



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

DAFNAE
Dipartimento di Agronomia Animali
Alimenti Risorse naturali e Ambiente

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTE**

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

IMPIEGO DI PRODOTTI A BASE DI SPIRULINA COME BIOSTIMOLANTI IN ORTICOLTURA

**THE USE OF SPIRULINA BASED PRODUCTS AS
BIOSTIMULANTS IN HORTICULTURE**

RELATORE: Prof.ssa Quaggiotti Silvia

LAUREANDO: Bonato Cristiano (N° matricola: 1192474)

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

“Fa’ che il cibo sia la tua medicina e che la medicina sia il tuo cibo”

Ippocrate

SOMMARIO

ABSTRACT	7
RIASSUNTO	8
1. INTRODUZIONE	9
1.1 Perché l'agricoltura sostenibile?.....	9
1.2 Potenzialità e formulazione dei biostimolanti.....	11
1.3 Biostimolanti da microalghe e cianobatteri	13
1.4 Principali effetti biostimolanti sulla pianta.....	13
1.5 Correlazione tra biostimolazione e tolleranza agli stress abiotici.....	14
1.6 Bioattività delle molecole microalgali e cianobatteriche	15
1.7 Introduzione alla spirulina	17
1.8 Coltivazione della spirulina	19
2. SCOPO DEL LAVORO	22
3. CASI STUDIO	24
3.1 Preparazione dei biostimolanti e modalità di applicazione	24
3.2 Caso studio 1: Utilizzo di spirulina prodotta dal trattamento di acque reflue come fertilizzante agricolo.....	25
3.2.1 Estratto di spirulina su piante in vaso	25
3.2.2 Immersione semi in sospensione di spirulina	27
3.2.3 Conclusioni	28
3.3 Caso studio 2: Filtrati ed omogenati di spirulina in agricoltura	28
3.3.1 Test di germinazione con piastre Petri.....	29
3.3.2 Test della biomassa fuori terra	30
3.3.3 Effetto sul peso della biomassa fresca.....	32
3.3.4 Effetto sull'indice di clorofilla.....	32
3.3.5 Composizione elementare della biomassa aerea	32
3.3.6 Conclusioni	33
3.4 Caso studio 3: Crescita, resa e qualità di melanzane trattate con spirulina per via fogliare.....	34
3.5 Caso studio 4: Utilizzo di spirulina come antidoto agli effetti nocivi dell'erbicida fusilade su fava.....	36
3.5.1 Effetti sulla crescita e sulla resa	36

3.5.2 Effetto sulla composizione biochimica.....	37
3.5.3 Conclusioni	39
3.6 Caso studio 5: Biofortificazione di <i>Amaranthus dubius</i> (spinacio cinese)	40
4. CONCLUSIONI	44
4.1 Aspetti positivi e future aspettative riguardo l'utilizzo di cianobatteri come biostimolanti	44
4.2 Criticità nell'utilizzo di cianobatteri come biostimolanti.....	45
4.3 Osservazioni conclusive	46
5. BIBLIOGRAFIA	48
6. SITOGRAFIA	51

ABSTRACT

Nowadays we use to talk more and more about ecology and sustainability: environmental sustainability, production sustainability, transformation, supply chain and agriculture sustainability. Sustainability is one of the fundamental requirements that a company must have, in the field it operates, from the agricultural to the tertiary sector.

Research on microalgae and cyanobacteria has become an area of great interest, as their productivity is way higher than terrestrial plants one and they can be used to produce biofuels, feed and agricultural fertilizers. Furthermore, to improve the economic sustainability of algae-based products, microalgae growth can also be coupled with wastewater remediation.

Therefore, the use of products based on these microorganisms therefore represent a potential sustainable alternative for the enhancement and protection of agricultural crops. The following thesis aims to analyse the use of microalgae biostimulants in agriculture and, specifically, the use effects for various spirulina-based products in the growth and in the production of vegetable crops. Some cases will be discussed where cell extracts and dry biomass of different species of microalgae and cyanobacteria have been applied as seed primer, foliar spray and biofertilizer at different concentrations and in different forms (as suspension, filtered, homogenate, supernatant or, in some cases, directly as dry biomass), to evaluate its effects on seed germination, plant growth and the production of various horticultural crops such as, for example, aubergine, cabbage, broad bean, rocket and radish.

Furthermore, any significant differences in some parameters will be described and analysed, including the weight of fresh and dry biomass, the number and size of leaves, the chlorophyll content and the macro and microelement content.

The aim of the thesis is therefore to present and to examine various case studies and make a summary of the use effectiveness for the various spirulina-based products as alternatives or in association with synthetic fertilizers and/or other biostimulants used today.

RIASSUNTO

Oggigiorno si parla sempre più di green, ecologico, sostenibile: sostenibilità ambientale, sostenibilità della produzione, della trasformazione, della filiera e sostenibilità in agricoltura. La sostenibilità è uno dei requisiti fondamentali che un'azienda deve avere, in qualsiasi campo essa operi, da quello agricolo al settore terziario.

La ricerca sulle microalghe e sui cianobatteri è divenuta dunque un'area di grande interesse, poiché la loro produttività è di gran lunga superiore rispetto a quella delle piante terrestri e possono essere utilizzati per la produzione di biocarburanti, mangimi per animali e fertilizzanti agricoli. Inoltre, per migliorare la sostenibilità economica dei prodotti a base di alghe, la crescita delle microalghe può anche essere accoppiata alla bonifica delle acque reflue.

L'utilizzo di prodotti a base di questi microrganismi rappresenta quindi una potenziale alternativa sostenibile per la valorizzazione e la protezione delle colture agricole.

La seguente tesi vuole affrontare l'utilizzo dei biostimolanti da microalghe in agricoltura e, nello specifico, l'effetto dell'impiego di vari prodotti a base di spirulina nella crescita e nella produzione delle colture orticole. Verranno discussi casi in cui gli estratti cellulari e la biomassa secca di diverse specie di microalghe e cianobatteri sono stati applicati come primer per semi, spray fogliare e biofertilizzante a diverse concentrazioni e in diverse forme (come sospensione, filtrato, omogenato, supernatante o, in alcuni casi, direttamente come biomassa secca), per valutarne gli effetti sulla germinazione dei semi, sulla crescita delle piante e sulla produzione di diverse colture orticole come, per esempio, melanzana, cavolo, fava, rucola e ravanello.

Verranno, inoltre, descritte e analizzate anche eventuali differenze significative di alcuni parametri, tra i quali il peso della biomassa fresca e secca, il numero e le dimensioni delle foglie, il contenuto di clorofilla e il contenuto di macro e microelementi.

L'obiettivo della tesi è quindi quello di presentare ed esaminare diversi casi studio e fare una sintesi sull'efficacia di utilizzo dei vari prodotti a base di spirulina come alternative o in associazione ai concimi di sintesi e/o altri biostimolanti oggi utilizzati.

1. INTRODUZIONE

1.1 Perché l'agricoltura sostenibile?

Il concetto di sostenibilità in agricoltura è molto ampio e complesso, può essere analizzato da più punti di vista: ambientale, sociale ed economico (ESG360, 2021).

Dal punto di vista ambientale con sostenibilità s'intende un'agricoltura rispettosa delle risorse naturali, l'aspetto sociale invece considera la capacità della produzione agroalimentare mondiale di far fronte alla domanda globale, inclusa quella dei paesi in via di sviluppo; mentre dal punto di vista economico la sostenibilità vuole garantire un miglioramento della qualità della vita favorendo un reddito equo, la tutela della salute dell'operatore e il miglioramento della qualità della vita degli agricoltori e dell'intera società (Coderoni, 2015).

Ma cosa significa agricoltura sostenibile? E quali sono le differenze rispetto all'agricoltura biologica?

In agricoltura, con sostenibilità s'intende un'agricoltura rispettosa delle risorse ambientali (acqua, suolo, biodiversità) e dei tempi della natura. Inoltre, non si utilizzano prodotti fitosanitari o altre sostanze naturali o di sintesi (pesticidi, ormoni, additivi, ecc.) inquinanti e dannose per la salute di uomini e animali. Per quanto riguarda l'equità sociale, l'agricoltura è globalmente sostenibile se riesce a far fronte alle necessità di cibo di tutti: paesi industrializzati e paesi in via di sviluppo (Corrado, 2021).

L'agricoltura biologica invece, in Italia e in base alla normativa vigente, è uno specifico metodo di produzione legato alla coltivazione che ammette solo l'impiego di sostanze naturali ed esclude l'utilizzo di sostanze di sintesi chimica: le piante e i terreni possono essere nutriti solo con concimi naturali o appositamente autorizzati. Sono inoltre richiesti l'utilizzo di tecniche naturali per prevenire i danni provocati dai parassiti e la rotazione pluriennale delle colture (Corrado, 2021).

In sintesi, l'agricoltura biologica è un metodo di coltivazione e di allevamento con standard precisi che viene "premiato" con una certificazione ed un'etichettatura ad hoc. La sostenibilità invece, sebbene sia anch'essa misurabile, al giorno d'oggi non viene regolamentata da uno standard univoco. Al momento esiste un regolamento, l'1169/2011, che impone ai produttori di esporre in etichetta informazioni chiare sulle caratteristiche dell'alimento, sulla produzione e sulla lavorazione ma dice poco riguardo l'impatto ambientale (Gelasio, 2022). Negli ultimi anni sempre più produttori hanno scelto la via del "bollino", un marchio riportato in confezione che dovrebbe rassicurare i consumatori sulla natura green del prodotto acquistato. Non vi è però un marchio unico o una certificazione basata su una normativa come accade per il biologico, e capire quali criteri vengano considerati e quali scartati, è davvero difficile. In linea di massima, i produttori si stanno così orientando:

- Certificazioni interne: prevedono l'adozione di disciplinari interni, ovvero delle regole autoprodotte per garantire un maggiore rispetto dell'ambiente in tutte le fasi di produzione dell'alimento;

- Certificazioni private: sia enti certificatori privati che organizzazioni non governative forniscono servizi di certificazione, anche con criteri molto rigidi. Eppure, per quanto serie siano queste organizzazioni, un produttore potrebbe approfittarne per scegliere l'ente che più si addice alle sue esigenze, continuando invece a mantenere nascoste le aree più problematiche della produzione;
- Certificazioni istituzionali: al momento, non esiste un vero e proprio marchio per l'agricoltura sostenibile promosso a livello istituzionale. Qualcosa si sta muovendo ora, con diverse proposte a livello europeo, ma sembra ancora mancare un piano unificato su cui lavorare (Gelasio, 2022).

Non di rado, poi, un prodotto alimentare biologico, anche se più sano e genuino (e leggermente più costoso), può non essere considerato sostenibile nel suo complesso.

Con il termine agricoltura sostenibile s'intende quindi un'agricoltura rispettosa delle risorse naturali e che non utilizza sostanze inquinanti per non alterare l'equilibrio ambientale. È un modo di fare agricoltura che risulta essere agli antipodi rispetto al concetto di agricoltura intensiva a cui siamo o eravamo abituati (Briamonte *et al.*, 2010). Secondo la definizione dell'Agricultural Sustainability Institute, l'obiettivo dell'agricoltura sostenibile è quello di soddisfare il fabbisogno attuale di alimenti e tessuti senza compromettere la capacità da parte delle generazioni future di soddisfare a loro volta il proprio fabbisogno (ESG360, 2021).

Lo sviluppo sostenibile è dunque un tipo di economia che promuove il rispetto dell'ambiente in cui viviamo ma al contempo è in grado di salvaguardare le risorse umane, ambientali ed economiche coinvolte nei suoi processi.

Per questo un'agricoltura sostenibile è un modello di produzione economicamente vantaggiosa per i lavoratori: tra i suoi obiettivi ha quello di migliorare la loro qualità di vita e le loro condizioni di lavoro.

Per aiutarci a capire l'importanza di coniugare sostenibilità e attività agricola la FAO ha definito nel 2018 i 5 principi dell'agricoltura sostenibile:

- aumentare la produttività, l'occupazione e il valore aggiunto nei sistemi alimentari: modificare le pratiche e i processi agricoli garantendo i rifornimenti alimentari e riducendo allo stesso tempo i consumi di acqua ed energia;
- proteggere e migliorare le risorse naturali: favorire la conservazione dell'ambiente, riducendo l'inquinamento delle fonti idriche, la distruzione di habitat ed ecosistemi e il deterioramento dei suoli;
- migliorare i mezzi di sussistenza e favorire una crescita economica inclusiva;
- accrescere la resilienza di persone, comunità ed ecosistemi: trasformare i modelli produttivi in modo da minimizzare gli impatti che gli eventi estremi innescati dai cambiamenti climatici e la volatilità dei prezzi di mercato hanno sull'agricoltura;
- adattare la governance alle nuove sfide: assicurare una cornice legale idonea a raggiungere un equilibrio fra settore pubblico e privato, assegnare incentivi e garantire equità e trasparenza (FAO, 2018).

Un altro ruolo fondamentale nella strada verso la sostenibilità è svolto dall'innovazione tecnologica. La nuova frontiera si chiama agricoltura smart o agricoltura 4.0 e consiste

nell'applicare al settore le innovazioni dell'industria 4.0: digitalizzazione, geolocalizzazione, connessione in rete, Internet of Things (Salerno, 2021).

Questi strumenti sono usati in particolare nell'agricoltura di precisione, che calibra le tecniche e le sostanze da usare in base alle caratteristiche dei singoli terreni (in termini di suoli, risorse idriche, colture e rischi ambientali) e a un monitoraggio in tempo reale delle condizioni meteorologiche: una gestione efficiente che è in grado di ottimizzare la produzione minimizzando gli sprechi e gli impatti sul pianeta (Salerno, 2021).

Altro importante ruolo è quello svolto dai biostimolanti e dalla componente microbica del terreno. I biostimolanti sono prodotti di "nuova generazione" che applicati in piccole quantità, promuovono la crescita delle piante. Rappresentano una categoria eterogenea di prodotti per l'agricoltura il cui utilizzo si sta diffondendo come mezzo per incrementare le rese e la qualità delle produzioni agricole in maniera sostenibile (Santini *et al.*, 2021).

I biostimolanti sono miscele complesse derivate solitamente da processi di estrazione su matrice vegetale, possono risultare prodotti dell'economia circolare, come per esempio gli scarti di alcuni tipi di industrie che possono rappresentare una risorsa per l'agricoltura.

I principali aspetti che caratterizzano questa categoria di prodotti sono l'utilizzo in basse dosi e l'assenza di tossicità per l'ambiente e per l'uomo (CREA, 2019).

A livello legislativo, la regolamentazione di produzione e vendita dei biostimolanti è stata a lungo oggetto di discussione da parte dell'Unione Europea, il fatto che siano costituiti principalmente da miscele complesse contenenti un elevato e diversificato numero di composti rende difficile stabilire regole che possano valere per tutti. Nel luglio 2019 è stato promulgato il Regolamento Europeo 2019/1009, che riconosce i biostimolanti come categoria distinta di prodotti utilizzati in agricoltura. Questo regolamento entrerà in vigore da 2024 e, da allora, sarà obbligatorio sviluppare per ogni prodotto un dossier contenente informazioni specifiche da fornire secondo determinate linee guida (Vernì, 2022).

1.2 Potenzialità e formulazione dei biostimolanti

Il recente successo dei prodotti biostimolanti è legato all'urgente necessità di ripensare le moderne pratiche colturali per soddisfare le richieste alimentari di una popolazione mondiale in rapida crescita, preservando al contempo le risorse naturali in via di esaurimento, quali acqua e suolo, minimizzando l'impiego di prodotti agrochimici ad elevato impatto ambientale, quali fertilizzanti di sintesi e fitofarmaci, e contrastando gli effetti negativi sulle rese agricole causati dal cambiamento climatico in atto.

Per affrontare le complesse sfide dell'agricoltura del nostro secolo, l'utilizzo di biostimolanti, capaci di migliorare l'efficienza d'uso dei fertilizzanti, di ridurre l'incidenza delle avversità abiotiche e/o di migliorare la qualità delle produzioni agricole potrà giocare un ruolo determinante contribuendo alla transizione verso un modello di intensificazione sostenibile delle colture agrarie, definito dall'obiettivo di produrre di più dalla stessa area di terreno in maniera sostenibile (Bulgari *et al.*, 2014; Sellitto *et al.*, 2021).

I biostimolanti sono stati pensati per integrare e ottimizzare l'azione dei fertilizzanti e dei fitofarmaci tradizionalmente applicati sulle colture, distinguendosi nettamente da essi in

quanto agiscono influenzando i processi fisiologici della pianta, migliorandone la crescita e lo stato nutrizionale, indipendentemente dal tenore in nutrienti e senza agire direttamente contro i patogeni (du Jardin, 2015). Secondo indicazioni dello European Biostimulants Industry Council i biostimolanti possono aumentare l'efficienza d'uso dei fertilizzanti dal 5 al 25%, dove un aumento del solo 5% porterebbe ad una riduzione di circa 550.000 tonnellate di azoto utilizzato all'anno nell'Unione Europea, migliorando il reddito delle aziende agricole e riducendo la dispersione di composti azotati nell'ambiente a seguito di fenomeni di lisciviazione e volatilizzazione (EBIC, 2016).

Secondo l'attuale regolamento europeo sui fertilizzanti (UE 2019/1009), i biostimolanti sono definiti principalmente sulla base dei loro effetti sulla pianta piuttosto che sulla loro composizione. La difficoltà nel classificare tali prodotti deriva dal fatto che, come accennato precedentemente, molti biostimolanti attualmente in commercio sono ottenuti da matrici biologiche complesse ed eterogenee. Ciò ha portato a definire, dal punto di vista regolatorio, due categorie di macromolecole di prodotti: biostimolanti non microbici e biostimolanti microbici (Banzato, 2019).

