

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE  
NATURALI E AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in  
Scienze e Tecnologie Alimentari

Valorizzazione di fecce di prosecco per ottenimento di inoculanti a  
base di Bacillaceae

Relatore:  
Prof.ssa Marina Basaglia

Correlatore:  
Dott.ssa Viola Caminiti

Laureando:  
Barcaro Andrea  
Matricola n. 2093118

*ANNO ACCADEMICO 2023-2024*

## RIASSUNTO

Le fecce di vino sono rifiuti semisolidi generati durante la fase di fermentazione del vino. Si tratta di prodotti di scarto che ad oggi costituiscono circa il 25% dei rifiuti formati durante il processo di vinificazione in quantità pari a circa il 5% del peso totale dell'uva. Per comprendere l'entità delle fecce prodotte, basti pensare che, secondo ISTAT, su 45'000 ettolitri di vino prodotti nel 2022 sul territorio italiano, sono stati prodotti 6,5Kg di fecce per ogni ettolitro di vino prodotto. Le fecce presentano una fase solida e una fase liquida. Ciascuna di queste ha caratteristiche differenti: la fase solida è prevalentemente costituita da lieviti, carboidrati insolubili, composti fenolici, proteine, lignina, tartrati e altri materiali provenienti dalle bucce d'uva. La fase solubile è composta principalmente da acidi organici, etanolo e composti fenolici solubili. Le fecce sono caratterizzate da alto contenuto di sostanze fitochimiche bioattive, proteine, vitamina B e minerali essenziali, costituendo una risorsa importante per l'industria alimentare, nutraceutica e farmaceutica. La composizione delle fecce le rende un potenziale integratore nelle formulazioni dei terreni di coltura utilizzati nei processi industriali di fermentazione. I composti contenuti possono infatti costituire una potenziale base nutrizionale atta a sostenere la crescita e l'attività di microrganismi specifici impiegati in vari processi. Tale possibilità offre un'alternativa promettente ed economica per arricchire i substrati di coltura utilizzati nell'industria fermentativa. Il presente lavoro si pone quindi come obiettivo quello di valutare l'utilizzo delle fecce per la coltivazione di due ceppi microbici industriali, *Bacillus toyonensis* sp27 e il *Paenibacillus humicus* sp29, considerati PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Dagli esperimenti condotti si è evidenziato un potenziale notevole da parte della fase liquida nel promuovere la crescita e la propagazione dei batteri, se comparato con la crescita in fase solida, che invece non ha apportato alcun sostegno alla coltivazione dei microrganismi considerati. Questo lavoro apre la strada ad una possibile applicazione delle fecce di vino nell'allestimento di terreni colturali per inoculi promuovendo la vitalità batterica, inducendo un cospicuo risparmio economico e supportando l'idea dell'economia circolare e della filiera sostenibile.

## Abstract

Wine lees are semi-solid waste generated during the wine fermentation phase. They are byproducts that currently account for about 25% of the waste produced during the winemaking process and 5% of the total weight of the grapes. To understand the extent of the lees produced, consider that out of 45,000 hectoliters of wine produced in Italy in 2022 (ISTAT data), 6.5 kg of lees were generated for every hectoliter of wine produced. Lees have both a solid and a liquid phase, each with different characteristics. The solid phase is predominantly composed of yeast, insoluble carbohydrates, phenolic compounds, proteins, lignin, tartrates, and other materials, including grape skins. Wine lees are characterized by a high content of bioactive phytochemicals, proteins, vitamin B, and essential minerals, making it an important resource for the food, nutraceutical, and pharmaceutical industries. The composition of grape lees makes them a potential supplement for formulations used in the cultivation substrates employed in industrial fermentation processes. The compounds contained therein could indeed constitute a nutritional base capable of supporting the growth and activity of specific microorganisms employed in various processes. This possibility offers a promising and cost-effective alternative for enriching the culture substrates used in the fermentation industry. The present study aims to evaluate the use of both solid and liquid phases of wine lees for the cultivation of two industrial microbial strains, *Bacillus toyonensis* sp27 and *Paenibacillus humicus* sp29, which colonize plant roots and are considered plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). The conducted experiments have revealed a significant potential of the liquid phase in promoting the growth and proliferation of bacteria, as compared to growth in the solid phase, which did not provide any advantageous support for the cultivation of the considered microorganisms. This experimentation paves the way for highlighting the potential application of wine lees in the preparation of cultivation substrates for bacterial inoculants, promoting bacterial vitality, inducing significant economic savings, and supporting the concept of circular economy and sustainable supply chain.

## Sommario

<b>Capitolo 1 - Introduzione</b> .....	<b>4</b>
1.1 Il processo di vinificazione .....	4
1.2 I residui della vinificazione .....	6
1.2.1 Tralci di vite.....	6
1.2.2 Raspi d'uva .....	7
1.2.3 Vinacce d'uva.....	8
1.2.4 Bucce d'uva .....	10
1.2.5 Semi d'uva.....	10
1.3 Fecce di vino.....	11
1.3.1 Applicazioni delle fecce di vino .....	13
1.3.2 Potenziale impiego come substrato nutrizionale in processi biotecnologici .....	15
1.4 PGPR.....	17
1.5 <i>Bacillus</i> sp come PGPR .....	20
<b>Capitolo 2 - Scopo dello studio</b> .....	<b>24</b>
<b>Capitolo 3 - Materiali e metodi</b> .....	<b>25</b>
3.1 Fecce utilizzate .....	25
3.2 Ceppi batterici utilizzati.....	25
3.3 Colture batteriche.....	26
3.3.1 Valutazione della crescita batterica tramite misura dei microrganismi coltivabili .....	26
3.3.2 Valutazione della crescita batterica tramite misura della densità ottica .....	26
3.3.3 Valutazione della crescita di <i>B. toyonensis</i> sp27 nella frazione solida secca delle fecce .....	26
3.3.4 Valutazione della crescita di <i>B. toyonensis</i> sp27 nella frazione liquida delle fecce .....	27
3.3.4.1 Ottenimento di un inoculante contenente <i>B. toyonensis</i> sp27 a partire da porzione liquida delle fecce con sali dell'MM.....	27
3.3.5 Valutazione della crescita di <i>P. humicus</i> sp29 nella frazione liquida delle fecce .....	28
3.3.5.1 Ottenimento di un inoculante contenente <i>P. humicus</i> sp29 a partire da porzione liquida delle fecce con sali dell'MM.....	28
3.4 Analisi statistica .....	26
<b>Capitolo 4 - Risultati</b> .....	<b>30</b>
4.1 <i>B. toyonensis</i> sp27 .....	30
4.1.1 Crescita <i>B. toyonensis</i> sp27 nella frazione solida e liquida delle fecce.....	30
4.1.2 Ottenimento di inoculanti su substrato solido contenenti <i>B. toyonensis</i> sp27 .....	33
4.2 <i>P. humicus</i> sp29 .....	34
4.2.1 Crescita <i>P. humicus</i> sp29 nella frazione liquida delle fecce.....	34
4.2.2 Ottenimento di inoculanti su substrato solido contenenti <i>P. humicus</i> sp29 .....	36
<b>Capitolo 5 - Discussione e Considerazioni conclusive</b> .....	<b>39</b>
<b>Capitolo 6 - Bibliografia</b> .....	<b>43</b>

# Capitolo 1 - Introduzione

## 1.1 Il processo di vinificazione

Il progresso scientifico e tecnologico ha catalizzato notevoli miglioramenti nelle industrie convenzionali, in particolare nel settore agroalimentare. Questa evoluzione ha riversato benefici significativi nella produzione di alimenti e bevande, con un'attenzione particolare rivolta sia all'ottimizzazione della qualità che all'efficienza economica dei processi (Bharathiraja et al., 2020).

Nel panorama delle bevande alcoliche, l'industria vinicola emerge come uno dei settori di maggior rilievo sotto molteplici aspetti, tra cui il volume di produzione, il valore economico e il profondo significato culturale.

La produzione del vino è un processo che si articola in più fasi: inizia dalla coltivazione e raccolta delle materie prime poi trasportate e lavorate, ottenendo alla fine il vino. Le fasi di vinificazione prevedono il lavaggio delle uve, la separazione dei raspi, la pigiatura dell'uva, seguita dalla fermentazione. Negli impianti viene utilizzato un volume enorme di acqua, che si traduce nella generazione di notevoli quantità di acque reflue.

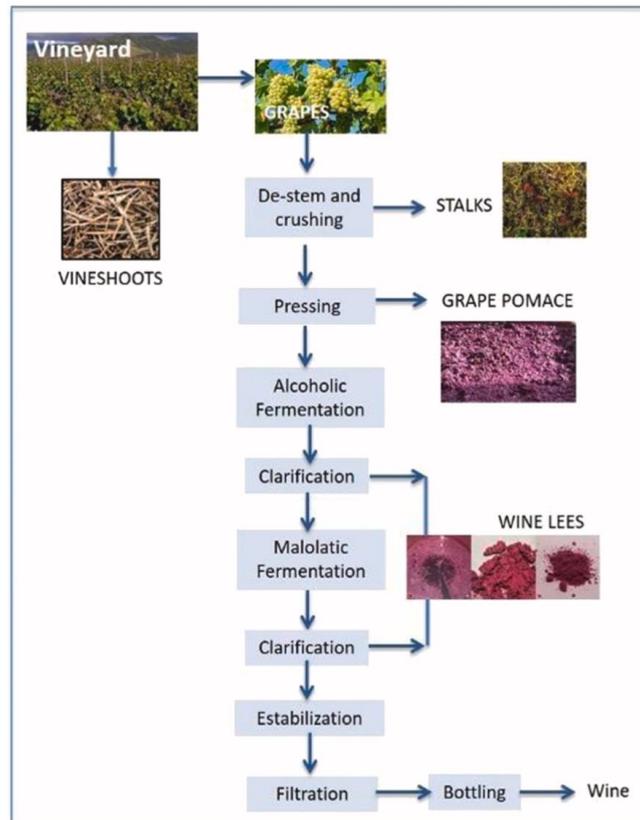
Al termine del processo di fermentazione viene eseguita la separazione del vino e vengono effettuati ulteriori processi di chiarifica e stabilizzazione.

Infine, il vino prodotto viene filtrato e confezionato (Musee et al., 2006; Sirohi et al., 2020).

La quantità di rifiuti solidi accumulati durante la produzione del vino dipende principalmente dal grado di estrazione del succo, dal tipo di attrezzatura, dal numero di fermentazioni e dalle fasi di chiarificazione. Si stima che circa 9-13 tonnellate di uva generino almeno una tonnellata di materiali di scarto, di cui il 65% è costituito da acque reflue (Kyzas et al., 2016). A livello mondiale, il 57% delle uve coltivate ha trovato impiego nei processi di vinificazione, compresi mosti e succhi, mentre il 36% è destinato al consumo diretto come uva da tavola, e il rimanente 7% è convertito in uve appassite (OIV, 2019).

Sulla base di tali dati, si può dedurre che la produzione di 1 litro di vino richiede in media 1,5 kg di uva, indicando una resa in vino del 66%, con variazioni generalmente comprese tra il 65% e il 75%, a seconda della tipologia di vino. Assumendo una densità media del vino pari a 1 kg/L (Charrondièrre et al., 2012), è possibile stimare che i processi di vinificazione generino approssimativamente tra 0,3 e 0,5 kg di sottoprodotti per ogni litro di vino prodotto. A questi vanno aggiunti i sottoprodotti generati durante le stagioni di potatura.

I principali sottoprodotti solidi derivanti dal processo di vinificazione comprendono tralci di vite, raspi d'uva, vinacce (costituite da bucce e vinaccioli, con un rapporto ponderale approssimativo di 1:1) e le fecce di vino (Figura 1).



**Figura 1** - Diagramma di flusso del processo per l'industria del vino (del Mar Contreras et al., 2022).

I tralci e le foglie di vite sono tra i primi residui e derivano dagli interventi agronomici mirati a garantire la riproduzione della pianta. Successivamente, durante la vendemmia, che si svolge nel periodo tra agosto e novembre, gli acini maturi vengono raccolti e inviati alle aziende vitivinicole. In queste aziende, la fase di diraspatura è eseguita per entrambi i tipi di vino, rosso e bianco, oltre che per i succhi. Tale processo produce ulteriori sottoprodotti: i raspi. A questo punto, l'uva viene sottoposta a pigiatura per estrarre il succo, dando origine alle vinacce, composte da vinaccioli e bucce d'uva. Nel caso dei vini bianchi o dei succhi, le vinacce sono immediatamente separate dal mosto appena pigiato.

Diversamente, per i vini rossi, le vinacce vengono inizialmente mantenute con il mosto per un periodo di fermentazione durante il quale avviene l'estrazione dei pigmenti e di vari costituenti dell'uva. Successivamente, le vinacce sono rimosse e scartate.

Al termine delle fermentazioni alcoliche, e in alcuni casi delle fermentazioni malolattiche, si procede alla raccolta delle fecce di vino. Tale operazione avviene concomitantemente alle fasi di travaso, chiarifica, stabilizzazione tartarica e/o filtrazione (Nanni et al., 2021).

## **1.2 I residui della vinificazione**

La composizione dei rifiuti derivanti dal processo di vinificazione è strettamente dipendente dalle condizioni e dal momento della vendemmia. Secondo uno studio condotto da Ene et al. nel 2013, la generazione di acqua reflua durante la produzione di vino varia approssimativamente da 0,5 a 14 litri per ogni litro di vino prodotto. Quest'acqua si contraddistingue per la sua acidità, fitotossicità e un elevato valore di domanda biochimica di ossigeno (BOD). Inoltre, si caratterizza per la presenza di sali, sostanze organiche, oligoelementi come magnesio, calcio e sodio, erbicidi e pesticidi, con un pH inferiore a 5,5. Analisi condotte da Lucas et al. nel 2009 e Vlyssides et al. nel 2005 indicano la presenza significativa di zuccheri, acidi organici, glicerolo e alcoli, oltre a una consistente popolazione microbica di lieviti e batteri. Negli effluenti è stata segnalata anche la presenza di zolfo, una salinità moderata e composti inorganici (Kyzas et al., 2016).

I residui solidi generati dall'industria vinicola includono tralci di vite (foglie e germogli) (Amendola et al., 2012), vinacce (Fernández et al., 2010; Lachman et al., 2013), raspi di uva (Ping et al., 2011) e fecce di vino (Kontogiannopoulos et al., 2016), la cui composizione chimica differisce in base alla fonte (Leite et al., 2019).

### **1.2.1 Tralci di vite**

Nel corso delle operazioni di potatura, si originano tralci di vite il cui ammontare è stimato attorno ad 1-2 tonnellate per ettaro (Sánchez-Gómez et al., 2017a, 2017b); questa quantità può aumentare fino a 3 tonnellate per ettaro nei vigneti allevati a spalliera. Tale pratica agronomica è solitamente attuata durante la stagione invernale, successivamente alla vendemmia, con l'obiettivo di ottimizzare la produttività per il successivo raccolto (Pérez-Rodríguez et al., 2017).

La biomassa legnosa generata dalle fasi di potatura generalmente ha uno spessore non superiore a 1-2 cm e una lunghezza che solitamente supera i 50 cm (fino a oltre 1 m). Considerando che la superficie mondiale coltivata a vite ammonta a circa 6,9 milioni di ettari, si stima che le potature possano generare una quantità compresa tra 6,9 e 13,8 milioni di tonnellate di tralci di vite. Attualmente, questi rifiuti agricoli presentano un basso valore economico e sono caratterizzati da limitati utilizzi (Gullón et al., 2018). Una pratica diffusa consiste nel lasciare i suddetti tralci nei campi a scopo di fertilizzazione organica (Peralbo-Molina & Luque de Castro, 2013). Tuttavia, gran parte di essi viene bruciata in loco per prevenire la diffusione di fitopatogeni (Peralbo-Molina & Luque de Castro, 2013). Tale processo combustivo genera emissioni inquinanti contenenti idrocarburi policiclici aromatici e contribuisce al cambiamento climatico attraverso l'emissione di gas serra (Dávila et al., 2019; Pérez-Rodríguez et al., 2017). Sia lasciando i tralci in campo sia bruciandoli, si verificano significativi impatti ambientali negativi; pertanto, l'opportunità di valorizzare i tralci di vite come materia prima per prodotti a base biologica rappresenta un interessante approccio (Dávila et al., 2019). Tale valorizzazione potrebbe contribuire a mitigare gli impatti negativi attualmente associati alle pratiche convenzionali, favorendo allo stesso tempo una transizione verso un modello più sostenibile ed eco-friendly.

Negli ultimi tempi, questi elementi sono stati oggetto di studio in diverse prospettive. Sono stati esaminati come fonte di antiossidanti (Rajha et al., 2015), biostimolanti (Harris-Valle et al., 2007) o come aromi legnosi (Delgado de la Torre et al., 2014); sono stati inoltre valutati come assorbitori di composti tossici (Karaoğlu et al., 2010) e sono stati considerati anche a fini energetici (Buratti et al., 2015).

I tralci di vite sono costituiti principalmente da olocellulosa (cellulosa ed emicellulosa) ( $\geq 60\%$ ), lignina ( $\geq 20\%$ ), e circa il 3% di sostanze estrattive (Senila et al., 2020; Dávila et al., 2016; Delgado-Torre et al., 2012); la percentuale di tali componenti è influenzata da vari fattori, tra cui la cultivar coinvolta (Senila et al., 2020; Benito-González et al., 2020).

