

GLI INVISIBILI IN AGRICOLTURA

Marco Nuti

Sommario:

1. Le città dei microbi, come parlano tra loro i cittadini
2. Il ruolo dei microrganismi nell'agricoltura moderna, per il benessere delle piante e degli animali e per la tutela dell'ambiente

1. Le città dei microbi, come parlano tra loro i cittadini

Dopo la descrizione dei batteri, fatta da Leeuwenhoeck nel 17mo secolo con il suo microscopio costruito a mano usando per lenti delle sferette di vetro, i microrganismi oltre che invisibili ad occhio nudo sono stati ritenuti appartenenti ad un mondo di sordomuti, esseri solitari e da combattere in quanto per lo più pericolosi per gli umani. Così la visione del mondo microbico è rimasta durante tutto l'800 e a poco sono servite le scoperte di Luigi Pasteur durante la seconda metà di quel secolo sui batteri acetici, sui batteri lattici, sui lieviti. L'interesse mondiale era rivolto ai microbi come agenti di malattie dell'uomo, delle piante e degli animali. Ebbero infatti enorme risonanza la scoperta pasteuriana dell'agente microbico del colera dei polli, dell'agente eziologico della tubercolosi di Roberto Koch, dei trattamenti di sterilizzazione degli strumenti chirurgici di Joseph Lister che salvarono la vita a migliaia di puerpere, dalla vaccinazione antirabica del giovane Joseph Meister da parte di Pasteur. Era sì iniziato il secolo d'oro della microbiologia, con l'isolamento in coltura pura dei microrganismi. Ma purtroppo passarono praticamente inosservate scoperte altrettanto fondamentali quali l'isolamento e la coltivazione *ex planta* dei rizobi, simbiotici radicali delle leguminose, della stessa fissazione biologica dell'azoto atmosferico e dei batteri azotofissatori, dei processi microbici del ciclo dello zolfo. Dovevano passare ancora quasi cento anni perché questa visione parziale e distorta venisse corretta, pur se anticipata dalla scoperta di Metchnikov nel 1907 della utilità dei fermenti lattici per la salute umana e dalla scoperta dell'utilità del *Bacillus thuringiensis* nel controllo di insetti fitopatogeni (i primi saggi in pieno campo risalgono al 1937). E finalmente abbiamo compreso che i microbi sono i curatori della salute del suolo, delle piante e degli umani; oltre il 99 % dei microbi del nostro pianeta sono utili o indispensabili. Una sparuta minoranza, anche se molto agguerrita (vedasi le pandemie), è per noi dannosa. Qui di seguito ci occuperemo dei microbi utili in agricoltura.

I procarioti (archea, seguiti da eubatteri e alghe verdi-azzurre) sono stati i primi abitatori viventi del nostro pianeta (i primi resti fossili datano 3.7-4.2 miliardi di anni fa), ben prima di piante ed animali. Durante il corso dell'evoluzione, i microbi hanno maturato mezzi di comunicazione molto raffinati. Questi tipi di comunicazione sono basati innanzitutto su "parole" chimiche: il sistema di *quorum-sensing* dei batteri, i fattori della micorrizzazione (Myc) nella simbiosi tra funghi micorrizici e radici delle piante, i fattori della nodulazione (Nod) nella simbiosi tra piante leguminose e rizobi del terreno sono solo i casi più noti. Questi sistemi permettono ai batteri e ai microfunghi di "parlare" tra di loro, di "parlare" con le piante e con gli animali. Alcune parole sono

normali prodotti metabolici: uno dei fattori di nodulazione dei rizobi è addirittura uno dei mattoni che costituiscono la parete cellulare del batterio. Il caso della simbiosi tra piante leguminose e rizobi è emblematico: il batterio riesce a convertire il segnale di allontanamento (flavonoidi), che la pianta produce appena sente che ci sono dei batteri nelle vicinanze delle radici, in un segnale di attivazione dei geni della nodulazione, con una piccola modifica chimica ad uno dei mattoni che formano la sua parete cellulare. In questo modo il batterio realizza un significativo risparmio energetico. La pianta risponde chiedendo una conferma della capacità del batterio a formare noduli azotofissatori. Lo scambio di segnali prosegue con la verifica a tappe che la pianta puntualmente pretende prima della formazione del nodulo. Se queste verifiche hanno esito positivo, la simbiosi dà luogo ad un composto chimico tipico del mondo animale, una emoglobina che viene chiamata leg-emoglobina, cioè emoglobina delle leguminose per distinguerla dall'emoglobina del sangue umano. Ma la funzione è la stessa: il trasporto dell'ossigeno, in questo caso fino all'interno del nodulo in concentrazione sufficiente per permettere al metabolismo del batterio di funzionare. Tuttavia, poiché la nitrogenasi, l'enzima batterico che fissa l'azoto atmosferico, potrebbe essere danneggiata irreversibilmente dall'eccesso di ossigeno, la membrana che avvolge le cellule batteriche (chiamate batteroidi perché non si dividono più) all'interno delle cellule vegetali del nodulo consente il passaggio della concentrazione sufficiente di ossigeno ma mai in eccesso. La fissazione dell'azoto atmosferico quindi può aver luogo e durerà fino alla fioritura della leguminosa simbiote, cioè nella fase di sviluppo che maggiormente richiede questo elemento. La simbiosi rizobi-leguminose è emblematica, ma non dimentichiamo che esistono molti altri sistemi di comunicazione nel mondo microbico: colori, suoni, vibrazioni che consentono di modulare i comportamenti sia dei singoli sia di quelli collettivi. La produzione di bio-luminescenze batteriche in verde, blu, rosso, rosa, arancione sono noti da tempo. Basti pensare alla simbiosi dei batteri luminescenti *Photobacterium* e *Vibrio* con calamari, meduse, pesci lanterna, vongole, anguille, rane pescatrici. È recente acquisizione che nei calamari l'emissione della bio-luminescenza da parte di *Vibrio* modula l'espressione genica nell'ospite, lasciando intravedere che la conversazione tra batteri e animali è intima e complessa. Tra i comportamenti collettivi più evoluti ci sono quelli della simbiosi tra i batteri e l'intestino delle termiti. Le termiti, come noi umani, non possono digerire le ligno-cellulose, compito che invece viene egregiamente svolto dagli attinobatteri che abitano simbioticamente nella cavità gastro-intestinale di questi insetti. Alcune specie di attinobatteri sono in grado di iniziare la degradazione delle lignine, e i microfunghi in perfetta sincronia e spirito collaborativo perfezionano il processo degradativo e lo completano. In questo modo vengono costruiti i termitai e viene nutrita la regina che giace sulla piattaforma basale. I basidiocarpi di alcuni funghi vengono molto apprezzati come cibo dagli umani, così come la regina che viene mangiata arrostita, mettendo rischio l'esistenza stessa dei

