicale

Le determinazioni relative allo sviluppo ed alla morfologia dell'apparato radicale sono state condotte al termine dell'esperimento (dopo 5 settimane di trattamenti). La zolla d'erba è stata lavata molto delicatamente in acqua per rimuovere tutto il terreno di crescita, facendo attenzione a non danneggiare le radici. Si è poi proceduto dapprima alla misurazione dello sviluppo in lunghezza delle radici e della biomassa prodotta. I campioni di tessuto radicale e rizosfera sono stati



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

campionati per la successiva per la conta dei peli radicali e la determinazione della composizione microbica e di eventuali funghi simbionti presenti nei tessuti.

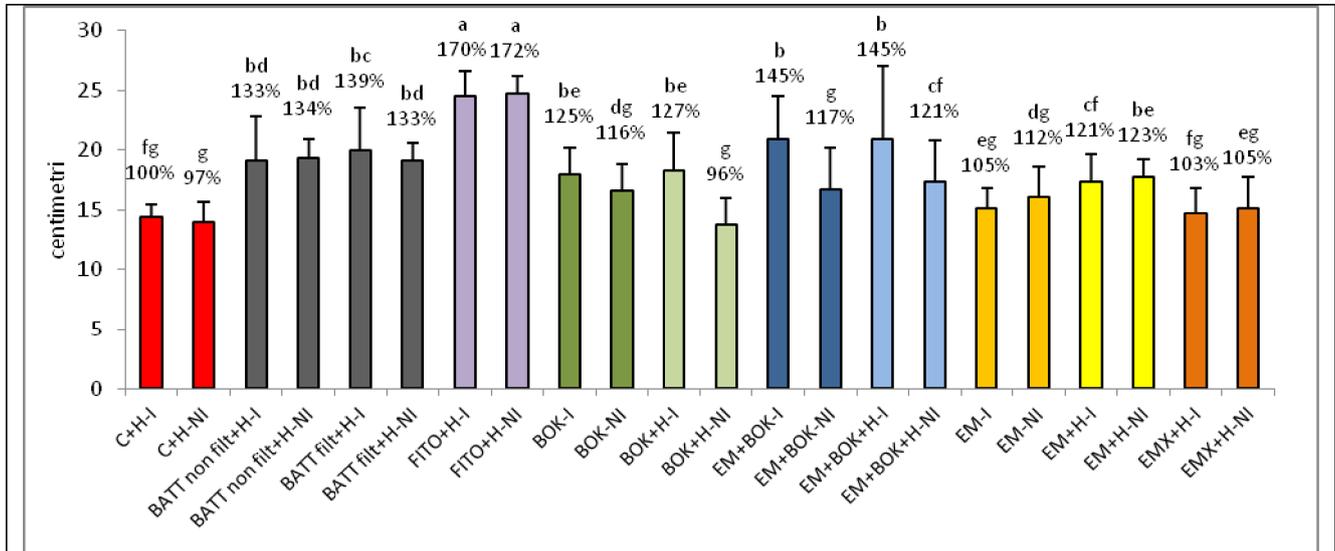


Figura 7. Lunghezza delle radici. Le lettere fra parentesi indicano la significatività per $P < 0,05$ (lettere differenti indicano valori medi statisticamente differenti).

Complessivamente il trattamento con i fitormoni ha indotto i migliori risultati nella crescita dell'apparato radicale, determinando una crescita della lunghezza radicale di circa 0,7 volte superiore rispetto al controllo. Tra i trattamenti composti da microrganismi effettivi, il trattamento EM+Bokashi è risultato il migliore nello stimolare la crescita dell'apparato radicale, mentre i trattamenti EM + Hoagland (imbibito e non imbibito), si sono differenziati per il cospicuo sviluppo di radici laterali (Figura 13).



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

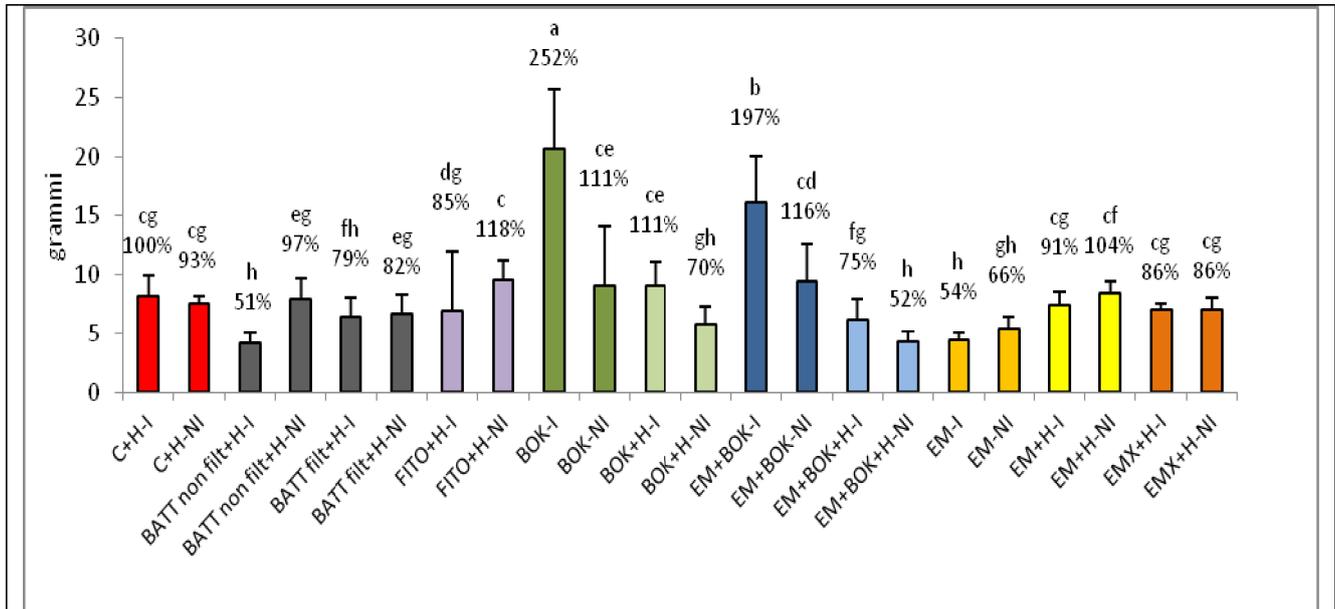


Figura 8. Peso fresco totale della biomassa radicale. Le lettere fra parentesi indicano la significatività per $P < 0,05$ (lettere differenti indicano valori medi statisticamente differenti).

I trattamenti con Bokashi ed EM+Bokashi (entrambi imbibiti) hanno determinato la miglior produzione di biomassa fresca radicale (Figura 8). Gli stessi trattamenti associati alla soluzione nutritiva Hoagland, hanno fatto drasticamente diminuire la produzione di biomassa fresca. Le cause ipotizzabili potrebbero essere essenzialmente due:

- 1) l'eccessiva quantità di nutrienti (ovvero la soluzione nutritiva Hoagland unita al già presente concime Bokashi) può aver limitato lo sviluppo radicale in quanto la pianta disponeva degli elementi nutritivi necessari;
- 2) l'eccessiva quantità di fertilizzante può aver causato uno stress metabolico determinando così un ridotto sviluppo dell'apparato radicale.

I risultati relativi alla produzione di biomassa secca (Figura 9) sono in linea con i dati precedentemente illustrati sulla biomassa fresca. Da rilevare l'effetto dei trattamenti con EM+Hoagland e di EM+Hoagland (imbibito e non imbibito) che determina incrementi medi rispettivamente del 32 e 16,5% rispetto al controllo.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

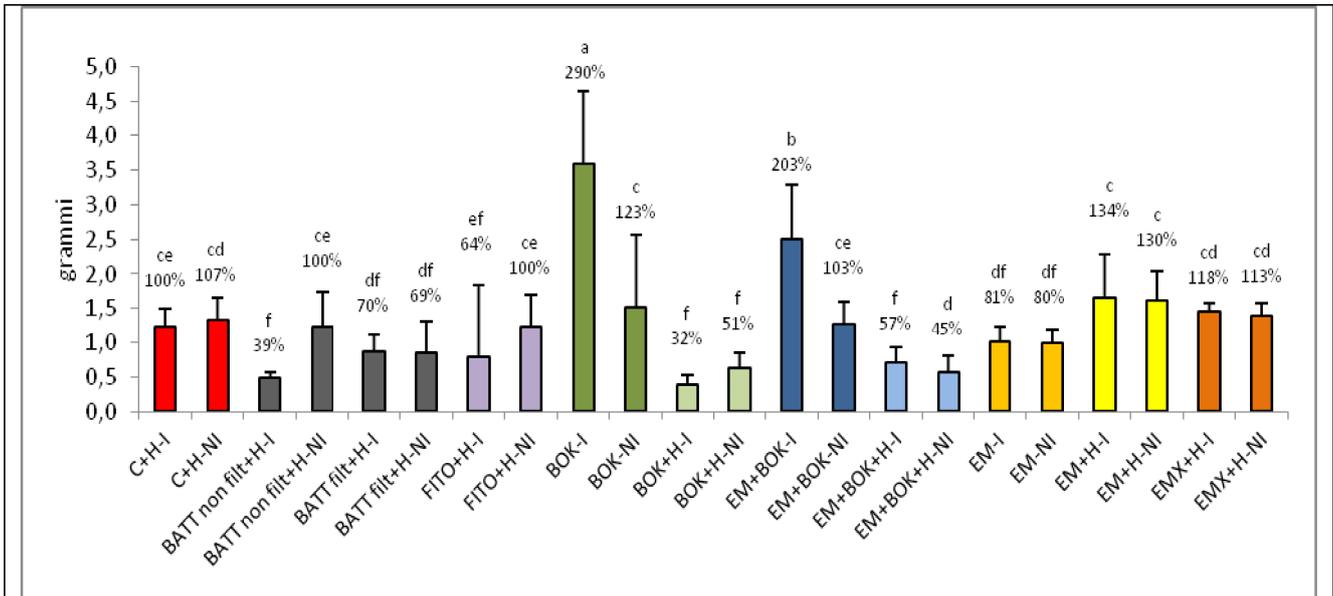


Figura 9. Peso secco totale della biomassa radicale. Le lettere fra parentesi indicano la significatività per $P < 0,05$ (lettere differenti indicano valori medi statisticamente differenti).