### **1.2.2 Raspi d'uva**

I raspi dell'uva, ossia la struttura legnosa che costituisce il grappolo, rappresentano uno scheletro generato nel corso del processo di vinificazione, caratterizzati da tessuti lignificati (Ping et al., 2011). Solitamente, prima della fermentazione, i raspi che costituiscono fino al 6-7% del peso dell'uva, vengono rimossi dai grappoli (Troilo et al., 2021; Borsoi et al., 2020).

La composizione chimica dei raspi dell'uva comprende carboidrati complessi come la cellulosa (circa 12,2-36,3%, p/p) e principalmente emicellulose (circa 26%, p/p), insieme al glucosio solubile e fruttosio. Uno dei principali zuccheri contenuti nell'emicellulosa è lo xilosio, che può contribuire fino al 12% del peso (Prozil et al., 2012).

Analisi chimiche indicano nei raspi un alto contenuto di lignina (circa il 30%) e di estrattivi (oltre il 20%) (Egüés et al., 2013; Amendola et al., 2012; Ping et al., 2011; Spigno et al., 2014; Prozil et al., 2014). Ricerche condotte da Spigno et al. (2013) hanno segnalato variazioni nel contenuto in emicellulosa, attribuibili a diversi fattori quali il tipo di vitigno, l'origine delle uve, la stagione, la sezione trasversale dei raspi e la presenza di fruttosio derivato dal succo d'uva (Egüés et al., 2013; Ping et al., 2011; Spigno et al., 2013).

Filippi et al. (2022) hanno recentemente indagato la composizione dei raspi dell'uva, rilevando un contenuto proteico del 7,2% e una percentuale di pectina dell'1,6%.

È interessante notare che, analogamente alla vinaccia, i raspi dell'uva contengono tannini condensati, sebbene in quantità minori (Ping et al., 2011), e polifenoli (Sánchez-Valdepeñas et al., 2015). L'analisi della composizione elementare dei raspi dell'uva evidenzia somiglianze significative con la composizione dei tralci di vite.

La rilevante presenza di zuccheri e composti biologicamente attivi nei raspi dell'uva ne fa una biomassa di interesse, con possibili applicazioni nell'industria alimentare e in altri settori industriali. Attualmente, i raspi dell'uva vengono impiegati come input organici e minerali per il terreno, contribuendo a fornire calcio, magnesio e potassio. Tuttavia, va sottolineato che l'efficacia di questa pratica è limitata a causa della bassa biodegradabilità dei raspi dell'uva (Portinho et al., 2017).

### **1.2.3 Vinacce d'uva**

Le vinacce sono il principale sottoprodotto della vinificazione durante la fase di pressatura dell'uva. La quantità di vinacce generate è influenzata dalla varietà dell'uva e dalla modalità di pressatura, rappresentando generalmente dal 15 al 30% del peso totale dell'uva. Analogamente ai tralci della vite, la composizione chimica delle vinacce può essere modulata da diversi fattori, tra cui la cultivar dell'uva, la posizione geografica del vigneto e le condizioni di coltivazione e di processo (Beres et al., 2017). Le vinacce sono costituite principalmente da buccia, semi, polpa residua e raspi (Jin et al., 2021; Bao et al., 2020; Pedras et al., 2020). Il peso dei semi e delle bucce nelle vinacce può superare il 60% del

peso totale (González et al., 2020). Tuttavia, il rapporto tra semi e bucce varia in base al processo di vinificazione, che può essere in bianco o in rosso (Beres et al., 2017).

La composizione chimica della vinaccia include monosaccaridi C6 (glucosio, fruttosio, fucosio, galattosio, mannosio, ramnosio) e C5 (xilosio, arabinosio), strutturati principalmente come cellulosa ed emicellulosa. Inoltre, sono presenti lignina, proteine, lipidi e pectine (Corbin et al., 2015; Pedras et al., 2020; Beres et al., 2017).

La vinaccia, come residuo solido, presenta una notevole varietà nella sua composizione chimica. La frazione cellulosica, costituente principale, può rappresentare fino al 26% in peso sulla base secca della vinaccia. Nella frazione estrattiva della vinaccia sono presenti anche zuccheri solubili, i cui livelli possono variare significativamente. Ad esempio, le vinacce di Cabernet Sauvignon contengono il 14,8% in peso di zuccheri solubili, mentre nelle vinacce di Sauvignon Blanc questo valore può raggiungere fino il 43% (Corbin et al., 2015).

Un altro aspetto rilevante riguarda il contenuto di lignina, che è particolarmente elevato, raggiungendo circa il 30%. Questo è correlato alla presenza di semi, i quali hanno una maggiore concentrazione di lignina rispetto alla buccia o alla polpa delle uve (Pedras et al., 2020).

Da notare anche l'alto contenuto di tannini condensati, noti come proantocianidine, presenti nelle vinacce di buccia e vinaccioli. Questi composti polifenolici possono essere estratti in ambiente acquoso e trovano applicazioni nell'industria per la produzione di adesivi a base di tannino (Rondeau et al., 2013).

Le vinacce contengono quindi numerose e diverse sostanze organiche che possono avere impatti significativi su vari processi, comprese le potenziali applicazioni industriali o agricole della vinaccia stessa.

Le vinacce, specialmente quelle con un elevato contenuto di zucchero, possono essere considerate un sottoprodotto con diverse applicazioni nella produzione di etanolo nelle distillerie o come materiale utilizzabile per il compostaggio, per la produzione di fertilizzanti o mangime per il bestiame (Williams et al., 2019; Cejudo-Bastante et al., 2021). Tuttavia, è comune che vengano smaltite in discarica come rifiuti, generando impatti ambientali significativi, principalmente a causa della loro elevata umidità, che si attesta tra il 60% e il 70% (p/p) (Corbin et al., 2015; González et al., 2020; Del Pozo et al., 2021; Drevelegka & Goula, 2020).

Oltre alla necessità di ridurre la produzione di rifiuti da parte delle industrie vinicole (Romanini et al., 2021), la presenza di elevate concentrazioni di composti preziosi rende

questa biomassa lignocellulosica una materia prima interessante per ottenere composti di rilevante interesse (Del Pozo et al., 2021). Ricerche recenti hanno evidenziato il notevole potenziale di questa biomassa lignocellulosica nella produzione di estratti ricchi di composti fenolici, inclusi fenoli semplici e polifenoli come tannini o flavonoidi, noti per le loro proprietà antiossidanti (Del Pozo et al., 2021; Brezoiu et al., 2019; González et al., 2020; Bao et al., 2020; Cejudo-Bastante et al., 2021).

#### **1.2.4 Bucce d'uva**

Le bucce dell'uva costituiscono quasi la metà, in peso, della vinaccia, sebbene la proporzione tra bucce e vinaccioli possa variare significativamente a seconda del tipo di uva. Le bucce contengono una serie di componenti, tra cui proteine (5–12%), ceneri (2–8%), e zuccheri solubili (da 1% fino al 70%, a seconda del processo enologico impiegato). Tuttavia, ciò che le rende particolarmente interessanti sono i polifenoli e le fibre alimentari. Nel complesso, il contenuto totale di fibre alimentari nelle bucce dell'uva rappresenta circa il 60% della sostanza secca, e quasi il 98,5% di esse sono insolubili (Deng et al., 2011). Le bucce dell'uva contengono inoltre una concentrazione significativa di polifenoli, presenti sia all'interno che all'esterno della parete cellulare. I polifenoli legati alla parete cellulare formano legami con la cellulosa e l'emicellulosa mediante interazioni idrofobiche e legami idrogeno. Questa conformazione li rende particolarmente difficili da estrarre (Galanakis, 2017). Va sottolineato che i polifenoli non legati alla parete cellulare, inclusi quelli presenti nei vacuoli e quelli associati al nucleo, sono più facilmente estraibili (Pinelo et al., 2006). Dal punto di vista qualitativo, questi polifenoli sono caratterizzati da una presenza significativa di tannini condensati con elevati gradi di polimerizzazione, insieme a basse quantità di tannini idrolizzabili, che rappresentano quasi il 5%. Inoltre, nelle bucce del vino, si riscontrano quantità rilevanti di antociani come delphinidina, cianidina e malvidina (Galanakis, 2017).

#### **1.2.5 Semi d'uva**

I semi d'uva, che costituiscono un'altra parte della vinaccia, sono caratterizzati da un notevole contenuto di fibre, pari al 48%, proteine all' 11,5%, e lipidi variabili tra il 13% e il 15% (Özvural & Vural, 2014). L'olio derivato dai semi di uva, in particolare, presenta

tipicamente elevati livelli di tocoli e acidi grassi insaturi, tra cui l'acido linoleico e oleico (Fiori et al., 2014).

Inoltre, all'interno dei vinaccioli, si trovano significative quantità di polifenoli. Questi composti condividono comunemente le stesse unità costituenti dei polifenoli presenti nelle bucce dell'uva, come catechine e gallo catechine. Tuttavia, la caratteristica peculiare di questi polifenoli nei semi è la loro tendenza a esistere in forme monomeriche, con gradi di polimerizzazione inferiori rispetto a quelli delle bucce.

Dall'altro lato, è da notare come il contenuto di polifenoli derivati dall'acido gallico, noti come tannini idrolizzabili, sia superiore del 30% rispetto a quelli presenti nelle bucce e nei raspi (Pinelo et al., 2006). In termini di applicazioni pratiche, i vinaccioli sono solitamente impiegati per estrarre l'olio, che a sua volta trova utilizzo come ingrediente alimentare. In alcuni casi, per evitare costi di trasporto elevati, i vinaccioli vengono bruciati direttamente nel terreno.

La ricerca sta oggi esplorando i semi di uva come una fonte promettente di antiossidanti nei settori alimentare, farmaceutico e cosmetico (Glampedaki & Dutschk, 2014; Aghamirzaei et al., 2018). Inoltre, si stanno considerando i semi di uva come materia prima per la produzione di grafene verde (Yaragalla et al., 2016) e come fonte di proteine (Galanakis, 2017).

### **1.3 Fecce di vino**

Dopo la fase di fermentazione, si attua la chiarificazione del vino, un processo che genera rifiuti semisolidi, le fecce di vino. Le fecce possono essere classificate in base alla fase specifica del processo di vinificazione durante il quale si formano. Tale suddivisione comprende le fecce di vino di prima fermentazione, le fecce di vino di seconda fermentazione e le fecce di vino da invecchiamento. Queste fasi corrispondono rispettivamente alla formazione delle fecce dopo la fermentazione alcolica del vino, dalla rifermentazione o l'invecchiamento in botti di legno (Jara-Palacios, 2019). Inoltre, vengono considerate fecce di vino anche le particelle precipitate durante il periodo di affinamento del prodotto (Romero-Díez et al., 2018; López-Fernández-Sobrino et al., 2021).

Le fecce rappresentano il 25% dei rifiuti del processo di vinificazione (De Iseppi et al., 2020), possono costituire fino al 5% in peso del totale dell'uva (Troilo et al., 2021), e la loro composizione è influenzata dalle condizioni della cultivar, dalla varietà dell'uva e dalla durata dell'invecchiamento nelle botti di legno (Romero-Díez et al., 2018).

Dopo centrifugazione o filtrazione, la feccia può essere suddivisa in due fasi: una fase solida e una fase liquida. La proporzione tra queste due fasi può variare in relazione al tipo di feccia o alla procedura di ottenimento.

La fase solida è prevalentemente costituita da lieviti, carboidrati insolubili, composti fenolici, proteine, lignina, tartrati e altri materiali, tra cui bucce d'uva (Pérez-Bibbins et al., 2015).

Per quanto concerne la fase liquida, è composta principalmente da acidi organici, etanolo e composti fenolici solubili (López-Fernández-Sobrino et al., 2021).

Le fecce di vino, caratterizzate da alta umidità e un elevato contenuto di sostanza organica, presentano valori significativamente elevati di BOD e COD (domanda biochimica e chimica di ossigeno), come evidenziato da De Iseppi et al. (2021). Questa composizione le rende un sottoprodotto nocivo il cui smaltimento in discarica può generare rilevanti impatti ambientali (Zhijing et al., 2018).

Dal punto di vista chimico, tali residui biologici sono caratterizzati da una ricchezza di sostanze fitochimiche bioattive, proteine, vitamina B e minerali essenziali, e sono pertanto una potenziale risorsa per l'industria alimentare, nutraceutica e farmaceutica (Mena et al., 2014).

Gli antociani sono stati identificati come i principali composti fenolici presenti negli estratti di fecce di vino, giocando un ruolo significativo nelle loro proprietà antiossidanti (Romero-Díez et al., 2018). Anche la presenza di tannini nelle fecce di vino contribuisce alle proprietà antiossidanti degli estratti, sebbene questo aspetto possa variare in base alle tecniche di vinificazione utilizzate e al tipo di uve, bianche o rosse, da cui sono ottenute (Zhijing et al., 2018).

Nel loro studio del 2008, Bustamante et al. hanno osservato come le fecce di vino presentino fluttuazioni nel contenuto di polifenoli, compresi tra 1,9 e 16,3 g/kg, sulla base del tipo di vino e del processo di lavorazione. Ricerche più recenti si sono focalizzate sulla caratterizzazione di questa frazione, identificando diversi composti fenolici. Tra questi, sono stati individuati principalmente membri delle sottoclassi degli acidi fenolici, dei flavonoli, dei flavanoli e degli antociani. Questi risultati hanno un impatto sia riguardo alla valutazione del potenziale valore nutrizionale che alle applicazioni industriali di tali composti (Delgado De La Torre et al., 2015; Giacobbo et al., 2019; Matos et al., 2019; Romero-Díez et al., 2019, 2018).

I polifenoli presenti nelle fecce del vino si distribuiscono sia nella componente liquida, sia nella componente solida, in conseguenza del loro adsorbimento sulle pareti cellulari del lievito durante il processo di vinificazione (Ye et al., 2015). Il meccanismo di adsorbimento

è influenzato da diversi fattori, tra cui la tipologia e la quantità dei composti fenolici, nonché da variabili quali il vitigno, il grado di maturazione delle bacche, il metodo di macerazione e la temperatura di fermentazione. Si è ipotizzato che i polifenoli colloidali interagiscano con le proteine presenti sulle pareti cellulari del lievito attraverso le forze di Van der Waals. Questo fenomeno è strettamente correlato alla composizione specifica dei polifenoli presenti nel vino e alle caratteristiche del lievito coinvolto nel processo di fermentazione. La comprensione di tali interazioni è fondamentale per approfondire la complessità della distribuzione e dell'adsorbimento dei polifenoli durante la vinificazione (Kawamoto & Nakatsubo, 1997; Salmon et al., 2000).

Tuttavia, a causa della debolezza di queste interazioni, i polifenoli possono essere facilmente recuperati dalle fecce di lievito e quindi hanno il potenziale per essere sfruttati. Attualmente, nelle fecce di vino viene recuperato l'acido tartarico, il quale viene successivamente riutilizzato nel processo di vinificazione per regolare il pH iniziale dei mosti prima della fermentazione. Questo sottoprodotto può essere efficacemente impiegato nelle distillerie anche come materia primaria per la produzione di alcoli ricchi di composti aromatici derivati dal vino (De Iseppi et al., 2020). Nonostante ciò, alcune ricerche indicano che le fecce di vino sono considerate un sottoprodotto spesso sottovalutato nell'ambito dell'industria enologica (Pérez-Serradilla & Luque de Castro, 2008).

Secondo Dimou e collaboratori (2016), l'etanolo derivato dalle fecce di vino si può utilizzare come tale, o, alternativamente, come materiale di partenza per l'ottenimento di altre molecole. In effetti, un approccio di trattamento di questa biomassa che si basa sulla produzione integrata di etanolo edibile, polifenoli, tartrato di calcio e cellule di lievito potrebbe significativamente migliorare la redditività del processo di frazionamento (De Iseppi et al., 2020; Dimou et al. 2016).

### **1.3.1 Applicazioni delle fecce di vino**

Le fecce di vino rappresentano una risorsa potenzialmente utile per il recupero di etanolo e composti polifenolici (Bustos et al., 2004). La concentrazione di etanolo nelle fecce può superare i 55 g/L, rendendole adatte al recupero attraverso il processo di distillazione. Inoltre, i composti polifenolici presenti potrebbero essere impiegati per la produzione di liquori aromatici.

È importante notare che le fecce di vino potrebbero offrire anche l'opportunità per il recupero dei Sali in esse contenuti. Tuttavia il processo di evaporazione potrebbe rivelarsi economicamente poco sostenibile a causa dell'alta richiesta energetica necessaria per

implementare questa procedura su scala industriale. Pertanto, mentre il recupero di etanolo e composti polifenolici è considerato praticabile, l'efficacia economica del recupero dei sali tramite evaporazione potrebbe rappresentare una sfida.

Tra i sali, i tartrati sono particolarmente interessanti a causa della loro elevata presenza nell'uva e, di conseguenza, nelle fecce e nella bagassa (residuo della macinazione e spremitura).