termitai in quei climi. Un' altra caso di simbiosi è quella tra funghi e radici delle piante, vecchio di 400 milioni di anni. Si stima che l'80-90 % delle piante terrestri stabilisca un rapporto mutualistico con i funghi micorrizici, che tramite le strutture fungine all'interno delle cellule radicali e le ife che si propagano all'esterno, riescono a favorire e in alcuni casi permettere la nutrizione delle piante stesse. Così avviene per molti microelementi, ma anche per macroelementi nutritivi come il fosforo e il carbonio, che vengono "trasportati" da pianta a pianta attraverso la rete ifale che si forma nel suolo. Questa rete è così estesa da formare una notevole biomassa rispetto alle tre-dieci tonnellate di microbi esistenti nei primi venticinque centimetri di profondità di un ettaro di terreno. Sebbene siano noti anche comportamenti meno eticamente edificanti come predazione e cannibalismo, in generale lo spirito collaborativo prevale in tutti i membri di questa complessa società fino a svolgere funzioni di volano per i cicli degli elementi in natura. L'intensa vita di relazione, le loro dimensioni, il metabolismo accelerato in presenza degli stimoli energetici e nutritivi appropriati fanno sì che sia nel suolo lontano dalle radici delle piante sia nell'intorno di queste, i microrganismi diventino elementi indispensabili per lo sviluppo ed il mantenimento della fertilità biologica dei terreni. Le aggregazioni di cellule microbiche, non tanto le cellule singole che sono una rarità, all'interno degli aggregati delle particelle di suolo, attraverso lo scambio di segnali e attraverso lo scambio di materiale genetico crescono fino ad incontrare limiti dovuti allo spazio fisico e al nutrimento disponibile.

Infatti i microbi possono contare non solo su forme evolute di proto-linguaggio, ma normalmente anche sullo scambio di materiale genetico, cioè su forme di vera e propria proto-sessualità per le cellule procariotiche con i sistemi di coniugazione, fino alla sessualità delle cellule eucariotiche. In entrambi i casi aumenta la capacità di adattamento all'ambiente, così come la possibilità di reagire agli stress sia biotici che abiotici. Si pensi che in una ifa dei Deuteromiceti, funghi microscopici tipici del terreno che sono privi di ricombinazione sessuale, possono coesistere anche una quindicina di nuclei diversi. In altri termini le cellule microbiche hanno investito una parte sostanziale dell'energia disponibile per scambiare materiale genetico e adattarsi alle più svariate condizioni ambientali, diventando gli esseri viventi nella biosfera più flessibili, sia in termini genetici che metabolici. Quando le condizioni di stress, soprattutto idrico, di temperatura, sostanze tossiche, nutrienti, ossigeno, diventano eccessive i microbi passano da stati fisiologici di coltivabilità, cioè attiva moltiplicazione, a quelli di non-coltivabilità (pur restando vitali). E' stato possibile soltanto negli anni più recenti, utilizzando le moderne tecniche di metagenomica, svelare che la frazione maggioritaria dei microbi nel suolo è in stato fisiologico di vitalità ma non coltivabilità. Con questo nuovo approccio si può oggi descrivere la totalità del microbiota in un terreno, sia in termini di DNA che di RNA. Le analisi proteomiche e metabolomiche, anche integrate