I biostimolanti non microbici sono costituiti da un'ampia gamma di formulazioni organiche che rappresentano la maggior parte del mercato mondiale dei biostimolanti, tra questi gli estratti di alghe, ottenuti quasi esclusivamente da macroalghe, e gli idrolizzati proteici, derivati da idrolisi chimica o enzimatica di residui animali o residui di leguminose. Quelli appena descritti sono i biostimolanti non microbici più utilizzati, occupano oltre il 60% del mercato globale, mentre gli acidi umici e fulvici, ottenuti per biodegradazione microbica di residui vegetali e animali, rappresentano circa il 20% del mercato globale (MarketsandMarkets, 2019).

I biostimolanti microbici sono invece prodotti contenenti una o più specie microbiche in formula di cellule vive, essiccate o liofilizzate, ed elementi residui dei loro mezzi di coltura, il cui utilizzo è molto più limitato (10% circa del mercato globale) (MarketsandMarkets, 2019).

Ad oggi la frazione di mercato occupata dai biostimolanti ottenuti da microalghe e cianobatteri è ancora troppo piccola per poter essere quantificata. Da un punto di vista normativo, la regolamentazione UE 2019/1009 pone le alghe (ma non i cianobatteri) nella categoria delle piante (Categoria di Materiali Costituenti piante, parti di piante o estratti di piante, CMC 2) e quindi l'uso delle alghe deve adeguarsi alle prescrizioni relative alle piante (Lasorella, 2021).

Nella lista dei microrganismi autorizzati all'uso come biostimolanti microbici (Categoria di materiali costituenti microrganismi, CMC 7) sono inclusi ad oggi pochi batteri azotofissatori liberi (*Azotobacter*, *Azospirillum*) e simbionti (*Rhizobium*), e funghi micorrizici arbuscolari. Tuttavia, il regolamento UE 2019/1009 prevede la possibilità di aggiungere nuovi microrganismi o metodi di lavorazione degli stessi qualora se ne dimostri l'effettiva utilità agronomica e l'assenza di rischi per la salute umana, animale e vegetale e la sicurezza per l'ambiente (Lasorella, 2021; Colla, 2019).

1.3 Biostimolanti da microalghe e cianobatteri

Le applicazioni in agricoltura delle microalghe e dei cianobatteri sono state a lungo focalizzate sull'utilizzo come biofertilizzanti e ammendanti, i cui effetti sulle colture sono principalmente attribuibili al miglioramento della fertilità fisica, chimica e biologica del suolo. Tuttavia, in anni recenti numerosi studi hanno dimostrato che la varietà di risposte fisiologiche nelle piante a seguito dell'applicazione di queste biomasse microbiche non può essere attribuita esclusivamente all'aumento dei nutrienti disponibili per la pianta, ma deriva dall'azione di una vasta gamma di molecole bioattive (fitormoni, vitamine, aminoacidi, polisaccaridi, poliamine, polifenoli) che risultano efficaci sulla pianta a concentrazioni notevolmente inferiori rispetto a quelle dei macroelementi (quali azoto, fosforo e potassio) contenuti nei biofertilizzanti (Sellitto *et al.*, 2021).

La capacità delle microalghe e dei cianobatteri di produrre tali molecole bioattive, che le piante possono assorbire e metabolizzare sia per via fogliare che per via radicale, e la possibilità di migliorare la produttività delle colture utilizzando quantità di prodotto molto più ridotte rispetto ai biofertilizzanti, ha portato la comunità scientifica e le aziende ad interessarsi allo studio delle proprietà biostimolanti di questi microrganismi.

Dell'enorme biodiversità di questi microrganismi solo un numero esiguo di ceppi appartenenti a pochi generi è stato finora investigato per le proprietà biostimolanti. La maggior parte dei prodotti attualmente in commercio sono ottenuti dal cianobatterio *Arthrospira platensis* e dalla microalga verde *Chlorella spp* (Sellitto *et al.*, 2021).

1.4 Principali effetti biostimolanti sulla pianta

L'applicazione di microalghe e cianobatteri o delle formulazioni da questi derivate (biomassa, estratti, idrolizzati) sulle piante ha mostrato una vasta serie di effetti benefici spesso interconnessi. Tali risposte variano in base alla specie microalgale o cianobatterica utilizzata per produrre il biostimolante, ma anche in relazione alla specie vegetale trattata e alle condizioni di coltivazione (piante in condizioni di crescita ottimale o sub-ottimale). Tra gli effetti più comuni riscontrati c'è l'incremento della crescita vegetativa e, conseguentemente, della resa in orticole da foglia (ad es. lattuga, rucola, spinacio, cavolo cinese) e aromatiche (ad es. menta, basilico). L'aumento della crescita e del peso fresco della pianta è stato associato ad una stimolazione del metabolismo dell'azoto e del carbonio nelle piante trattate con estratti microalgali, dove si osserva di conseguenza un incremento del contenuto fogliare di proteine, carboidrati e pigmenti fotosintetici (clorofille e carotenoidi) (Santini *et al.*, 2021).

I biostimolanti possono contribuire alla stimolazione del metabolismo primario (portando ad un aumento dell'assorbimento dei nutrienti) sia in maniera diretta che indiretta: da una parte possono influenzare direttamente la fisiologia vegetale se applicati per via fogliare, dall'altra migliorano la struttura del suolo e la disponibilità di nutrienti se applicati basalmente. È saputo infatti che l'inoculo di cianobatteri nel suolo può favorire l'assorbimento di zinco e ferro da parte delle piante, attraverso la produzione di siderofori, e può favorire la mobilizzazione del fosforo nel terreno. Inoltre, i polisaccaridi extracellulari

prodotti da molte specie di cianobatteri possono stimolare il microbiota della rizosfera fornendo carbonio organico per la crescita microbica e possono migliorare l'aggregazione del suolo e la capacità di ritenzione idrica, aumentando il volume di suolo esplorabile dalle radici e favorendo indirettamente lo sviluppo radicale (Sellitto *et al.*, 2021).

Trattamenti con biostimolanti cianobatterici o microalgali hanno evidenziato effetti positivi anche nella stimolazione della crescita e dello sviluppo dell'apparato radicale: si sono osservati effetti positivi sull'architettura radicale, tra cui un aumento della lunghezza della radice, ma anche del numero di radici laterali e quindi della superficie radicale preposta all'assorbimento dei nutrienti. Tali effetti di stimolazione si esplicano sia quando il biostimolante viene applicato sulla parte basale della pianta ed è assorbito direttamente dalle radici, sia quando viene applicato sulle foglie e induce un concomitante incremento del contenuto in macro e microelementi nei tessuti vegetali (Sellitto *et al.*, 2021; Nowruzi *et al.*, 2021).

Oltre all'applicazione sulle foglie o sul terreno, la crescita delle plantule può essere stimolata anche in seguito a trattamento del seme in fase di presemina con diversi metodi, dall'immersione dei semi per tempi predeterminati al rivestimento di questi con diversi prodotti a base cianobatteri o microalghe e a diverse concentrazioni. Il trattamento su seme può avere anche l'effetto di aumentare la percentuale di germinazione.

1.5 Correlazione tra biostimolazione e tolleranza agli stress abiotici

Oggigiorno la produzione agricola è fortemente limitata dalla presenza di diversi stress abiotici, come siccità, salinità e temperature estreme che determinano rese più basse e prodotti di qualità più bassa. Si prevede che queste problematiche peggioreranno ulteriormente nei prossimi anni a causa del cambiamento climatico che sta portando ad incrementi delle temperature medie senza precedenti e al verificarsi sempre più frequente di eventi meteorologici estremi (Agricola Internazionale, 2021). Nonostante l'urgenza, le strategie per mitigare gli stress abiotici sono ancora scarse. I cianobatteri possono promuovere la crescita e lo sviluppo delle piante in condizioni di stress producendo e rilasciando una vasta gamma di molecole biologicamente attive, che possono indurre risposte sistemiche nelle piante per combattere lo stress. Questi composti di segnalazione, detti elicitori, possono influenzare l'espressione genica delle piante e stimolare l'accumulo di un'ampia gamma di sostanze fitochimiche (ad es. glucosinolati, alcaloidi, polifenoli, flavonoidi, glicosidi flavonoidi, saponine, terpeni, fitoalessine), che forniscono protezione alla pianta verso stress biotici e abiotici (Sellitto *et al.*, 2021).

Si è visto che l'inoculo di piante in vaso con vari ceppi cianobatterici in grado di determinare un consistente aumento della concentrazione nelle foglie di acidi fenolici (acido gallico, gentisico, caffeico, clorogenico e ferulico), flavonoidi (rutina e quercetina), fitormoni (acido indolo acetico e acido indolo butirrico), proteine e clorofille. L'aumento dei livelli di sostanze fitochimiche è positivamente correlato con un aumento del tasso di germinazione, della lunghezza dei germogli, della lunghezza delle radici e della biomassa nelle piante inoculate (Sellitto *et al.*, 2021).

Il trattamento delle piantine di pomodoro con estratti cianobatterici derivati da *Aphanothece sp.* e *Arthrospira platensis* ha influito sul profilo di diversi metaboliti lipofili correlati alla tolleranza allo stress abiotico delle piante: è stato riscontrato un aumento significativo del contenuto di fitolo (+2044% e +1973%) e acidi grassi fitili (+1088% e +1008%) rispetto ai controlli non trattati. Il fitolo (derivato principalmente dalla degradazione della clorofilla) è un precursore essenziale nella biosintesi dei tocoferoli, noti antiossidanti lipidici, che contribuiscono alla protezione del fotosistema II dal fotodanneggiamento. Le piante trattate con estratti cianobatterici hanno evidenziato anche l'accumulo di acido linolenico, precursore chiave nella via biosintetica che porta ai jasmonati, in quantità considerevole (+673% e +561% con *Aphanothece sp.* e *A. maxima*, rispettivamente) rispetto ai controlli non trattati (Santini *et al.*, 2021).

Molti fattori abiotici (siccità, salinità, temperature estreme) si manifestano nelle piante come stress ossidativo, portando all'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che danneggiano il DNA, i lipidi, i carboidrati e le proteine e causano anche segnali cellulari aberranti. È stato dimostrato che l'inoculo nel suolo o l'applicazione fogliare di biostimolanti a base di cianobatteri rafforzano l'attività antiossidante delle piante trattate, mitigando così gli effetti dei radicali liberi indotti dallo stress e prevenendo la formazione di ROS (Santini *et al.*, 2021; Bano *et al.*, 2022).

Nonostante si stiano accumulando prove sul potenziale dei cianobatteri nell'indurre risposte di difesa nelle piante, la caratterizzazione delle molecole elicentriche e dei loro meccanismi d'azione è ancora scarsa. Tuttavia, recentemente sono stati compiuti notevoli progressi nella comprensione degli elicitori dei cianobatteri.

1.6 Bioattività delle molecole microalgali e cianobatteriche

Gli effetti biostimolanti descritti precedentemente sono il risultato dell'attività di una serie di molecole bioattive, estratte o rilasciate da microalghe e cianobatteri, la cui quantità o qualità nel prodotto biostimolante dipende dalla tecnica di estrazione e dalla specie microbica utilizzata. Nonostante l'evidenza sperimentale suggerisca una relazione tra i composti bioattivi prodotti dalle microalghe e dai cianobatteri e i loro effetti sulla fisiologia vegetale, ad oggi mancano studi che identifichino chiaramente il ruolo e la rilevanza di ciascuna molecola coinvolta nella biostimolazione, di conseguenza l'effetto dei biostimolanti può essere interpretato come risultato di un insieme complesso di costituenti che possono anche agire in modo sinergico. I composti bioattivi possono agire direttamente, stimolando i processi fisiologici e biochimici delle piante, o agire da molecole segnale, dette elicitori, che inducono la produzione di sostanze bioattive da parte delle piante stesse. Ad esempio, si pensa che la capacità degli estratti algali di aumentare il contenuto di fitormoni nei tessuti vegetali sia principalmente legata alla loro capacità di stimolare le vie biosintetiche ormonali nelle piante trattate (Sellitto *et al.*, 2021).

I fitormoni sono composti organici prodotti in concentrazioni molto basse che funzionano da messaggeri chimici nella regolazione di diversi processi fisiologici vegetali, agendo in tutte le fasi di sviluppo della pianta, dalla germinazione del seme alla senescenza (Vitali, 2020). La loro presenza e funzione è stata principalmente studiata nelle piante, tuttavia

molti microrganismi, incluse le microalghe e i cianobatteri, sono in grado di produrre e rilasciare fitormoni come, ad esempio, auxine, citochinine, etilene, gibberelline, acido abscissico e brassinosteroidi, nonché molecole ad attività ormono-simile quali poliammine, acido salicico e acido jasmonico. Sebbene gli studi sulle risposte fisiologiche indotte dall'applicazione di fitormoni microalgali e cianobatterici siano ancora scarsi, sono stati condotti alcuni biosaggi in vitro su specie vegetali modello che hanno evidenziato come gli estratti aggiunti nel mezzo di coltura inducano risposte paragonabili a quelle degli ormoni purificati usati come standard (Santini *et al.*, 2021).

Le citochinine e le gibberelline possono avere un effetto protettivo sulla pianta, riducendo la degradazione della clorofilla e ritardando la senescenza fogliare. Le poliammine svolgono importanti ruoli nel mantenimento delle funzioni fisiologiche durante gli stress, grazie alle loro attività antiossidanti e osmoprotettive. La biosintesi delle poliammine, così come di altre molecole coinvolte nella risposta allo stress, viene coordinata a livello cellulare dall'acido abscissico, un altro importante fitormone sintetizzato nelle piante così come nelle microalghe e nei cianobatteri in risposta a fattori di stress. La presenza di acido abscissico negli estratti algali può indurre nelle piante trattate tolleranza alla siccità, attraverso la regolazione della chiusura stomatica e il miglioramento degli scambi gassosi a livello fogliare (Santini *et al.*, 2021; Refaay *et al.*, 2021).

Anche molecole bioattive come gli aminoacidi possono mostrare attività ormoni-simili, agendo come precursori o attivatori di fitormoni da parte della pianta. Alcune microalghe e cianobatteri presentano contenuti proteici molto elevati che possono raggiungere il 70% sul peso secco della biomassa. Negli idrolizzati enzimatici ottenuti dalla spirulina circa il 60% del contenuto proteico totale è costituito da aminoacidi in forma L che possono essere direttamente utilizzati dalle piante per la sintesi proteica o possono migliorare l'assorbimento dei nutrienti dal suolo, ad esempio attraverso la stimolazione della crescita dell'apparato radicale in particolar modo in piante sottoposte a stress abiotico. Al contrario gli aminoacidi D, abbondanti soprattutto in idrolizzati proteici ottenuti per idrolisi chimica, possono produrre effetti fitotossici se forniti alla pianta in alte concentrazioni (Santini *et al.*, 2021).

Tra i componenti maggiormente attivi e più abbondanti in microalghe e cianobatteri troviamo i polisaccaridi, che possono agire come elicitori attivando una serie di molecole segnale, tra cui l'acido salicico, l'acido jasmonico e l'etilene, che conferiscono una maggiore resistenza agli stress abiotici e ai patogeni. Le microalghe e i cianobatteri sono in grado di sintetizzare polisaccaridi di riserva intracellulari (glucani) e polisaccaridi extracellulari. Questi ultimi sono molecole di ben nota rilevanza agronomica nei suoli, grazie alla loro capacità di migliorarne l'aggregazione, la capacità idrica e la biodisponibilità di macro e micronutrienti (Sellitto *et al.*, 2021).

La bioattività dei polisaccaridi dipende dalla composizione in monosaccaridi, dalla loro struttura (es. grado di ramificazione e ultrastruttura) e dal loro peso molecolare. Nonostante i meccanismi attraverso i quali i polisaccaridi microalgali e cianobatterici migliorano la crescita delle piante siano ancora da chiarire, si pensa che la presenza di acidi uronici e gruppi solfato possa essere associata agli effetti biostimolanti osservati. Infine, l'applicazione di alcuni oligosaccaridi può avere effetti auxino-simili, stimolando l'accelerazione della biosintesi e del trasporto di auxina alle radici della pianta.

Nell'utilizzo commerciale delle molecole bioattive prodotte dalle microalghe e dai cianobatteri è importante considerare che la concentrazione e il rapporto tra le varie molecole può variare notevolmente in relazione al momento della raccolta. Ad esempio, la produzione di auxina è tipicamente associata ad una riduzione del tasso di crescita della coltura microbica, risultando maggiore al termine della fase di crescita esponenziale e all'inizio della fase stazionaria, mentre l'attività auxino e citochinino-simile di ceppi microalgali sembra essere soggetta a variazioni giornaliere in funzione del tempo di esposizione alla luce. Grazie alla plasticità metabolica di questi microrganismi, le condizioni colturali possono essere gestite in modo da orientare le vie metaboliche verso una maggiore produzione di metaboliti di interesse. Ad esempio, la produzione di auxina può essere stimolata tramite l'aggiunta di triptofano, l'aminoacido precursore nella via biosintetica delle auxine (Santini *et al.*, 2021).

Gli esopolisaccaridi invece svolgono tipicamente una funzione protettiva. L'induzione di condizioni di stress nella coltura ne può stimolare la produzione in maggiori quantità, come, ad esempio, condizioni di carenza di azoto, fosforo e zolfo, che possono portare ad una diminuzione della sintesi proteica e ad un accumulo di lipidi e/o carboidrati intra- o extracellulari in relazione alla specie microbica coltivata. In colture a luce artificiale l'applicazione di elevate intensità luminose o di determinate lunghezze d'onda può aumentare la sintesi o il rilascio di polisaccaridi extracellulari (Sellitto *et al.*, 2021).

