

Microorganismi biostimolanti per la nutrizione e la difesa delle colture: dal laboratorio al campo

Edoardo Puglisi, *PhD*

DiSTAS

Facoltà di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali

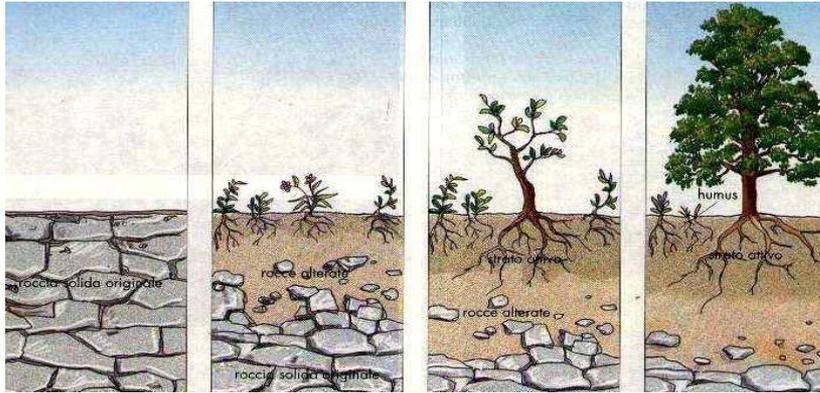
Università Cattolica del Sacro Cuore

Piacenza, Italy

edoardo.puglisi@unicatt.it



- Salute e fertilità del suolo: le nuove sfide dell'agricoltura
- Perché studiare i microorganismi del suolo?
- Meccanismi diretti ed indiretti di azione dei biostimolanti microbici
- Bioprospecting dei biostimolanti microbici: isolamento, fenomica, genomica e test in campo
- Dal lab al campo alla registrazione: quale percorso ci attende?



Il suolo è un complesso substrato fisico, chimico e biologico che permette la crescita delle piante e, di fatto, la vita stessa sulla terra.

(alcune) funzioni essenziali del suolo:

- Degradazione dei residui organici e riciclo dei nutrienti
- Depurazione delle acque e degradazione di sostanze tossiche
- Riserva di biodiversità
- Sink di CO₂ ed altri gas serra
- Funzioni estetiche e sociali



garantire nel tempo un corretto svolgimento di queste funzioni significa garantire la sostenibilità in agricoltura

“The nation that destroys its soil, destroys itself” (Franklin D. Roosevelt, 1937)



FISICA

- Struttura
- Tessitura
- Compattazione
- Porosità
- Disponibilità idrica

CHIMICA

- pH
- C.S.C
- Nutrienti disponibili
- Sostanza organica
- Salinità

BIOLOGICA

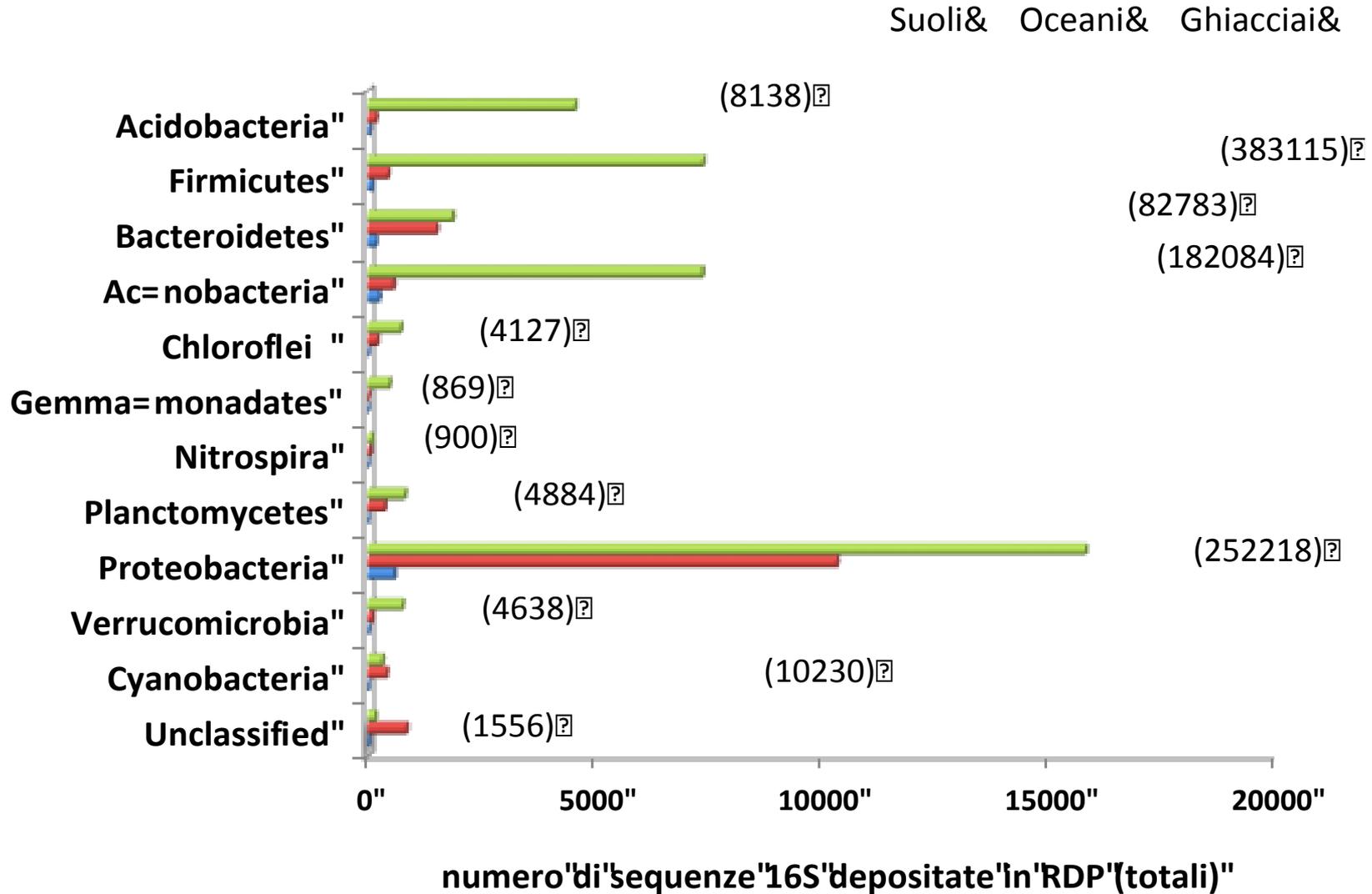
- Macrofauna
- Microfauna
- Microorganismi
- Radici
- Metaboliti