con le analisi basate su metodi colturali, possono delineare un quadro preciso della fisiologia del microbioma terricolo. Le funzioni fisiologiche diventano o rimangono attive solo quando le condizioni ambientali lo consentono, mentre rallentano o addirittura si fermano se le condizioni ambientali diventano difficili o proibitive, consentendo un enorme risparmio energetico ai microrganismi senza che vadano incontro alla loro devitalizzazione. E' quindi fatta salva anche la biodiversità che caratterizza la totalità del microbiota terricolo e la capacità dei vari gruppi fisiologici di aiutarsi gli uni con gli altri al momento opportuno integrando le loro funzioni per la prosecuzione dei cicli degli elementi in natura. I microbi in questo modo non si limitano ad essere agenti di trasformazione di materie prime, sotto forma di consorzi multi-specie o multi-ceppo, ma hanno un impatto determinante sullo stato di salute del suolo e delle piante, analogamente al loro ruolo nella promozione e mantenimento dello stato di salute degli animali e dell'uomo. Nella rizosfera delle piante ci sono da uno a dieci miliardi di cellule microbiche per grammo di terreno. Nell'intestino umano ce ne sono due logaritmi in più e i due habitat rappresentano le densità cellulari massime dei microrganismi nella biosfera. Se il microbioma intestinale entra in disbiosi per stress alimentare od altro, si evidenziano stati patologici anche gravi (quali alterazioni al sistema cognitivo, diabete di tipo 2, obesità, depressione, altri) come dimostra la letteratura scientifica degli ultimi quindici anni. Per nostra fortuna la somministrazione di preparati microbici multiceppo e multispecie riesce a contrastare gli stati patologici ed a far rientrare le disbiosi intestinali in un più bilanciato equilibrio dinamico. I consorzi microbici somministrabili sono diversi per fasce di età e per gravità della disbiosi, in genere comprendendo specie diverse o ceppi diversi di bifidobatteri, lattobacilli e bacilli.

Se il microbioma delle piante, per lo più condensato nella micorrizosfera e all'interno con gli endofiti, entra in disbiosi e la resilienza generale della pianta agli stress biotici ed abiotici diminuisce, la pianta comincia a soffrire. Va ristabilito l'equilibrio del microbioma della pianta e la sua corretta interazione col microbioma del terreno. Ai cittadini delle città microbiche bisogna consentire di parlare di nuovo tra di loro, di parlare con le piante e con gli animali. Una visione unificante del mondo microbico in natura ci aiuterà a capirne meglio il ruolo nell'agricoltura moderna.

2. Il ruolo dei microrganismi nell'agricoltura moderna, per il benessere delle piante e degli animali e per la tutela dell'ambiente

Consideriamo che un solo grammo di terreno agrario rappresenti una vastissima biblioteca di geni, contenuta in svariate migliaia di individui che parlano diverse lingue e un numero maggiore di dialetti. I lemmi di questi linguaggi (composti volatili, vibrazioni sonore, emissione di colori, produzione di sostanze chimiche) servono ai microbi per nutrirsi, difendersi da eventuali nemici, sopravvivere, diffondersi. Ma l'espressione genica, se correttamente interpretata, può rivelarsi estremamente utile in agricoltura. Il controllo biologico delle fitopatie, la produzione di biocidi, la produzione di biostimolanti e biofertilizzanti sono solo alcuni esempi. I linguaggi usati dai microbi, cioè sia l'emissione che la percezione di segnali anche a distanza, sono sotto stretto controllo genetico. Per alcuni batteri è stato possibile dimostrare che la produzione, il rilascio e la percezione delle molecole-segnale vengono utilizzati per fare il censimento della popolazione che cresce e per controllare il suo comportamento in risposta alle variazioni del numero degli individui e alle variazioni degli stimoli ambientali. E sono diversi i casi dimostrati nei quali il linguaggio è utilizzato per determinare il comportamento degli individui all'interno e all'esterno di una popolazione. Tutto quanto abbiamo detto finora per la società dei microbi avviene nell'intervallo delle condizioni climatiche caratteristiche dei climi temperati e tropicali fino a quelli artici. Ma la

