

# SILC

fertilizzanti

## **FACCIAMO IL PUNTO SU...** **Preparazione del Modulo B per Inibitori e Biostimolanti ai sensi del Reg. UE 2019/1009**

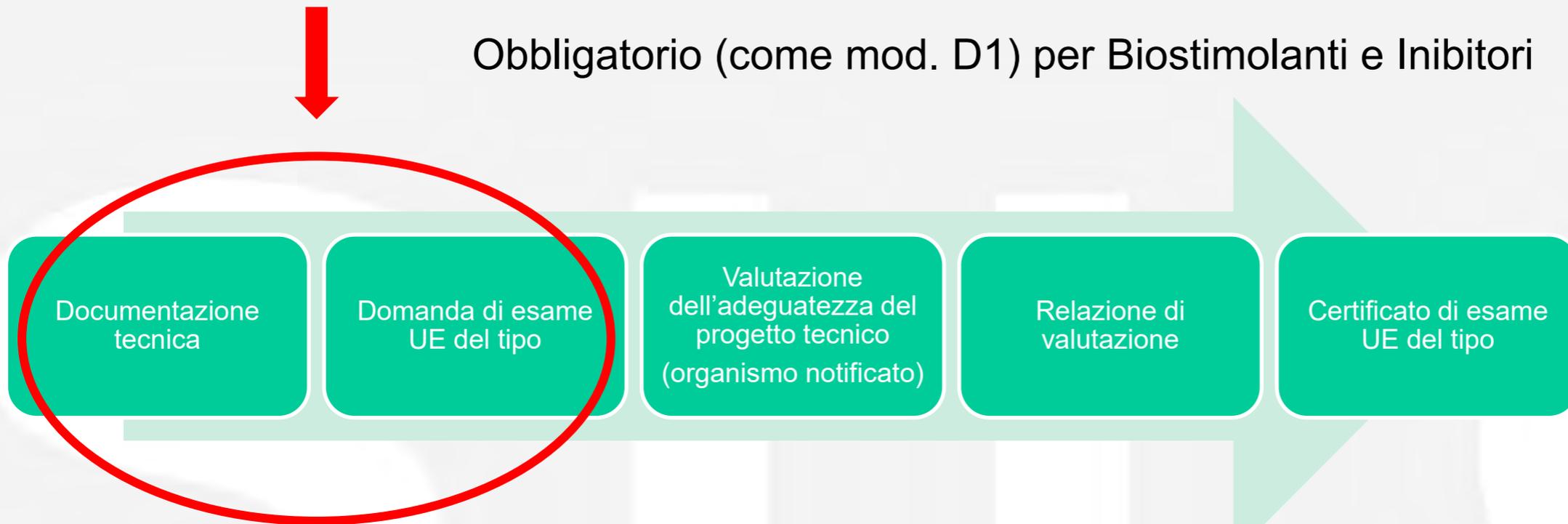
**Giovedì 22 Giugno 2023**

**Michele Vitiello  
Roberta Pucci**

# Modulo B: step by step

procedura di valutazione della conformità con cui un organismo notificato esamina il progetto tecnico di un prodotto fertilizzante dell'UE, e verifica e attesta che il progetto tecnico di tale prodotto fertilizzante dell'UE rispetta le prescrizioni del regolamento UE 2019/1009.

Obbligatorio (come mod. D1) per Biostimolanti e Inibitori



# PFC 6: BIOSTIMOLANTE DELLE PIANTE

1. Un biostimolante delle piante è un prodotto fertilizzante dell'UE con la funzione di stimolare i processi nutrizionali delle piante **indipendentemente dal tenore di nutrienti del prodotto**, con l'unico obiettivo di migliorare una o più delle seguenti caratteristiche delle piante o della loro rizosfera:

- **efficienza dell'uso dei nutrienti**
  - efficienza di assorbimento e/o efficienza di utilizzo
- **disponibilità di nutrienti contenuti nel suolo o nella rizosfera**
  - migliorare la disponibilità di elementi confinati nel suolo e nella rizosfera, es: migliorare la disponibilità di fosforo nella rizosfera, migliorare la disponibilità di azoto nel suolo
- **tolleranza allo stress abiotico**
  - termico, da luce, meccanico, idrico, chimico
- **caratteristiche qualitative**
  - migliora il colore dei frutti, aumenta il numero di fiori, aumenta la dimensione delle radici, grado brix, uniformità

# I tipi di Biostimolanti (PFC 6)

## A. BIOSTIMOLANTE MICROBICO DELLE PIANTE

costituito da un microrganismo o da un consorzio di microrganismi di cui alla CMC 7 della parte II dell'allegato II.

Limiti in termini di patogeni:

<i>Salmonella spp.</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Vibrio spp.</i>
<i>Shigella spp.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Enterococcaceae</i>

- **Definizione di microrganismo** (Reg. 1107/2009): le entità microbiologiche, compresi i funghi e i virus inferiori, cellulari o non cellulari, capaci di replicarsi o di trasferire materiale genetico.

## Microrganismi (CMC 7)

PFC 6 (A) **coincidono** con la CMC 7 che non devono aver subito trattamenti diversi dall'essiccazione o dalla liofilizzazione e appartengano a queste categorie:

1. **Azotobacter spp.**
2. **Funghi Micorrizici**
3. **Rhizobium spp.**
4. **Azospirillum spp.**

# I tipi di Biostimolanti (PFC 6)

## B. BIOSTIMOLANTE NON MICROBICO DELLE PIANTE

– è un biostimolante delle piante diverso da un biostimolante microbico delle piante.

– Limiti di patogeni per: *Salmonella spp.*

*Escherichia coli or Enterococcaceae*

## Esempio: piante, parti di piante o estratti di piante (CMC 2)

che sono state sottoposte **SOLO** a uno o più dei seguenti procedimenti di lavorazione:



piante includono i funghi e le alghe, ma **escludono le alghe azzurre (cyanobacteria)**

# SPECIFICHE TECNICHE

I documenti ufficiali sono già acquistabili online. I punti principali:

- Le prove si possono tenere **in campo**, **in condizioni protette** (serra) o **condizioni controllate** (serra, camera di crescita, laboratorio, ecc.).
- La letteratura scientifica può essere utilizzata per descrivere i metodi utilizzati per misurare l'efficacia del prodotto e le metodologie analitiche.



**Estensive** (grano, mais, patata, riso, bietola, ecc.)



**Legnose Perenni** (pomacee, drupacee, agrumi, vite, ecc.)



**Orticole, ornamentali, aromatiche** (basilico, melanzana, pomodoro, melone, ecc.)

- Le coltivazioni sono divise in 3 macro gruppi

# Numero di prove da condurre

Claim dichiarato	Numero minimo di prove
Claim su Coltura specifica (es: pomodoro):	3 prove nello stesso anno o in più anni
Claim su Gruppo di colture (es: orticole):	6 prove con minimo due gruppi (es: melanzana e peperone) da effettuare nello stesso anno o in più anni
Claim su due gruppi di colture:	8 prove in totale da 2 gruppi diversi = 4 prove per gruppo (con minimo 2 colture diverse per gruppo) prove da effettuare nello stesso anno o in più anni
Claim su tutti i gruppi di colture:	9 prove in totale da 3 diversi gruppi = 3 prove per gruppo (con minimo 2 colture diverse per gruppo)

...e se non conosco qual è il claim del «mio» biostimolante?