SALUTE DEL SUOLO

“la capacità di un suolo di interagire con l’ecosistema per sostenere la produttività biologica, mantenere la qualità ambientale e promuovere la salute delle piante e degli animali”



IL SUOLO, L'AMBIENTE CON LA MAGGIORE BIODIVERSITA' MICROBICA AL MONDO

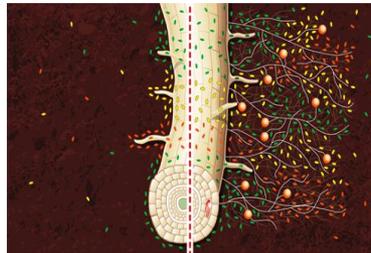
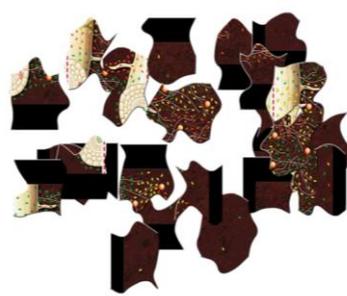
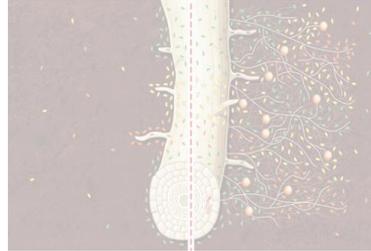




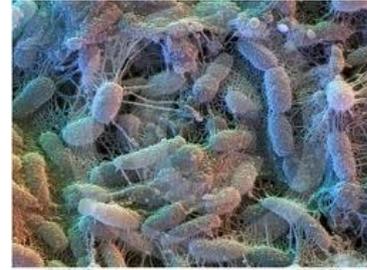
I MICROORGANISMI DEL SUOLO

Cosa fanno?

- Decomposizione della sostanza organica
- Ciclo dei nutrienti
- Fissazione dell' N_2
- Soppressione delle malattie delle piante
- Miglioramento della struttura del suolo
- Biodegradazione degli inquinanti
- Emissioni di gas serra



Chi sono? Quanti sono ?



La biomassa microbica in 1 ha di suolo pesa circa come una vacca

Dotazione microbiologica di un g di suolo di buona qualità:

- Oltre 1 miliardo di cellule
- Centinaia di migliaia di specie microbiche



SOIL =

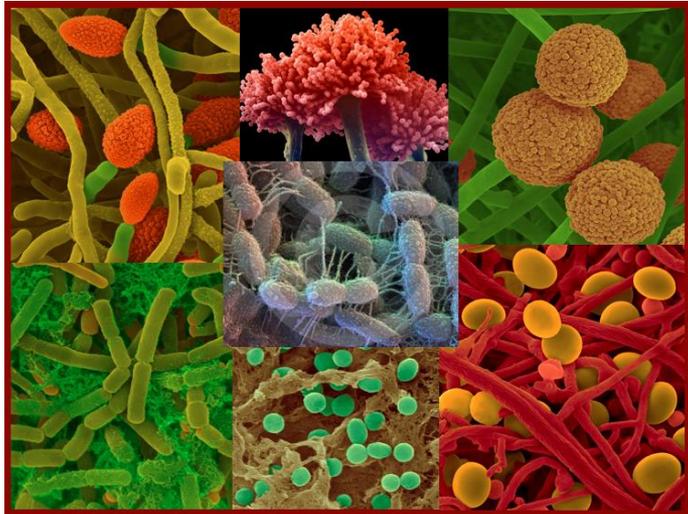
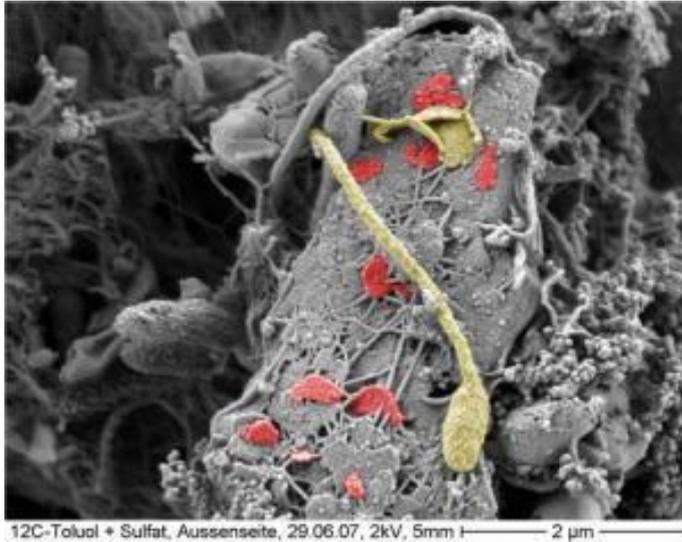
A mixture of minerals, air, water, dead and rotting remains of plants and animals (organic matter) and LOTS of living organisms! Soil is alive ... it has

There are more organisms in one shovel full of soil than all of the people living on planet Earth.