memoria dei microbi è assai più antica delle attuali condizioni di vita per così dire rilassate e permissive. Essa infatti si spinge indietro nel tempo, quando le condizioni climatiche sulla terra erano estreme, i vulcani nelle profondità marine erano in continua attività e le rocce eruttate non erano pronte alla transizione per diventare suolo. Quelle condizioni vedevano i gas vulcanici dominare senza ossigeno ma ricchi in idrogeno, metano e monossido di carbonio, mentre le acque nelle quali s'infiltravano erano più ricche di ossigeno. Probabilmente l'interfaccia di fasi acquose e gassose, le elevate temperature e acidità o alcalinità estreme, hanno favorito la comparsa dei microbi più antichi, gli Archea, che utilizzano le diverse reazioni chimiche invece della luce come sorgente di energia. E' una vera fortuna che queste condizioni siano ancora presenti nella enorme caldera del parco di Yellowstone, permettendo così di isolare e coltivare gli Archea, veri "fossili" viventi, di studiarne le attività e caratteristiche nel loro proprio ambiente, di svelarne la presenza se non coltivabili. Ricordiamoci che *Thermus aquaticus* isolato dal bacino del geyser Norris nella caldera di Yellowstone cresce a 80°C ed è stato utilizzato per estrarre la Taq polimerasi, l'enzima termo-resistente usato nella PCR (reazione a catena della polimerasi) per l'amplificazione del DNA, reazione chiave della biologia molecolare. E insieme a *Thermus* provengono da Yellowstone moltissimi di quei microbi che crescono ad alte temperature, fino a 80-90°C, e caratteristiche uniche: i batteri cellulosolitici *Caldicellulosiruptor obsidiansis* utilizzati nella biodegradazione termofila della cellulosa per la produzione di etanolo, i coloratissimi cianobatteri fotosintetici che tre miliardi di anni fa aiutarono a produrre l'ossigeno che caratterizza l'atmosfera attuale, i batteri termo-estremofili *Sulfolobus acidocaldarius* che cresce a spese dell'idrogeno solforato emesso dai vulcani, convertendolo in acido solforico che a sua volta degrada la roccia vulcanica iniziando il processo di pedogenesi. Finora sono stati citati i procarioti, cioè microrganismi con organizzazione metabolica, fisiologica, genetica condensata in un'unica cellula. Per quanto riguarda gli eucarioti, si ritiene che il primo organismo ancestrale sia vissuto durante l'era Mesoproterozoica, cioè 1-1.6 miliardi di anni fa. Nelle rocce sedimentarie dell'India centrale sono stati rinvenuti strati di cianobatteri fotosintetici insieme ad organismi filamentosi e lobati con le caratteristiche delle moderne eucariotiche alghe rosse. Ma torniamo ai giorni nostri. Quando Sergei Winogradski nel 1919 ricevette da Emilio Roux, successore di Luigi Pasteur alla direzione dell'istituto omonimo a Parigi, una lettera d'invito in cui gli chiedeva se fosse possibile trasferirsi da S. Pietroburgo a Parigi, aveva già scoperto e descritto i batteri chemio-litotrofi della nitrificazione, cioè quelli che utilizzano l'anidride carbonica come fonte di carbonio e le reazioni di ossido-riduzione come fonte di energia. Winogradski fu ben lieto di fuggire, insieme alla figlia Elena, dalla rivoluzione bolscevica in atto, che gli impediva di proseguire nei suoi studi. Dal 1921 seguirono altre scoperte: i solfobatteri, i ferrobatteri, alcuni batteri fissatori d'azoto. Era l'inizio della microbiologia del suolo che ha visto in Francia anche altri

epigoni: negli anni '50 Pochon e negli anni '70 Dommergues, che ne hanno definito le metodologie, i contenuti scientifici e le applicazioni in agronomia. Il maggior merito della Scuola francese è quello di aver fatto tesoro delle scoperte del "periodo d'oro" dei pionieri della microbiologia che avevano isolato in coltura pura e descritto microbi nuovi, legando queste conoscenze alle funzioni ecologiche dei vari microrganismi considerati non tanto individualmente ma come membri di gruppi denominati "fisiologici" cioè gruppi di generi e specie tassonomicamente diverse di microbi accomunati per la loro funzione ecologica prevalente. Ecco che i comportamenti dei microrganismi, potendo essere considerati collettivi, consentono di definirne sia il ruolo nei cicli biogeochimici in natura sia la gestione in agricoltura e nelle foreste. Si giustifica pertanto la nascita della nuova disciplina, l' Ecologia microbica. Le tecniche di valutazione dei gruppi fisiologici presenti nel terreno, sviluppate negli anni '60, pur restando valide per le popolazioni coltivabili, devono essere integrate con gli approcci meta-genomici più moderni per arrivare, risultato ancora non completamente raggiunto, alla individuazione delle funzioni delle popolazioni non coltivabili. In questo modo sarà più agevole indirizzare la gestione agronomica verso obiettivi di maggiore sostenibilità. In effetti lo studio del microbioma del suolo ha fatto decisivi passi in avanti indicando gli effetti delle pratiche colturali sull'insieme delle popolazioni microbiche coltivabili o meno, sulla localizzazione di batteri e microfunghi negli aggregati e più in generale delle dinamiche del biota terricolo. Vediamo ora alcuni aspetti relativi ai cicli biogeochimici in agricoltura che riguardano gli elementi biogenici carbonio, azoto, solfo, fosforo senza dimenticare che altri elementi come ferro e manganese vanno incontro a reazioni di solubilizzazione-insolubilizzazione, ossido- riduzione ad opera dei gruppi fisiologici dei ferrobatteri e dei manganobatteri. Per il carbonio, la posizione del microbiota terricolo per i millenni successivi alla sedentarizzazione dei cacciatori-raccoglitori, cioè successivi all'inizio delle attività agricole si è confrontata praticamente con la capacità fotosintetica dei batteri fotosintetici e delle piante coltivate da un lato e la degradazione dei residui colturali di queste ultime dall'altro lato, insieme alla degradazione dei residui carboniosi dell'allevamento animale. Quindi il lavoro coordinato dei microbi ligninolitici, cellulolitici, emicellulosolitici, pectinolitici, cheratinolitici è continuato, perturbato solo da eventi climatici o comunque naturali come gli incendi, le eruzioni vulcaniche, glaciazioni e per niente o molto poco per cause antropogeniche. E' dall' inizio della utilizzazione su scala industriale delle fonti non rinnovabili e della immissione di composti del carbonio non degradabili che lo scenario è cambiato e che il lavoro dei microbi si è fatto improbo, cioè da poco più di un secolo. Ecco che con crescente insistenza si parla dei "carbon stocks" nel terreno, cioè di quei serbatoi dei quali il genere umano mai si era dovuto occupare semplicemente perché il ciclo del carbonio in natura e in agricoltura era in equilibrio, pur dinamico, tra le perdite (emissioni di anidride carbonica) e guadagni (fotosintesi vegetale e microbica e successiva