Test preliminari condotti dai centri di saggio

# Introduzione del controllo nel disegno sperimentale

Il controllo o “controllo non trattato” è un trattamento che viene condotto sotto la stessa gestione agronomica (applicazione di fertilizzanti, prodotti fitosanitari, irrigazione ecc.), ad eccezione dell'applicazione del prodotto testato:



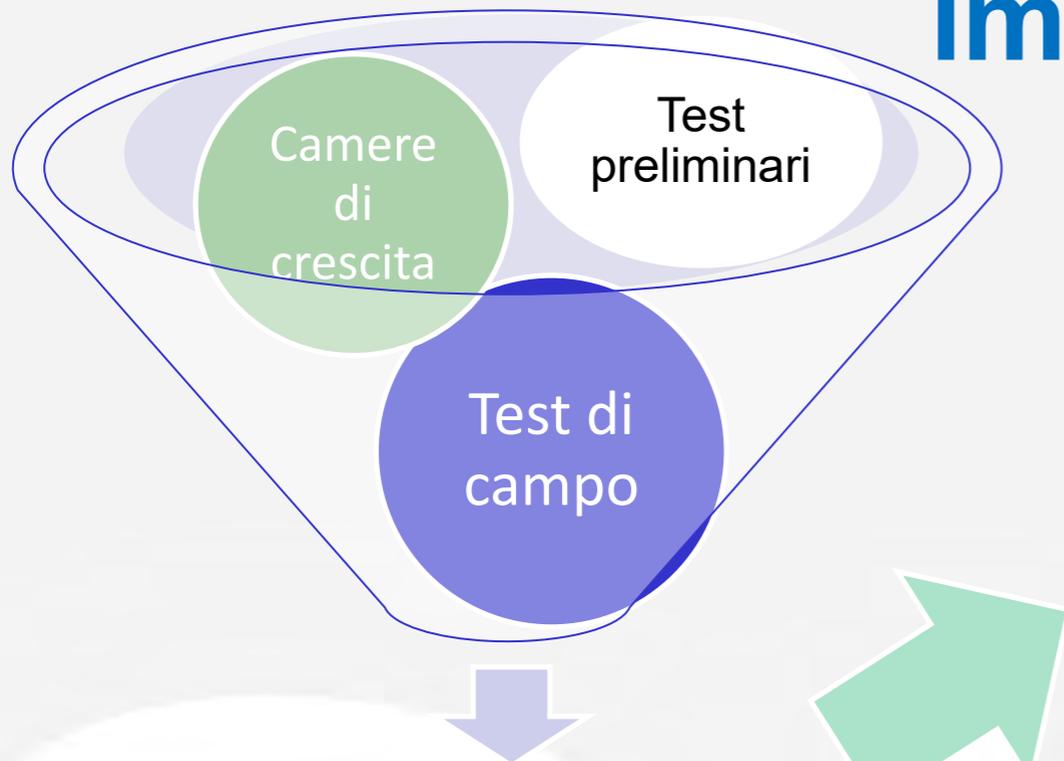
Eccezioni: un plot in pieno campo sotto stress abiotico



Utilizzo di uno stress marker (heat shock protein) affiancato ad uno stress agronomico (es.: scottatura su frutto) in quanto non è possibile avere un controllo negativo

# Biostimolanti: Etichettatura & immissione in commercio

## Centro di Saggio



## Etichetta

- Effetto dichiarato per ciascuna pianta bersaglio (gruppo)
- Applicazione (coltura/dose/frequenza/effetto)
- incompatibilità con prodotti fitosanitari, dimensioni degli ugelli e pressione dell'irroratrice, altre misure antideriva

**MODULO B+C**  
MODULO B – ESAME UE DEL TIPO  
MODULO C – CONFORMITÀ AL TIPO  
BASATA SUL CONTROLLO INTERNO  
DELLA PRODUZIONE  
o MODULO D1

**Organismo di valutazione  
della conformità (CAB)  
(esame)**



**le informazioni in etichetta  
devono essere scientificamente  
supportate da prove**

# Prove agronomiche (trial) biostimolanti: sperimentazione, dati e risultati

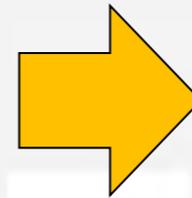
Esempio: **effetto desiderato/Claim** (es. «il biostimolante è efficace per il danno da scottatura in pieno campo su pomodoro»)