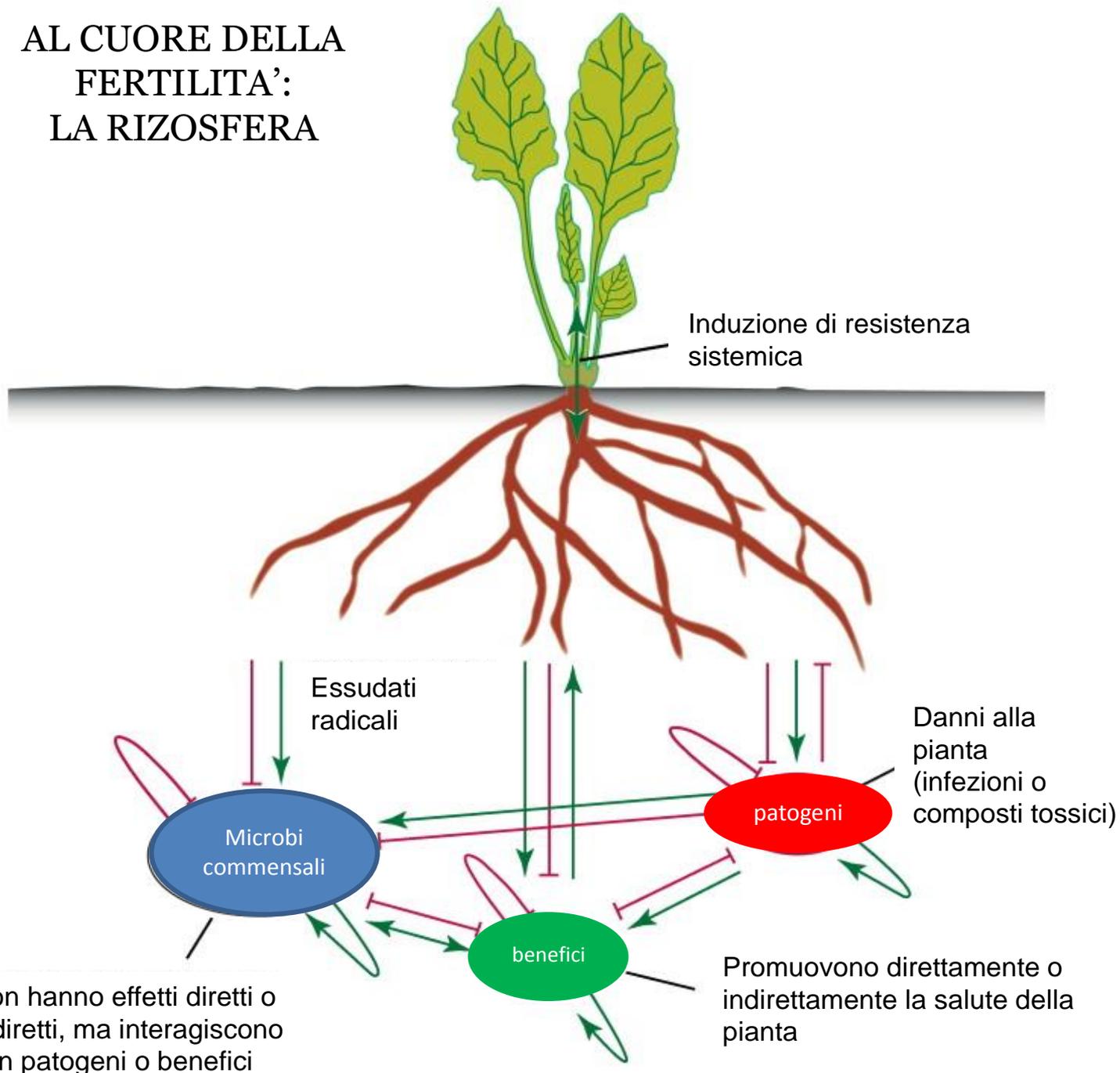


INTERAZIONI BIOLOGICHE: BATTERI, FUNGHI E PIANTE RENDONO IL SUOLO UN AMBIENTE VITALE



LIFE15 ENV/IT/000590 7

AL CUORE DELLA FERTILITA': LA RIZOSFERA





MICROORGANISMI BIOSTIMOLANTI o PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA (PGPR)

- Il termine PGPR (**Plant Growth Promoting Rhizobacteria**) è stato coniato nel 1981 (Kloepper and Schroth) per indicare le popolazioni microbiche della rizosfera in grado di promuovere la crescita della pianta
- E' possibile distinguere tra PGPR extracellulari e intracellulari (**ePGPR** e **iPGPR**)
- Du Jardin (2012) definisce i **biostimolanti** come: «Prodotti contenenti sostanze e/o microrganismi che, applicati alla pianta o alla rizosfera, stimolano i processi naturali che migliorano l'efficienza d'assorbimento e d'assimilazione dei nutrienti, la tolleranza a stress abiotici e/o la qualità del prodotto indipendentemente dal loro contenuto in nutrienti”.
- Per estensione, i biostimolanti designano anche prodotti commerciali contenenti miscele di tali sostanze e/o microrganismi. Per microrganismi si intende sia **batteri** benefici, PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria), che **funghi** benefici



Probiotici, prebiotici e sinbiotici per l'agricoltura del futuro



Meccanismi diretti di stimolazione della crescita della pianta
(attività biofertilizzante):

- Fissazione dell'azoto atmosferico
- Solubilizzazione del fosforo
- Solubilizzazione del potassio
- Produzione di siderofori
- Produzione di fitoormoni (acido indolacetico, citochinine, etilene)