1.7 Introduzione alla spirulina

La spirulina (*Arthrospira platensis*) è un batterio fotoautotrofo filamentoso Gram-negativo appartenente alla classe Cyanobacteria (cianobatteri). È una specie unicellulare a forma di spirale, è lunga circa mezzo millimetro ed è di colore verde-azzurro, appartiene alla famiglia delle Phormidiaceae (Wikipedia).

Vive in laghi di acqua salata, calda e con pH alcalino delle regioni tropicali e subtropicali. Viene coltivata in maniera estensiva in bacini artificiali in Cina, in India e negli Stati Uniti, mentre in Cile, in Italia, in Francia, a Cuba ed in Australia viene coltivata principalmente in sistemi chiusi composti da fotobioreattori, che garantiscono una qualità del prodotto di gran lunga superiore, ma in quantità inferiori (Zagnoli, 2014).

Negli ultimi anni si sta diffondendo il suo consumo come integratore alla dieta, può andare a sostituire altre fonti proteiche come la carne e il pesce e viene usata soprattutto nel mondo del benessere e dello sport per le sue proprietà nutrizionali.

Sul peso secco contiene circa il 65% di proteine, supera di circa tre volte il contenuto proteico di carne, pesce, uova e latticini. Come se non bastasse, a differenza della carne e dei latticini, non ha "effetti collaterali" su colesterolemia ed equilibrio acido-base del corpo, non provoca quindi iperacidità; al contrario, sembra abbia addirittura un effetto regolatore e normalizzatore. La frazione proteica è inoltre costituita da tutti gli aminoacidi essenziali, la loro concentrazione prevale su quella degli aminoacidi non essenziali o sintetizzabili dal nostro organismo (Arndt, 2014).

Contiene poi importanti quantità acidi grassi insaturi come l'acido gamma-linolenico (10-19%) e l'acido linoleico (12-14%) (Arndt, 2014).

La spirulina viene definita “superalimento” perché oltre a contenere molte proteine e acidi grassi importanti concentrati in poco volume, contiene anche pigmenti coloranti, vitamine e minerali, in quantità così elevate da non essere eguagliata da nessun altro alimento.

Tra i pigmenti coloranti troviamo principalmente la clorofilla verde, la ficocianina azzurra e i carotenoidi gialli, arancioni e rossi. La clorofilla è il pigmento che dà alle foglie il colore verde e cattura la luce del sole per produrre energia e per la fotosintesi, è presente nella spirulina in quantità tre volte superiore a quella contenuta nelle piante più evolute (Arndt, 2014)

La ficocianina azzurra stimola la produzione di globuli bianchi e rossi nel sangue, rafforza poi il sistema immunitario attivando, tra le altre cose, i linfociti. Favorisce le normali funzioni cellulari e allo stesso tempo inibisce degenerazioni patologiche come il cancro.

Un terzo gruppo di pigmenti sono i carotenoidi che, come il beta-carotene, rappresentano un primo stadio della vitamina A. Nella spirulina sono presenti più di 15 tipi di carotenoidi, con circa il 20% di solo beta-carotene. Anche in questo caso la concentrazione è incredibilmente alta: si tratta di una misura dieci volte superiore a quella delle carote, a parità di peso secco. I pigmenti del carotene contribuiscono anche a rafforzare il sistema immunitario e si contraddistinguono per la loro capacità di prevenire e combattere il cancro. I pigmenti funzionano anche come antiossidanti e rendono quindi inoffensivi i radicali liberi, riducendo così i danni alle cellule e al DNA (Arndt, 2014).

Tra le numerose vitamine fondamentali per il metabolismo troviamo la vitamina A (beta-carotene), la vitamina B12, B1, B2 (riboflavina), B6, l'inositolo, l'acido nicotinico, l'acido folico, l'acido pantotenico, la biotina (vitamina H), il tocoferolo (vitamina E) e la vitamina C. Insieme all'ormai noto beta-carotene o provitamina A, è degna di nota anche l'alta concentrazione di vitamina B12, contenuta in concentrazione doppia rispetto al fegato di manzo, alimento ad oggi che ne contiene in maggiore quantità. Dal momento che questa serve soprattutto per la produzione di globuli rossi, una sua carenza può determinare uno stato di stanchezza cronica e/o nevralgia. La vitamina B1, in quanto componente enzimatica, è coinvolta in numerosi processi metabolici ed è indispensabile per scindere i carboidrati. La vitamina E viene oggi considerata un importantissimo neutralizzatore di radicali liberi, la spirulina ne contiene dai 3 ai 18 mg su 100 g (Arndt, 2014).

A. platensis contiene inoltre moltissimi enzimi: finora ne sono già stati scoperti più di 2000, in buona parte non ancora categorizzati né studiati. Uno dei più importanti è la superossido dismutasi (SOD) che di solito, quando vi sono rame, zinco e manganese a sufficienza, viene prodotta direttamente dall'organismo. La SOD è un antiossidante molto efficace. (Sannasimuthu *et al.*, 2018).

Tra i minerali presenti in quantità maggiori nella spirulina, troviamo magnesio, potassio e calcio, che provocano una reazione basica in grado di riequilibrare l'iperacidità diffuse. Tra gli oligoelementi contenuti in *A. platensis*, sono soprattutto lo zinco e il selenio ad aumentare le difese immunitarie e la vitalità. Lo zinco è indispensabile per il corretto funzionamento di circa 80 enzimi, il selenio serve soprattutto per depurare l'organismo da metalli pesanti e per neutralizzare i radicali liberi (Arndt, 2014).

Al giorno d'oggi si consiglia l'introduzione della spirulina nella nostra dieta perché è un alimento sano, naturale e nutriente, ideale come integratore alimentare in quanto si diffondono sempre più forme di alimentazione sbagliata rappresentate dai fast food e dai

prodotti preconfezionati, trattati e di bassa qualità. Si può anche considerare un alimento dimagrante in quanto il suo contenuto in fenilalanina induce un senso di sazietà.

1.8 Coltivazione della spirulina

La coltivazione della spirulina avviene in bacini, vasche o fotobioreattori a seconda della zona di produzione e soprattutto in base all'utilizzo che verrà fatto del prodotto finale.

I cianobatteri per crescere (fotosintetizzare) hanno bisogno di molta luce: più luce c'è, più aumenta la produzione e meno saranno i nutrienti e fertilizzanti necessari. La maggior parte degli impianti moderni, infatti, viene allestita in campo anziché in serra.

Il processo di coltivazione inizia con la preparazione dell'ambiente di coltura: vengono riempite le vasche o i fotobioreattori con acqua pura e sterilizzata, poi viene aggiunto il cosiddetto "brodo di coltura", costituito da una miscela di fosfati ed altri nutrienti in quantità inferiori e infine viene conglobata della CO₂ per facilitare il processo fotosintetico. La temperatura ottimale dell'acqua è di 35/37°C e il pH viene mantenuto tra 8.5 e 10.5.

Prima di inoculare la spirulina nell'ambiente di coltura è necessario farla riprodurre in piccoli contenitori per ridurre i tempi di sviluppo, si inizia da piccoli becher e si scala gradualmente fino ad arrivare a contenitori da 25-30 litri. Si effettua poi l'inoculo in vasca o in fotobioreattore (Casazza *et al.*, 2022).

Durante la crescita della popolazione cianobatterica, l'acqua viene movimentata e rimescolata di continuo grazie all'azione di alcune pompe o pale, che evitano il ristagno e migliorano la crescita della coltura, permettendo anche il ricircolo dei nutrienti.

Nei periodi successivi l'inoculo, la spirulina si riproduce seguendo due fasi di crescita: nella prima, detta fase esponenziale, il tasso di crescita è sempre positivo nel tempo grazie alla pronta disponibilità dei nutrienti e all'alta illuminazione, che andrà pian piano ad abbassarsi a causa dell'ombreggiamento reciproco delle cellule; nella seconda fase, detta stazionaria, il tasso di crescita della popolazione è molto rallentato e la concentrazione algale raggiunge valori elevati; questo è il periodo che si può considerare adatto per la raccolta (Zagnoli, 2014; Ravelonandro *et al.*, 2008).



Fig. 1 e Fig. 2: coltivazione della spirulina in vasche all'aperto

La raccolta inizia con il convoglio del liquido contenuto nelle vasche verso un'unità filtrante, che permette di separarlo in due flussi distinti: la massa algale umida, dove la coltura è maggiormente concentrata, e il liquido filtrato che viene nuovamente immesso nelle vasche perché ricco di nutrienti e sali minerali.

La massa algale viene poi pressata e trafilata, al fine di velocizzare la disidratazione; gli spaghetti d'alga vengono successivamente lasciati essiccare sistemati su delle griglie e ad una temperatura di 18-20°C (Zagnoli, 2014).



Fig. 3, 4, 5: raccolta, pressatura e trafilatura di *A. platensis*

La crescita e la composizione chimica delle microalghe sono influenzate da diversi fattori, quali l'intensità della luce, i nutrienti, il pH, la conducibilità elettrica, la forma e la concentrazione di azoto nel substrato. Il potassio è un elemento molto importante per la crescita delle microalghe e, infatti, *Arthrospira platensis* ha tollerato condizioni estreme di pH e concentrazione salina del substrato di crescita, aumentando la sua biomassa quando il sodio è stato sostituito da K a parità di concentrazione. Da altre ricerche è emerso che gli stimolanti biochimici, come fitormone e poliammide, hanno propiziato l'aumento della produttività delle microalghe, mentre le auxine naturali o sintetiche ed i loro precursori l'incremento della crescita e del contenuto di proteine, saccaridi e clorofille dell'alga verde (Zagnoli, 2014).

Come accennato precedentemente, sono ad oggi diffusi due distinti metodi di coltivazione, la coltivazione in vasca all'aperto e quella in fotobioreattore in ambiente chiuso.

Le coltivazioni in vasca, o nei bacini all'aperto, possono arrivare a coprire qualche ettaro e sono caratteristiche delle zone tropicali, dove le temperature sono elevate tutto l'anno e consentono una produzione senza interruzioni.

Il principale vantaggio di questo metodo di coltivazione sono i bassi costi d'impianto e di gestione, mentre, tra gli svantaggi, troviamo l'impossibilità di controllare pH e temperatura e il possibile inquinamento da altre specie algali o insetti.

Le coltivazioni in fotobioreattori invece, sono caratteristiche delle zone in cui la coltivazione nei bacini non garantirebbe una produzione costante nell'arco dell'anno, come in Italia. I costi di produzione sono elevati, ma la spirulina è di alta qualità.

Tra i vantaggi troviamo la possibilità di controllare i parametri chimico-fisici dell'acqua ed una produzione maggiore rispetto alla coltivazione all'aperto, l'unico svantaggio, oltre agli elevati costi d'impianto, è rappresentato dal rischio di accumulo di ossigeno prodotto durante la fotosintesi, che limita le dimensioni dei fotobioreattori (Zagnoli, 2014).

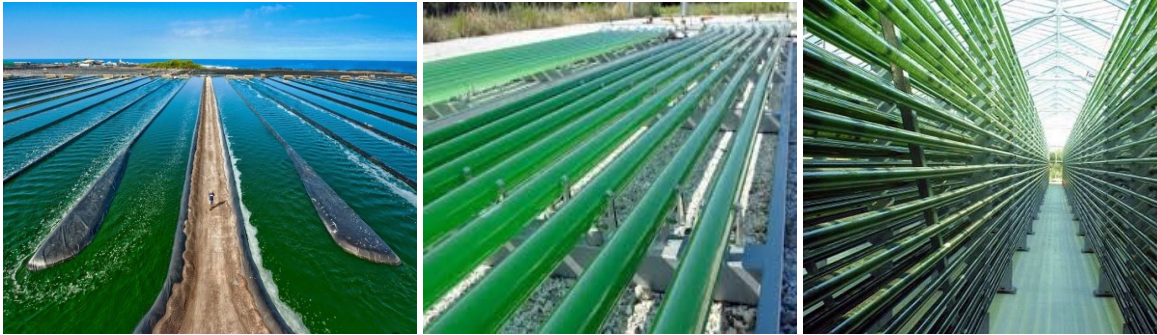


Fig. 6: coltivazione di spirulina in bacini all'aperto – Fig. 7, 8: coltivazione di *A. platensis* in sistemi chiusi

Per migliorare la fattibilità economica dei prodotti a base di cianobatteri o microalghe, la crescita di questi può essere accoppiata alla bonifica delle acque reflue, recuperando in tal modo i nutrienti e conservando l'acqua per un ulteriore utilizzo. Le acque reflue contengono diversi composti come azoto, ammoniaca, fosforo, zolfo e ferro, ma sono presenti anche tossine e metalli pesanti. I processi normali di trattamento primario e secondario di queste acque reflue portano ad avere un effluente limpido, apparentemente pulito, che in taluni casi contiene però forme di azoto e fosforo inorganico in quantità medio-alte, potrebbe essere potenzialmente eutrofizzante e determinare quindi problemi a lungo termine sull'ambiente. Per la loro composizione, le acque reflue sono in grado di fornire alle microalghe diversi composti nutritivi quali il carbonio, l'azoto e il fosforo, che rappresentano i nutrienti essenziali per la loro crescita in condizioni eterotrofe o mixotrofe. In diversi studi è stato dimostrato che molte specie di microalghe sono in grado di rimuovere in modo efficiente i metalli pesanti e i nutrienti presenti nelle acque, in percentuali variabili e dipendenti dalla specie coltivata (Wuang *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2004).

2. SCOPO DEL LAVORO

Entro il 2050 il mondo avrà bisogno del 60% in più di cibo rispetto a quello disponibile oggi e circa l'80% di questo aumento dovrà provenire da terreni già coltivati. Questo obiettivo, insieme al cambiamento climatico e alla diminuzione della disponibilità di risorse naturali, rappresenta una seria sfida per l'agricoltura, che per soddisfare l'attuale domanda alimentare, fa un uso massiccio di fertilizzanti sintetici e pesticidi, di lavorazioni intensive, di irrigazione eccessiva, così determinando inquinamento, elevate emissioni di gas serra e perdita di servizi ecosistemici essenziali. D'altra parte, l'uso dell'agricoltura biologica comporta spesso perdite di resa del 20% e più rispetto alla coltivazione convenzionale (Santini *et al.*, 2021).

In questo contesto, i biostimolanti vegetali hanno ricevuto crescente attenzione da parte della comunità scientifica e delle industrie agrochimiche negli ultimi due decenni e mezzo. I biostimolanti sono destinati ad integrare i prodotti fitosanitari e i fertilizzanti tradizionali, in quanto definiti un “prodotto fertilizzante la cui funzione è quella di stimolare i processi nutritivi delle piante indipendentemente dal contenuto nutritivo del prodotto con il solo scopo di migliorare una o più delle seguenti caratteristiche della pianta o la rizosfera della pianta: efficienza nell'uso dei nutrienti, tolleranza allo stress abiotico, caratteristiche qualitative o disponibilità di nutrienti confinati nel suolo o nella rizosfera”. Queste caratteristiche dei biostimolanti derivano dall'azione di composti bioattivi efficaci sulle piante a concentrazioni significativamente inferiori rispetto ai macronutrienti. Inoltre, essi derivano da un processo produttivo sostenibile che utilizza molte meno risorse (Santini *et al.*, 2021; Kopittke, 2019).

Obiettivo della tesi è fare una rassegna dei casi studio pubblicati sull'utilizzo della spirulina come biostimolante in agricoltura, applicata sottoforma di diversi formulati, come sospensione, filtrato, omogenato o supernatante, per valutare se ci sono effetti benefici sulla germinazione dei semi, sulla crescita delle piante e sulla produzione di diverse colture orticole, venendo applicati come primer per semi, spray fogliare o biofertilizzante a diverse concentrazioni. I risultati verranno poi analizzati al fine di determinare se esiste una differenza significativa tra coltura non trattata e coltura trattata con biostimolanti cianobatterici e, in alcuni casi, il confronto verrà fatto anche con colture concimate e/o trattate con biostimolanti non microalgali o cianobatterici.

Gli studi di seguito riportati e successivamente analizzati mostrano risultati in alcuni casi discordanti tra loro, ciò può dipendere dalla coltura trattata, dalla concentrazione del prodotto, dal tipo di trattamento effettuato e, non per ultimo, dal metodo di applicazione. Anche se lo sviluppo e la commercializzazione di nuovi biostimolanti attualmente non richiedono una chiara dimostrazione della modalità e della specificità d'azione, per massimizzare gli effetti benefici delle applicazioni cianobatteriche è necessaria una migliore comprensione di come ceppi diversi influenzino specificamente la fisiologia delle piante. L'evidenza sperimentale suggerisce che esiste una relazione tra i composti bioattivi prodotti dai cianobatteri e gli effetti sulla fisiologia vegetale. Tuttavia, mancano studi che

identifichino chiaramente il ruolo e la rilevanza delle diverse molecole coinvolte nel processo di biostimolazione.

Wuang *et al.* (2016) hanno testato della spirulina derivata dal biorisanamento delle acque reflue dell'acquacoltura come fertilizzante agricolo in ortaggi a foglia quali rucola e cavolo cinese. Hanno confrontato campioni non concimati (di controllo) con campioni fertilizzati con della spirulina pura ed anche campioni concimati con un fertilizzante commerciale 15-15-15 e, a parità di trattamento, hanno ottenuto i risultati migliori in rucola piuttosto che in cavolo cinese.

