RELAZIONE FINALE

a cura della Dott.ssa Carmen Morales-Rodríguez

Convenzione DIBAF – HORTOIDEA Soc. Consortile a R.L.
Periodo: 01/01/2024 – 31/12/2025

Responsabile Scientifico:
Dott.ssa Carmen Morales-Rodríguez
Dipartimento DIBAF – Università degli Studi della Tuscia

In questa relazione viene descritta l'attività svolta dall'inizio del progetto nell'ambito dell'attività di sperimentazione e ricerca che OP HOROIDEA ha affidato al DIBAF relative a:

1. Studio della microbiologia del compost utilizzato per la produzione di substrato di coltivazione di *Agaricus bisporus*
2. Analisi approfondita tassonomica e funzionale delle comunità microbiche nella fase termofila
3. Ottimizzazione del processo di compostaggio e formulazione di un protocollo operativo.

1. Introduzione

La produzione industriale di *Agaricus bisporus* (champignon) si basa su un processo biologico complesso in cui la qualità e la stabilità del compost rappresentano il presupposto fondamentale per una coltivazione efficiente e produttiva. Il compostaggio non è un semplice processo di trasformazione fisico-chimica, ma un sistema biologico dinamico, caratterizzato dalla successione di comunità microbiche (batteriche e fungine) che degradano e ristrutturano la materia organica fino a renderla selettiva per la crescita del micelio di *A. bisporus*.

Sebbene gli aspetti fisico-chimici del compost siano ampiamente studiati, la comprensione dettagliata della dinamica microbiologica lungo l'intera filiera produttiva — dalla materia prima fino ai flush produttivi nei tunnel — risulta ancora limitata in contesti produttivi reali.

Il presente progetto ha avuto l'obiettivo di colmare questa lacuna, caratterizzando in modo integrato la comunità microbica lungo tutta la linea di produzione di HORTOIDEA.

2. Obiettivi del progetto

L'obiettivo generale è stato:

Analizzare la dinamica delle comunità microbiche lungo l'intera filiera produttiva del champignon al fine di comprendere i meccanismi ecologici che influenzano stabilità del substrato e produttività.

Obiettivi specifici:

- Caratterizzare il microbiota delle materie prime e delle fasi di compostaggio.
- Monitorare la successione microbica nei tunnel di produzione.
- Confrontare batch differenti.
- Identificare biomarcatori associati alle diverse fasi produttive.
- Valutare la relazione tra comunità microbica, parametri ambientali e indicatori produttivi.

3. Struttura del progetto

3.1 Primo anno (2024)

Il primo anno di progetto ha rappresentato una fase strategica di costruzione dell'impianto scientifico e operativo dello studio. L'obiettivo principale di questa annualità è stato definire un disegno sperimentale solido, coerente con le esigenze produttive dell'azienda e metodologicamente adeguato all'analisi microbiologica dell'intera filiera.

Revisione scientifica e definizione dell'approccio analitico

È stata condotta una revisione approfondita della letteratura scientifica internazionale relativa alla microbiologia del compost per *Agaricus bisporus*, con particolare attenzione alla successione microbica nelle fasi termofile e alla transizione verso la fase produttiva.

Sono stati analizzati studi riguardanti l'applicazione di tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) per la caratterizzazione tassonomica e funzionale delle comunità

microbiche, al fine di individuare le metodologie più idonee per uno studio su scala industriale.Questa fase ha portato alla scelta di un approccio integrato basato sull'analisi del gene 16S rRNA per la componente batterica.

Pianificazione del disegno sperimentale

Sulla base delle informazioni raccolte e delle esigenze operative dell'azienda, è stato definito un piano di campionamento strutturato lungo tutta la linea produttiva.

Sono stati individuati i punti critici del processo di compostaggio — dalla materia prima fino al substrato pronto per l'ingresso nei tunnel — e i momenti chiave della fase produttiva, includendo le diverse fasi di raccolta.

È stata posta particolare attenzione alla rappresentatività dei campioni, alla replicabilità del prelievo e alla coerenza temporale tra i diversi batch, in modo da permettere confronti robusti nel secondo anno.

Attività di coordinamento tecnico con gli impianti produttivi

Nel corso del primo anno sono state effettuate visite tecniche presso gli impianti produttivi dei soci OP HORTOIDEA, tra cui Funghitex e Mac Società Agricola.

Le visite hanno consentito di osservare direttamente le diverse fasi operative del compostaggio e della coltivazione nei tunnel, comprendendo nel dettaglio:

- gestione delle materie prime,
- dinamiche della fase termofila,
- modalità di trasferimento nei tunnel,
- applicazione del *casing*,
- gestione ambientale (temperatura, aerazione, CO_2),
- tempistiche dei flush produttivi.

Sono stati organizzati incontri di coordinamento con il personale tecnico aziendale per allineare le tempistiche di campionamento con il calendario produttivo e raccogliere informazioni relative ai parametri ambientali e agli indicatori produttivi. Questo dialogo costante ha permesso di integrare l'analisi microbiologica con la realtà operativa aziendale.

Valore strategico del primo anno

Il primo anno non ha rappresentato solamente una fase preliminare, ma ha costituito la base strutturale dell'intero progetto. La definizione rigorosa del disegno sperimentale, la standardizzazione delle procedure e il coordinamento tecnico con gli impianti hanno permesso

di avviare nel secondo anno uno studio completo dell'intera filiera con elevato livello di robustezza metodologica e comparabilità tra batch.

3.2 Secondo anno (2025): campionamento sistematico dell'intera filiera produttiva

Nel secondo anno è stato implementato il campionamento sistematico dell'intera linea produttiva, seguendo un disegno sperimentale uniforme applicato a due lotti distinti.
Sono stati analizzati:

- **Batch 3A**, trasferito nei Tunnel 6 e 7
- **Batch 19A1**, trasferito nel Tunnel 11

L'obiettivo era monitorare la dinamica microbiologica lungo l'intero processo, dalla fase di compostaggio fino alla fase produttiva nei tunnel, garantendo comparabilità tra batch e tra tunnel.

Campionamento nella fase di compostaggio

Per ciascun batch sono stati raccolti campioni nelle principali fasi del processo di compostaggio:

- **Paglia**, come matrice vegetale di base.
- **Letame IN**, rappresentativo della materia organica in ingresso.
- **Letame OUT**, fase successiva di trasformazione biologica.
- **Mix 3**, fase avanzata del compostaggio.

Questi punti di prelievo hanno consentito di seguire la successione microbica durante le fasi iniziali e termofile del processo, caratterizzate da intensa attività metabolica e selezione di microrganismi adattati a condizioni di elevata temperatura.

Campionamento nella fase di coltivazione nei tunnel

Dopo il trasferimento nei tunnel, sono stati effettuati prelievi sia dal **compost** sia dal ***casing***, in tre momenti chiave del ciclo produttivo:

1. **Una settimana dopo l'ingresso in tunnel**, fase di stabilizzazione del substrato e avvio della colonizzazione miceliale.
2. **Prima raccolta (1° flush)**, momento di massima espressione produttiva iniziale.
3. **Seconda raccolta (2° flush)**, fase caratterizzata da progressivo sfruttamento del substrato.

Nel caso del Batch 3A, il monitoraggio è stato condotto nei Tunnel 6 e 7, permettendo un confronto intra-batch tra ambienti produttivi distinti ma alimentati dallo stesso substrato. Nel caso del Batch 19A1, il monitoraggio è stato effettuato nel Tunnel 11, consentendo il confronto inter-batch.

Raccolta dei parametri ambientali e produttivi

I parametri ambientali e produttivi associati ai lotti analizzati stati forniti dall'azienda nell'ambito delle attività di monitoraggio routinario già previste dal sistema di gestione produttiva.

