

Dipartimento di Ingegneria Civile, Architettura,  
Territorio, Ambiente e di Matematica

Corso di Laurea Triennale in  
SISTEMI AGRICOLI SOSTENIBILI



# **Coltivazione di *Pleurotus ostreatus* in economia circolare: produzione di *spawn***

Relatrice:

Chiar.ma Prof.ssa Emanuela Gobbi

Correlatrice:

Dott.ssa Daniela Bulgari

Laureanda:

Chiara Di Giovambattista

Matricola 728136

Anno Accademico 2021-2022

Alla zia Paola,  
accanto a me nello studio  
anche nei momenti più difficili.

# Indice

1	INTRODUZIONE.....	1
1.1	L’Economia Circolare.....	2
1.1.1	L’Economia Circolare in Agricoltura .....	2
1.1.2	Agricoltura Sostenibile e Agricoltura Rigenerativa .....	3
1.2	La Coltivazione di Funghi .....	6
1.2.1	Il Regno dei Funghi.....	6
1.2.2	I funghi e <i>Homo sapiens</i> .....	7
1.2.3	I funghi commestibili: mercato globale, europeo ed italiano.....	8
1.2.4	<i>Mycoagroecology</i> e contesto locale .....	11
1.2.5	<i>Pleurotus ostreatus</i> .....	12
1.2.6	La coltivazione di <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	14
1.2.6.1	<i>Solid-State Fermentation</i> .....	16
1.2.6.2	<i>Solid-State Fermentation</i> applicata alla coltivazione di <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	17
1.2.6.3	La <i>Spawn</i> .....	18
2	SCOPO DELLA TESI.....	19
3	MATERIALI E METODI .....	20
1.1	Microrganismo utilizzato .....	20
1.2	Tecniche colturali.....	20
1.2.1	Isolamento, mantenimento in coltura e collezione dei ceppi .....	20
1.3	Produzione di <i>spawn</i> .....	21
1.3.1	Substrati e procedura di idratazione.....	21
1.3.1.1	Miglio Bianco (MB) .....	21
1.3.1.2	Cippato di Carpino (CC) e Cippato di Orniello (CO).....	22
1.3.1.3	Ammendante Vegetale Semplice Non Compostato (AVSNC).....	23
1.3.1.4	Substrato Aziendale Iside per <i>Spawn</i> (SAIS) .....	24
1.3.1.5	Segatura, Crusca e Frutta Non Commercializzabile (SCFNC).....	25
1.3.2	Inoculo .....	26
1.3.2.1	Omogenato di coltura fungina solida.....	26
1.3.2.2	Tasselli di coltura fungina solida .....	27
1.3.2.3	Coltura fungina liquida .....	27
1.3.3	Procedura .....	28
1.3.4	Metodologia di valutazione.....	28
1.3.4.1	Valutazione visiva della crescita fungina .....	28
1.3.4.2	Valutazione dell’idoneità della <i>spawn</i> a fini produttivi .....	30
4	RISULTATI .....	34
4.1	Substrati.....	34
4.1.1	Preparazione: idratazione e sterilizzazione.....	34
4.1.2	Valutazione visiva della crescita fungina .....	34
4.2	Inoculo .....	37
4.2.1	Valutazione visiva della crescita fungina .....	37

4.3	Idoneità della <i>spawn</i> a fini produttivi .....	41
4.3.1	Colonizzazione del substrato .....	43
4.3.2	Produzione di corpi fruttiferi .....	45
4.3.3	Analisi sensoriale organolettica .....	47
5	DISCUSSIONE .....	49
6	CONCLUSIONI .....	53
	BIBLIOGRAFIA .....	54
	SITOGRAFIA .....	57
	ELENCO DELLE TABELLE .....	58
	ELENCO DELLE FIGURE .....	59
	ACRONIMI .....	61
	RINGRAZIAMENTI .....	62

# 1 INTRODUZIONE

*Il problema è la soluzione. Tutto funziona in entrambi i versi. È il nostro modo di vedere le cose a renderle vantaggiose o meno.* Bill Mollison [1]

*Il metabolismo è l'arte della trasformazione chimica e i funghi sono maghi del metabolismo.*

Merlin Sheldrake [2]

Ogni anno circa 11,2 miliardi di tonnellate di rifiuti solidi vengono raccolte nel mondo [3]. Essi sono materiali indesiderati generati da diverse attività umane ed includono rifiuti solidi urbani, rifiuti commerciali, rifiuti industriali, rifiuti elettronici, rifiuti farmaceutici e rifiuti agricoli [4]. Secondo l'ultimo rapporto *What a Waste 2.0* della *World Bank*, la quantità di rifiuti prodotta nel mondo non solo è in continuo aumento, ma ha un tasso di incremento superiore al doppio di quello della popolazione globale [5]. Una tale massa di rifiuti impone una seria presa di coscienza e una ricerca di nuove soluzioni per risolvere il problema. Una gestione inefficiente dei rifiuti può infatti portare alla contaminazione dell'aria, del suolo e dell'acqua, causando seri problemi agli ecosistemi e alla salute umana [3]. Per far fronte a questa e a molte altre problematiche mondiali, nel 2015 193 Stati membri delle Nazioni Unite hanno deciso di adottare 17 Obiettivi di Sviluppo Sostenibile (*Sustainable Development Goals, SDGs*) come guida alla propria agenda politica [6]. Lo sviluppo sostenibile prevede la capacità degli esseri umani di soddisfare i propri bisogni presenti senza compromettere quelli delle generazioni future e integra principi di sostenibilità ambientale, economica e sociale [7]. I 17 SDGs sono una chiamata urgente all'azione di tutti i Paesi, sviluppati e in via di sviluppo, in una collaborazione globale che possa portare alla pace e alla prosperità delle persone e del pianeta, oggi e in futuro. Essi hanno infatti la finalità di scongiurare ciò che è successo il 28 luglio 2022, quando gli esseri umani avevano già terminato le risorse biologiche che la Terra era in grado di rigenerare durante l'intero anno [8], dimostrando come la strada verso uno sviluppo sostenibile sia ancora lunga da percorrere. Gli SDGs mirano, quindi, ad affrontare un'ampia gamma di questioni relative allo sviluppo economico e sociale, che includono la povertà, la fame, il diritto alla salute e all'istruzione, l'accesso all'acqua e all'energia, il lavoro, la crescita economica inclusiva e sostenibile, il cambiamento climatico e la tutela dell'ambiente, l'urbanizzazione, i modelli di produzione e consumo, l'uguaglianza sociale e di genere, la giustizia e la pace [6]. In particolare, con il dodicesimo Obiettivo di Sviluppo Sostenibile, le Nazioni Unite aspirano a cambiare il modello attuale di produzione e di consumo di beni e servizi per ottenere una gestione efficiente delle risorse naturali [9], limitando lo spreco e la produzione di rifiuti, con la finalità di garantire il benessere della popolazione attraverso l'accesso all'acqua, all'energia e agli alimenti. Secondo il Programma delle Nazioni Unite per l'Ambiente (*United Nations Environment Program, UNEP*), la soluzione più efficace per gestire il problema dell'enorme quantità di rifiuti prodotta ogni anno sul pianeta Terra è quella di eliminare alla radice la produzione dei rifiuti. Quando ciò non è possibile, il recupero di materiali ed energia dagli scarti, la rilavorazione e il riciclo dei rifiuti in prodotti utilizzabili sono la seconda opzione, poiché il riciclo porta ad un sostanziale risparmio di risorse [3]. In questo contesto il concetto di sviluppo sostenibile si intreccia con quello di economia circolare.

## 1.1 L'Economia Circolare

L'economia circolare (*Circular Economy*, CE) è definita come un sistema economico composto da circuiti chiusi in cui le materie prime, le componenti e i prodotti mantengono la loro qualità e il loro valore nel tempo il più a lungo possibile e in cui i sistemi sono alimentati da energia rinnovabile [10]. Questo modello di produzione e consumo prevede la condivisione, il noleggio, il riuso, la riparazione, la ristrutturazione e il riciclo dei prodotti e dei materiali esistenti [11] e la riduzione al minimo dei rifiuti [12], offrendo un'alternativa migliore all'attuale modello di sviluppo lineare *take, do and dispose of* (prendi, produci, consuma e getta). I vantaggi dei sistemi progettati in economia circolare sono attribuibili alla riduzione dell'impatto ambientale attraverso la minimizzazione dei rifiuti, all'incremento di benefici economici, al re-design dei prodotti, alla scelta dei materiali, alla riduzione della fluttuazione del prezzo e alla crescita del lavoro.

Oggi è possibile definire l'8,6% dell'economia mondiale come circolare [13].

L'applicazione dei principi dell'economia circolare risulta particolarmente interessante nel settore dei rifiuti solidi organici. Essi sono rifiuti composti prevalentemente da scarti di origine animale, agricola, urbana e forestale e sono generalmente ricchi di sostanze nutritive, come proteine, minerali e zuccheri, che possono diventare la materia prima per un nuovo processo produttivo [14]. L'economia circolare può così aiutare a chiudere il cerchio e a risolvere lo squilibrio creato dall'economia lineare nel ciclo della biosfera. In economia lineare, infatti, la sostanza organica rimossa dall'ambiente, normalmente dalle aree rurali, viene consumata nelle città e non ritorna più alla terra che l'ha prodotta, causando il deterioramento della qualità del suolo e un enorme problema di gestione dei rifiuti. Grazie alla massimizzazione di vita dei materiali e alla minimizzazione degli impatti ambientali negativi, l'economia circolare può quindi essere una valida soluzione [15]: i rifiuti solidi organici, attraverso l'utilizzo di diverse tecnologie, possono essere convertiti in biocarburanti, sostanze chimiche, energia, cibo e altri prodotti di origine organica [4].

### 1.1.1 L'Economia Circolare in Agricoltura

L'economia circolare può essere adottata all'interno di diversi processi produttivi come modello alternativo e di riduzione e trasformazione dei rifiuti, in particolare nel settore agro-alimentare. Per farlo occorre tenere presente tre principi fondamentali: la sostenibilità economica, sociale e ambientale sul lungo periodo, i sistemi rigenerativi che rendono possibile la chiusura dei cicli dei nutrienti e minimizzano le perdite, e l'uso efficiente delle risorse e l'ottimizzazione dei processi per ridurre l'uso delle risorse stesse e prevenire la produzione di rifiuti. Tenendo conto di questi tre presupposti, Velasco-Muñoz e colleghi definiscono l'economia circolare in agricoltura come un set di attività progettate non solo per assicurare la sostenibilità economica, sociale ed ambientale attraverso pratiche che perseguono un efficiente ed efficace uso delle risorse in tutte le fasi della catena del valore, ma un insieme di azioni che possono garantire la rigenerazione e la biodiversità degli agro-ecosistemi e degli ecosistemi che li circondano [16].

I tre principi che guidano il design in economia circolare sono la progettazione senza rifiuti ed inquinamento, il mantenimento dei prodotti e dei materiali in uso e la rigenerazione dei sistemi naturali. Il perseguimento del primo principio in agricoltura prevede l'eliminazione delle esternalità negative generate dal processo di produzione, come l'inquinamento e il degrado del suolo e dell'acqua. Il secondo prevede, invece, che il valore dei prodotti, dei coprodotti e dei sottoprodotti venga massimizzato in ogni fase della catena del settore agroalimentare, mentre il terzo principio si

basa sulla promozione della conservazione e del miglioramento dei sistemi naturali grazie all'uso di risorse rinnovabili [17].

Attuare modelli circolari nel settore agricolo comprendere una serie di sfide, come le limitazioni normative, il bisogno di ottimizzare le catene logistiche inverse, la dispersione geografica delle imprese, i confini del sistema e la perdita di materiali, l'ignoranza e la mancanza di accettazione da parte dei consumatori, le limitazioni tecnologiche e la mancanza di certezze e incentivi rispetto agli investimenti [17].

### *1.1.2 Agricoltura Sostenibile e Agricoltura Rigenerativa*

L'obiettivo che accomuna le aziende che hanno deciso di affrontare queste ed altre sfide è quello di poter produrre cibo in maniera sostenibile. Come riportato nell'Obiettivo di Sviluppo Sostenibile 2.4, secondo le Nazioni Unite per essere sostenibile l'agricoltura deve incontrare i bisogni delle generazioni presenti e future, garantendo reddito, salute ambientale ed equità economica e sociale. L'agricoltura sostenibile deve quindi contemporaneamente puntare ad un aumento della produttività, del lavoro e del valore aggiunto nei sistemi alimentari, deve proteggere e potenziare le risorse naturali, deve incrementare il sostentamento e promuovere una crescita economica inclusiva, deve potenziare la resilienza delle persone, delle comunità e degli ecosistemi e dovrebbe essere supportata dagli organi di governo [18].

Nonostante il concetto di agricoltura sostenibile sia largamente accettato grazie alla definizione di principi globali, come riuscire a metterli in pratica è invece molto vago [19]. C'è un grande dibattito attorno a quali siano le pratiche di produzione agricola più appropriate per raggiungere l'obiettivo di una produzione alimentare sostenibile: il ventaglio di opzioni va dalle pratiche basate sullo sviluppo di un'avanzata tecnologia a quelle basate su principi ecologici. Da un lato, l'agricoltura di precisione o l'uso di colture geneticamente modificate potrebbero aiutare a soddisfare la domanda alimentare futura, dall'altro, pratiche come il controllo biologico dei patogeni, l'integrazione di elementi di paesaggi naturali nel panorama agricolo con lo scopo di diminuire l'uso di pesticidi, e la riduzione o eliminazione della pratica dell'aratura, possono essere altre opzioni [20]. Data l'assenza di chiarezza sul contenuto pratico dell'agricoltura sostenibile, l'agricoltura rigenerativa offre una risposta concreta al concetto di sostenibilità in agricoltura. Variamente identificato con i termini di agroecologica, agricoltura biologica, agricoltura conservativa, permacultura, *holistic management* e *carbon farming*, il concetto contenitore di "agricoltura rigenerativa" focalizza la sua attenzione sul potenziamento e risanamento dei sistemi resilienti, rigenerativi e olistici, supportati da processi ecosistemici funzionali e suoli organici in salute capaci di produrre una serie di servizi ecosistemici, come per esempio il sequestro di carbonio o una maggiore ritenzione idrica [21]. In quest'ottica i principi dell'economia circolare sono connessi ad un approccio sistemico di gestione dei paesaggi e delle comunità più ampio.

Il movimento dell'agricoltura rigenerativa nasce negli anni '80 e solo recentemente si è trasformato in una sorta di "rivoluzione del suolo" grazie all'aumento di consumatori e produttori che supportano prodotti provenienti dall'agricoltura rigenerativa e rispondono ad emergenti nicchie di mercato e a schemi di certificazione [21]. Il termine "agricoltura rigenerativa" è stato coniato originariamente da Robert Rodale negli Stati Uniti quando, come reazione alla crisi agricola statunitense degli anni '70-'80, ha sviluppato una serie di pratiche agricole che puntassero al rinnovo delle risorse interne aziendali piuttosto che al costante uso di input sintetici. Allo stesso tempo però, le origini delle pratiche di agricoltura rigenerativa sono ben più antiche e collegate ai sistemi agricoli altamente

integrati con l'ecologia dei popoli indigeni che li hanno sviluppati e gestiti in tutto il mondo, come per esempio in Sud e Nord America o in Australia. Molti elementi dell'agricoltura rigenerativa, come la policoltura, i cicli di rigenerazione del suolo, il non-disturbo del suolo, hanno infatti grandi affinità con i sistemi indigeni [22]. Le pratiche agricole che caratterizzano l'agricoltura rigenerativa influenzano i processi ecosistemici aumentando la sostanza organica e la biodiversità del suolo con il duplice scopo di favorire la crescita del raccolto senza utilizzare sostanze di sintesi e incrementare la capacità idrica del suolo per ridurre la vulnerabilità a periodi siccitosi o ad alluvioni. La gestione del carbonio organico del suolo è uno degli obiettivi principali ed è realizzato grazie a numerose tecniche, come la riduzione o l'eliminazione dell'aratura, l'utilizzo di compost, la semina di colture di copertura per ridurre la terra nuda e la diversificazione delle colture per ridurre la vulnerabilità ai patogeni. Gli agricoltori che aderiscono a tali principi riducono od eliminano l'uso di input chimici come fertilizzanti sintetici, erbicidi e pesticidi e, coloro che possiedono animali, usano il pascolo in maniera strategica per aumentare la biodiversità, il contenuto di umidità, la fertilità, e il carbonio del suolo grazie a frequenti spostamenti degli animali [21].

Montgomery nota che gli agricoltori che praticano l'agricoltura rigenerativa considerano il suolo in una maniera differente, ossia come un sistema biologico vivo piuttosto che come un serbatoio chimico e, quindi, lavorano per supportare la vita sotterranea anziché uccidere e rimpiazzare, promuovendo le simbiosi sotterranee tra piante e funghi micorrizici. Essi hanno un modo di pensare diverso anche riguardo all'acqua: la siccità non dipende da quanto piove, ma anche da cosa c'è nel suolo e dalla sua capacità di trattenere l'acqua [21]. Anziché dipendere dalle precipitazioni, gli agricoltori gestiscono il paesaggio e i processi del suolo in maniera proattiva, migliorando la disponibilità e l'immagazzinamento di acqua, per esempio con la sistemazione idraulica in *keyline* [23].

Nei sistemi rigenerativi gli agricoltori danno un valore agli animali non solo per il cibo e le fibre che producono, ma, primariamente, per il loro ruolo nella costruzione del suolo. Inoltre, le razze del bestiame sono scelte per la loro compatibilità con l'ambiente locale e per riuscire a migliorare l'utilizzo del foraggio grazie a gradienti altitudinali e ad eterogeneità spaziali [21].

Per quanto riguarda la coltivazione di funghi secondo i principi dell'agricoltura rigenerativa, Elizabeth Gall e Noureddine Benkeblia integrano i concetti di agroecologia, economia circolare e coltivazione di funghi, raccogliendo i risultati di diversi campi di sperimentazione, come quelli relativi alle tecniche di coltivazione di funghi, all'utilizzo di rifiuti solidi organici, al riutilizzo degli scarti di produzione della coltivazione stessa di funghi, ecc. e organizzandoli in una visione olistica di gestione dell'agroecosistema. Viene valorizzato il ruolo dei funghi in diversi contesti agricoli: dalla lotta biologica contro agenti patogeni alle interazioni simbiotiche con le piante che aumentano la salute e la produzione dell'agroecosistema, dalla gestione degli scarti di produzione alla coltivazione di funghi commestibili, dimostrando come l'uso integrato dei microrganismi appartenenti a questo Regno sia imprescindibile ad una gestione sostenibile del territorio [24].

In Figura 1 viene mostrato un modello di coltivazione di funghi in economia circolare.



## 1.2 La Coltivazione di Funghi

La coltivazione di funghi alimentari è un processo biotecnologico che ricicla i rifiuti organici lignocellulosici e, ad oggi, potrebbe essere l'unico metodo che riesce ad unire la produzione di cibo ricco in proteine e la diminuzione di inquinamento ambientale [26]. Poppe riporta che ci sono almeno 200 tipi di rifiuti su cui è possibile produrre funghi edibili [26]. La tipologia di rifiuto organico su cui far crescere i funghi dipende dalle esigenze nutrizionali del fungo stesso e, in un'ottica di economia circolare, gli scarti della produzione di un fungo (*Spent Mushroom Substrate*, SMS) possono essere utilizzati per la produzione di un altro fungo che riesca a beneficiare del lavoro di decomposizione del primo [25]. Per comprendere questo fenomeno è necessario andare prima ad analizzare la biologia dei funghi stessi.

### 1.2.1 Il Regno dei Funghi

I funghi, o miceti, appartengono a un Regno composto da organismi eucarioti, unicellulari e pluricellulari, che comprende tra le 45.000 e le 300.000 specie conosciute [27], e che si stima possa contenere tra i 2.2 e i 13.2 milioni di specie esistenti [28].