Godlewska *et al.* (2019) hanno utilizzato un omogenato per il rivestimento dei semi di ravanello e testato l'applicazione di un filtrato di spirulina per l'ammollo dei semi e per l'irrorazione fogliare, sempre su ravanello. Tutti e tre gli esperimenti sono stati fatti utilizzando diverse concentrazioni di filtrato od omogenato e sono stati ottenuti risultati diversi, in alcuni casi anche controproducenti. Il trattamento fogliare è sembrato essere quello più efficiente.

Dias *et al.* (2016) hanno valutato la crescita, la resa e la qualità post-raccolta di melanzane trattate con Spirufert®, ogni campione è stato trattato per via fogliare a quattro stati fenologici distinti, per un totale di quattro trattamenti. I campioni differivano tra essi solo per la diversa concentrazione del fertilizzante. I risultati ottenuti hanno dimostrato che non c'è una concentrazione di fertilizzante ideale, ma che una determinata concentrazione è più conveniente rispetto ad un'altra in base al tipo o alla quantità di prodotto che si vuole ottenere (maggior numero di frutti, maggiori dimensioni, maggior compattezza della polpa...).

Osman *et al.* (2015) hanno studiato l'effetto dell'applicazione di una sospensione di spirulina dopo aver eseguito un trattamento erbicida con fusilade max in una coltivazione di fave. Fusilade max ha portato ad una riduzione di tutti i parametri di crescita e resa, il trattamento fogliare con una sospensione di spirulina ha attenuato gli effetti negativi del trattamento diserbante ed ha fatto sì che la coltivazione si riprendesse più velocemente.

Mala *et al.* (2017) hanno analizzato l'effetto di un trattamento a base di spirulina su spinacio cinese, i test sono stati effettuati sia sulla germinazione che sulla crescita ed in particolare sul contenuto fogliare di clorofilla, proteine e vitamina A. Sono stati ottenuti risultati molto positivi in entrambi i casi.

Verranno di seguito analizzate tutte le pubblicazioni appena presentate.

3. CASI STUDIO

3.1 Preparazione dei biostimolanti e modalità di applicazione

La produzione di biostimolanti a partire da biomasse microalgali e cianobatteriche può prevedere l'utilizzo di diverse tecniche volte principalmente a rompere le cellule rendendo disponibili per la pianta le molecole bioattive contenute o legate alle pareti cellulari (Sellitto *et al.*, 2021). Questa rottura può avvenire attraverso metodi fisico/meccanici, chimici o enzimatici: la scelta del metodo di estrazione dipende principalmente dal tipo di biomassa utilizzata e dalle molecole target. I metodi fisico/meccanici sono ad oggi quelli più utilizzati a scopo di ricerca, sono molto più efficienti se applicati nell'estrazione di biomolecole da cianobatteri in quanto prevedono la rottura meccanica delle cellule o l'utilizzo di alta pressione, alte temperature, ultrasuoni o loro combinazioni, non sono in grado di garantire elevate rese di estrazione di micro e macroalghe che possono presentare una parete cellulare più spessa. In seguito alla rottura delle cellule, può seguire una fase di separazione dell'estratto dai residui cellulari tramite centrifugazione o filtrazione o una fase di estrazione mediante solventi al fine di ottenere specifiche frazioni dall'estratto grezzo. Ad esempio, nella produzione di estratti polisaccaridici biostimolanti, a seguito della rottura fisica delle cellule i polisaccaridi vengono fatti precipitare solitamente con etanolo. Una tecnica piuttosto recente è l'estrazione che utilizza come solvente la CO₂ supercritica, ovvero con proprietà chimico-fisiche intermedie tra un liquido e un gas, ottenuta a temperature contenute (≈50°C) e in condizioni di alta pressione (200-500 bar), garantendo la conservazione dei composti bioattivi termolabili presenti nella biomassa (Sellitto *et al.*, 2021).

Nella preparazione di idrolizzati microalgali e cianobatterici l'utilizzo di agenti chimici, principalmente acidi o basi come acido solforico, acido cloridrico e idrossido di sodio, comporta generalmente la rottura delle macromolecole contenute nelle cellule. Per questo motivo questi metodi vengono sempre meno utilizzati in quanto possono portare alla degradazione e inattivazione di alcune delle molecole bioattive contenute nella biomassa e richiedono il successivo smaltimento di grosse quantità di composti chimici. Nei metodi enzimatici invece, si utilizzano singoli enzimi o miscele di enzimi in grado di rompere le pareti cellulari (cellulasi, xilanasi, pectinasi) e/o enzimi proteolitici (proteasi) che scindono i legami peptidici andando a produrre idrolizzati proteici, ovvero prodotti ricchi in aminoacidi liberi e peptidi solubili. Gli estratti e gli idrolizzati possono essere applicati direttamente sull'apparato fogliare tramite irrorazione o nebulizzazione, sul substrato di coltura (suolo, mezzo di coltura idroponico) tramite fertirrigazione dove le molecole attive vengono assorbite dall'apparato radicale, oppure possono essere utilizzati per trattamenti presemina (seed priming). L'applicazione fogliare è generalmente preferita all'applicazione su suolo poiché consente di utilizzare dosi inferiori di prodotto, limitare le perdite dovute a lisciviazione e prevenire la degradazione da parte dei microrganismi del suolo. Nel seed priming i prodotti vengono applicati tramite immersione dei semi per un tempo variabile nell'estratto/sospensione microbica (seed soaking) o

possono andare a costituire, assieme a coadiuvanti, un rivestimento intorno al seme (seed coating).

In alternativa, per evitare i costi legati ai processi di estrazione/idrolisi, possono essere applicate direttamente le cellule vive nel substrato di crescita o sulle foglie della pianta o essere utilizzate per il trattamento dei semi. Anche il mezzo di coltura separato per filtrazione o centrifugazione dalla biomassa microalgale o cianobatterica può essere utilizzato direttamente per il trattamento biostimolante, sfruttando l'azione dei composti rilasciati dalle colture microbiche (es. fitormoni e polisaccaridi extracellulari) (Sellitto *et al.*, 2021).

3.2 Caso studio 1: Utilizzo di spirulina prodotta dal trattamento di acque reflue come fertilizzante agricolo

Wuang, Khin, Chua, Luo (2016): Use of Spirulina biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers

Wuang *et al.* (2019) hanno testato della spirulina derivata dal biorisanamento delle acque reflue dell'acquacoltura come fertilizzante agricolo in ortaggi a foglia quali rucola e cavolo cinese. Il biorisanamento è una valida alternativa ai tradizionali trattamenti di purificazione, inoltre, in condizioni fotosintetiche, la crescita delle alghe consente il rilascio di ossigeno, aumentando il potenziale di fitodepurazione dell'acqua.

Uno degli scopi di questo studio era quello di migliorare la fattibilità economica dei prodotti a base di cianobatteri, la crescita della spirulina è stata quindi accoppiata alla bonifica delle acque reflue.

A. platensis è stata coltivata in un terreno commerciale (Guillard F/2), secondo la diluizione raccomandata dal produttore (1:1000) in acqua di rubinetto con 30 g/l sale marino. La coltivazione è poi stata trasferita in batch di 2L contenenti le acque reflue da acquacoltura, ad una concentrazione iniziale di 2×10^4 cellule per ogni mL di acqua. Durante tutto lo studio, l'unica forma di agitazione è stata fornita dall'aerazione dell'aria tramite un tubo singolo (portata di 10/15 mL/min) in ciascuna batch di coltivazione.

Sono state prelevate dalle batch e successivamente centrifugate delle quantità prestabilite di sospensione di alghe (50 mL). I supernatanti sono stati prelevati e analizzati, al fine di determinare il residuo di ammoniaca, nitriti, nitrati e altri inquinanti, mentre il pellet rimasto nel fondo è stato successivamente testato come fertilizzante.

3.2.1 Estratto di spirulina su piante in vaso

Gli esperimenti riguardavano piante in vaso di rucola (*Eruca sativa*), e cavolo cinese (*Brassica rapa ssp. chinensis* – Pak Choy). Per ciascuna pianta sono state condotte quattro prove: una di controllo, una con spirulina solida post centrifugazione (5 g/vaso), una con fertilizzante chimico (Triple Pro 15-15-15, 0,3 g/vaso/settimana) e una con spirulina (5 g/vaso) più fertilizzante chimico (0,3 g/vaso/settimana). La durata degli esperimenti variava dai 30 ai 40 giorni, tutte le prove sono state eseguite in triplicato. La misurazione dei parametri di crescita è stata svolta settimanalmente. Al termine delle prove, le piante

sono state raccolte e sono stati determinati il numero di foglie, l'altezza della pianta, il contenuto di clorofilla, la lunghezza delle radici, il peso fresco e il peso secco.

Tabella 1: risultati dei parametri di crescita alla raccolta in rucola (dopo 30 gg) e cavolo cinese (dopo 40 gg)

Parametro della pianta	Controllo	<i>Spirulina</i>	Concime chimico	<i>Spirulina</i> + concime chimico
<i>Rucola (30 giorni alla raccolta)</i>				
Numero di foglia	7,67 ± 0,67	9,00 ± 0,58	9,67 ± 0,67	9,67 ± 0,33
Altezza della pianta (cm)	31,33 ± 5,93	48,67 ± 3,67** [,] * [,] #	28,33 ± 3,33*	32,00 ± 8,00 [#]
Lunghezza radice (cm)	6,00 ± 1,73	6,17 ± 0,60*	7,33 ± 0,33 [#]	9,67 ± 0,33* [,] #
Contenuto di clorofilla	13,67 ± 0,28	17,80 ± 1,87	18,60 ± 0,32	18,70 ± 0,87
Peso fresco (g)	10,67 ± 0,67	12,67 ± 0,33** [,] *	13,67 ± 1,45	14,67 ± 0,33** [,] *
Peso a secco (g)	7,48 ± 0,38	9,06 ± 0,36**	9,52 ± 1,05	10,00 ± 0,05**
<i>Pak Choy (40 giorni alla raccolta)</i>				
Numero di foglia	10,33 ± 0,88	13,00 ± 0,00*	14,00 ± 0,00** [,] *	13,50 ± 0,50
Altezza della pianta (cm)	15,83 ± 1,59	17,5 ± 2,50	19,17 ± 0,73	21,75 ± 0,75
Lunghezza radice (cm)	2,33 ± 0,33	7,00 ± 1,00**	6,17 ± 1,59**	7,00 ± 1,00**
Contenuto di clorofilla	13,17 ± 1,37	14,25 ± 2,85	12,77 ± 0,79	11,10 ± 0,80
Peso fresco (g)	12,67 ± 1,20	14,00 ± 3,00	17,33 ± 1,76	17,50 ± 0,50
Peso a secco (g)	3,71 ± 0,60	4,79 ± 0,26*	5,91 ± 0,22** [,]	5,30 ± 0,23**

* e [#] indicano la significatività statistica tra i gruppi di test.

** indica la significatività statistica con il gruppo di controllo.

Rispetto al controllo, le piante di rucola coltivate in terreni fertilizzati con spirulina hanno mostrato un aumento dell'altezza della pianta (del 55,3%), un aumento del contenuto di clorofilla (del 30,2%), un maggiore peso fresco e secco (rispettivamente del 18,7% e del 21,1%). Rispetto alle piante coltivate con Triple Pro 15-15-15, le piante coltivate in terreno arricchito con spirulina hanno mostrato un aumento dell'altezza della pianta del 71,8% e prestazioni comparabili in tutti gli altri parametri di crescita. L'aggiunta di *A. platensis* a Triple Pro 15-15-15 non ha mostrato alcun miglioramento nella maggior parte dei parametri di crescita, rispetto alle prove con sola spirulina o solo Triple Pro.

Per quanto riguarda il cavolo cinese, non ci sono state differenze significative di tutti i parametri di crescita tra le piante coltivate in terreno arricchito con spirulina e il controllo, tranne che per la lunghezza delle radici risultata maggiore per le piante coltivate nel terreno arricchito con spirulina.

Le piante coltivate nel terreno concimato con Triple Pro 15–15-15 hanno mostrato risultati migliori in termini di numero di foglie e di aumento del peso secco (+29,1%), rispetto a quelle nel terreno arricchito con spirulina. L'aggiunta di *A. platensis* a Triple Pro 15–15-15 non ha mostrato alcun miglioramento dei parametri di crescita.

3.2.2 Immersione semi in sospensione di spirulina

Gli studi sono stati condotti su cavolo cinese (*B. rapa ssp. chinensis*) e broccolo cinese (*Brassica oleracea alboglabra*). Per entrambi gli ortaggi sono stati preparati sei campioni costituiti da 100 semi ognuno, mentre i trattamenti erano numerati da T1 a T5 e contenevano varie concentrazioni di spirulina (rispettivamente 2g/L, 4g/L, 6g/L, 8g/L e 10g/L), T0 rappresentava il controllo, con solo acqua del rubinetto. I semi sono stati immersi nella rispettiva soluzione per una notte, sono state eseguite prove triple per ciascun gruppo di trattamento. Sono stati misurati il tasso di germinazione, la lunghezza dei germogli, la lunghezza delle radici, l'indice di vigoria e il peso secco di 100 piantine.

Tabella 2: tassi di germinazione e parametri di crescita di cavolo cinese e broccolo cinese

Gruppo di trattamento	Tasso di germinazione (%)	Lunghezza del tiro (cm)	Lunghezza radice (cm)	Peso a secco di 100 piantine (g)	Indice di vigore
<i>Cavolo cinese</i>					
T ₀ (controllo)	93,3 ± 5,8	1,07 ± 0,19	1,82 ± 0,24	3,45 ± 0,59	99,8 ± 12,5
T ₁ (2 g/L)	88,3 ± 12,6	1,02 ± 0,08	2,01 ± 0,15	3,30 ± 0,3	90,1 ± 6,4
T ₂ (4 g/L)	98,3 ± 2,9	1,22 ± 0,05	2,28 ± 0,31	3,85 ± 0,44	119,9 ± 8,0
T ₃ (6 g/L)	100,0 ± 0,0	0,92 ± 0,14	2,71 ± 0,35	2,75 ± 0,26	92,0 ± 13,9
T ₄ (8 g /L)	100,0 ± 0,0	1,08 ± 0,19	2,05 ± 0,40	11,15 ± 1,38**	108,0 ± 18,6
T ₅ (10 g/L)	100,0 ± 0,0	0,95 ± 0,13	2,31 ± 0,17	3,09 ± 0,59	95,0 ± 12,5

Kai Lan

T0 _	70,0 ± 8,7	1,88 ± 0,15	1,51 ± 0,15	2,60 ± 0,13	131,6 ± 25,6
T1 _	56,7 ± 5,8	2,21 ± 0,17	1,56 ± 0,11	3,93 ± 1,48	125,3 ± 17,3
T2 _	63,3 ± 10,4	2,02 ± 0,17	2,08 ± 0,40	5,00 ± 1,20	127,9 ± 22,4
T3	75,0 ± 5,0	2,02 ± 0,23	1,65 ± 0,06	6,53 ± 2,68	151,5 ± 6,9
T4 _	66,7 ± 16,1	1,83 ± 0,12	1,70 ± 0,12	10,22 ± 2,78**	122,1 ± 20,8
T5 _	81,7 ± 17,6	1,96 ± 0,14	1,83 ± 0,13	7,15 ± 2,41**	160,1 ± 26,0

Per il cavolo cinese, non è stato osservato alcun miglioramento del tasso di germinazione a tutte le concentrazioni di spirulina inoculata. L'unico miglioramento significativo è stato osservato con un'inoculazione di 8 g/L di *A. platensis*, dove il peso secco delle piantine germinate è aumentato di oltre 3 volte quello del controllo. Nel caso del broccolo cinese (Kai Lan in tabella), sono stati osservati aumenti significativi del peso della piantina secca con inoculazioni di spirulina di 8 g/L e 10 g/L. Allo stesso modo, non ci sono stati miglioramenti significativi per gli altri parametri di crescita delle piante.

3.2.3 Conclusioni

I risultati ottenuti in questo studio suggeriscono che la spirulina potrebbe non essere un potenziatore universale della crescita e della germinazione delle piante, poiché i suoi effetti variano considerevolmente tra le diverse specie vegetali e in base al tipo di prodotto biostimolante utilizzato.

Rispetto ai risultati ottenuti con il fertilizzante chimico, i prodotti a base di *A. platensis* sono risultati efficaci in maniera comparabile nei confronti della maggior parte dei parametri di crescita delle specie trattate, su rucola in particolare. Il test sulla germinazione dei semi è risultato essere quello meno efficace.

3.3 Caso studio 2: Filtrati ed omogenati di spirulina in agricoltura

Godlewska, Michalak, Pacyga, Baśladyńska, Chojnacka (2019): Potential applications of cyanobacteria: *Arthrospira platensis* filtrates and homogenates in agriculture

Godlewska *et al.* (2019) hanno testato l'impiego di un omogenato per il rivestimento dei semi e di un filtrato per l'applicazione fogliare e per l'ammollo dei semi. Tutti e tre gli esperimenti sono stati effettuati a diverse concentrazioni.

È stato studiato l'effetto dei prodotti a base di spirulina sulla lunghezza, sul peso fresco, sulla composizione elementare e sull'indice di verde delle foglie di ravanella. Sono stati

stabiliti il miglior tempo di ammollo, le concentrazioni di filtrato e le dosi di omogenato ottimali.

Arthrospira platensis, essendo ricca di macro e micronutrienti, può essere utilizzata come fonte di questi nella fertilizzazione delle piante, ad esempio vitamine, aminoacidi, polipeptidi, fitormoni (gibberelline, auxine, citochinine), antiossidanti e composti con proprietà antibatteriche e antifungine.