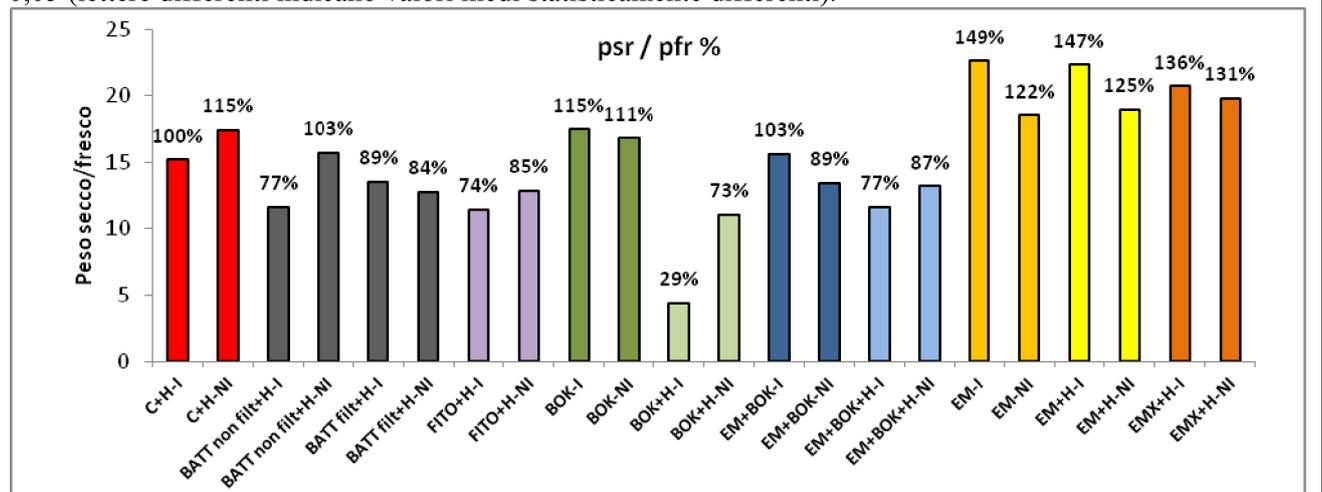


Figura 10. Rapporto % tra il peso secco e il peso fresco dell'apparato radicale.

Rapportando il peso della biomassa secca al peso della biomassa fresca delle radici è possibile notare come gli incrementi maggiori siano stati osservati per i trattamenti contenenti i soli microrganismi efficaci (EM1 e EMX).

1.5 Peli radicali

Al momento della raccolta del loietto una parte delle radici sono state utilizzate per lo studio della densità e della lunghezza dei peli radicali. I peli radicali sono delle estroflessioni della radice che si formano nella zona più giovane di essa, in particolare in prossimità dell'apice. Hanno durata



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

limitata in quanto vengono sostituiti da nuovi peli radicali mano a mano che la radice cresce. La loro sintesi è influenzata dalla disponibilità di elementi nutritivi presenti nel terreno, mentre la loro funzione è quella di aumentare la superficie di assorbimento dell'apparato radicale (Schiefelbein and Somerville, 1990; Bielenberg et al., 2001).

Le determinazioni della densità e della lunghezza dei peli radicali sono state condotte utilizzando il software APS ASSESS 2.0. Le analisi hanno interessato i trattamenti che in termini di lunghezza dell'apparato radicale e di biomassa prodotta avevano fornito le migliori performance, ovvero Bokashi 2 FI e EM+Bokashi, senza l'aggiunta della soluzione nutritiva Hoagland, mentre per il Controllo e EM-1 sono stati selezionati i trattamenti con la Hoagland.

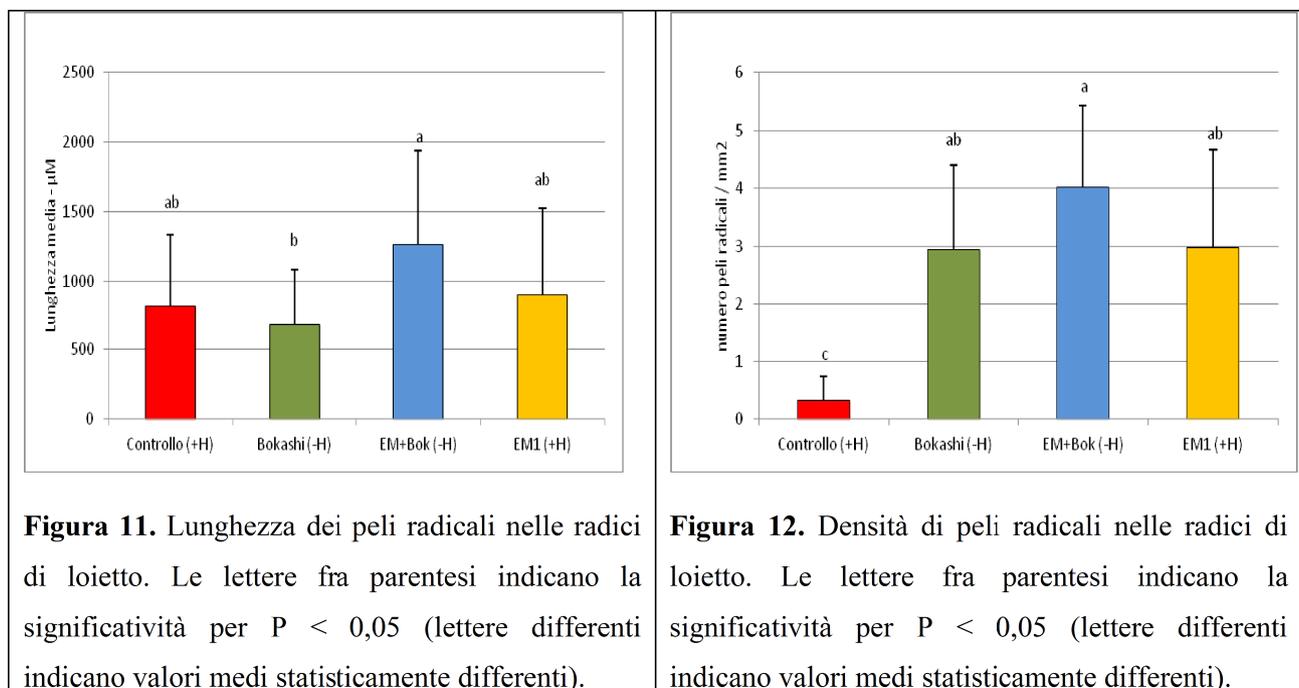


Figura 11. Lunghezza dei peli radicali nelle radici di loietto. Le lettere fra parentesi indicano la significatività per $P < 0,05$ (lettere differenti indicano valori medi statisticamente differenti).

Figura 12. Densità di peli radicali nelle radici di loietto. Le lettere fra parentesi indicano la significatività per $P < 0,05$ (lettere differenti indicano valori medi statisticamente differenti).

Come è possibile notare dai dati illustrati nelle Figure 11 e 12, esiste una notevole variabilità all'interno di ciascun trattamento preso in esame. Per quanto riguarda la lunghezza dei peli radicali (Figura 11), pur rilevando differenze tra i trattamenti, esse non risultano particolarmente rilevanti a causa dell'elevata variabilità osservata all'interno di ciascun trattamento.

Per quanto riguarda invece la densità dei peli radicali, espressa come numero di peli radicali per mm^2 , i trattamenti contenenti EM-1 e/o Bokashi hanno determinato incrementi di circa 10 volte superiori rispetto al controllo non trattato. Tali differenze forniscono un valore aggiunto di notevole



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

importanza alle piante trattate con prodotti derivanti dalla tecnologia EM, in quanto garantiscono una maggiore superficie di assorbimento degli elementi nutritivi.