Inizialmente classificati da Linneo nel *Regnum Plantarum*, solo nel 1959 i funghi sono stati elevati a Regno a sé stante grazie al lavoro e alla proposta del biologo Robert Whittaker [29], formalizzata secondo le regole della nomenclatura micologica solo nel 1980 da Moore [30]. I funghi hanno una distribuzione ubiquitaria e sono in grado di adattarsi agli ambienti più differenti grazie alle loro svariate capacità metaboliche. Caratterizzati da un'alimentazione eterotrofa, i funghi, non essendo in grado di fissare il carbonio come le piante mediante fotosintesi e non potendo ingerire cibo come gli animali, secernono appositi acidi ed enzimi per decomporre il substrato su cui crescono e poter così assorbire i nutrienti tramite il proprio micelio. Grazie a questa capacità, i funghi hanno un ruolo fondamentale all'interno degli ecosistemi poiché decompongono la materia organica e consentono il corretto funzionamento dei cicli biogeochimici. A seconda della tipologia di rapporto che il fungo ha col proprio substrato di crescita è possibile suddividere i funghi in saprotrofi, parassiti e simbiotici, alcuni facoltativi, quando possono attivare comportamenti differenti, altri invece obbligati. Mentre i funghi parassiti si nutrono di organismi viventi, portandoli a volte gradatamente verso la morte, i funghi simbiotici innescono un rapporto mutualistico con l'ospite, traendone un vantaggio reciproco. I funghi saprotrofi invece degradano le sostanze non viventi di origine animale e vegetale in composti meno complessi e, a seconda della tipologia di sostanze che decompongono, possono suddividersi in saprotrofi decompositori primari, secondari e terziari. I decompositori primari, come il *Pleurotus ostreatus*, degradano la cellulosa, l'emicellulosa e la lignina, i decompositori secondari, come *Agaricus bisporus*, colonizzano materiali già compostati e i decompositori terziari si trovano generalmente nel suolo. Le tre categorie di decompositori rappresentano un *continuum* nella transizione metabolica dai composti più complessi, come quelli lignocellulosici, a quelli più biodisponibili e assorbibili da diversi organismi viventi. La maggior parte dei funghi coltivati rientra nella categoria di funghi saprotrofi e, grazie ad un'attenta pianificazione, è possibile compostare completamente i rifiuti solidi organici attraverso la successione di coltivazione di funghi di diversi stadi del *continuum* di decomposizione [25].

Le sostanze nutritive che i funghi riescono ad assorbire possono essere successivamente conservate in polisaccaridi di riserva come il mannitolo e il trealosio oppure, analogamente agli animali, il glicogeno, diversamente dai vegetali che utilizzano l'amido.

Per quanto riguarda la cellula fungina, essa si differenzia dalle altre cellule eucariote per le componenti della propria membrana cellulare e della parete cellulare: l'ergosterolo è infatti lo sterolo primario della membrana cellulare mentre la parete cellulare è costituita da differenti glucani ( $\beta$ -glucani prevalentemente non cellulostici) e da un altro polisaccaride, la chitina, polimero presente anche nell'esoscheletro degli artropodi.

L'accrescimento cellulare di un fungo dipende dalla tipologia del microrganismo stesso: il Regno dei funghi è infatti composto da individui estremamente differenti tra loro. I lieviti sono funghi unicellulari di forma sferica od ellissoidale, si riproducono per via sessuata o asessuata e vivono generalmente in colonie. I funghi pluricellulari, al contrario, formano delle lunghe catene di cellule unite alle estremità e divise da pareti chiamate setti, che raramente formano una barriera completa. Queste lunghe catene vengono chiamate "ife" e possono essere strutture tubolari continue o ramificate contenenti il citoplasma e molteplici nuclei, che possono così fluire liberamente. Una massa di ife interconnesse è definita "micelio" e costituisce un sistema che può, complessivamente, estendersi per molti metri<sup>2</sup>, se non addirittura km<sup>2</sup> [31].

Per le caratteristiche filogenetiche, strutturali, molecolari e riproduttive, il Regno dei funghi può essere distinto in cinque *phyla*: *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*.

### 1.2.2 I funghi e *Homo sapiens*

La relazione tra *Homo sapiens* e *Regnum Fungi* è antica quanto la comparsa sulla Terra della specie umana. I funghi sono parte integrante del nostro microbiota e sono imprescindibili alla nostra sopravvivenza. Da migliaia di anni l'uomo sfrutta per i suoi bisogni le numerose caratteristiche che i microrganismi di questo Regno posseggono e la recente scoperta dell' "Uomo venuto dal ghiaccio", Ötzi, ne è un esempio. Infatti, tra gli oggetti che componevano il suo equipaggiamento, sono stati ritrovati dei frammenti di due specie fungine: *Piptoporus betulinus*, utilizzato ancora oggi per le sue proprietà anticancerogene, antinfiammatorie e antimicrobiche [32] e *Fomes fomentarius*, utilizzato come esca per innescare il fuoco, ma anche come materiale tessile e medicinale [33]. A 5300 anni di distanza [34], l'uomo non ha smesso di servirsi delle potenzialità di questo Regno per soddisfare i propri bisogni. I funghi vengono attualmente utilizzati in campo medico contro diverse tipologie di malattie: viene sfruttata la loro capacità di produrre sostanze ad attività antibiotica, antimicotica, antivirale, anticancerogena e antidiabetica, possono essere utilizzati come biofilms inibitori, immunosoppressori, immunomodulatori, sono promotori delle funzionalità nervose e sono utili per la cura di malattie cardiovascolari. I microrganismi appartenenti a questo Regno possono anche essere impiegati in agricoltura come biofertilizzanti, mitigatori degli stress abiotici oppure per il biocontrollo di problematiche causate da insetti, nematodi e microrganismi, per il biocontrollo di piante infestanti e per il controllo di malattie in fase di post-raccolta. I funghi sono anche utilizzati nel campo delle bonifiche e della degradazione di sostanze tossiche, come la plastica o gli idrocarburi policiclici aromatici. Con i funghi è anche possibile produrre materiali da costruzione, tessuti e cosmetici. E infine, il settore produttivo più conosciuto e in cui si inserisce questa tesi di ricerca, è quello alimentare, che ha accompagnato da sempre la storia dell'uomo grazie a cibi di alto valore nutritivo e nutraceutico [35].

### 1.2.3 I funghi commestibili: mercato globale, europeo ed italiano

All'interno del Regno dei funghi, circa 3000 specie possono essere considerate edibili, ma solo 200 sono state coltivate sperimentalmente. Di queste, 60 sono coltivate a livello commerciale per il settore alimentare o medico e circa 30 di esse sono state selezionate come specie ideali per la produzione industriale, grazie alla loro commestibilità, alle loro caratteristiche organolettiche alla loro facilità di coltivazione e conservazione [36]. Attualmente, a livello mondiale, le specie edibili ricoprono il ruolo principale nell'industria dei funghi (54%), seguite da quelle di funghi medicinali (38%) e da quelle selvatiche (8%). Il mercato globale della produzione di funghi per il consumo umano è dominato da 5 generi principali, che insieme rappresentano l'85% dell'offerta globale. La specie più coltivata è *Agaricus bisporus* (38%), seguita dai *Pleurotus* che, con 6 differenti specie, raggiunge il 25%. In terza posizione si trova la coltivazione di *Lentinula edodes* (10%), in quarta e quinta alcune specie dei generi *Auricularia* (6%) e *Flammulina* (5%) [37].

Il maggior produttore e consumatore di funghi è la Cina, con una produzione di circa 5 milioni di tonnellate annue, corrispondente al 75% dell'intera produzione mondiale e destinata sia al mercato interno che a quello estero (Figura 2). L'Europa è il secondo più grande produttore (14,72%), seguita dagli USA (4,63%), dove il mercato dei funghi si sta gradualmente espandendo grazie a una crescente consapevolezza sugli stili di vita nutrizionali salutari. Riguardo al consumo di funghi, in Cina, Europa e USA è stato registrato il più alto livello, ma livelli considerevoli sono stati riportati anche in Canada, Giappone, Russia, Australia ed India. Il veloce ed esponenziale sviluppo dell'industria dei funghi in tutto il mondo negli ultimi 30 anni ha portato ad una straordinaria crescita nella produzione di funghi, che si è tradotta in un consumo medio pro capite di 5 Kg annui (2017), rispetto a 1 Kg del 1997. Ci si aspetta che questo dato continui a crescere nei prossimi anni, grazie alla crescente consapevolezza riguardo all'importanza di un'alimentazione salutare e dei benefici che i funghi possono apportare all'organismo [37].

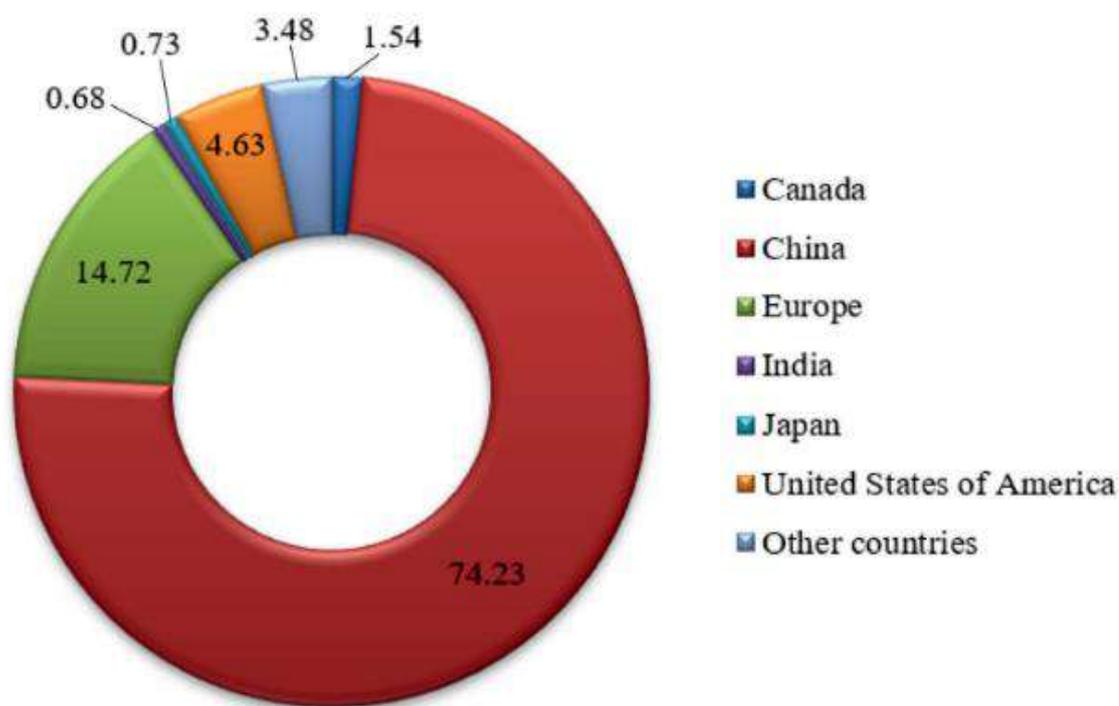
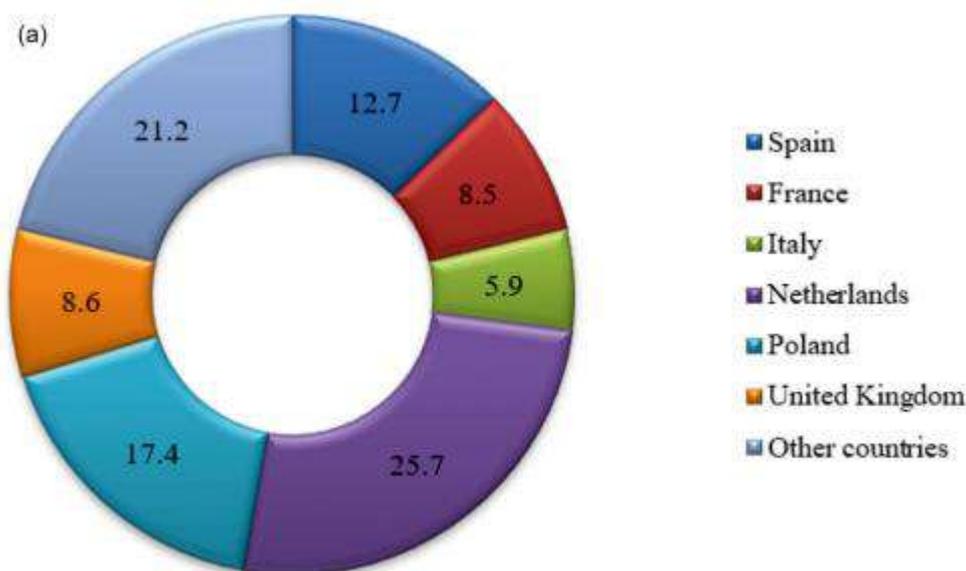


Figura 2 - Produzione mondiale di funghi per Paese (in percentuale) [37]

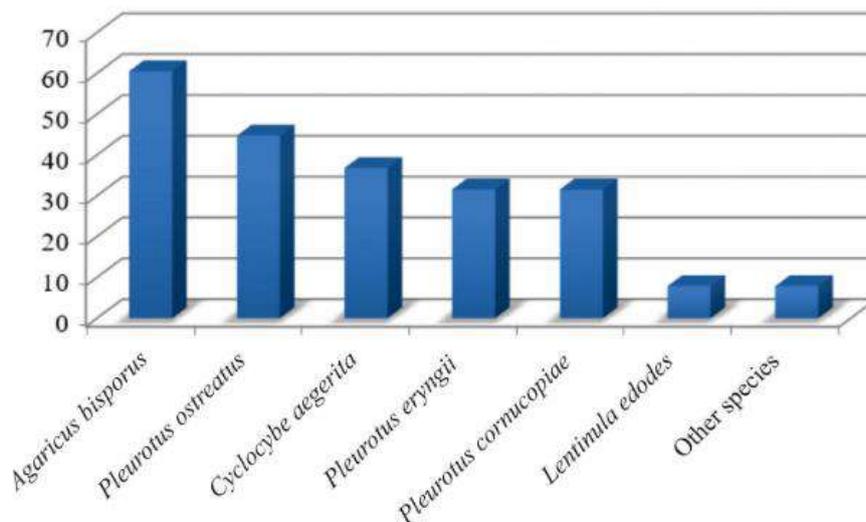
In Europa, il settore produttivo legato ai funghi freschi e trasformati è sostenuto dallo *European Mushroom Grower's Group* (*Groupement Européen de Producteurs de Champignon*, GEPC), creato nel 1980 in opposizione alle importazioni cinesi. Oggigiorno GEPC è diventato un sottogruppo ufficiale specifico del *Fruits and Vegetables Group* del Committee of Professional Agricultural Organisations (COPA, Comitato delle organizzazioni professionali agricole) e della General Confederation of Agricultural Cooperatives (COGECA, Confederazione Generale delle Cooperative Agricole) e tutela gli interessi dei coltivatori di funghi. Essi si occupano di indagini di mercato, di promozione, di ricerca, di prodotti fitosanitari e di negoziazioni economiche al fine di migliorare le condizioni produttive del settore [37].

In Europa, il più grande produttore di funghi è l'Olanda, la cui produzione è di circa 260.000 tonnellate annue, destinate per la maggior parte all'esportazione. A seguire vengono la Polonia, la Spagna, il Regno Unito, la Francia e infine l'Italia [37] (Figura 3).



**Figura 3** - Produzione di funghi (in 1000 tonnellate) dei più importanti coltivatori d'Europa nel triennio 2016-2018 [37]

In Italia, la funghicoltura è un'attività produttiva piuttosto recente, iniziata nel secolo scorso a seguito del rientro nel Paese di migranti veneti e bergamaschi che avevano appreso in Belgio e Francia le tecniche di coltivazione di *Agaricus bisporus*. Attualmente, l'Italia è il sesto Paese europeo per la produzione di funghi con circa 70,000 tonnellate annue, l'87% delle quali è destinato al consumo fresco mentre il 13% alla trasformazione industriale. Nonostante il mercato sia evidentemente in costante crescita, un'analisi dettagliata della funghicoltura italiana risulta difficile a causa della mancanza di dati ufficiali. Ferraro e colleghi hanno identificato 43 medie e grandi aziende sul territorio nazionale. Sei di queste aziende si occupano esclusivamente della produzione e vendita di micelio cresciuto su differenti substrati e kit di crescita di diverse specie, come *Pleurotus eryngii*, *P. ostreatus*, *P. cornucopiae*, *Agaricus bisporus* e *Cyclocybe aegerita*. Delle restanti 37, 25 aziende sono specializzate nella coltivazione di funghi di differenti specie, come *A. bisporus*, *C. aegerita*, *P. ostreatus*, *P. eryngii* e *P. cornucopiae* mentre 12 producono anche i substrati. Secondo l'Associazione Italiana Funghicoltori (AIF), il fungo più coltivato è *Agaricus bisporus*, che rappresenta quasi il 60% della produzione totale, seguito dalle specie del genere *Pleurotus* e da *Cyclocybe aegerita* e *Lentinula edodes* [37] (Figura 4).



**Figura 4** - Specie di funghi maggiormente coltivate in Italia (in percentuale) [37]

Più del 50% dei funghi coltivati in Italia provengono dal Veneto, dove sono localizzate le imprese con i più avanzati processi produttivi, installazioni e tecnologie; segue poi l'Emilia-Romagna e il Sud Italia. La protezione e il potenziamento della funghicoltura italiana sono supportate dal consorzio Fungo Italiano Certificato, che gestisce il 70% della produzione nazionale e garantisce ai consumatori un'alta qualità [37].

Nonostante la funghicoltura italiana stia sperimentando un'importante fase di sviluppo tecnologico e progressiva crescita, il consumo nazionale è ancora basso comparato con quello europeo e mondiale, attestandosi su 2,5 kg pro capite annui secondo l'Organizzazione Produttori Ortofrutticoli (OPO) Veneto o 1,5 secondo AIF. Tuttavia, questa domanda rimane ben sopra l'offerta delle aziende agricole italiane, dimostrando come ci sia un ottimo potenziale di crescita per la funghicoltura italiana. Inoltre, la presenza dei funghi italiani sui mercati stranieri è in crescita, come denota un considerevole interesse da parte di operatori stranieri come i Paesi dell'Europa del Nord, dimostrando ancora una volta le potenzialità di questo settore [37].

Vale la pena anche ricordare come nel 2019 sia stata istituita la Società Italiana Funghi Medicinali (SIFM), l'unica società scientifica europea e la seconda dopo l'*International Society for Medicinal Mushrooms*, che promuove la ricerca sui funghi medicinali e le loro applicazioni in campo medico e si dedica alla divulgazione. Questa società si pone anche come obiettivo quello di certificare e garantire la qualità dei prodotti micoterapici, poiché oggi molti estratti di funghi sono prodotti senza una chiara determinazione tassonomica della specie e senza un'origine geografica. Alcuni recenti studi hanno dimostrato come i prodotti che si trovano correntemente sul mercato siano caratterizzati da una mancanza di omogeneità, di corrispondenza della specie in etichetta e nel prodotto, e di una bassa qualità legata a un basso contenuto reale di ingredienti attivi. La produzione di estratti di qualità a partire da una materia prima di qualità apre altre interessanti possibilità di mercato per chi si voglia introdurre in questo settore [37].

#### 1.2.4 *Mycoagroecology e contesto locale*

Nel contesto globale di coltivazione di funghi commestibili è raro trovare la presenza di aziende che riescano a mettere realmente in pratica i principi dell'economia circolare e dell'agricoltura sostenibile e rigenerativa. Nonostante le grandi potenzialità di questo settore, la maggior parte dei produttori di funghi opera in condizioni industriali in cui strutture altamente energivore immettono al proprio interno degli input, rifiuti solidi organici ma non solo, provenienti da territori lontani dal proprio processo produttivo, e generano un consistente output di rifiuti come i substrati esausti, che possono essere causa di contaminazione ambientale e che hanno bisogno di essere smaltiti. In questo contesto il contributo che il nuovo paradigma della *mycoagroecology* può fornire è proprio quello di riuscire a realizzare dei sistemi integrati, efficienti e sostenibili, che sfruttino il ruolo ecologico dei funghi insieme a quello degli altri esseri viventi. Le proposte pratiche che la *mycoagroecology* offre sono numerose e prevedono l'utilizzo di funghi sia come supporto ad altre colture vegetali, sia come strumento di rigenerazione degli scarti e bonifica, sia come produzione di cibo ad alto valore nutritivo. Concentrandoci solo sull'ultima proposta, la coltivazione di funghi può avvenire in diversi ambienti: all'interno di una serra o di una fungaia, direttamente in campo in consociazione o in rotazione con altre colture vegetali o su tronchi di alberi o ceppaie.

Le tecniche di micoagroecologia, conosciute da decenni nell'ambito della micologia hobbistica, sono state recentemente sistematizzate dalle autrici del libro *Mycoagroecology: Integrating Fungi into Agroecosystems* grazie al supporto di valide pubblicazioni scientifiche [24]. Tuttavia, queste tecniche sono ancora poco conosciute nell'ambito dell'agricoltura rigenerativa e l'utilizzo di tali principi all'interno delle aziende agricole italiane risulta essere ridotto; tra i pochi esempi presenti sul territorio italiano, è possibile citare l'Azienda Agricola Iside (Sulzano, BS), partner di questo progetto di ricerca. Questa azienda fonda la propria produzione sui principi dell'agricoltura rigenerativa attraverso l'utilizzo di sistemi agro-silvo-pastorali. Nel gennaio 2022, l'azienda ha deciso di avviare una fase sperimentale di produzione di funghi commestibili che potesse integrarsi con il già complesso panorama aziendale: la coltivazione si è sviluppata nei letti dell'orto, su tronchi di castagno e *indoor* in barattoli di plastica dura riutilizzabili. Particolare attenzione è stata posta allo smaltimento dei substrati esausti che sono stati utilizzati come materiale di pacciamatura nell'orto o come supplemento nella nutrizione animale [38]. In questo contesto, l'anello mancante della circolarità della produzione di funghi aziendale risulta essere la produzione di *spawn*, ossia l'inoculo fungino per avviare la produzione di funghi commestibili, oggetto della mia tesi.