L'omogeneizzato è stato preparato mediante una sospensione di *A. platensis* secca in acqua deionizzata (in un rapporto 1:10) e miscelando a 37 ° C per 40 minuti, a 500 giri/min. La soluzione ottenuta è stata poi centrifugata per 20 min a 4600 giri/min.

Il supernatante è stato separato e trattato come un filtrato di alghe, quindi applicato per via fogliare sui germogli come soluzione acquosa a diverse concentrazioni (5, 7, 10, 15, 20 e 25% v/v). La concentrazione del 15% è stata utilizzata anche per mettere i semi in ammollo per diversi intervalli di tempo: 1, 3, 6, 12, 18, 24, 36 e 48 h. Il residuo solido rimanente, trattato come un omogenato algale è stato diluito con acqua deionizzata (1:1) e utilizzato nel rivestimento dei semi, alle dosi di 100, 300, 500, 700 µL per 1,5 g di semi di ravanello.

3.3.1 Test di germinazione con piastre Petri

Gli esperimenti sono stati condotti in condizioni controllate: 21 ± 1 °C, umidità costante e fotoperiodo chiaro/buio di 12/12 h, limitando il rischio di stress abiotico e/o biotico.

Per il test sono stati utilizzati semi di ravanello non pretrattati ma spruzzati successivamente con un biostimolante commerciale (Fig. 9), semi imbevuti nel filtrato/surnatante di spirulina e spruzzati con lo stesso nei giorni successivi (Fig. 10) e semi rivestiti da un omogenato di spirulina (Fig. 11).

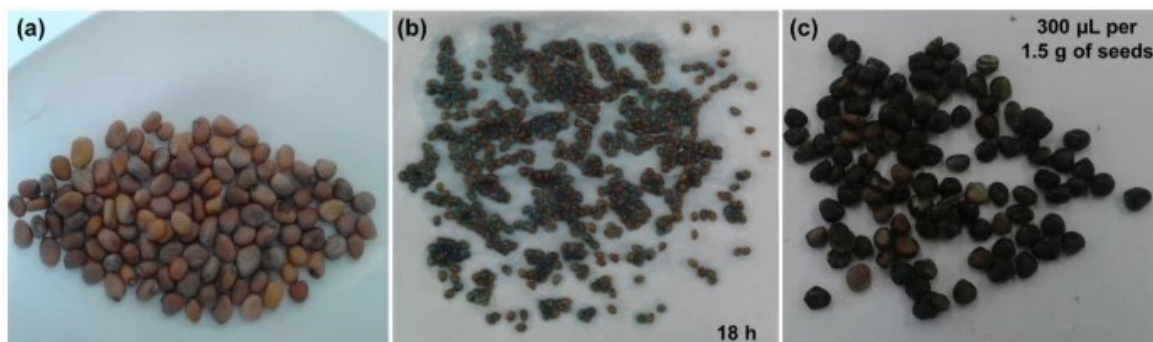


Fig. 9, 10 e 11: semi di ravanello non trattati, imbevuti nel filtrato e rivestiti da un omogenato, rispettivamente

Gli esperimenti sono stati condotti su piastre Petri e sono state effettuate tre repliche per ogni gruppo, in condizioni standardizzate. Sono stati posti 25 semi su ciascuna capsula Petri (diametro 85 mm), contenente cotone idrofilo inumidito.

Ogni piatto del gruppo trattato con spirulina è stato spruzzato tre volte con 5 ml di filtrato di alghe (dopo il 6°, 8° e 10° giorno), mentre il gruppo di controllo è stato costantemente annaffiato con acqua deionizzata e spruzzato con biostimolante commerciale. Dopo 13 giorni le piantine sono state raccolte e analizzate.

L'analisi ha mostrato che c'è una differenza nella composizione elementare tra filtrato e omogenato: i macroelementi K, Mg, P, S sono rappresentati in quantità maggiori in un

omogenato, mentre i microelementi Cu, Fe, Ni e Zn sono maggiormente contenuti in un filtrato di alghe.

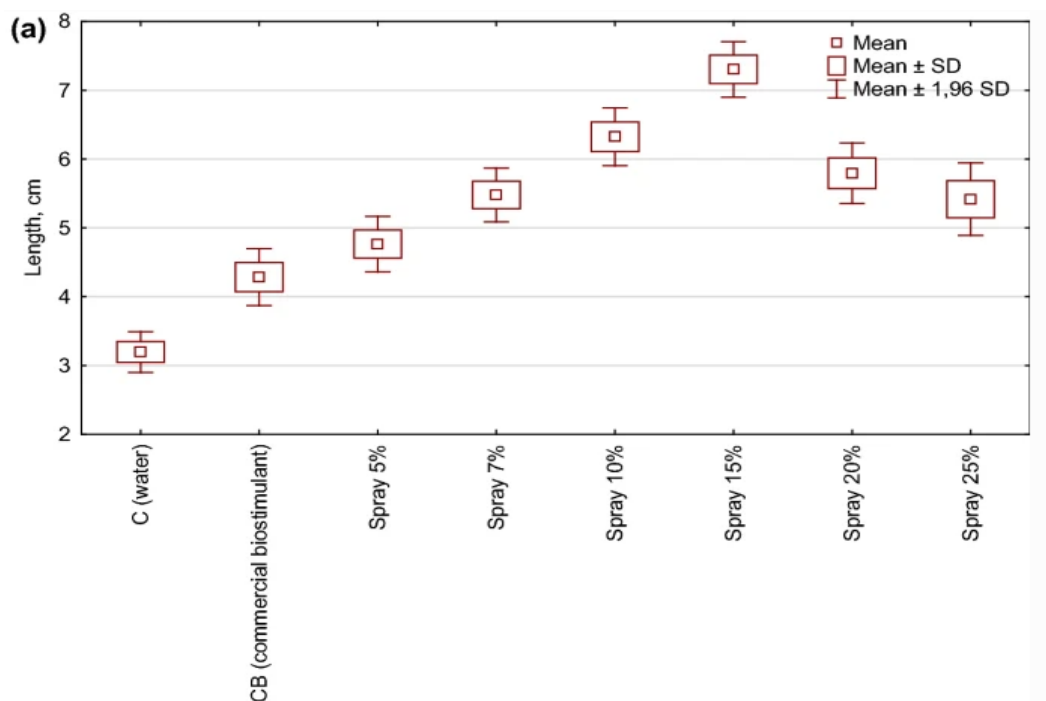
Sia i micro che i macroelementi sono risultati essere contenuti in quantità maggiori nei campioni trattati con spirulina piuttosto che quelli trattati con biostimolante commerciale. Pertanto, i prodotti a base di microalghe non solo migliorano la crescita e lo sviluppo delle piante, ma migliorano anche la composizione minerale delle piante coltivate.

3.3.2 Test della biomassa fuori terra

Questo test aveva l'obiettivo di analizzare eventuali effetti dell'omogenato (dosi: 100, 300, 500, 700 μ L per 1,5 g di semi di ravenello) utilizzato per il rivestimento dei semi, del filtrato al 15% utilizzato per l'ammollo dei semi (intervallo di tempo: 1, 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48 h) e del filtrato utilizzato per l'irrorazione fogliare (concentrazioni: 5, 7, 10, 15, 20 e 25%) sulla lunghezza della biomassa fuori terra, sono poi state analizzate anche le biomasse umide e secche.

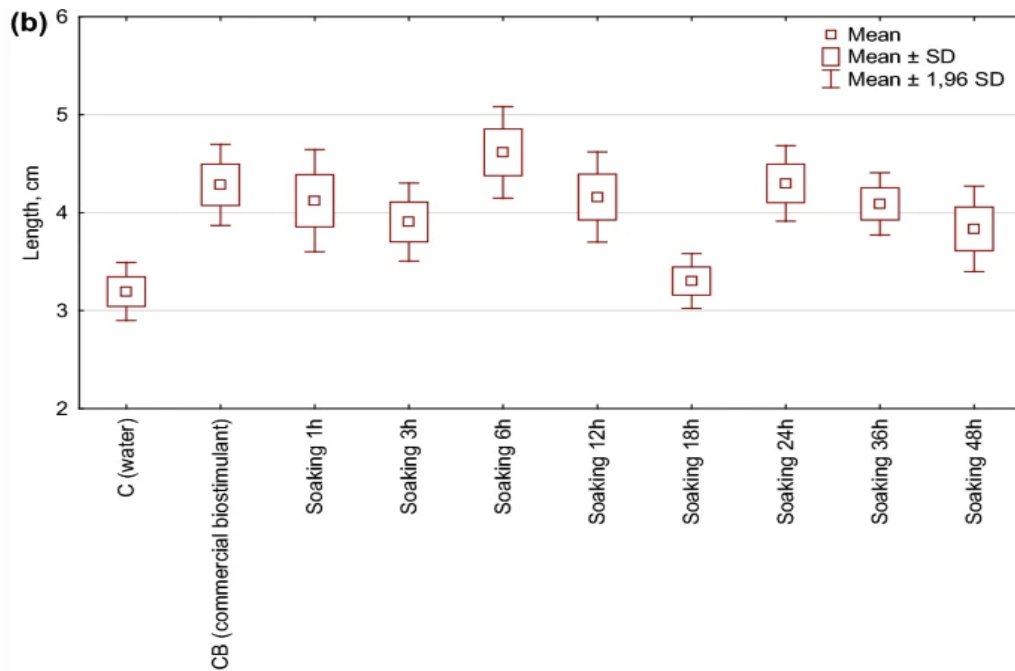
L'esperimento è durato 13 giorni, sono poi state raccolte 3 piante da ciascuna replicazione e ne è stata misurata la lunghezza, per tutti i prodotti a base di spirulina e per i gruppi di controllo. Sia il biostimolante algale che quello commerciale hanno mostrato un effetto benefico sulla lunghezza della pianta rispetto al controllo.

Fig. 12: effetto dello spray fogliare sulla lunghezza di ravenello



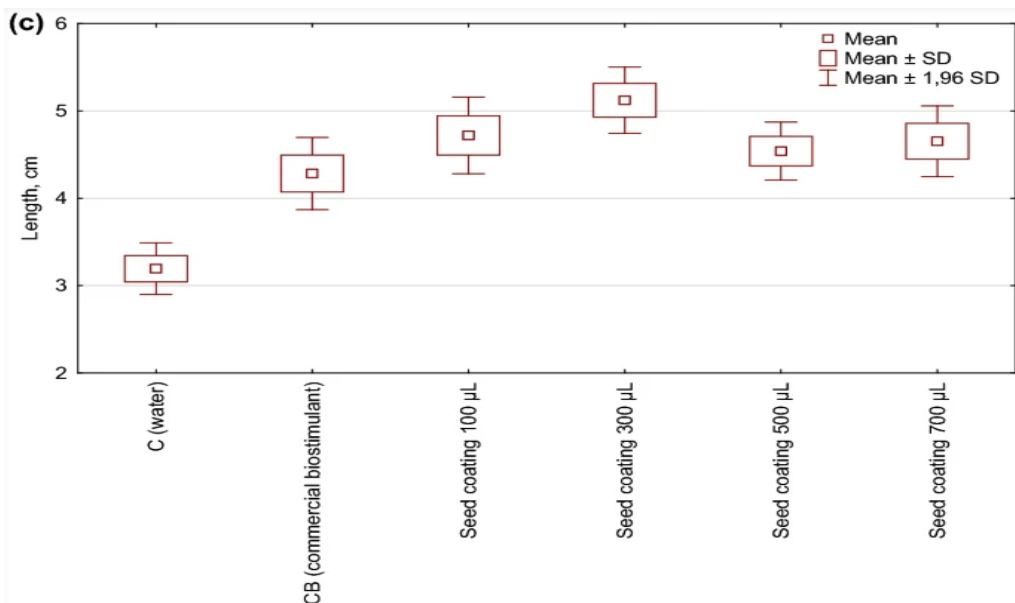
Per quanto riguarda l'effetto dello spray fogliare sulla lunghezza del ravenello, è stato osservato che con l'aumentare della concentrazione del preparato l'altezza delle piante aumentava. Tuttavia, è stata osservata una diminuzione dell'attività biostimolante al di sopra del 15% di concentrazione del filtrato, dose che ha influito sulla lunghezza del ravenello nella misura massima, rispettivamente del 129% e del 71% in più rispetto a C e CB (con CB = biostimolante commerciale).

Fig. 13: effetto dei diversi tempi di ammollo dei semi di ravenello nel filtrato di spirulina al 15%



L'effetto dei diversi tempi di immersione dei semi nel filtrato di spirulina al 15% invece, ha mostrato un effetto stimolante di vario grado sulla crescita del ravenello. Tutti i trattamenti con *A. platensis* hanno avuto un'influenza benefica sulla crescita del ravenello rispetto al gruppo di controllo (C). Il tempo di immersione migliore si è rivelato essere di 6 ore, dove le piante erano più alte rispetto a C del 44,5% e CB del 7,7%. Un tempo più lungo di trattamento dei semi in filtrato si è rivelato inefficace.

Fig. 14: effetto del rivestimento dei semi con omogenati a base di *A. platensis*



Infine, il rivestimento dei semi con omogeneizzati a base di spirulina ha mostrato maggiori proprietà biostimolanti rispetto al prodotto commerciale. Le piante più alte sono state

ottenute in un gruppo trattato con 300 µL di omogenato per 1,5 g di semi. In questo gruppo, le piante erano superiori rispettivamente del 60,5 e del 20% rispetto a C e CB.

3.3.3 Effetto sul peso della biomassa fresca

Il primo test effettuato è stato quello del filtrato di *A. platensis* sottoforma di spray fogliare: una concentrazione del 15% è risultata essere la più efficace, le piante erano più pesanti rispettivamente del 151% e del 72% rispetto a C e CB. All'aumentare della concentrazione del filtrato, il peso della biomassa fresca andava a diminuire.

Il test dei semi immersi nel filtrato di spirulina al 15% ha mostrato un effetto stimolante sulla biomassa fresca delle piante in tutti i gruppi sperimentali, sia rispetto a C che a CB. Il miglior risultato è stato osservato per il tempo di ammollo più lungo (48 h), con un aumento rispettivamente dell'81 e del 25% rispetto a C e CB.

L'ultimo test è stato quello del rivestimento dei semi di ravanello con omogenato di spirulina. Dai risultati è stato possibile notare che le masse più elevate erano nei gruppi trattati con 300 e 100 µL di omogenato (92 e 90% più pesanti rispetto a C; 32,3 e 31% più pesanti rispetto a CB). Le dosi crescenti di preparati (500 e 700 µL) è risultata meno efficace.

3.3.4 Effetto sull'indice di clorofilla

L'applicazione fogliare del filtrato di spirulina sui semi di ravanello ha comportato un leggero aumento del contenuto del pigmento verde, ma non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i filtrati testati, il prodotto commerciale e il gruppo di controllo.

I semi immersi nel filtrato di spirulina hanno mostrato un incremento dell'indice di clorofilla della foglia in tutti i gruppi testati, i risultati migliori si sono visti per un'immersione di 48 h (rispettivamente +32% e +20% in più rispetto a C e CB).

L'applicazione di omogenati per il rivestimento dei semi ha comportato un aumento dell'indice di clorofilla delle foglie di ravanello, il contenuto più alto è stato osservato in un gruppo trattato con 100 µL di preparato (rispettivamente +19 e +9,2% in più rispetto a C e CB) mentre il più basso con 500 µL (15% in più rispetto a C).

3.3.5 Composizione elementare della biomassa aerea

Un ultimo esperimento aveva l'obiettivo di esaminare l'effetto delle diverse modalità di applicazione dei prodotti a base di spirulina sulla composizione elementare del ravanello. Il filtrato di *A. platensis* utilizzato come spray fogliare ha portato ad un aumento del contenuto di micronutrienti vegetali rispetto al gruppo di controllo (acqua).

- Il contenuto di boro e rame generalmente aumentava con l'aumentare della concentrazione del filtrato algale (dal 5 al 20%). Il contenuto di B nel ravanello era 2,5 volte superiore nel gruppo con il 20% di filtrato rispetto al gruppo di controllo, per il Cu era del 30% superiore rispetto a C.
- Il contenuto di ferro è aumentato nella biomassa del ravanello con l'aumento della concentrazione del filtrato di spirulina, fino alla concentrazione del 20% (aumento del 46% rispetto a C).

- Il contenuto di manganese in tutti i gruppi sperimentali era maggiore rispetto al gruppo di controllo, ma i risultati migliori sono stati ottenuti per il filtrato del 20% (aumento del 34%).
- L'applicazione del filtrato al 20% ha comportato anche il più alto contenuto di nichel e zinco nel ravanello, con un aumento di circa 5,5 volte e del 55% rispetto al controllo.

L'effetto migliore è stato ottenuto per il filtrato al 20%. Concentrazioni del filtrato più elevate, causavano una diminuzione del contenuto di micro e macroelementi nella biomassa del ravanello; il contenuto di micro e macroelementi nel ravanello dopo l'applicazione del filtrato al 20% era di poco superiore al gruppo trattato con il biostimolante commerciale.

Un altro test ha analizzato l'effetto dell'ammollo dei semi nel filtrato di spirulina al 15% sulla composizione elementare del ravanello. È stato osservato che l'ammollo dei semi nel filtrato di spirulina per più di 24 ore generalmente ha influenzato negativamente il contenuto di micro e macroelementi nella biomassa. Nel caso dei macroelementi è stato osservato che (per il gruppo di 24 ore) il contenuto di Ca era superiore del 21% rispetto al controllo ma inferiore rispetto al CB; il contenuto di Mg era del 25% superiore rispetto al controllo ma leggermente inferiore rispetto al CB; il contenuto di P era del 14% superiore (24 h) rispetto al controllo ma leggermente inferiore rispetto al CB e il contenuto di S era del 16% superiore (24 h) rispetto al controllo ma leggermente inferiore rispetto al CB.