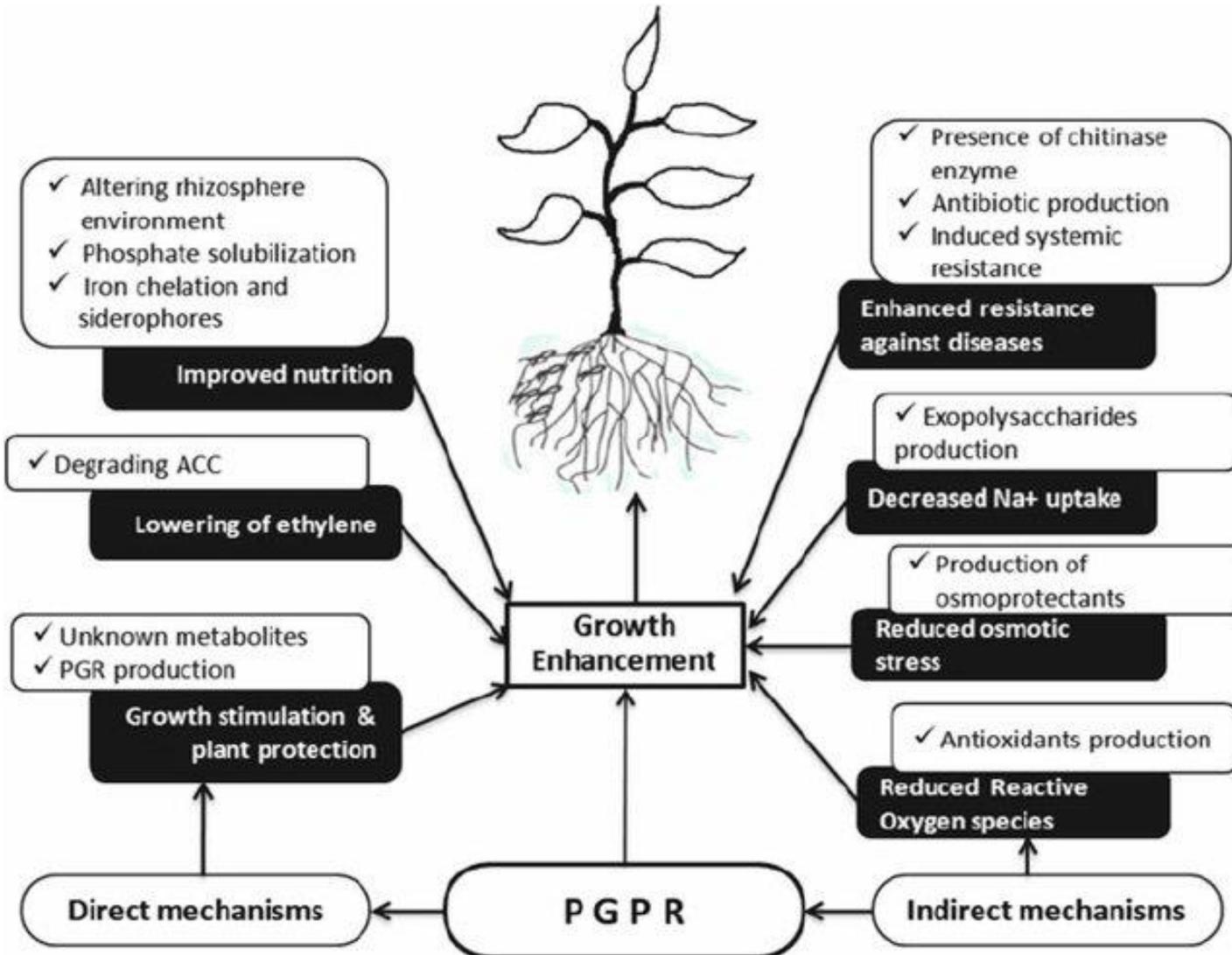


Meccanismi indiretti di stimolazione della crescita della pianta (attività di biocontrollo):

- Inibizione di funghi patogeni tramite produzione di acido cianidrico e altri metaboliti
- Inibizione di batteri patogeni tramite produzione di batteriocine
- Induzione di resistenza sistemica alla pianta nei confronti di stress abiotici (siccità, salinità) e biotici (resistenza ad insetti fitofagi)



MICROORGANISMI BIOSTIMOLANTI o PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA (PGPR)





NUMERO DI ARTICOLI PER ANNO

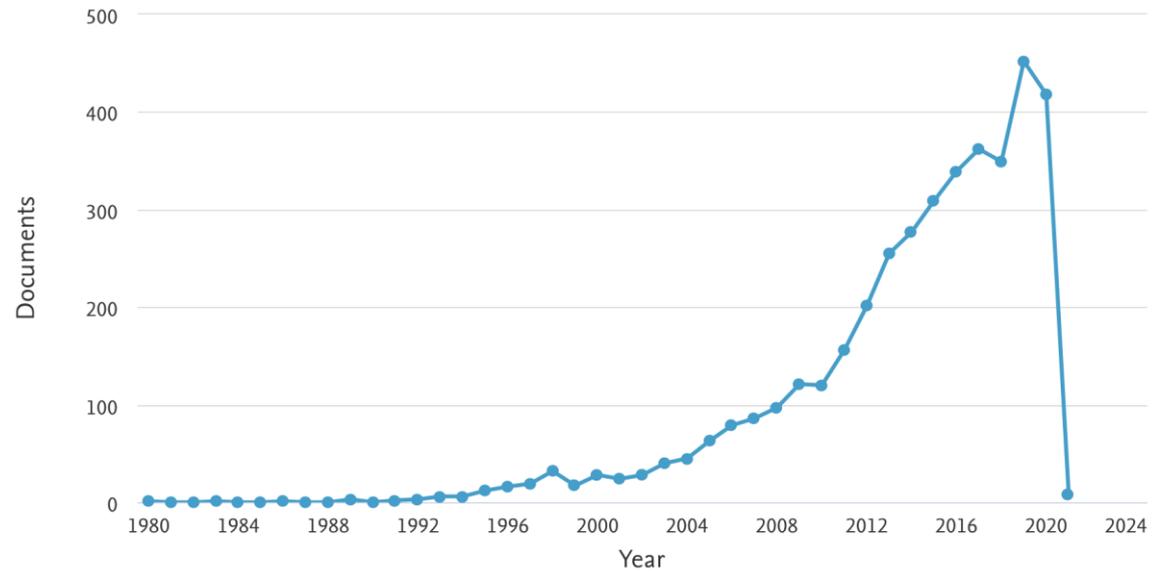
TITLE-ABS-KEY (pgpr)