L'ipotesi sarà dimostrata dopo aver eseguito un **trial** e aver fatto **test statistici** con i **dati accumulati** (confronto di **medie** e **varianze** tra il **controllo** non trattato e le piante **trattate con una o più dosi**)

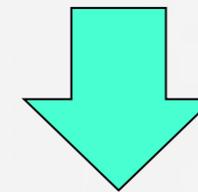
Alcuni dei **dati** più importanti da prendere in considerazione saranno:

- Modalità di sperimentazione;
- Area delle unità sperimentali, numero di campioni e di repliche, dosi;

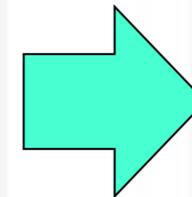
- Indici
- P-value



Dati che verranno utilizzati per i test statistici

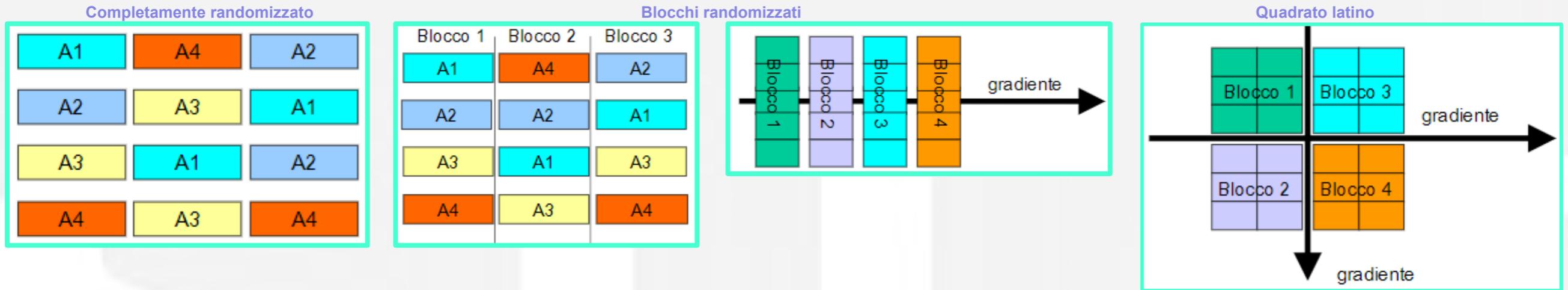


Risultato



# Disegno sperimentale: quale scegliere?

- Il **disegno sperimentale** suddivide il campo in **unità sperimentali** (parcelle = plot)
- Le **unità sperimentali** sono le unità trattate con il biostimolante
- La **replica** è l'unità sperimentale ripetuta
- Le sperimentazioni più utilizzate in agricoltura sono: **completamente randomizzato**, a **blocchi randomizzati**, a **quadrato latino**.



- **Omogeneità tra unità sperimentali** nel terreno e/o tra le piante → **Completamente randomizzato**;
- **Disomogeneità tra unità sperimentali** nel terreno e/o tra le piante → **Blocchi randomizzati o quadrato latino**.

Esempio: **gradiente** di concentrazione di un nutriente nel terreno.

# Disegno sperimentale: repliche, unità sperimentali, campioni

## 1. Repliche: **minimo** 4

- Sugerite **almeno** due dosi per replica (il numero raddoppia)



## 2. Area unità sperimentali e numero minimo di campioni:

### • Trial in pieno campo:

- **Minimo** 20 m<sup>2</sup> per le colture estensive (es. girasole),
- **Minimo** 3 piante per le colture perenni legnose (es. melo) e **minimo** 25 unità (**campioni**)/parcella (es. frutti/gemme/foglie/fiori)
- **Minimo** 10 m<sup>2</sup> per colture ortive, ornamentali e officinali (es. carota, cetriolo, anice)
- Trial in condizioni controllate con e senza controllo dei parametri ambientali:
  - **Minimo** 3 piante per replica (es. serra, camera di crescita, laboratorio, ecc).