In particolare, per ciascun batch e tunnel sono stati messi a disposizione dati relativi a:

- Temperatura del compost
- Temperatura dell'aria nei tunnel
- Concentrazione di CO_2
- Indicatori produttivi relativi ai flush

Tali parametri vengono regolarmente registrati dall'azienda come parte del controllo standard del processo produttivo. I dati forniti sono stati integrati nelle analisi statistiche multivariate al fine di valutare eventuali associazioni tra struttura delle comunità microbiche, condizioni ambientali e andamento produttivo.

Razionale scientifico del disegno sperimentale

Il disegno sperimentale adottato è stato concepito per rispondere a specifiche domande ecologiche e applicative.

In primo luogo, il monitoraggio longitudinale di ciascun batch lungo tutta la filiera ha permesso di osservare la continuità ecologica tra le fasi di compostaggio e la fase produttiva, riducendo la variabilità legata alla composizione iniziale del substrato.

In secondo luogo, l'analisi di tunnel differenti alimentati dallo stesso batch (Tunnel 6 e 7 per il Batch 3A) ha consentito di valutare l'effetto dell'ambiente di coltivazione sulle dinamiche microbiche, distinguendo l'influenza del substrato da quella delle condizioni di gestione del tunnel.

Infine, il confronto tra batch differenti (3A e 19A1) ha permesso di verificare la riproducibilità dei pattern osservati e la stabilità strutturale del processo microbiologico nel sistema produttivo.

L'inclusione di campioni di compost e *casing* in momenti successivi (1 settimana, primo flush, secondo flush) ha reso possibile descrivere l'evoluzione della comunità microbica in relazione alla crescita del micelio e alla produzione dei corpi fruttiferi.

Questo approccio integrato ha fornito una visione sistemica dell'ecosistema microbico associato alla produzione di *Agaricus bisporus*.

4. Analisi di laboratorio e caratterizzazione molecolare delle comunità microbiche

L'analisi delle comunità microbiche associate alla filiera produttiva è stata condotta mediante approccio di metabarcoding basato su sequenziamento ad alta profondità (Next Generation Sequencing, NGS).

L'intero processo analitico ha incluso le seguenti fasi: estrazione del DNA, quantificazione, amplificazione dei marcatori molecolari, preparazione delle librerie e sequenziamento, seguito da analisi bioinformatica e statistica.

4.1 Estrazione e quantificazione del DNA

Il DNA totale è stato estratto dai campioni di compost, *casing* e materie prime utilizzando protocolli ottimizzati per matrici organiche complesse, caratterizzate da elevato contenuto di sostanza organica e potenziali inibitori della PCR.

Le procedure di estrazione sono state eseguite in condizioni controllate al fine di garantire:

- omogeneità tra campioni,
- minimizzazione della contaminazione crociata,
- massima resa e qualità del DNA.

La concentrazione e la purezza del DNA estratto sono state valutate mediante quantificazione fluorimetrica e controllo spettrofotometrico, verificando l'idoneità dei campioni per le successive fasi di amplificazione. Solo i campioni che rispettavano i criteri di qualità sono stati inclusi nella preparazione delle librerie di sequenziamento.

4.2 Amplificazione dei marcatori molecolari e preparazione delle librerie

Per la caratterizzazione della componente batterica è stato amplificato il gene 16S rRNA, mentre per la componente fungina è stata amplificata la regione ITS1. Le amplificazioni sono state effettuate mediante PCR utilizzando primers specifici contenenti barcode univoci (index

sequences), che hanno permesso la multiplexazione dei campioni all'interno della stessa corsa di sequenziamento.

L'utilizzo di primers barcoded ha consentito:

- l'identificazione univoca di ciascun campione,
- la riduzione di errori di assegnazione,
- la gestione simultanea di un elevato numero di campioni.

Le librerie ottenute sono state purificate, normalizzate e sottoposte a controllo qualità prima dell'invio al sequenziamento.

4.3 Sequenziamento ad alta profondità

Le librerie ampliconiche ottenute sono state inviate per il sequenziamento presso BioTraker (https://www.nature4.org/), utilizzando una piattaforma Illumina con tecnologia paired-end 2 × 250 bp. Questa configurazione di sequenziamento ha consentito di ottenere una elevata profondità di lettura per ciascun campione, garantendo una copertura adeguata della diversità microbica presente nelle matrici analizzate.

L'approccio paired-end ha permesso l'assemblaggio delle letture forward e reverse, migliorando significativamente la qualità delle sequenze ricostruite e aumentando l'accuratezza dell'assegnazione tassonomica. L'elevata qualità delle letture generate ha rappresentato un elemento fondamentale per l'affidabilità delle successive analisi bioinformatiche e statistiche.

4.4 Analisi bioinformatica

Le sequenze grezze ottenute dal sequenziamento sono state sottoposte a una pipeline bioinformatica strutturata e standardizzata. In una prima fase è stato effettuato un controllo di qualità, con filtraggio delle sequenze a bassa qualità e rimozione delle regioni non affidabili. Successivamente sono stati rimossi i primers e sono state effettuate operazioni di *trimming* per eliminare eventuali basi terminali di qualità inferiore.

L'inferenza delle *Amplicon Sequence Variants* (ASV) è stata eseguita mediante l'algoritmo DADA2, che consente di distinguere le varianti reali dalle sequenze generate da errori di sequenziamento, aumentando la risoluzione analitica rispetto ai tradizionali metodi di clustering in OTU. Le sequenze chimeriche sono state identificate e rimosse al fine di evitare sovrastime della diversità.

L'assegnazione tassonomica è stata effettuata utilizzando database di riferimento aggiornati, impiegando SILVA per le sequenze 16S relative alla componente batterica e UNITE per le

sequenze ITS relative alla componente fungina. L'utilizzo di un approccio basato su ASV, anziché su OTU tradizionali, ha permesso di ottenere una maggiore risoluzione tassonomica e una migliore comparabilità tra campioni e tra batch differenti.

4.5 Analisi statistiche e multivariate

Le matrici di abbondanza generate dalla pipeline bioinformatica sono state utilizzate per effettuare analisi statistiche volte a descrivere la struttura delle comunità microbiche e la loro variazione lungo la filiera produttiva.

Sono state calcolate misure di diversità alfa, tra cui gli indici di *Shannon, Simpson e Chao1*, al fine di valutare la ricchezza e l'equilibrio delle comunità nei diversi materiali e stadi produttivi. La diversità beta è stata analizzata mediante distanza di Bray-Curtis e rappresentata attraverso tecniche di *ordination*, in particolare *Principal Coordinates Analysis* (PCoA), per visualizzare le differenze composizionali tra campioni.

Le differenze tra gruppi sono state testate mediante analisi statistiche non parametriche quali ANOSIM e PERMANOVA. L'identificazione di taxa differenzialmente abbondanti e potenziali biomarcatori è stata effettuata mediante approccio LEfSe.

Nel complesso, tali analisi hanno consentito di descrivere in modo robusto e integrato la struttura delle comunità microbiche e la loro evoluzione lungo le diverse fasi del processo produttivo.

5. Risultati: caratterizzazione integrata del microbioma batterico lungo la filiera produttiva

5.1 Qualità del sequenziamento e consistenza del dataset

L'analisi della componente batterica (16S rRNA) ha prodotto un dataset comparabile in termini di qualità e robustezza, consentendo l'identificazione ad alta risoluzione delle Amplicon Sequence Variants (ASV) e una descrizione dettagliata della struttura delle comunità batteriche.

L'approccio basato su ASV ha permesso di evitare la perdita di informazione associata ai metodi di clustering tradizionali, garantendo una maggiore precisione nell'identificazione delle variazioni microbiche tra materiali, stadi produttivi, batch e tunnel.
Nel complesso, la qualità del sequenziamento e la profondità delle letture ottenute assicurano un'elevata affidabilità delle analisi statistiche successive e delle interpretazioni ecologiche derivate.