3,976 document results

Select year range to analyze: 1980 to 2021 Analyze

Year ↓	Documents ↑
2021	8
2020	418
2019	452
2018	349
2017	362
2016	339
2015	309
2014	277
2013	255
2012	201

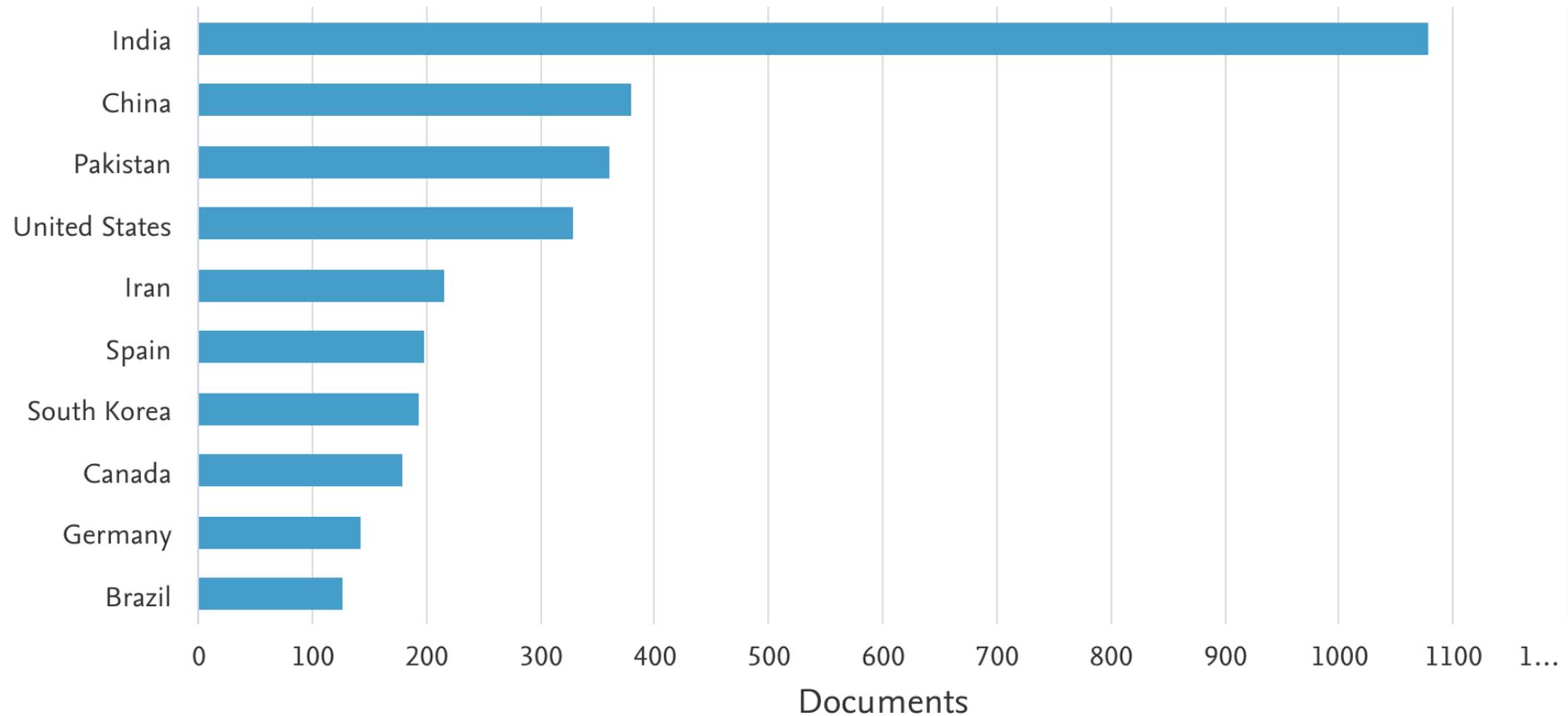
Documents by year





Documents by country or territory

Compare the document counts for up to 15 countries/territories.