L'acido tartarico offre un ampio spettro di potenziali applicazioni nelle industrie alimentari. È un acido naturale e rappresenta quindi una scelta alternativa e popolare rispetto all'acido citrico e fosforico, ampiamente impiegati nel settore alimentare e delle bevande (Salgado et al., 2010).

L'acido tartarico viene utilizzato nella produzione di diverse categorie di prodotti alimentari, tra cui caramelle, prodotti da forno come biscotti e bevande quali le bibite gassate. L'attività antimicrobica dell'acido tartarico si traduce in una maggiore stabilità dei prodotti alimentari, riducendo la necessità di utilizzare agenti conservanti chimici o di sottoporli a processi termici intensi (Boulton et al., 1995). Questa caratteristica contribuisce alla qualità e alla sicurezza alimentare, sottolineando come l'acido tartarico sia un componente versatile e vantaggioso per l'industria alimentare.

In un contesto di ricerca applicata, Nurgel e Canbas (1998) hanno investigato la fattibilità di produrre acido tartarico da vinacce di alcune cultivar di uva.

Al fine di ottimizzare il processo di valorizzazione delle fecce di vino, Rivas et al. (2006) hanno sviluppato un approccio integrato, ulteriormente perfezionato da Salgado et al. (2010). Questo approccio comprende una fase di estrazione dell'acido tartarico con un elevato grado di purezza, contribuendo così a ridurre i costi associati alla successiva fase di evaporazione. Questi studi indicano prospettive promettenti per l'utilizzo sostenibile delle vinacce come risorsa per la produzione efficiente di acido tartarico.

Liu et al. (2010) hanno impiegato le vinacce come fonte di carbonio per la sintesi di acido L-lattico mediante un processo che coinvolge l'idrolisi enzimatica di cellulosa ed emicellulosa, seguita dalla fermentazione con *Lactobacillus casei*. L'obiettivo principale dello studio era la disgregazione del complesso cellulosa-lignina-emicellulosa, la riduzione della cristallinità della cellulosa e l'eliminazione della lignina al fine di migliorare l'accesso degli enzimi idrolitici ai substrati. Il trattamento ottimale è stato individuato nella combinazione tra il trattamento con NaOH all'8% e uno con microonde ad una potenza di 700 W. raggiungendo un tasso di idrolisi e utilizzo della cellulosa e dell'emicellulosa rispettivamente del 23,8% e del 71%. Di conseguenza, le vinacce sono state identificate come una fonte particolarmente

promettente per la produzione di acido lattico, offrendo un approccio efficiente per sfruttare al massimo queste biomasse di scarto.

Anche l'impiego delle fecce di vino come fertilizzante del terreno è stato oggetto di studio, tuttavia, la presenza di composti fenolici residui suscita preoccupazioni per la vitalità del microbiota del suolo (Bustamante et al., 2008).

In aggiunta, le fecce di vino hanno recentemente trovato applicazione nella generazione di biogas e digestato (residuo del processo di digestione anaerobica) di elevata qualità attraverso il processo di co-digestione anaerobica. Questa tecnica prevede il trattamento simultaneo dei sottoprodotti delle fecce di vino e dei fanghi attivi in condizioni mesofile o termofile. I risultati di Da Ros et al. (2014) indicano che entrambe le condizioni operative presentano rendimenti simili (0,40 m<sup>3</sup>/kg COD alimentato), sebbene con differenti livelli di stabilità del processo biologico.

### **1.3.2 Potenziale impiego come substrato nutrizionale in processi biotecnologici**

Le fecce di vino, birra e sidro potrebbero rappresentare una interessante fonte di composti che possono essere utilizzati come integratori nutrizionali nei processi di fermentazione industriale (Pérez-Bibbins et al., 2015). L'interesse deriva dal contenuto residuo delle fecce, che comprende carboidrati, composti azotati e, in particolare, metaboliti e componenti dei lieviti contenenti vitamine essenziali per altri microrganismi, come i batteri lattici. Questa caratteristica rende la feccia un potenziale integratore, analogamente all'estratto di lievito o al corn steep liquor (derivato dal mais) per la formulazione dei terreni di coltura utilizzati nei processi industriali di fermentazione. La presenza di tali composti fornisce una base nutrizionale che potrebbe favorire la crescita e l'attività di microrganismi specifici impiegati in vari processi, offrendo un'alternativa promettente ed economica per arricchire i substrati di coltura utilizzati nell'industria fermentativa (Salgado et al., 2009).

Le tecnologie di fermentazione devono dimostrare competitività rispetto alla sintesi chimica per implementare con successo i processi biotecnologici su larga scala industriale. L'estratto di lievito e il peptone sono comunemente impiegati come le principali fonti di azoto nei contesti fermentativi. L'estratto di lievito, in particolare, si distingue per la sua elevata concentrazione di purine, pirimidine e vitamina B.

Tuttavia, è essenziale sottolineare che sia il peptone che l'estratto di lievito, risultano costosi e possono rappresentare approssimativamente il 30-40% del costo complessivo di un processo fermentativo (Miller & Churchill, 1986).

Pertanto, emerge la necessità di condurre ricerche mirate alla scoperta di fonti nutritive alternative che siano economicamente competitive, allo scopo di ottimizzare i costi e rendere più sostenibili i processi su scala industriale.

Con l'obiettivo principale della riduzione dei costi di produzione nei processi di fermentazione microbica industriale, diversi mezzi colturali contengono sottoprodotti industriali o agricoli residuali, tra cui il permeato di siero di latte, la melassa, idrolizzati di caseina, idrolizzato di soia o il corn steep liquor.

In particolare, il corn steep liquor sembra essere la fonte di nutrienti più economica tra queste opzioni. Questo liquido viene impiegato con successo in diversi processi biotecnologici, compresa ad esempio la produzione di antibiotici o la produzione di xilitolo da parte del microrganismo *Debaryomyces hansenii*, (Carvalho et al., 2007), microrganismo comunemente impiegato per la bioconversione dello xilosio in xilitolo.

La possibilità di includere l'estrazione dei polifenoli nella lavorazione delle fecce di vino è stata presa in considerazione da Kopsahelis et al. (2018) che hanno sviluppato un protocollo partendo dalla separazione iniziale delle fecce di vino nelle loro frazioni solide e liquide.

La frazione liquida è stata quindi distillata per la produzione di etanolo, mentre la frazione solida è stata utilizzata come substrato per la produzione di lipidi da *Cryptococcus curvatus* e *Mortierella ramanniana*.

Pertanto, questo approccio ha previsto l'estrazione di tutti i preziosi componenti delle fecce di vino utilizzando quindi i residui solidi come substrato per ottenere un prodotto biotecnologico di alto valore.

Sulla base delle evidenze scientifiche, le fecce di vino si delineano come una possibile e interessante ed economica risorsa di nutrienti destinati a produzioni biotecnologiche su vasta scala. Questa risorsa potrebbe essere sfruttata come sopra riportato per la sintesi di additivi alimentari naturali ad alto valore aggiunto, tra cui xilitolo, acido lattico e citrico. Inoltre, si potrebbe considerare la produzione di biotensioattivi, con potenziali applicazioni nell'industria alimentare, medica e biotecnologica. Questa prospettiva sottolinea la possibilità di una valorizzazione più ampia delle fecce di vino, attraverso l'estrazione di composti di interesse che potrebbero contribuire a diverse aree industriali (Salgado et al., 2009).

## 1.4 PGPR

I batteri promotori della crescita delle piante (Plant Growth Promoting Rhizobacteria o PGPR) costituiscono una categoria di batteri del suolo che hanno dimostrato la capacità di promuovere direttamente o indirettamente la crescita delle piante (Mayak et al., 1999; Glick, 1995). Questo impatto positivo si traduce in una dimostrata efficacia competitiva rispetto alle comunità già esistenti nella rizosfera.

Coniato oltre quattro decenni fa, il concetto di PGPR fa riferimento a batteri non patogeni che colonizzano le radici delle piante, la cui presenza è associata ad un aumento nella resa delle piante, un fenomeno attribuibile a uno o più meccanismi specifici. In generale, i PGPR possono essere suddivisi in due categorie principali. La prima, denominata extracellulari (ePGPR), comprende batteri presenti nella rizosfera, sul rizopiano o negli spazi intercellulari della corteccia radicale. La seconda categoria, chiamata intracellulari (iPGPR), include batteri che si trovano all'interno delle cellule radicali, solitamente all'interno di strutture nodulari specializzate. Questa distinzione riflette la diversa localizzazione dei batteri e fornisce una base per comprendere la complessità delle interazioni tra PGPR e piante.

Tra i batteri promotori della crescita delle piante, possiamo identificare appartenenti a diversi generi, tra cui *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, e alcune Enterobacteriaceae. La sperimentazione diretta con microrganismi per stimolare la crescita delle piante e gestire i parassiti vegetali è un'area di ricerca in costante espansione.

Un passo iniziale cruciale per comprendere il ruolo di questi microrganismi è la loro colonizzazione della rizosfera, ovvero la zona del suolo in prossimità delle radici delle piante. La ricerca in questo campo si sta sviluppando rapidamente con l'obiettivo di sfruttare appieno il potenziale dei PGPR per migliorare la salute e la crescita delle piante agricole, riducendo così gli input chimici. I benefici derivanti da questi rizobatteri sono stati attribuiti a diversi caratteri, tra cui la loro capacità di fissare l'azoto atmosferico e solubilizzare il fosfato, di produrre composti quali fitormoni, acidi organici, siderofori o antibiotici, alla capacità, di secernere ormoni come acido indolacetico (IAA), gibberelline (GA) e citochinine, nonché alla produzione di deaminasi ACC (1-amminociclopropane-1-acido carbossilico), che contribuisce all'abbassamento della concentrazione dell'etilene (Glick et al., 1999) e ad altri meccanismi ancora non completamente identificati.

I fitormoni, sostanze chimiche endogene alle piante, esercitano un'influenza significativa su diversi aspetti cruciali del ciclo di vita vegetale, come la germinazione dei semi, lo sviluppo

dei sistemi radicali per migliorare l'assorbimento dei nutrienti, l'elaborazione del tessuto vascolare, l'allungamento dei germogli, la fioritura e, in generale, la crescita delle piante (Antar et al., 2021). Gli studi condotti da Sgroy et al. (2009) e Antar et al. (2021) indicano il potenziale dei fitormoni nel conferire alle piante una maggiore tolleranza allo stress ambientale. Inoltre, emerge la loro capacità di promuovere la crescita vegetale attraverso complessi meccanismi di regolazione. Le ricerche hanno evidenziato come gli ormoni prodotti dai microbi, come le auxine e le citochinine, presentino similitudini con i fitormoni sintetizzati dalle piante. Questa somiglianza consente ai fitormoni microbici di modulare i processi biochimici vegetali, influenzando direttamente la fotosintesi e favorire la crescita e lo sviluppo delle piante (Backer et al., 2018).

I batteri del suolo sono coinvolti anche nel processo di fissazione dell'azoto, uno dei nutrienti minerali più importanti per le piante poiché è parte integrante della maggior parte dei processi fisiologici, tra cui la fotosintesi e la sintesi proteica (Alori et al., 2017). I fissatori di azoto sono fondamentalmente classificati in due gruppi principali; i simbionti e i fissatori di azoto a vita libera, esclusivamente in base al loro tipo di associazione sviluppata con le piante. I fissatori simbiotici dell'azoto che includono generi come: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azoarcus*, *Mesorhizobium*, *Frankia*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Azorhizobium* e alcuni ceppi di *Achromobacter* (Babalola, 2010; Pérez-Montaña et al., 2014; Turan et al., 2016). Tra i principali azotofissatori liberi si riportano appartenenti ai generi *Azoarcus*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azospirillum* e *Azotobacter* (Vessey, 2003). Dopo l'azoto, il fosforo è il secondo macronutriente più richiesto dalle piante (Tak et al., 2012). Molti microrganismi benefici, inclusi batteri e funghi che vivono nel suolo, e quelli associati alle radici delle piante, sono in grado di solubilizzare il fosforo del suolo altrimenti insolubile (Bechtaoui et al., 2020). Il meccanismo principale seguito da quasi tutti i microbi solubilizzanti il fosforo è quello di produrre metaboliti, per lo più acidi organici, sotto forma di acidi gluconici e chetogluconici, che attraverso i loro gruppi idrossilici e carbossilici chelano i cationi legati al fosfato (Bates & Lynch, 2001; Vassilev et al., 2006; Heydari et al., 2007), solubilizzano così il fosforo insolubile nella soluzione del suolo e lo rendono accessibile all'assorbimento da parte delle piante (Riaz et al., 2021). Altri batteri solubilizzanti il fosforo sono in grado di mobilitare forme di fosforo difficilmente accessibili. Tra questi sono inclusi *Agrobacterium* spp, *Pseudomonas* spp (Babalola & Glick, 2012), *Bacillus* (Raj et al., 2014), *Rhizobium* (Tajini et al., 2012), *Paenibacillus* (Bidondo et al., 2011), *Burkholderia* (Istina et al., 2015), *Azotobacter* (Kumar et al., 2014), *Enterobacter* ed *Erwinia* (Chakraborty et al., 2009).

Anche il ferro è un elemento vitale per le piante e altri organismi fotosintetici poiché svolge un ruolo fondamentale come cofattore di enzimi coinvolti in vari processi metabolici come la fotosintesi, la sintesi degli amminoacidi, la respirazione, la fissazione dell'azoto e il trasporto dell'ossigeno. Alcuni batteri che promuovono la crescita delle piante sequestrano il ferro dal suolo rilasciando composti a basso peso molecolare che chelano il ferro, i siderofori, in grado di legare gli ioni di ferro e, infine, di rendere il ferro facilmente disponibile per l'assorbimento da parte delle cellule vegetali (Goswami et al., 2016). Inoltre, i siderofori secreti dai PGPR hanno un'affinità molto maggiore nei confronti del ferro rispetto a quelli prodotti dai funghi o dalla pianta stessa (Saha et al., 2016). Finora sono stati identificati oltre 500 siderofori terrestri e marini, con diverse strutture chimiche (Chu et al., 2010) e classificati in quattro gruppi principali: fenolati, idrossammati, pioverdine e carbossilati (Daly et al., 2017). Più del 90% degli isolati batterici produttori di siderofori appartengono ai batteri gram-negativi; dominano i generi *Enterobacter* e *Pseudomonas*; pochi generi gram-positivi come *Bacillus* e *Rhodococcus* sono invece in grado di produrre siderofori (Tian et al., 2009). Gli studi eseguiti suggeriscono che la maggior parte dei rizobatteri, selezionati dal suolo o dai tessuti delle radici dei vegetali, hanno la capacità di migliorare la crescita delle piante attraverso la produzione di siderofori se inoculati in terreni carenti di ferro (Tian et al., 2009). La produzione di siderofori da parte di microbi benefici associati al suolo/pianta è inoltre un meccanismo importante in termini di controllo biologico, poiché i PGPR competono con i patogeni delle piante per le fonti di ferro, con conseguente limitazione della disponibilità di ferro per questi patogeni (Shanmugaiah et al., 2015).

L'insieme di tutte queste caratteristiche sottolinea il ruolo multifunzionale degli inoculanti microbici e la loro potenziale applicazione in una serie di contesti agricoli e ambientali (Glick, 1995).

Parallelamente, sono stati identificati anche alcuni meccanismi indiretti attraverso i quali i PGPR favoriscono la crescita delle piante. Questi comprendono la resistenza sistemica indotta (ISR), il fenomeno dell'antibiosi, la competizione per i nutrienti, il parassitismo e la produzione di metaboliti. Questi ultimi giocano un ruolo cruciale nella soppressione dei microbi dannosi, contribuendo così all'ottimizzazione delle condizioni ambientali per la crescita vegetale. Il meccanismo della resistenza sistemica indotta i PGPR coinvolge la manipolazione delle proprietà fisiche e biochimiche della pianta ospite, fornendo un ulteriore strumento per la gestione delle patologie vegetali.

In sintesi, la presenza di PGPR nella rizosfera non solo migliora le condizioni nutrizionali per le piante, ma svolge anche un ruolo attivo nella protezione della salute delle piante attraverso strategie di esclusione e induzione di resistenza sistemica.

Attualmente, l'interesse per l'uso di bioinoculanti a base microbica è in aumento, ma ci sono sfide associate al passaggio dal laboratorio al campo. Questi bioinoculanti sono stati inizialmente saggiati su piante coltivate come legumi e cereali in laboratorio. Lo screening iniziale dei ceppi PGPR in laboratorio richiede la valutazione di specifici meccanismi di promozione della crescita delle piante. Tuttavia, il successo *in vitro* non garantisce un'efficace promozione della crescita in campo. Allo stesso tempo, isolati con bassa attività *in vitro* potrebbero avere strategie di promozione della crescita diverse e poco comprese, complicando lo screening in condizioni standard.

### **1.5 *Bacillus* sp come PGPR**

Il genere *Bacillus* emerge come il più abbondante nella rizosfera, e la sua attività come PGPR è stata oggetto di studi approfonditi per molti anni, permettendo una comprensione approfondita dei meccanismi coinvolti.