Definizione delle sigle dei materiali e degli stadi produttivi

Per facilitare l'interpretazione delle figure e delle analisi statistiche, nella Tabella 1 sono riportate le sigle utilizzate nei grafici e il loro significato lungo la filiera produttiva.

Tabella 1.

Sigla	Materiale	Fase del processo	Descrizione dettagliata
WhSt	Wheat Straw	Materia prima	Paglia utilizzata come matrice vegetale iniziale
ManIn	Manure IN	Compostaggio iniziale	Letame in ingresso al processo di compostaggio
ManOut	Manure OUT	Compostaggio intermedio	Letame dopo prima trasformazione biologica
PICmpM	Phase I Compost Mix	Fine Fase I	Miscela di compost dopo la prima fase di compostaggio
Cmp1W	Compost	Produzione in tunnel	Compost una settimana dopo l'ingresso nel tunnel di coltivazione
Cas1W	*Casing*	Produzione in tunnel	*Casing* una settimana dopo l'ingresso in tunnel
Cmp1fl	Compost	Primo flush	Compost al momento della prima raccolta

Cas1fl	*Casing*	Primo flush	*Casing* al momento della prima raccolta
Cmp2fl	Compost	Secondo flush	Compost al momento della seconda raccolta
Cas2fl	*Casing*	Secondo flush	*Casing* al momento della seconda raccolta

Al fine di interpretare correttamente i risultati, è utile distinguere due macro-ambienti lungo la filiera: (i) la **produzione del substrato (compost)**, dove sono stati analizzati materie prime e materiali di processo (WhSt, ManIn, ManOut, Mix3), e (ii) il **tunnel di produzione**, dove sono stati effettuati campionamenti paralleli di **substrato (compost)** e ***casing*** in tre momenti chiave del ciclo colturale: **una settimana dopo l'ingresso in tunnel (1W)**, **prima raccolta (1fl)** e **seconda raccolta (2fl)**. Questa suddivisione riflette due condizioni ecologiche differenti: una fase iniziale di trasformazione e selezione microbica durante la produzione del compost, seguita da una fase produttiva in cui la comunità microbica evolve in relazione alla colonizzazione del micelio e alla gestione del *casing*.

5.1 Valutazione della riproducibilità tra cicli di processo

Prima di analizzare le differenze tra materiali e fasi del ciclo produttivo, è stata valutata la possibile presenza di differenze strutturali tra le due repliche del processo produttivo batch 3 e batch 19 (Cycle A e Cycle B, rispettivamente), al fine di verificare il grado di standardizzazione microbiologica del sistema.

Alpha diversity

L'analisi degli indici di diversità alfa (Chao1, ACE, Shannon e Simpson) non evidenzia differenze significative tra i due cicli (Figure 1). Le distribuzioni dei valori risultano ampiamente sovrapponibili per tutti gli indici:

- **Chao1 e ACE (ricchezza stimata)** mostrano range comparabili tra i due cicli, indicando una sostanziale equivalenza nel numero di ASV.
- **Shannon** evidenzia una distribuzione simile della diversità e dell'equità.

- **Simpson** mostra valori elevati e sovrapponibili, indicativi di comunità altamente diversificate con bassa dominanza in entrambi i cicli.

Nel complesso, l'alpha diversity conferma un'elevata riproducibilità della complessità tassonomica tra le repliche.

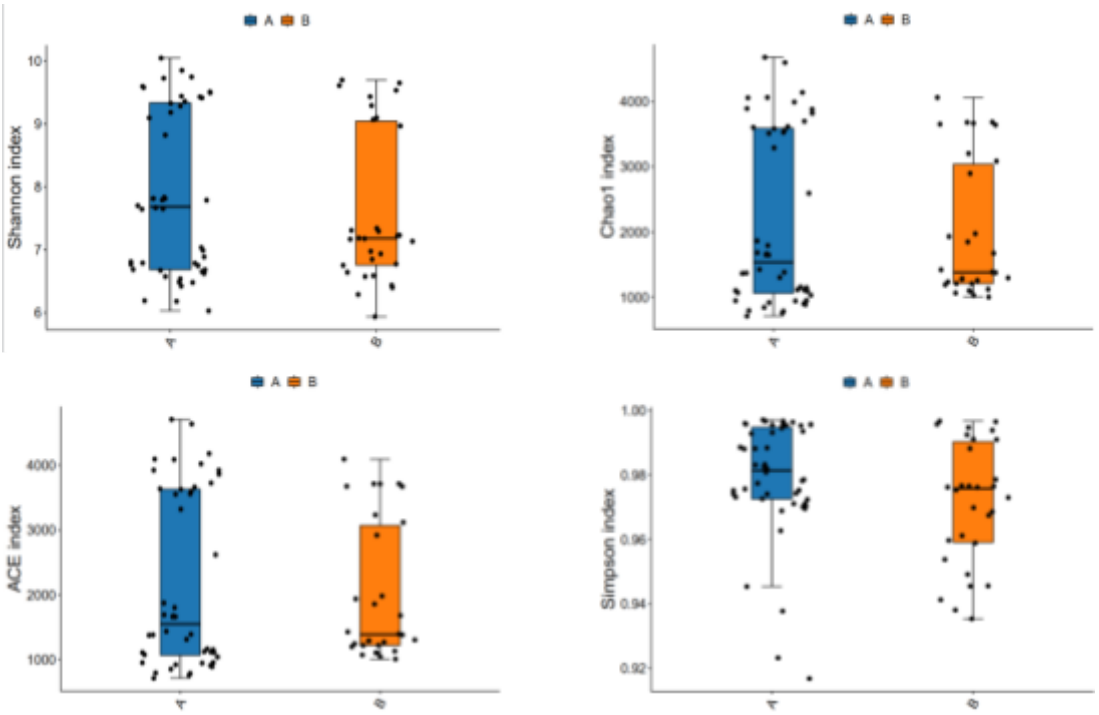


Figure 1. Indici di alpha diversity calcolati a livello di campione e stratificati per la variabile categoriale Cycle

Beta diversity

Le analisi di *beta diversity* (Jaccard, Bray–Curtis, Unweighted e Weighted UniFrac) non mostrano una separazione sistematica tra Cycle A e Cycle B. Nei grafici PCoA i campioni dei due cicli risultano fortemente sovrapposti e distribuiti all'interno degli stessi cluster strutturali. Le ellissi di dispersione dei due gruppi si sovrappongono in tutte le metriche considerate. La PERMANOVA non evidenzia differenze statisticamente significative tra i cicli ($p > 0.05$), con valori di R^2 bassi, indicando che la variabile "Cycle" spiega solo una quota minima della variabilità totale osservata (Figure 2).

È interessante notare che in tutte le metriche emergono tre cluster strutturali principali indipendenti dal ciclo, suggerendo che la struttura biologica dominante nei dati sia legata a fattori diversi dalla replica di processo, verosimilmente associati a materiale o fase del ciclo produttivo