La sfida più grossa nella coltivazione di funghi in ottica micoagroecologica per un'azienda medio-piccola è quella di ottenere una produzione economicamente sostenibile che possa essere un'importante fonte di reddito. Lavorare senza il ricorso ad una costosa ed energivora strumentazione industriale che consente il preciso controllo dei parametri di produzione impone all'agricoltore uno sforzo maggiore per conoscere e sfruttare al meglio i microrganismi con cui lavora e le caratteristiche ambientali del proprio contesto produttivo.

Produrre seguendo i principi della micoagroecologia è una sfida aperta che richiede la presenza di agricoltori competenti e con una formazione interdisciplinare che gli consenta di gestire sistemi complessi integrati e diversificati. Intuito, coraggio e creatività sono doti altrettanto richieste.

### 1.2.5 *Pleurotus ostreatus*

Terzo fungo maggiormente coltivato al mondo, e secondo in Italia, *Pleurotus ostreatus* è stato l'oggetto di studio di questa tesi di ricerca.

Comunemente chiamato Orecchione o *Oyster Mushroom*, *Pleurotus ostreatus*, appartiene al *phylum* dei *Basidiomycota*, alla classe degli *Agaromycetes*, all'ordine degli *Agaricales* e alla famiglia delle *Pleurotaceae*. Esso è un fungo saprotrofo molto comune dell'emisfero boreale che cresce naturalmente nei boschi di latifoglie [39]. È un fungo dalla carne tenera, sovente mensoliforme o imbutiforme, con lamelle di norma lungamente decorrenti, bianche o giallastre. Il gambo è eccentrico, laterale e raramente centrale o assente [40] (Figura 5).



**Figura 5** - *Pleurotus ostreatus* [41]

L'attenzione che questo fungo sta ricevendo a livello mondiale è dovuta alla sua grande capacità di adattamento a diverse condizioni di crescita e alle sue caratteristiche nutritive e nutraceutiche. Esso è infatti in grado di crescere su diverse tipologie di rifiuti solidi organici, come la segatura, la carta, la paglia, i fondi di caffè, i resti di agave, soia, canna da zucchero, ecc. ma non solo: egli è infatti in grado di degradare rifiuti solidi inorganici come alcune componenti plastiche [42].

*Pleurotus ostreatus* è notoriamente conosciuto per le sue alte qualità nutrizionali: in 100 g di peso secco sono contenuti mediamente 50,9 g di carboidrati, 32 g di proteine, 3,1 g di lipidi, 6,2 g di fibre e 6,1 g di sostanza secca (Tabella 1). Il contenuto proteico, superiore a quello della verdura ma inferiore rispetto a quello di latte e carne, è molto rilevante grazie alla presenza di tutti gli amminoacidi essenziali [43].

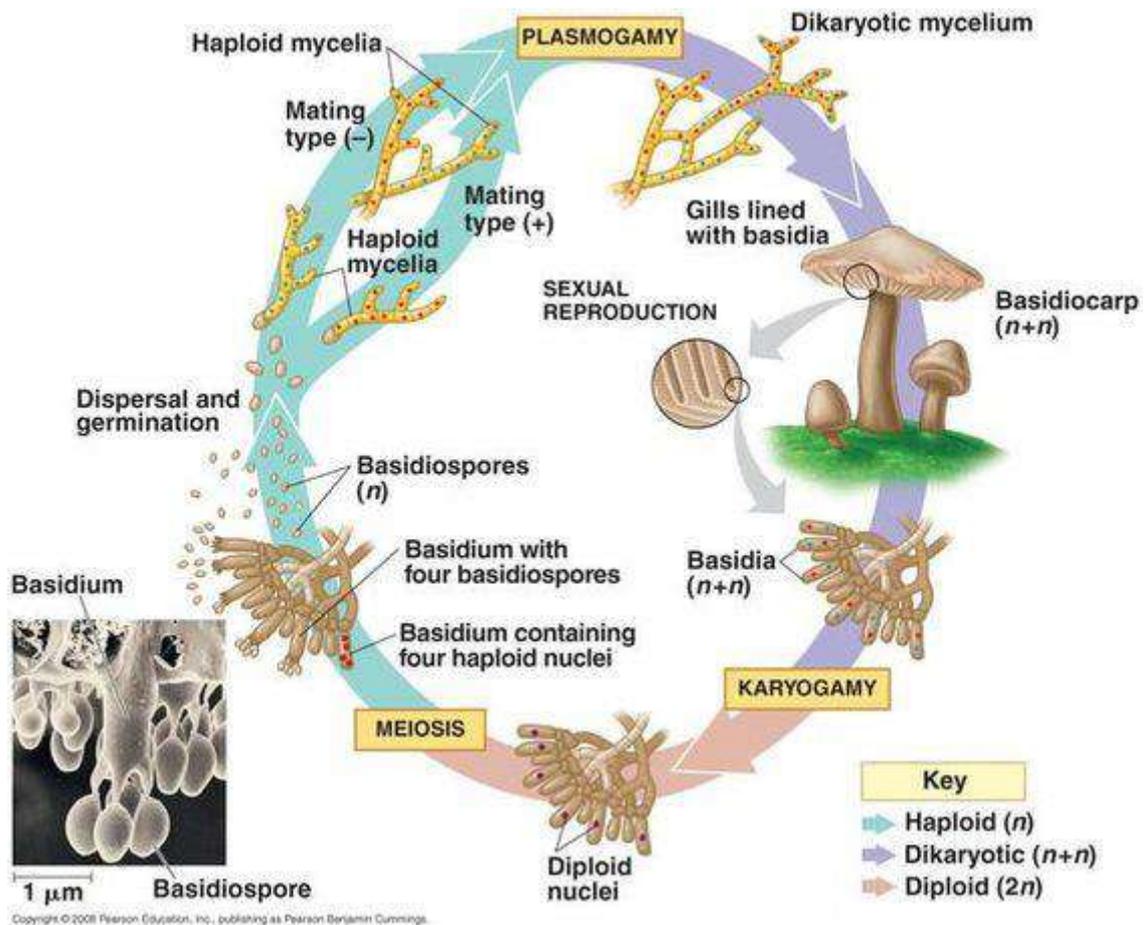
**Tabella 1** - Contenuto nutrizionale di *P. ostreatus* in g/100 g di peso secco [43]

Carboidrati	Proteine	Lipidi	Fibre crude	Sostanza secca
50,9	32	3,1	6,2	6,1

Anche la componente lipidica è importante: acidi grassi, mono, di e trigliceridi, steroli, esteri e fosfolipidi sono molto presenti all'interno di questa specie. Inoltre, le specie appartenenti al genere *Pleurotus* sono importanti fonti di minerali (Na, Ca, P, Fe e K), vitamine (gruppo B e C) e composti organici come alcoli, fenoli e triterpenoidi [43].

Grazie a tutte queste caratteristiche è stato evidenziato come *Pleurotus* possa stimolare il sistema immunitario, avere proprietà anticancerogene ed epato-protettive e agire come anti-ipercolesterolemico, oltre ad essere un eccellente cibo per le persone che soffrono di ipertensione e malattie cardiovascolari [43].

Il *phylum* a cui appartiene *P. ostreatus*, *Basidiomycota*, è così chiamato a causa della caratteristica struttura riproduttiva sessuata di questi funghi, il basidiocarpo, a forma di ombrello. Nel loro ciclo di vita, i basidiomiceti attraversano fasi riproduttive e vegetative, come mostrato in Figura 6.



**Figura 6** - Ciclo di vita dei Basidiomycota [44]

Durante la fase vegetativa, il micelio cresce sopra e dentro il substrato, giocando un ruolo chiave nel processo di sintesi dei nutrienti. Generato in natura da un'unica spora, il micelio dei basidiomiceti è inizialmente monocariotico, cioè contiene un solo nucleo. Nel momento in cui un micelio monocariotico incontra un altro micelio monocariotico diverso da sé e compatibile sessualmente (il genere *Pleurotus* ha 4 *mating forms*), essi possono fondersi e formare un micelio dicariotico, cioè formato da due nuclei: questo processo si chiama plasmogamia, ovvero fusione dei citoplasmi. Solo i miceli dicariotici possono avviare la fase riproduttiva sessuata. Quando le condizioni atmosferiche sono ottimali alla fruttificazione, ossia per *P. ostreatus* quando si hanno temperature moderate (20-25 °C), alta umidità relativa (65-70%), flusso di ossigeno e un'intensità luminosa di circa 200-640 lumen per 8-12 ore al giorno, il micelio dicariotico può intraprendere la fase riproduttiva. Durante questa fase vengono prodotti i corpi fruttiferi, i basidiocarpi, formati interamente da micelio dicariotico. All'interno delle lamelle che si trovano sotto la superficie del loro cappello, si formano i basidi, ossia le strutture in cui avviene la riproduzione sessuata. Al loro interno avviene la cariogamia, ossia la fusione dei due nuclei. Il nuovo nucleo diploide può così avviare il processo di meiosi e produrre 4 nuclei aploidi, ognuno dei quali sarà contenuto in una basidiospora. Ogni basidiocarpo produce dalle centinaia di migliaia a oltre un milione di spore che vengono espulse nell'ambiente e trasportate dal vento. Una volta depositate, ogni spora può germinare e dare vita a un nuovo micelio monocariotico quando le condizioni atmosferiche lo consentono [45]. Ai fini del settore agroalimentare, i basidiocarpi sono i corpi fruttiferi che vengono raccolti e venduti.

Dalla descrizione del ciclo di vita di *P. ostreatus* si evince come il micelio di partenza nel processo di coltivazione debba avere una caratteristica fondamentale: essere dicariotico per poter intraprendere la fase di fruttificazione. Le informazioni genetiche contenute dai due diversi nuclei concorreranno a determinare le caratteristiche dei basidiocarpi stessi.

#### 1.2.6 La coltivazione di *Pleurotus ostreatus*

La coltivazione di *P. ostreatus* è globalmente considerata una delle coltivazioni più convenienti. Essa rappresenta infatti un investimento *low-cost* grazie alla possibilità di usare rifiuti solidi organici come substrato di crescita, al breve ciclo di vita fino alla raccolta (28-35 giorni esclusa la fase di produzione di *spawn*) e alla possibilità di cicli di raccolta multipli.

Iniziata in Germania su ceppaie e tronchi di alberi e successivamente introdotta in Cina durante la Prima guerra mondiale [43], la coltivazione di *P. ostreatus* si è molto evoluta nel tempo grazie a continui miglioramenti tecnologici che hanno portato allo sviluppo di altri metodi di coltivazione, come la coltivazione a parete o con l'utilizzo di mensole, vassoi di legno, barattoli, sacchi di plastica e bottiglie; i sacchi di plastica cilindrici e i vassoi di legno, per esempio, sono tra i più remunerativi e preferiti dai coltivatori del settore agroalimentare [45]; in Figura 7 vengono mostrate diverse tecniche di coltivazione di funghi. Ciò che accomuna tutti questi metodi di coltivazione è il processo microbiologico: la fermentazione in stato solido.

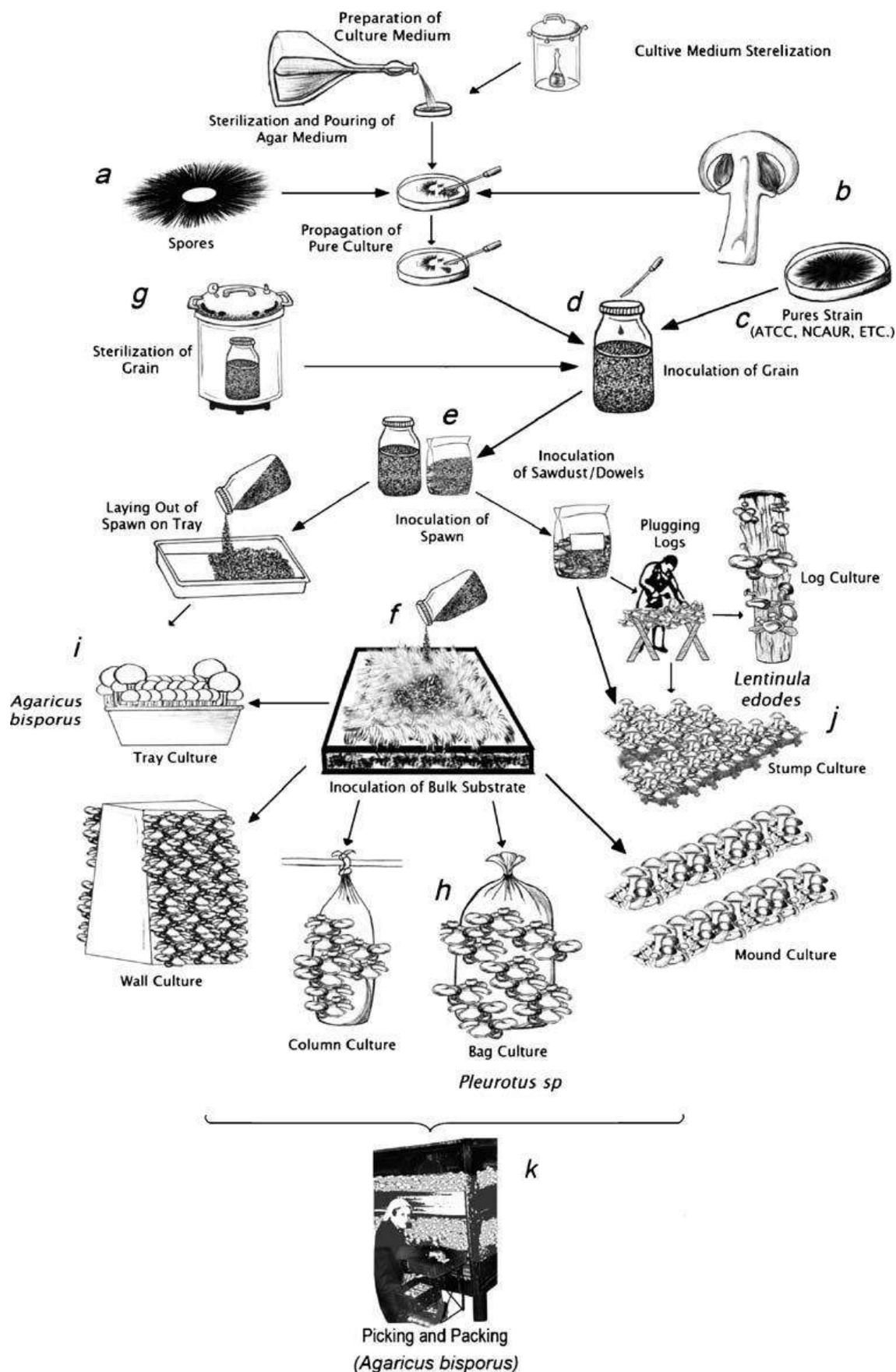


Figura 7 - Coltivazione e raccolta di funghi [26]

### 1.2.6.1 *Solid-State Fermentation*

La fermentazione in stato solido (*Solid-State Fermentation*, *SSF*) è definita come il processo di fermentazione in cui i microrganismi crescono sulla superficie o all'interno di una matrice solida porosa in assenza, totale o parziale, di acqua libera. L'umidità necessaria alla crescita microbica si trova infatti complessata con la matrice solida e non è mai inferiore al 12%, poiché sotto questo livello tutte le attività biologiche cessano; il limite superiore dipende invece dalla capacità di assorbimento del substrato stesso [46].

Le origini di questa tecnica di fermentazione sono molto antiche e risalgono a più di 4500 anni fa, quando, in latitudini opposte del pianeta, Egizi e Civiltà orientali usavano la fermentazione su substrato solido per produrre pane (reperti archeologici egizi datati 2600 a.C), miso, salsa di soia e *sakè* (Giappone), il vino *shao-hsing* e il liquore *kao-liang* (Cina) e tanti altri prodotti [46].

La sua diffusione in campo industriale ha avuto origine verso la fine del XIX secolo, con una crescita esponenziale tra gli anni '40 e '50 del XX secolo, in quella che fu definita la "golden era" della fermentazione, grazie ad importanti scoperte scientifiche, come la produzione di antibiotici a base di penicillina di origine fungina e la trasformazione di steroidi a partire da spore fungine. Tuttavia, dopo essere stata così ampiamente utilizzata durante la Seconda guerra mondiale per produrre penicillina, la fermentazione in stato solido è stata temporaneamente abbandonata in Occidente per difficoltà legate al controllo dei parametri di fermentazione. All'inizio degli anni '80 si assiste ad un nuovo impulso industriale legato alla crescita delle attività di ricerca per la produzione di metaboliti primari e secondari tramite *SSF*, allo sviluppo di nuove tipologie di fermentatori e alla formulazione di nuove teorie cinetiche e nuovi modelli [46].

Dal 1990 il panorama legato alla fermentazione in stato solido è quindi completamente rinnovato e questa tecnologia viene utilizzata in ambiti molto diversi tra loro: biobonifiche, decomposizione biologica di materiale pericolosi, biodetossificazione di rifiuti agroindustriali, biotrasformazione di colture o residui colturali per un arricchimento nutrizionale, produzione su larga scala di metaboliti secondari attivi biologicamente come antibiotici, alcaloidi, enzimi, acidi organici, biopesticidi, biotensioattivi e prodotti farmaceutici di origine biologica, produzione di biocarburanti e composti aromatici [46].

In molti ambiti industriali la fermentazione in stato solido è stata introdotta in sostituzione a processi di fermentazione che sfruttavano la tecnica di fermentazione in liquido (*Submerged Fermentation*, *SmF*). Questo passaggio ha portato diversi vantaggi, tra i quali la minore richiesta di acqua che ha consentito di ottimizzare al meglio i costi di produzione a vari livelli, da quello iniziale per la formazione del substrato, a quello di recupero e purificazione dei prodotti di fermentazione. Inoltre, l'assenza di una fase acquosa consente di utilizzare fermentatori di più piccole dimensioni e permette di ridurre nettamente il rischio di contaminazioni, consentendo in molti processi di *SSF* la non sterilizzazione del substrato. In aggiunta, nel processo di fermentazione in stato solido non è richiesto un sistema di agitazione e ossigenazione, indispensabile nelle fermentazioni in liquido [46].

Tuttavia, anche utilizzare la fermentazione in stato solido comporta alcune problematiche, come la minore omogeneità di colonizzazione del substrato da parte del fungo dovuta alla mancata agitazione del substrato e alla difficoltà nel determinare alcuni parametri di fermentazione quali la crescita microbica e l'umidità.

Nel processo di fermentazione i parametri che più incidono sulla crescita microbica sono il grado di triturazione del substrato e il livello di umidità. È infatti necessario individuare per ogni microrganismo le adeguate dimensioni della matrice: un substrato sufficientemente fine per

consentire un'alta superficie di crescita, ma non troppo da compromettere gli scambi gassosi con l'ambiente.

Oltre che a livello industriale, la fermentazione in stato solido viene incoraggiata anche nei manuali per agricoltori, in cui vengono proposte tecniche di SSF attuabili in ambito domestico senza bisogno dell'utilizzo di strumentazione industriale. Paul Stamets [47], Peter McCoy [36] e Tradd Cotter [48] sono solo alcuni tra i più famosi coltivatori di funghi a livello mondiale che si occupano della diffusione di conoscenze micologiche al di fuori dall'ambito accademico. Grazie al loro lavoro di divulgazione, un grande numero di appassionati, hobbisti, agricoltori e micologi utilizza oggi tecniche di SSF per coltivare numerose tipologie di funghi.

#### 1.2.6.2 *Solid-State Fermentation* applicata alla coltivazione di *Pleurotus ostreatus*

La coltivazione di *P. ostreatus* attraverso la tecnica di fermentazione in stato solido include diverse operazioni, ciascuna delle quali deve essere eseguita con attenzione: la preparazione del substrato, l'inoculo, l'incubazione e l'allestimento del processo di fruttificazione.