incorporazione del carbonio nelle frazioni a lenta degradazione della sostanza organica). Allo stesso modo ora si parla molto anche di "bioremediation" per tentare di arginare il crescente stato di inquinamento dei terreni, utilizzando piante e microrganismi. Nel ciclo dell'azoto, i comportamenti collettivi dei microbi sono anch'essi integrati in un continuum come per il ciclo del carbonio. Considerando che il reservoir maggiore di azoto è l'atmosfera che ne contiene quasi l'80%, vi è una fase in più, operata esclusivamente da batteri: l'azoto atmosferico viene fissato da batteri aerobi e anaerobi (*Azotobacter*, *Clostridium*), cianobatteri, batteri simbiotici delle radici di leguminose (*Rizobi*) o delle non-leguminose (attinobatteri) a formare vari tipi d'azoto organico che si accumula nei microbi, nei vegetali, negli animali e che poi confluisce nei residui, nelle deiezioni e nei cadaveri. Queste forme di azoto vengono ammonificate da batteri e funghi, l'azoto ammoniacale solo in parte è assimilabile dalle piante e viene quindi nitrificato prima in azoto nitroso da batteri chemio-litotrofi (*Nitrosomonas*, *Nitrospira*) e poi ulteriormente ossidato da batteri (*Nitrobacter*) in azoto nitrico, forma facilmente assimilabile dalle piante. Là dove ricorrono le condizioni, ad esempio l'assenza di ossigeno, l'azoto nitrico può essere ridotto, cioè denitrificato in forme volatili fino ad azoto gassoso dai batteri denitrificanti. E ci sono batteri che possono fissare l'azoto atmosferico o denitrificare a seconda delle condizioni ambientali, come fanno gli stessi *Rizobi* in rizosfera quando scarseggia o viene a mancare l'ossigeno. L'estrema flessibilità metabolica collettiva, la capacità di adattamento dei vari gruppi fisiologici alle mutevoli condizioni pedo-climatiche fanno sì che a distanza di pochi millimetri l'enorme potenziale microbico si possa sempre esprimere.

Lo zolfo nel suolo è in forma sia organica che inorganica, ma la deficienza di questo elemento sta diventando un problema, grave in alcune aree come nel cerrado brasiliano, a causa delle pratiche agronomiche (incremento dei prodotti fertilizzanti con alte concentrazioni di azoto e fosforo, ma senza zolfo) le elevate esportazioni di biomasse vegetali conseguenti all'incremento delle rese per ettaro, le ridotte emissioni di zolfo in atmosfera sotto forma di anidride solforosa. Generalmente il 95% dello zolfo nel terreno è presente in forma organica negli orizzonti superficiali. Questa forma però non è prontamente assimilabile dalle piante, che invece assimilano prontamente la forma inorganica, il solfato. Quindi lo zolfo organico è una fonte potenziale importante di questo elemento ma necessita di essere mineralizzato. Si conoscono varie forme a diverso stato di ossidazione, legate alla sostanza organica più o meno umificata. Le forme più ridotte comprendono mono-, di- e poli-solfuri, tioli e tiofeni, quelle ad uno stato medio di ossidazione comprendono sulfossidi e sulfonati, quella altamente ossidata rappresentata da esteri solfati. Questa varietà di forme di zolfo nel terreno richiedono un'elevata biodiversità del microbiota, che in effetti è in grado di immobilizzare, mineralizzare, ossidare e ridurre lo zolfo con un notevole spirito di

collaborazione di attività enzimatiche. D'altra parte, era stato Winogradsky stesso nel 1887 a scoprire che *Beggiatoa* è in grado di utilizzare l'idrogeno solforato come fonte di energia e l'anidride carbonica come fonte di carbonio e Beijerinck pochi anni dopo isolava due batteri, *Thiobacillus denitrificans* e *Thiobacillus thioparus* che sono dei potenti zolfo-ossidanti. Quando la sostanza organica ha un rapporto carbonio/zolfo maggiore di 400 prevale l'immobilizzazione, seppur temporanea, del solfato prontamente assimilabile dalle piante. Quando invece i residui organici (animali e vegetali, la biomassa microbica e i suoi metaboliti, le sostanze umificate) hanno un rapporto carbonio/zolfo inferiore a 200, prevalgono i microbi che mineralizzano. Quando il rapporto è fra 200 e 400, non si hanno cambiamenti sostanziali del solfato minerale nella soluzione circolante e le attività microbiche organicanti, nel suolo, e mineralizzanti, prevalenti in rizosfera, sono in equilibrio. E ci sono anche i solfobatteri con attività multiple, sullo zolfo e sul ferro, *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *A. thiooxidans*, capaci di ossidare il ferro e il tiosolfato. Dalla rizosfera di piante leguminose sono stati isolate varie specie di *Paracoccus* in grado di ossidare tiosolfati, tetrati, tiocianati, solfuri e zolfo elementare. Quest'ultimo può essere ossidato anche da alcune specie rizosferiche di leguminose e ceriali di *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azospirillum* e *Pseudoxanthomonas*. Ancora una volta la biodiversità funzionale, cioè l'interazione dei comportamenti collettivi dei microbi, soccorre la nutrizione delle piante.