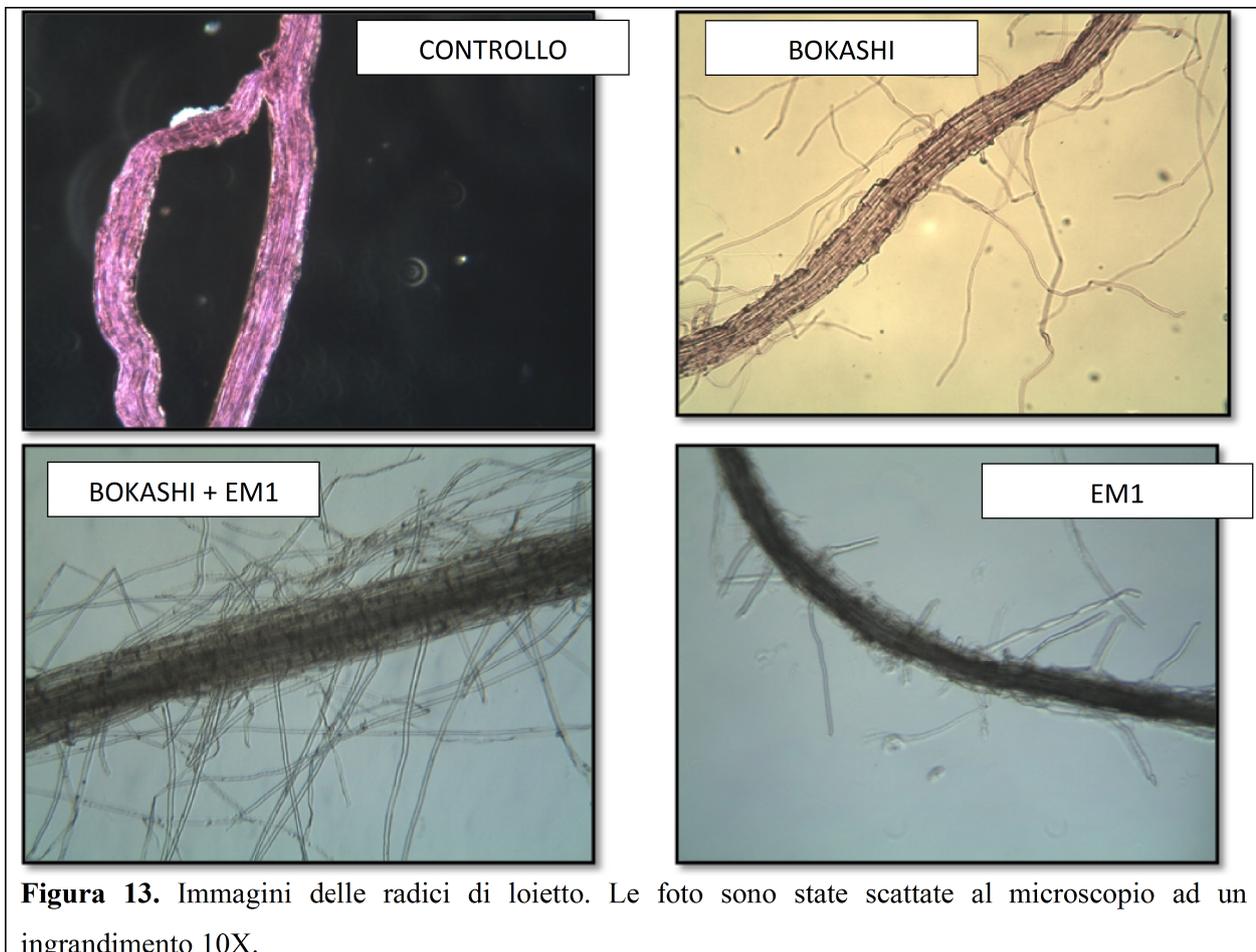


Figura 13. Immagini delle radici di loietto. Le foto sono state scattate al microscopio ad un ingrandimento 10X.

1.7 Colorazione dell'apparato fogliare

L'intensità, la copertura e l'uniformità di colore sono parametri estetici molto importanti nel valutare la qualità di un manto erboso. Il colore dell'apparato fogliare, a pari condizioni pedoclimatiche e di essenza erbosa, può essere influenzato dalla concimazione (elementi nutritivi come azoto e ferro sono fondamentali alla colorazione delle foglie) e dalle comunità microbiche che influenzano il metabolismo della pianta, dalla capacità assimilativa e dalla disponibilità di elementi nutritivi (Berg, 2009).

A 38 giorni dalla semina, ovvero al termine del ciclo di trattamenti, lo sviluppo dell'apparato vegetativo si differenziava chiaramente in 4 grandi gruppi (Figura 14) classificabili in base al trattamento somministrato.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

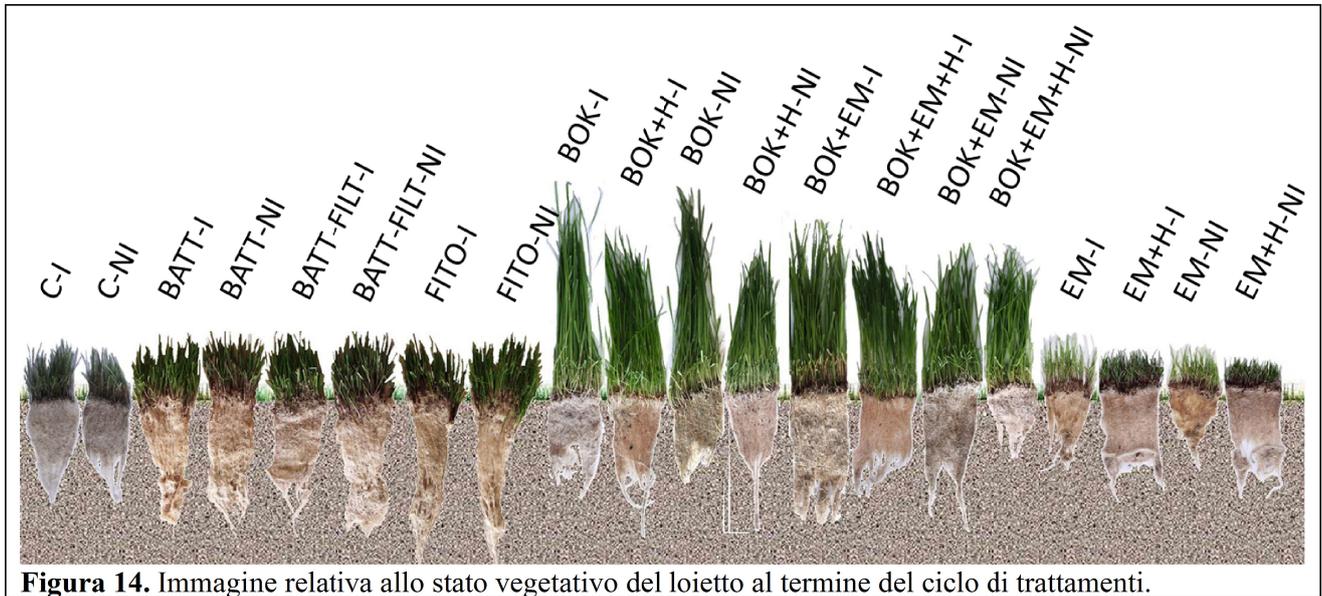


Figura 14. Immagine relativa allo stato vegetativo del loietto al termine del ciclo di trattamenti.

Come visualizzabile in Figura 14, sia l'apparato radicale che l'apparato fogliare del controllo non si presentano in condizioni ottimali (radici eccessivamente sottili e apparato fogliare di colorazione grigiastro). Per quanto riguarda i prodotti commerciali (batteri commerciali e fitormoni), essi hanno determinato uno sviluppo vegetativo sostanzialmente di buona qualità. Il trattamento con Bokashi 2 FI (da solo o in associazione ai microorganismi effettivi), ha determinato un eccessivo sviluppo vegetativo, con conseguenti effetti sulla colorazione fogliare, e un limitato sviluppo dell'apparato radicale. I trattamenti con EM-1 hanno invece garantito un'intensa colorazione, un elevato accostamento e un buono sviluppo dell'apparato radicale, solo se associati con la soluzione nutritiva di Hoagland.

Procedendo con l'analisi della colorazione e dell'intensità del verde, 16 campioni di foglie per ogni trattamento, sono state fotografate con una macchina fotografica ad alta definizione. L'immagine elettronica è stata elaborata tramite il software di analisi di immagine APS ASSESS 2.0.

Una prima elaborazione grafica sulle immagini è stata effettuata analizzando la combinazione dei tre colori primari (rosso, verde e blu), ottenendo, per ogni trattamento e per ogni colore primario un valore medio espresso nello spazio di colori RGB. I valori risultanti da tale analisi sono riportati in Tabella II.

Tabella II. Valore medio dei tre colori primari per i diversi trattamenti in esame.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

TRATTAMENTI	R (ROSSO)	G (VERDE)	B (BLU)
Controllo	62	65	55
Batteri commerciali	56	57	36
Fitormoni	44	44	28
Bokashi	76	91	69
Bokashi + Hoagland	49	64	30
EM + Bokashi	62	70	50
EM + Bokashi + Hoagland	56	71	36
EM1	168	169	171
EM1 + Hoagland	59	62	43

Utilizzando tali valori medi è stato possibile ottenere la combinazione cromatica media (RGB) del tappeto erboso, per i diversi trattamenti in esame (Figura 15).



Figura 15. Gradazione cromatica media per ciascun trattamento (analisi RGB).

L'analisi in RGB effettuata con il software APS ASSESS 2.0, ha mostrato come la colorazione predominante per la maggior parte dei i trattamenti, sia la colorazione verde. Merita sottolineare che per tutti i trattamenti, in associazione con la soluzione nutritiva Hoagland la colorazione verde appare più intensa, mentre nei trattamenti senza soluzione nutritiva, la combinazione di colori restituisce un'immagine più chiara, in particolar modo per il trattamento con EM-1.

Analizzando i valori medi di verde e confrontandoli con la rispettiva scala è possibile valutare l'intensità di colore che le foglie hanno assunto in seguito ai rispettivi trattamenti (Figura 16).



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI



Figura 16. Valori medi di verde per ciascun trattamento in esame (figura in alto) e scala cromatica di riferimento (0 per i colori più scuri fino a 255 per i valori più chiari) (figura in basso).

L'analisi dell'intensità del verde ha permesso di rilevare come i trattamenti con Bokashi ed EM1 determinino una colorazione di verde più chiaro rispetto al controllo, con valori rispettivamente pari a G-91 e G-169. Al contrario i trattamenti con i batteri commerciali e con i fitormoni hanno portato ad una colorazione verde più intensa con valori pari rispettivamente a G-57 e G-44. Interessante il comportamento del trattamento con EM1 che, in associazione con la soluzione nutritiva incrementa notevolmente la sua intensità di colorazione raggiungendo valori di verde pari a G-62. Tutti gli altri trattamenti hanno fatto registrare una colorazione verde prossima ai valori del controllo.

1.7.1 Contenuto di clorofilla

Il contenuto di clorofilla nelle foglie del tappeto erboso è stato determinato con un metodo rapido ed indiretto che sfrutta la correlazione negativa tra il contenuto di clorofilla e l'intensità luminosa del colore verde ottenuto in RGB, secondo quanto riportato da Yadav e Ibaraki (2010).

Tale correlazione permette di determinare un indice quantitativo del contenuto di clorofilla il cui valore assoluto può essere calcolato mediante la formula di Markwell *et al.* (1995) (dati non mostrati).