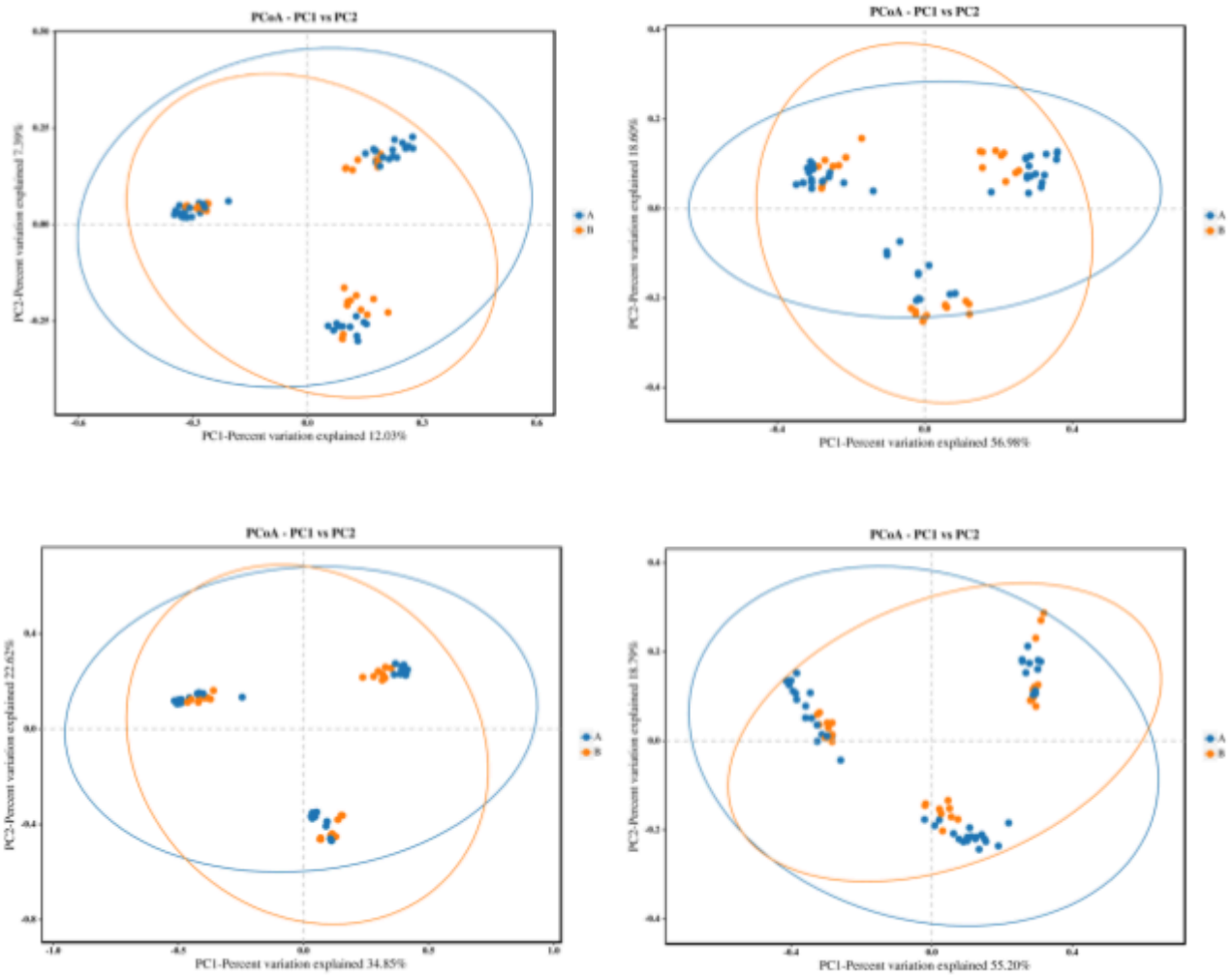


Fig. 2 I grafici mostrano analisi di Principal Coordinates Analysis (PCoA) basate su diverse metriche di distanza/dissimilarità. A) Jaccard, B) Bray-Curtis, C) Unweighted UniFrac, D) Weighted UniFrac

Composizione tassonomica

L'analisi della composizione a livello di genere mostra un'elevata sovrapponibilità tra Cycle A e Cycle B. I principali generi sono condivisi tra le due repliche e mantengono proporzioni relative comparabili. Non si osservano inversioni marcate di dominanza né comparsa/scomparsa evidente di taxa principali. Anche la quota della categoria "Others" risulta simile nei due cicli, indicando una distribuzione della diversità su numerosi taxa a bassa abbondanza in entrambi i gruppi (Figure 3).

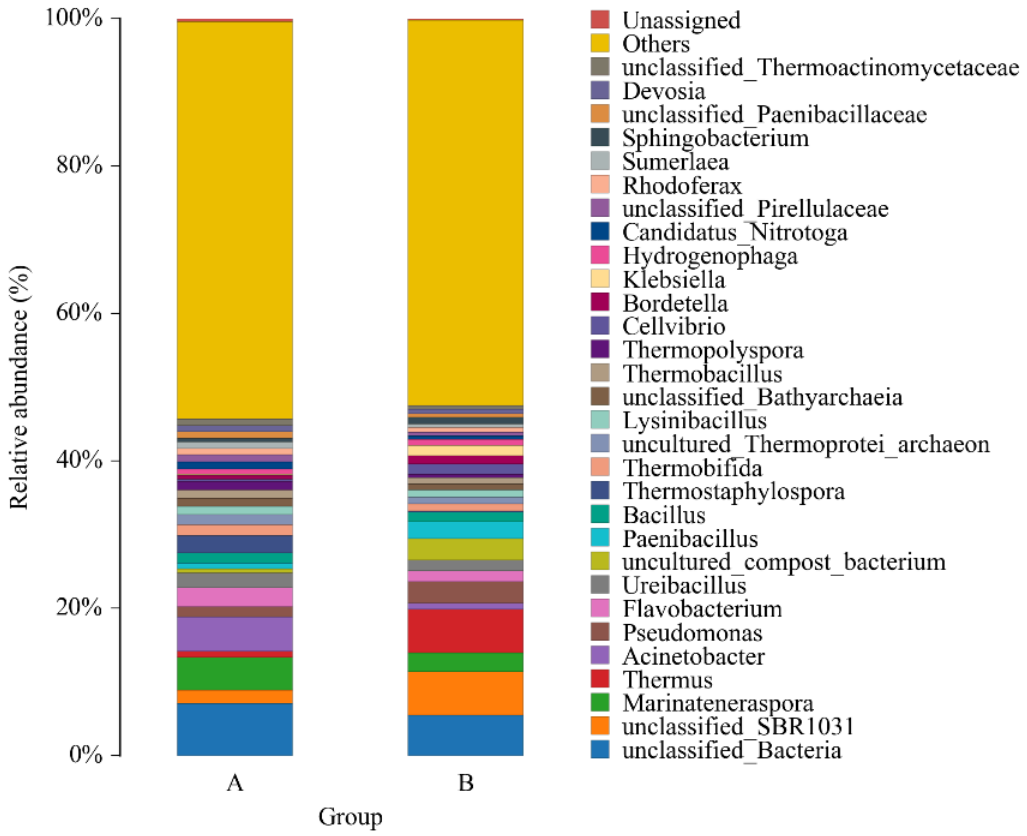


Fig. 3 Barplot di abbondanza relativa (%) dei 30 generi più abbondanti, aggregati per Cycle. Le categorie "Others" "Unclassified" e "Unassigned" raccolgono rispettivamente i taxa a bassa abbondanza/non inclusi nei top 30 e le sequenze non assegnate a livello di genere.

Conclusione sull'effetto Cycle

Nel complesso, i risultati indicano che le due repliche del processo non differiscono in modo sostanziale a livello di comunità batterica. L'assenza di differenze significative in alpha

diversity, beta diversity e composizione tassonomica supporta l'ipotesi di una elevata stabilità e riproducibilità microbiologica del processo produttivo.

Alla luce di questi risultati, i dati dei due cicli sono stati successivamente aggregati per l'analisi delle differenze associate al materiale e alla fase del ciclo produttivo, al fine di aumentare la potenza statistica e focalizzare l'interpretazione sui driver ecologici principali.

5.2 Differenze tra materiali e fasi del ciclo produttivo

5.2.1 Alpha diversity

Gli indici di diversità alfa (Shannon, Chao1, Simpson, ACE) mostrano un andamento coerente tra i diversi materiali analizzati. In generale, i campioni del ***casing*** presentano comunità batteriche più ricche e più diversificate rispetto ai campioni di **substrato (compost)** e ai materiali della fase di produzione del compost (materie prime e mix). Questo pattern suggerisce che il *casing* rappresenti un habitat microbiologicamente più eterogeneo e meno filtrato, capace di mantenere una maggiore ricchezza tassonomica, mentre il compost — in particolare nelle fasi avanzate e produttive — risulta più selettivo e maggiormente dominato da un numero ridotto di taxa (Figure 4).