Alcune specie di *Bacillus* sono in grado di solubilizzare il fosfato, stimolare la crescita delle piante migliorando l'apporto nutritivo di fosforo. Questo processo, a sua volta, favorisce l'assorbimento di azoto, fosforo, potassio e ferro. L'impiego di biofertilizzanti contenenti fosforo potrebbe contribuire ad aumentare la disponibilità dei fosfati presenti nel suolo, potenziando la crescita delle piante attraverso un miglioramento dell'efficienza della fissazione biologica dell'azoto e un aumento dell'accessibilità di ferro e zinco. Questo avviene grazie alla produzione di sostanze che promuovono la crescita delle piante.

I diversi ceppi di *Bacillus* impiegati come biofertilizzanti sembrano influire positivamente sulla crescita delle piante, verosimilmente grazie alla produzione diretta di ormoni che stimolano lo sviluppo vegetale (Amer & Utkhede, 2007).

In particolare, alcuni ceppi di *Bacillus* naturalmente presenti in rizosfera rilasciano numerosi metaboliti (Charest et al., 2005), che hanno un impatto significativo sull'ambiente, contribuendo all'aumento della disponibilità di nutrienti per le piante.

La produzione di ormoni come GA e IAA è uno dei meccanismi diretti esibiti dagli appartenenti al genere *Bacillus* (García-Fraile et al., 2015). La biosintesi dei fitormoni da parte di questi rizobatteri è stata direttamente collegata alla disponibilità di nutrienti e alla successiva promozione della crescita in diverse piante (Stamenkovic et al., 2018). Ad

esempio, è stato riportato che l'inoculazione di piantine di pomodoro in vaso con sospensioni cellulari di *B. subtilis* migliora la crescita dei germogli e delle radici, il vigore delle piantine e l'area fogliare delle piante e livelli più elevati di GA e IAA sono stati rilevati nelle piante trattate, rispetto alle piante non trattate (Chowdappa et al., 2013).

L'isolamento dei rizobatteri produttori di IAA e la loro applicazione sulle colture è stato proposto come un modo promettente per aumentare la fertilità del suolo e la produzione vegetale (Vejan et al., 2016).

È noto anche che i GA influenzano molti processi di sviluppo come la germinazione dei semi, l'allungamento dello stelo, la fioritura e la fruttificazione nelle piante (Hedden & Phillips, 2000), nonché un maggiore allungamento dei germogli e la formazione delle gemme fogliari (Srivastava, 2002).

Le Bacillaceae sono tra gli agenti di bioprotezione delle piante più studiati (Przemieniecki et al., 2018) e l'uso e il numero di questi batteri importanti per l'attività antagonista stanno aumentando rapidamente, soprattutto a causa del loro ampio spettro di azione contro i patogeni vegetali (Shafi et al., 2017).

Tra i bacilli che svolgono un'azione come bioprotettori delle piante sono inclusi *B. simplex* (Schwartz et al., 2013), *B. amyloliquefaciens* (Idris et al., 2007), *B. thuringiensis* (Bai et al., 2003), *B. megaterium* (López-Bucio et al., 2007) e *B. subtilis* (Ashwiri & Srividya, 2013). Ad esempio, è stato dimostrato che *B. amyloliquefaciens* possiede attività antifungina contro *Puccinia striiformis* (Reiss & Jørgensen, 2017).

Le indagini di Wei et al. (2011), hanno rivelato la capacità di questo batterio nel ridurre le infezioni causate da *Ralstonia solanacearum* nelle piante di patata. In un altro rapporto di Etesami e Alikhani (2017), si è evidenziato che *B. cereus* ha il potenziale di controllare molti funghi patogeni del riso dimostrando di essere efficace anche nella bioprotezione del pisello dei tropici (*Cajanus cajan*) contro diversi agenti patogeni fungini (Rani et al., 2011).

Oltre alla produzione di siderofori e agli antibiotici, numerosi bacilli rizosferici producono anche enzimi litici come chitinasi, glucanasi e chitosanasi (Shafi et al., 2017), le cui attività di difesa sono state dimostrate contro vari patogeni vegetali (Shafi et al., 2017; Thilagavathi et al., 2007). I potenziali e principali agenti di biocontrollo con attività chitinolitica includono *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis* (Sadfi et al., 2001).

*B. subtilis* ha dimostrato la capacità di stabilire una relazione stabile con le piante superiori, promuovendone la crescita. Nell'ambito di un sistema di micropropagazione vegetale, l'inoculazione batterica all'inizio della fase di acclimatazione rivela un impatto significativo sulla formazione della rizosfera e sul microbiota del suolo. *B. licheniformis*, quando applicato

su coltivazioni di pomodoro e peperone, manifesta una capacità di colonizzazione notevole, rendendolo un potenziale biofertilizzante senza interferire con le normali pratiche di gestione delle serre (Garcia et al., 2004).

La stimolazione della crescita e il controllo delle malattie da parte di *Pseudomonas* e *Bacillus* sono processi complessi che coinvolgono meccanismi diretti e indiretti. Tali meccanismi comprendono la sintesi di specifici metaboliti (auxine, citochinine, gibberelline, l'induzione dell'enzima 1-amino ciclopropano-1-carbocilato deaminasi, siderofori, antibiotici, acido cianidrico (HCN) e composti volatili) (Abbasdokht & Gholam, 2010).

Jaizme-Vega et al. (2004) hanno esaminato gli effetti di un consorzio di rizobatteri appartenenti al genere *Bacillus* sugli stadi iniziali di sviluppo di due varietà di banane micropropagate. La conclusione a cui sono giunti gli autori è che l'applicazione di questo consorzio batterico potrebbe rappresentare un metodo promettente per migliorare la salute delle piante e aumentare i tassi di sopravvivenza nei vivai commerciali.

Altri studi hanno dimostrato che il genere *Bacillus* ha il potenziale per incrementare la resa, favorire la crescita e migliorare la nutrizione delle piante di lampone in contesti di coltivazione biologica. I risultati di questa ricerca suggeriscono che l'applicazione di tale consorzio batterico potrebbe contribuire in modo significativo alla produttività e alla salute delle piante in ambienti colturali specifici (Orhan et al., 2006).

*B. megaterium* dimostra la capacità di migliorare il sistema radicale della pianta di menta, in termini di prestazioni, lunghezza e contenuto di sostanza secca delle radici (Kaymak et al., 2008).

L'utilizzo di ceppi batterici specifici, come *B. megaterium* var. *phosphaticum* e *B. mucilaginosus*, batterio solubilizzante il potassio, in terreni poveri di nutrienti si è dimostrato promettente. Difatti, gli studi condotti su terreni poveri di nutrienti hanno evidenziato che entrambi i ceppi batterici, hanno costantemente incrementato la disponibilità di minerali nel suolo, facilitando l'assorbimento e promuovendo la crescita delle piante di peperone e cetriolo. Questi risultati indicano quindi un potenziale impiego di tali ceppi come fertilizzanti. In aggiunta, *B. pumilus* ha mostrato efficacia come biofertilizzante utilizzato per incrementare la resa della varietà di grano Orkhon in Mongolia. Questi studi, condotti da Han et al. (2006) e Supanjani et al. (2006), suggeriscono la possibilità di utilizzare questi microrganismi benefici per migliorare la fertilità del suolo e ottimizzare la produzione agricola in pieno campo (Hafeez et al., 2006).

L'efficienza di *Bacillus* rispetto ad altri rizobatteri è stata costantemente attribuita alla sua capacità di produrre spore resistenti agli stress ambientali (Rayavarapu & Padmavathi,

2016). I Bacilli che vivono in rizosfera sono noti per essere resistenti alle condizioni ambientali avverse grazie alla loro capacità di produrre endospore resistenti, carattere che li ha resi agenti di controllo biologico molto interessanti. Secondo alcuni ricercatori, le spore li fanno sopravvivere a temperature, pH e condizioni osmotiche estremi e li rendono più competitivi rispetto ad altri microrganismi (Kumar et al., 2014).

La capacità delle spore di sopravvivere per lunghi periodi di tempo è particolarmente interessante perché aiuta ad aumentare la durata di conservazione dei prodotti commerciali, rendendo quindi le formulazioni facilmente adattabili e attraenti per applicazioni sul campo (Adesemoye et al., 2017).

È noto che le endospore di *B. subtilis* contribuiscono alla loro elevata attività contro numerosi patogeni fungini, grazie alla capacità delle spore di resistere a condizioni ambientali estreme (Shafi et al., 2017).

Oltre alla sporulazione, i bacilli possiedono molte altre importanti proprietà che aumentano le loro possibilità di sopravvivenza nell'ambiente (Rosas-Garcia, 2009). Ad esempio, sebbene siano aerobici, hanno la capacità di sopravvivere in condizioni anossigeniche estreme (Silini-Cherif et al., 2012). Ciò consente loro di sopravvivere in diverse condizioni ambientali a basso tensione di ossigeno e li dota di un vantaggio competitivo rispetto ad altri rizobatteri (Cawoy et al., 2011).

Inoltre, anche la loro flessibilità metabolica e la capacità di replicarsi rapidamente li ha resi idonei candidati PGPR poiché la veloce capacità di colonizzazione è uno dei fattori critici per il successo delle attività di biocontrollo (Cavaglieri et al., 2005).

## Capitolo 2- Scopo della tesi

L'obiettivo di questo elaborato di tesi è quello di esplorare una nuova frontiera nell'ambito dell'allestimento di terreni di coltura per ceppi batterici attraverso l'utilizzo di prodotti di scarto derivanti dal mondo vinicolo.

In sintesi, lo studio si propone di esplorare se le fecce, rifiuti semisolidi e inquinanti, derivanti dalla fermentazione del vino, possano essere utilizzati come potenziale mezzi colturali per batteri PGPR, contribuendo a diminuire gli alti costi di produzione nell'industria fermentativa legati alle fonti carboniose.

Nello studio sono stati utilizzati due ceppi batterici, *B. toyonensis* sp27 e il *P. humicus* sp29, isolati da ambiente apicolo. La loro capacità di crescere è stata saggiata con terreni di coltura contenenti fecce (sia la frazione solida che liquida); sono state poi predisposte due possibili formulazioni commerciali e si è monitorata nel tempo la vitalità dei microrganismi nei prodotti, al fine di identificare sia la composizione migliore del mezzo di crescita, sia la formulazione di prodotto in grado di sostenere meglio nel tempo la vitalità dei batteri.

## Capitolo 3 - Materiali e metodi

### 3.1 Fecce utilizzate

Le fecce di prosecco utilizzate per questo studio sono di seconda generazione e provengono dalla Distilleria Castagner di Vazzola (TV).

Una volta che lo scarto della vinificazione è arrivato in laboratorio, è stato centrifugato a 5000 giri al minuto per 10 minuti mediante centrifuga refrigerata (Sigma 3K15 Refrigerated Centrifuge), ottenendo così due fasi:

- una frazione solida che è stata recuperata, sterilizzata in autoclave verticale (FVG Fedegari Groupper) per 15 minuti a 120°C e in parte essiccata in forno a 65°C per 24-48 ore (WL solida).
- una frazione liquida è stata distillata tramite Rotavapor (Buchi RE111) per ridurre al minimo la concentrazione di etanolo, portata a pH 6.5 con una soluzione di NaOH 5M e sterilizzata in autoclave (WL liquida).

### 3.2 Ceppi batterici utilizzati

I ceppi batterici usati per questi esperimenti sono stati gentilmente donati dalla prof.ssa Di Gioia (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Università di Bologna).

Per l'esecuzione di questo lavoro di tesi sono stati impiegati:

- *B. toyonensis* sp27, isolato dal polline fermentato di api mellifere (gene bank accession number MG650046) (Alberoni, 2018).
- *P. humicus* sp29, isolato dal miele, (gene bank accession number MG650046) (Alberoni, 2018).

Per il mantenimento dei ceppi nella collezione di DAFNAE, biomasse dei due microrganismi, dopo crescita in piastre di Nutrient agar (NA: D (+)-glucosio, 1 g/L peptone, 15 g/L NaCl, 3 g/L estratto di lievito; addizionato di 18 g/L di agar agar, HI Media), sono stati risospesi in Nutrient Broth (NB) sterile addizionato di glicerolo al 25% e congelate a -80°C fino al momento dell'uso.

### 3.3 Colture batteriche

#### 3.3.1 Valutazione della crescita batterica tramite misura dei microrganismi coltivabili

Il numero dei batteri coltivabili è stato valutato negli esperimenti secondo il metodo della diluizione/piastratura su piastre petrie e conta delle CFU (colony forming units) risultanti dopo incubazione. La crescita è espressa come numero dei batteri coltivabili presenti per 1 mL di coltura (CFU/mL) o grammo di prodotto se solido (CFU/g).

Per l'esecuzione dei test, la sospensione batterica da analizzare è stata diluita in maniera seriale. Da ogni diluizione effettuata, sono stati prelevati 100 µL che sono stati a loro volta piastrati in terreno nutritivo solido (NA) e distribuiti in maniera omogenea su tutta la superficie della piastra con una spatola sterile.

Le piastre sono state poi capovolte e incubate per consentire la crescita delle colonie. La concentrazione (CFU/mL o g) è stata calcolata applicando la seguente formula:

$$\frac{\text{numero delle colonie}}{0,1 \text{ mL}} \times \text{fattore di diluizione}$$

#### 3.3.2 Valutazione della crescita batterica tramite misura della densità ottica

Per le matrici liquide e non torbide, la valutazione della crescita batterica è stata effettuata anche tramite la rilevazione della densità ottica. La lettura spettrofotometrica è stata effettuata tramite Spettrofotometro UV VIS Onda UV-21 alla lunghezza d'onda di 600 nm (OD<sub>600 nm</sub>).

#### 3.3.3 Valutazione della crescita di *B. toyonensis* sp27 nella frazione solida secca delle fecce

Per la coltivazione di *B. toyonensis* sp27 sulla frazione solida delle fecce è stato preparato un preinoculo in 15 mL di NB incubato per 24 ore a 30°C. Terminata l'incubazione, la sospensione ottenuta è stata centrifugata e poi risospesa in 45 mL di una soluzione di sodio cloruro (NaCl) 0.9% sterile e aliquote di 3 mL sono state inoculate in beute con diversi terreni da valutare e qui sotto descritti.

- Terreno NB

- Terreno Mineral Medium (MM) arricchito con 15g/L di glucosio. Terreno MM (modificato da Hankin and Anagnostakis, 1975) è composto da: 2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g Na<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub>; 0,2 g FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 1 mg CaCl, 10 µm H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 70 µg ZnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O; 50 µg CuSO<sub>4</sub>.
- Terreno Mineral Medium (MM) arricchito con Yeast Extract (YE) 2 g/L
- Terreno MM addizionato di WL solida. Il quantitativo della porzione solida della feccia è stato stabilito al fine di garantire al mezzo di coltura la stessa quantità di Carbonio presente nel terreno MM addizionato con i 15 g/L di glucosio.
- Terreno Mineral Medium (MM) arricchito con Yeast Extract (YE) 2 g/L e WL solida.

I mezzi di coltura sono stati preparati in beute da 150 mL contenenti un volume totale di 50 mL per ciascun terreno e dopo inoculazione, le beute sono stati incubate per 36 h a 30°C. A tempo 0 (T0) e a tempo 36 ore (T36), è stata effettuata una conta delle Unità Formanti Colonie (CFU) utilizzando la tecnica delle diluizioni scalari e piastratura su NA sopradescritta.

### **3.3.4 Valutazione della crescita di *B. toyonensis* sp27 nella frazione liquida delle fecce**

Per la coltivazione di *B. toyonensis* sp27 nella frazione liquida delle fecce (WL liquida) è stato preparato un preinoculo in 15 mL di NB e uno in WL liquida + sali dell'MM e incubati per 24 ore a 30°C. Terminata l'incubazione, le sospensioni ottenute sono state centrifugate e poi risospese rispettivamente in 15 mL di una soluzione di sodio cloruro (NaCl) 0.9% sterile (preinoculo in NB) e 40 mL di NaCl 0,9% (preinoculo in WL liquida + sali).

Nel primo caso sono state prelevate aliquote di 5 mL (da preinoculo di NB) mentre per la sospensione in WL liquida + sali sono state prelevate aliquote di 4 mL e sono state inoculate in beute da 150 mL contenenti 50 mL dei terreni di crescita da valutare.

Nel dettaglio, sono stati utilizzati:

- NB
- WL liquida pura
- WL liquida + sali dell'MM
- WL liquida + 2g/L di YE
- WL liquida + 2g/L di YE + sali dell'MM

Le beute sono state incubate per 36 h a 30°C in agitazione.

La crescita batterica è stata monitorata a tempo 0, 8, 24 e 36 misurando l'OD<sub>600 nm</sub> e con conta delle Unità Formanti Colonie (CFU) utilizzando la tecnica delle diluizioni scalari e piastratura su NA.

#### **3.3.4.1 Ottenimento di un inoculante contenente *B. toyonensis* sp27 a partire da porzione liquida delle fecce con sali dell'MM**

Al fine di ottenere inoculanti microbici da utilizzare in pieno campo o in serra, si sono valutati due carrier: Farina Fossile (Agrobull) e Vermiculite (Vermiculita Battle Huerto y Jardin). Dopo 36 ore di crescita del microrganismo in WL liquida + sali, la sospensione batterica è stata centrifugata e risospesa in 50 mL di NB o in 50 mL di WL liquida + Sali dell'MM. Successivamente, le sospensioni sono state diluite 1:10 e 1:100 nel rispettivo mezzo di coltura per valutare diverse concentrazioni di partenza. 0,8 mL sono stati inoculati in 2 g di Vermiculite e in 2 g di Farina Fossile. Il primo carrier è stato sterilizzato in autoclave prima dell'uso, mentre la Vermiculite è stata lavata per 24 ore in acqua corrente, essiccata e sterilizzata in autoclave.