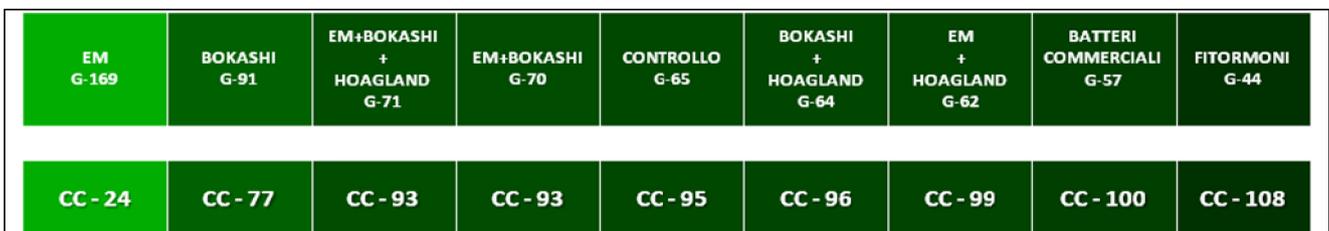


Figura 17. Indice quantitativo del contenuto in clorofilla (CC) nei diversi trattamenti.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

La figura riporta, in ordine crescente, il contenuto di clorofilla (*Chlorophyll Content* – CC) per i diversi trattamenti applicati al loietto. Come si vede valori maggiori di clorofilla si osservano per alcuni dei trattamenti in associazione alla soluzione nutritiva Hoagland in particolare per il trattamento con EM-1 (CC-99), per il trattamento con i batteri commerciali (CC-100) e per il trattamento a base di fitormoni (CC-108). Valori decisamente inferiori si sono osservati per il trattamento Bokashi senza Hoagland (CC-77) ed per EM1 senza Hoagland (CC-24).

1.8 Analisi della flora microbica

1.8.1 Quantificazione microbica

La determinazione quantitativa dei gruppi microbici considerati, lattobacilli, microrganismi aerobi e lieviti, è avvenuta considerando le piastre nelle quali la diluizione della soluzione ha portato allo sviluppo di un numero di colonie compreso tra le 100 e le 250. L'analisi dei risultati, consultabili in Figura 16, indicano che l'attivazione della soluzione madre (M) ha portato ad ottenere una concentrazione di microrganismi confrontabile con quella della soluzione madre, con solo un lieve incremento per gli aerobi coltivati a 22°C e in minima parte per i lieviti. Questo dato è in accordo col fatto che la procedura di attivazione può essere a tutti gli effetti considerata come un “rinfresco” della soluzione madre, mirata all'ottenimento di microrganismi vivi e attivi in una soluzione stabile da un punto di vista microbiologico.

SOLUZIONE M					SOLUZIONE MA				
TERRENO	GRUPPI MICR.	UFC/ml	Log ₁₀ medio	Dev. Std.	TERRENO	GRUPPI MICR.	UFC/ml	Log ₁₀ medio	Dev. Std.
PCA 37°C	AEROBI	7.45 x 10 ⁵	5.9	0.02	PCA 37°C	AEROBI	1.79 x 10 ⁵	5.3	0.04
PCA 22°C	AEROBI	8.70 x 10 ³	4.9	0.00	PCA 22°C	AEROBI	1.56 x 10 ⁵	5.2	0.00
SAB	LIEVITI	6.35 x 10 ⁴	5.7	0.03	SAB	LIEVITI	9.45 x 10 ⁴	5.0	0.03
MRS - A	LATTICI	1.87 x 10 ⁶	6.3	0.01	MRS - A	LATTICI	1.20 x 10 ⁶	6.1	0.00

Figura 18. Risultati delle UFC/ml rilevate per ciascun gruppo microbico considerato, del log₁₀ medio e della deviazione standard per la soluzione Madre (soluzione M) e per la soluzione madre attivata (soluzione MA).



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

1.8.2 Tipizzazione degli isolati

Dall'osservazione allo stereomicroscopio delle colonie scelte per l'isolamento è stato possibile individuare le principali caratteristiche morfologiche dei ceppi isolati. I ceppi presenti su terreni MRS agar risultano caratterizzati da una morfologia a bastoncino e possono essere presuntivamente classificati come batteri lattici. I batteri isolati in TSA presentano anch'essi forma bastoncellare e possono formare gruppi di 2, 3 o più individui. Infine l'osservazione morfologica degli isolati in *Sabouraud* DA conferma la loro appartenenza al gruppo dei lieviti.

L'identificazione fenotipica sui lattobacilli e sui lieviti, condotta mediante l'analisi del profilo di fermentazione e assimilazione di diverse fonti di carbonio mediante i kit API50 CHL[®] e API 20-C-AUX[®], ha permesso una preliminare identificazione a livello di specie degli isolati microbici, come riportato in Tabella III e IV.

Tabella III: Identificazione a livello di specie dei lattobacilli sulla base del profilo metabolico elaborato dall'APIWEB[®] e grado di probabilità dell'appartenenza alla specie.

CEPPO	Identificazione %
LA 1	nd
LA 2	<i>Lactobacillus brevis</i> 3 (94,0%)
LA 3	<i>Lactobacillus brevis</i> 2 (95,1%)
LA 4	nd
LA 5	nd
LA 6	<i>Lactobacillus brevis</i> 2 (99,9%)
LA 7	<i>Lactobacillus buchneri</i> (94,9%)
LA 8	<i>Lactobacillus brevis</i> 3 (99,7%)
LA 9	<i>Lactobacillus brevis</i> 2 (99,9%)
LA 10	<i>Lactobacillus brevis</i> 3 (99,8%)
LA 11	<i>Lactobacillus brevis</i> 3 (78,9%)



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

LA 12	<i>Lactobacillus brevis</i> 3 (97,3%)
<i>L. brevis</i> ATCC 14869	<i>Lactobacillus brevis</i> 3 (99,7%)
<i>L. buchneri</i> 4005	<i>Lactobacillus buchneri</i> (95.4%)

Tabella IV. Identificazione a livello di specie dei lieviti sulla base del profilo metabolico elaborato dall'APIWEB e grado di probabilità dell'appartenenza alla specie.

CEPPO	Identificazione %
L 1	<i>Candida utilis</i> (99.8%)
L 2	<i>Candida utilis</i> (94.8%)
L 3	<i>Candida utilis</i> (97.3%)
L 4	<i>Candida krusei/inconspicua</i> (84.5%)

Infine, in seguito all'estrazione del DNA è stato possibile effettuare analisi di tipo molecolari che hanno permesso di ascrivere i lattobacilli prevalentemente alle specie *L. brevis* e *L. buchneri*; e di identificare i lieviti come *Candida utilis* e *Candida krusei/inconspicua*. Tutte queste specie sono conosciute per le attività di biocontrollo nei confronti di patogeni alimentari e fitopatogeni e, oltre a produrre metaboliti utili, sono anche in grado di svolgere potenzialmente un'azione protettiva verso i tessuti vegetali.

1.8.3 Analisi della flora microbica dalle radici e dal suolo

La quantità di DNA estratta dal suolo presentava valori decisamente bassi, probabilmente per il fatto che al momento della semina si è scelto di utilizzare un substrato sterile e di non facile colonizzazione per via dello scarso contenuto in elementi nutrizionali.

I risultati della determinazione quantitativa dei lattobacilli presenti nei campioni di radice avvenuta mediante *real - time* PCR sono riportati in Errore: sorgente del riferimento non trovata V.

Tabella V. Risultati della concentrazione di lattobacilli totali nei campioni di radice fresca e secca (a sinistra), mediante *real - time* PCR.

RADICI	Lattobacilli totali radice fresca log ₁₀ UFC/g	Dev. Std.	Lattobacilli totali radice secca log ₁₀ UFC/g
--------	--	--------------	---



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

CONTR	2.021	0.024	1.232
BOK	6.109	0.058	5.304
EM+BOK	5.781	0.041	4.847
EM	6.588	0.036	5.694
EMX	5.792	0.065	4.924
BATT COMM	5.913	0.064	5.001

Le determinazioni quantitative rispecchiano in parte le aspettative; infatti, tutte le prove a cui si è addizionata la miscela contenete microrganismi benefici presentano valori di concentrazione dei lattobacilli totali di oltre tre ordini di grandezza superiori al controllo.

I profili delle comunità microbiche ottenuti mediante DGGE evidenziano una maggior complessità in termini di numero di specie presenti nelle radici trattate rispetto al controllo non trattato (dati non mostrati).



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

2. COLTURE ORTICOLE: POMODORO IN PIENO CAMPO

Al fine di valutare l'effetto delle condizioni del suolo sulla resa produttiva e sulla qualità di una coltura orticola, quale il pomodoro, è stata effettuata una prova in pieno campo, presso l'Azienda Agricola Biodinamica "Podere Santa Croce" in località Argelato. La prova è stata condotta secondo uno schema sperimentale a blocchi randomizzati e replicato 3 volte. Per la prova sono state poste a confronto le tesi sperimentali riportate in Tabella VI.

Tabella VI: Trattamenti applicati e loro sigla identificativa.

N° TESI	TRATTAMENTO	SIGLA IDENTIFICATIVA
1°	Controllo (solo acqua)	CONTR
2°	Controllo trattato con prodotti biodinamici comuni	BIODIN
3°	Prodotti biodinamici + EM5 (1:500) + Polvere di ceramica EM-X Super Cera C Hakko (1%);	BIODIN + EM
4°	Bokashi 2 Fl + EM-5 (1:500) + Polvere di ceramica EM-X Super Cera C Hakko (1%).	BOK + EM