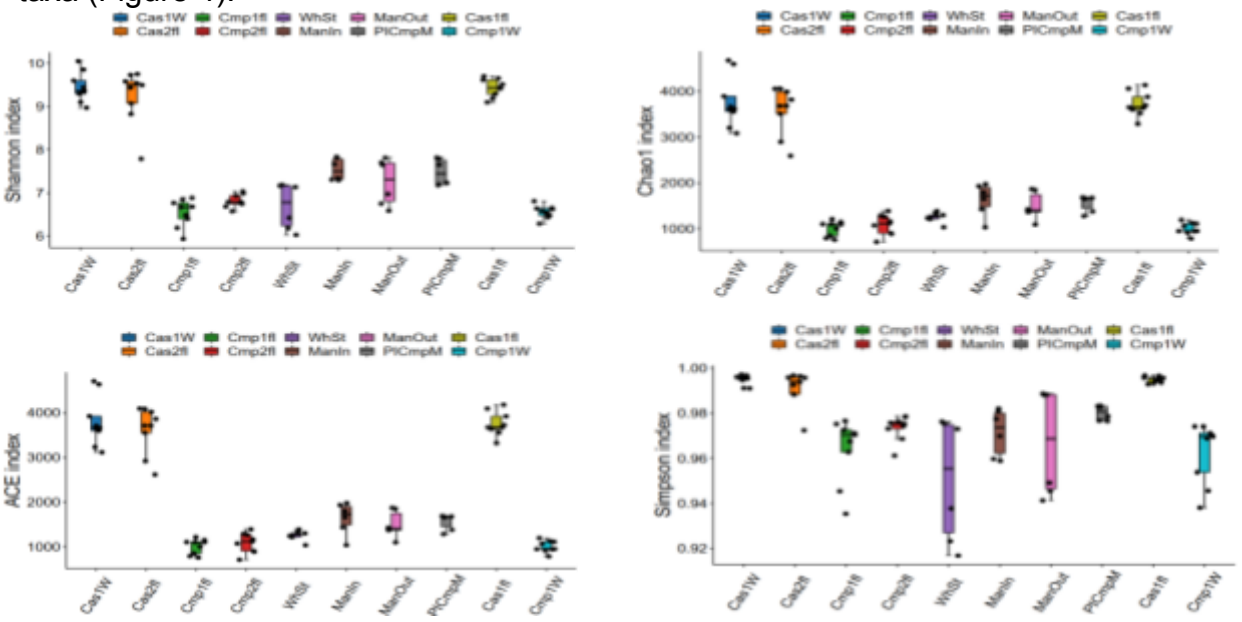


Fig. 4. Indici di alpha diversity (Shannon, Chao1, Simpson, ACE) calcolati a livello di campione e stratificati per Material. I boxplot mostrano la distribuzione dei valori nei diversi materiali (WhSt, ManIn, ManOut, Mix3, Cmp1W, Cmp1fl, Cmp2fl, Cas1W, Cas1fl, Cas2fl).

5.2.2 Beta diversity e struttura della comunità

L'analisi della diversità beta evidenzia una chiara separazione dei campioni in funzione del tipo di materiale e della fase del processo produttivo. Le analisi PCoA basate su differenti metriche di distanza (Jaccard, Bray–Curtis, Unweighted UniFrac e Weighted UniFrac) mostrano una distinzione coerente tra:

- Materiali della **produzione del substrato (compost)**: WhSt, ManIn, ManOut, Mix3
- Campioni prelevati nel **tunnel di produzione**, comprendenti substrato (Cmp1W, Cmp1fl, Cmp2fl) e *casing* (Cas1W, Cas1fl, Cas2fl)

La separazione osservata indica che la struttura della comunità batterica varia in modo consistente tra la fase di compostaggio e la fase produttiva in tunnel (Figure 5).

Le metriche basate su presenza/assenza (Jaccard) mostrano che esistono taxa differenzialmente associati ai due macro-ambienti. Le metriche basate su abbondanza relativa (Bray–Curtis) evidenziano che le differenze non riguardano soltanto taxa rari, ma anche i gruppi dominanti. Le analisi filogenetiche (UniFrac) indicano inoltre che le comunità differiscono anche a livello evolutivo, suggerendo che le pressioni selettive proprie delle due fasi favoriscono gruppi batterici appartenenti a linee filogenetiche differenti. I test statistici (ANOSIM e PERMANOVA) confermano che l'effetto del materiale è altamente significativo ($p = 0.001$), indicando che la tipologia di ambiente (produzione del compost vs tunnel) rappresenta il principale driver ecologico della struttura microbica.

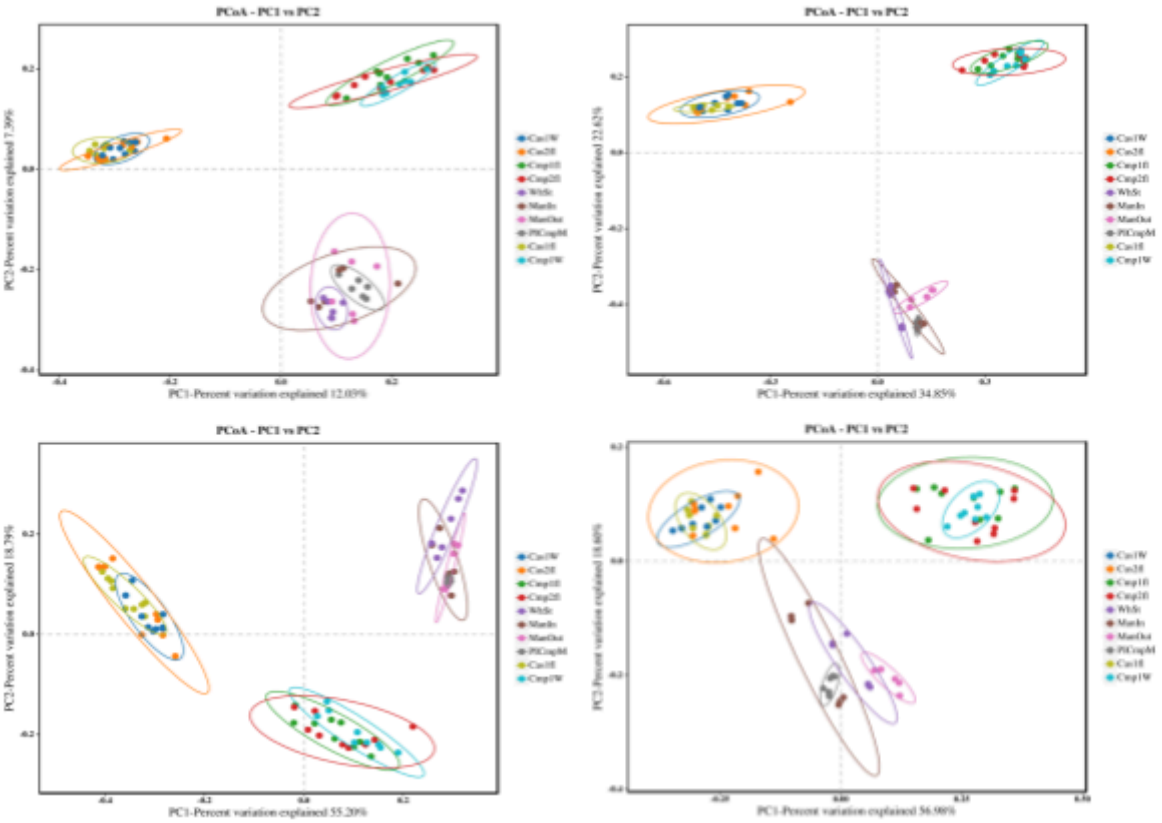


Fig. 5. Principal Coordinates Analysis (PCoA) della comunità batterica basata su diverse metriche di distanza: (A) Jaccard, (B) Bray–Curtis, (C) Unweighted UniFrac, (D) Weighted UniFrac. I punti rappresentano i campioni colorati in base al materiale. La separazione evidenzia la distinzione tra fase di produzione del substrato e fase di coltivazione in tunnel.