Grazie alla sua ottima capacità di adattamento a differenti substrati, la scelta del materiale su cui far crescere *P. ostreatus* può essere comodamente adattata alle esigenze locali e aziendali. Se nei climi tropicali è più sostenibile usare scarti della produzione di cotone o foglie di banana e bambù, alle nostre latitudini risulta più interessante utilizzare materiali lignocellulosici che rientrano nella categoria dei rifiuti solidi organici, come gli scarti di gestione del verde urbano o dei boschi alpini, o i resti di produzione industriale, come per esempio del settore agroalimentare o dei mobili. Una volta scelti i materiali, il substrato deve subire un pretrattamento per abbattere la carica microbica contenuta al suo interno. A livello industriale viene comunemente utilizzata la pastorizzazione [26], che richiede molta energia, mentre nelle piccole aziende agricole è più comune l'applicazione di pretrattamenti a freddo che sfruttano l'innalzamento o l'abbassamento del pH tramite l'aggiunta di una sostanza acidificante o basificante.

La fase successiva, quella dell'inoculo, risulta essere la più delicata di tutto il processo: in questa fase viene aggiunto al substrato il fungo che si desidera coltivare. Per fare ciò è necessario possedere una inoculo, o *spawn*, di cui tratterò in maniera approfondita più avanti. L'inoculazione del fungo nel substrato deve avvenire prestando attenzione alla pulizia al fine di ridurre al minimo le contaminazioni ambientali.

Dopo essere stato inoculato, il substrato viene incubato per un periodo variabile di due-tre settimane, a temperatura controllata, generalmente tra i 21 e i 24 °C, senza bisogno di luce [43].

Una volta che il micelio ha colonizzato interamente il substrato, è possibile trasferire la coltura nell'apposita stanza di fruttificazione, allestita per consentire che le diverse fasi di produzione possano proseguire contemporaneamente in condizioni diverse: la stanza di fruttificazione deve infatti garantire l'illuminazione, non prevista nella fase di incubazione, e una temperatura generalmente più bassa rispetto a quella di incubazione. I primordi, primo stadio di sviluppo dei corpi fruttiferi, compaiono generalmente dopo 24-30 giorni dall'inizio della fase di incubazione e, una volta comparsi, sono pronti per la raccolta dopo circa 7 giorni. Ogni substrato è in grado di fornire due o tre raccolti [43].

Una volta terminata la fase di raccolta, i contenitori monouso e i substrati esausti vengono smaltiti. In una coltivazione di funghi che segue i principi dell'economia circolare, i contenitori non dovrebbero essere monouso ma riutilizzabili, e i substrati esausti dovrebbero essere materia prima di

un altro processo produttivo, come la coltivazione di un altro tipo di fungo o la fertilizzazione di colture vegetali [25].

### 1.2.6.3 La *Spawn*

Elemento chiave per una produzione di funghi efficiente è la *spawn*. Per il coltivatore di funghi, la *spawn* è l'equivalente delle piantine da vivaio per l'orticoltore: essa serve per "seminare" il proprio substrato ed introdurre il fungo desiderato. La *spawn* è costituita da un substrato interamente colonizzato dal micelio del fungo. Il substrato della *spawn* è generalmente composto da grani di diversa dimensione, come miglio, grano, riso o da segatura, o da un misto dei due. È necessario che le dimensioni delle diverse componenti del substrato siano piuttosto ridotte per avere un ottimale rapporto volume:superficie in fase di inoculo. I grani si configurano come delle "capsule di micelio"[47] da cui il fungo può iniziare la colonizzazione: più piccoli sono i grani e più punti di partenza per la colonizzazione ci sono, a parità di peso di *spawn*. Per evitare che le piccole dimensioni impediscano lo scambio gassoso o portino alla formazione di grumi, nelle *spawn* viene spesso aggiunto del carbonato di calcio [43]. La preparazione della *spawn* è necessario che si realizzi nelle condizioni più vicine possibili alla sterilità, poiché, nel caso avvenga una piccola contaminazione nella fase di produzione, essa potrebbe tradursi in un'enorme contaminazione nel substrato finale di fruttificazione.

Idealmente, il micelio contenuto nella *spawn* è vivo, attivo e particolarmente performante. Per mantenere queste caratteristiche è necessario utilizzare la *spawn* non oltre i due mesi di vita, poiché la scarsità di nutrienti che si verrebbe a creare e la secrezione di enzimi e metaboliti secondari da parte dello stesso micelio porterebbero al declino della sua vitalità.

Il successo della produzione di funghi dipende per la maggior parte dalla qualità della *spawn* poiché è soprattutto da essa che dipende la capacità e la velocità di colonizzazione del substrato di fruttificazione da parte del fungo [26].

Molti studi sono stati condotti per migliorare la qualità della *spawn* e individuare nuove tecniche per la sua produzione. Per esempio, per quanto riguarda la *spawn* di *P. ostreatus*, sono stati sperimentati nuovi metodi di produzione, oltre a quelli classici con grani e segatura: diversi tipi di coltura liquida o in bastoncini [43].

Per un coltivatore di funghi, ottenere una *spawn* di qualità risulta quindi essere una priorità. In alternativa ad un fornitore di fiducia, il coltivatore potrebbe anche prodursi da sé la *spawn*. Questo porterebbe all'agricoltore enormi vantaggi: egli avrebbe pieno controllo sulla qualità della *spawn*, potrebbe sviluppare un proprio ceppo, ridurrebbe i costi di produzione e potrebbe aumentare senza costi aggiuntivi la percentuale di *spawn* di inoculo rendendo il processo di colonizzazione più veloce ed efficiente.

In questo contesto si inserisce l'obiettivo principale di questo progetto di ricerca: produrre una *spawn* di qualità.

## 2 SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo principale di questa tesi di ricerca è stato quello di produrre una *spawn* di *Pleurotus ostreatus* che portasse alla produzione di corpi fruttiferi in maniera sostenibile. Non ci si è infatti limitati alla semplice propagazione del micelio ma sono state prese in considerazione diverse tematiche, come la provenienza e la tipologia dei substrati utilizzati o il consumo energetico e il riuso, per poter realizzare un prodotto interessante sotto più punti di vista.

I principi dell'economia circolare sono stati il punto di partenza per quanto riguarda la scelta dei materiali: oltre a testare uno dei cereali standard di riferimento della produzione globale di *spawn*, il Miglio Bianco (MB), sono state utilizzate diverse tipologie di rifiuti solidi organici locali: la segatura di scarto, la frutta non più commercializzabile ritirata dai supermercati della città, l'Ammendante Vegetale Semplice Non Compostato prodotto con gli scarti di potatura verde urbana e gli scarti di gestione forestale di un'azienda locale.

La collaborazione con quest'ultima azienda ha creato il contesto locale in cui si è inserito il progetto di ricerca, creando un ponte tra il mondo accademico, le sue tecniche e conoscenze, e il mondo agricolo, in cui queste possono essere applicate e avere un risvolto produttivo. In questo contesto, la produzione di *spawn* ha avuto un valore aggiunto e si è configurata come quell'anello mancante della produzione agricola di funghi che potrebbe in futuro consentire alle aziende con un approccio micoagroecologico di "chiudere il cerchio" e non dover più ricorrere all'acquisto esterno di una *spawn*. Proporre il processo produttivo di *spawn* all'interno di un'azienda agricola senza la strumentazione di un laboratorio universitario non è per niente banale e richiede importanti riflessioni su diversi fattori del processo produttivo stesso.

La tecnologia utilizzata per produrre la *spawn* è stata la *Solid-State Fermentation* e *Pleurotus ostreatus* è stato scelto come fungo di sperimentazione per le sue ottime capacità adattative di crescita e per il suo interesse a livello alimentare e medicinale.

La ricerca ha utilizzato l'approccio *One-Factor-At-A-Time* (OFAT) e si è svolta in tre fasi: durante la prima fase è stata testata l'adeguatezza di diversi substrati alla crescita di *P. ostreatus*, durante la seconda si sono sperimentate diverse tipologie di inoculo su due dei substrati che hanno ottenuto le migliori performance nella fase precedente e, infine, nella terza, si è verificata la capacità delle *spawn* prodotte nella seconda fase di supportare la produzione di corpi fruttiferi.

### 3 MATERIALI E METODI

#### 1.1 Microrganismo utilizzato

Il fungo basidiomicete utilizzato in tutti gli esperimenti è *Pleurotus ostreatus*, ceppo PO56825, proveniente dall'azienda MPC *Mushroom Production Center LCC* (Innsbruck, Austria). Il ceppo è pervenuto in laboratorio sotto forma di *spawn*, ovvero micelio cresciuto su segatura, all'interno di un sacco di plastica trasparente.

#### 1.2 Tecniche colturali

##### 1.2.1 *Isolamento, mantenimento in coltura e collezione dei ceppi*

Il terreno utilizzato per la coltura su piastra è stato il *Potato Dextrose Agar* (PDA) con composizione: 20 g/L di glucosio, 4 g/L di estratto di patata e 15 g/L di Agar. Per realizzarlo occorre pesare 39 g di polvere di PDA, aggiungere 1 L di acqua deionizzata, sterilizzare in autoclave (121°C per 15 minuti) e infine, quando la soluzione raggiunge circa i 45°C, colare nelle piastre Petri sotto cappa a flusso laminare.

Il ceppo PO56825 di *Pleurotus ostreatus* è stato inizialmente isolato dalla *spawn* commerciale prelevando con un'ansa ad ago sterile una porzione di micelio e depositandola al centro di una piastra Petri contenente PDA. L'operazione è stata ripetuta tre volte.

Successivamente, per il mantenimento in coltura dei ceppi, è stato prelevato un tassello di micelio e agar direttamente dal margine giovane e attivo di una colonia cresciuta su PDA per circa 7 giorni (Figura 8) e trasferito al centro di una nuova piastra con terreno PDA. L'operazione è stata ripetuta con regolarità nel corso della ricerca.



**Figura 8** - Crescita di *Pleurotus ostreatus* su PDA dopo 7 giorni

Le piastre sono state incubate a 26°C fino al raggiungimento della completa colonizzazione e sono state successivamente conservate in frigorifero a 4°C fino al loro utilizzo.

Per conservare nel lungo periodo le caratteristiche fisiologiche e biochimiche del ceppo originario di *P. ostreatus* PO56825 sono stati preparati degli stock di tasselli di coltura fungina solida. Sotto cappa biologica, utilizzando un foratappi del diametro di 0.4 cm precedentemente sterilizzato, sono stati prelevati da una colonia del ceppo PO56825 su agar in piastra Petri dei tasselli completamente colonizzati. I tasselli sono stati inseriti in provette Eppendorf contenenti 1 mL di acqua deionizzata sterile (4 tasselli per Eppendorf).

### 1.3 Produzione di *spawn*

#### 1.3.1 *Substrati e procedura di idratazione*

I substrati utilizzati per la *Solid-State Fermentation* sono stati selezionati secondo due criteri fondamentali: i contenuti nutritivi necessari a soddisfare il fabbisogno del fungo e la loro circolarità, privilegiando i materiali di scarto.

Tutti i substrati sono stati idratati seguendo tre diverse procedure al fine di ottenere un substrato completamente idratato ma senza la presenza di acqua libera. La prima procedura (1) prevedeva che il substrato rimanesse in immersione per 24 ore e l'acqua in eccesso venisse assorbita in fase di sterilizzazione; la seconda (2) prevedeva di lasciare in immersione il substrato per trenta minuti ed eliminare successivamente l'acqua in eccesso; la terza procedura (3) prevedeva un'idratazione progressiva e un costante mescolamento del substrato affinché fosse idratato in maniera omogenea fino al punto ottimale.

I contenitori utilizzati per tutti i substrati sono stati i vasi microbox round slim 114, generalmente usati per la micropropagazione *in vitro* delle piante (Azienda Micropoli, Milano, Italia), con un coperchio dotato di filtro da 0,45 µm per consentire gli scambi gassosi pur mantenendo la sterilità. La quantità di substrato idratato inserita in ciascun vaso microbox è stata scelta per rispettare le proporzioni di 1:4 di substrato:aria.

Di seguito vengono riportati i diversi substrati e le diverse tecniche colturali utilizzate per la SSF.

##### 1.3.1.1 Miglio Bianco (MB)

###### Composizione e provenienza

Il miglio bianco, *Panicum miliaceum*, per la nutrizione animale è stato acquistato presso l'azienda agricola Cardoni (Montoro di Filottrano, Ancona, Italia) e conservato in laboratorio a temperatura ambiente per due settimane. Secondo la letteratura, la sua composizione chimica è la seguente:

**Tabella 2** - Composizione chimica di *Panicum miliaceum* espressa come % sul totale del peso secco [49]

<b>Proteine</b>	13.89 ± 1.58
<b>Lipidi</b>	8.43 ± 0.28
<b>Amido</b>	72.58 ± 3.19
<b>Fibre</b>	4.29 ± 0.79
<b>Polifenoli</b>	0.98 ± 0.04

### Preparazione

Per l'idratazione del substrato è stata utilizzata la procedura 1. Sono state effettuate delle prove preliminari per valutare il quantitativo di acqua ottimale: in ogni vaso microbox sono stati aggiunti 100 g di miglio bianco e un quantitativo di acqua variabile per testare i rapporti substrato:acqua 1:1,5, 1:2, 1:2,5 e 1:3 (Figura 9). Il substrato è stato lasciato in immersione 24 ore e successivamente ha subito il processo di sterilizzazione.



**Figura 9** - Prove preliminari di idratazione del substrato Miglio Bianco: da sinistra a destra, rapporti substrato:acqua 1:1,5, 1:2, 1:2,5, 1:3

Negli esperimenti successivi sono stati utilizzati 100 g di miglio bianco e 150 mL di acqua. Il substrato è rimasto in immersione 24 ore e successivamente ha subito il processo di sterilizzazione.

#### 1.3.1.2 Cippato di Carpino (CC) e Cippato di Orniello (CO)

##### Composizione e provenienza

Il cippato è legno ridotto in frammenti, con dimensioni variabili da alcuni millimetri a qualche centimetro, prodotto a partire da tronchi e ramaglie di scarto attraverso il biotrituratore. I cippati di essenze pure di carpino, *Ostrya carpinifolia*, e orniello, *Fraxinus ornus*, sono stati prodotti dall'Azienda Agricola Iside, lì conservati per due settimane e successivamente portati in laboratorio.

##### Preparazione

Il substrato è stato idratato con la procedura 2. Centoventicinque g del materiale idratato sono stati inseriti nei vasi microbox (Figura 10).



**Figura 10 A - Cippato di Orniello**



**Figura 10 B - Cippato di Carpino**

### 1.3.1.3 Ammendante Vegetale Semplice Non Compostato (AVSNC)

#### Composizione e provenienza

L'AVSNC rientra nella categoria degli Ammendanti ed è definito come prodotto non fermentato a base di cortecce e/o di altri materiali vegetali, come sanse, pule, bucce con esclusione di alghe e di altre piante marine nell'allegato 2 Supplemento ordinario n.51 alla GAZZETTA UFFICIALE del 2009 [50]. L'AVSNC utilizzato come substrato in questo lavoro di tesi deriva dall'Impianto di Compostaggio del Verde di Bedizzole di A2A Ambiente (Brescia, Italia). Secondo la normativa, l'AVSNC deve avere delle caratteristiche specifiche, riportate in Tabella 3.

**Tabella 3 - Caratteristiche dell'Ammendante Vegetale Semplice Non Compostato**

Modo di preparazione e componenti essenziali	Titolo minimo in elementi e/o sostanze utili. Criteri concernenti la valutazione. Altri requisiti richiesti	Elementi oppure sostanze utili il cui titolo deve essere dichiarato. Caratteristiche diverse da dichiarare. Altri requisiti richiesti	Note
Prodotto non fermentato a base di cortecce e/o di altri materiali vegetali, come sanse, pule, bucce con esclusione di alghe e di altre piante marine	Umidità: massimo 50% pH compreso tra 6 e 8,5 C organico sul secco: minimo 40% Azoto organico sul secco: almeno 80% dell'azoto totale Torba: massimo 20% sul tal quale	Umidità pH C organico sul secco Azoto organico sul secco Contenuto in torba sul tal quale Salinità Deve essere dichiarata la granulometria	È consentito dichiarare i titoli in altre forme di azoto, fosforo totale e potassio totale. Il tenore di materiale plastico, eventualmente presente, del diametro fino a 3,33 mm non può superare lo 0,45% sulla sostanza secca. Il tenore di materiale plastico, eventualmente presente, del diametro maggiore di 3,33 mm e minore di 10 mm non può superare lo 0,05% sulla sostanza secca. Il tenore di altri materiali inerti, eventualmente presenti, del diametro fino a 3,33 mm non può superare lo 0,9% sulla sostanza secca. Il tenore di altri materiali inerti, eventualmente presenti, del diametro maggiore di 3,33 mm e minore di 10 mm non può superare lo 0,1% sulla sostanza secca. Materiali plastici ed inerti di diametro superiore a 10 mm devono essere assenti.

### Preparazione

Il substrato ha subito un ulteriore processo di cippatura al fine di ottenere frammenti di dimensioni comprese tra 2 e 5 cm di grandezza, più adeguati al processo di fermentazione in stato solido (Figura 11). Dopo essere stato conservato in laboratorio a temperatura ambiente per 2 settimane, il materiale è stato idratato secondo la procedura 2. Centoventicinque g di substrato idratato sono stati inseriti nei vasi microbox.



**Figura 11** - Substrato AVSNC prima della procedura di idratazione

#### 1.3.1.4 Substrato Aziendale Iside per *Spawn* (SAIS)

##### Composizione e provenienza

Il substrato è stato preparato in laboratorio con materiale proveniente dall'Azienda Agricola Iside (Sulzano, BS, Italia). L'azienda ha fornito due materiali diversi: un materiale prevalentemente legnoso e fresco e un materiale erbaceo secco. Il materiale legnoso era composto da interi alberi di orniello, *Fraxinus ornus*, e carpino, *Ostrya carpinifolia*, tagliati nel bosco aziendale, mentre il materiale erbaceo era composto da erba medica, *Medicago sativa*, coltivata e raccolta per il foraggio animale. Entrambe i materiali sono stati raccolti, cippati e conservati (il materiale legnoso per un mese e il materiale erbaceo per tre) all'interno dell'azienda fino al loro utilizzo.

##### Preparazione

Il materiale fornito dall'azienda agricola è stato setacciato con un setaccio da 2,5 mm e mescolato in proporzione 1:1, ossia 305 g di materiale legnoso e 305 g di materiale erbaceo. Il substrato ottenuto è stato idratato seguendo la procedura 3. Nelle due diverse ripetizioni dell'esperimento, avendo il substrato di partenza un diverso livello di idratazione, sono stati aggiunti diversi quantitativi di acqua per ottenere lo stesso grado di idratazione: nella prima sono stati aggiunti 700 mL di acqua, mentre nella seconda sono stati aggiunti 1200 mL di acqua. Centoventicinque g di substrato idratato sono stati inseriti all'interno di ciascun vaso microbox (Figura 12).



**Figura 12 A** - Substrato Aziendale Iside per Spawn, visione dall'alto



**Figura 12 B** - Substrato Aziendale Iside per Spawn, visione laterale

#### 1.3.1.5 Segatura, Crusca, Frutta Non Commercializzabile (SCFNC)

##### Composizione e provenienza

Il substrato SCFNC è stato preparato in laboratorio con materiale già ivi presente. Esso è stato realizzato utilizzando l'80% di segatura di scarto (Azienda BricoCenter, Rezzato, BS, Italia), il 10% di crusca proveniente dall'azienda Bongiovanni (Villanova Mondovi, CN, Italia) e il 10% di frutta non più commercializzabile (Cooperativa Sociale Cauto, BS, Italia). La frutta è stata sminuzzata mediante l'utilizzo di un frullatore (*Waring commercial*) e mescolata alle altre componenti del substrato di fermentazione.

##### Preparazione

Il substrato è stato idratato seguendo la procedura 3: a 500 g di substrato secco sono stati aggiunti 1000 mL di acqua (rapporto substrato:acqua 1:2). In Figura 13 viene mostrato il substrato alla fine del processo di idratazione. Centoventicinque g del miscuglio idratato sono stati inseriti nei vasi microbox.



**Figura 13** - Substrato Segatura, Crusca e Frutta Non Commercializzabile appena idratato

### 1.3.2 Inoculo

L'inoculazione di *Pleurotus ostreatus* in ogni substrato utilizzato per la produzione di *spawn* è avvenuta sotto cappa a flusso laminare in condizioni sterili con diverse metodologie, come riportato nella Tabella 4.

**Tabella 4** - Modalità di inoculo e substrati di crescita testati negli esperimenti di fermentazione in stato solido: ogni X indica l'utilizzo di una determinata metodologia di inoculo per substrato.