Dopo 7 e 21 giorni a temperatura ambiente, si sono determinati i batteri vivi e coltivabili tramite la tecnica della diluizione piastratura. A tale scopo 2 g di Vermiculite e 2 g di Farina fossile sono stati risospesi in 18 mL di NaCl 0.9% sterile e poi determinate le CFU/g come sopradescritto.

#### **3.3.5 Valutazione della crescita di *P. humicus* sp29 nella frazione liquida delle fecce**

Per la coltivazione di *P. humicus* sp29 nella frazione liquida delle fecce (WL liquida) sono stati ottenuti un preinoculo in 15 mL di NB e uno di WL liquida + sali dell'MM e incubati per 24 ore a 30°C. Terminata l'incubazione, le sospensioni ottenute sono state centrifugate e poi risospese rispettivamente in 15 mL di una soluzione di NaCl 0.9% sterile e 45 mL di NaCl 0,9%.

Dalla prima sospensione, derivante da preinoculo di NB, sono state prelevate aliquote di 6 mL mentre per la seconda sospensione sono state prelevate aliquote di 4 mL, utilizzate per inoculare beute da 150 mL contenenti 50 mL dei terreni da valutare.

Nel dettaglio, sono stati utilizzati:

- NB

- WL liquida pura
- WL liquida + sali dell'MM
- WL liquida + 2g/L di YE
- WL liquida + 2g di YE + sali dell'MM

Le beute sono state incubate per 48 h a 30°C in agitazione.

La crescita batterica è stata monitorata a tempo 0, 8, 24, 36 e 48 misurando sia l'OD<sub>600 nm</sub> sia le Unità Formanti Colonie (CFU) utilizzando la tecnica delle diluizioni scalari e piastratura su NA.

### **3.3.5.1 Ottenimento di un inoculante contenente *P. humicus* sp29 a partire da porzione liquida delle fecce e sali dell'MM**

Al fine di ottenere inoculanti microbici da utilizzare in pieno campo o in serra, si sono valutati due carrier: Farina Fossile e Vermiculite. Dopo 36 ore di crescita del microrganismo in WL liquida + sali, la sospensione batterica è stata centrifugata e risospesa in 50 mL di NB o in 50 mL di WL liquida + sali. Successivamente, le sospensioni sono state diluite 1:10 e 1:100 nel rispettivo mezzo di coltura per valutare diverse concentrazioni di partenza. 0,8 mL sono stati inoculati in 2 g di Vermiculite e in 2 g di Farina Fossile. Il primo carrier è stato sterilizzato in autoclave prima dell'uso, mentre la Vermiculite è stata lavata per 24 ore in acqua corrente, essiccata e sterilizzata in autoclave.

Dopo 7 e 21 giorni a temperatura ambiente, si sono determinati i batteri vivi e coltivabili tramite la tecnica della diluizione piastratura. A tale scopo 2 g di Vermiculite e 2 g di Farina fossile sono stati risospesi in 18 mL di NaCl 0.9% sterile.

### **3.4 Analisi statistica**

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. I risultati sono riportati come media dei valori e riportati come media  $\pm$  deviazione standard (DS).

## Capitolo 4 - Risultati

Questo studio ha avuto come obiettivo principale la valorizzazione delle fecce di prosecco di seconda generazione provenienti dalla Distilleria Castagner di Vazzola (TV). Con questo scopo sono stati allestiti terreni di coltura ed è stata valutata la crescita di specifici ceppi batterici.

Nello studio sono stati utilizzati *B. toyonensis* sp27, isolato dal polline fermentato dalle api mellifere, e *P. humicus* sp29, estratto dal miele; entrambi i ceppi provengono dalla collezione dell'Università di Bologna.

I microrganismi oggetto di studio sono non patogeni, in grado di colonizzare le radici delle piante e hanno un effetto PGPR; infatti sono capaci di aumentare la resa agronomica di queste ultime attraverso un insieme di processi e di meccanismi ancora non conosciuti.

Nello studio è stata saggiata *in primis* la capacità di crescere dei due ceppi batterici soprariportati, in terreni di coltura opportunamente allestiti contenenti la frazione solida e liquida delle fecce di prosecco con l'obiettivo ultimo di studiare se le fecce derivanti dalla fermentazione del vino potessero essere utilizzate come un potenziale mezzo di coltura per batteri PGPR.

### 4.1 *B. toyonensis* sp27

#### 4.1.1 Crescita di *B. toyonensis* sp27 nella frazione solida e liquida delle fecce

Per quanto riguarda la crescita nella frazione solida essiccata di *B. toyonensis* sp27, è stato condotto un test preliminare. Dai risultati riportati in tabella 1, si evince che questo substrato non sostiene la crescita batterica e anzi, dopo 36 ore il numero di microrganismi coltivabili è addirittura inferiore di circa 2 logaritmi rispetto al tempo 0 (T0). Anche il solo estratto di lievito non è comunque sufficiente a sostenere la crescita in MM di *B. toyonensis* sp27.

**Tabella 1.** Valutazione della crescita di *B. toyonensis* sp27 in terreno colturale contenente feccia solida secca a T0 e T36 ore. L'esperimento è stato condotto in triplicato con una DS inferiore al 5%.

Mezzo colturale	CFU/mL	
	T0	T36
MM + frazione solida	1,35 X 10 <sup>7</sup> /mL	4 X 10 <sup>5</sup> /mL
MM + frazione solida + 2 g/L YE	1,35 X 10 <sup>7</sup> /mL	10 <sup>5</sup> /mL
MM + 2 g/L YE	1,35 X 10 <sup>7</sup> /mL	4,72 X 10 <sup>6</sup> /mL

Per tali ragioni la frazione solida delle fecce è stata abbandonata e si sono invece condotti altri esperimenti utilizzando la frazione liquida (WL (I)). I risultati sono riportati in figura 2.

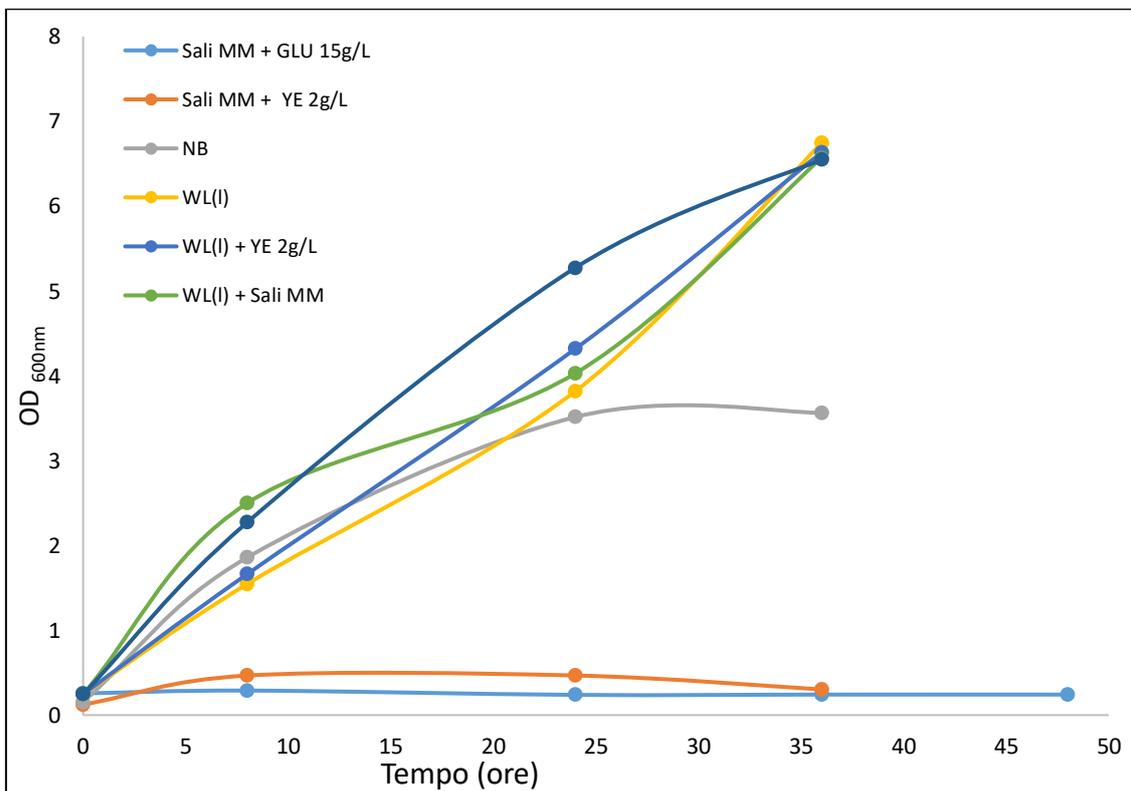
In MM addizionato di glucosio (15 g/L) o di estratto di lievito (2 g/L), si osserva una crescita molto limitata di *B. toyonensis* sp27 che raggiunge un'OD massima di 0,4675.

Quando *B. toyonensis* sp27 viene coltivato in NB, dopo la crescita esponenziale, a circa T 25 ore viene raggiunta la fase stazionaria.

In terreno contenente feccia liquida si osserva una buona crescita: viene raggiunta un'OD massima di 6,635 e si arriva in fase stazionaria dopo circa 20-24 ore. L'aggiunta di sali alla componente liquida delle fecce sembra migliorare leggermente lo sviluppo microbico. L'aggiunta di estratto di lievito da solo sembra invece rallentare leggermente la crescita, mentre l'aggiunta di sali insieme all'estratto di lievito la ripristina a livelli superiori. Tali osservazioni suggeriscono che i sali potrebbero giocare un ruolo cruciale come fattore limitante nella crescita batterica e che le fecce utilizzate come substrato per la crescita microbica potrebbero contenere quantità insufficienti di sali necessari per sostenere una crescita ottimale.

La semplice integrazione di sali potrebbe compensare la mancanza di sali nelle fecce, permettendo così ai batteri PGPR di raggiungere la loro massima efficienza di crescita. Questa constatazione è significativa, poiché suggerisce che la formulazione del substrato di coltivazione per i batteri PGPR deve essere attentamente bilanciata, tenendo conto di

tutti i nutrienti essenziali, compresi i sali. La comprensione di questi fattori è fondamentale per ottimizzare il processo di coltivazione dei batteri PGPR, rendendolo più efficiente ed economicamente vantaggioso. Ulteriori studi potrebbero approfondire questa relazione tra estratto di lievito, sali e crescita batterica, contribuendo così a sviluppare pratiche di coltivazione più efficaci e sostenibili.



**Figura 2.** Curva di crescita di *B. toyonensis* sp27 in diversi substrati di coltura. L'esperimento è stato condotto in triplicato con una DS inferiore al 5%.

A T 36 ore si sono misurate nel brodo colturale le cellule coltivabili. I risultati sono riportati in tabella 2. In termini di CFU/mL, tutti i terreni contenenti fecce sembrano sostenere la crescita di *B. toyonensis* sp27 e non si notano differenze significative tra le condizioni analizzate.

**Tabella 2.** Cellule vitali e coltivabili durante la crescita di *B. toyonensis* sp27 in diversi terreni colturali liquidi. L'esperimento è stato condotto in triplicato e si è riportata la DS.

Tempo (ore)	CFU/mL				
	NB	WL(I)	WL(I) + 2 g/L YE	WL(I) + Sali	WL(I) + 2 g/L YE + Sali
0	5,72E+06	2,07E+07	2,07E+07	2,07E+07	2,07E+07
8	1,23E+07 ± 0,382	3,78E+07 ± 1,24	6,88E+07 ± 0,389	7,10E+07 ± 0,269	8,90E+07 ± 1,27
24	8,15E+07 ± 1,63	4,55E+07 ± 0,354	1,21E+08 ± 0,559	9,25E+07 ± 1,06	1,87E+08 ± 0,255
36	1,28E+08 ± 0,170	2,90E+08 ± 0,141	2,34E+08 ± 0,085	2,08E+08 ± 0,672	1,85E+08 ± 0,346

#### 4.1.2 Ottenimento di inoculanti su substrato solido contenenti *B. toyonensis* sp27

Dopo 36 ore di crescita, le biomasse ottenute di *B. toyonensis* sp27 derivanti da WL + sali sono state lavate e risospese in terreno NB o WL + sali e utilizzate per inoculare polvere di vermiculite e di farina fossile al fine di ottenere un possibile inoculante da utilizzare in campo. Il numero di CFU/g è stato monitorato dopo 7 e 21 giorni. I risultati sono riportati in tabella 3 e 4. Dopo 21 giorni a temperatura ambiente, in vermiculite il numero di CFU/g di substrato supera i 10<sup>8</sup>/g in NB e in WL + sali, sia partendo dalla concentrazione di 5,89 x 10<sup>5</sup> che 5,89 x10<sup>6</sup> /g di carrier. Risultati analoghi si ottengono in carrier di farina fossile.

**Tabella 3.** Crescita (CFU/g) di *B. toyonensis* sp27 in vermiculite a temperatura ambiente. L'esperimento è stato condotto in triplicato ed è stata riportata la DS.

CFU/g di vermiculite			
Mezzo di crescita	T0	7gg	21 gg
NB	$5,89 \times 10^6 \pm 0,12$	$2,95 \times 10^8 \pm 0,142$	$2,16 \times 10^8 \pm 0,094$
	$5,89 \times 10^5 \pm 0,12$	$1,34 \times 10^8 \pm 0,064$	$1,4 \times 10^8 \pm 0,156$
WL(I) + SALI MM	$4,11 \times 10^6 \pm 0,154$	$1,65 \times 10^8 \pm 0,104$	$1,27 \times 10^8 \pm 0,234$
	$4,11 \times 10^5 \pm 0,154$	$2,17 \times 10^8 \pm 0,158$	$2,15 \times 10^8 \pm 0,246$

**Tabella 4.** Crescita (CFU/g) di *B. toyonensis* sp27 in farina fossile a temperatura ambiente. E' riportata la DS.

CFU/g di farina fossile			
Mezzo di crescita	T0	7gg	21 gg
NB	$5,89 \times 10^6 \pm 0,12$	$2,77 \times 10^8 \pm 0,173$	$2,21 \times 10^8 \pm 0,183$
	$5,89 \times 10^5 \pm 0,12$	$3,61 \times 10^8 \pm 0,149$	$1,85 \times 10^8 \pm 0,271$
WL(I) + SALI MM	$4,11 \times 10^6 \pm 0,154$	$1,17 \times 10^8 \pm 0,162$	$1,6 \times 10^8 \pm 0,233$
	$4,11 \times 10^5 \pm 0,154$	$1,85 \times 10^8 \pm 0,054$	$1,31 \times 10^8 \pm 0,134$

## 4.2 *P. humicus* sp29

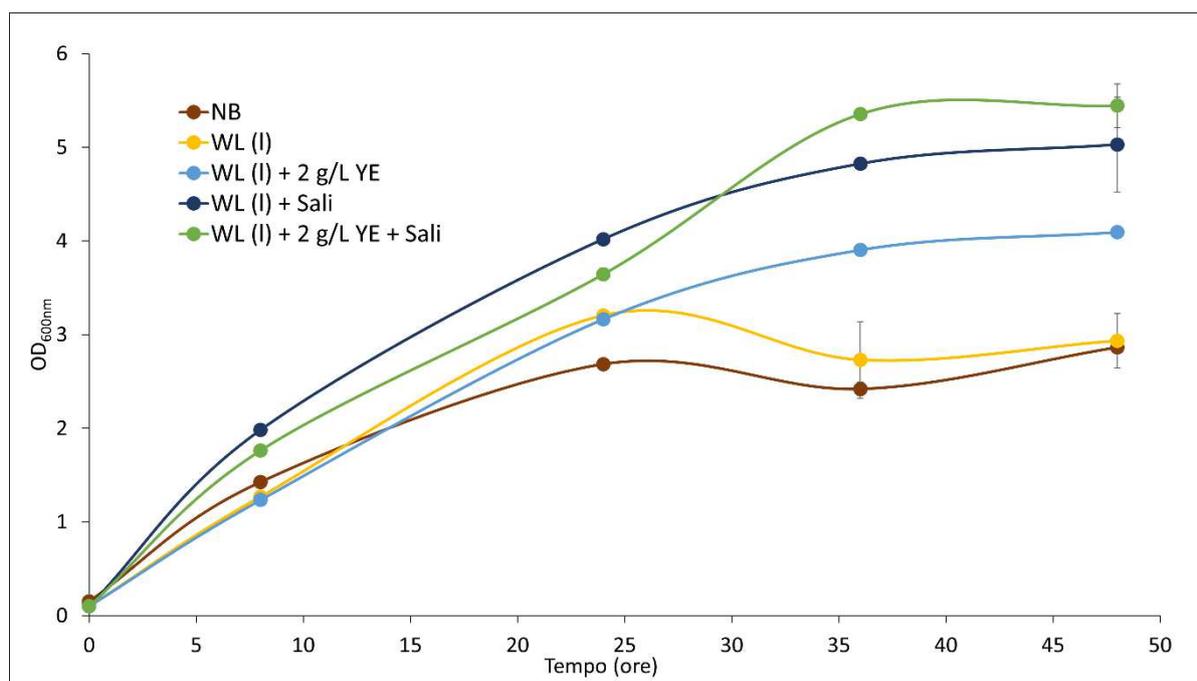
### 4.2.1 Crescita di *P. humicus* sp29 nella frazione liquida delle fecce

Anche per *P. humicus* sp29 si è saggiato come substrato di crescita NB a confronto con il terreno WL + sali, WL + 2g/L YE e WL + 2g/L YE + sali.