Nell'ottica di un'agricoltura produttiva e sostenibile, i microorganismi benefici sono stati utilizzati: fin dal 1896 (i primi inoculanti a base di Rizobi sul mercato), dal 1937 alcuni batteri per la difesa delle piante (*Bacillus thuringiensis*) e durante la seconda metà del secolo scorso i funghi micorrizici arbuscolari per incrementare le rese produttive. In uno studio di meta-analisi sono stati presi in esame gli effetti della micorrizzazione del grano dal 1975 al 2013. L'incremento, basato su 333 osservazioni, varia fino a 20% per la granella, contenuto e concentrazione di fosforo della parte soprasuolo, contenuto di azoto della parte soprasuolo, di oltre il 20% per il contenuto in azoto della granella e l'indice di raccolta, di oltre il 50% per il contenuto di fosforo nella paglia. In un altro studio sugli effetti della concia del riso con Rizobi considerati per il loro potenziale di promotori della crescita della pianta, l'inoculo ha fatto aumentare significativamente, nel Delta del Nilo, le rese del grano tra 9.2 e 22.5 % rispetto alle medie produttive degli agricoltori della stessa area, usando le stesse varietà nei campi adiacenti, cioè con un aumento di 4.8 - 7.1 tonnellate per ettaro in cinque diverse annate (2003 - 2008). Oggi, nel faticoso cammino verso la l'agricoltura smart, abbiamo a disposizione altre categorie di prodotti: gli ammendanti compostati prodotti con consorzi microbici (bio-fertilizzanti) e i biostimolanti costituiti da singole specie o consorzi microbici. In Brasile sono utilizzati biofertilizzanti contenenti fosfati

minerali, zolfo elementare e *Acidithiobacillus thiooxidans* per la concimazione fosfatica di canna da zucchero, vite, melone e *Vigna unguiculata* (il comune "cow-pea"). Ripetute sperimentazioni di campo hanno dimostrato che l'uso di consorzi microbici contenenti batteri rizosferici, saprofiti, endofiti e funghi micorrizici fanno aumentare la crescita della pianta, la fruttificazione, l'efficienza dell'uso dei nutrienti, le rese per ettaro, la tolleranza ad un ampio spettro di stress abiotici.

Possiamo utilizzare anche virus, batteri, attinobatteri e microfunghi come agenti di controllo biologico delle fitopatie. Esistono quasi un centinaio di ceppi microbici registrati in Unione Europea per la protezione delle piante, e almeno tre volte tanti i prodotti formulati, registrati nei vari Paesi dell'Unione. Tutti i prodotti a base di microorganismi per la protezione delle piante, collettivamente chiamati "microbials", sono a più basso impatto ambientale rispetto ai convenzionali fitofarmaci di sintesi. La lenta progressione dell'agricoltura da tradizionale a convenzionale a smart (passando dalle varie sue forme di agricoltura biologica, biodinamica, simbiotica) si basa da un lato sulla constatazione che i mezzi di produzione convenzionali non sono più sufficienti a garantire la eco-compatibilità della gestione agronomica e dall'altro che l'innovazione tecnologica permette sempre più di conciliare gli obiettivi del mantenimento delle rese produttive con un minor impatto sulla salute umana, animale e dell'ambiente. L'evoluzione del modo di fare agricoltura ha attraversato più recentemente tappe intermedie importanti. L'agricoltura conservativa degli anni '90 si poneva come obiettivo il mantenimento della biodiversità e della sostanza organica nel terreno attraverso la diversificazione colturale, la riduzione delle lavorazioni o addirittura l'adozione delle non-lavorazioni come nel caso di pascoli e di allevamenti animali estensivi. L'agricoltura rigenerativa dell'ultimo decennio ha come obiettivo non più il mantenimento bensì l'aumento della sostanza organica e del microbiota nel terreno tenendo conto delle caratteristiche nutraceutiche degli alimenti prodotti. Vengono così recepite le crescenti evidenze scientifiche della generalizzata diminuzione della sostanza organica nei terreni più volte segnalate dalle Agenzie Internazionali, la FAO e l'Environmental European Agency, che parlano ormai chiaramente di un contenuto inferiore al 2%, ma in Italia in varie Regioni il contenuto spesso si avvicina all'1% come in Puglia nella zona del Salento dove il disseccamento rapido degli olivi ha provocato la perdita di centinaia di migliaia di piante anche secolari. Sappiamo il mantenimento della biodiversità funzionale nel terreno si può conseguire quando il contenuto in carbonio organico è superiore all'1.75% cioè quando la sostanza organica è superiore al 3.5 %. Al di sotto di questa soglia, i gruppi fisiologici che sorreggono i cicli biogeochimici non funzionano più con il sistema del "mutuo soccorso" e per conseguenza si devono aumentare gli input energetici, in primis l'apporto dei fertilizzanti. Purtroppo quest'ultimo contrasta con la sostenibilità del sistema produttivo, che si appoggia proprio sulla biodiversità

funzionale del terreno. Da qui il concetto che non si deve solo mantenere ma aumentare il contenuto di sostanza organica insieme alla biodiversità del biota terricolo. Nell'ultimo decennio la messa a punto di più potenti mezzi d'indagine, soprattutto molecolari, ha permesso di fare maggior chiarezza sulla consistenza e sul ruolo del microbiota terricolo. Attualmente sappiamo che la gestione agronomica influenza il profilo numerico e funzionale del microbiota del suolo: le comunità batteriche sono influenzate strutturalmente dalle lavorazioni del suolo (tillage), quelle fungine principalmente dalla gestione agronomica e meno dalle lavorazioni. Invece la rizosfera è influenzata dalla gestione e meno dalle lavorazioni.

