

VERIFICA DELL'EFFICACIA DELL'ACQUA OZONIZZATA NELLA DIFESA DELLA BARBABIETOLA DA ZUCCHERO DA *CERCOSPORA BETICOLA*

G. CAMPAGNA¹, F. VALLI², R. PILANI²

¹ Co.Pro.B. - Cooperativa Produttori Bieticoli - Soc. Coop. Agricola - Via Mora 56, 40061 Minerbio (BO)

² Agri 2000 Net - Via Marabini 14/A, 40013 Castel Maggiore (BO)
valli@agri2000.it

RIASSUNTO

Durante il biennio 2017-2018 sono stati realizzati saggi di campo e di laboratorio per valutare l'efficacia di acqua addizionata di ozono nella difesa della barbabietola da zucchero da *Cercospora beticola* e nella riduzione della carica conidica svernante. L'acqua ozonizzata, prodotta mediante specifica attrezzatura è stata applicata in campo, miscelata ad acqua, mediante irrorazione alla dose di 1-4 mg/L. I saggi di laboratorio hanno invece previsto l'immersione di foglie sintomatiche di barbabietola nell'acqua ozonizzata. I risultati si sono rivelati nel complesso incoraggianti, mostrando una efficacia abbattente dell'acqua ozonizzata nei confronti di cercospora, aprendo la strada a possibili futuri impieghi in agricoltura biologica.

Parole chiave: applicazioni fogliari, cercosporiosi

SUMMARY

EVALUATION OF OZONATED WATER IN THE CONTROL OF *CERCOSPORA BETICOLA* ON SUGAR CANE BEET

In 2017 and 2018, field trials and laboratory tests were carried out to verify the effectiveness of ozonated water in the defence of sugar beet against *Cercospora beticola* and in the reduction of the overwintering conidial load. The results were generally encouraging, demonstrating the knock-down effect of ozone and paving the way for possible future uses in organic farming.

Keywords: Cercospora leaf spot, efficacy

INTRODUZIONE

La crescente attenzione per l'impatto ambientale, la sicurezza degli operatori e la resistenza dei patogeni Agli agrofarmaci è di stimolo per sviluppare mezzi di protezione alternativi ai fungicidi di sintesi. L'applicazione di acqua ozonizzata può rappresentare una promettente soluzione per la protezione delle piante. Il largo spettro d'azione contro batteri e funghi e l'assenza di residui suggeriscono che l'acqua ozonizzata possa essere applicata nella difesa contro le malattie fungine delle piante, con garanzie di sicurezza per l'ambiente e per l'uomo.

L'ozono è una molecola caratterizzata da un elevato potenziale ossidativo (potenziale redox di + 2,07 V), inferiore solo ad alcune sostanze, ma nettamente superiore a quello del cloro. Il principale meccanismo di azione è la perossidazione lipidica che causa danni ai fosfolipidi di membrana dei microrganismi (Khadre et al., 2001) La tossicità dell'ozono dipende, inoltre, dalla sua capacità di ossidare gli amminoacidi, alterando irreversibilmente la struttura e la funzione delle proteine. L'azione ossidante esplicata dall'acqua ozonizzata ha fatto sì che fin dalla sua scoperta venisse utilizzata come agente battericida, fungicida ed inattivante dei virus.

L'efficacia antimicrobica dell'ozono è stata comprovata in diversi settori di impiego, dalla sanificazione di ambienti di lavoro nell'industria alimentare (Previdi et al., 2009), al

trattamento e potabilizzazione di acque reflue (Cho et al., 2003; Mahmoudi et al., 2015), fino al trattamento in post-raccolta di derrate agricole come la fragola (Thaer et al., 2013).

Lo scopo della presente sperimentazione è stato di valutare l'efficacia dell'acqua ozonizzata nei confronti di *Cercospora beticola*, principale malattia fogliare della barbabietola da zucchero.

MATERIALI E METODI

Sono state predisposte due distinte sperimentazioni: una prova in pieno campo, nel 2017, per valutare l'efficacia nel preservare l'apparato fogliare dall'attacco fungino e dalla progressione della malattia, mentre nel biennio 2017 – 2018 sono stati condotti altri tipi di saggi sperimentali, alcuni che prevedevano l'applicazione in campo, con successive analisi di laboratorio mentre altri, esclusivamente di laboratorio, avevano come specifico obiettivo quello di valutare la capacità di acqua ozonizzata nell'abbattimento dell'inoculo svernante presente sui residui colturali.