La figura 3 riporta le curve di crescita ottenute in seguito al monitoraggio per 48 ore della crescita del batterio nei diversi terreni. Come si può notare dai valori delle assorbanze rilevate a 600nm, la coltura in WL + sali, WL + estratto di lievito o con entrambe le componenti, ha sostenuto la crescita e vitalità di *P. humicus* sp29 nel tempo rispetto alla coltura nel terreno di riferimento NB o nel solo WL. In particolare, al tempo finale di

monitoraggio (48 ore), la coltura in cui si sono riscontrati valori di una migliore vitalità batterica, è stata quella in cui è stato usato WL + 2g/L di YE + sali.

La fase stazionaria vien raggiunta dopo circa 24 ore in NB e dopo 30-35 ore negli altri mezzi. Il terreno WL sembra supportare la crescita di *P. humicus* sp29 in maniera simile a NB sia in termini dell'OD finale sia in termini di andamento. Come si può notare dai valori delle assorbanze rilevate a 600nm, il terreno WL + sali, con e senza estratto di lievito, sembra meglio sostenere la crescita di *P. humicus* rispetto a terreno di riferimento NB o nel solo WL. I mezzi di coltura in cui si sono riscontrati valori di assorbanza migliori, sono stati WL + 2g/L di YE+ sali e WL + sali. Mentre l'estratto di lievito da solo, pur consentendo di raggiungere OD finali superiori a quelle con NB o con le fecce da sole, non da gli stessi risultati ottenuti con l'aggiunta di soli sali. Si può quindi concludere ancora una volta che nel terreno WL manchino microelementi contenuti nella soluzione salina aggiunta.



**Figura 3.** Crescita di *P. humicus* sp29 in diversi mezzi di coltura. L'esperimento è stato condotto in triplicato ed è riportata la DS.

Durante la crescita, sono state valutate anche le CFU/mL. I risultati sono riportati in tabella 5. NB, WL e WL+ estratto di lievito danno performances simili in termini di CFU/mL dopo 48 ore. In presenza di sali si ottengono valori di CFU/mL superiori di almeno un logaritmo

rispetto ai terreni senza sali. La presenza di sali nel mezzo di coltura si conferma quindi fondamentale per favorire una crescita batterica ottimale. Nel caso del mezzo di coltura WL, che risulta evidentemente carente di sali essenziali per la crescita batterica, l'integrazione di sali rappresenta una strategia chiave per migliorare la crescita microbica. I sali forniscono agli organismi un ambiente più completo e bilanciato, garantendo una disponibilità ottimale di ioni essenziali per le funzioni cellulari quali la sintesi di DNA, RNA e proteine, nonché per il mantenimento dell'omeostasi cellulare.

L'aggiunta di sali al mezzo WL sembra ripristinare efficacemente le carenze presenti, creando un ambiente di coltura più ricco e favorevole alla crescita batterica.

**Tabella 5.** CFU/mL di *P. humicus* sp29 durante la crescita in diversi substrati. L'esperimento è stato condotto in triplicato ed è riportata la deviazione standard.

Tempo (ore)	CFU/mL				
	NB	WL(I)	WL(I) + 2 g/L YE	WL(I) + sali	WL(I) + 2 g/L YE + sali
<b>0</b>	2,52E+06	2,94E+06	2,94E+06	2,94E+06	2,94E+06
<b>8</b>	8,75E+06 ± 1,06	5,05E+07 ± 0,354	6,85E+07 ± 0,919	6,92E+07 ± 1,17	4,41E+07 ± 0,035
<b>24</b>	3,29E+07 ± 0,87	1,36E+08 ± 0,035	6,01E+07 ± 0,651	1,02E+08 ± 0,081	9,24E+07 ± 0,587
<b>36</b>	9,03E+07 ± 0,53	6,01E+07 ± 1,43	4,23E+07 ± 0,884	1,77E+08 ± 1,20	1,61E+08 ± 0,035
<b>48</b>	6,98E+07 ± 0,46	5,69E+07 ± 1,46	5,86E+07 ± 0,622	2,10E+08 ± 1,60	1,71E+08 ± 0,884

#### 4.2.2 Ottenimento di inoculanti su substrato solido contenenti *B. toyonensis* sp27

Con l'obiettivo di ottenere degli inoculanti microbici da utilizzare in pieno campo o in serra, anche con *P. humicus* sp29 si sono saggiate la vermiculite e la farina fossile come possibili

carrier. I risultati dei monitoraggi nel tempo sono riportati rispettivamente in tabella 6 e in tabella 7.

**Tabella 6.** Crescita (CFU/g) di *P. humicus* sp29 in vermiculite dopo 21 giorni a temperatura ambiente. L'esperimento è stato condotto in triplicato ed è riportata la deviazione standard.

CFU/g di vermiculite			
Mezzo di crescita	T0	7gg	21 gg
NB	$3,11 \times 10^6 \pm 0,133$	$1,07 \times 10^8 \pm 0,221$	$7,75 \times 10^7 \pm 0,138$
	$3,11 \times 10^5 \pm 0,133$	$1,34 \times 10^8 \pm 0,094$	$7,37 \times 10^8 \pm 0,239$
WL(I) + SALI MM	$3,54 \times 10^6 \pm 0,23$	$7,46 \times 10^7 \pm 0,29$	$7 \times 10^7 \pm 0,087$
	$3,54 \times 10^5 \pm 0,23$	$1,07 \times 10^8 \pm 0,193$	$8,1 \times 10^7 \pm 0,35$

**Tabella 7.** Crescita (CFU/g) di *P. humicus* sp29 in farina fossile dopo 21 giorni a temperatura ambiente. L'esperimento è stato condotto in triplicato ed è riportata la deviazione standard.

CFU/g di farina fossile			
Mezzo di crescita	T0	7gg	21 gg
NB	$3,11 \times 10^6 \pm 0,133$	$1,1 \times 10^8 \pm 0,129$	$5,9 \times 10^7 \pm 0,239$
	$3,11 \times 10^5 \pm 0,133$	$1,03 \times 10^8 \pm 0,096$	$8 \times 10^8 \pm 0,039$
WL(I) + SALI MM	$3,54 \times 10^6 \pm 0,23$	$7,42 \times 10^7 \pm 0,142$	$4,32 \times 10^7 \pm 0,23$
	$3,54 \times 10^5 \pm 0,23$	$1,33 \times 10^8 \pm 0,156$	$6,85 \times 10^7 \pm 0,156$

Si può osservare che in tutti i casi le CFU/g di *P. humicus* sp29 raggiungono approssimativamente  $10^8$  CFU/g entro i primi 7 giorni di incubazione. E' interessante notare che, successivamente, i valori mostrano una significativa stabilità almeno nei 14 giorni successivi, mantenendosi sostanzialmente costanti fino al giorno 21. Questa fase di plateau suggerisce che, dopo una fase iniziale di rapida crescita, il sistema raggiunge un equilibrio dinamico in cui la replicazione e la mortalità dei microrganismi sono bilanciate.

Questi risultati sono rilevanti poiché forniscono informazioni cruciali sulla possibile crescita dei microrganismi sul carrier inerte qui utilizzato.

## Capitolo 5 - Discussione e Considerazioni conclusive

L'impiego dei batteri PGPR in agricoltura rappresenta una prospettiva promettente per migliorare la crescita delle piante e aumentare la resa dei raccolti. Tuttavia, va sottolineato che l'utilizzo di tali batteri implica una fase preliminare di coltivazione in laboratorio e stabilimento, un processo che può risultare dispendioso dal punto di vista economico.

La produzione su larga scala dei batteri PGPR richiede un ambiente controllato e specifiche condizioni di crescita ottimali, aumentando così i costi associati alla loro implementazione. Questo aspetto finanziario può costituire una sfida per gli agricoltori, specialmente per coloro che operano in contesti con risorse limitate.

Tuttavia, è importante considerare che gli investimenti in tecnologie e metodologie di produzione potrebbero ridurre progressivamente questi costi nel tempo, rendendo l'utilizzo dei batteri PGPR più accessibile e vantaggioso per l'agricoltura su scala globale. La ricerca continua di nuovi approcci e strategie potrebbe contribuire a ottimizzare il processo di coltivazione dei batteri PGPR, facilitandone l'adozione diffusa nell'ambito agricolo. Certamente la ricerca di fonti di carbonio a basso costo risulta fondamentale per rendere più sostenibile ed economicamente accessibile la produzione dei batteri PGPR. La coltivazione in laboratorio di questi batteri richiede una fonte di carbonio per sostenere la loro crescita e replicazione. L'individuazione di fonti di carbonio economiche e abbondanti può contribuire significativamente a ridurre i costi associati alla produzione dei PGPR. Gli studiosi e gli esperti stanno lavorando attivamente per identificare soluzioni sostenibili, come l'utilizzo di sottoprodotti industriali o agricoli, che possono fungere da fonti di carbonio a basso costo. L'ottimizzazione delle tecniche di coltivazione e la diversificazione delle fonti di carbonio potrebbero non solo abbattere i costi di produzione ma anche rendere questa tecnologia più adattabile a diverse realtà agricole, inclusi i contesti economicamente più svantaggiati. In sintesi, la ricerca di fonti di carbonio convenienti è un passo cruciale per garantire che l'utilizzo dei batteri PGPR diventi una soluzione sostenibile ed economicamente vantaggiosa per migliorare la produttività agricola.

La produzione annuale di rifiuti da parte della filiera agroindustriale alimentare è di circa 95-98 milioni di tonnellate e desta numerose preoccupazioni a livello mondiale (Lafka et al. 2007). Tra le attività che si distinguono in questo scenario vi è la viticoltura che, durante la lavorazione di 1 tonnellata di uva per la produzione di vino, genera circa 0,13 tonnellate di vinacce, 0,06 tonnellate di fecce di vino e 1,65 m<sup>3</sup> di acque reflue (Lucarini et al. 2018).

Tra i sottoprodotti che si formano durante la vinificazione in grandi volumi vi sono le fecce di vino che costituiscono il 25% della materia prima (De Iseppi et al. 2020).

La feccia di vino viene definita come il residuo che si forma sul fondo del contenitore durante la fase di fermentazione. Si tratta di un materiale ricco di fibre alimentari e composti antiossidanti ma, nonostante questo, è poco sfruttato ed è per lo più destinato allo smaltimento o ad attività di scarso valore economico (Teixeira et al. 2014).

Negli ultimi anni è stato avviato un processo di valorizzazione dei rifiuti derivanti dal processo di vinificazione. Un esempio di approccio è la possibilità di utilizzare gli scarti della vinificazione come additivi per terreni di coltura per i batteri lattici (G. Bustos, de la Torre, Moldes, Cruz, & Domínguez, 2007; Pérez-Bibbins, Torrado-Agrasar, Salgado, Oliveira, & Domínguez, 2015; Rivas et al., 2006). In particolare, Rivas et al. (2006) hanno proposto un approccio in cui le vinacce, dopo essere state trattate per il recupero dell'acido tartarico, venivano utilizzate come fonte di nutrienti per la produzione di acido lattico da parte di *L. pentosus*, utilizzando idrolizzati di tralci di vite contenenti emicellulosa come fonte di carbonio.

Allo stesso modo, Bustos et al. (2007) hanno valutato il potenziale di un terreno di coltura a base di vinacce per la fermentazione di idrolizzati emicellulosici utilizzando *L. pentosus* per produrre sia acido lattico che biotensioattivi.

Altre applicazioni biotecnologiche delle vinacce dopo l'estrazione dell'acido tartarico riguardano il loro impiego nella formulazione di terreni di coltura economici per la produzione di xilitolo da parte di *Debaryomyces hansenii*, il microrganismo tipicamente utilizzato per la bioconversione dello xilosio in xilitolo. Salgado, Rodríguez, Cortés e Domínguez (2009), considerando i bisogni nutrizionali di *D. hansenii*, sono stati in grado di calcolare un parametro di efficienza economica che ha identificato le vinacce come una fonte di nutrienti a basso costo e più efficace per la produzione di xilitolo e acido citrico rispetto a corn steep liquor, un nutriente sfuso ampiamente utilizzato. I terreni di coltura a base di vinacce sono stati applicati anche per la crescita di *Aspergillus*. Salgado et al. (2014) hanno prodotto lipasi extracellulari mediante fermentazione su substrato solido (SSF) con *A. niger*, *A. ibericus* e *A. uvarum*, utilizzando diversi terreni di coltura derivati dai rifiuti, inclusa una combinazione di sansa di oliva con vinacce di vino. In questo caso, il terreno di coltura che includeva vinacce non ha dato risultati soddisfacenti rispetto ad altri terreni derivati dai rifiuti. Al contrario, un lavoro precedente (Salgado et al., 2009) ha utilizzato vinacce ottenute prima o dopo l'estrazione con acido tartarico per la formulazione di un terreno di coltura a basso

costo per la produzione di acido citrico da parte di *A. niger*, mostrando risultati paragonabili a quelli di altri terreni sintetici.

Nel corso del tempo, si è aperto un nuovo filone per la valorizzazione degli scarti provenienti dalla filiera vinicola: l'utilizzo delle fecce. Salgado et al. (2010) hanno ottimizzato il processo di valorizzazione delle fecce di vino che ha consentito l'estrazione di acido tartarico con un elevato grado di purezza e l'applicazione dei residui come nutrienti a basso costo per la produzione di xilitolo da parte di *D. hansenii*.

Come per le vinacce, anche le fecce di vino si possono prestare ad essere utilizzate come arricchimento di terreni di coltura per la crescita di alcuni ceppi batterici.

Kopsahelis et al. (2018) hanno sviluppato un protocollo per l'estrazione dei polifenoli nella lavorazione delle fecce partendo dalla separazione iniziale delle fecce di vino nelle loro frazioni solide e liquide. La frazione liquida è stata quindi distillata per la produzione di etanolo mentre la frazione solida è stata sottoposta sia ad efficaci estrazioni di polifenoli che di tartrato prima di essere applicata come substrato per la produzione di olio microbico da *Cryptococcus curvatus* e *Mortierella ramanniana*. Pertanto, questo approccio ha tentato di estrarre tutti i componenti preziosi delle fecce di vino e quindi utilizzare i residui solidi come substrato per ottenere un prodotto biotecnologico di alto valore.

I risultati ottenuti in questo lavoro supportano l'ipotesi che la particolare composizione delle fecce, particolarmente ricche di sostanze fitochimiche bioattive, proteine, vitamina B e minerali essenziali le rendano un potenziale componente per la formulazione dei terreni di coltura utilizzati nei processi industriali di fermentazione. La presenza di tali composti, infatti, potrebbe fornire una base nutrizionale in grado di sostenere la crescita e l'attività di microrganismi specifici impiegati in vari processi, offrendo un'alternativa promettente ed economica per arricchire i substrati di coltura utilizzati nell'industria fermentativa.

Tale sperimentazione, oltre a sottolineare la possibile applicazione delle fecce di vino nell'allestimento di terreni colturali per inoculi promuovendo la vitalità batterica, mette in luce altri importantissimi vantaggi. In primis, facilitare, in modo economicamente efficiente, la diffusione e l'impiego di microrganismi benefici nell'ambito agricolo e in serra. Allo stesso tempo questo studio introduce notevoli implicazioni da un punto di vista economico, riducendo i costi relativi allo smaltimento dei rifiuti da parte delle aziende produttrici di vino. Viene quindi promossa la transizione verso un'economia circolare esaltando un virtuoso modello di produzione e consumo basato sull'estensione del ciclo di vita dei prodotti, contribuendo a ridurre i rifiuti al minimo. Abbandonando dunque l'attuale modello economico lineare, viene promosso un ciclo produttivo in grado di generare sempre più valore.

Le aziende vinicole si troverebbero dunque a ripensare al proprio business model sposando una serie di istanze di natura sociale, ambientale ed economica supportando il concetto della sostenibilità in filiera.

L'adozione di sottoprodotti di scarto inquinanti e di scarso valore come materie prime rappresenta un vantaggio significativo nel contesto dell'economia circolare. Invece di considerare questi materiali come rifiuti da eliminare, la trasformazione di tali sottoprodotti in risorse utili rappresenta una strategia chiave per ridurre l'impatto ambientale e promuovere un modello sostenibile.

L'utilizzo di sottoprodotti inquinanti come risorse primarie per la produzione apre la strada a una gestione più efficiente delle risorse, contribuendo a limitare la dipendenza da materie prime vergini. Questo approccio non solo riduce la quantità di rifiuti destinati alle discariche, ma trasforma ciò che una volta era considerato un problema ambientale in una risorsa preziosa.