I terreni forestati hanno dinamiche ovviamente diverse da quelli coltivati, nel senso che quando la sostanza organica s'accumula in superficie, i microfunghi tendono a dominare e in genere ad acidificare grazie alla produzione di acido citrico, che porta il ferro in profondità e di acido ossalico che salifica il calcio. Le reti miceliari prevalgono, le sostanze umiche restano negli strati superficiali e la biodiversità si riduce per il microbioma procariotico a favore del bioma eucariotico: Oligocheti, Isopodi, Collemboli, Nematodi, seguiti dai Protozoi, Rotiferi, Nematodi, dai micofagi, ficofagi, fitofagi ed infine dai predatori. La deforestazione provoca dei guasti ecologici immediati con la stimolazione dei batteri denitrificanti e la conseguente perdita dell'azoto sotto forma di composti volatili. Si depauperano i depositi di carbonio e la ricostituzione di sostanza organica sufficiente a mantenere la biodiversità funzionale può richiedere da parecchi anni a parecchi decenni.

L'estrema flessibilità metabolica collettiva e la capacità di adattamento dei microbi possono soccombere quando la gestione agronomica diventa aggressiva con forti inputs di fertilizzanti e pesticidi, lavorazioni profonde, intensivizzazione delle colture sia erbacee che arboree in presenza di ridotte quantità di sostanza organica a lenta degradazione. Il microbioma del terreno entra in stress e disbiosi e la biodiversità funzionale non funziona più. Può succedere allora che si debba ricorrere alla concimazione azotata delle leguminose: un vero e proprio controsenso ecologico considerando che negli ultimi 12.000 anni questo non è mai stato necessario! Se consideriamo i cicli biogeochimici, il rapporto carbonio/azoto/zolfo nei suoli indisturbati risulta più elevato rispetto a quelli gestiti con agricoltura convenzionale e dopo ripetuti cicli di coltivazione lo zolfo diventa meno mineralizzabile. All'opposto, con una gestione agronomica conservativa, come minime o senza lavorazioni e con rotazioni colturali, si ha un aumento della sostanza organica, minor perdite di nutrienti e mineralizzazione dello zolfo per azione delle solfatasi degli onnipresenti eterotrofi *Pseudomonas* e dei mixotrofi *Paracoccus*.

La moderna agricoltura nasce dal millenario esercizio di domesticazione delle piante, che ha comportato tra l'altro la dislocazione dai loro centri di origine biologica: vedasi

il mais, la patata, il pomodoro, i legumi, i cereali, gli pseudo-cereali e molte altre colture. In questo storico percorso abbiamo purtroppo perso per strada quello che le piante avevano sempre avuto, cioè il rapporto stretto con il loro microbioma simbiotico. Così il miglioramento genetico vegetale, in particolare durante il secolo scorso, ha perso l'occasione di sottoporre a selezione non solo la parte soprasuolo ma anche, congiuntamente, quella rizosferica. Molte piante coltivate infatti interagiscono in maniera diversa, rispetto ai loro progenitori, con il loro benefici partner microbici. Lo stravolgimento dei tratti genetico-fisiologici che regolano le simbiosi può essere dovuto all'accumulo di mutazioni deleterie nella pianta, o favorito direttamente o indirettamente dalla selezione operata dall'uomo, od essere selettivamente neutro in condizioni di coltivazione. La riduzione dei tratti simbiotici avvenuta durante la domesticazione o dovuta ad una errata impostazione della selezione genetica comporta il mancato o scarso riconoscimento dei partners microbici da parte delle radici, quasi non siano più in grado di intavolare la conversazione che nei millenni ha portato alla simbiosi. Ed oggi dobbiamo correre ai ripari, cambiando i paradigmi della selezione genetica e tenendo conto dei tratti genetici favorevoli alla formazione delle simbiosi e al loro funzionamento. In attesa che queste nuove sementi o piante siano disponibili, possiamo cominciare dal selezionare gli abbinamenti naturali più efficaci tra genotipo di pianta coltivata e genotipo di microorganismi da utilizzare come inoculo in campo.

In agricoltura, tranne la contaminazione da derivati del petrolio, la fonte principale di rischio ambientale e per la salute umana è data dalla struttura chimica, applicazione e conservazione non corretta dei pesticidi chimici. Le classi principali di pesticidi organici comprendono gli organo-fosfati, gli organo-metallici, gli organo-cloruri, i piretroidi e i carbammati. I soli depositi di materiale obsoleto sparsi per il mondo sono stimati intorno al mezzo milione di tonnellate e le persone intossicate per l'uso di questi prodotti sono stimate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità intorno ai tre milioni all'anno. Proprio per queste ragioni dal 2005 è in atto, sia in Unione Europea che in altri Paesi dell'area occidentale, una profonda revisione dei criteri di autorizzazione alla commercializzazione con limiti massimi di residui più stringenti, una valutazione severa degli effetti sugli organismi non-target e del destino ambientale; spesso si verifica una drastica limitazione del numero e tipologia dei prodotti in commercio. Come possono aiutare i microbi nella decontaminazione del terreno e delle falde acquifere? La biodegradazione microbica degli xenobiotici inclusi i pesticidi, viene detta anche "bioremediation" ed è un metodo ormai consolidato di rimozione degli inquinanti dall'ambiente. Sono stati usati varie specie di *Sphingomonas*, *Burkholderia* e *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Acinetobacter* e *Moraxella*. La biodegradazione completa non può essere operata o completata da un singolo microorganismo ma piuttosto da consorzi microbici, come abbiamo visto per la degradazione delle lignine, e porta alla