L'acqua ozonizzata è stata prodotta mediante una macchina modello MOW™ (MET Medical Equipment Technologies Srl, San Lazzaro di Savena – BO). Il processo di produzione è in sintesi il seguente: l'ossigeno, prodotto da un generatore di tipo medicale, viene iniettato all'interno di un generatore al plasma, composto di acciaio e ceramica, poi scisso da una scarica elettrica ad alta tensione tra i 7000 e i 15000 V, che genera molecole monoatomiche estremamente instabili che tendono ad aggregarsi all'ossigeno andando a formare molecole di ozono. Il gas ozono così generato, viene iniettato in un flusso di acqua attraverso un Venturi poi, per ottimizzare il processo di aggregazione dell'ozono all'acqua, detto flusso viene fatto passare in un apposito miscelatore per favorire la saturazione fisica delle molecole dell'acqua. A questo punto l'acqua ozonizzata viene resa disponibile al rubinetto di uscita del generatore, in concentrazione variabile a seconda dei livelli di potenza impostati e della portata dell'acqua da erogare, e a seconda dell'impiego.

Prova di efficacia in pieno campo con acqua ozonizzata

La prova in pieno campo, volta a verificare l'efficacia di ozono disciolto in acqua a basse concentrazioni (1-4 mg/L), è stata condotta nel periodo maggio-agosto 2017, presso l'azienda agricola Rizzi Angelo, in comune di Argelato (BO), su barbabietola da zucchero varietà Gladiator, seminata il 20 febbraio 2017. Lo schema sperimentale prevedeva l'applicazione dei prodotti su parcelle di grandi dimensioni (3 m di larghezza per 70 m di lunghezza), per una superficie di 210 m², disposte una di fianco all'altra e separate da stradelli di 0,45m di larghezza. Ad ogni tesi in prova è stata attribuita a caso una parcella, all'interno della quale sono state ricavate 4 sotto-parcelle.

Le tre tesi sperimentali hanno previsto l'impiego di acqua ozonizzata alla medesima concentrazione di 1-4 mg/L ma con diversi intervalli applicativi, di 3, 6 e 9 giorni per un totale rispettivamente di 12,6 e 4 applicazioni. Le tesi in prova sono riportate in tabella 1.

Le applicazioni sono state eseguite con motopompa spalleggiata, dotata di barra con ugelli, di tipo Teejet TJ60 110 ins. INOX 03 e volume di 600 L/ha per le tesi con ozono, e Teejet XR 110-03 con un volume di applicazione di 500 L/ha per le due tesi con fungicidi di sintesi. I trattamenti sono stati effettuati in maniera preventiva a partire dal 22 giugno.

La presenza di *C. beticola* è stata valutata rilevando incidenza e severità su 100 foglie per replica in data 10 luglio, 18 luglio, 27 luglio e 9 agosto 2017, selezionandole casualmente solo nella parte centrale di ogni parcella. I risultati sono stati sottoposti all'analisi della varianza (Anova) con test di SNK (Student Newman Keuls) ($p \leq 0,05$) per la separazione delle medie. Il

livello di efficacia percentuale dei trattamenti è stato calcolato secondo la formula di Abbott sui dati medi di severità.

Tabella 1. Descrizione delle tesi saggiate nella prova di Argelato, anno 2017

Tesi	Formulato	Sostanza attiva	Dose	Num. di applicazioni (epoca di impiego)
1	Acqua ozonizzata	ozono	1 – 4 mg/L	12 (ABCDEFGHIKLNOQ)
2	Acqua ozonizzata	ozono	1 – 4 mg/L	6 (ACEHLO)
3	Acqua ozonizzata	ozono	1 – 4 mg/L	4 (ADHM)
4	Clortosip 500 SC +	clorotalonil	2 L/ha	1 (A)
	Thiopron +	zolfo	4 kg/ha	
	Century +	fosfito di potassio	2 L/ha	
	Clortosip 500 SC +	clorotalonil	2 L/ha	1 (E)
	Enovit-methyl FL Beet	tiofanate-metile	1,5 kg/ha	
5	Testimone non trattato			