Inoltre, l'impiego di sottoprodotti di scarso valore per la produzione di beni contribuisce a creare un ciclo chiuso in cui i materiali vengono continuamente riutilizzati, riducendo così l'uso di risorse naturali e l'impatto ecologico complessivo. Questa pratica non solo favorisce la sostenibilità ambientale, ma può anche generare opportunità economiche, dando vita a nuove filiere produttive e riducendo la dipendenza da materie prime tradizionali.

In conclusione, l'utilizzo di sottoprodotti inquinanti e di scarso valore all'interno di un modello di economia circolare non solo contribuisce a mitigare l'inquinamento e a gestire in modo più efficiente le risorse, ma rappresenta anche un passo significativo verso un futuro più sostenibile e responsabile.

## Capitolo 6 - Bibliografia

Abbasdokht, H., & Gholami, A. (2010). The effect of seed inoculation (*Pseudomonas putida*+*Bacillus lentus*) and different levels of fertilizers on yield and yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, 4(8), 678-682.

Adesemoye, A. O., Yuen, G., & Watts, D. B. (2017). Microbial inoculants for optimized plant nutrient use in integrated pest and input management systems. *Probiotics and plant health*, 21-40.

Aghamirzaei, M., Peighambaroust, S. H., Azadmard-Damirchi, S., & Majzoob, M. (2018). Effects of Grape Seed Powder as a Functional Ingredient on Flour Physicochemical Characteristics and Dough Rheological Properties.

Alberoni D, Beneficial microorganism for honey bees health, PhD thesis, 2018, Università di Bologna.

Alori, E. T., Dare, M. O., & Babalola, O. O. (2017). Microbial inoculants for soil quality and plant health. *Sustainable agriculture reviews*, 281-307.

Amendola, D. A. N. I. L. A., De Faveri, D. M., Egües, I., Serrano, L., Labidi, J., & Spigno, G. I. O. R. G. I. A. (2012). Autohydrolysis and organosolv process for recovery of hemicelluloses, phenolic compounds and lignin from grape stalks. *Bioresource technology*, 107, 267-274.

Amer, G. A., & Utkhede, R. S. (2000). Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Canadian journal of microbiology*, 46(9), 809-816.

Antar, M., Gopal, P., Msimbira, L. A., Naamala, J., Nazari, M., Overbeek, W., ... & Smith, D. L. (2021). Inter-organismal signaling in the rhizosphere. *Rhizosphere biology: Interactions between microbes and plants*, 255-293.

Ashwini, N., & Srividya, S. (2014). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech*, 4(2), 127-136.

Babalola, O. O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology letters*, 32, 1559-1570.

Babalola, O. O., & Glick, B. R. (2012). The use of microbial inoculants in African agriculture: current practice and future prospects. *J. Food Agric. Environ*, 10(3&4), 540-549.

Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., ... & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in plant science*, 1473.

Bai, Y., Zhou, X., & Smith, D. L. (2003). Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop science*, 43(5), 1774-1781.

Bao, Y., Reddivari, L., & Huang, J. Y. (2020). Enhancement of phenolic compounds extraction from grape pomace by high voltage atmospheric cold plasma. *Lwt*, 133, 109970.

Bates, T. R., & Lynch, J. P. (2001). Root hairs confer a competitive advantage under low phosphorus availability. *Plant and Soil*, 236, 243-250.

Bechtaoui, N., Raklami, A., Benidire, L., Tahiri, A. I., Göttfert, M., & Oufdou, K. (2020). Effects of PGPR co-inoculation on growth, phosphorus nutrition and phosphatase/phytase activities of faba bean under different phosphorus availability conditions. *Pol. J. Environ. Stud*, 29(2), 1557-1565.

Benito-González, I., Jaén-Cano, C. M., López-Rubio, A., Martínez-Abad, A., & Martínez-Sanz, M. (2020). Valorisation of vine shoots for the development of cellulose-based biocomposite films with improved performance and bioactivity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 1540-1551.

Beres, C., Costa, G. N., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S., Cruz, A. P., ... & Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste management*, 68, 581-594.

Bharathiraja, B., Iyyappan, J., Jayamuthunagai, J., Kumar, R. P., Sirohi, R., Gnansounou, E., & Pandey, A. (2020). Critical review on bioconversion of winery wastes into value-added products. *Industrial Crops and Products*, 158, 112954.

Bidondo, L. F., Silvani, V., Colombo, R., Pégola, M., Bompadre, J., & Godeas, A. (2011). Pre-symbiotic and symbiotic interactions between *Glomus intraradices* and two *Paenibacillus* species isolated from AM propagules. In vitro and in vivo assays with soybean (AG043RG) as plant host. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(9), 1866-1872.

Borsoi, C., Dahlem Júnior, M. A., Beltrami, L. V. R., Hansen, B., Zattera, A. J., & Catto, A. L. (2020). Effects of alkaline treatment and kinetic analysis of agroindustrial residues from grape stalks and yerba mate fibers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 139, 3275-3286.

Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E., Boulton, R. B., Singleton, V. L., ... & Kunkee, R. E. (1999). The physical and chemical stability of wine. *Principles and practices of winemaking*, 320-351.

Brezoiu, A. M., Matei, C., Deaconu, M., Stanciuc, A. M., Trifan, A., Gaspar-Pintiliescu, A., & Berger, D. (2019). Polyphenols extract from grape pomace. Characterization and valorisation through encapsulation into mesoporous silica-type matrices. *Food and Chemical Toxicology*, 133, 110787.

Buratti, C., Barbanera, M., & Lascaro, E. (2015). Ethanol production from vineyard pruning residues with steam explosion pretreatment. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 34(3), 802-809.

Bustamante, M. A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., & Pérez-Murcia, M. D. (2008). Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste management*, 28(2), 372-380.

Bustos, G., De la Torre, N., Moldes, A. B., Cruz, J. M., & Domínguez, J. M. (2007). Revalorization of hemicellulosic trimming vine shoots hydrolyzates trough continuous production of lactic acid and biosurfactants by *L. pentosus*. *Journal of food engineering*, 78(2), 405-412.

Bustos, G., Moldes, A. B., Cruz, J. M., & Domínguez, J. M. (2004). Evaluation of vinification lees as a general medium for *Lactobacillus* strains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(16), 5233-5239.

Carvalho, F., Duarte, L. C., Medeiros, R., & Gírio, F. M. (2007). Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* in brewery spent grain dilute-acid hydrolysate: effect of supplementation. *Biotechnology letters*, 29, 1887-1891.

Cavaglieri, L., Orlando, J. R. M. I., Rodriguez, M. I., Chulze, S., & Etcheverry, M. (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in microbiology*, 156(5-6), 748-754.

Cawoy, H., Bettioli, W., Fickers, P., & Ongena, M. (2011). *Bacillus*-based biological control of plant diseases. *Pesticides in the modern world-pesticides use and management*, 273-302.

Cejudo-Bastante, C., Arjona-Mudarra, P., Fernández-Ponce, M. T., Casas, L., Mantell, C., Martínez de la Ossa, E. J., & Pereyra, C. (2021). Application of a natural antioxidant from grape pomace extract in the development of bioactive jute fibers for food packaging. *Antioxidants*, 10(2), 216.

Chakraborty, U., Chakraborty, B. N., Basnet, M., & Chakraborty, A. P. (2009). Evaluation of *Ochrobactrum anthropi* TRS-2 and its talc based formulation for enhancement of growth of tea plants and management of brown root rot disease. *Journal of applied microbiology*, 107(2), 625-634.

Charest, M. H., Beauchamp, C. J., & Antoun, H. (2005). Effects of the humic substances of de-inking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(2), 219-227.

Charrondière, U. R., Rittenschober, D., Nowak, V., Wijesinha-Bettoni, R., Stadlmayr, B., Haytowitz, D., & Persijn, D. (2012). FAO/INFOODS Guidelines for converting units, denominators and expressions, version 1.0. Rome: FAO.

Chowdappa, P., Kumar, S. M., Lakshmi, M. J., & Upreti, K. K. (2013). Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological control*, 65(1), 109-117.

Chu, B. C., Garcia-Herrero, A., Johanson, T. H., Krewulak, K. D., Lau, C. K., Peacock, R. S., ... & Vogel, H. J. (2010). Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals*, 23, 601-611.

Corbin, K. R., Hsieh, Y. S., Betts, N. S., Byrt, C. S., Henderson, M., Stork, J., ... & Burton, R. A. (2015). Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol: Chemical composition, pre-treatment and saccharification. *Bioresource technology*, 193, 76-83.

Da Ros, C., Cavinato, C., Pavan, P., & Bolzonella, D. (2014). Winery waste recycling through anaerobic co-digestion with waste activated sludge. *Waste management*, 34(11), 2028-2035.

Daly, D. H., Velivelli, S. L., & Prestwich, B. D. (2017). The role of soil microbes in crop biofortification. *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture: Volume I: Plant-soil-microbe nexus*, 333-356.

Dávila, I., Gordobil, O., Labidi, J., & Gullón, P. (2016). Assessment of suitability of vine shoots for hemicellulosic oligosaccharides production through aqueous processing. *Bioresource Technology*, 211, 636-644.

Dávila, I., Remón, J., Gullón, P., Labidi, J., & Budarin, V. (2019). Production and characterization of lignin and cellulose fractions obtained from pretreated vine shoots by microwave assisted alkali treatment. *Bioresource technology*, 289, 121726.

De Iseppi, A., Lomolino, G., Marangon, M., & Curioni, A. (2020). Current and future strategies for wine yeast lees valorization. *Food Research International*, 137, 109352.

De Iseppi, A., Marangon, M., Lomolino, G., Crapisi, A., & Curioni, A. (2021). Red and white wine lees as a novel source of emulsifiers and foaming agents. *Lwt*, 152, 112273.

del Mar Contreras, M., Romero-García, J. M., López-Linares, J. C., Romero, I., & Castro, E. (2022). Residues from grapevine and wine production as feedstock for a biorefinery. *Food and Bioproducts Processing*, 134, 56-79.

del Pozo, C., Bartrolí, J., Alier, S., Puy, N., & Fàbregas, E. (2021). Production, identification, and quantification of antioxidants from torrefaction and pyrolysis of grape pomace. *Fuel Processing Technology*, 211, 106602.

Delgado De La Torre, M. P., Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. D. (2015). Characterization and comparison of wine lees by liquid chromatography–mass spectrometry in high-resolution mode. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(4), 1116-1125.

Delgado de la Torre, M. P., Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. D. (2014). Comparative profiling analysis of woody flavouring from vine-shoots and oak chips. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(3), 504-514.

Delgado-Torre, M. P., Ferreira-Vera, C., Priego-Capote, F., Perez-Juan, P. M., & Luque de Castro, M. D. (2012). Comparison of accelerated methods for the extraction of phenolic compounds from different vine-shoot cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(12), 3051-3060.

Deng, Q., Penner, M. H., & Zhao, Y. (2011). Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*, 44(9), 2712-2720.

Dimou, C., Vlysidis, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., Koutinas, A. A., & Kookos, I. K. (2016). Techno-economic evaluation of wine lees refining for the production of value-added products. *Biochemical engineering journal*, 116, 157-165.

Drevelegka, I., & Goula, A. M. (2020). Recovery of grape pomace phenolic compounds through optimized extraction and adsorption processes. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 149, 107845.

Egüés, I., Serrano, L., Amendola, D., De Faveri, D. M., Spigno, G., & Labidi, J. (2013). Fermentable sugars recovery from grape stalks for bioethanol production. *Renewable energy*, 60, 553-558.

Ene, S. A., Teodosiu, C., Robu, B., & Volf, I. (2013). Water footprint assessment in the winemaking industry: A case study for a Romanian medium size production plant. *Journal of Cleaner Production*, 43, 122-135.

Etesami, H., & Alikhani, H. A. (2017). Evaluation of gram-positive rhizosphere and endophytic bacteria for biological control of fungal rice (*Oryza sativa* L.) pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 147, 7-14.

Fernández, C. M., Ramos, M. J., Pérez, Á., & Rodríguez, J. F. (2010). Production of biodiesel from winery waste: extraction, refining and transesterification of grape seed oil. *Bioresource technology*, 101(18), 7019-7024.

Filippi, K., Papapostolou, H., Alexandri, M., Vlysidis, A., Myrtsi, E. D., Ladakis, D., ... & Koutinas, A. (2022). Integrated biorefinery development using winery waste streams for the production of bacterial cellulose, succinic acid and value-added fractions. *Bioresource Technology*, 343, 125989.

Fiori, L., Lavelli, V., Duba, K. S., Harsha, P. S. C. S., Mohamed, H. B., & Guella, G. (2014). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oil from seeds of six grape cultivars: Modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 94, 71-80.

Galanakis, C. M. (Ed.). (2017). *Handbook of grape processing by-products: sustainable solutions*. Academic Press.

García-Fraile, P., Menéndez, E., & Rivas, R. (2015). Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *Aims Bioengineering*, 2(3), 183-205.

García, J. A. L., Probanza, A., Ramos, B., Palomino, M., & Mañero, F. J. G. (2004). Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronomie*, 24(4), 169-176.

Giacobbo, A., Dias, B. B., Onorevoli, B., Bernardes, A. M., de Pinho, M. N., Caramão, E. B., ... & Jacques, R. A. (2019). Wine lees from the 1st and 2nd rackings: Valuable by-products. *Journal of food science and technology*, 56, 1559-1566.

Glampedaki, P., & Dutschk, V. (2014). Stability studies of cosmetic emulsions prepared from natural products such as wine, grape seed oil and mastic resin. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 460, 306-311.

Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 41(2), 109-117.

Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G., & Penrose, D. M. (1999). *Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria*.

Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1127500.

Gray, E. J., & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil biology and biochemistry*, 37(3), 395-412.

Gullón, P., Gullón, B., Dávila, I., Labidi, J., & Gonzalez-Garcia, S. (2018). Comparative environmental Life Cycle Assessment of integral revalorization of vine shoots from a biorefinery perspective. *Science of the total environment*, 624, 225-240.

Hafeez, F. Y., Yasmin, S., Ariani, D., Renseigné, N., Zafar, Y., & Malik, K. A. (2006). Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer. *Agronomy for sustainable development*, 26(2), 143-150.

Han, H. S., & Lee, K. D. (2006). Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant soil and Environment*, 52(3), 130.

- Hankin, L., & Anagnostakin, S.L. (1975). The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. *Mycologia*, 67, 3. 597-607
- Harris-Valle, C., Esqueda, M., Sanchez, A., Beltran-Garcia, M., & Valenzuela-Soto, E. M. (2007). Polar vineyard pruning extracts increase the activity of the main ligninolytic enzymes in *Lentinula edodes* cultures. *Canadian journal of microbiology*, 53(10), 1150-1157.
- Hedden, P., & Phillips, A. L. (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in plant science*, 5(12), 523-530.
- Heydari, A., Misaghi, I. J., & Balestra, G. M. (2007). Pre-emergence herbicides influence the efficacy of fungicides in controlling cotton seedling damping-off in the field. *International Journal of Agricultural Research*, 2(12), 1049-1053.
- Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., & Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular plant-microbe interactions*, 20(6), 619-626.
- Istina, I. N., Widiastuti, H., Joy, B., & Antralina, M. (2015). Phosphate-solubilizing microbe from Saprists peat soil and their potency to enhance oil palm growth and P uptake. *Procedia Food Science*, 3, 426-435.
- Jara-Palacios, M. J. (2019). Wine lees as a source of antioxidant compounds. *Antioxidants*, 8(2), 45.
- Jin, Q., O'Keefe, S. F., Stewart, A. C., Neilson, A. P., Kim, Y. T., & Huang, H. (2021). Techno-economic analysis of a grape pomace biorefinery: Production of seed oil, polyphenols, and biochar. *Food and Bioproducts Processing*, 127, 139-151.
- Jordán, M. J., Martínez, R. M., Martínez, C., Monino, I., & Sotomayor, J. A. (2009). Polyphenolic extract and essential oil quality of *Thymus zygis* ssp. *gracilis* shrubs cultivated under different watering levels. *Industrial crops and products*, 29(1), 145-153.
- Karaoğlu, M. H., Zor, Ş., & Uğurlu, M. (2010). Biosorption of Cr (III) from solutions using vineyard pruning waste. *Chemical Engineering Journal*, 159(1-3), 98-106.
- Kawamoto, H., & Nakatsubo, F. (1997). Effects of environmental factors on two-stage tannin-protein co-precipitation. *Phytochemistry*, 46(3), 479-483.

Kaymak, H. C., Yarali, F., Guvenc, I., & Donmez, M. F. (2008). The effect of inoculation with plant growth rhizobacteria (PGPR) on root formation of mint (*Mentha piperita* L.) cuttings. *African journal of Biotechnology*, 7(24).

Kontogiannopoulos, K. N., Patsios, S. I., & Karabelas, A. J. (2016). Tartaric acid recovery from winery lees using cation exchange resin: Optimization by Response Surface Methodology. *Separation and Purification Technology*, 165, 32-41.

Kopsahelis, N., Dimou, C., Papadaki, A., Xenopoulos, E., Kyraleou, M., Kallithraka, S., ... & Koutinas, A. A. (2018). Refining of wine lees and cheese whey for the production of microbial oil, polyphenol-rich extracts and value-added co-products. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(1), 257-268.