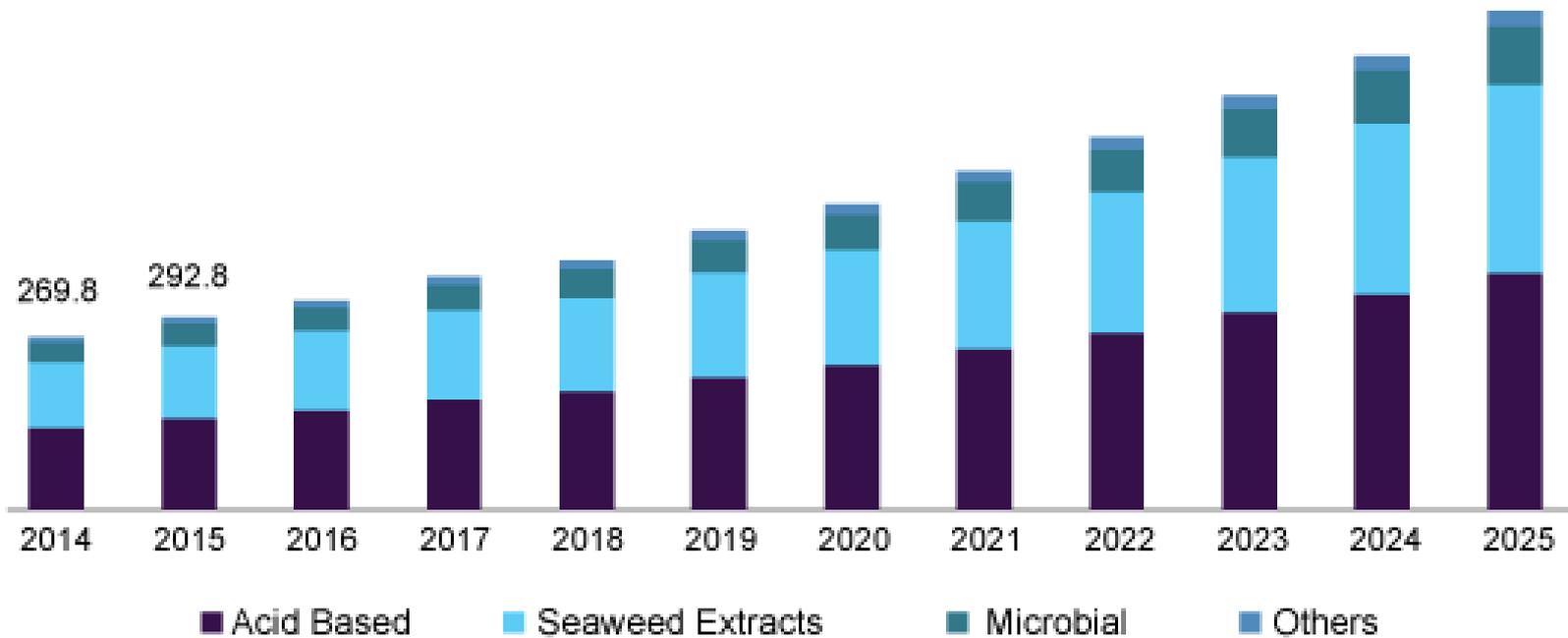


Appendix 1. Examples of promising plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)-based biostimulants for the reduction of chemical fertilizers under various experimental conditions — *Exemples de biostimulants prometteurs à base de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR), pour une réduction de l'usage des fertilisants chimiques dans des conditions d'expérimentations variées.*

Biostimulant	Enhancement of crop growth and reduction of chemical fertilizer level	Crop	Experimental conditions	Reference
<i>Bacillus megaterium</i> M3, <i>Bacillus</i> OSU-142, <i>Azospirillum brasilense</i> sp. 245, <i>Paenibacillus polymyxa</i> RC05, <i>Bacillus megaterium</i> RC07, <i>Bacillus licheniformis</i> RC08, <i>Raoutella terrigena</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> FS Tur	Plant root and shoot weight increase under greenhouse conditions. Single and combinations of PGPR increased yield up to 40.4% for wheat and 33.7% for barley under field conditions and in combination with N fertilizer	Wheat, barley	Greenhouse and field	Çakmakçi et al., 2014
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Improved N and P uptake. Increase in leaf chlorophyll amounts and plant biomass under Zn stress (enhancement of antioxidative enzymes, ascorbic acid and total phenolics)	Wheat	Greenhouse	Islam et al., 2014
<i>Arthrobacter</i> sp. and <i>Bacillus subtilis</i>	Increased plant tolerance to salinity. Plant dry weight increased up to 26% and 40% under 2 dS·m ⁻¹ and 6 dS·m ⁻¹ salinity level, respectively	Wheat	Greenhouse	Upadhyay et al., 2015
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> AR112	Increased or equivalent weight and yield of traditional rice compared with 100% N chemical fertilization	Rice	Field	Araújo et al., 2013
<i>Bradyrhizobium</i> spp. and concentrated metabolites from <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	Increased grain yield by 4.8% compared with the exclusive use of <i>Bradyrhizobium</i> spp.	Soybean	Greenhouse and field	Marks et al., 2013
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899, <i>Glomus intraradices</i>	Increase in P and N amounts up to 40% and 42%, respectively, in soil. Nodule number enhanced by 70% and nodule mass by 43%. Plant shoot dry weight increased by up to 24% and root growth by up to 48%	Bean	Greenhouse	Tajini et al., 2012
<i>Pseudomonas jessenii</i> , <i>Pseudomonas synxantha</i> and a local AM	PGPR or AMF alone increased yield by up to 29% and 31%, respectively. Combining PGPR and AMF increased the yield by up to 41%	Wheat	Field	Mäder et al., 2011
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IN937a, <i>Bacillus pumilus</i> T4, <i>Glomus intraradices</i>	Inoculation of PGPR and AM together reduced fertilizer use by 25%. Combination was equivalent to 100% fertilizer application for plant growth, yield and nutrient uptake	Tomato	Greenhouse	Adesemoye et al., 2009
<i>Bacillus subtilis</i>	Plant growth and yield enhanced by up to 30% compared with NPK fertilization	Cotton	Field	Yao et al., 2006



U.S. biostimulants market size, by active ingredient, 2014 - 2025 (USD Million)





Bioprospecting -> *“sistematica ricerca di prodotti utili derivati da risorse biologiche incluse piante, animali e microorganismi che possono essere sfruttati per la commercializzazione ed il beneficio della società”.*

Nel caso dei biostimolanti microbici:

1. Isolamento di ceppi microbici dal suolo e dalla rizosfera
2. Dereplicazione ed identificazione tassonomica
3. Valutazione fenomica *in vitro* di proprietà biostimolanti
4. Ranking quantitativo delle proprietà biostimolanti
5. Analisi genomiche per confermare le proprietà, valutare sicurezza ed unicità (IP)
6. Rese in biomassa e scale-up industriale
7. Test di serra e di campo
8. Registrazione e commercializzazione