Infine, il test effettuato con semi trattati con omogenato di spirulina ha mostrato che nel caso dei microelementi (B, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn) i migliori risultati sono stati ottenuti, con qualche eccezione, per la dose più alta: 700 µL. Il contenuto di B era 2,6 volte superiore per la dose 700 µL e 6 volte superiore per 100 µL rispetto al gruppo di controllo (acqua) e rispettivamente del 12% e 2,8 volte superiore rispetto al biostimolante commerciale (CB); il contenuto di Cu era del 49% superiore per la dose 700 µL rispetto al controllo e del 18% rispetto al CB; il contenuto di Fe era del 30% superiore per la dose 700 µL rispetto al controllo e dell'11% rispetto al CB; il contenuto di Mn era del 64% superiore per la dose 700 µL rispetto al controllo e del 24% rispetto al CB. Nel caso del contenuto di macroelementi, il livello di Ca e Mg era il più alto nel gruppo 700 µL, mentre K, P e S nel gruppo 100 µL sia nei confronti di C che nei confronti di CB (+10/20%). Riassumendo i risultati riguardanti la composizione elementare del ravanello coltivato dai semi trattati con omogenato di spirulina, la dose somministrata che ha dato i migliori risultati è stata quella di 700 µl per 1,5 g di semi.

3.3.6 Conclusioni

Concludendo, il contenuto più alto di micro e macroelementi nel ravanello è stato osservato per i seguenti gruppi: ammollo dei semi nel filtrato di spirulina al 15% per 24 ore, rivestimento dei semi con omogenato alla dose di 700 µL per 1,5 g di semi e spray fogliare con filtrato al 20%. Tra questi trattamenti, il più piccolo effetto sul contenuto elementare del ravanello si è visto con l'ammollo dei semi, mentre il metodo per via fogliare sembra essere stato quello più efficiente.

3.4 Caso studio 3: Crescita, resa e qualità di melanzane trattate con spirulina per via fogliare

Dias, Rocha, Araújo, de Lima, Guedes (2016): Growth, yield, and postharvest quality in eggplant produced under different foliar fertilizer (*Spirulina platensis*) treatments

Dias *et al.* (2016) hanno testato l'utilizzo del prodotto commerciale Spirufert® per via fogliare, al fine di valutare la crescita, la resa e la qualità post-raccolta delle melanzane. Ogni campione è stato trattato per via fogliare a quattro stati fenologici distinti, sono stati effettuati uno o più trattamenti per ogni fase fenologica. I risultati ottenuti hanno mostrato che non c'è una concentrazione di fertilizzante ideale, ma che una determinata concentrazione può favorire maggiormente lo sviluppo di un certo parametro di qualitativo piuttosto che di un altro, o viceversa.

Per l'esperimento sono state utilizzate melanzane cultivar Embu, il test è stato fatto in pieno campo. I trattamenti a base di concime fogliare Spirufert® consistevano in quattro dosaggi diversi, successivi e crescenti per ogni campione, un campione differiva dall'altro solo per la diversa concentrazione del fertilizzante. Considerando M=trattamento, allora M1 (10, 15, 25 e 35 g/L), M2 (15, 20, 30 e 40 g/L), M3 (20, 25, 35 e 45 g/L) e M4 (controllo rappresentato da piante irrorate solo con acqua). Ogni campione occupava una superficie in campo di 21 mq. e consisteva in 24 piante, di cui 6 utili (le piante di confine non sono state incluse nell'analisi).

L'applicazione di Spirufert® è stata effettuata per via fogliare a partire dal decimo giorno post-trapianto (DAT=days after transplant), i trattamenti successivi hanno seguito un intervallo di applicazione di cinque giorni. La prima dose di fertilizzante è stata applicata cinque volte, nella prefioritura; la seconda dose è stata applicata due volte in piena fioritura; la terza dose è stata applicata due volte durante la formazione del frutto; la quarta dose è stata applicata ripetutamente fino a quando i frutti non hanno raggiunto il punto ottimale di raccolta.

Al momento della fioritura, le foglie mature sono state campionate per determinare i livelli di N, P, K, Na, i frutti sono stati raccolti a 73 DAT. Nel post-raccolta i frutti di ogni campione sono stati selezionati in base all'uniformità di dimensioni e colore.

I frutti sono stati analizzati a 0, 3, 4, 5 e 6 giorni di conservazione e sono stati valutati parametri del colore e di compattezza del frutto, i contenuti di solidi solubili sono stati valutati in ciascuno tempo di conservazione.

Il contenuto di solidi solubili è stato determinato direttamente dal succo omogeneizzato attraverso l'utilizzo di un rifrattometro digitale. I dati sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) e il test di Tukey con un livello di significatività del 5%.

Tabella 3: effetto dei trattamenti a base di Spirufert® nella crescita delle melanzane

Table 2. Stem diameter (DC), plant height (PH), number of leaves (NL), number of flower buds (NFB), number of fruits per plant (NF), yield, longitudinal diameter (LD) and equatorial diameter (ED) of fruits, and contents of nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), and sodium (Na) in eggplants under different fertilizer (Spirufert®) treatments. UFCG, Pombal 2015.

Treatment*	SD (mm)	PH (cm)	NL	NFB
M1	12.69 a	50.56 a	59.41 c	18.58 ab
M2	12.87 a	54.11 a	66.16 b	26.75 a
M3	13.68 a	52.33 a	78.75 a	9.33 b
M4	10.4 a	46.75 a	37.41 d	18.33 ab
CV (%)	17.12	5.74	2.82	30.09
	NF	Yield (g plant ⁻¹)	LD (mm)	ED (mm)
M1	4.22 ab	451.0 a	124.77 a	65.34 a
M2	2.72 bc	408.44 ab	114.5 a	61.5 a
M3	5.08 a	202.5 b	123.78 a	63.5 a
M4	1.83 c	257.66 ab	118.61 a	60.06 a
C.V. (%)	19.48	23.52	5.82	7.27
	N	P	K	Na
	g kg ⁻¹			
M1	26.66 a	2.75 a	21.28 a	0.54 a
M2	28.0 a	2.06 a	21.07 a	0.66 a
M3	28.1 a	2.88 a	22.4 a	0.68 a
M4	36.5 a	3.15 a	22.78 a	0.48 a
CV (%)	28.49	31.92	12.23	23.22

*Foliar fertilizer (Spirufert®) treatments during eggplant development: M1 = 10, 15, 25, and 35 g L⁻¹; M2 = 15, 20, 30, and 40 g L⁻¹; M3 = 20, 25, 35, and 45 g L⁻¹; and M4 = 0 g L⁻¹. CV: Coefficient of variation. Means followed by the same letter in a column are not significantly different (Tukey's test, p < 0.05).

I risultati hanno mostrato che la crescita delle melanzane non è stata influenzata dai diversi trattamenti a base di Spirufert®. Al contrario, il numero di frutti era significativamente più alto nei trattamenti M1, M2 e M3 rispetto al controllo (M4) anche se il rapporto dose-risposta non si è dimostrato essere lineare. Inoltre, in M3 (massima dose di fertilizzante), il numero delle foglie era maggiore mentre quello dei boccioli, dei fiori e la resa dei frutti erano inferiori rispetto ai trattamenti M1 e M2, questo può essere spiegato dal fatto che Spirufert® utilizzato ad alte concentrazioni può avere un effetto negativo sulla crescita del frutto, in quanto la crescita vegetativa risulta essere troppo spinta a causa dell'elevato contenuto di azoto del prodotto commerciale. Ciò si traduce in una competizione intraspecifica tra crescita vegetativa e crescita riproduttiva per acqua, luce e nutrienti.

L'effetto positivo di Spirufert® sulla resa osservata nei trattamenti M1 e M2 può essere correlato anche ad un effetto non nutritivo di *S. platensis*, considerando che le microalghe sono ricche di polipeptidi, aminoacidi, ormoni, acidi organici, vitamine ed enzimi che potrebbero fungere da promotori di crescita-

Le dimensioni del frutto non sono state influenzate significativamente dai trattamenti Spirufert®, La media valori per diametro longitudinale ed equatoriale era rispettivamente di 120,4 mm e 63,6 mm, dimensioni che soddisfano i requisiti di qualità standard.

Le concentrazioni fogliari di N, P, K e Na non sono state influenzate dall'utilizzo di Spirufert®, in quanto i livelli scambiabili di questi elementi nel suolo erano sufficientemente alti da compensare gli effetti dei trattamenti fertilizzanti sul contenuto fogliare di questi elementi.

Durante il periodo di conservazione, la compattezza del frutto era significativamente diversa tra i trattamenti, eccetto per M1 che ha mantenuto per un tempo più lungo (5 giorni) mentre il contenuto di solidi solubili aumentava leggermente all'aumentare del tempo di conservazione. In M4 il contenuto di solidi solubili risultava essere lievemente più basso in tutti i test effettuati.

3.5 Caso studio 4: Utilizzo di spirulina come antidoto agli effetti nocivi dell'erbicida fusilade su fava

Osman, Abo-Shady, El-Nagar (2015): Cyanobacterial *Arthrospira (Arthrospira platensis)* as safener against harmful effects of fusilade herbicide on faba bean plant

Osman *et al.* (2015) hanno testato l'utilizzo di una sospensione di spirulina come antidoto in piante di fava trattate nel post-emergenza con l'erbicida fusilade max.

Fusilade max è un graminicida di post emergenza selettivo nei confronti di numerose colture erbacee ed arboree.

Nome comune: EC 12,5 % fusilade DX/fluazifop-p-butil (EC: concentrato emulsionabile).

Meccanismo d'azione: Inibizione della formazione di lipidi.

Il trattamento della pianta di fava mediante erbicida fusilade ha causato la riduzione di tutti parametri di crescita misurati (altezza della pianta, lunghezza di radici e germogli, numero di foglie/pianta, peso fresco e secco della radice e area fogliare) e parametri di resa (numero di baccelli/pianta, numero di semi/baccello, numero di semi/pianta e peso di 100 semi). L'immersione dei semi di fava in una sospensione di spirulina prima della coltivazione ha attenuato gli effetti negativi dell'erbicida sulla pianta portando ad un aumento e miglioramento del livello proteico e amminoacidico di radici e germogli, e limitando anche gli effetti dannosi dell'erbicida sugli enzimi antiossidanti.

I semi di fava sono stati selezionati, sterilizzati in una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% per 15 min, lavati accuratamente con acqua distillata e immersi in una sospensione di *A. platensis* all'1% per 12 ore. Un campione di controllo è stato immerso in acqua distillata. La coltivazione si è svolta in normali condizioni ambientali di luce e temperatura, in vasi di 35 cm di diametro contenenti uguali quantità di terreno argilloso e sabbioso in rapporto 2:1. Ogni trattamento è stato replicato tre volte.

Fusilade è stato applicato per via fogliare come erbicida post emergenza dopo 21 giorni dalla semina, secondo le dosi indicate in etichetta.

3.5.1 Effetti sulla crescita e sulla resa

I campioni di piante sono stati prelevati inizialmente in due fasi, una fase di piantina (15 giorni) e una fase vegetativa (45 giorni) e sono stati misurati i parametri di crescita e di resa elencati precedentemente.

I dati sono stati analizzati statisticamente per determinare il grado di significatività tra i trattamenti utilizzando l'analisi unidirezionale di varianza (ANOVA).

Tabella 4: effetto dell'ammollo dei semi nella sospensione algale all'1% di *A. platensis* su alcuni parametri di crescita della pianta di fava dopo 45 giorni

	Controllo	Fusilade	A. platensis	A. platensis + fusilade
lunghezza radici (cm)	20,2	18,3	27,2	30,6
altezza germoglio (cm)	31,7	29,9	40,5	48,3
numero foglie/pianta	18,3	15,8	22,0	24,3
area fogliare (cm ²)	16,8	13,7	18,4	24,7
peso fresco radici (g)	2,8	1,2	4,9	6,2
peso fresco germoglio (g)	18,0	15,9	24,4	31,3
peso secco radici (g)	0,2	0,1	0,4	0,7
peso secco germoglio (g)	1,7	1,0	2,9	4,4

I risultati (tab. 4) hanno mostrato che l'applicazione di erbicida fusilade su fava ha causato riduzioni significative della misura di tutti i parametri di crescita rispetto al controllo (-9% nella lunghezza delle radici, -6% nella lunghezza dei germogli, -14% del numero di foglie/pianta e -18% dell'area fogliare totale). Anche il peso fresco e secco di radici e germogli è risultato diminuito (-57% e -12% nel fresco e -50% e -41% nel secco, rispettivamente in radici e germogli).

Tabella 5: Effetto dell'ammollo dei semi nella sospensione algale all'1% di *A. platensis* su alcuni parametri di resa della pianta di fava

	Controllo	Fusilade	A. platensis	A. platensis + fusilade
N° baccelli/pianta	6,0	5,7	6,3	7,0
N° semi/baccello	3,0	3,0	3,3	3,7
N° semi/pianta	18,0	18,0	21,3	25,7
peso 100 semi	53,7	47,0	60,4	70,0

La riduzione del potenziale di crescita della pianta di fava si è riflesso in modo simile anche sulla loro resa (come riportato in tabella 5), questa riduzione si è espressa come diminuzione del numero di baccelli/pianta (-5%) e del peso di 100 semi (-13%).

L'utilizzo di *A. platensis* ha influito positivamente nel miglioramento di tutti i parametri di crescita e di resa, sia in assenza che in combinazione dell'intervento erbicida. In quest'ultimo caso si hanno avuto le misurazioni migliori verso tutti i parametri analizzati.

3.5.2 Effetto sulla composizione biochimica

Tabella 6: Effetto dell'ammollo dei semi nella sospensione algale all'1 % di *A. platensis* sul contenuto di pigmenti totali e sul livello di attività fotosintetica, dopo 45 giorni

	Controllo	Fusilade	A. platensis	A. platensis + fusilade
Pigmenti totali (mg/g DW)	4,2	3,4	9,1	14,9
Attività fotosintetica (F _v /F _m)	2450	2468	2343	2203

I risultati hanno mostrato che l'applicazione di fusilade ha causato una riduzione del contenuto di pigmenti totali e dell'attività fotosintetica delle foglie, ha anche causato una riduzione del contenuto di carboidrati nelle radici, germogli e semi prodotti.

D'altra parte, il contenuto di proteine totali e aminoacidi liberi è aumentato nella radice, nei germogli e nei semi prodotti in seguito alla combo *A. platensis* + fusilade, come si può notare in tabella 7.

Tabella 7: Effetto dell'ammollo dei semi nella sospensione algale all'1% di *A. platensis* sul contenuto totale di carboidrati, proteine e aminoacidi liberi dei semi di fava

	Controllo	Fusilade	<i>A. platensis</i>	<i>A. platensis</i> + fusilade
DRV (mg/g DW)	6,0	5,7	6,3	7,0
Saccarosio (mg/g DW)	3,0	3,0	3,3	3,7
Amido (mg/g DW)	18,0	18,0	21,3	25,7
Proteine (mg/g DW)	53,7	47,0	60,4	70,0
Aminoacidi liberi (mg/g DW)	32,0	36,8	46,2	51,2

Come si può notare in tabella 8, il contenuto di prolina è aumentato in modo significativo sia nelle radici che nel germoglio in risposta ai trattamenti *A. platensis* + fusilade. I risultati mostrano anche un aumento dell'attività delle catalasi, delle ossidasi e delle perossidasi delle foglie, la perossidazione lipidica è stata calcolata come accumulo di MDA (composto intermedio nella perossidazione lipidica).

Tabella 8: Effetto dell'ammollo dei semi nella sospensione algale all'1 % di *A. platensis* sul contenuto di prolina, sulle attività degli enzimi antiossidanti e sul livello di perossidazione lipidica (misurata come MDA)

	Controllo	Fusilade	<i>A. platensis</i>	<i>A. platensis</i> + fusilade
Prolina radici (mg/g DW)	20,2	18,3	27,2	30,6
Prolina germogli (mg/g DW)	31,7	29,9	40,5	48,3
Perossidasi foglie (Um/g FW)	18,3	15,8	22,0	24,3
Catalasi foglie (Um/g FW)	16,8	13,7	18,4	24,7
Ossidasi ac. ascorbico (Um/g FW)	2,8	1,2	4,9	6,2
MAD (mg/g DW)	1,5	2,3	0,7	0,03

Per quanto riguarda il profilo amminoacidico delle piantine, a 15 giorni dalla semina, si può notare dai risultati in tabella 9 che l'immersione dei semi nella sospensione di spirulina ha portato a cambiamenti significativi nella composizione e concentrazione amminoacidica. Questi cambiamenti si sono espressi con la scomparsa degli aminoacidi arginina e acido glutammico, mentre sono comparsi altri amminoacidi che non erano presenti sul controllo, come prolina, isoleucina, leucina, metionina, acido aspartico, ciclina, serina e fenilalanina. D'altra parte, sono aumentate le concentrazioni di treonina e valina, mentre quelli di lisina e istidina sono diminuite.