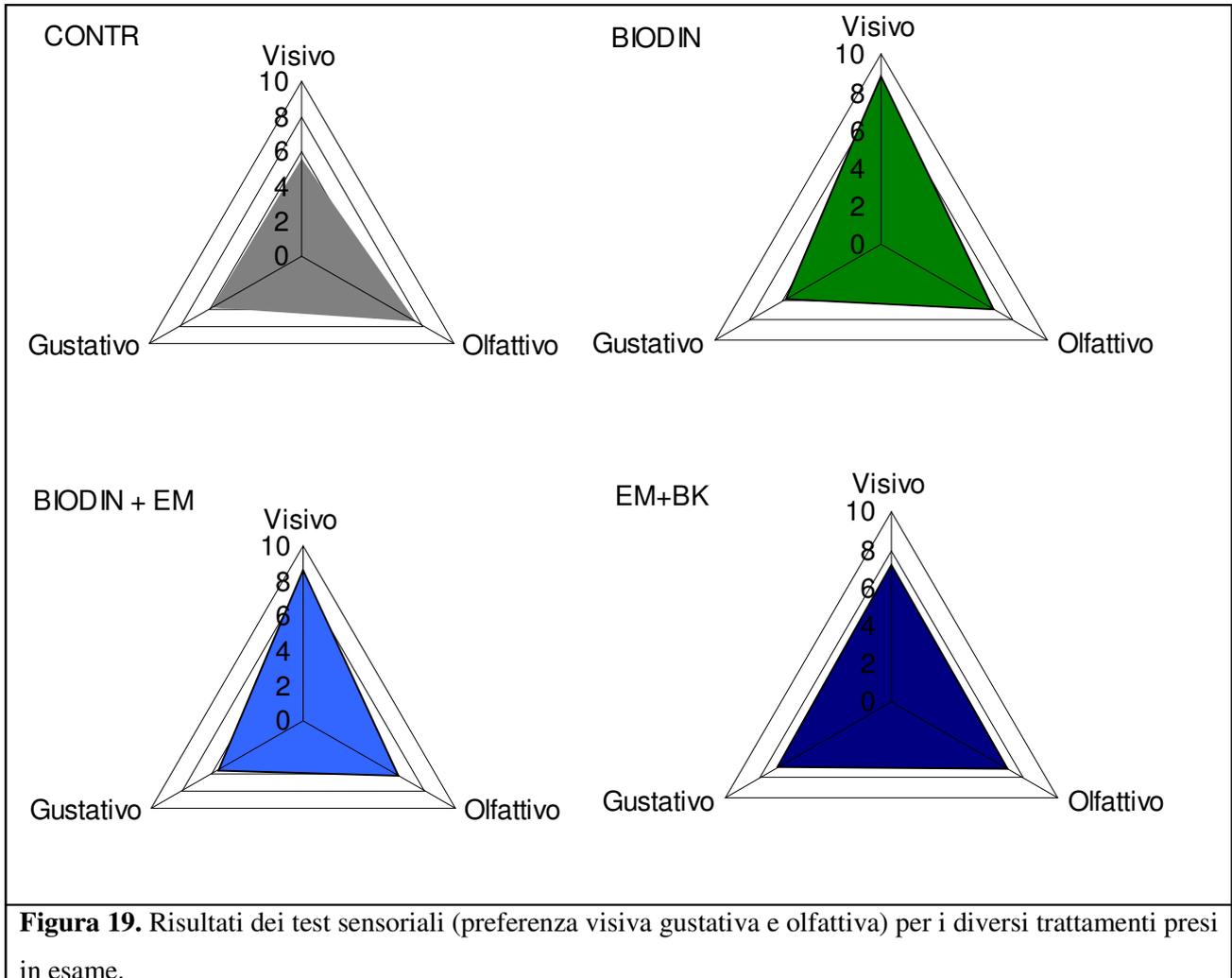
Al termine della prova, l'efficacia dei trattamenti é stata determinata prendendo in analisi parametri sia di tipo produttivo che di tipo qualitativo.

2.1 Analisi sensoriale

Il test di accettazione sensoriale è stato svolto su scala di laboratorio (Stone & Sidel, 1985). Lo scopo è stato quello di individuare l'effetto dei diversi trattamenti in termini di livello massimo d'accettazione sensoriale, riguardo a caratteristiche visive, odorose e gustative. Un gruppo di 20 inesperti (10 maschi e 10 femmine fra i 25 e i 40 anni, impiegati) è stato utilizzato per il test. Innanzitutto è stata effettuata una valutazione visiva ed olfattiva; successivamente i giudici hanno assaggiato i frutti ed assegnato un livello complessivo di gradimento. Ciascun assaggiatore ha utilizzato una scala di 9 punti, dove "1" indicava il livello minimo di accettazione, "9" il livello massimo di gradimento, mentre "5" indicava indifferenza.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI



Come è possibile osservare in Figura 19, in termini di preferenza visiva i risultati migliori sono stati ottenuti con il trattamento Biodinamico, sia da solo che in associazione con gli EM. Per quanto riguarda la preferenza odorosa, i punteggi più elevati sono stati ottenuti dal controllo, mentre per la preferenza gustativa il trattamento contenente EM + Bokashi 2 FI si è differenziato positivamente dagli altri trattamenti presi in esame. Complessivamente, l'analisi sensoriale non ha quindi fornito, per nessun trattamento, chiare indicazioni di preferenza da parte della giuria.

2.2 Resa produttiva



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

Complessivamente la resa produttiva per tutti i trattamenti in esame è risultata di 2 - 3 volte superiore rispetto al controllo trattato con acqua. Rispetto al trattamento biodinamico, invece, il trattamento BOK + EM permette di incrementare le rese di circa il 20%, mentre il trattamento con EM associato al trattamento biodinamico determina una riduzione delle rese produttive di circa il 10% (Tabella VII).

Tabella VII. Dati produttivi della prova di campo. Le lettere fra parentesi indicano la significatività per $P < 0,05$ (lettere differenti indicano valori medi statisticamente differenti).

TRATTAMENTO	RESA TOTALE (Kg)	NUM. TOTALE DI FRUTTI	RESA MEDIA per PIANTA (Kg)	PESO MEDIO del FRUTTO (g)	NUM. MEDIO DI FRUTTI PER PIANTA
CONTR	44,23 (c)	774 ± 8,0 (c)	0,79 ± 0,48 (b)	51,6 ± 18,7 (b)	14,4 ± 7,2 (b)
BIODIN	101,67 (ab)	1607 ± 12,2 (ab)	1,85 ± 0,71 (a)	66,4 ± 9,4 (a)	27,3 ± 7,9 (a)
BIODIN + EM	92,05 (b)	1566 ± 10,2 (b)	1,59 ± 0,89 (a)	64,7 ± 16,1 (ab)	23,5 ± 7,6 (a)
BOK + EM	123,80 (a)	1897 ± 11,7 (a)	1,96 ± 1,14 (a)	74,5 ± 15,3 (a)	25,3 ± 12,1 (a)

Per quanto riguarda invece il numero totale di bacche prodotte, si conferma nuovamente quanto già descritto per il parametro "resa totale": i trattamenti BIODIN; BIODIN + EM e BOK + EM hanno assicurato una produzione di bacche più che doppia rispetto al controllo, mentre, rispetto al trattamento con soli prodotti biodinamici, il trattamento con Bokashi ha determinato un incremento nella produzione di bacche pari a circa il 18% (Tabella VII).

Non sono emerse differenze statisticamente significative tra i trattamenti (BIODIN; BIODIN + EM e BOK + EM) per quanto riguarda il numero medio di bacche per pianta, il peso medio del frutto e la resa media per pianta; mentre tali differenze risultano invece significative se confrontate con il controllo trattato con acqua (Tabella VII).

2.3 Caratteristiche qualitative

Per ciascun parametro in esame (pH, solidi solubili totali, acidità titolabile totale, DPPH, polifenoli totali, carotenoidi totali e contenuto in licopene) sono state analizzate 10 repliche per trattamento.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

I campioni sono stati analizzati per le caratteristiche qualitative riguardanti i solidi solubili totali (TSS), l'acidità titolabile totale (TA) e il pH. Il contenuto in solidi solubili è stato calcolato mediante rifrattometro, utilizzando il saccarosio per la calibrazione ed i risultati sono stati espressi in °Brix. Non si osservano differenze significative tra il controllo e i trattamenti contenenti prodotti derivanti dalla tecnologia EM (BIODIN + EM e BOK + EM) (Tabella VIII). Il trattamento con i prodotti biodinamici ha invece fatto registrare una significativa diminuzione del contenuto in solidi solubili (-13% rispetto al controllo). I dati ottenuti risultano in generale accordo con i valori riportati in letteratura (Caliman *et al.*, 2010). Per il pH, i cui valori sono risultati compresi tra $4,36 \pm 0,08$ e $4,43 \pm 0,11$, non si sono osservate differenze significative tra i trattamenti (Tabella VIII).

Tabella VIII. Contenuto in solidi solubili, acidità totale e valori di pH e Maturity Index ottenuti per i diversi trattamenti presi in esame. I risultati sono espressi come media per ciascun trattamento \pm deviazione standard. Le lettere fra parentesi indicano la significatività per $P < 0,05$ (lettere differenti indicano valori medi statisticamente differenti). Abbreviazioni: TSS, solidi solubili totali; TA, acidità titolabile; CA, acido citrico.

TRATTAMENTO	pH	TSS (° BRUX)	TA (g CA/100 g FW).	MATURITY INDEX (TSS/TA)
CONTR	$4,40 \pm 0,14$ (a)	$5,05 \pm 0,76$ (a)	$0,32 \pm 0,05$ (a)	$15,66 \pm 2,02$ (b)
BIODIN	$4,36 \pm 0,08$ (a)	$4,36 \pm 0,45$ (b)	$0,29 \pm 0,04$ (b)	$15,31 \pm 2,36$ (b)
BIODIN + EM	$4,40 \pm 0,08$ (a)	$5,32 \pm 0,34$ (a)	$0,27 \pm 0,02$ (b)	$19,45 \pm 1,77$ (a)
BOK + EM	$4,43 \pm 0,11$ (a)	$5,24 \pm 0,28$ (a)	$0,27 \pm 0,02$ (b)	$19,69 \pm 2,08$ (a)

L'acidità totale è stata calcolata attraverso titolazione con idrossido di sodio 0.1 N fino al raggiungimento di un valore di pH pari a 8,1. I risultati sono stati calcolati in grammi di acido citrico equivalente, che rappresenta il principale acido organico presente nella pomodoro, ed espressi per 100 grammi di frutto (g CA/100 g FW). I valori di acidità risultano leggermente inferiori rispetto ai dati pubblicati in letteratura, presumibilmente per il fatto che le determinazioni sono state effettuate a maturazione completa del frutto, ovvero quando i valori di acidità totale iniziano a diminuire (Davies *et al.*, 1981; Hobson *et al.*, 1987). Va comunque evidenziato che, per



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

tutti i trattamenti in esame, è stata osservata una lieve ma significativa diminuzione rispetto al controllo negativo (Acqua) (Tabella VIII).

Nella pomodoro, un gusto apprezzabile e ben bilanciato è dato da un rapporto tra contenuto in zuccheri (TSS) e contenuto in acidi (TA) superiore a 10 (Kader *et al.*; 1978; Mencarelli and Saltveit, 1988), come osservato per tutti i trattamenti in esame e per il controllo. Tuttavia, valori contenuti di acidità totale, associati a valori elevati di solidi solubili, sono spesso associati ad una perdita di aroma e di sapore (Opiyo and Ying, 2005). Tale combinazione si evidenzia soprattutto nei frutti trattati con prodotti EM (BIODIN + EM e BOK + EM) che determinano valori di Maturity Index superiori a 19, con incrementi del 25% rispetto al controllo negativo (acqua) e positivo (prodotti biodinamici) (Tabella VIII).