Date trattamenti: A=22/6, B=26/6, C=28/6, D=30/6, E=04/7, G=07/7, H= 10/7, J=12/7, K=13/7, L=17/7, M=19/7, N=20/7, O=24/7, P=26/7, Q=27/7

Prova di laboratorio per valutare la riduzione dell'inoculo svernante

Nel corso della stagione 2017 inoltre sono stati effettuati 2 distinti saggi sperimentali. Il primo ha previsto l'applicazione, poco prima della raccolta (in agosto), di acqua ozonizzata alla concentrazione di 1-4 mg/L su una piccola superficie di campo, distribuita mediante motopompa spalleggiata. Subito dopo l'applicazione sono stati raccolti, per ciascuna modalità applicativa, dei campioni fogliari con evidenti sintomi di cercospora sottoposti poi ad analisi presso il laboratorio fitopatologico CeRSAA (Centro di Sperimentazione ed Assistenza Agricola, Albenga – SV), mediante osservazioni in microscopia ottica, di sospensioni di lavaggio delle foglie, volte a determinare i valori di conidi di *C. beticola* per cm² di superficie fogliare sintomatica, mediante conteggio in camera di Burker.

Il secondo saggio, prettamente di laboratorio, prevedeva l'applicazione di acqua ozonizzata alla concentrazione di 1-4 mg/L tramite immersione di foglie di bietola sintomatiche per 5 secondi, al fine di ottenere un "caso ottimale" rispetto al trattamento fatto in campo. Sulle foglie così trattate sono stati condotti tre tipi di analisi sempre tramite osservazioni in microscopia ottica di sospensioni di lavaggio delle foglie (preparato su vetrino): concentrazione di conidi di *C. beticola* per cm² di superficie fogliare sintomatica al 100%, valutazione della vitalità conidica (mediante colorazione con Trypan blue), intesa come integrità di membrana dei conidi di *C. beticola* rispetto alla carica totale, ed energia germinativa dei conidi vivi intesa come percentuale di emergenza del tubulo germinativo. Quest'ultima effettuata mediante osservazione in microscopia ottica, previa semina su piastre agarizzate della sospensione di lavaggio delle foglie.

Nel 2018 infine, è stata nuovamente valutata l'attività dell'acqua ozonizzata mediante saggi prettamente di laboratorio, indagando i medesimi parametri con le stesse modalità già precedentemente descritte per i saggi del 2017.

Tutti i saggi sono stati effettuati a partire da 5 porzioni fogliari da 1 cm², completamente sintomatiche. Tali porzioni sono state sospese in acqua sterile deionizzata ottenendo soluzioni di lavaggio 1:10 peso/peso. Di ogni indagine sono state condotte 3 repliche.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Prova di efficacia in pieno campo di Argelato (2017)

L'andamento climatico osservato ad Argelato è stato caratterizzato da una prima parte della primavera piuttosto piovosa, seguita da una pressoché totale assenza di piogge tra la seconda metà di maggio e la prima metà di giugno. Il periodo estivo è stato caldo con sporadici temporali.

Nella prova i primi sintomi di infezione di cercospora su foglia sono stati riscontrati il 25 giugno, data precedente la seconda applicazione, con un'incidenza del 10% e una severità del 0,5% su testimone non trattato. La cercospora è progressivamente aumentata durante il mese di luglio fino a raggiungere, al termine della prova, in data 9 agosto, un livello di infezione molto alto, con severità ed incidenza sul testimone non trattato, rispettivamente del 55% e 100%, come riportato in tabella 2.

Visto l'elevato livello di infezione riscontrato al termine della prova, 13 giorni dopo l'ultima applicazione, la tesi 1 in cui è stata saggiata l'acqua ozonizzata, con intervallo applicativo di 3 giorni, si è mostrata l'unica tra le tesi sperimentale capace di produrre un seppur lieve contenimento della malattia, senza comunque mostrare differenze significative rispetto al testimone. Da notare che, ai rilievi del 18 e 27 luglio, l'acqua ozonizzata con intervallo applicativo di 3 giorni manteneva un controllo superiore al 60% per la severità, con differenze significative rispetto al testimone non trattato sia in termini di incidenza che di severità. Per contro, alle medesime date, le tesi con intervalli di applicazione di 6 e 9 giorni non differivano statisticamente dal testimone, mostrando livelli di controllo non adeguati.