Kumar, S., Baudh, K., Barman, S. C., & Singh, R. P. (2014). Amendments of microbial biofertilizers and organic substances reduces requirement of urea and DAP with enhanced nutrient availability and productivity of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ecological engineering*, 71, 432-437.

Kyzas, G. Z., Symeonidou, M. P., & Matis, K. A. (2016). Technologies of winery wastewater treatment: a critical approach. *Desalination and Water Treatment*, 57(8), 3372-3386.

Lachman, J., Hejtmánková, A., Hejtmánková, K., Horníčková, Š., Pivec, V., Skala, O., ... & Příbyl, J. (2013). Towards complex utilisation of winemaking residues: Characterisation of grape seeds by total phenols, tocopherols and essential elements content as a by-product of winemaking. *Industrial Crops and Products*, 49, 445-453.

Lafka, T. I., Sinanoglou, V., & Lazos, E. S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food chemistry*, 104(3), 1206-1214.

Leite, P., Silva, C., Salgado, J. M., & Belo, I. (2019). Simultaneous production of lignocellulolytic enzymes and extraction of antioxidant compounds by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. *Industrial Crops and Products*, 137, 315-322.

León, O., Ruiz, M., Marcos, R., Antolin, G., & Del Álamo, M. (2006). Optimisation of the polyphenol extraction from post - Distillation grapes by diffusion process. *CHISA 2006 - 17th International Congress of Chemical and Process Engineering*.

Liu, J. G., Wang, Q. H., Ma, H. Z., & Wang, S. (2010). Effect of pretreatment methods on L-lactic acid production from vinasse fermentation. *Advanced Materials Research*, 113, 1302-1305.

López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J. C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L. I., & Valencia-Cantero, E. (2007). *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(2), 207-217.

López-Fernández-Sobrino, R., Soliz-Rueda, J. R., Margalef, M., Arola-Arnal, A., Suárez, M., Bravo, F. I., & Muguerza, B. (2021). ACE Inhibitory and antihypertensive activities of wine lees and relationship among bioactivity and phenolic profile. *Nutrients*, 13(2), 679.

Lucarini, M., Durazzo, A., Romani, A., Campo, M., Lombardi-Boccia, G., & Cecchini, F. (2018). Bio-based compounds from grape seeds: A biorefinery approach. *Molecules*, 23(8), 1888.

Lucas, M. S., Peres, J. A., Lan, B. Y., & Puma, G. L. (2009). Ozonation kinetics of winery wastewater in a pilot-scale bubble column reactor. *Water research*, 43(6), 1523-1532.

Lugtenberg, B. J., Dekkers, L., & Bloemberg, G. V. (2001). Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual review of phytopathology*, 39(1), 461-490.

Matos, M. S., Romero-Díez, R., Álvarez, A., Bronze, M. R., Rodríguez-Rojo, S., Mato, R. B., ... & Matias, A. A. (2019). Polyphenol-rich extracts obtained from winemaking waste streams as natural ingredients with cosmeceutical potential. *Antioxidants*, 8(9), 355.

Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (1999). Effect of wild-type and mutant plant growth-promoting rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings. *Journal of plant growth regulation*, 18, 49-53.

Mena, P., Ascacio-Valdés, J. A., Gironés-Vilaplana, A., Del Rio, D., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2014). Assessment of pomegranate wine lees as a valuable source for the recovery of (poly) phenolic compounds. *Food chemistry*, 145, 327-334.

Miller, T. L., & Churchill, B. W. (1986). Substrates for large-scale fermentations. In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* (A. L. Demain and N. A. Solomon, eds.), pp. 122–136, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Musee, N., Lorenzen, L., & Aldrich, C. (2006). Decision support for waste minimization in wine-making processes. *Environmental Progress*, 25(1), 56-63.

Nanni, A., Parisi, M., & Colonna, M. (2021). Wine by-products as raw materials for the production of biopolymers and of natural reinforcing fillers: A critical review. *Polymers*, 13(3), 381.

Nurgel, C., & Canbas, A. (1998). Production of tartaric acid from pomace of some Anatolian grape cultivars. *American journal of Enology and Viticulture*, 49(1), 95-99.

OIV,I. (2019). Statistical report on world vitiviniculture.  
<https://www.oiv.int/public/medias/6782/oiv-2019-statistical-report-on-world-vitiviniculture.pdf>

Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., & Sahin, F. (2006). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia horticultrae*, 111(1), 38-43.

Özvural, E. B., & Vural, H. (2014). Which is the best grape seed additive for frankfurters: extract, oil or flour?. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(4), 792-797.

Pedras, B. M., Regalin, G., Sa-Nogueira, I., Simoes, P., Paiva, A., & Barreiros, S. (2020). Fractionation of red wine grape pomace by subcritical water extraction/hydrolysis. *The Journal of Supercritical Fluids*, 160, 104793.

Peralbo-Molina, Á., & de Castro, M. D. L. (2013). Potential of residues from the Mediterranean agriculture and agrifood industry. *Trends in Food Science & Technology*, 32(1), 16-24.

Pérez-Bibbins, B., Torrado-Agrasar, A., Salgado, J. M., de Souza Oliveira, R. P., & Domínguez, J. M. (2015). Potential of lees from wine, beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: An overview. *Waste management*, 40, 72-81.

Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., Del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., ... & Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological research*, 169(5-6), 325-336.

Pérez-Rodríguez, N., Outeiriño, D., Torrado Agrasar, A., & Domínguez, J. M. (2017). Vine trimming shoots as substrate for ferulic acid esterases production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 181, 813-826.

Pérez-Serradilla, J. A., & De Castro, M. L. (2008). Role of lees in wine production: A review. *Food chemistry*, 111(2), 447-456.

Pérez-Bibbins, B., Torrado-Agrasar, A., Pérez-Rodríguez, N., Aguilar-Uscanga, M. G., & Domínguez, J. M. (2015). Evaluation of the liquid, solid and total fractions of beer, cider and wine lees as economic nutrient for xylitol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(6), 1027-1039.

Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17(11), 579-590.

Ping, L., Brosse, N., Sannigrahi, P., & Ragauskas, A. (2011). Evaluation of grape stalks as a bioresource. *Industrial crops and products*, 33(1), 200-204.

Portinho, R., Zanella, O., & Féris, L. A. (2017). Grape stalk application for caffeine removal through adsorption. *Journal of environmental management*, 202, 178-187.

Prozil, S. O., Costa, E. V., Evtuguin, D. V., Lopes, L. P. C., & Domingues, M. R. M. (2012). Structural characterization of polysaccharides isolated from grape stalks of *Vitis vinifera* L. *Carbohydrate research*, 356, 252-259.

Prozil, S. O., Evtuguin, D. V., Silva, A. M., & Lopes, L. P. (2014). Structural characterization of lignin from grape stalks (*Vitis vinifera* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(24), 5420-5428.

Przemieniecki, S. W., Kurowski, T. P., Damszel, M., Krawczyk, K., & Karwowska, A. (2018). Effectiveness of the *Bacillus* sp. SP-A9 strain as a biological control agent for spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 20(3), 609-619.

Raj, D. P. R. S., Linda, R., & Babyson, R. S. (2014). Molecular characterization of phosphate solubilizing bacteria (PSB) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from pristine soils. *Int J Innov Sci Eng Technol*, 1, 317-324.

Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. (2015). Electrical, mechanical, and chemical effects of high-voltage electrical discharges on the polyphenol extraction from vine shoots. *Innovative food science & emerging technologies*, 31, 60-66.

Rani, M. U., & Gopal, R. (2011). *Bacillus cereus* and *Enterobacter cancerogenus* screened for their efficient plant growth promoting traits rhizobacteria (PGPR) and antagonistic traits among sixteen bacterial isolates from rhizospheric soils of pigeon pea. *African Journal of Microbiology Research*, 5(15), 2090-2094.

Rayavarapu, V. B., & Padmavathi, T. (2016). *Bacillus* sp. as potential plant growth promoting rhizobacteria. *Int J Adv Life Sci*, 9(1), 29-36.

Renseigné, N., Han, H. S., Jung, J. S., & Lee, K. D. (2006). Rock phosphate-potassium and rock-solubilising bacteria as alternative, sustainable fertilisers. *Agronomy for sustainable development*, 26(4), 233-240.

Riaz, U., Murtaza, G., Anum, W., Samreen, T., Sarfraz, M., & Nazir, M. Z. (2021). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as biofertilizers and biopesticides. *Microbiota and biofertilizers: a sustainable continuum for plant and soil health*, 181-196.

Rivas, B., Torrado, A., Moldes, A. B., & Domínguez, J. M. (2006). Tartaric acid recovery from distilled lees and use of the residual solid as an economic nutrient for *Lactobacillus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(20), 7904-7911.

Rivas, S., López, L., Vila, C., & Parajó, J. C. (2021). Organosolv processing of vine shoots: Fractionation and conversion of hemicellulosic sugars into platform chemicals by microwave irradiation. *Bioresource Technology*, 342, 125967.

Romanini, E. B., Rodrigues, L. M., Finger, A., Chierrito, T. P. C., da Silva Scapim, M. R., & Madrona, G. S. (2021). Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from BRS Violet grape pomace followed by alginate-Ca<sup>2+</sup> encapsulation. *Food Chemistry*, 338, 128101.

Romero-Díez, R., Matos, M., Rodrigues, L., Bronze, M. R., Rodríguez-Rojo, S., Cocero, M. J., & Matias, A. A. (2019). Microwave and ultrasound pre-treatments to enhance anthocyanins extraction from different wine lees. *Food chemistry*, 272, 258-266.

Romero-Díez, R., Rodríguez-Rojo, S., Cocero, M. J., Duarte, C. M., Matias, A. A., & Bronze, M. R. (2018). Phenolic characterization of aging wine lees: Correlation with antioxidant activities. *Food chemistry*, 259, 188-195.

Rondeau, P., Gambier, F., Jolibert, F., & Brosse, N. (2013). Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard. *Industrial Crops and Products*, 43, 251-254.

Rosas-García, N. M. (2009). Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an environmentally friendly alternative. *Recent Patents on biotechnology*, 3(1), 28-36.

Sadfi, N., Cherif, M., Fliss, I., Boudabbous, A., & Antoun, H. (2001). Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *Journal of Plant Pathology*, 101-117.

Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 3984-3999.

Salgado, J. M., Carballo, E. M., Max, B., & Domínguez, J. M. (2010). Characterization of vinasses from five certified brands of origin (CBO) and use as economic nutrient for the xylitol production by *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource technology*, 101(7), 2379-2388.

Salgado, J. M., Rodriguez, N., Cortes, S., & Domínguez, J. M. (2009). Development of cost-effective media to increase the economic potential for larger-scale bioproduction of natural food additives by *Lactobacillus rhamnosus*, *Debaryomyces hansenii*, and *Aspergillus niger*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(21), 10414-10428.

Salgado, J. M., Rodriguez, N., Cortes, S., & Domínguez, J. M. (2010). Improving downstream processes to recover tartaric acid, tartrate and nutrients from vinasses and formulation of inexpensive fermentative broths for xylitol production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(13), 2168-2177.

Salmon, J. M., Fornairon-Bonnefond, C., Mazauric, J. P., & Moutounet, M. (2000). Oxygen consumption by wine lees: impact on lees integrity during wine ageing. *Food Chemistry*, 71(4), 519-528.

Sánchez-Gómez, R., Sánchez-Vioque, R., Santana-Méridas, O., Martín-Bejerano, M., Alonso, G. L., Salinas, M. R., & Zalacain, A. (2017a). A potential use of vine-shoot wastes: The antioxidant, antifeedant and phytotoxic activities of their aqueous extracts. *Industrial crops and products*, 97, 120-127.

Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Pardo, F., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2017b). Moscatel vine-shoot extracts as a grapevine biostimulant to enhance wine quality. *Food Research International*, 98, 40-49.

Sanchez-Valdepenas, V., Barrajon, E., Vegara, S., Funes, L., Marti, N., Valero, M., & Saura, D. (2015). Effect of instant controlled pressure drop (DIC) pre-treatment on conventional solvent extraction of phenolic compounds from grape stalk powder. *Industrial Crops and Products*, 76, 545-549.

Schwartz, A. R., Ortiz, I., Maymon, M., Herbold, C. W., Fujishige, N. A., Vijanderan, J. A., ... & Hirsch, A. M. (2013). *Bacillus simplex*—a little known PGPB with anti-fungal activity—alters pea legume root architecture and nodule morphology when coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Agronomy*, 3(4), 595-620.

Senila, L., Kovacs, E., Scurtu, D. A., Cadar, O., Becze, A., Senila, M., ... & Roman, C. (2020). Bioethanol production from vineyard waste by autohydrolysis pretreatment and chlorite delignification via simultaneous saccharification and fermentation. *Molecules*, 25(11), 2606.

Sgroy, V., Cassán, F., Masciarelli, O., Del Papa, M. F., Lagares, A., & Luna, V. (2009). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied microbiology and Biotechnology*, 85, 371-381.

Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3), 446-459.

Shanmugaiah, V., Nithya, K., Harikrishnan, H., Jayaprakashvel, M., & Balasubramanian, N. (2015). Biocontrol mechanisms of siderophores against bacterial plant pathogens. *Sustainable approaches to controlling plant pathogenic bacteria*, 167-190.

Silini-Cherif, H., Silini, A., Ghouil, M., & Yadav, S. (2012). Isolation and characterization of plant growth promoting traits of a rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* Ima2. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 15(6), 267-276.

Sirohi, R., Tarafdar, A., Singh, S., Negi, T., Gaur, V. K., Gnansounou, E., & Bharathiraja, B. (2020). Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. *Bioresource Technology*, 314, 123771.

Spigno, G., Maggi, L., Amendola, D., Dragoni, M., & De Faveri, D. M. (2013). Influence of cultivar on the lignocellulosic fractionation of grape stalks. *Industrial crops and products*, 46, 283-289.

Spigno, G., Moncalvo, A., De Faveri, D. M., & Silva, A. (2014). Valorisation of stalks from different grape cultivars for sugars recovery. *CHEMICAL ENGINEERING*, 37.

Srivastava, L. M. (2002). *Plant growth and development: hormones and environment*. Elsevier.

Stamenković, S., Beškoski, V., Karabegović, I., Lazić, M., & Nikolić, N. (2018). Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(1).

Tajini, F., Trabelsi, M., & Drevon, J. J. (2012). Combined inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT899 increases phosphorus use efficiency for symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Saudi journal of biological sciences*, 19(2), 157-163.

Tak, H. I., Ahmad, F., Babalola, O. O., & Inam, A. (2012). Growth, photosynthesis and yield of chickpea as influenced by urban wastewater and different levels of phosphorus. *International Journal of Plant Research*, 2(2), 6-13.

Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *International journal of molecular sciences*, 15(9), 15638-15678.

Thilagavathi, R., Saravanakumar, D., Ragupathi, N., & Samiyappan, R. (2007). A combination of biocontrol agents improves the management of dry root rot (*Macrophomina phaseolina*) in greengram. *Phytopathologia Mediterranea*, 46(2), 157-167.

Tian, F., Ding, Y., Zhu, H., Yao, L., & Du, B. (2009). Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 276-284.

Troilo, M., Difonzo, G., Paradiso, V. M., Summo, C., & Caponio, F. (2021). Bioactive compounds from vine shoots, grape stalks, and wine lees: Their potential use in agro-food chains. *Foods*, 10(2), 342.

Turan, M., Kıtır, N., Alkaya, Ü., Günes, A., Tüfenkçi, Ş., Yıldırım, E., ... & Alkaya, Ü. (2016). Making soil more accessible to plants: the case of plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Growth*, 1, 61-69.

- Vassilev, N., Vassileva, M., & Nikolaeva, I. (2006). Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied microbiology and biotechnology*, 71, 137-144.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. *Molecules*, 21(5), 573.
- Versari, A., Castellari, M., Spinabelli, U., & Galassi, S. (2001). Recovery of tartaric acid from industrial enological wastes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 76(5), 485-488.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255, 571-586.
- Vlyssides, A. G., Barampouti, E. M., & Mai, S. (2005). Wastewater characteristics from Greek wineries and distilleries. *Water Science and Technology*, 51(1), 53-60.
- Wei, Z., Yang, X., Yin, S., Shen, Q., Ran, W., & Xu, Y. (2011). Efficacy of *Bacillus*-fortified organic fertiliser in controlling bacterial wilt of tomato in the field. *Applied soil ecology*, 48(2), 152-159.
- Williams, D. L., Schueckel, J., Vivier, M. A., Buffetto, F., & Zietsman, A. J. (2019). Grape pomace fermentation and cell wall degradation by *Kluyveromyces marxianus* Y885. *Biochemical Engineering Journal*, 150, 107282.
- Yaragalla, S., Rajendran, R., Jose, J., AlMaadeed, M. A., Kalarikkal, N., & Thomas, S. (2016). Preparation and characterization of green graphene using grape seed extract for bioapplications. *Materials Science and Engineering: C*, 65, 345-353.
- Ye, Z., Harrison, R., Cheng, V. J., & Bekhit, A. E. D. A. (2016). Wine making by-products. *Valorization of Wine Making By-Products; CRC Press: Boca Raton, FL, USA*, 73-116.
- Zhijing, Y., Shavandi, A., Harrison, R., & Bekhit, A. E. D. A. (2018). Characterization of phenolic compounds in wine lees. *Antioxidants*, 7(4), 48.