	Coltura fungina solida		Coltura fungina liquida
	Omogenato	Tasselli	
<b>MB</b>	X	X	X
<b>CC</b>	X		
<b>CO</b>	X		
<b>AVSNC</b>	X		
<b>SAIS</b>	X	X	X
<b>SCFNC</b>	X		

Substrati: Miglio Bianco (MB), Cippato di Carpino (CC), Cippato di Orniello (CO), Ammendante Vegetale Semplice Non Compostato (AVSNC), Substrato Aziendale Iside per *Spawn* (SAIS), Segatura, Crusca, Frutta Non Commercializzabile (SCFNC)

#### 1.3.2.1 Omogenato di coltura fungina solida

Tutti i substrati oggetto di questo lavoro di tesi sono stati inoculati utilizzando un omogenato di *P. ostreatus* cresciuto su una piastra di PDA fino a completa copertura. In dettaglio, il fungo è stato inoculato al centro di una piastra Petri di diametro 90 mm contenente PDA ed incubato a 24°C per 7 giorni. L'agar interamente colonizzato dal fungo è stato omogenato in 25 mL di acqua sterile per mezzo di un frullatore (*Waring Blender*). Per ogni vaso microbox contenente 125 g di substrato, sono stati inoculati con pipetta sterile 5 mL di omogenato. In Figura 14 viene riportato un momento della fase di inoculo dell'omogenato di coltura fungina solida.



**Figura 14** - Prelievo di 5 mL di omogenato di coltura fungina

### 1.3.2.2 Tasselli di coltura fungina solida

I substrati MB e SAIS sono stati inoculati, inoltre, mediante tasselli di coltura fungina solida. Una colonia giunta a completa colonizzazione del PDA in piastra Petri di diametro 90 mm è stata frammentata con bisturi in tasselli di dimensioni di 3-6 mm (Figura 15). In ogni vaso microbox contenente 125 g di MB e di SAIS è stato inoculato un  $\frac{1}{4}$  di colonia suddiviso in tanti tasselli delle dimensioni sopra riportate. I frammenti sono stati inoculati sui substrati per mezzo di pinzette sterilizzate con alcool e bunsen.



**Figura 15** - Divisione in quarti della piastra Petri e preparazione dei tasselli con bisturi

### 1.3.2.3 Coltura fungina liquida

I substrati MB e SAIS sono stati inoculati anche mediante coltura liquida. Il terreno di crescita utilizzato per la coltura liquida è stato il *Potato Dextrose Broth* (PDB), composto da 4,0 g/L di estratto di patata e 20,0 g/L di destrosio. Il substrato è stato preparato sciogliendo 3,6 g di PDB in 150 mL di acqua sterile e aggiungendovi un inoculo di *P. ostreatus* PO56825 sottoforma di omogenato di coltura fungina solida (come riportato nel paragrafo 1.3.2.1). La coltura liquida è stata incubata a 24°C in agitazione per 48 ore a 150 rpm. Cinque mL della coltura liquida sono stati inoculati in substrato MB e SAIS. In Figura 16 viene mostrato un particolare di micelio in coltura liquida visualizzato al microscopio ottico Leica DM 1000 equipaggiato con camera ICC50.



**Figura 16** - Micelio di *P. ostreatus* in coltura liquida dopo 2 giorni di crescita, osservato a microscopio ottico con ingrandimento 40X

### 1.3.3 Procedura

Per ogni esperimento sono state preparate quattro repliche identiche di vasi microbox: tre sono state inoculate con *P. ostreatus* e una non inocolata è stata utilizzata come controllo, come mostrato in Figura 17.



*Figura 17 - Disegno sperimentale tipico: tre ripetizioni inoculate e una di controllo priva di inoculo fungino*

Prima di essere inoculati tutti i substrati sono stati sterilizzati nei vasi microbox in autoclave a una temperatura di 121°C per 15 minuti. I substrati CC, CO, AVSNC e SCFNC hanno subito due cicli di sterilizzazione, mentre i substrati MB e SAIS solo uno.

I substrati contenuti nei vasi microbox sono stati inoculati con *P. ostreatus* con le metodologie riportate nella Tabella 4 e successivamente sono stati posti all'interno di un incubatore alla temperatura di 24°C, al buio. Il periodo di incubazione è variato da 10 giorni a 3 settimane a seconda del substrato e della modalità di inoculo utilizzata.

### 1.3.4 Metodologia di valutazione

La valutazione della colonizzazione dei differenti substrati ad opera di *P. ostreatus* è avvenuta mediante osservazione della crescita fungina ottenuta alla fine del periodo di incubazione e mediante la verifica della capacità delle *spawn* prodotte di sostenere la fase di fruttificazione.

La compenetrazione del micelio all'interno del substrato rendeva impossibile separare la biomassa fungina dal substrato, rendendo così irrealizzabile una valutazione tramite quantificazione in grammi del peso fresco o del peso secco di *P. ostreatus*.

#### 1.3.4.1 Valutazione visiva della crescita fungina

La valutazione ha tenuto conto di due parametri fondamentali: la velocità di colonizzazione del substrato, misurata in un periodo massimo di 40 giorni di incubazioni ed espressa in giorni come media delle diverse repliche, e la quantità di substrato colonizzato a fine periodo (media delle diverse repliche). Per quantificare quest'ultimo parametro è stata utilizzata la seguente scala di valutazione:

**Tabella 5** - Scala di valutazione della colonizzazione.

	Substrato interamente non colonizzato: 0%		
-			
	Substrato colonizzato tra l'1% e il 49%		
+			
	Substrato colonizzato tra il 50% e il 99%		
++			
	Substrato interamente colonizzato: 100%		
+++			

#### 1.3.4.2 Valutazione dell'idoneità della *spawn* a fini produttivi

##### Spawn testate

Le *spawn* che sono state valutate per la loro capacità di sostenere la fase di fruttificazione sono state quelle prodotte con substrato MB e SAIS ed inoculate con tasselli di coltura fungina solida.

##### Substrato

Il materiale utilizzato come substrato per la produzione di corpi fruttiferi di *Pleurotus ostreatus* è stato il Substrato Aziendale Iside per Fruttificazione (SAIF) proveniente dall'Azienda Agricola Iside (Figura 18). Il materiale era composto in quantità volutamente non note da cippato di intere piante vive di carpino, *Ostrya carpinifolia*, e orniello, *Fraxinus ornus*, tagliati ancora vivi e quindi composti sia da materiale legnoso che da materiale verde. Dopo essere stato raccolto, il materiale è stato cippato in azienda fino a ottenere pezzi di dimensioni di 0,5 – 1,5 cm e successivamente pretrattato con la procedura aziendale.



**Figura 18** - Substrato Aziendale Iside per Fruttificazione

##### Pretrattamento

Il pretrattamento aziendale ha previsto una procedura a due fasi: Appena cippato, il materiale è stato inserito in una tanica di plastica da 1000 L e completamente immerso d'acqua. In questa fase le fermentazioni generate hanno portato il pH a un valore di 3.5-4.5 (misurazioni aziendali). Dopo una settimana, sono stati aggiunti circa 500 g di calce idrata che hanno portato il pH a un valore 12 per poche ore, nei giorni successivi il pH si è stabilizzato su un valore medio 7.

## Contenitori

I contenitori utilizzati nella fase di fruttificazione sono stati dei barattoli di plastica (Auer Packaging, Amerang, Germania) appositamente forati dall'azienda agricola Iside: barattoli da 4,4 L, 5,6 L, 7,4 L e 8,6 L con fori di diametro tra i 10 e i 14 mm ogni 10-15 cm. I fori avevano il doppio scopo di far entrare l'aria e consentire a *P. ostreatus* di fruttificare.

## Tipologia, metodologia e percentuale di inoculo

Le *spawn* prodotte con SSF su MB e SAIS sono state utilizzate come inoculo per la produzione di corpi fruttiferi, con una percentuale del 10% sul peso totale.

La procedura di inoculo dei substrati per la fruttificazione è stata quella aziendale: si è operato in un contesto aperto con guanti, mascherina, e cuffia per i capelli, per cercare di limitare il più possibile le contaminazioni provenienti dall'operatore. La postazione è stata preparata posizionando su un piano comodo una bilancia da mercato, alcool, scottex, vasi microbox di *spawn* ancora chiusi e sterili e una cassetta forata contenente il substrato da inoculare appena prelevato dalla cisterna da 1000 L e lasciato scolare qualche minuto per fare in modo che perdesse l'acqua in eccesso. In Figura 19 viene riportato il momento in cui viene prelevato il substrato.

Ogni contenitore di plastica forato, prima dell'uso, è stato quindi pulito con alcool e scottex, posizionato sulla bilancia e riempito a strati: uno strato di substrato e uno strato di *spawn* (Figura 20). Il criterio con cui sono stati effettuati i diversi strati all'interno del barattolo è stato quello di mantenere costanti le proporzioni in peso di *spawn*:substrato, tale da avere un rapporto di 1:10. A seconda della grandezza dei contenitori di plastica aziendali disponibili, sono stati utilizzati uno o più vasi di *spawn* per riuscire a riempire completamente il contenitore. In ognuno di essi è stato poi lasciato uno strato finale d'aria di altezza variabile da 1 a 3 cm. Il peso finale di ogni barattolo varia a seconda della grandezza del contenitore stesso: in contenitori da 4,4 L il peso finale del substrato sommato alla *spawn* è stato di 1250g, in contenitori da 5,6 L 2500 g, in contenitori da 7,4 L 4000 g, in contenitori da 8,6 L 5000g.



**Figura 19** - Prelievo del substrato di fruttificazione dalla tanica da 1000 L a fine pretrattamento



**Figura 20** - Inoculo di *spawn* di *P. ostreatus* su substrato SAIF

### Incubazione

Una volta inoculati i barattoli sono stati chiusi con dei coperchi e incubati nella cantina aziendale, ad una temperatura di circa 16/17 °C. Dopo i primi 7 giorni è stato aperto il coperchio per verificare il livello di colonizzazione e contaminazione. Tale operazione è stata ripetuta dopo 14 e 26 giorni dall'inoculazione. I substrati, ritenuti pronti poiché interamente colonizzati, sono passati in ambiente controllato di fruttificazione.

### Fruttificazione

La fase di fruttificazione è avvenuta in una serra controllata, con rilevatori di umidità e temperatura (Figura 21). La temperatura minima rilevata è stata di 16,3 °C, quella massima di 19,4°C. L'umidità relativa minima rilevata è stata del 37%, quella massima del 84%. Una striscia di lampade a led di 1250 lumen totali è stata collegata ad un timer per consentire di esporre i barattoli a 12 ore di luce e 12 ore di buio.

Il ricircolo d'aria è stato effettuato manualmente aprendo la serra per 30 minuti ogni giorno.

L'umidità è stata generata mediante un *Mist Maker* dell'Azienda Neptune Hydroponics (Valencia, Spagna), azionato per 120 minuti al giorno dopo la fase di arieggiamento.

### Raccolta

Il prodotto finale fresco è stato raccolto manualmente e pesato con una bilancia da cucina, come mostrato in Figura 22.



**Figura 21** - Barattoli con substrato SAIF inoculati con spawn prodotte su substrati SAIS e MB



**Figura 22** - Pesatura di corpi fruttiferi freschi di *P. ostreatus*

### Analisi sensoriale organolettica

Per verificare l'idoneità del prodotto finale a scopo commerciale è stato organizzato un *panel test* di consumatori, ovvero un'analisi sensoriale cieca eseguita da un gruppo misto di persone. Il *panel test* organizzato rientra nella categoria dei test affettivi, ovvero quei test in cui vengono indagate le sensazioni personali dei consumatori allo scopo di valutare la loro risposta al prodotto alimentare.

Al *panel test* hanno partecipato 9 persone, 6 uomini e 3 donne, e sono stati valutati 2 differenti prodotti: i corpi fruttiferi di *Pleurotus ostreatus* coltivati su substrato SAIF e inoculati con *spawn* autoprodotta e i corpi fruttiferi di *Pleurotus ostreatus* prodotti dall'azienda Fungamico (Isola della Scala, VR, Italia) e venduti presso il supermercato Esselunga (Brescia, Italia). I funghi sono stati cotti per 13 minuti a fuoco lento con la sola aggiunta di acqua all'occorrenza.

Ogni partecipante ha compilato una scheda d'assaggio per valutare l'intensità del gusto e la persistenza, e per poter dare un giudizio complessivo sull'assaggio, con la possibilità di inserire note personali.

## 4 RISULTATI

### 4.1 Substrati

#### 4.1.1 Preparazione: idratazione e sterilizzazione

Tutte le procedure di idratazione utilizzate hanno dato risultati soddisfacenti: i substrati erano sufficientemente idratati per consentire la crescita di *P. ostreatus*. Inoltre, l'assenza di acqua libera ha ridotto la probabilità di contaminazioni o problemi dati dall'eccesso di acqua, quali l'assenza di ossigeno negli strati più profondi del substrato.

Negli esperimenti preliminari di idratazione del substrato Miglio Bianco il rapporto substrato:acqua risultato ottimale è stato quello 1:1,5. Le altre prove (1:2, 1:2,5 e 1:1:3) sono risultate non idonee poiché il substrato, a seguito del processo di sterilizzazione, risultava compatto e non poroso a causa della perdita di integrità dei chicchi.

Per quanto riguarda il Substrato Aziendale Iside per *Spawn* (SAIS), *P. ostreatus* è cresciuto sia sui substrati idratati con una quantità minore (700 mL) che con una quantità superiore di acqua (1200 mL).

Nessuna crescita microbica è stata rilevata sui substrati sterilizzati e non inoculati con il fungo. Il processo di sterilizzazione effettuato attraverso uno o due cicli di autoclave ha garantito in tutti gli esperimenti di produzione di *spawn* la totale sterilità del substrato, permettendo la crescita in purezza del fungo inoculato.

#### 4.1.2 Valutazione visiva della crescita fungina

Per valutare l'idoneità dei substrati alla crescita fungina e stabilire quali fossero i più adatti alla produzione di *spawn* di *Pleurotus ostreatus* sono stati effettuati degli esperimenti di crescita in cui sono stati testati tutti i substrati a disposizione. Nella Tabella 6 è riportato l'elenco dei substrati e i relativi risultati ottenuti inoculando il substrato mediante omogenato di coltura fungina solida.

La valutazione ha tenuto conto di due parametri fondamentali: la velocità di colonizzazione del substrato, misurata in un periodo massimo di 40 giorni di incubazioni ed espressa in giorni come media delle diverse repliche, e la quantità di substrato colonizzato a fine periodo (media delle diverse repliche).

**Tabella 6 - Efficienza di crescita di *P. ostreatus* su differenti substrati**

<b>Omogenato di coltura fungina solida</b>		
	Velocità di colonizzazione (giorni)	Quantità di substrato colonizzato
<b>MB</b>	9	+++
<b>CC</b>	22	+++
<b>CO</b>	28	+++
<b>AVSNC</b>	10	+++
<b>SAIS</b>	16,3	+++
<b>SCFNC</b>	40	-

Substrati: Miglio Bianco (MB), Cippato di Carpino (CC), Cippato di Orniello (CO), Ammendante Vegetale Semplice Non Compostato (AVSNC), Substrato Aziendale Iside per *Spawn* (SAIS), Segatura, Crusca, Frutta Non Commercializzabile (SCFNC)

- : substrato interamente non colonizzato: 0%

+++ : substrato interamente colonizzato, micelio fitto: 100%

Come è riportato in Tabella 6, la crescita di *P. ostreatus* ha avuto luogo su tutti i substrati testati raggiungendo la piena colonizzazione della biomassa utilizzata (100%), tranne nel substrato SCFNC.

Il miglior substrato in termini di velocità e superficie di colonizzazione è stato il Miglio Bianco (MB), su cui il fungo ha raggiunto la completa colonizzazione in soli 9 giorni, estendendo la sua crescita sulle pareti del vaso microbox, nei giorni successivi, come si può osservare nella Figura 23.

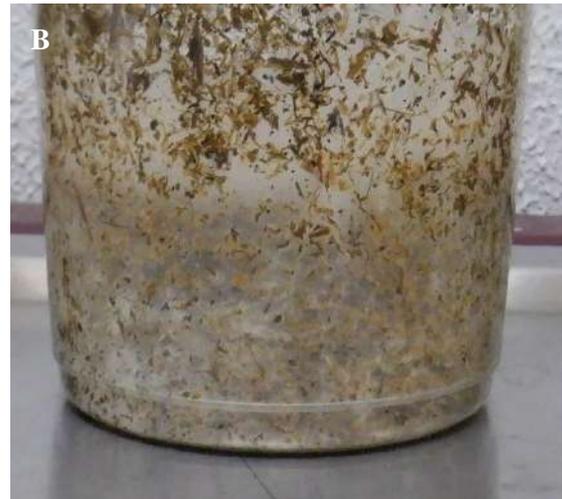


**Figura 23 A** - Crescita di *P. ostreatus* su substrato MB dopo 11 giorni, visione dall'alto



**Figura 23 B** - Crescita di *P. ostreatus* su substrato MB dopo 11 giorni, visione laterale

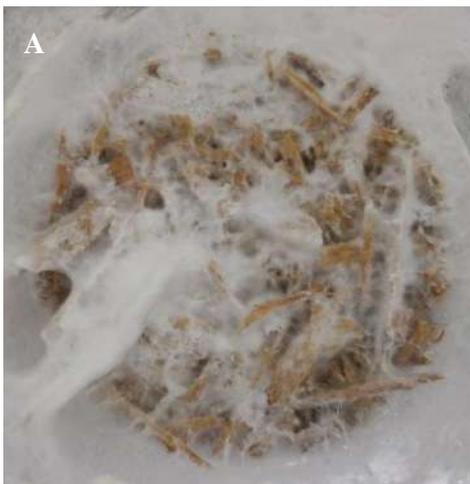
La crescita di *P. ostreatus* è risultata ottimale anche su altri due substrati: l'Ammendante Vegetale Semplice Non Compostato (AVSNC) e il Substrato Aziendale Iside per *Spawn* (SAIS). *P. ostreatus* ha infatti raggiunto in tempi brevi, 10 giorni per AVSNC e 16,3 giorni per SAIS, una colonizzazione completa e fitta del substrato, rendendolo idoneo a un suo utilizzo come *spawn* (Figura 24).



**Figura 24 A** - Crescita di *P. ostreatus* su substrato SAIS dopo 15 giorni, visione dall'alto

**Figura 24 B** - Crescita di *P. ostreatus* su substrato SAIS dopo 15 giorni, visione laterale

La crescita fungina su substrati di essenze pure, Cippato di Carpino (CC) e Cippato di Orniello (CO), è risultata più lenta, raggiungendo la colonizzazione completa in 22 giorni su CC e 28 giorni su CO; in entrambe i casi la colonizzazione era omogenea e fitta (Figura 25).



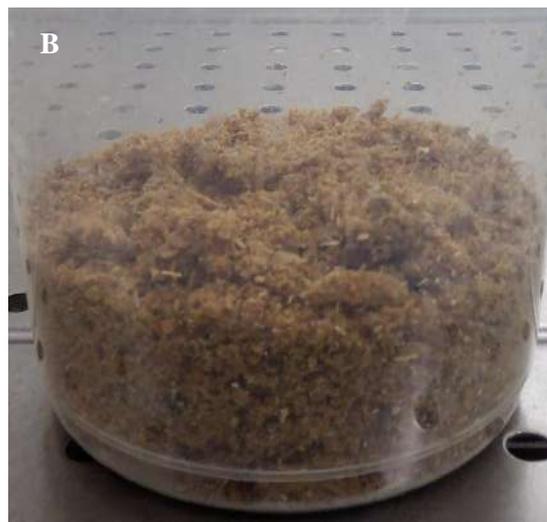
**Figura 25 A** - Crescita di *P. ostreatus* su substrato CO dopo 32 giorni, visione dall'alto

**Figura 25 B** - Crescita di *P. ostreatus* su substrato CO dopo 32 giorni, visione laterale

Diversamente, sul substrato composto da Segatura, Crusca e Frutta Non Commercializzabile (SCFNC) *P. ostreatus* non è cresciuto in nessuna delle repliche delle due ripetizioni dell'intero processo di SSF durante i 40 giorni di incubazione. In Figura 26 è possibile notare l'assenza di crescita del substrato inoculato con *P. ostreatus* a termine dell'esperimento. In Figura 26 A, è possibile notare una macchia chiara che indica il punto di inoculo dell'omogenato che non è riuscito a svilupparsi.



**Figura 26 A** - Crescita di *P. ostreatus* su substrato SCFNC dopo 40 giorni, visione dall'alto. La freccia indica l'inoculo del fungo



**Figura 26 B** - Crescita di *P. ostreatus* su substrato SCFNC 40 giorni, visione laterale

## 4.2 Inoculo

Stabiliti quali fossero i substrati che supportano la crescita di *P. ostreatus*, mediante inoculo di omogenato di coltura fungina solida, sono testate diverse metodologie di inoculo per verificare quali fossero le più adatte alla propagazione del fungo: i tasselli di coltura fungina solida e la coltura liquida. I substrati utilizzati sono stati scelti tra quelli che hanno ottenuto i risultati migliori: MB e SAIS.