Tabella 2. Risultati dei rilievi su foglia, prova 2017

Tesi	10/7		18/7		27/7		9/8	
	Incidenza (%)	Severità (%)	Incidenza (%)	Severità (%)	Incidenza (%)	Severità (%)	Incidenza (%)	Severità (%)
1	20 a	1,3 a (32,5)*	85 b	10,6 b (61,9)	87,5 b	16,6 bc (63)	95 a	46,5 b (14,5)
2	23,8 a	1,9 a (20,4)	91,3 ab	24,4 a (12,7)	93,8 a	32,8 ab (24)	97,5 a	51,4 ab (6,1)
3	28,8 a	3,2 a (0)	97,5 a	38,9 a (0)	98,8 a	34,9 ab (22,1)	100 a	56,3 ab (0)
4	6,3 b	0,2 b (86,1)	47,5 c	2,2 c (92,6)	57,5 c	4,4 c (89,9)	61,3 b	8,9 c (84,6)
5	23,8 a	3,1 a	91,3 ab	29 a	97,5 a	42,9 a	100 a	55 ab

I valori della stessa colonna contrassegnati da lettere diverse differiscono tra loro per $p \leq 0,05$ (Test SNK).
*grado di efficacia % secondo Abbott

Test di laboratorio anno 2017

In tabella 3 vengono presentati i risultati ottenuti nei saggi per valutare la riduzione della carica complessiva di inoculo svernante, dopo applicazione in campo con motopompa spalleggiata oppure per immersione diretta in acqua ozonizzata di foglie sintomatiche.

Con entrambe le modalità applicative, le differenze mostrate dalle due tesi in prova, foglie non trattate e foglie trattate con acqua ozonizzata, sono risultate non significative al test di Tukey. In entrambi i casi è emerso che l'applicazione di acqua addizionata con ozono, alla concentrazione di 1 – 4 mg/L ha ridotto, in termini numerici, la carica conidica totale rispetto al testimone non trattato.

Tabella 3. CFU di conidi di *Cercospora beticola* per cm² di superficie sintomatica al 100% (trattamento in campo e immersione delle foglie in acqua ozonizzata), rilievo del 2/8/17

Tesi	Dose	Campo	Immersione
Testimone non trattato		5,95 x 10 ⁵ *	1,04 x 10 ⁵ *
Acqua ozonizzata	1 – 4 mg/L	3,87 x 10 ⁵ *	8,93 x 10 ⁴ *

*CFU/cm² di superficie sintomatica al 100%. Dato medio ottenuto da 3 repliche

Nella tabella 4 è riportata la valutazione della vitalità dei conidi di *C. beticola*, rispetto alla carica totale, ponendo a confronto campioni fogliari non trattati con campioni fogliari immersi in acqua ozonizzata ad 1-4 mg/L. La vitalità dei conidi è stata espressa come percentuale di conidi che, sulla carica conidica totale, presentavano membrana integra.

Tabella 4. Integrità di membrana di conidi di *Cercospora beticola* in seguito ad immersione delle foglie in acqua ozonizzata, rilievo dell'11/11/17

Tesi	Dose	Integrità
Testimone non trattato		100%*
Acqua ozonizzata	1 – 4 mg/L	60%*

*percentuale di conidi con membrana integra sulla carica totale. Dato medio ottenuto da 3 repliche

Dall'analisi di vitalità è stata riscontrata una diminuzione del 40% dell'integrità di membrana dei conidi provenienti dai campioni trattati rispetto al non trattato, evidenziando una discreta capacità dell'acqua ozonizzata nel devitalizzare i conidi di *C. beticola*.

Infine, in tabella 6 viene riportato l'esito del saggio per valutare l'emergenza del tubulo germinativo, ponendo a confronto campioni fogliari non trattati con campioni fogliari immersi in acqua ozonizzata ad 1-4 mg/L.

Confrontando il campione non trattato con il campione trattato con acqua ozonizzata si riscontra una diminuzione del 16,1% nella percentuale di germinazione dei conidi presenti.