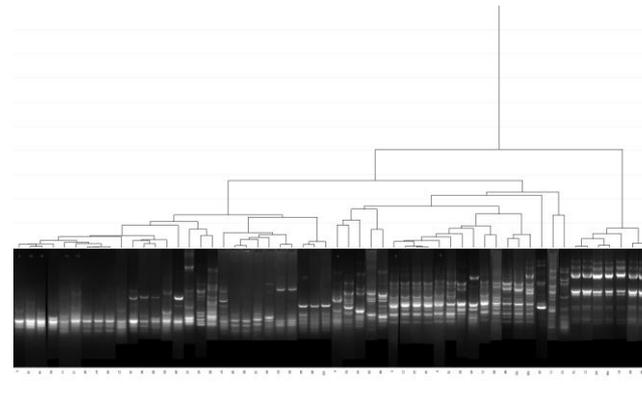
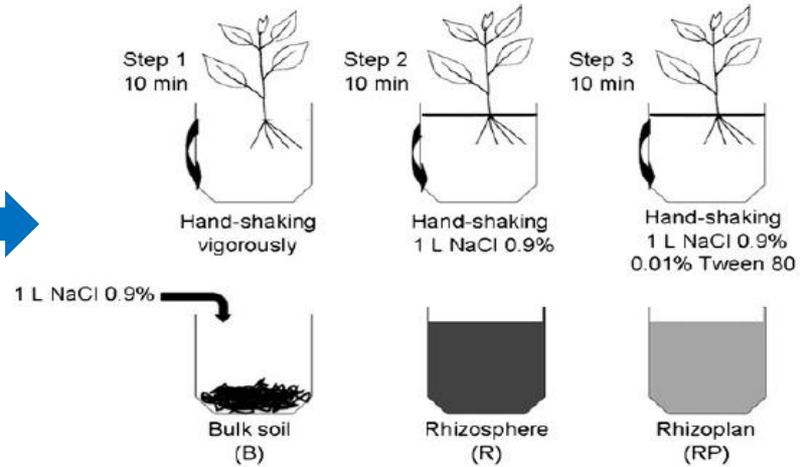
Campionamento
della rizosfera



Isolamento



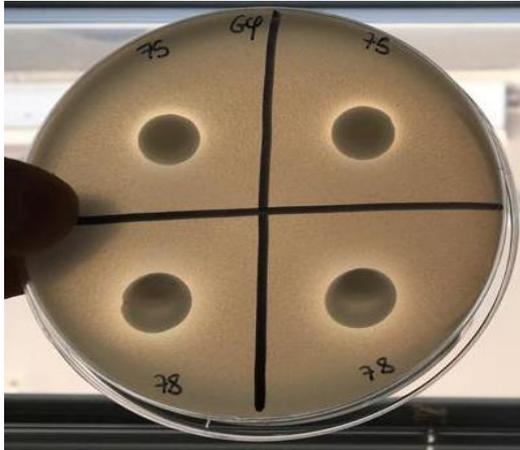
REP-
PCR



16s

Isolati unici
identificati

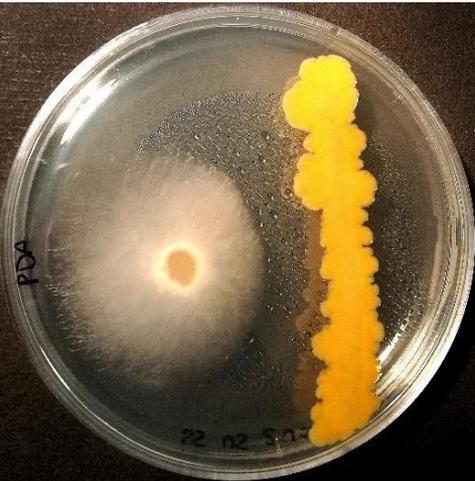
FENOMICA IN VITRO DI PROPRIETA' BIOSTIMOLANTI



Test solubilizzazione del tricalcio fosfato



Test produzione indoli



Test attività di biocontrollo vs *Sclerotinia sclerotiorum*



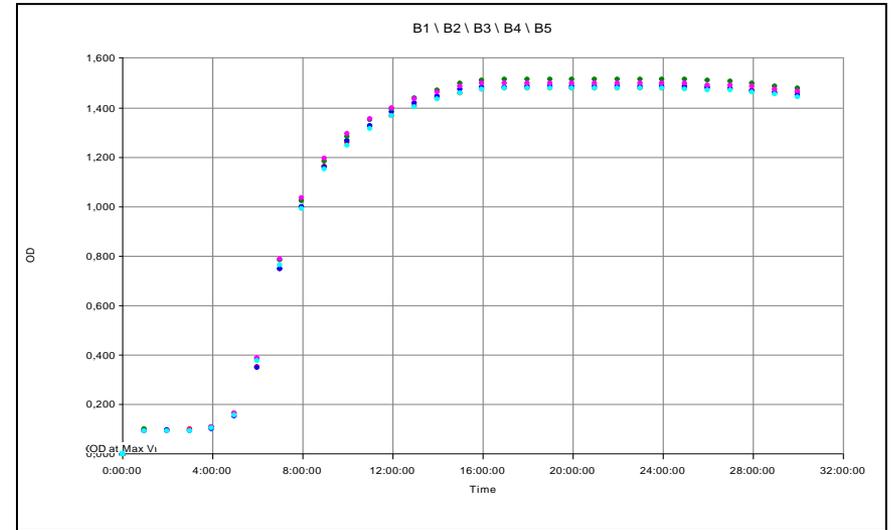
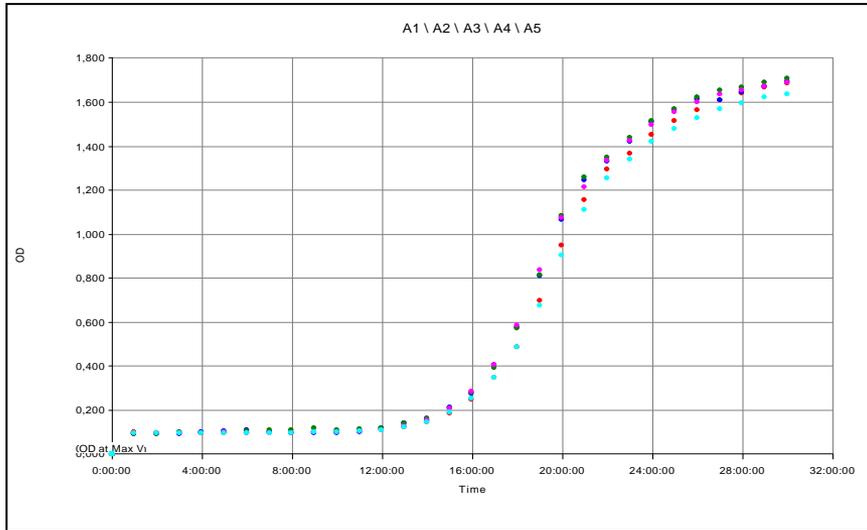
Test produzione di siderofori



Table 4. Ranking of the rhizobacteria based on their in vitro PGP (plant growth promoting) and antifungal assay.