### 4.2.1 Valutazione visiva della crescita fungina

I parametri di valutazione utilizzati sono stati i medesimi usati per la valutazione di idoneità del substrato (paragrafo 1.3.4.1).

Nella Tabella 7 sono riportati i risultati ottenuti con inoculo di tasselli di coltura fungina solida e inoculo di coltura fungina liquida confrontati con inoculo di omogenato di coltura fungina solida già riportato nella tabella precedente.

**Tabella 7 - Valutazione dell'inoculo**

	Coltura fungina solida				Coltura fungina liquida	
	Omogenato		Tasselli			
	Velocità di colonizzazione (giorni)	Quantità di substrato colonizzato	Velocità di colonizzazione (giorni)	Quantità di substrato colonizzato	Velocità di colonizzazione (giorni)	Quantità di substrato colonizzato
<b>SAIS</b>	16,3	+++	12,5	+++	18*	+++
<b>MB</b>	9	+++	8	+++	40	+

Substrati: Miglio Bianco (MB), Substrato Aziendale Iside per *Spawn* (SAIS)

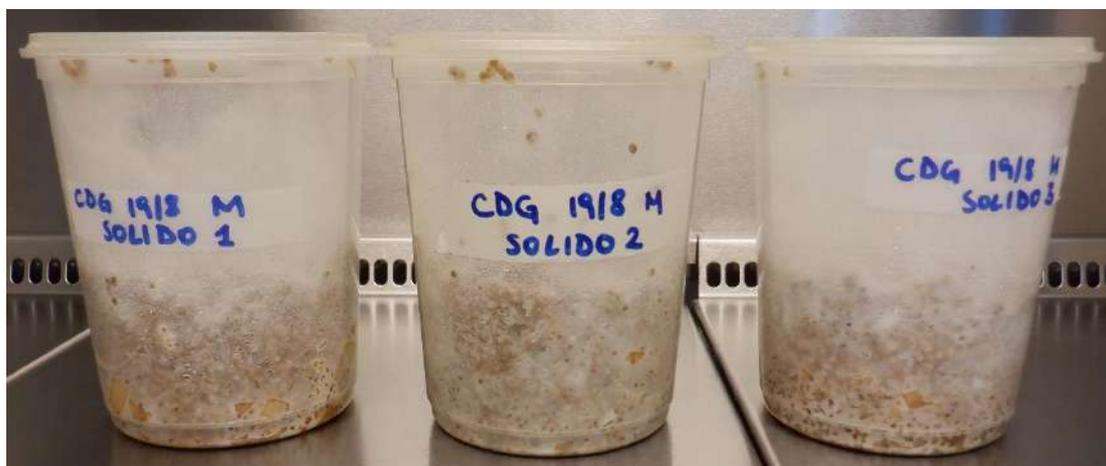
- : substrato interamente non colonizzato: 0%

+ : substrato colonizzato tra l'1 e il 49%

+++ : substrato interamente colonizzato, micelio fitto: 100%

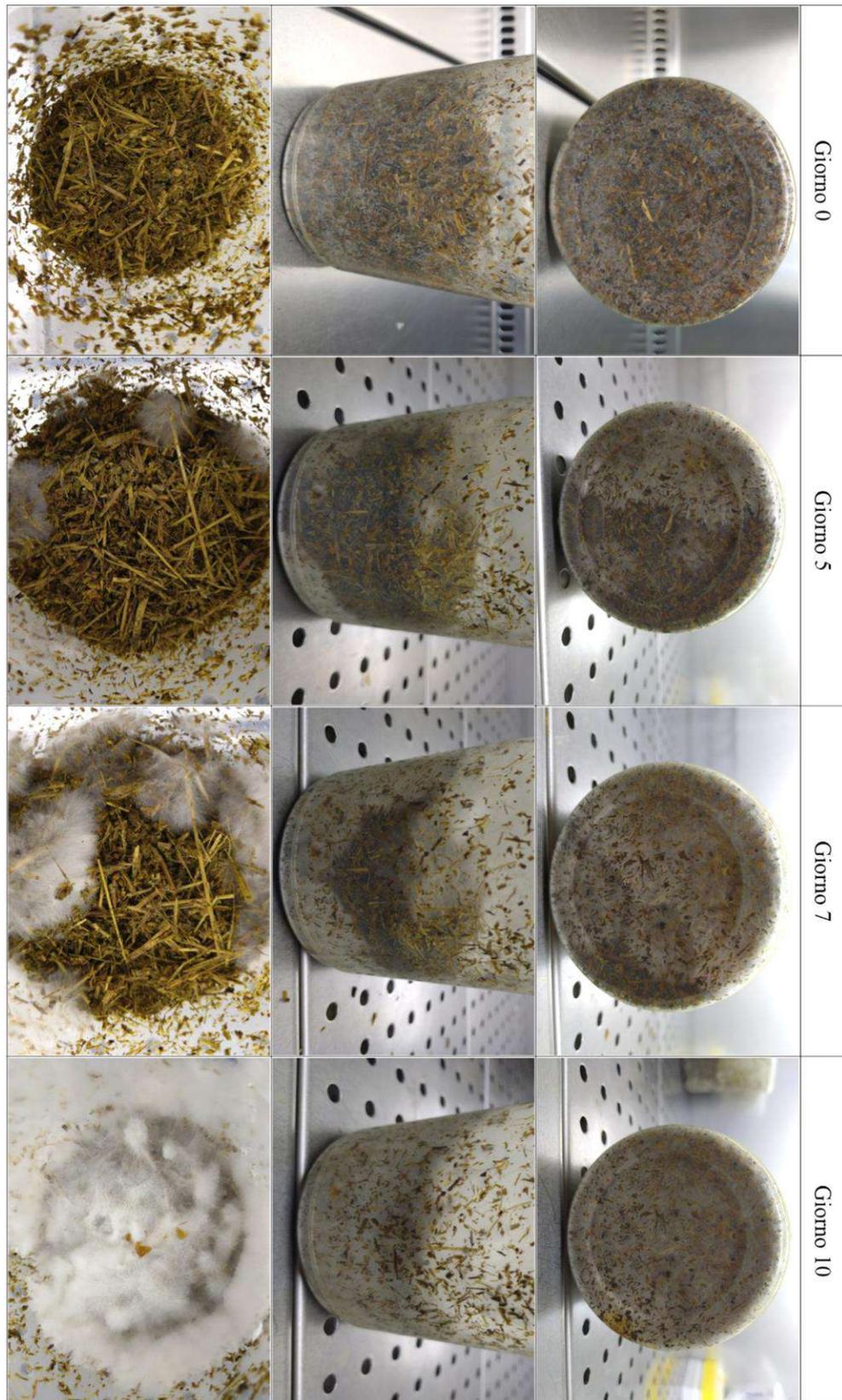
\* di cui 2 di crescita in liquido

Come si evidenzia in Tabella 7, *P. ostreatus*, inoculato mediante tasselli, ha colonizzato interamente il Miglio Bianco (MB), controllo positivo della sperimentazione, in 8 giorni, confermando quanto osservato sul medesimo substrato inoculato mediante omogenato. In Figura 27 è visibile la crescita del fungo dopo 8 giorni dall'inoculazione mediante tassello.



**Figura 27 - Crescita di *P. ostreatus* su substrato MB dopo 8 giorni**

Il fungo, inoculato mediante tasselli di coltura fungina solida, ha colonizzato completamente il substrato SAIS in 12,5 giorni, rispetto a 16,3 giorni mediante omogenato, confermandosi anche su questo materiale l'inoculo più efficiente in termini di velocità di crescita. In Figura 28 viene riportata la crescita progressiva nel tempo di *P. ostreatus* su substrato SAIS inoculato con tasselli. È interessante notare come la crescita non sia uniforme all'interno del substrato, ma dipenda dalla posizione casuale dei tasselli all'interno del vaso microbox: al quinto giorno, per esempio, *P. ostreatus*, ha colonizzato il 50% del fondo del contenitore, mentre, nello stesso lasso di tempo, ha colonizzato solo una porzione molto ridotta della parte superficiale.



*Figura 28 - Crescita progressiva nel tempo di P. ostreatus su substrato SAIS.  
Dall'alto al basso, visione da sotto, laterale e dall'alto*

Per quanto riguarda l'inoculo mediante coltura fungina liquida, sono stati ottenuti risultati su substrato SAIS paragonabili a quelli ottenuti con omogenato di coltura fungina solida: *P. ostreatus* ha colonizzato completamente il substrato in 18 giorni, di cui 2 su terreno liquido e 16 su substrato finale. Nella Figura 29 vengono riportate le diverse repliche: è interessante notare come la seconda replica mostri una crescita molto densa di *P. ostreatus*, che già al sedicesimo giorno aveva completato la colonizzazione del substrato, mentre nella terza replica manchi ancora una piccola porzione di substrato da colonizzare, in basso a sinistra, che verrà ultimata al ventesimo giorno.

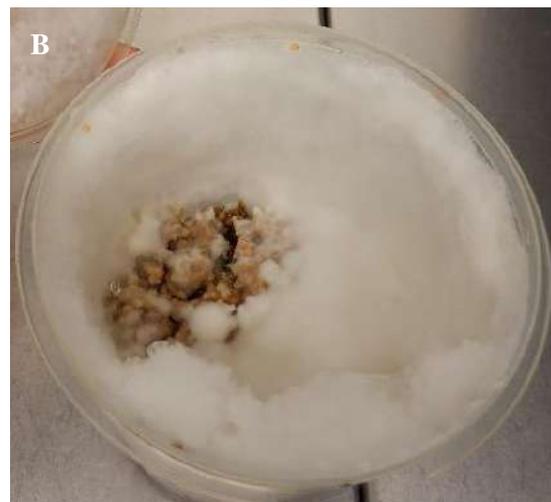


**Figura 29** - Crescita di *P. ostreatus* su substrato SAIS dopo 16 giorni dall'inoculazione

Diversamente, utilizzando l'inoculo di coltura fungina liquida su substrato MB, il fungo non è riuscito a colonizzarlo interamente, attestandosi su una porzione inferiore al 50% a fine esperimento, cioè dopo 40 giorni dall'inoculo (Figura 30). Durante questo periodo di incubazione, il fungo è notevolmente cresciuto nella parte superficiale del substrato, arrivando a ricoprire le pareti e il coperchio del vaso microbox, come mostrato in Figura 30 B.



**Figura 30 A** - Crescita di *P. ostreatus* su substrato MB dopo 40 giorni, visione da sotto



**Figura 30 B** - Crescita di *P. ostreatus* su substrato MB dopo 40 giorni, visione dall'alto



**Figura 30 C** - Crescita di *P. ostreatus* su substrato MB dopo 40 giorni, visione laterale

La crescita fungina è risultata, quindi, più rapida e abbondante sui substrati MB e SAIS inoculati mediante tasselli di coltura fungina solida e per questo essi sono stati utilizzati come *spawn* negli esperimenti di produzione di corpi fruttiferi.

#### 4.3 Idoneità della *spawn* a fini produttivi

Le *spawn* prodotte su substrato MB e SAIS sono state inoculate su substrato SAIF e sono state tutte in grado di supportare la colonizzazione del substrato di fruttificazione e la produzione di corpi fruttiferi.

Nella maggior parte dei casi i corpi fruttiferi si presentavano come “grappoli” da 15-20 funghi e non come singoli funghi. Al momento del raccolto, i corpi fruttiferi avevano raggiunto la maturazione, riconoscibile grazie allo sviluppo delle lamelle.

In Figura 31 viene riportata la crescita progressiva nel tempo dei corpi fruttiferi di *P. ostreatus* sulla replica SAIS 3: dalla comparsa dei primi primordi si ha una maturazione completa dei funghi in 8 giorni. Le immagini mostrano la progressiva maturazione del fungo con comparsa delle lamelle e apertura del cappello.



**Figura 31** - Progressione nel tempo della crescita di corpi fruttiferi di *P. ostreatus*

### 4.3.1 Colonizzazione del substrato

La quantità di substrato di fruttificazione colonizzato da *P. ostreatus* è stata differente a seconda degli esperimenti, come mostrato in Tabella 8. *P. ostreatus* è stato in grado di colonizzare il 100% delle prove effettuate con SAIS 1, SAIS 2, MB 1, MB 2 e MB 3, mentre si è attestato tra il 50 e il 99% nelle prove con SAIS 3, SAIS 4, SAIS 5.

**Tabella 8** - Colonizzazione del substrato SAIF

<b>Spawn utilizzata</b>	<b>Quantità di substrato colonizzato</b>
<b>SAIS 1</b>	+++
<b>SAIS 2</b>	+++
<b>SAIS 3</b>	++
<b>SAIS 4</b>	++
<b>SAIS 5</b>	++
<b>MB 1</b>	+++
<b>MB 2</b>	+++
<b>MB 3</b>	+++

Substrati: Miglio Bianco (MB), Substrato Aziendale Iside per *Spawn* (SAIS)

++ : substrato colonizzato tra il 50 e il 99%

+++ : substrato interamente colonizzato, micelio fitto: 100%

In Figura 32 viene messa a confronto la parte superficiale di due barattoli inoculati rispettivamente con SAIS 1 (Figura 32 A) e SAIS 3 (Figura 32 B) dopo 25 giorni di incubazione: nella Figura 32 A è possibile osservare come *P. ostreatus* abbia colonizzato interamente il substrato, mentre nella Figura 32 B si osserva come la crescita del fungo non sia omogenea, ma intervallata da aree colonizzate da un altro fungo che presenta una pigmentazione verde e una morfologia caratteristica delle specie appartenenti al genere *Trichoderma*, parassita di *P. ostreatus*.



**Figura 32 A** - Crescita di *P. ostreatus* su substrato SAIF inoculato con SAIS 1. Vista dall'alto dopo 25 giorni di incubazione: crescita omogenea e priva di contaminazioni



**Figura 32 B** - Crescita di *P. ostreatus* su substrato SAIF inoculato con SAIS 3. Vista dall'alto dopo 25 giorni di incubazione: crescita disomogenea dovuta a contaminazione da *Trichoderma* spp.

In Figura 33 viene mostrato un particolare della crescita di *Trichoderma* spp. sul substrato di fruttificazione.



**Figura 33** - Crescita di *Trichoderma* spp e *P. ostreatus* su substrato SAIF

### 4.3.2 Produzione di corpi fruttiferi

La fruttificazione è avvenuta in tutti gli esperimenti, come mostrato in Tabella 9.

Nelle prove con *spawn* SAIS 1, SAIS 2, MB 1, MB 2 e MB 3 *P. ostreatus* è stato in grado di compiere due cicli di fruttificazione nel periodo testato (60 giorni dall'inoculo della *spawn*). Nelle repliche SAIS 3, SAIS 4 e SAIS 5, *P. ostreatus* non è riuscito a compiere il secondo ciclo di fruttificazione, probabilmente, a causa della crescita di *Trichoderma* spp. mostrata nel paragrafo 4.3.1 e alla contemporanea presenza di *Drosophila melanogaster* nell'ambiente di fruttificazione.

**Tabella 9** - Cicli di fruttificazione portati a termine nelle diverse prove

<b>Spawn utilizzata</b>	<b>Fruttificazione</b>	
	<b>Primo ciclo</b>	<b>Secondo ciclo</b>
<b>SAIS 1</b>	+	+
<b>SAIS 2</b>	+	+
<b>SAIS 3</b>	+	-
<b>SAIS 4</b>	+	-
<b>SAIS 5</b>	+	-
<b>MB 1</b>	+	+
<b>MB 2</b>	+	+
<b>MB 3</b>	+	+

Substrati: Miglio Bianco (MB), Substrato Aziendale Iside per *Spawn* (SAIS)

- : assenza corpi fruttiferi

+ : presenza corpi fruttiferi

In Tabella 10 sono riportati i grammi di peso fresco di *P. ostreatus* rapportati ai chili di substrato di fruttificazione, che include il peso della *spawn* (10%) e quello del substrato SAIF.

Nelle prove che hanno portato a termine due cicli di fruttificazione il valore totale del peso fresco dei corpi fruttiferi raccolti oscilla tra i 56,8 e i 72 g/kg con *spawn* SAIS e tra i 67,6 e i 99 g/kg con *spawn* MB. Tra un ciclo di fruttificazione e l'altro è stato riscontrato nella maggior parte dei casi un aumento di peso nel secondo ciclo, pari a + 7,2 g/kg nella prova con SAIS 1, + 19,2 g/kg con SAIS 2, + 37,2 g/kg con MB 1. Contrariamente, nella prova con MB 2 è stato registrato un calo pari a - 18,4 g/kg. Nella prova con *spawn* MB 3 è stato registrato in entrambe i cicli un risultato simile, 49,2 g/kg nel primo ciclo e 49,8 g/kg nel secondo ciclo.

Nelle repliche in cui è stato registrato solo un ciclo di fruttificazione (SAIS 3, 4, 5) il peso del raccolto è variato da 15,5 a 22,5 g/kg.

**Tabella 10** - Prove di fruttificazione di *P. ostreatus* su substrato SAIF. I risultati sono espressi in g/kg di peso fresco raccolto su kg di peso totale del substrato di fruttificazione iniziale

<b>Spawn utilizzata</b>	<b>Primo ciclo di fruttificazione (g/kg)</b>	<b>Secondo ciclo di fruttificazione (g/kg)</b>	<b>Totale (g/kg)</b>
<b>SAIS 1</b>	24,8	32	56,8
<b>SAIS 2</b>	26,4	45,6	72
<b>SAIS 3</b>	22,5	/	22,5
<b>SAIS 4</b>	15,5	/	15,5
<b>SAIS 5</b>	19,5	/	19,5
<b>MB 1</b>	15,2	52,4	67,6
<b>MB 2</b>	53,2	34,8	88
<b>MB 3</b>	49,2	49,8	99

Substrati: Substrato Aziendale Iside per *Spawn* (SAIS), Miglio Bianco (MB)

In Tabella 11 vengono invece riportati il peso del substrato di fruttificazione iniziale di ogni prova, costituito dal substrato SAIF e dalla *spawn*, e i pesi dei corpi fruttiferi, espressi in grammi, per ogni ciclo di raccolto. È possibile evidenziare come le prove effettuate con un substrato di fruttificazione iniziale di 1250 g, inoculato con SAIS 1 e SAIS 2, abbia portato a un raccolto di 71 e 90 g, pari rispettivamente al 5,7 e al 7,2 % di resa.

Le repliche inoculate con *spawn* MB 1 e MB 2, dal peso del substrato di fruttificazione iniziale di 2500 g, hanno portato a un raccolto rispettivamente di 169 g (6,8%) e 220 g (8,8 %).

La prova effettuata inoculando con *spawn* MB 3 è stata l'unica ad avere un peso del substrato di fruttificazione iniziale di 5000 g ed un raccolto complessivo di 495 g pari al 9,9 % di resa.

Le repliche inoculate con *spawn* SAIS 3, 4 e 5 avevano un peso del substrato di fruttificazione iniziale di 4000g e hanno portato, dopo un solo ciclo di fruttificazione, a un raccolto che varia dai 62 g (1,6 %) ai 90 g (2,3 %).

**Tabella 11** - Prove di fruttificazione di *P. ostreatus* su substrato SAIF. I risultati sono espressi in g di peso fresco

<b>Spawn utilizzata</b>	<b>Substrato di fruttificazione iniziale(g)</b>	<b>Primo ciclo (g)</b>	<b>Secondo ciclo (g)</b>	<b>Totale raccolto (g)</b>
<b>SAIS 1</b>	1250	31	40	71
<b>SAIS 2</b>	1250	33	57	90
<b>SAIS 3</b>	4000	90	/	90
<b>SAIS 4</b>	4000	62	/	62
<b>SAIS 5</b>	4000	78	/	78
<b>MB 1</b>	2500	38	131	169
<b>MB 2</b>	2500	133	87	220
<b>MB 3</b>	5000	246	249	495

Substrati: Substrato Aziendale Iside per *Spawn* (SAIS), Miglio Bianco (MB)

#### 4.3.3. *Analisi sensoriale organolettica*

I risultati del *Panel Test* hanno evidenziato una differenza di gusto tra i funghi coltivati su substrato aziendale SAIF e i funghi comprati al supermercato. Tutti i partecipanti al test, infatti, hanno riscontrato e riferito differenze tra i funghi assaggiati.