2.4 Attività antiossidante e contenuto in polifenoli, carotenoidi e licopene

Le proprietà antiossidanti della pomodoro sono legate all'elevato contenuto in polifenoli, flavonoidi, vitamina C e numerosi altri composti dotati di attività antiradicalica. I radicali liberi sono molecole caratterizzate da elevata reattività, che tendono a captare un atomo di idrogeno da altre molecole innescando una catena ossidativa lesiva che si colloca alla base dei processi di invecchiamento cellulare e favorisce l'insorgenza di tumori, arteriosclerosi e ipertensione. Le linee guida sulla nutrizione raccomandano un adeguato consumo nella dieta di alimenti caratterizzati da elevato contenuto in antiossidanti, per contrastare l'azione dannosa dei radicali liberi. L'attività antiossidante del pomodoro è stata determinata secondo la metodica descritta da Brand-Williams *et al.* (1995). Il DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) è un radicale libero che simula l'attività dannosa dei radicali ossigenati presenti nelle cellule umane. In seguito ad una reazione di tale radicale con composti antiossidanti presenti nell'estratto del campione, si verifica una decolorazione misurabile allo spettrofotometro e proporzionale al contenuto in antiossidanti.

Per quanto riguarda i trattamenti in esame, l'attività antiossidante non ha mostrato differenze significative. Merita però sottolineare che tale dato, così come i dati che andremo successivamente a discutere (contenuto in polifenoli, in carotenoidi e in licopene) risentono notevolmente dell'elevata variabilità osservata tra le repliche analizzate per ciascun trattamento.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

Tabella VIII. Attività antiossidante, contenuto in polifenoli, carotenoidi e licopene per i diversi trattamenti presi in esame. I risultati sono espressi come media per ciascun trattamento \pm deviazione standard. Le lettere fra parentesi indicano la significatività per $P < 0,05$ (lettere differenti indicano valori medi statisticamente differenti; ns = non significativo)

TRATTAMENTO	DPPH ($\mu\text{mol trolox}/100\text{g FW}$)	POLIFENOLI TOTALI ($\text{mg}/100\text{ g FW}$)	CAROTENOIDI TOTALI ($\text{mg}/100\text{ g FW}$)	LICOPENE ($\text{mg}/100\text{ g FW}$)
CONTR	0,85 \pm 0,27 (ns)	28,34 \pm 7,38 (ns)	3,01 \pm 0,07 (ns)	2,69 \pm 0,05 (ns)
BIODIN	0,81 \pm 0,16 (ns)	30,68 \pm 3,89 (ns)	3,03 \pm 0,09 (ns)	2,75 \pm 0,05 (ns)
BIODIN + EM	0,85 \pm 0,34 (ns)	28,87 \pm 7,55 (ns)	3,05 \pm 0,14 (ns)	2,77 \pm 0,11 (ns)
BOK + EM	0,81 \pm 0,16 (ns)	23,76 \pm 3,15 (ns)	3,00 \pm 0,10 (ns)	2,70 \pm 0,08 (ns)

Per quanto riguarda il contenuto in polifenoli, carotenoidi e licopene, i dati ottenuti risultano in generale accordo con i valori riportati in letteratura (Martinez -Valverde *et al.*, 2002; Ahmed *et al.*, 2010). Anche in questo caso, non si sono osservate differenze significative tra i trattamenti. Tale risultato è in linea con quanto presentato dalla letteratura in quanto è ampiamente dimostrato che, in pomodoro, l'attività antiossidante è principalmente correlata al contenuto in composti fenolici (polifenoli) e al contenuto in carotenoidi (Sanchez-Moreno *et al.*, 2006; Martinez -Valverde *et al.*, 2002).

2.5 Analisi della qualità del pomodoro mediante la tecnica di cristallizzazione sensibile

La tecnica della cristallizzazione sensibile permette di analizzare il sistema di forze (etere di vita, etere chimico, etere di luce, etere di calore) e di relazioni che si manifestano attraverso il campo morfogenetico tipico ed esclusivo di ogni essere vivente. L'immagine dei cristalli al microscopio consente di analizzare il numero e la lunghezza delle formazioni principali (ramificazioni) e secondarie (diramazioni), la misurazione dei loro angoli di incidenza così come la valutazione nello spazio della cristallizzazione. Questa tecnica presenta però diverse difficoltà per un limite intrinseco dovuto alla difficoltà nell'estrapolare dati matematico-geometrici all'interno di un certo range di omogeneità, che permetterebbero un'analisi oggettiva e statisticamente accettabile, necessaria in campo scientifico.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

Al fine di determinare l'effetto del prodotto EM da un punto di vista prettamente "biodimanicosteineriano" l'esperimento è stato condotto sia con la tecnica della cristallizzazione delle gocce, sia con la cristallizzazione sensibile.

2.5.1 Cristallizzazione delle gocce

Allo scopo di determinare la cristallizzazione dall'estratto di semi di pomodoro, 5 semi di pomodoro (puliti ed asciutti) sono stati messi in acqua ultrapura per 1 ora. Le gocce ottenute dall'essudato sono state messe sui vetrini e fotografate in ingrandimenti 40 e 100 X. L'esperimento è stato ripetuto 4 volte con 5 immagini per campione.

2.5.2 Cristallizzazione sensibile

Al fine di determinare la cristallizzazione sensibile sono stati diluiti 10 grammi di ogni campione in 100 ml di acqua distillata. La soluzione per la cristallizzazione è stata preparata con un estratto acquoso di cloruro di rame al 10%, con un rapporto tra il prodotto e il cloruro di rame di 1:1 per ogni piastra. Le piastre (3 ripetizioni per ogni trattamento) sono state messe nella cabina di cristallizzazione per 18 ore a 30° C. Dopo la cristallizzazione le piastre sono state fotografate.

2.5.3 Risultati

I due metodi di analisi hanno dato risultati simili. I campioni ottenuti da pomodori trattati con la sola acqua hanno creato in entrambe le analisi immagini che possono essere giudicate come le più deboli. I campioni ottenuti dai trattamenti 2, 3, e 4 hanno invece creato immagini decisamente più forti. In particolare, tra questi, il campione 3 sembra essere il migliore. Le immagini dei campioni ottenuti dai trattamenti 1 e 2 sembrano mostrare alcune differenze rispetto ai campioni ottenuti dai trattamenti 3 e 4. Infatti nei campioni 1 e 2 predominano le forme sottili con la tecnica della cristallizzazione sensibile e tratti dritti con la cristallizzazione delle gocce. Un risultato diverso è stato mostrato dai campioni 3 e 4, in cui la cristallizzazione sensibile ha evidenziato forme decise e la tecnica della cristallizzazione delle gocce ha mostrato forme di tipo vegetale (con curve ramificazioni).



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

Tabella IX. Descrizione delle caratteristiche delle immagini provenienti dalle due analisi applicate: cristallizzazione sensibile e cristallizzazione delle gocce.

TRATTAMENTO / ANALISI	CONTR (campione 1)	BIODIN (campione 2)	BIODIN + EM (campione 3)	BOK + EM (campione 4)
CRISTALLIZZAZIONE SENSIBILE (IMMAGINI MOSTRATE IN FIGURA 20)	Forme molto sottili e poco visibili. Povera copertura cristallina. Spazi scoperti.	Alcuni tratti cristallini decisi che partono dal centro. La copertura cristallina è migliore rispetto al controllo.	L'immagine è ben integrata. La copertura cristallina è ben sviluppata e piena.	Ci sono tratti cristallini decisi. La copertura cristallina è debole e ci sono spazi scoperti dai cristalli.
CRISTALLIZZAZIONE DELLE GOCCE (IMMAGINI MOSTRATE IN FIGURA 21)	Pochi cristalli creati da tratti dritti.	Cristalli più numerosi rispetto al controllo, creati da tratti dritti e forme morbide di tipo vegetale.	Numerosi cristalli caratterizzati da forme morbide.	Cristalli più numerosi rispetto al controllo, creati da forme morbide.
CONSIDERAZIONI COMPLESSIVE	Campione decisamente debole	Campione intermedio	Campione forte	Campione intermedio