Meglio non limitarsi ai valori minimi...



# Risultato: analisi statistica e p-value

- L'analisi statistica restituisce come risultato degli **indici** tra cui il **p-value** (probabilità che il **riconoscimento di un effetto positivo** del biostimolante sia dovuto solo al **caso**).
- Quindi, il **caso** fa campionare unità (campioni) a cui si può attribuire un effetto positivo al biostimolante, senza che lo abbia realmente. Quali sono le cause?
- Una delle cause di **errore dovuto al caso** è effettuare un **campionamento ridotto** che può non essere rappresentativo della popolazione iniziale

Popolazione iniziale

Campione



- Vale lo stesso ragionamento per il **numero di repliche**
- Valori **minimi** di p-value: **pieno campo e serra** (<0,15) e con **controllo dei parametri ambientali** (<0,1)

# Conclusioni: dalla teoria alla pratica in campo

- *Caso: Validare l'efficacia di un biostimolante per il claim sullo stress abiotico «scottatura da colpo di calore» per una coltura in pieno campo;*
- Obiettivo: concludere tre trials che restituiscano ognuno p-value almeno  $< 0,15$ ;
- Consigli:
  - Non limitarsi a impostare le prove con il **numero minimo di campioni e di repliche** → Non raggiungere i risultati statistici desiderati, anche per un solo trial, compromette la riuscita di tutto l'insieme dei tre trials;
  - Fare le giuste valutazioni agronomiche per trovare un compromesso tra numero di repliche e campioni, concentrazioni delle dosi e costi;



- È necessario un **rapporto di comunicazione continua** tra il **centro di saggio, fabbricante e l'ente certificatore** e anche un'**approfondita conoscenza della normativa, delle Technical Specification e del prodotto**

# Modulo B e Inibitori: PFC 5 a marchio CE

Un **inibitore** è un prodotto fertilizzante dell'UE con la funzione di migliorare le modalità di rilascio dei nutrienti di un prodotto che fornisce nutrienti alle piante ritardando o bloccando l'attività di gruppi specifici di microrganismi o enzimi.

**ATTENZIONE:** il regolamento non propone liste di inibitori ma ne definisce solo la funzione e cosa si deve dimostrare per valutarne l'efficacia!

Il **composto inibitore**, è sottoposto alla procedura di valutazione della conformità con intervento dell'**organismo notificato**

La documentazione tecnica prevede i verbali di prova che dimostrino quanto prescritto dal regolamento:

- **inibitore dell'ureasi:** è richiesta una **prova in vitro** dove l'inibitore inibisce l'enzima ureasi **riducendo del 20% il tasso di idrolisi dell'urea**
- **inibitore della nitrificazione:** è richiesta una prova su un **campione di terreno** dove si evidenzia una **riduzione del 20% del tasso di ossidazione dell'azoto ammoniacale**
- Le verifiche della riduzione vanno fatte **14 giorni dopo l'applicazione** rispetto al campione di controllo senza inibitore

**SILC collabora con vari istituti che effettuano i test sugli inibitori nel rispetto di quanto previsto**



**GRAZIE**

**SILC**  
fertilizzanti

**Michele VITIELLO**  
[michele@silcfertilizzanti.it](mailto:michele@silcfertilizzanti.it)

**Roberta PUCCI**  
[roberta@silcfertilizzanti.it](mailto:roberta@silcfertilizzanti.it)

**SILC Fertilizzanti Srl**  
Via delle Acque, 43 – 48124 Ravenna (RA) Italy  
Phone +39 0544 419704