In Tabella 12 vengono riportati i risultati relativi all'intensità del gusto dei corpi fruttiferi di *P. ostreatus*, espressi con + (poco intenso), ++ (mediamente intenso) e +++ (molto intenso). Si osserva come i funghi prodotti all'interno di questa tesi (produzione propria) abbiano ottenuto i risultati migliori, con 3 consumatori con giudizio +++ e 4 con ++, contro 1 consumatore con giudizio +++ e 1 con ++ per i funghi prodotti dall'Azienda Fungamico.

**Tabella 12** - Valutazione dell'intensità del gusto di corpi fruttiferi di *P. ostreatus* di diversa provenienza

	<b>Produzione propria</b>	<b>Fungamico</b>
<b>Consumatore 1</b>	+++	+
<b>Consumatore 2</b>	++	+++
<b>Consumatore 3</b>	++	+
<b>Consumatore 4</b>	++	+
<b>Consumatore 5</b>	+++	+
<b>Consumatore 6</b>	+	+
<b>Consumatore 7</b>	+	++
<b>Consumatore 8</b>	++	+
<b>Consumatore 9</b>	+++	+

+: poco, ++: medio, +++: molto

In Tabella 13 vengono riportati i risultati relativi alla persistenza di gusto dopo l'assaggio. Anche in questo caso, i corpi fruttiferi prodotti all'interno di questa tesi hanno ottenuto i commenti migliori: 2 consumatori con giudizio +++ e 2 con ++, contro un consumatore con giudizio +++ e 1 con ++.

**Tabella 13** - Valutazione della persistenza del gusto di corpi fruttiferi di *P. ostreatus* di diversa provenienza

	<b>Produzione propria</b>	<b>Fungamico</b>
<b>Consumatore 1</b>	+++	+
<b>Consumatore 2</b>	+	+++
<b>Consumatore 3</b>	++	+
<b>Consumatore 4</b>	++	+
<b>Consumatore 5</b>	+++	+
<b>Consumatore 6</b>	+	+
<b>Consumatore 7</b>	+	+
<b>Consumatore 8</b>	+	++
<b>Consumatore 9</b>	+	+

+: poco, ++: medio, +++: molto

In Tabella 14 viene invece riportato il giudizio complessivo sull'assaggio: *P. ostreatus* autoprodotta è stata valutata da 5 consumatori come molto buono e da 1 consumatore come mediamente buono, mentre *P. ostreatus* prodotta da Fungamico è stata valutata come molto buono da 3 consumatori e mediamente buono da 2.

**Tabella 14** - Giudizio complessivo sul gusto di corpi fruttiferi di *P. ostreatus* di diversa provenienza

	<b>Produzione propria</b>	<b>Fungamico</b>
<b>Consumatore 1</b>	+++	+
<b>Consumatore 2</b>	+	+++
<b>Consumatore 3</b>	++	+
<b>Consumatore 4</b>	+++	++
<b>Consumatore 5</b>	+++	+
<b>Consumatore 6</b>	+++	++
<b>Consumatore 7</b>	+	+++
<b>Consumatore 8</b>	+	+++
<b>Consumatore 9</b>	+++	+

+: poco buono, ++: mediamente buono, +++: molto buono

Secondo quanto riportato nelle note dai partecipanti del *panel test*, i funghi della specie *Pleurotus ostreatus*, prodotti all'interno di questa tesi, sono risultati avere un sapore più intenso, meno acquoso, poco morbido e più amaro rispetto agli altri funghi. Queste caratteristiche organolettiche hanno contribuito al giudizio positivo espresso da coloro che sono abituati a mangiare funghi e che hanno apprezzato le caratteristiche di intensità e persistenza del gusto. I consumatori che non mangiano regolarmente funghi e non ne gradiscono particolarmente il caratteristico sapore hanno preferito i funghi più insipidi ed acquosi comprati al supermercato.

## 5 DISCUSSIONE

Tra i diversi punti cruciali del processo di coltivazione di funghi alimentari, quello determinante e più difficoltoso da ottimizzare per un'azienda agricola è quello legato alla produzione di *spawn*. Generalmente, le aziende agricole coltivatrici di funghi acquistano questo prodotto all'esterno da aziende specializzate, poiché il bisogno di una specifica strumentazione (cappa a flusso laminare, autoclave) e i rischi collegati al processo rendono difficile la produzione al proprio interno. Per questi motivi, in questo progetto di tesi è stata valutata un'alternativa valida all'acquisto di *spawn* che fosse applicabile in ambito agricolo. A tale scopo è stata messa a punto una procedura che potesse consentire autonomia all'agricoltore anche in questa fase cruciale del processo produttivo. Facilità, sostenibilità ed efficienza del prodotto sono stati i parametri ricercati.

La ricerca condotta in questo lavoro di tesi ha portato alla produzione di una *spawn* di *Pleurotus ostreatus* in grado di colonizzare completamente il substrato aziendale e portarlo alla produzione di corpi fruttiferi.

Sono state testate diverse tipologie di materiali da utilizzare come substrato di produzione di *spawn*; la sostenibilità legata alla loro provenienza è stata un prerequisito fondamentale al loro utilizzo: i substrati Ammendante Vegetale Semplice Non Compostato (AVSNC) e Segatura, Crusca e Frutta Non Commercializzabile (SCFNC) erano composti da rifiuti solidi organici provenienti dall'area urbana bresciana, mentre i substrati Cippato di Carpino CC, Cippato di Orniello (CO) e Substrato Aziendale Iside per *Spawn* (SAIS) erano materiali di scarto dell'attività agricola e forestale di un'azienda della provincia di Brescia. Solo il substrato Miglio Bianco non appartiene alla categoria dei rifiuti solidi organici prodotti sul territorio bresciano ed è stato utilizzato poiché standard di riferimento nella produzione di *spawn* a livello globale [47].

Oltre alla composizione del substrato, nei funghi, la crescita in SSF è influenzata da diversi fattori, quali: la temperatura, l'umidità, il pH, il ciclo luce/buio, il tempo di fermentazione e la modalità di inoculo [45]. Pertanto, nella fase di preparazione dei substrati sono state utilizzate diverse procedure di idratazione e diversi protocolli di sterilizzazione. È stata utilizzata per ogni substrato la procedura ritenuta più adeguata alle caratteristiche fisiche dei materiali: il substrato MB, essendo un seme non decorticato, è stato lasciato in immersione per 24 ore e poi sterilizzato, seguendo la procedura di riferimento per questo materiale [47]; il substrato SCFNC è stato idratato seguendo una procedura precedentemente messa a punto presso il laboratorio PIMIAA [51] e che consiste nell'aggiunta di una quantità d'acqua definita in rapporto alla massa del substrato (procedura 3); i substrati lignocellulosici, essendo piuttosto simili da un punto di vista granulometrico e chimico, sono stati trattati con due diverse procedure di idratazione (procedure 2 e 3). In entrambe le condizioni di umidità testate si è ottenuto un grado di idratazione adeguato alla crescita di *P. ostreatus* in stato solido, consentendo in un futuro processo produttivo di scegliere quale procedura utilizzare a seconda del contesto e delle esigenze aziendali. Infatti, se aggiungere in maniera progressiva l'acqua consente una maggior precisione (procedura 3), lasciare in ammollo il substrato e poi rimuovere l'acqua in eccesso (procedura 2) potrebbe adattarsi meglio alle prerogative di un'azienda agricola che deve riuscire ad ottimizzare il più possibile i tempi di lavoro.

Per quanto riguarda la sterilizzazione, l'utilizzo di MB, substrato produttivo standard di riferimento, ha imposto una riflessione riguardo all'utilizzo di uno o due cicli di autoclave per garantire la completa sterilità. Il Miglio Bianco, al termine del primo ciclo di sterilizzazione in autoclave, presentava delle caratteristiche di umidità e porosità adatte alla crescita del fungo in SSF. Un secondo

ciclo di sterilizzazione avrebbe potuto comportare una perdita dell'integrità dei chicchi e il substrato sarebbe risultato troppo compatto e non poroso. Pertanto, MB è stato inoculato dopo solo un ciclo di sterilizzazione. L'assenza di contaminazioni fungine e batteriche sul substrato MB e il maggior risparmio energetico ottenuto, ha spinto a testare l'adozione di un solo ciclo di sterilizzazione anche su SAIS, consentendo la crescita di *P. ostreatus* in purezza. La sterilizzazione è stata ottenuta mediante l'utilizzo dell'autoclave, strumento costoso ed energivoro, che potrebbe essere interessante sostituire con altri strumenti, come ad esempio la pentola a pressione, la cui effettiva sostenibilità economica ed ambientale andrebbe valutata insieme agli altri parametri di fermentazione con un'analisi del ciclo di vita.

La produzione di *spawn* è stata ottenuta in condizioni sterili all'interno di vasi microbox in plastica, risultati ottimali per la coltivazione di *P. ostreatus*. Questi contenitori sono stati riutilizzati più volte per evitare uno spreco di materiale ma, purtroppo, la fragilità di questo tipo di plastica, non ha consentito un loro utilizzo ripetuto nel tempo in autoclave e perciò sarebbe interessante ottimizzare il processo attraverso l'utilizzo di contenitori in vetro più duraturi.

Le prove di crescita effettuate su tutti i substrati hanno confermato come il Miglio Bianco, substrato di riferimento, sia quello più adatto alla crescita di *P. ostreatus*. Il fungo, inoculato con differenti modalità, ha colonizzato l'intero substrato più velocemente (9 giorni di SSF) di tutti gli altri substrati. Di tutti gli altri materiali testati, quelli lignocellulosici hanno dato ottimi risultati, come ci si aspettava [45]: *Pleurotus ostreatus* è un saprotrofo decompositore primario e in natura degrada prevalentemente substrati composti da cellulosa, emicellulosa e lignina. Tuttavia, a seconda della composizione dei differenti substrati, è stato possibile osservare delle differenze nella crescita del fungo. I substrati AVSNC e SAIF, composti da materiale sia ricco di cellulosa che di lignina, hanno ottenuto risultati migliori in termini di velocità di crescita (rispettivamente 10 e 16,3 giorni) mentre i substrati CC e CO, composti interamente da materiale legnoso e quindi ricco prevalentemente di lignina, sono stati interamente colonizzati da *P. ostreatus* con tempistiche più lunghe (rispettivamente 22 e 28 giorni). Questi risultati dimostrano come i substrati misti, composti sia da materiale più facilmente degradabile come la cellulosa, sia da materiale più difficilmente degradabile, come la lignina, siano quelli più adeguati alla crescita di *P. ostreatus*.

Unico risultato negativo della sperimentazione è stato quello su substrato SCFNC: non è stata osservata alcuna crescita di *P. ostreatus*, inoculato mediante omogenato di coltura fungina solida, nonostante l'abbondante presenza di segatura (80%), unita a crusca e a frutta non più commercializzabile. Essendo tutti e tre ottimi potenziali substrati di crescita, si potrebbe ipotizzare che la crescita di *P. ostreatus* sia stata inibita da composti chimici contenuti all'interno della segatura e residui del processo di produzione interno all'azienda di provenienza. Altre possibili spiegazioni potrebbero essere la non corretta quantità di acqua contenuta nel substrato o la tipologia e quantità di inoculo utilizzata.

Inoltre, la sperimentazione si è focalizzata sulle diverse metodologie di inoculo su due substrati: SAIS e MB. I tasselli di coltura fungina solida sono risultati essere la metodologia di inoculo più performante, poiché permette al fungo di colonizzare interamente il substrato in un tempo inferiore (- 1 giorno su substrato MB, - 4,3 giorni su substrato SAIS) rispetto all'omogenato. Tuttavia, questa metodologia di inoculazione del micelio ha un grosso limite: con una piastra Petri è possibile inoculare solo 4 vasi microbox. Per ottimizzare l'utilizzo di una piastra Petri è stata sperimentata la coltura liquida, che, a parità di materiale di partenza, ovvero il micelio cresciuto su una piastra Petri, consente di inoculare oltre 30 vasi microbox. La coltura liquida non è l'ambiente ideale dei funghi filamentosi come *P. ostreatus*, bensì di batteri e lieviti, e per poter coltivare con efficienza questa

tipologia di funghi è necessario garantire in tutte le fasi del processo un ambiente sterile, poiché anche la presenza di una sola cellula batterica troverebbe ambiente fertile e porterebbe alla contaminazione del substrato, evento che avverrebbe con molta più difficoltà nella fermentazione in stato solido. Inoltre, per consentire la crescita dei funghi filamentosi in coltura liquida, occorre applicare un'agitazione continua al substrato per evitare l'anossia e una crescita in pellet del fungo inoculato. Paradossalmente, però, in ambito agricolo, potrebbe essere più facile per l'agricoltore garantire la sterilità di una coltura liquida in barattolo rispetto a una coltura in stato solido poiché, una volta sterilizzato, il barattolo non viene più aperto e tutti i prelievi dell'inoculo vengono effettuati mediante siringa, limitando le possibili contaminazioni.

All'interno di questa ricerca l'utilizzo dell'inoculo di coltura liquida ha portato a risultati diversi a seconda del substrato utilizzato: su SAIS *P. ostreatus* ha colonizzato l'intero substrato, mentre su MB è riuscito a crescere solo parzialmente, colonizzando meno del 50% del substrato. Pur non potendo definire con certezza le motivazioni che hanno portato a una crescita parziale di *P. ostreatus*, è stata riscontrata la presenza di sostanze liquide di colore arancione scuro-rosso solo sulle repliche con substrato MB che probabilmente hanno ostacolato la crescita del fungo andando a riempire i pori presenti tra un chicco e l'altro e impedendo un'ottimale circolazione dei gas all'interno del substrato. Tali sostanze non sono state osservate quando MB è stato inoculato con omogenato, suggerendo che la loro formazione sia legata a una possibile reazione tra coltura liquida e substrato. Sarebbe interessante proseguire la ricerca ed aggiungere al substrato MB carbonato di calcio per limitare gli effetti negativi dell'interazione coltura liquida-substrato e favorire l'intera colonizzazione dello stesso [43].

I risultati ottenuti inoculando l'omogenato di coltura fungina solida sono stati piuttosto buoni (16,3 giorni), paragonabili a quelli ottenuti su SAIS con coltura liquida (16 giorni), ma inferiori a quelli ottenuti con tasselli di coltura fungina solida (12,5 giorni). In letteratura, l'omogenato di coltura fungina solida non viene considerato come modalità di inoculo per i basidiomiceti, poiché il micelio, dopo essere stato completamente omogenato, viene direttamente inoculato nel substrato senza passare per una fase di *recovery* come in coltura liquida [47]. Questo potrebbe essere uno dei motivi per cui *P. ostreatus* non è cresciuto su substrato SCFNC inoculato con omogenato.

Tutte le *spawn* testate hanno supportato la fruttificazione di *P. ostreatus* sul substrato aziendale. Nella maggior parte delle prove si sono verificati due cicli di fruttificazione, mentre in tre repliche si è assistito solo ad uno. Queste hanno sofferto di due problematiche comuni della coltivazione di *P. ostreatus*: *Trichoderma* spp., fungo molto presente nell'ambiente e micoparassita di *P. ostreatus* [45] e *Drosophila melanogaster*, conosciuta comunemente come moscerino della frutta, e anch'essa molto presente nell'ambiente. La relazione tra *Trichoderma* spp. e *Pleurotus ostreatus* è particolarmente interessante poiché, a seconda dei casi, *Trichoderma* spp. può parassitare *P. ostreatus* alimentandosi del suo micelio, oppure può convivere con esso nello stesso ambiente. In quel contesto ha ulteriormente influito la presenza di *Drosophila melanogaster*, le cui larve, cresciute sul substrato di fruttificazione, competevano con il fungo per l'utilizzo dei nutrienti [52].

I corpi fruttiferi ottenuti dagli esperimenti sono risultati confrontabili in termini di pezzatura e peso con quelli prodotti dall'azienda che ha fornito il substrato di partenza. Tuttavia, per verificare l'effettiva competitività della *spawn* autoprodotta con il suo equivalente commerciale, bisognerebbe andare ad effettuare dei test che le mettano a diretto confronto, mantenendo fisse tutte le altre variabili. La maggior resa produttiva è stata ottenuta su substrato SAIF inoculato *spawn* MB (99 g/kg il raccolto maggiore). Ulteriori esperimenti verranno condotti per ottimizzare le *spawn* SAIS,

modificando le percentuali dei materiali presenti al suo interno, oppure aggiungendo altri materiali di scarto aziendale, come scarti della produzione di orticole, al fine di incrementare la resa produttiva.

Anche la quantità di substrato iniziale potrebbe avere influito sulla produzione finale dei corpi fruttiferi. Ulteriori studi saranno condotti per ottimizzarne la produzione.

Infine, il *panel test* ha rivelato come i corpi fruttiferi prodotti avessero delle ottime qualità organolettiche, mettendo in luce le potenzialità del processo produttivo.

## 6 CONCLUSIONI

«In natura non esistono rifiuti, tutto ciò che viene scartato da una popolazione è alimento per un'altra», così asserisce Claudia Sorlini in una *lectio magistralis* sui microrganismi e la loro relazione con l'essere umano. Parole che fanno riflettere e che mettono in luce come l'*Homo sapiens* occidentale sia riuscito nell'impresa che nessun'altra specie sul pianeta terra era mai stata in grado di compiere: creare importanti disequilibri all'interno dei naturali cicli biogeochimici e produrre rifiuti che alterano la salute degli ecosistemi.

Risulta evidente come, per preservare il luogo in cui viviamo, sia necessario cambiare paradigma e ripensare i nostri processi produttivi in maniera completamente differente, cercando di mettere in pratica i principi dell'economia circolare e puntando ad una reale sostenibilità che non scenda a patti con interessi di altro tipo.

In questo contesto, la micologia, branca della scienza negletta e poco presente all'interno del mondo accademico, può dare un importante contributo al cambiamento di paradigma, grazie alle straordinarie capacità metaboliche dei funghi. Eccezionali decompositori, i funghi sono in grado di degradare un'enorme varietà di materiali e possono essere utilizzati per trasformare gli attuali rifiuti in prodotti commerciabili.

Di grande interesse all'interno di processi industriali di trasformazione dei rifiuti solidi organici, i funghi sono un importante elemento anche all'interno delle aziende agricole, in cui, grazie all'adozione di un'ottica micoagroecologica, possono essere utilizzati come anello di collegamento tra diversi processi produttivi interni alle aziende stesse. I funghi possono quindi aiutare a decomporre e a riutilizzare gli scarti agricoli ed essere contemporaneamente un'importante fonte di reddito. In questo contesto, la capacità di riproduzione del micelio si configura come un elemento chiave dell'attività agricola per non dover ricorrere costantemente a dispendiosi acquisti esterni.

Il contributo che questo progetto di ricerca preliminare ha voluto portare riguarda diversi aspetti relativi alla produzione di *spawn*. Si sono sperimentati diversi rifiuti solidi organici locali come substrato di crescita di *P. ostreatus*, ottenendo interessanti risultati sulla possibilità di trasformazione dei rifiuti stessi. Ulteriori approfondimenti sarebbero necessari per capire con precisione come le caratteristiche intrinseche ai diversi materiali, quali le proprietà nutrizionali e le dimensioni, possano influire sulla crescita di *P. ostreatus*. Per quanto riguarda le metodologie di inoculo, le criticità relative all'utilizzo della coltura liquida e dei tasselli di coltura fungina solida meriterebbero di essere ulteriormente analizzate, anche attraverso metodi strutturati come l'analisi del ciclo di vita. Sarebbe inoltre necessario proseguire la ricerca indagando la possibilità di utilizzo della *spawn* come inoculo per un'altra *spawn* e capire quante volte è possibile espandere in tal modo il micelio. La produzione di *spawn* all'interno di un'azienda agricola rimane tutt'ora un aspetto da sviluppare, cercando quelle metodologie e strumentazioni che meglio si adattino al contesto. Inoltre, sarebbe anche necessario indagare la produzione di *spawn* di altri funghi alimentari per poter ampliare il ventaglio di prodotti coltivati. Tanti percorsi di ricerca meriterebbero quindi di essere intrapresi, l'importante è «*keep the mycelium running*».