5.2.3 Composizione tassonomica a livello di genere

L'analisi delle abbondanze relative medie dei 30 generi più abbondanti (top 30) mostra che le comunità batteriche differiscono tra i diversi materiali principalmente per variazioni quantitative nelle proporzioni dei generi condivisi, piuttosto che per la presenza di taxa esclusivi (Figure 6).

Raramente emerge un genere chiaramente specifico di un solo materiale tra quelli più abbondanti. Nei materiali di compostaggio, ad esempio, generi come *Acinetobacter* e *Thermus* risultano maggiormente rappresentati, ma non esclusivi. La maggior parte dei taxa compare trasversalmente in più gruppi, talvolta con percentuali rilevanti anche in materiali differenti. Questo indica che la differenziazione tra materiali è graduale e strutturata sulle abbondanze relative, piuttosto che su una sostituzione netta dei taxa dominanti.

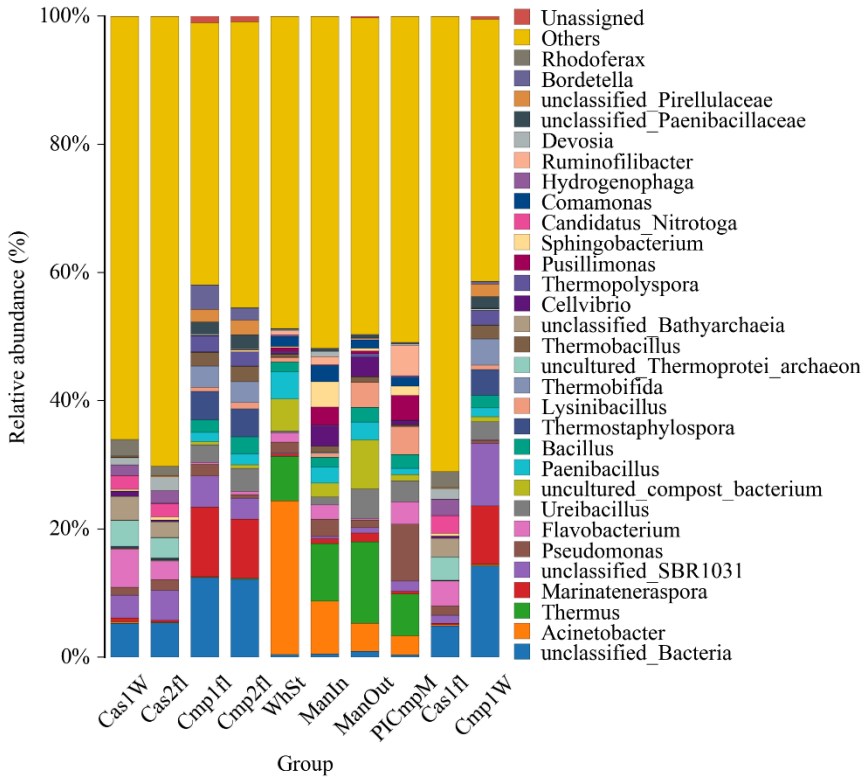


Fig. 6. Barplot di abbondanza relativa (%) dei 30 generi batterici più abbondanti, aggregati per materiale. Le categorie *Others*, *Unclassified* e *Unassigned* includono rispettivamente i taxa a bassa abbondanza non inclusi nei top 30 e le sequenze non assegnate a livello di genere.

Un elemento strutturale rilevante è l'elevata quota della categoria "Others" in tutti i materiali analizzati. Tale componente comprende generi a bassa o media abbondanza non inclusi tra i top 30 e suggerisce che una parte consistente della diversità sia distribuita tra numerosi taxa meno dominanti. Questo aspetto evidenzia come la comunità microbica sia complessa e non rigidamente dominata da pochi gruppi prevalenti. Nel complesso, la distinzione tra materiali non si basa su indicatori univoci evidenti tra i generi più abbondanti, ma su un riequilibrio quantitativo delle comunità lungo la filiera produttiva.

Ecologia dei principali generi associati alla coltivazione di *Agaricus bisporus*

Tra i generi più rappresentati nei diversi materiali emergono taxa già documentati in letteratura come associati al compost o alla coltivazione di *A. bisporus*.

Acinetobacter

Acinetobacter è stato rilevato tra i generi batterici dominanti in impianti di compostaggio aerobico su scala industriale per il trattamento di rifiuti organici, supportando la sua associazione con ambienti di compost rilevanti per la preparazione del substrato per la coltivazione dei funghi [Karadag et al., 2013].

Thermus

Durante la produzione del compost per *Agaricus bisporus*, campioni prelevati alla temperatura di picco sono risultati dominati da filotipi correlati a *Thermus thermophilus* [Szekely et al., 2008]. Ceppi di *Thermus* sono stati isolati da compost termogenici a temperature comprese tra 60 e 80 °C, indicando un adattamento a nicchie ad alta temperatura [Beffa et al., 1996].

Pseudomonas

Negli strati di casing di *Agaricus bisporus*, l'abbondanza di *Pseudomonas* nelle fasi tardive di raccolta può essere positivamente associata alla resa [Chen et al., 2023]. Questo genere è coinvolto nell'iniziazione dei primordi attraverso uno stimolo microbico e mediante la rimozione di composti volatili C8 inibitori da parte dei pseudomonadi [WA 1969; Noble et al., 2009]. Tuttavia, alcune specie come *Pseudomonas tolaasii* rappresentano patogeni noti responsabili della macchia bruna (brown blotch) [Soler-Rivas et al., 1999; Cho et al., 2003].

Ureibacillus

Ureibacillus composti è stato isolato da compost di letame zootecnico, indicando l'adattamento di questa linea termofila appartenente ai Bacillota agli ambienti di compostaggio [Weon et al., 2007]. Il genere è stato ripetutamente isolato nelle fasi termofile del compost in studi basati su coltura, coerentemente con un'associazione ai processi di decomposizione della sostanza organica ad alta temperatura.

Paenibacillus e Lysinibacillus

Entrambi i generi sono stati isolati dai corpi fruttiferi di *Agaricus bisporus*. Alcuni isolati hanno mostrato attività antimicrobiche e potenziali proprietà di promozione della crescita del fungo in vitro [Xiang et al., 2017], suggerendo possibili interazioni funzionali nel sistema produttivo.

Cellvibrio

Cellvibrio è stato rilevato tra i generi batterici presenti nello strato di casing durante la coltivazione di *Agaricus bisporus* [Chen et al., 2023].

Sphingobacterium

Specie appartenenti al genere *Sphingobacterium* sono state riportate sui cordoni miceliari e nel terreno di casing circostante di *Agaricus bisporus* [Baars et al., 2020].

5.2.4 Identificazione di biomarcatori (LEfSe)

L'analisi LEfSe ha identificato biomarcatori tassonomici significativamente arricchiti nei diversi materiali, evidenziando firme microbiche specifiche associate sia al *casing* sia al compost durante le diverse fasi del processo produttivo.

Biomarcatori associati al *casing*

Nei campioni di *casing* prelevati **una settimana dopo l'ingresso in tunnel (Cas1W)** risultano significativamente arricchiti i generi *Flavobacterium* e *Curvibacter*.