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

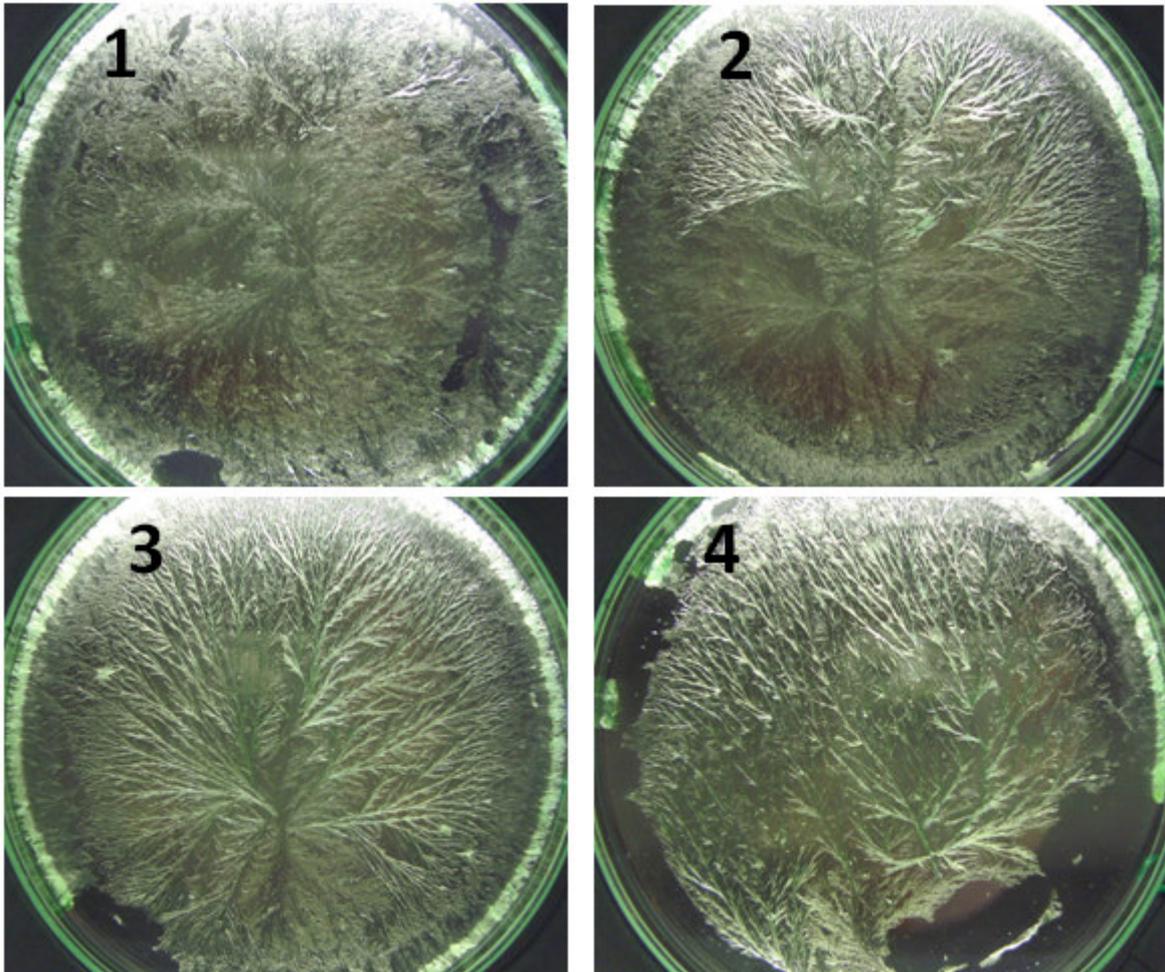


Figura 10: Immagini ottenute mediante la tecnica di cristallizzazione sensibile



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

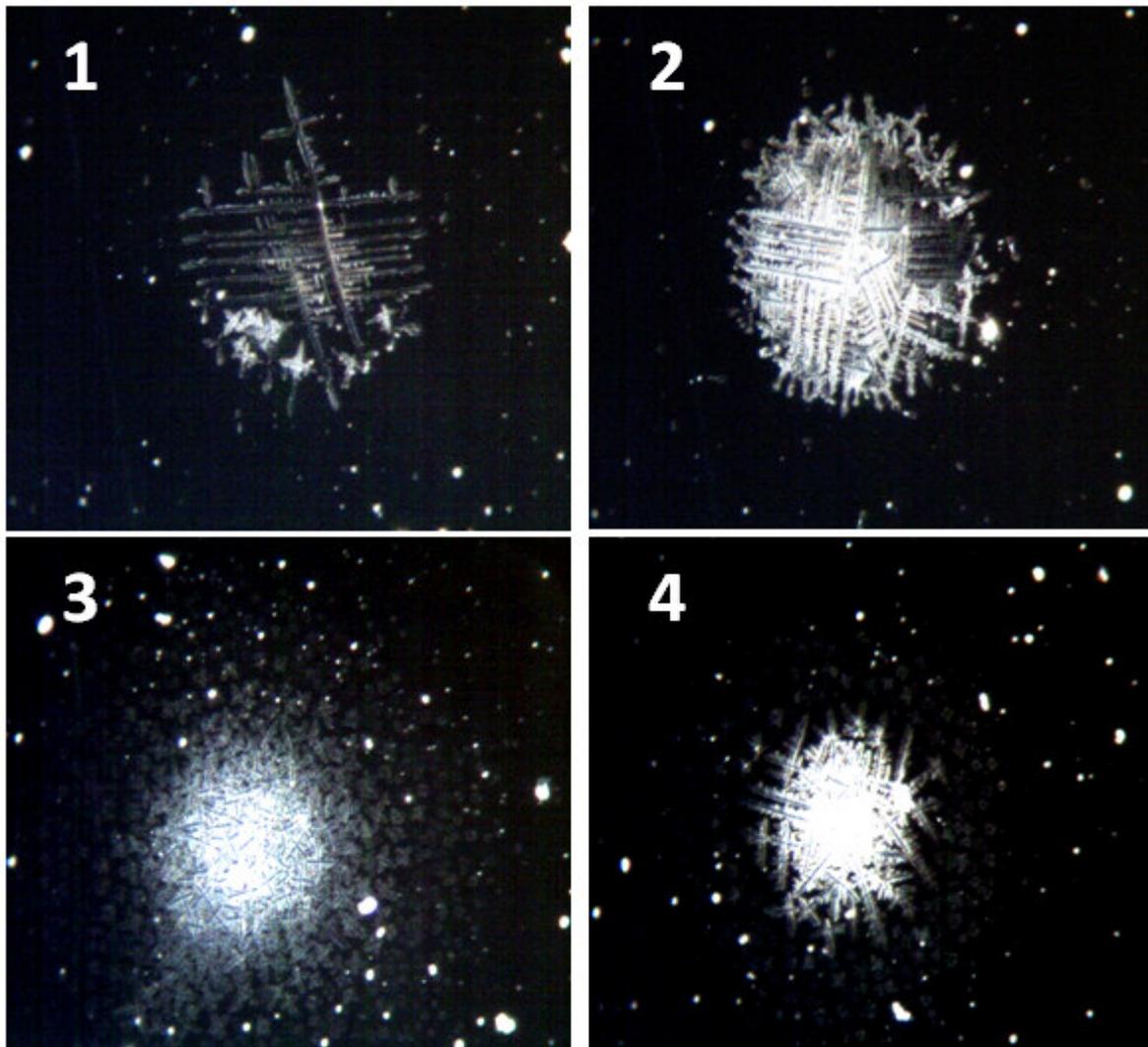


Figura 21: Immagini ottenute mediante la tecnica di cristallizzazione delle gocce



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

3. COLTURE CEREALICOLA: FRUMENTO IN PIENO CAMPO

Obiettivo della ricerca è stato quello di valutare l'utilizzo dei prodotti EM come antagonisti degli agenti patogeni del genere *Fusarium* spp, per contrastarne la diffusione, diminuendo così la concentrazione di micotossine nel prodotto raccolto.

Il problema delle micotossine, infatti, risulta essere particolarmente rilevante soprattutto per le produzioni di cereali in sistemi agricoli a basso input, quali ad esempio il regime biologico e biodinamico, a causa dell'impossibilità di utilizzare fungicidi e quindi di controllare i miceti del genere *Fusarium*, principali produttori di tossine.

Lo studio è stato effettuato utilizzando una cultivar di grano duro (cv. Simeto), coltivata presso l'Azienda Sperimentale di Cadriano dell'Università di Bologna. La prova è stata condotta secondo uno schema sperimentale a blocchi randomizzati e replicato 4 volte.

Tabella X: Trattamenti applicati e relativa tempistica dei trattamenti. Abbreviazioni: DBI = *Days Before Inoculation*; DAI = *Day After Inoculation*; WAI = *Weekly After Inoculation*

SIGLA	TRATTAMENTO	TEMPISTICA TRATTAMENTI			
		6 DBI	2 DBI	1 DAI	WAI
CONTROLLO POSITIVO	Controllo inoculato e non trattato				
CONTROLLO NEGATIVO	Controllo non inoculato				
BASF	Trattamento con il prodotto fungicida BASF		✓		
EM5 (1:500)	EM5 (1:500) + Polvere di ceramica EM-X Super Cera C Hakko (1%)	✓	✓	✓	✓
EM5 (1:100)	EM5 (1:100) + Polvere di ceramica EM-X Super Cera C Hakko (1%)	✓	✓	✓	

Allo stadio iniziale di fioritura le spighe di grano sono state inoculate con un mix di *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* (principali agenti patogeni della fusariosi della spiga), ad eccezione delle parcelle del controllo negativo, sulle quali verranno rilevati gli effetti della diffusione naturale della fusariosi. Trattamenti preventivi con i prodotti EM (EM5-1:100 e EM5-1:500) sono stati eseguiti 6 e 2 giorni prima dell'inoculo (*Days Before Inoculation*), mentre il trattamento con il prodotto fungicida BASF è stato eseguito, come suggerito dalla ditta fornitrice, 48 h prima dell'inoculo. A 24h dall'inoculo (*1 Day After Inoculation*), sono stati nuovamente