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Bill Mollison, *Permacultura: manuale di progettazione*, Bari: Sedit srl, 2018.
- [2] Merlin Sheldrake, *L'ordine nascosto. La vita segreta dei funghi*, Marsilio. Venezia, 2020.
- [4] A. v. Shah, A. Singh, S. Sabyasachi Mohanty, V. Kumar Srivastava, and S. Varjani, Organic solid waste: Biorefinery approach as a sustainable strategy in circular bioeconomy, *Bioresource Technology*, vol. 349. Elsevier Ltd, Apr. 01, 2022.
- [5] Silpa Kaza, Lisa Yao, Perinaz Bhada-Tata, and Frank Van Woerden, *What a Waste 2.0. A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050*, Washington DC, International Bank for Reconstruction and Development, 2018.
- [7] H. K. Lamba, N. S. Kumar, and S. Dhir, Circular economy and sustainable development: a review and research agenda, *International Journal of Productivity and Performance*, 2023.
- [10] Ellen MacArthur Foundation, *Towards the Circular Economy*, vol.2, 2013.
- [12] Commissione Europea, *L'anello mancante - Piano d'azione dell'Unione europea per l'economia circolare*, Bruxelles, 2015.
- [13] M. Hamam et al., Circular economy models in agro-food systems: A review, *Sustainability Switzerland*, vol. 13, no. 6, Mar. 2021.
- [14] S. Wainaina et al., Resource recovery and circular economy from organic solid waste using aerobic and anaerobic digestion technologies, *Bioresource Technology*, vol. 301. Elsevier Ltd, Apr. 01, 2020.
- [15] L. A. B. Paes, B. S. Bezerra, R. M. Deus, D. Jugend, and R. A. G. Battistelle, Organic solid waste management in a circular economy perspective – A systematic review and SWOT analysis, *J Clean Prod*, vol. 239, 2019.
- [16] J. F. Velasco-Muñoz, J. M. F. Mendoza, J. A. Aznar-Sánchez, and A. Gallego-Schmid, Circular economy implementation in the agricultural sector: Definition, strategies and indicators, *Resources Conservation Recycling*, vol. 170, 2021.
- [17] J. F. Velasco-Muñoz, J. A. Aznar-Sánchez, B. López-Felices, and I. M. Román-Sánchez, Circular economy in agriculture. An analysis of the state of research based on the life cycle, *Sustainable Production and Consumption*, vol. 34., Elsevier B.V., pp. 257–270, 2022.
- [19] E. Lichtfouse, M. Navarrete, P. Debaeke, V. Souchère, C. Alberola, and J. Ménassieu, Agronomy for sustainable agriculture. A review, *Agronomy for Sustainable Development*, vol. 29, no. 1., pp. 1–6, 2009.
- [20] A. Wezel, M. Casagrande, F. Celette, J. F. Vian, A. Ferrer, and J. Peigné, Agroecological practices for sustainable agriculture. A review, *Agronomy for Sustainable Development*, vol. 34, no. 1. EDP Sciences, pp. 1–20, 2014.
- [21] H. Gosnell, N. Gill, and M. Voyer, Transformational adaptation on the farm: Processes of change and persistence in transitions to “climate-smart” regenerative agriculture, *Global Environmental Change*, vol. 59, 2019.
- [22] A. Umantseva, “Regenerative” Social Innovation for European Rural Regions? Lessons from Regenerative Farming, *Journal of Social Entrepreneurship*, 2022.
- [23] Doherty Darren and Andrew Jeeves, *Regrarians handbook*, Victoria, Australia, 2016.

- [24] Gall Elizabeth and Benkeblia Nouredine, *Mycoagroecology Integrating Fungi into Agroecosystems*, CRC Press, 2022.
- [25] D. Grimm and H. A. B. Wösten, Mushroom cultivation in the circular economy, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 102, no. 18. Springer Verlag, pp. 7795–7803, 2018.
- [26] C. Sánchez, Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 85, no. 5. pp. 1321–1337, 2010.
- [27] B. R. Scheffers, L. N. Joppa, S. L. Pimm, and W. F. Laurance, What we know and don't know about Earth's missing biodiversity, *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 27, no. 9. pp. 501–510, 2012.
- [28] M. Q. He et al., Species diversity of Basidiomycota, *Fungal Diversity*, Springer Science and Business Media B.V., vol. 114, no. 1., pp. 281–325, 2022.
- [29] J. B. Hagen, Five kingdoms, more or less: Robert whittaker and the broad classification of organisms, *BioScience*, vol. 62, no. 1. pp. 67–74, 2012.
- [31] C. L. Schmitt, *The Malheur National Forest. Location of the World's Largest Living Organism*, 2008.
- [32] M. Pleszczyńska, M. K. Lemieszek, M. Siwulski, A. Wiater, W. Rzeski, and J. Szczodrak, *Fomitopsis betulina* (formerly *Piptoporus betulinus*): the Iceman's polypore fungus with modern biotechnological potential, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 33, no. 5. Springer Netherlands, 2017.
- [33] B. Roussel et al., *Fomes fomentarius*: multiple uses, *Cryptogamie, Mycologie*, 2002.
- [35] K. D. Hyde et al., The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially, *Fungal Diversity*, vol. 97, no. 1. Springer Netherlands, 2019.
- [36] McCoy Peter, *Radical Mycology*, Portland, OR, USA, 2016.
- [37] V. Ferraro, G. Venturella, L. Pecoraro, W. Gao, and M. L. Gargano, Cultivated mushrooms: importance of a multipurpose crop, with special focus on Italian fungiculture, *Plant Biosystems*, vol. 156, no. 1. Taylor and Francis Ltd., pp. 130–142, 2022.
- [38] V. Oliveira Vieira et al., A new circular economy approach for integrated production of tomatoes and mushrooms, *Saudi J Biol Sci*, vol. 29, no. 4, pp. 2756–2765, 2022.
- [39] Hobbs Christopher, *Medicinal Mushrooms. The essential guide*, North Adams, MA, USA, 2020.
- [40] Papetti Carlo, Colosini Carlo, Chiari Maurizio, and Marchina Mauro, *Introduzione allo studio dei funghi*, Nuova edizione, Brescia, Italia, 2006.
- [42] M. Srikanth, T. S. R. S. Sandeep, K. Sucharitha, and S. Godi, Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review, *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 9, no. 1. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2022.
- [43] J. Raman et al., Cultivation and Nutritional Value of Prominent *Pleurotus* Spp.: An Overview, *Mycobiology*, vol. 49, no. 1. Taylor and Francis Ltd., pp. 1–14, 2021.
- [45] W. A. Wan Mahari et al., A review on valorization of oyster mushroom and waste generated in the mushroom cultivation industry, *J Hazard Mater*, vol. 400, 2020.
- [46] C. Krishna, Solid-state fermentation systems - An overview, *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 25, no. 1–2. pp. 1–30, 2005.
- [47] Stamets Paul, *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*, New York, USA, 1993.

- [48] Cotter Tradd, *Organic Mushroom Farming and Mycoremediation*, White River Junction, VT, USA, 2014.
- [49] B. Piłat, D. Ogrodowska, and R. Zadernowski, Nutrient content of puffed proso millet (*Panicum miliaceum* L.) and Amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) Grains, *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 34, no. 4, pp. 362–369, 2016.
- [50] Ministero delle Politiche Agrarie, Alimentari e Forestali, *Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale"* n. 88 del 16 aprile 2009, Roma, 2009.
- [51] Salvatore Savino, Daniela Bulgari, Eugenio Monti and Emanuela Gobbi, *Agro-Industrial Wastes: A Substrate for Multi-Enzymes Production by Cryphonectria parasitica, Fermentation*, 2021.
- [52] D. Marri, M. Y. Osaе, L. Quansah & N. K. Kortei, Growing *Pleurotus ostreatus* (ex. Fr) Kummer using gamma radiation in southern Ghana and its associated pests, *Ghana Journal of Science*, vol 63., pp. 14-28, 2022.

## SITOGRAFIA

- [3] UN Environment programme, *Solid waste management*, in: <https://www.unep.org/explore-topics/resource-efficiency/what-we-do/cities/solid-waste-management> [consultato il 18/02/2023].
- [6] United Nations, *The 17 Goals*, in: <https://sdgs.un.org/goals> [consultato il 18/02/2023].
- [8] *Earth overshoot day*, in: <https://www.overshootday.org/> [consultato il 18/02/2023].
- [9] UN Global Compact Network Italia, *SDG 12 – Garantire modelli sostenibili di produzione e di consumo*, in: <https://www.globalcompactnetwork.org/it/il-global-compact-ita/sdgs/business-sdgs/1375-sdg-12-garantire-modelli-sostenibili-di-produzione-e-di-consumo.html#:~:text=SDG%2012%20%E2%80%93%20Garantire%20modelli%20sostenibili%20di%20produzione,livello%20normativo%20ad%20esempio%20C%20disincentivazione%20dell%E2%80%99uso%20dei%20combustibili%20fossili%29> [consultato il 18/02/2023].
- [11] Parlamento Europeo, *Circular economy: definition, importance and benefits*, in: <https://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/economy/20151201STO05603/circular-economy-definition-importance-and-benefits> [consultato il 18/02/2023].
- [18] Food and Agriculture Organization of United Nations, *Sustainable Food and Agriculture*, in: <https://www.fao.org/sustainability/background/en/> [consultato il 18/02/2023].
- [30] R. T. Moore, *Fungi*, <https://www.gbif.org/species/142364921>, [consultato il 19/02/2023].
- [34] Museo archeologico dell'Alto Adige, *L'Uomo venuto dal ghiaccio*, in: <https://www.iceman.it/oetzi-luomo-venuto-dal-ghiaccio/> [consultato il 19/02/2023].
- [41] *Pleurotus ostreatus*, in: <https://letziaboccabellanaturopata.wordpress.com/2018/11/29/pleurotus-ostreatus-fungo-ostrea-o-ping-gu-il-fungo-che-fluidifica-il-sangue-riduce-il-colesterolo-e-combatte-il-freddo/> [consultato il 20/02/2023].
- [44] *Reproduction*, in: [http://bioweb.uwlax.edu/bio203/f2012/rudolph\\_pai/reproduction.htm](http://bioweb.uwlax.edu/bio203/f2012/rudolph_pai/reproduction.htm) [consultato il 03/03/2023].

## ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1 - Contenuto nutrizionale di <i>P. ostreatus</i> in g/100 g di peso secco [43].....	13
Tabella 2 - Composizione chimica di <i>Panicum miliaceum</i> espressa come % sul totale del peso secco [49].....	21
Tabella 3 - Caratteristiche dell'Ammendante Vegetale Semplice Non Compostato .....	23
Tabella 4 - Modalità di inoculo e substrati di crescita testati negli esperimenti di fermentazione in stato solido: ogni X indica l'utilizzo di una determinata metodologia di inoculo per substrato .....	26
Tabella 5 - Scala di valutazione della colonizzazione.....	29
Tabella 6 - Efficienza di crescita <i>P. ostreatus</i> su differenti substrati.....	35
Tabella 7 - Valutazione dell'inoculo.....	38
Tabella 8 - Colonizzazione del substrato SAIF.....	43
Tabella 9 - Cicli di fruttificazione portati a termine nelle diverse prove.....	45
Tabella 10 - Prove di fruttificazione di <i>P. ostreatus</i> su substrato SAIF. I risultati sono espressi in g di peso fresco su kg di peso totale del substrato di fruttificazione iniziale.....	46
Tabella 11 - Prove di fruttificazione di <i>P. ostreatus</i> su substrato SAIF. I risultati sono espressi in g di peso fresco.....	46
Tabella 12 - Valutazione dell'intensità del gusto di corpi fruttiferi di <i>P. ostreatus</i> di diversa provenienza.....	47
Tabella 13 - Valutazione della persistenza del gusto di corpi fruttiferi di <i>P. ostreatus</i> di diversa provenienza .....	47
Tabella 14 - Giudizio complessivo sul gusto di corpi fruttiferi di <i>P. ostreatus</i> di diversa provenienza .....	48

## ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1 - Coltivazione di funghi in economia circolare [25] .....	5
Figura 2 - Produzione mondiale di funghi per Paese (in percentuale) [37].....	8
Figura 3 - Produzione di funghi (in 1000 tonnellate) dei più importanti coltivatori d'Europa nel triennio 2016-2018 [37] .....	9
Figura 4 - Specie di funghi maggiormente coltivate in Italia (in percentuale) [37] .....	10
Figura 5 - <i>Pleurotus ostreatus</i> [41] .....	12
Figura 6 - Ciclo di vita dei <i>Basidiomycota</i> [44] .....	13
Figura 7 - Coltivazione e raccolta di funghi [26] .....	15
Figura 8 - Crescita di <i>Pleurotus ostreatus</i> su PDA dopo 7 giorni.....	20
Figura 9 - Prove preliminari di idratazione del substrato Miglio Bianco: da sinistra a destra, rapporti substrato:acqua 1:1,5, 1:2, 1:2,5, 1:3.....	22
Figura 10 A - Cippato di Orniello .....	23
Figura 10 B - Cippato di Carpino.....	23
Figura 11 - Substrato AVSNC prima della procedura di idratazione.....	24
Figura 12 A - Substrato Aziendale Iside per <i>Spawn</i> , visione dall'alto.....	25
Figura 12 B - Substrato Aziendale Iside per <i>Spawn</i> , visione laterale .....	25
Figura 13 - Substrato Segatura, Crusca e Frutta Non Commercializzabile appena idratato .....	25
Figura 14 - Prelievo di 5 mL di omogenato di coltura fungina .....	26
Figura 15 - Divisione in quarti della piastra Petri e preparazione dei tasselli con bisturi .....	27
Figura 16 - Micelio di <i>P. ostreatus</i> in coltura liquida dopo 2 giorni di crescita osservato a microscopio ottico con ingrandimento 40X.....	27
Figura 17 - Disegno sperimentale tipico: tre ripetizioni inoculate e una di controllo priva di inoculo fungino .....	28
Figura 18 - Substrato Aziendale Iside per Fruttificazione .....	30
Figura 19 - Prelievo del substrato di fruttificazione dalla tanica di 1000 L a fine pretrattamento ...	31
Figura 20 - Inoculo di <i>spawn</i> di <i>P. ostreatus</i> su substrato SAIF.....	31
Figura 21 - Barattoli con substrato SAIF inoculati con <i>spawn</i> prodotte su substrati SAIS e MB ...	32
Figura 22 - Pesatura di corpi fruttiferi freschi di <i>P. ostreatus</i> .....	32
Figura 23 A - Crescita di <i>P. ostreatus</i> su substrato MB dopo 11 giorni, visione dall'alto.....	35
Figura 23 B - Crescita di <i>P. ostreatus</i> su substrato MB dopo 11 giorni, visione laterale .....	35
Figura 24 A - Crescita di <i>P. ostreatus</i> su substrato SAIS dopo 15 giorni, visione dall'alto .....	36
Figura 24 B - Crescita di <i>P. ostreatus</i> su substrato SAIS dopo 15 giorni, visione laterale.....	36
Figura 25 A - Crescita di <i>P. ostreatus</i> su substrato CO dopo 32 giorni, visione dall'alto .....	36
Figura 25 B - Crescita di <i>P. ostreatus</i> su substrato CO dopo 32 giorni, visione laterale .....	36
Figura 26 A - Crescita di <i>P. ostreatus</i> su substrato SCFNC dopo 40 giorni, visione laterale. La freccia indica l'inoculo del fungo.....	37
Figura 26 B - Crescita di <i>P. ostreatus</i> su substrato SCFNC dopo 40 giorni, visione laterale.....	37

Figura 27 - Crescita di <i>P. ostreatus</i> su substrato MB dopo 8 giorni .....	38
Figura 28 - Crescita progressiva nel tempo di <i>P. ostreatus</i> su substrato SAIS. Dall'alto al basso, visione da sotto, laterale e dall'alto.....	39
Figura 29 - Crescita di <i>P. ostreatus</i> su substrato SAIS dopo 1 giorni dall'inoculazione.....	40
Figura 30 A - Crescita di <i>P. ostreatus</i> su substrato MB dopo 40 giorni, visione da sotto .....	40
Figura 30 B - Crescita di <i>P. ostreatus</i> su substrato MB dopo 40 giorni, visione dall'alto.....	40
Figura 30 C - Crescita di <i>P. ostreatus</i> su substrato MB dopo 40 giorni, visione laterale .....	41
Figura 31 - Progressione nel tempo della crescita di corpi fruttiferi di <i>P. ostreatus</i> .....	42
Figura 32 A - Crescita di <i>P. ostreatus</i> su substrato SAIF inoculato con SAIS 1. Vista dall'alto dopo 25 giorni di incubazione: crescita omogenea e priva di contaminazioni.....	44
Figura 32 B - Crescita di <i>P. ostreatus</i> su substrato SAIF inoculato con SAIS 3. Vista dall'alto dopo 25 giorni di incubazione: crescita disomogenea dovuta a contaminazione da <i>Trichoderma</i> spp. ..	44
Figura 33 - Crescita di <i>Trichoderma</i> spp. e <i>P. ostreatus</i> su substrato SAIF .....	44

## ACRONIMI

AVSNC	Ammendante Vegetale Semplice Non Compostato
CC	Cippato di Carpino
CO	Cippato di Orniello
CE	<i>Circular Economy</i> (Economia Circolare)
MB	Miglio Bianco
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PDB	<i>Potato Dextrose Broth</i>
SAIS	Substrato Iside Aziendale per <i>Spawn</i>
SAIF	Substrato Iside Aziendale per Fruttificazione
SCFNC	Segatura, Crusca, Frutta Non Commercializzabile
SDG	<i>Sustainable Development Goal</i> (Obiettivo di Sviluppo Sostenibile)
SSF	<i>Solid State Fermentation</i> (Fermentazione in Stato Solido)

## RINGRAZIAMENTI

Scegliere di intraprendere un nuovo percorso universitario a 28 anni è stata una follia, un lusso, un'avventura. Una decisione presa sull'onda dell'entusiasmo e della passione per il mondo agricolo e i suoi elementi, che mi ha portato a volerne capire di più e ad approfondirne gli aspetti in maniera scientifica. Un grazie va a coloro che mi hanno introdotto a questo mondo, che hanno mostrato a un'insensibile cittadina com'era fatta una pianta di patate e come poteva essere buona un'insalata coltivata sul davanzale rispetto ad una comprata in buste di plastica al supermercato. Grazie a coloro con cui ho condiviso per anni progetti di vita agricoli e di agricoltura sociale, esperienze formative fondamentali senza le quali non sarei mai arrivata ad iscrivermi all'università. Grazie anche a coloro che hanno cercato di farmi desistere, di convincermi che non sarebbe stata un'ottima idea, e che hanno alimentato così la mia convinzione a farlo.

Questi anni sono stati pieni di scoperte, confronti ed ansie. Ritornare tra i banchi e preparare gli esami non sarebbe stato possibile se non fosse stato per la compagnia e il grande aiuto dei miei compagni di corso, in particolare Marta e Andrea, senza i quali sarebbe stato tutto più noioso e, a tratti, indecifrabile; grazie. Grazie anche alle amiche e agli amici che mi hanno supportato fuori dal mondo universitario e che hanno spesso sopportato monologhi entusiasti relativi al mondo biologico... «ma tu lo sai qual è la percentuale di cellule che non contengono il tuo DNA all'interno del tuo corpo?». Grazie a chi ha condiviso con me quell'entusiasmo, a chi ha revisionato la tesi ed altri lavori, a chi ha condiviso con me parte del proprio sapere, aiutandomi a superare gli esami.

L'incredibile mondo dei funghi, oggetto di questa tesi, mi si è palesato come tale solo grazie a Marcello che, con il suo arrivo a Iside e il suo entusiasmo, mi ha proposto di lavorare con lui a questa nuova sperimentazione aziendale: grazie. E grazie anche a tutti coloro che fanno di Iside un posto speciale, in cui i principi dell'agricoltura rigenerativa si realizzano davvero. Il progetto che è nato da questo entusiasmo non sarebbe mai stato realizzabile senza il supporto delle mie due docenti, Emanuela Gobbi e Daniela Bulgari, che mi hanno aperto le porte del loro laboratorio e mi hanno introdotto al mondo della ricerca, insegnandomi tecniche sperimentali e dandomi preziosi consigli. La costanza e la pazienza con cui mi hanno seguito e la visione sul concetto di sostenibilità che gli appartiene, sono elementi per niente comuni all'interno del mondo accademico, dove spesso si dà importanza solo all'innovazione tecnologica sacrificando la visione ecologica e dove i poveri tesisti non hanno la possibilità di proporre alcunché e aspettano settimane invano le risposte dei propri relatori. Un grazie anche a Chiara D., compagna di laboratorio per un anno, e ai miei coinquilini, che hanno sopportato la presenza di barattoli e miceli per casa, talvolta con moscerini della frutta inclusi.

La buona riuscita di questo percorso universitario la devo soprattutto al solido sostegno della mia famiglia, sempre presente. Serate passate a rivedere tabelle Excel, libri regalati, schiscette lasciate furtivamente sotto casa e abiti fatti a mano sono stati elementi imprescindibili della mia vita universitaria: grazie a Tiziana, Giorgio e alla mia sorellina Silvia. Un grazie anche a Leo, familiare acquisito, e voce della mia coscienza da tanti anni.

E infine, un grazie a loro, i funghi, che con la loro esistenza e le loro capacità mi hanno fatto vedere il mondo sotto un'altra luce.