Code	Identity	N Fixation	P Solubilization	IAA Production		Antifungal Activity vs. <i>S. sclerotiorum</i>	Siderophore	Rank
				w/Try	w/o Try			
UC4094	<i>Enterobacter tabaci</i>	1	0.5	0.46	0.42	0.51	0.51	3.41
UC4098	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	1	0.5	0.16	1.00	0.57	0.00	3.22
UC4109	<i>Enterobacter tabaci</i>	1	0.5	1.00	0.11	0.38	0.17	3.16
UC4127	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0.5	0.25	0.22	1.00	0.09	3.06
UC4089	<i>Stenotrophomonas pictorum</i>	1	0.5	0.25	0.22	1.00	0.09	2.99
UC4105	<i>Stenotrophomonas pictorum</i>	1	0.25	0.17	0.03	0.75	0.78	2.98
UC4103	[<i>Pseudomonas</i>] <i>hibiscicola</i>	1	0.25	0.04	0.04	0.94	0.68	2.94
UC4123	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0.5	0.25	0.21	0.93	0.02	2.92
UC4099	<i>Enterobacter tabaci</i>	1	0.5	0.36	0.09	0.45	0.51	2.90
UC4117	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	1	0.75	0.07	0.09	0.59	0.39	2.88
UC4113	[<i>Pseudomonas</i>] <i>hibiscicola</i>	1	0.25	0.04	0.03	0.85	0.68	2.86
UC4096	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	1	0.25	0.04	0.03	0.76	0.77	2.85
UC4090	<i>Aeromonas caviae</i>	1	0.5	0.18	0.12	0.74	0.30	2.84
UC4106	<i>Enterobacter ludwigii</i>	1	0.5	0.36	0.26	0.60	0.08	2.80
UC4093	<i>Stenotrophomonas pictorum</i>	1	0.25	0.02	0.01	0.60	0.91	2.79
UC4082	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	1	0.25	0.01	0.03	0.90	0.60	2.79
UC4084	<i>Kosakonia radicincitans</i>	1	0.5	0.04	0.02	0.65	0.58	2.78
UC4091	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	1	0	0.22	0.05	0.92	0.57	2.76
UC4101	<i>Klebsiella grimontii</i>	1	0.5	0.25	0.25	0.61	0.01	2.61
UC4118	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0.5	0.26	0.22	0.43	0.11	2.52
UC4088	<i>Pseudomonas indoloxydans</i>	1	0	0.06	0.06	0.86	0.53	2.50
UC4087	<i>Pseudomonas indoloxydans</i>	1	0	0.05	0.06	0.82	0.55	2.48
UC4092	<i>Kosakonia radicincitans</i>	1	0.5	0.13	0.13	0.66	0.06	2.48
UC4104	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	1	0.25	0.04	0.02	0.56	0.58	2.46
UC4110	<i>Kosakonia oryzendophytica</i>	1	0.5	0.06	0.04	0.60	0.18	2.39
UC4126	<i>Pseudomonas japonica</i>	1	0.5	0.18	0.13	0.11	0.42	2.33
UC4122	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	1	0.75	0.00	0.03	0.20	0.22	2.20
UC4125	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	1	0	0.01	0.01	0.75	0.28	2.05
UC4102	<i>Chryseobacterium ureilyticum</i>	0	0.25	0.04	0.03	0.74	0.98	2.04
UC4120	<i>Chryseobacterium rhizosphaerae</i>	0	0	0.18	0.02	0.82	0.97	1.99
UC4086	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0.5	0.54	0.31	0.42	0.19	1.96
UC4112	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	1	0.5	0.01	0.03	0.17	0.23	1.95
UC4081	<i>Chryseobacterium oranimense</i>	0	0.25	0.04	0.03	0.66	0.91	1.89
UC4083	<i>Stenotrophomonas acidamiphila</i>	0	0	0.05	0.04	0.77	0.75	1.61
UC4107	<i>Sphingobacterium canadense</i>	0	0	0.06	0.02	0.46	1.00	1.54
UC4108	<i>Chryseobacterium rhizosphaerae</i>	0	0	0.04	0.03	0.65	0.81	1.53
UC4080	<i>Sphingobacterium detergens</i>	0	0	0.04	0.01	0.45	0.79	1.29
UC4121	<i>Sphingobacterium siyangense</i>	0	0	0.00	0.00	0.40	0.87	1.27

w/Try and w/o Try stands for with or without DL-Tryptophan.





- D.L. 75/2010: Definisce biostimolanti, solo 4 gruppi attualmente ammessi (endomicorrizze, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* spp.)
- Nuovo regolamento europeo in vigore dal 2022 su fertilizzanti e biostimolanti
- Necessità di ampliare ad altre specie, includere fortemente la genomica
- Possibilità di registrare come PPP: percorso molto più costoso e complesso
- Numerose incognite da chiarirsi nei prossimi 2 anni



- Meccanismi di azione dei biostimolanti microbici oggi in larga parte conosciuti (magia → scienza)
- Numerose le evidenze sperimentali di efficacia
- Ampi spazi per la scoperta ed applicazione di nuovi biostimolanti
- Eterogeneità di prodotti attualmente sul mercato (**controlli**)
- Strumenti **complementari** all'utilizzo di fertilizzanti e fitofarmaci
- Ricerca necessaria per calibrare ed ottimizzare modi di produzione ed impiego, dosi di applicazione e co-applicazione con fertilizzanti e fitofarmaci
- Occorre una regolamentazione più ampia, coerente ed al passo con gli avanzamenti scientifici e commerciali nel settore