Tabella 9: Contenuto di aminoacidi (mM/g DW) delle foglie di fava dopo 15 e dopo 45 giorni dall'ammollo del seme nel filtrato di spirulina all'1%

	Controllo 15 day old	A. platensis 15 day old	Controllo 45 day old	Fusilade 45 day old	A. platensis 45 day old	A. plat. + fus. 45 day old
Arginina (mM/g DW)	0,20	Nd	0,50	0,52	0,50	0,70
Treonina (mM/g DW)	8,80	54,50	0,50	0,28	0,40	0,60
Prolina (mM/g DW)	Nd	14,20	0,40	0,48	0,30	0,40
Ac. glutammico (mM/g DW)	4,20	Nd	0,70	1,02	0,60	0,80
Cistina (mM/g DW)	Nd	11,50	0,003	0,01	Nd	Nd
Tirosina (mM/g DW)	Nd	Nd	1,00	0,32	0,90	1,40
Alanina (mM/g DW)	Nd	Nd	0,60	0,64	0,50	0,80
Ac. aspartico (mM/g DW)	Nd	100,40	1,30	4,10	3,60	4,10
Lisina (mM/g DW)	1,80	0,80	0,96	1,00	0,60	0,10
Istidina (mM/g DW)	13,10	0,70	0,62	0,40	0,50	0,60
Glicina (mM/g DW)	Nd	Nd	0,47	0,50	0,40	0,70
Valina (mM/g DW)	38,70	60,00	0,90	0,80	1,00	1,30
Leucina (mM/g DW)	Nd	0,08	0,61	0,60	0,90	1,50
Isoleucina (mM/g DW)	Nd	0,005	0,83	1,00	2,10	2,20
Fenilalanina (mM/g DW)	Nd	40,00	0,60	0,40	0,80	1,20
Metionina (mM/g DW)	Nd	12,40	0,09	0,02	0,05	0,10
Serina (mM/g DW)	Nd	70,00	0,52	0,40	1,10	1,60
Totale (mM/g DW)	66,70	364,60	10,70	11,90	14,20	18,20

Allo stadio vegetativo di 45 giorni di vita, si può osservare che il trattamento con fusilade ha causato una riduzione della concentrazione di treonina, tirosina, istidina, valina, fenilalanina e serina, mentre sono aumentate le concentrazioni di prolina, acido glutammico, cistina, alanina, acido aspartico e isoleucina.

Il doppio trattamento (ammollo dei semi in *A. platensis* + trattamento con erbicida fusilade) ha causato un aumento della concentrazione di arginina, treonina, acido glutammico, tirosina, alanina, acido aspartico, glicina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina e serina portando ad un marcato aumento del contenuto totale di aminoacidi. Questi cambiamenti nel tipo di aminoacidi e nei loro livelli sono stati osservati sia nelle piante derivate da semi trattati con spirulina sia dalla combinazione dei due trattamenti.

3.5.3 Conclusioni

Il trattamento fogliare su fava con erbicida fusilade ha causato la riduzione di alcuni parametri di crescita (altezza della pianta, lunghezza della radice e del germoglio, numero di foglie/pianta e superficie fogliare totale) e di resa. Nel presemina, l'ammollo dei semi in una sospensione algale all'1% di *A. platensis* per 12 ore ha fatto sì che le piante da questi derivate fossero caratterizzate da una composizione biochimica diversa, senza tralasciare gli effetti più che positivi sulla crescita e sulla resa della coltura rispetto al controllo. Questi risultati sono coerenti con quelli ottenuti da altri lavori (Haroun *et al.*, 2003).

La riduzione dei parametri di crescita misurati in seguito al trattamento con solo fusilade può essere attribuita all'interferenza tra l'erbicida e uno o più processi metabolici delle piante di fava.

L'applicazione dell'erbicida ha portato anche ad una diminuzione dell'attività fotosintetica, che ha causato la riduzione del contenuto di carboidrati e di pigmenti totali. Le proteine e il quantitativo totale di aminoacidi liberi invece, sono aumentati sia nelle radici che nei germogli.

Si pensa che l'aumento del contenuto di carboidrati (dovuto alla maggior attività fotosintetica) verificatosi nei campioni trattati con spirulina possa essere conseguire un aumento della frequenza respiratoria, che causa un accumulo di α -chetoadidi nel ciclo di Krebs, principali precursori della biosintesi degli aminoacidi.

I risultati mostrano un aumento del contenuto di prolina sia nella radice che nel germoglio in risposta al trattamento erbicida, ciò è correlato ad una maggiore tolleranza agli stress. Per quanto riguarda il profilo amminoacidico, sono variate le quantità e i rapporti tra amminoacidi e alcuni di questi, non presenti nel controllo, sono comparsi in seguito al trattamento con *A. platensis*, come leucina, isoleucina, valina, serina, fenilalanina, metionina e istidina. Questi aminoacidi sono conosciuti come fitoprotettori nei confronti degli effetti negativi di alcuni erbicidi, si pensa che la sintesi di questi avvenga in risposta al trattamento con spirulina.

L'aumento di alcuni contenuti di aminoacidi accompagnata dalla riduzione di altri suggerisce un aumento dell'attività delle transaminasi (enzimi che trasformano un aminoacido in un altro), che portano alla sintesi di nuovi amminoacidi.

In base ai risultati ottenuti possiamo quindi affermare che l'ammollo dei semi di fava in una sospensione di spirulina all'1% prima della semina ha indotto la biosintesi di alcuni aminoacidi e incrementato l'attività fotosintetica e il contenuto glucidico, attenuando gli effetti negativi osservati in seguito al trattamento erbicida.

È poi noto che i cianobatteri contengano molti composti, come regolatori di crescita, vitamine, aminoacidi, polipeptidi e acidi grassi che possono agire da stimolanti nei diversi processi metabolici.

3.6 Caso studio 5: Biofortificazione di *Amaranthus dubius* (spinacio cinese) Mala, Celsia, Mahalakshmi, Rajeswari (2017): Agronomic Biofortification of *Amaranthus dubius* with Macro Nutrients and Vitamin A

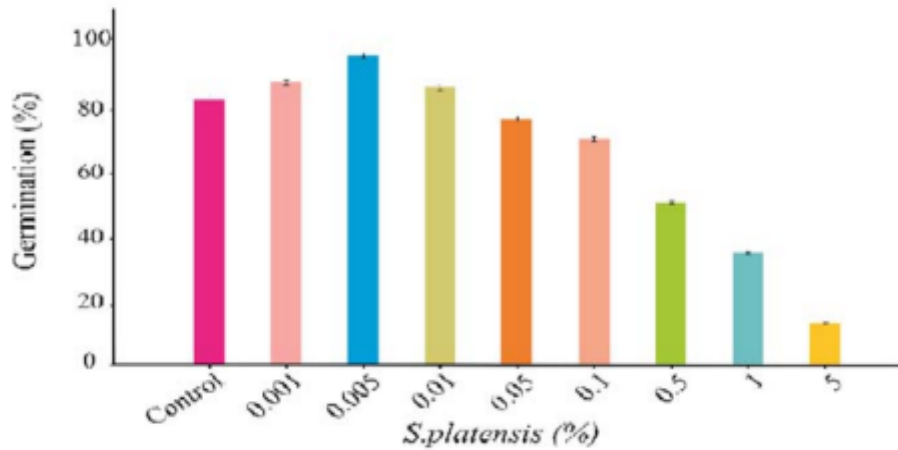
Mala *et al.* (2017) hanno analizzato l'effetto di un trattamento a base di spirulina su spinacio cinese, i test sono stati effettuati sia sulla germinazione che sulla crescita ed in particolare sul contenuto fogliare di clorofilla, carboidrati, proteine, pigmenti e vitamina A. Sono stati ottenuti risultati molto positivi in entrambi i casi.

Tutti i trattamenti sono stati eseguiti in triplicato, sono stati effettuati anche dei test di controllo dove non è stato utilizzato alcun biostimolante.

Gli esperimenti sulla germinazione sono stati condotti utilizzando una sospensione di spirulina a diverse concentrazioni: 0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1% e 5%; mentre i test che hanno analizzato il contenuto fogliare di clorofilla e nutrienti

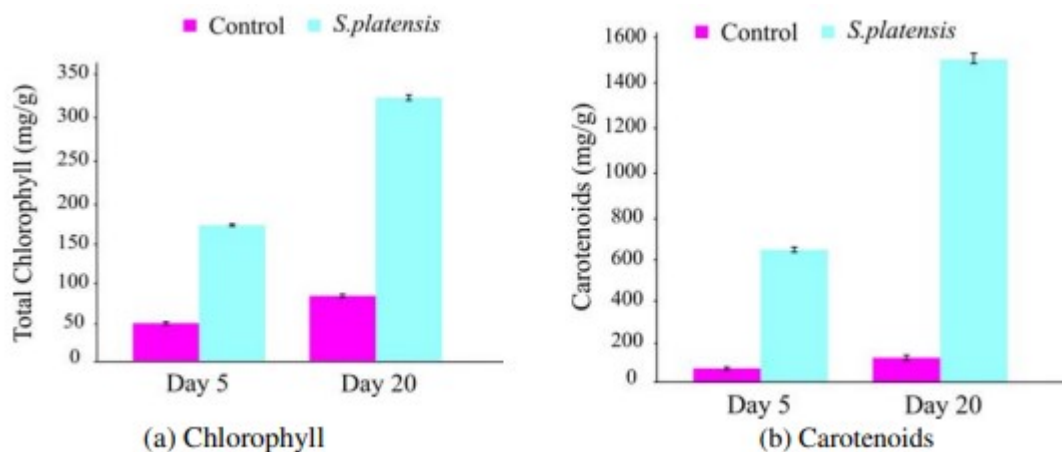
prevedevano l'inoculo di 5 g di spirulina direttamente nel suolo. I campioni fogliari sono stati raccolti il 5° e il 20° giorno post trattamento per l'analisi di carboidrati totali, proteine, clorofilla, carotenoidi e attività antiossidante.

Fig. 15: test di germinazione di *A. dubius* utilizzando sospensioni con diverse concentrazioni di *A. platensis*



Il grafico mostra l'influenza di *A. platensis* alle varie concentrazioni a cui è stata utilizzata (0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1% e 5%) sul test di germinazione di *A. dubius*. Nel campione di controllo la germinabilità dei semi è risultata essere dell'82%, il tasso di germinazione più alto (92%) si è manifestato nel campione trattato con la sospensione allo 0,005%, mentre concentrazioni pari allo 0.001% e 0.01% hanno portato ad una germinabilità, comunque, più alta rispetto al controllo, rispettivamente pari all'87% e all'85%. I test con concentrazioni superiori allo 0,01% hanno mostrato tassi di germinazione via via discendenti, poiché si sono verificati effetti inibitori dovuti all'elevata concentrazione di nutrienti, che bloccava osmoticamente l'imbibizione e l'assorbimento di acqua da parte del seme, causando anche una disponibilità ridotta di acqua per la germinazione.

Fig. 16: contenuto totale di clorofilla e carotenoidi (mg/g) tra controllo e trattato con *A. platensis*



Per quanto riguarda la concentrazione totale di clorofilla e di carotenoidi, come si può vedere in figura 16, si è osservato un notevole incremento del contenuto di questi, sia dopo 5 che dopo 20 giorni dal trattamento con 5g di spirulina/pianta.

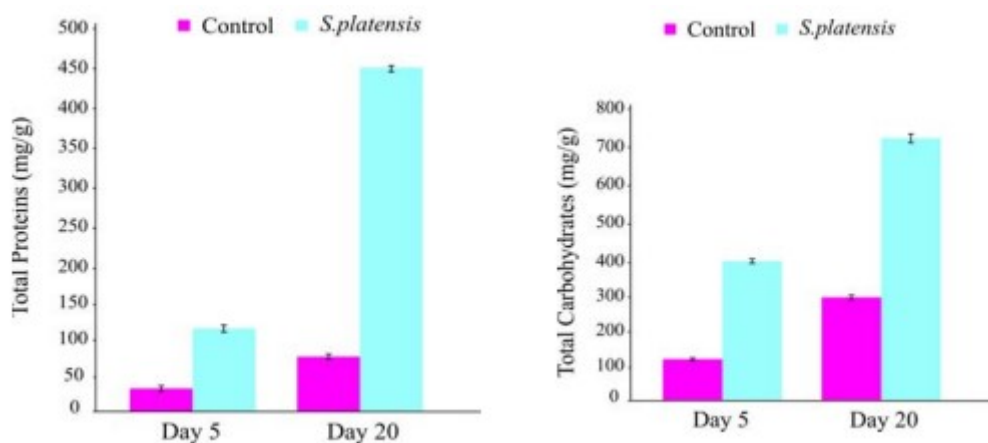
La concentrazione fogliare di clorofilla al 5° giorno era, nel controllo, di 49,5 mg/g, mentre nelle piante trattate con *A. platensis* la concentrazione è risultata essere di 155 mg/g.

Dopo 20 giorni, si è registrato un aumento del contenuto di clorofilla più che proporzionale rispetto al precedente: 85,6 mg/g nel controllo e 325 mg/g nei campioni trattati.

L'aumento della disponibilità di Mg e N nel terreno derivati dalla biofortificazione con spirulina hanno facilitato e aumentato la sintesi di clorofilla nelle foglie.

All'aumentare della concentrazione di clorofilla, è aumentata anche la concentrazione di carotenoidi. Nel controllo, al 5° e al 20° giorno era rispettivamente di 71,85 mg/g e 118,9 mg/g, mentre nei campioni trattati, si è osservato un contenuto di caroteni pari a 650 mg/g e 1500 mg/g il 5° e il 20° giorno, rispettivamente.

Fig. 17: contenuto fogliare totale di proteine e carboidrati tra controllo e trattato con *A. platensis*

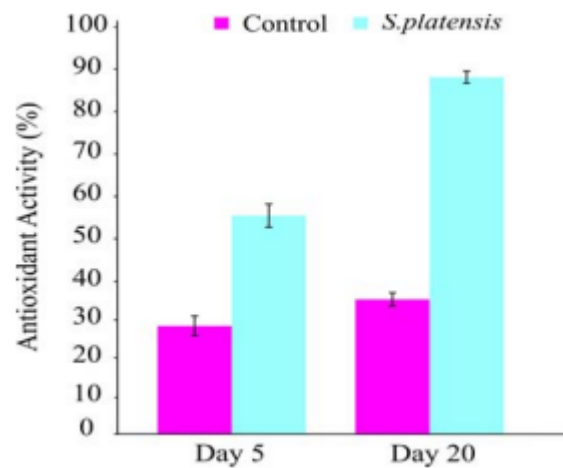


I grafici in figura 17 mostrano l'influenza di *A. platensis* sulla concentrazione fogliare di proteine e carboidrati, anche in questo caso i risultati ottenuti sono stati più che buoni: nel controllo la concentrazione di proteine al 5° e al 20° giorno era, rispettivamente, di 31,5 mg/g e 71,93 mg/g, mentre nei campioni trattati è stato osservato un contenuto proteico di 115 mg/g e 450 mg/g rispettivamente il 5° e il 20° giorno.

La maggior disponibilità di azoto ha fatto sì che aumentasse la sintesi proteica.

La concentrazione di carboidrati il 5° e il 20° giorno era 107.2 e 299.6 mg/g, rispettivamente. Nelle foglie trattate con *A. platensis*, il contenuto glucidico è aumentato significativamente, 405,3 mg/g dopo 5 giorni e 723,98 mg/g dopo 20 giorni. In questo caso, dopo il trattamento biofortificante, è stato osservato un aumento dell'espressione degli enzimi di biosintesi dell'amido, come l'adenosina difosfato-glucosio pirofosforilasi, l'amido sintasi e l'enzima di ramificazione dell'amido.

Fig. 18: confronto tra l'attività ossidante fogliare dopo 5 e dopo 20 giorni, tra controllo e trattato



In figura 18 possiamo osservare l'incremento dell'attività antiossidante nelle foglie di *A. dubius*, che in seguito al trattamento con *A. platensis* è risultata incrementata del 21,5% dopo 5 giorni e del 32% dopo 20 giorni. L'aumento dell'attività antiossidante è dovuto principalmente all'aumento della concentrazione dei caroteni.

Questo studio ha dimostrato che la spirulina può essere utilizzata come biostimolante al fine di incrementare la crescita e l'attività metabolica delle piante, allo stesso tempo risulta essere anche un fortificante agronomico.

Al momento il trattamento biostimolante con *A. platensis* non risulta essere vantaggioso nelle verdure a foglia economicamente poco costose come spinacio, dove è più conveniente utilizzare biostimolanti di sintesi più economici; sono poi necessari ulteriori studi per comprendere il meccanismo di fortificazione in campo su larga scala.

4. CONCLUSIONI

4.1 Aspetti positivi e future aspettative riguardo l'utilizzo di cianobatteri come biostimolanti

Tutti i precedenti studi hanno dimostrato che l'utilizzo delle microalghe e dei loro estratti possono determinare un beneficio nella crescita di diverse specie di piante, attraverso l'attivazione di complessi meccanismi metabolici. In particolare, a livello chimico-molecolare, viene incrementata l'attività degli enzimi coinvolti nella respirazione cellulare e nel metabolismo dell'azoto, aumenta la produzione dei pigmenti necessari alla fotosintesi clorofilliana e si osserva una maggiore efficienza nella traslocazione dei principi nutritivi e nell'attivazione del metabolismo ormonale. Questi effetti sono diversi in funzione del tipo e della concentrazione del prodotto utilizzato e della specie su cui vengono applicati.