produzione di anidride carbonica e acqua, fornendo al contempo energia per i microbi degradatori. Però un processo di ossidazione incompleta spesso porta a composti meno tossici rispetto al pesticida di partenza. Questo è stato il caso dell'endosulfan che viene biodegradato ad endosulfan-diolo, endosulfan-lattone ed endosulfan-etere. Per i terreni che non hanno o non hanno più biodiversità sufficiente del microbioma per operare le varie biodegradazioni si consiglia spesso di aggiungere starters di consorzi microbici, stante la complessità dei metaboliti intermedi e la recalcitranza della molecola iniziale. La rimozione per via biodegradativa dei pesticidi porta effetti benefici sullo stato di fertilità del terreno. Riguardo alle capacità biodegradative, è bene ricordare che non esiste composto naturale sulla Terra, dalla roccia ai depositi di zolfo, che non possa essere trasformato nel tempo dai microorganismi. Non avviene altrettanto per i composti di sintesi, magari prodotti proprio per essere persistenti nell'ambiente.

Concludendo questo breve excursus sulla società dei microbi, possiamo affermare che la "Nazione delle Piante", egregiamente descritta da Stefano Mancuso, trova negli invisibili del terreno degli alleati indispensabili per una crescita sana e vigorosa e per la produzione di alimenti con maggior valore nutraceutico, sia nelle colture erbacee che arboree, e che al mondo microbico possiamo affidare la qualità dell'ambiente nel quale viviamo.

Bibliografia consigliata per consultazione

Andrews M and Andrews ME (2017) Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 705

Bailly A. and Weissskopf L (2012) The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth. *Plant Signaling & Behavior* 7, 1.

Bassler B.L. and Losick R. (2006) Bacterially Speaking. *Cell* 125, 237.

Brameyer S. et al. (2015) Languages and dialects: bacterial communication beyond homoserine lactones. *Trends in Microbiology* 23, 521.

Burokas A. et al. (2017) Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. *Biol Psychiatry* 82, 472-487.

Faduma H., Nuti M.P., Kuneman K., Lepidi A.A (1978) Uso e selezione di rizobi per la batterizzazione di leguminose di nuova introduzione in Somalia. *Agricoltura Subtropicale e Tropicale* 72, 291.

FAO, Food and Agriculture Organization (2020) *Global Forest Resources Assessment- Key findings*. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca8753en>

Garbeva P. et al. (2015) Volatile-mediated interactions between phylogenetically different soil bacteria.. *Frontiers in Microbiology* 5, 289.

Hacquard S. et al. (2015) Microbiota and Host Nutrition across Plant and Animal Kingdoms. *Cell Host & Microbe* 17, 603.

Hartman K. et al. (2018) Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. *Microbiome* 6,14. DOI 10.1186/s40168-017-0389-9

Lennon Á.M. et al. (2006) The Ability of Selected Oral Microorganisms to Emit Red Fluorescence. *Caries Res.* 40, 2.

Matsushashi M. (1998) Production of sound waves by bacterial cells and the response of bacterial cells to sound. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44, 49.

Miller M.B., Bassler B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 55, 165.

Oldroyd G.E.D. (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Rev. Microbiol.* 11, 252.

Reguera G. (2011) When microbial conversations get physical. *Trends in Microbiol.* 19, 105.

Sablok G. et al (2017) Draft genome sequence of the nitrogen-fixing *Rhizobium sulae* type strain IS123T focusing on the key genes for symbiosis with its host *Hedysarum coronarium* L. *Frontiers in Microbiology* 8, article 1348.

Schmidt R. et al. (2016) Microbial Small Talk: Volatiles in Fungal-Bacterial Interactions. *Frontiers in Microbiology* 6, 1495.

Schmidt R. et al. (2017) Fungal volatile compounds induce production of the secondary metabolite Sodorifen in *Serratia plymuthica* PRI-2C. *Scientific Reports* 7, 862.

Sender R., Fuchs S., Milo R. (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacterial Cells in the Body. *PLoS Biol.*19;14(8):e1002533. doi:10.1371

Toju H. et al. (2018) Core microbiome for sustainable agroecosystems. *Nature Plants* 4, 247.

Trushin M.V. (2004) Light-mediated "conversation" among microorganisms. *Microbiol. Res.* 159, 1.

Verona O. (1972) *Opere di Luigi Pasteur. In "I Classici della Scienza" UTET Torino.*

Weisskopf L. et al. (2016) Editorial: Smelly Fumes, Volatile Mediated Communication between Bacteria and Other Organisms. *Frontiers in Microbiology* 7, 2031.

www.isqaper-project.eu (2016-2020) Interactive Soil Quality Assessment for Agricultural Productivity and Environmental Resilience.

Werner S. et al. (2016) Belowground communication: impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100, 8651.