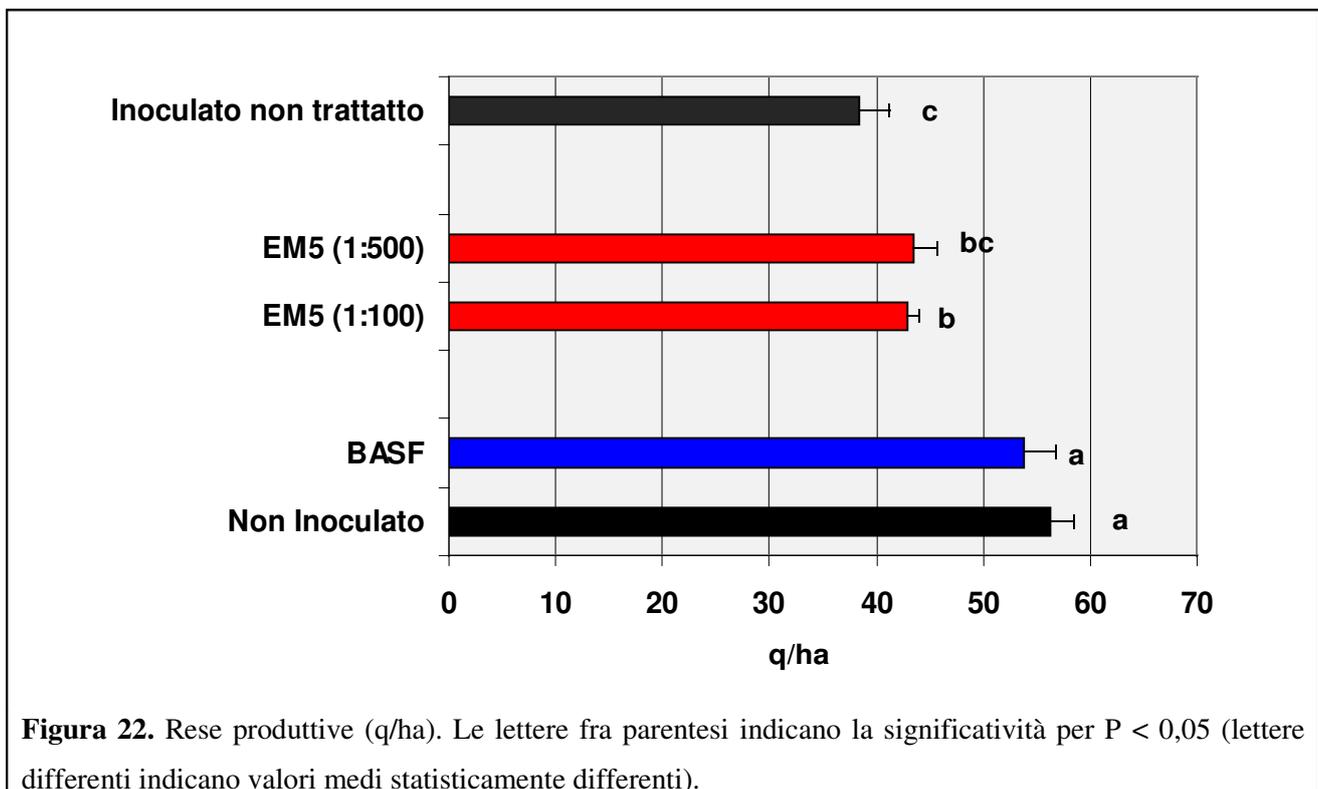
ALMA MATER STUDIORUM • UNIVERSITA' DI BOLOGNA



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI
eseguiti i trattamenti con entrambi i prodotti EM (EM5-1:100 e EM5-1:500). Il trattamento EM5 (1:500) è poi proseguito, con cadenza settimanale (*Weekly After Inoculation*), fino al momento della raccolta. La tempistica dettagliata di ciascun trattamento è riportata in Tabella X.
Al termine della prova, l'efficacia dei trattamenti é stata determinata prendendo in analisi parametri sia di tipo produttivo che di tipo qualitativo (contenuto in micotossine, peso ettolitrico).

3.1 Resa produttiva

Come atteso, il controllo negativo ha fornito le rese produttive più elevate ($56,25 \pm 2,29$ q/ha) in quanto su tali parcelle non è stato effettuato l'inoculo artificiale con *F. graminearum* e *F. culmorum*.



Altrettanto elevate sono state le rese medie ottenute sulle parcelle trattate con il prodotto fungicida BASF ($53,82 \pm 3,04$ q/ha), che ha permesso di minimizzare l'effetto causato dall'infezione artificiale. Per le parcelle inoculate e non trattate, invece, le riduzioni produttive rispetto al controllo non inoculato hanno superato il 30%, confermando così un'elevata incidenza del trattamento artificiale. Infine, per le parcelle trattate con i prodotti EM (EM5-1:100 e EM5-1:500), si sono



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

osservate rese medie produttive statisticamente inferiori rispetto alle parcelle non inoculate e alle parcelle trattate con BASF, ma superiori rispetto al controllo inoculato e non trattato. Dall'analisi di tali risultati è quindi possibile ipotizzare un'efficacia del trattamento EM nel contenere lo sviluppo e la diffusione della fusariosi del grano.

3.2 Caratteristiche qualitative: peso ettolitrico e contenuto in micotossine

Per quanto riguarda il peso ettolitrico, non si sono osservate differenze significative né rispetto al controllo, né tra i diversi trattamenti (dati non mostrati).

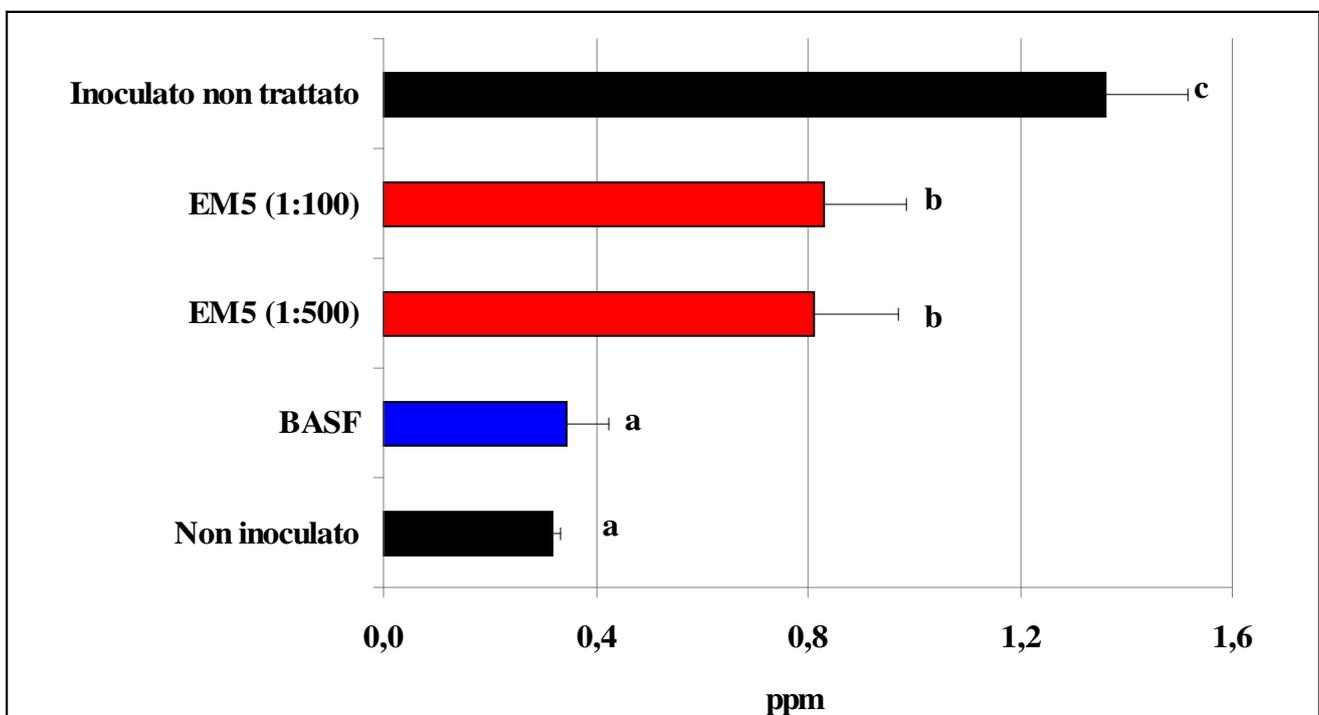


Figura 22. Contenuto in micotossine (ppm). Le lettere fra parentesi indicano la significatività per $P < 0,05$ (lettere differenti indicano valori medi statisticamente differenti).

Per la determinazione del contenuto in micotossine, la presenza di micotossine è stata valutata utilizzando il test quantitativo ELISA AgraQuant®DON (Romer Labs). In Figura 22 vengono riportati i valori medi di micotossine, espressi in ppm, ottenuti per ciascun trattamento. Va inoltre ricordato che la concentrazione limite fissata dal Reg. CE N. 1126/2007 per cereali non trasformati è pari a 1,250 ppm. Il controllo inoculato e non trattato ha fatto registrare le concentrazioni di micotossine maggiori rispetto agli altri trattamenti presi in esame, con valori di poco inferiori al limite massimo previsto dall'Unione Europea ($1,20 \pm 0,38$ ppm). Per quanto riguarda il controllo



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

non inoculato, il contenuto medio in micotossine è risultato pari a $0,32 \pm 0,02$ ppm; tale dato risulta un indice importante per la valutazione dell'incidenza naturale del fungo patogeno. Valori medi statisticamente uguali si sono ottenuti nelle parcelle trattate con il prodotto chimico BASF, che, come noto, assicura un ottimo controllo del patogeno, contenendo così anche la produzione di micotossine. Infine, entrambi i trattamenti effettuati con i prodotti EM hanno dimostrato un'azione positiva nel contrastare la diffusione degli agenti patogeni del genere *Fusarium* spp, facendo registrare una concentrazione media di micotossine pari a $0,82 \pm 0,15$ ppm.

I risultati ottenuti, pur essendo del tutto incoraggianti, dovranno essere nuovamente confermati da ulteriori prove da svolgersi sia in campo che in ambiente controllato, al fine di poter meglio chiarire il meccanismo d'azione dei prodotti EM.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROAMBIENTALI

4. Bibliografia citata

- Ahmed L *et al.*, 2011. Food Chemistry, 24:1451-1457.
- Barrs HD and Weatherley PE, 1962. Australian Journal of Biological Sciences, 15:413-428.
- Bielenberg M *et al.*, 2001. Plant, Cell and Environment, 24:459-467.
- Brand-Williams W *et al.*, 1995. Food Science and Technology, 28:25-30.
- Canaway PM, 1985. In: Proc. 5th Int. Turfgrass Res. Conf., Avignon, France (Ed. F. Lemaire), INRA, Paris, 45-56.
- Caseiro RF *et al.*, 2004. Seed Science and Technology, 32:365-375.
- Jarvis MC and Mc Cann MC, 2000. Plant Physiology and Biochemistry, 38: 1-13
- Jordan JE *et al.*, 2003. Crop Science, 43:282-287.
- Lucas PW *et al.*, 1995. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 348:363-372.
- Markwell J *et al.*, 1995. Photosynthesis Research. 46:467-472.
- Martínez-Valverde I *et al.*, 2002. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82:323-330.
- Opiyo AM and Ying TJ, 2005. International Journal of Food Science & Technology, 40:665-673.
- Rush CM, 1991. Phytopathology , 81: 878-882.
- Sánchez-Moreno C *et al.*, 2006. Food Chemistry, 98:749-756.
- Schiefelbein JW and Somerville C, 1990. The plant cell, 2:235-243.
- Stone H and Sidel JL, 1985. Sensory Evaluation Practices. Orlando, USA: Academic Press, 56-59.
- Yadav SP *et al.*, 2010. Plant Cell Tissue Organ Culture, 100:183-188.