Flavobacterium è stato riportato tra le popolazioni batteriche dominanti nei materiali di casing durante la fase di *pinning* nella coltivazione dello champignon (*Agaricus bisporus*) [Siyoum et al., 2010]. Studi di sequenziamento ad alta profondità hanno evidenziato un'elevata abbondanza di questo genere anche nelle fasi tardive di raccolta, con una correlazione positiva rispetto alla resa produttiva [Chen et al., 2023]. Le comunità di *casing* associate a *Flavobacterium* risultano collegate alle fasi di sviluppo riproduttivo e possono contribuire al turnover della sostanza organica nello strato di copertura [Siyoum et al., 2010].

Curvibacter, appartenente ai Betaproteobacteria, è stato originariamente descritto a partire da isolati acquatici [Ding & Yokota, 2004]. Attualmente non sono disponibili evidenze peer-reviewed che colleghino direttamente questo genere al compost o al *casing* di *A. bisporus*. La sua identificazione come biomarcatore nel presente studio suggerisce una possibile associazione con condizioni ambientali specifiche del *casing*, meritevole di ulteriori approfondimenti.

Nei campioni di *casing* prelevati al **secondo flush (Cas2fl)** è risultato significativamente arricchito il genere *Brevundimonas*. Durante la coltivazione di *Agaricus bisporus*, l'abbondanza di *Brevundimonas* negli strati di *casing* aumenta nelle fasi tardive di raccolta ed è stata riportata come positivamente correlata alla resa produttiva in studi basati su sequenziamento *amplicon* [Chen et al., 2023]. Queste osservazioni associano il genere a stati del microbioma del *casing* collegati alla fase produttiva avanzata.

Biomarcatori associati al Compost (CMP)

Nei campioni di compost prelevati nel tunnel emergono generi coerenti con comunità termofile e lignocellulosolitiche tipiche delle fasi di preparazione del substrato.

Nel campione **CMP1W** risulta significativamente arricchito il genere *Thermobifida*. Questo taxon è stato riportato tra gli Actinobacteria termofili più abbondanti durante la Fase II della preparazione del compost per *Agaricus bisporus* ed è descritto come un genere cellulolitico rilevante nei consorzi microbici del compost per funghi [Thai et al., 2022]. *Thermobifida cellulolytica* è stata isolata da compost di letame surriscaldato ed è caratterizzata dalla capacità di degradare la lignocellulosa [Kukolya et al., 2002].

Nel campione **CMP1FL** risultano arricchiti i generi *Thermostaphylospora* e *Thermopolyspora*. *Thermostaphylospora grisealba* è stata isolata da compost per funghi ed è descritta come un attinomicete termofilo [Wu et al., 2018]. *Thermopolyspora* è stata rilevata in modo consistente durante la Fase II del compostaggio in diversi impianti e, in alcuni casi, ha dominato la comunità degli attinomiceti [Thai et al., 2022]. Nel compost per funghi, questo genere è associato alla produzione di emicellulasi e al turnover dei polimeri vegetali.

Nel campione **CMP2FL** risulta significativamente arricchito il genere *Thermobacillus*, un Bacilli termofilo frequentemente rilevato nei profili microbici del compost per *Agaricus bisporus* durante la Fase II [Thai et al., 2022]. *Thermobacillus composti* è stato descritto come batterio moderatamente termofilo e sporigeno isolato da un reattore di compostaggio [Watanabe et al., 2007].

Interpretazione complessiva

Nel complesso, l'analisi LEfSe evidenzia una netta distinzione funzionale ed ecologica tra le due macro-fasi del processo:

- Il **compost** è caratterizzato dall'arricchimento di attinomiceti e bacilli termofili coinvolti nella degradazione della lignocellulosa e nella stabilizzazione del substrato.
- Il **casing**, invece, presenta biomarcatori associati alla fase produttiva e potenzialmente coinvolti nelle interazioni microbioma–fungo e nella modulazione della resa.

Questa distinzione rafforza l'ipotesi che il tipo di materiale e lo stadio produttivo rappresentino driver ecologici primari nella strutturazione della comunità batterica lungo la filiera di *Agaricus bisporus*.

6. Discussione e interpretazione complessiva

L'analisi integrata dei dati 16S rRNA evidenzia che il tipo di materiale rappresenta il principale fattore strutturante delle comunità batteriche lungo l'intera filiera produttiva analizzata, mentre l'effetto "replica di processo" risulta trascurabile.

L'assenza di differenze significative tra i due cicli produttivi conferma l'elevato grado di standardizzazione microbiologica del sistema. L'aspettativa iniziale era che le repliche non differissero in modo sostanziale, e i risultati ottenuti sono pienamente coerenti con tale ipotesi. La variabilità osservata è dominata da fattori biologici intrinseci alle fasi del ciclo e al tipo di materiale, piuttosto che da deviazioni tra batch.

Le analisi di *alpha diversity* mostrano differenze consistenti tra materiali. I *casing* presentano maggiore ricchezza ed equità, indicando comunità più complesse e meno dominate da pochi taxa. I compost di coltivazione (CMP) mostrano invece una struttura più selettiva, con minore ricchezza e maggiore concentrazione relativa su gruppi batterici specifici, coerentemente con le pressioni ambientali tipiche del processo di compostaggio. Manure e Phase I Compost Mix si collocano in una posizione intermedia, riflettendo uno stadio di transizione microbiologica lungo il gradiente di trasformazione del substrato.

La *beta diversity* conferma che le comunità associate ai diversi materiali sono nettamente distinte. La separazione è osservabile con tutte le metriche utilizzate (Jaccard, Bray–Curtis, Unweighted e Weighted UniFrac) ed è supportata da valori elevati di ANOSIM e PERMANOVA ($p = 0.001$). Le metriche filogenetiche e basate sulle abbondanze indicano che le differenze coinvolgono non solo la presenza/assenza dei taxa, ma anche la loro struttura filogenetica e distribuzione relativa. Il materiale agisce quindi come driver ecologico dominante nel sistema.

L'analisi della composizione tassonomica mostra che la differenziazione tra materiali non si basa su taxa esclusivi, bensì su variazioni quantitative combinate di generi condivisi. I compost evidenziano un arricchimento di generi coerenti con condizioni di degradazione organica e selezione termica, mentre i *casing* presentano una distribuzione più frammentata e bilanciata, riflettendo una comunità più eterogenea e funzionalmente articolata.

L'analisi LEfSe ha ulteriormente evidenziato una chiara differenziazione funzionale ed ecologica: nei materiali di compost emergono generi termofili e lignocellulosolitici tipici delle fasi di stabilizzazione del substrato; nei *casing* risultano arricchiti generi associati alla fase produttiva di *Agaricus bisporus*, suggerendo possibili interazioni microbioma–fungo.

Nel complesso, la filiera produttiva può essere interpretata come una successione ecologica controllata, articolata in:

1. Fase di selezione termofila e degradativa (compostaggio)
2. Transizione verso substrato produttivo
3. Complessificazione microbica nel casing durante la fase di produzione

Il microbioma batterico emerge quindi come componente funzionale integrata del sistema produttivo, potenzialmente utilizzabile come indicatore biologico dello stato del materiale e della fase del processo. La definizione di firme microbiche caratteristiche apre prospettive applicative per il monitoraggio microbiologico del compost, la valutazione preventiva della qualità biologica del substrato e l'identificazione di indicatori associati alla resa e alla stabilità produttiva.

7. Conclusioni

Il presente studio ha consentito di caratterizzare in modo integrato e ad alta risoluzione la dinamica delle comunità batteriche lungo l'intera filiera produttiva di *Agaricus bisporus*, dalla fase di produzione del substrato fino ai flush produttivi nei tunnel.

I risultati evidenziano un sistema microbiologicamente stabile e riproducibile tra cicli produttivi, confermando l'elevato grado di standardizzazione del processo adottato. Le differenze strutturali osservate non sono attribuibili alla replica di processo, bensì al tipo di materiale e alla fase del ciclo colturale, che emergono come principali driver ecologici della comunità batterica.