L'apparente discrepanza tra i campioni non trattati nei due saggi effettuati (100% di conidi con membrana integra contro 84,8%) è da ascrivere alla possibile non colturalità su terreno agarizzato di una frazione dei conidi di *Cercospora beticola*.

Tabella 5. Emergenza del tubulo germinativo di conidi di *Cercospora beticola* in seguito ad immersione delle foglie in acqua ozonizzata, rilievo dell'11/11/17

Tesi	Dose	Emergenza
Testimone non trattato		84,8%*
Acqua ozonizzata	1 – 4 mg/L	68,7%*

*percentuale di conidi che evidenziano emergenza del tubulo germinativo sulla carica totale. Dato medio ottenuto da 3 repliche

Test di laboratorio anno 2018

In tabella 6 viene riportato l'esito del saggio per valutare la vitalità dei conidi e l'emergenza del tubulo germinativo, ponendo a confronto campioni fogliari non trattati con campioni fogliari immersi in acqua ozonizzata ad 1-4 mg/L.

Tabella 6. Vitalità ed energia germinativa di conidi di *Cercospora beticola* in seguito ad immersione delle foglie in acqua ozonizzata, rilievo del 2/10/2018

Tesi	Dose	Integrità di membrana*	Energia germinativa conidi vivi**
Testimone non trattato		90	100
Acqua ozonizzata	1 – 4 mg/L	70	85

* % di conidi con membrana integra sulla carica totale. Dato medio ottenuto da 3 repliche

** % di conidi che evidenziano emergenza del tubulo germinativo sulla carica totale. Dato medio ottenuto da 3 repliche

In termini di vitalità dei conidi, l'acqua ozonizzata ha determinato una riduzione del 22,2% di conidi con membrana integra rispetto al testimone non trattato dato inferiore rispetto a quanto osservato nei saggi del 2017. Infine, in termini di energia germinativa di conidi vivi, l'acqua ozonizzata ne ha determinato una riduzione del 15% rispetto al testimone non trattato, confermando sostanzialmente il dato del 2017.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel biennio 2017 - 2018 nella prova di campo e nei saggi di laboratorio, indicano una possibile potenzialità di impiego per l'acqua ozonizzata nel contenimento in campo di patogeni fogliari come *Cercospora beticola*, nonché opportunità per l'abbattimento della carica di inoculo svernante, mostrandosi in grado di inibire, almeno in parte, la vitalità e la germinazione dei conidi.

La limitazione nell'applicazione pratica dell'acqua ozonizzata potrebbe invece riferirsi al rapido tempo di disattivazione dell'attività fungicida e alla mancanza di una persistente azione preventiva o penetrante. L'acqua ozonizzata ha mostrato un effetto solo su strutture fungine presenti al momento del trattamento e pertanto un suo impiego pratico richiederebbe una ripetizione frequente dei trattamenti.

Ringraziamenti

Si ringraziano l'azienda MET (Medical Equipment Technologies Srl, San Lazzaro di Savena – BO) per la messa a disposizione della macchina produttrice di acqua ozonizzata ed il CeRSAA (Centro di Sperimentazione ed Assistenza Agricola, Albenga – SV) per l'esecuzione delle analisi fitopatologiche a supporto dei test di laboratorio.

LAVORI CITATI

- Cho M., Chung H., Yoon J., 2003. Disinfection of water containing natural organic matter by using ozone-initiated radical reactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4, 2284 – 2291.
- Khadre M.A., Yousef A.E., Kim J.G., 2001. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A review. *JFS: Concise Reviews in Food Science*, 66, 9, 1242 - 1252.
- Mahmoudi A., Shafahee H. A., Roudbari A. A., 2015. The effects of water ozonation on disinfection by-product formation. *International Journal of Health Studies*, 1(1), 32 – 35.
- Previdi M. P., Franceschini B., Fortini G., 2009. Impiego dell'ozono per la disinfezione di acque e superfici metalliche e in polistirene artificialmente contaminate. *Industria Conserve*, 1, 84, 31 – 41.
- Thaer Y., D'Onghia A. M., Ricelli A., 2013. The use of ozone in strawberry post harvest conservation. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens. IOBC-WPRS Bulletin*, 86, 143 – 148.