I cianobatteri stanno trovando un crescente interesse da parte della comunità scientifica e dell'industria agrochimica come nuova fonte rinnovabile di biostimolanti vegetali in grado di migliorare in maniera sostenibile le rese e la qualità delle colture agricole. L'adozione di biostimolanti cianobatterici in agricoltura potrebbe consentire una maggior produzione nella stessa area di terreno, riducendo la dipendenza dai fertilizzanti sintetici e sostenendo il passaggio verso un'intensificazione sostenibile dell'agricoltura. L'utilizzo dei vari estratti cianobatterici sottoforma di filtrati, sospensioni od omogenati, e attraverso i diversi metodi di applicazione (inoculo nel terreno, trattamento fogliare, sommersione dei semi...) hanno mostrato molteplici effetti benefici, tra cui una miglior germinazione dei semi, crescita delle plantule, attività fotosintetica, fioritura, fruttificazione e produzione, efficienza nell'uso dei nutrienti e tolleranza agli stress abiotici, massimizzando così la produttività delle piante in condizioni di stress (Santini *et al.*, 2021). Tutti i precedenti effetti sono attribuiti ad una varietà di molecole biologicamente attive prodotte dai cianobatteri, come fitormoni, aminoacidi, proteine, antiossidanti, carboidrati e polisaccaridi. Gli studi finora condotti su diverse specie vegetali dimostrano che i cianobatteri presentano caratteristiche che soddisfano la definizione di "biostimolante vegetale" dal regolamento UE, tuttavia, non risulta semplice confrontare gli effetti dell'applicazione dei vari ceppi cianobatterici o anche dello stesso ceppo su diverse specie vegetali in quanto vengono utilizzati diversi metodi di estrazione, dosi, tempi e modalità d'impiego e vengono valutati diversi parametri.

Anche se lo sviluppo e la commercializzazione di nuovi biostimolanti attualmente non richiedono una chiara dimostrazione della modalità d'azione, per massimizzare gli effetti benefici delle applicazioni cianobatteriche è necessario comprendere come i diversi ceppi influenzano specificamente la fisiologia delle piante. L'evidenza sperimentale suggerisce che esiste una relazione tra i composti bioattivi prodotti dai cianobatteri e gli effetti sulla fisiologia vegetale ma mancano ancora studi che identifichino con chiarezza il ruolo e la rilevanza delle diverse molecole coinvolte nei processi di biostimolazione. Non si può escludere la possibilità di interazioni antagonistiche, che potrebbe comportare effetti ridotti sulla crescita delle piante rispetto ai composti purificati.

Sarà il prezzo finale del prodotto a determinare l'uso futuro dei nuovi biostimolanti vegetali in agricoltura. Rispetto ai biofertilizzanti, l'applicazione a basse dosi caratteristica dei biostimolanti configura una maggiore remunerabilità dell'utilizzo dei cianobatteri, che compensa gli elevati costi di produzione, anche se, prima che tali prodotti diventino ampiamente diffusi sul mercato, devono essere risolti diversi "problemi" a riguardo, come la riduzione dei costi di produzione della biomassa cianobatterica, l'individuazione delle molecole biostimolanti target, l'utilizzo di specifiche procedure di estrazione per la conservazione delle sostanze bioattive e la riduzione dei costi di applicazione attraverso studi approfonditi sulle modalità applicative (es. dosi attive minime, tempi di applicazione) a seconda della coltura da trattare (Sellitto *et al.*, 2021).

4.2 Criticità nell'utilizzo di cianobatteri come biostimolanti

Nonostante le evidenze scientifiche sugli effetti benefici riguardo l'utilizzo delle microalghe e dei cianobatteri siano molteplici, la loro applicazione in agricoltura è molto limitata e sono ancora pochissimi i produttori attualmente presenti sul mercato, soprattutto se paragonati all'elevato numero di prodotti a base di macroalghe. Uno dei principali ostacoli da superare nella produzione commerciale di cianobatteri riguarda i costi di produzione della biomassa, che risultano essere ancora troppo elevati. Infatti, microalghe e cianobatteri vengono coltivati in sistemi chiusi e controllati come fotobioreattori e vasche, che richiedono notevoli quantità di materiale per la costruzione, il funzionamento, il mantenimento e la manutenzione, fertilizzanti, energia elettrica, acqua e materiali per la raccolta/essiccazione. I costi di produzione della biomassa variano da un minimo di 5 ad oltre 500 €/kg in base al metodo di coltivazione (ad es. a luce naturale o artificiale, fotobioreattori o vasche) rispetto agli 0,6-15 €/kg delle biomasse macroalgali raccolte dagli ambienti marini o rispetto alle biomasse cianobatteriche prodotte nei bacini all'aperto, molto più facilmente contaminate e di qualità più bassa rispetto alle produzioni in ambiente chiuso (Santini *et al.*, 2021).

D'altra parte, la coltivazione in ambiente chiuso e controllato rappresenta anche uno dei principali vantaggi dell'utilizzo di biomasse microalgali e cianobatteriche per la produzione di biostimolanti, in quanto consente una maggiore standardizzazione dei processi produttivi. Le biomasse macroalgali, al contrario, mostrano caratteristiche biochimiche che possono variare considerevolmente in base alle condizioni ambientali durante la produzione, allo stadio fenologico alla raccolta e alla disponibilità di nutrienti in mare, risulterebbe quindi molto più complessa una standardizzazione.

Per sfruttare tutto il potenziale di una coltivazione di microalghe o cianobatteri, il processo produttivo di questi potrebbe essere integrato con la produzione di altri prodotti. Ad esempio, il pellet residuo dell'estrazione potrebbe essere impiegato come biofertilizzante, la frazione lipidica rimanente potrebbe essere utilizzata per la produzione di biocarburanti o per estrarne acidi grassi polinsaturi, con diversi utilizzi in cosmetica, farmaceutica e nutraceutica. Le proteine residue potrebbero trovare utilizzo nella formulazione di mangimi per la zootecnia e l'acquacoltura. Tuttavia, la progettazione di un sistema di bioraffineria efficiente richiede che vengano chiaramente identificate le frazioni che

maggiormente contribuiscono all'azione biostimolante, al fine di valutare i possibili riutilizzi delle restanti frazioni.

4.3 Osservazioni conclusive

Microalghe e cianobatteri vengono considerati ad oggi una delle fonti più promettenti per lo sviluppo di prodotti biostimolanti, data la loro ampia biodiversità genetica e metabolica. Negli ultimi anni si sono accumulate evidenze scientifiche a supporto dell'azione biostimolante di tali microrganismi e dei formulati da essi derivati, che si sono dimostrati in grado di aumentare le rese, permettendo al contempo di migliorare l'efficienza dei trattamenti di fertilizzazione grazie alla stimolazione dell'assorbimento dei nutrienti da parte della pianta. Inoltre, l'applicazione di biostimolanti microalgali e cianobatterici si è dimostrata in grado di ridurre gli effetti negativi sulla crescita vegetativa causati dagli stress abiotici, aumentando la resilienza delle colture al cambiamento climatico.

Il successo di un trattamento biostimolante dipende da molti fattori, tra cui la specie microalgale o cianobatterica utilizzata, il metodo di lavorazione della biomassa, la specie vegetale su cui viene applicato e la concentrazione e modalità di applicazione. Ne consegue che lo sviluppo di un nuovo prodotto biostimolante dev'essere testato su diverse specie vegetali per determinare dosi, tempi e modalità di applicazione più convenienti ed efficaci in funzione della specie, della modalità di applicazione e delle condizioni colturali. Attualmente lo sviluppo e il commercio di un biostimolante non richiedono una chiara dimostrazione dei meccanismi di azione, una maggiore comprensione di questi però permetterebbe di accelerare la selezione di nuovi ceppi biostimolanti e di pianificare strategie volte ad aumentare la concentrazione dei composti bioattivi di interesse nelle biomasse microalgali e cianobatteriche.

5. BIBLIOGRAFIA

- Bano A., Gupta A., Rai S., Fatima T., Sharma S., Pathak N., (2022), Plant stress Phisyology, BoD – Books on Demand, 107-109.
[https://books.google.it/books?hl=it&lr=&id=zNBuEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA107&dq=Many+abiotic+factors+\(drought,+salinity,+extreme+temperatures\)+manifest+in+plants+as+oxidative+stress,+leading+to+the+accumulation+of+reactive+oxygen+species+\(ROS\)+which+damage+DNA,+lipids,+carbohydrates+and+proteins+and+also+cause+cell+signals+aberrant.+l&ots=P7ikjfZHTB&sig=SlkWXBMwAh79Tx6bk8JxS52YU18&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.it/books?hl=it&lr=&id=zNBuEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA107&dq=Many+abiotic+factors+(drought,+salinity,+extreme+temperatures)+manifest+in+plants+as+oxidative+stress,+leading+to+the+accumulation+of+reactive+oxygen+species+(ROS)+which+damage+DNA,+lipids,+carbohydrates+and+proteins+and+also+cause+cell+signals+aberrant.+l&ots=P7ikjfZHTB&sig=SlkWXBMwAh79Tx6bk8JxS52YU18&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false).
- Banzato D., (2019), Fertilizzanti, le nuove norme per il mercato europeo. *L'informatore agrario*, 2019.
<https://www.venetoagricoltura.org/wp-content/uploads/2019/10/Colla-final.pdf>
- Briamonte L., Pergamo R., (2010), I metodi di produzione sostenibile nel sistema agroalimentare. Istituto Nazionale di Economia Agraria, 11-27.
http://dSPACE.crea.gov.it/bitstream/inea/519/1/Agres_Metodi.pdf
- Bulgari R., Cocetta G., Ferrante A., (2014), Biostimolanti su orticole per aumentare rese e qualità. *L'informatore Agrario* 29, 2014.
https://iris.unito.it/retrieve/handle/2318/1781620/739647/Biostimolanti_orticole.pdf
- Carvalho J. C. M., Francisco F. R., Almeida K. A., Sato S., Converti A., (2004), Cultivation of *Arthrospira* (spirulina) *platensis* (cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially increasing feeding rates. *Journal of Phycology*, 40, 589-597.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03167.x>
- Casazza A. A., de Souza P. O. R., da Silva F. M., Solisio C., Farias B. B. C., Sarubbo L., Converti A., (2022), *Arthrospira platensis* Cultivation in a Bench-Scale Helical Tubular Photobioreactor. *Applied Sciences*, 12(3), 1311.
<https://doi.org/10.3390/app12031311>
- Coderoni S., (2015), Sostenibilità ambientale in agricoltura. Alcune considerazioni introduttive. *Agriregionieuropa*, 41.
<https://agrireregionieuropa.univpm.it/it/content/article/31/41/sostenibilita-ambientale-agricoltura-alcune-considerazioni-introduttive>

- Colla G., Nardi S., Cardarelli M., Ertani A., Lucini L., Canaguier R., Rouphael Y., (2015), Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 28-38.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.037>
- Dias G. A., Rocha R. H. C., Araújo J. L., de Lima J. F., Guedes W. A., (2016), Growth, yield, and postharvest quality in eggplant produced under different foliar fertilizer (*Arthrospira platensis*) treatments. *Ciências Agrárias*, 37, 3893-3901.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445748913007>
- du Jardin P., (2015), Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- EBIC, (2016), How can the European Union Encourage Innovation in Microbial Biostimulants?
<https://biostimulants.eu/wp-content/uploads/2019/09/EBIC-Position-Paper-microbes-innovation-FINAL.pdf>
- Godlewska K., Michalak I., Pacyga P., Baśladyńska S., Chojnacka K., (2019), Potential applications of cyanobacteria: *Arthrospira platensis* filtrates and homogenates in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol*, 35, 80.
<https://doi.org/10.1007/s11274-019-2653-6>
- Haroun S. A., Hussein M. H., (2003), The Promotive Effect of Algal Biofertilizers on Growth, Protein Pattern and Some Metabolic Activities of *Lupinus termis* Plants Grown in Siliceous Soil. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2, 13, 944-951.
10.3923/ajps.2003.944.951
- Kopittke P. M., Menzies N. W., Wang P., McKenna B. A., Lombi E., (2019), Soil and the intensification of agriculture for global food security. *Environment International*, 135, 105078.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105078>
- Mala R., Celsia A. S. R., Mahalakshmi R., Rajeswari S., (2017), Agronomic Biofortification of *Amaranthus dubius* with Macro Nutrients and Vitamin A. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Ing.* 225 012214.
<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/225/1/012214>
- MarketsandMarkets, (2019), Biostimulants for Crops from Seed Germination to Plant Development. 289-296.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823048-0.00012-5>

- Nowruzi B., Bouaïcha N., Metcalf J. S., Porzani J. S., Konur O., (2021), Plant-cyanobacteria interactions: Beneficial and harmful effects of cyanobacterial bioactive compounds on soil-plant systems and subsequent risk to animal and human health. *Phytochemistry*, 192, 122959.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112959>
- Osman E. M. H., Abo-Shady A. M., El-Nagar M. M. F., (2015), Cyanobacterial *Arthrospira* (*Arthrospira platensis*) as safener against harmful effects of fusilade herbicide on faba bean plant. *Rend. Fis. Acc. Lincei*, 27, 455–462.
<https://doi.org/10.1007/s12210-015-0498-y>
- Ravelonandro P. H., Ratianarivo D. H., Joannis-Cassan C., Isambert A., Raherimandimby M., (2008), Influence of light quality and intensity in the cultivation of *Arthrospira platensis* from Toliara (Madagascar) in a closed system. *Journal of chemical Technology and Biotechnology*. 83, 842-848.
<https://doi.org/10.1002/jctb.1878>
- Refaay D. A., El-Marzoki E. M., Abdel-Hamid M. I., Haroun S. A., (2021), Effect of foliar application with *Chlorella vulgaris*, *Tetradesmus dimorphus* and *Arthrospira platensis* as biostimulants for common bean. *Journal of Applied Phycology*, 33, 3807–3815.
<https://doi.org/10.1007/s10811-021-02584-z>
- Sannasimuthu A., Kumaresan V., Pasupuleti M., Ahmad B., K.Al-Sadoon M., (2018), Radical scavenging property of a novel peptide derived from C-terminal SOD domain of superoxide dismutase enzyme in *Arthrospira platensis*. *Algal research* 35, 519-529.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.028>
- Santini G., Biondi N., Rodolfi L., Tredici M. R., (2021), Plant Biostimulants from Cyanobacteria: An Emerging Strategy to Improve Yields and Sustainability in Agriculture. *Plants*, 10(4), 643.
<https://doi.org/10.3390/plants10040643>
- Sellitto V. M., (2021), Microalghe (e cianobatteri). I microrganismi fotosintetici in agricoltura, *Edagricole*. 3, 45-56.
- Ulrich A., (2014), Le alghe della salute. Spirulina, Clorella, Klamath. Superfoods naturali di forza, bellezza e benessere, *Età dell'acquario*.
- Verni M. A., (2022), Biostimolanti, cosa prevede la nuova normativa europea. *Colture protette, orticoltura e florovivaismo*.

<https://coltureprotette.edagricole.it/orticoltura/biostimolanti-cosa-prevede-la-nuova-normativa-europea/>

- Wang S. C., Khin M. C., Chua P. D. Q., Luo Y. D., (2016), Use of spirulina biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. *Algal research*, 15, 59-64.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.009>
- Zagnoli L., (2014), Studio del processo di produzione di alga spirulina e confronto energetico e ambientale tra il metodo di coltivazione in vasca aperta e quello in fotobioreattore. 2, 23.
<https://morethesis.unimore.it/theses/available/etd-03152016-160028/>

6. SITOGRAFIA

- Agricola Internazionale, (2021), Stress delle piante. I fattori abiotici più diffusi.
<https://www.agricolainternazionale.it/news/stress-delle-piante-i-fattori-abiotici-piu-diffusi>
- Corrado M., (2021), Che differenza c'è tra agricoltura sostenibile e agricoltura biologica.
<https://tingate.it/lifestyle/green/che-differenza-c-e-tra-agricoltura-sostenibile-e-agricoltura-biologica.vum>
- CREA, (2019), Biostimolanti per un'agricoltura sostenibile. Cosa sono, come agiscono e modalità di utilizzo.
<https://www.crea.gov.it/-/-biostimolanti-per-un-agricoltura-sostenibile.-cosa-sono-come-agiscono-e-modalit%C3%A0-di-utilizzo#:~:text=I%20biostimolanti%20sono%20prodotti%20contenenti,dal%20trapianto%20fino%20alla%20raccolta>
- EGS360, (2021), Agricoltura sostenibile, cos'è e come funziona.
<https://www.esg360.it/environmental/agricoltura-sostenibile-cose-e-come-funziona/>
- FAO, (2018), Alimentazione e agricoltura sostenibili.
<https://www.fao.org/sustainability/en/>

- Gelisio T., (2022), Agricoltura sostenibile: le certificazioni provano davvero la sostenibilità?
<https://ecocentrica.it/agricoltura-sostenibile-certificazioni-ecocentrica/>
- Lasorella V., (2021), Nuovo Regolamento Europeo dei Fertilizzanti: ecco come funziona.
[https://agronotizie.imagelinenetwork.com/fertilizzanti/2021/12/07/nuovo-regolamento-europeo-dei-fertilizzanti-ecco-come-funziona/73440#:~:text=Il%20Regolamento%20\(Ue\)%202019%2F,il%20Regolamento%20\(Ce\)%20n](https://agronotizie.imagelinenetwork.com/fertilizzanti/2021/12/07/nuovo-regolamento-europeo-dei-fertilizzanti-ecco-come-funziona/73440#:~:text=Il%20Regolamento%20(Ue)%202019%2F,il%20Regolamento%20(Ce)%20n)
- Salerno A., (2021), Agricoltura 4.0: cos'è, incentivi e tecnologie abilitanti.
<https://www.agrifood.tech/precision-farming/agricoltura-4-0-cose-incentivi-e-tecnologie-abilitanti/>
- Vitali V., (2020), Ormoni vegetali: che cosa sono?
<https://www.microbiologiaitalia.it/didattica/ormoni-vegetali/>
- Wikipedia, *Arthrospira platensis*.
https://it.wikipedia.org/wiki/Arthrospira_platensis