La produzione del compost è caratterizzata da comunità selezionate da condizioni termofile e degradative, con arricchimento di taxa coerenti con la trasformazione e stabilizzazione della sostanza organica. Nel tunnel di produzione, e in particolare nel *casing*, si osserva un aumento della diversità e una ristrutturazione della comunità, con la presenza di generi associati in letteratura alla fase produttiva del fungo.

Nel complesso, il microbioma batterico si configura come una componente funzionale integrata del sistema produttivo, potenzialmente utilizzabile come indicatore biologico dello stato del materiale e della fase del processo. La definizione di firme microbiche caratteristiche delle diverse fasi apre prospettive per lo sviluppo di strumenti di monitoraggio microbiologico e per future strategie di ottimizzazione del processo.

Il progetto ha quindi fornito una base scientifica solida per comprendere la struttura e la dinamica del microbioma associato alla produzione di champignon, ponendo le basi per eventuali sviluppi applicativi e approfondimenti futuri.

8. Riferimenti bibliografici

Baars, J. J., Scholtmeijer, K., Sonnenberg, A. S., & van Peer, A. (2020). Critical factors involved in primordia building in Agaricus bisporus: a review. *Molecules*, *25*(13), 2984.

Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P. F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J. L., & Aragno, M. (1996). Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60–80 °C). *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1723–1727.

Chen, Q., et al. (2024). Dynamics of bacterial communities in casing soil during the cultivation of Agaricus bisporus and their association with yield. Journal of Anhui Agricultural Univesity 51 (3).

Cho, K. H., & Kim, Y. K. (2003). Two types of ion channel formation of tolaasin, a Pseudomonas peptide toxin. *FEMS microbiology letters*, *221*(2), 221-226.

Ding, L., & Yokota, A. (2004). *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov., isolated from well water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 87–93.

Karadag, D., Özkaya, B., Ölmez, E., Nissilä, M. E., Çakmakçı, M., Yıldız, Ş., & Puhakka, J. A. (2013). Profiling of bacterial community in a full-scale aerobic composting plant. International Biodeterioration & Biodegradation, 77, 85-90.

Kukolya, J., et al. (2002). *Thermobifida cellulosilytica* sp. nov., a lignocellulose-decomposing actinomycete isolated from compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1193–1199.

Noble, R., Dobrovin-Pennington, A., Hobbs, P. J., Pederby, J., & Rodger, A. (2009). Volatile C8 compounds and their role in mushroom development. *Mushroom Science*, 17, 457–466.

Siyoum, N. A., Surridge, K., & Korsten, L. (2010). Bacterial profiling of casing materials for white button mushrooms (Agaricus bisporus) using denaturing gradient gel electrophoresis. South African Journal of Science, 106(9), 1-6.

Soler-Rivas, C., Jolivet, S., Arpin, N., Olivier, J. M., & Wichers, H. J. (1999). Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4878–4884.

Thai, M., Safianowicz, K., Bell, T. L., & Kertesz, M. A. (2022). Dynamics of microbial community and enzyme activities during preparation of Agaricus bisporus compost substrate. *Isme Communications*, *2*(1), 88.

WA, H. (1969). The nature of the microbial stimulus affecting sporophore formation in Agaricus bisporus. *Annu Appl Biol*, *64*, 177-187.

Watanabe, K., et al. (2007). *Thermobacillus composti* sp. nov., isolated from composting reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 147–151.

Weon, H. Y., et al. (2007). *Ureibacillus composti* sp. nov., isolated from livestock manure compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2220–2223.

Wu, Y., et al. (2018). *Thermostaphylospora grisealba* sp. nov., a thermophilic actinomycete isolated from mushroom compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, 2543–2548.

Xiang, Q., Luo, L., Liang, Y., Chen, Q., Zhang, X., & Gu, Y. (2017). The diversity, growth promoting abilities and anti-microbial activities of bacteria isolated from the fruiting body of Agaricus bisporus. Polish journal of microbiology, 66(2), 201-207.

Oneri sostenuti per l'impiego del personale incaricato

Per svolgere le attività sovra riportate, la suddetta OP ha impiegato il personale incaricato per un totale di:

- Coordinatore attività gruppo di ricerca n. 150 ore
- Assistente coordinatore attività gruppo di ricerca n.265 ore

Il dettaglio delle ore lavorate ed imputabili al progetto è riassunto nel prospetto di seguito riportato:

OP	HORTOIDEA																												
																			Cod IT	524									
Personale incaricato	ANDREA VANNINI																		ANNO	2025									
(riportare il numero di ore per ciascun giorno lavorativo)																													
MESE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	TOTALE ORE DEDICATE AL PROGETTO DI RICERCA
gennaio							3,0	1,0		2,0			3,0	3,0	3,0	1,0					1,0		2,0	2,0								21,00
febbraio			2,0	1,0	2,0	1,0							1,0	3,0	1,0					2,0	2,0						2,0	2,0				19,00
marzo			2,0									2,0									2,0											6,00
aprile								2,0									2,0												2,0			6,00
maggio					2,0																2,0			3,0				2,0			9,00
giugno							2,0			2,0				2,0											2,0	5,0						13,00
luglio			2,0						2,0			2,0						2,0	2,0													10,00
agosto		2,0		3,0			2,0												2,0	2,0					2,0	2,0						15,00
settembre	3,0	1,0									3,0															3,0						10,00
ottobre		1,0	2,0															1,0	1,0	2,0	2,0					2,0	2,0					13,00
novembre				2,0	2,0									2,0					2,0			3,0	3,0									14,00
dicembre	1,0	2,0	1,0	1,0						2,0	2,0	2,0																	3,0			14,00
																																150,00

OP	HORTOIDEA	Cod IT	524

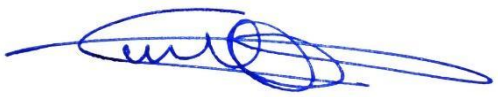
Personale incaricato	MARIA DEL CARMEN MORALES RODRIGUEZ	ANNO	2025

(riportare il numero di ore per ciascun giorno lavorativo)

MESE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	TOTALE ORE DEDICATE AL PROGETTO DI RICERCA
gennaio													2,0	2,0	2,0	2,0	3,0										2,0	2,0				15,00
febbraio			2,0	3,0	2,0	3,0				3,0				3,0			2,0	2,0	2,0	2,0												24,00
marzo										2,0	2,0	2,0	2,0	2,0										3,0	3,0	3,0	3,0				3,0	25,00
aprile							2,0	2,0	2,0	2,0	2,0																	3,0	1,0	1,0		15,00
maggio												2,0	2,0	2,0	2,0	2,0										4,0		4,0	2,0	2,0		22,00
giugno									2,0	2,0	2,0	2,0	2,0										3,0	3,0	3,0	3,0	3,0					25,00
luglio	2,0	2,0	2,0											3,0	3,0	3,0	3,0	3,0														21,00
agosto				2,0	2,0	2,0	2,0	2,0																	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0			20,00
settembre															3,0	3,0	3,0	3,0	3,0			2,0	2,0	2,0	2,0							23,00
ottobre																				3,0	3,0	3,0	2,0	2,0			2,0	2,0	2,0			19,00
novembre			2,0	2,0	2,0	2,0	2,0			2,0	2,0	2,0	1,0				2	2,0	2,0	2,0	2,0											27,00
dicembre	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0										3,0	3,0	3,0	3,0	2,0													29,00
																																265,00

TOTALE GIORNI LAVORATI

Ruolo	Ore Uomo sul progetto	Costo orario	Costo Totale
Coordinatore gruppo di ricerca	150	45,00	6.750,00
Assistente coordinatore attività di ricerca	265	35,00	9.275,00
TOTALE			16.025,00

Viterbo 28/12/2025

Maria del Carmen Morales-Rodríguez