

## OSSERVAZIONI SULL'ATTIVITÀ DI SOSTANZE NATURALI VERSO IL FUNGO *ASPERGILLUS CARBONARIUS* E LA CONTAMINAZIONE DA OCHRATOSSINA A DELLE UVE

S. POLLASTRO<sup>1</sup>, C. DONGIOVANNI<sup>2</sup>, C. GIAMPAOLO<sup>2</sup>, M. DI CAROLO<sup>2</sup>,  
F. MINGOLLA<sup>1</sup>, P. NATALE<sup>2</sup>, P. POLLASTRO<sup>2</sup>, R.M. DE MICCOLIS ANGELINI<sup>1</sup>,  
A. PICCHIERRI<sup>1</sup>, F. FARETRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia applicata  
Università degli Studi di Bari - Via Amendola, 125, 70126 Bari

<sup>2</sup> Centro di Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura "Basile Caramia"  
Via Cisternino, 281, 70010 Locorotondo (BA)  
faretra@agr.uniba.it

### RIASSUNTO

L'ochratoossina A (OTA) è un comune contaminante di numerosi alimenti ovunque nel mondo. Il Reg. (CE) n. 123/2005 ha fissato in 2 µg/kg la concentrazione massima tollerabile di OTA nel vino e altri prodotti derivati dall'uva. La prevenzione della contaminazione deve essere effettuata nei vigneti contenendo lo sviluppo sull'uva del fungo ocratoxigeno *Aspergillus carbonarius*. In agricoltura biologica, i mezzi tecnici impiegabili contro il micete sono scarsi. Diverse sostanze naturali sono state impiegate nel biennio 2006-2007 su 'Primitivo' e 'Negroamaro'. In presenza di bassi livelli di malattia, è stata osservata una modesta o nulla attività delle sostanze naturali saggiate verso le diverse forme di marciume del grappolo e la contaminazione da OTA nel mosto.

**Parole chiave:** agricoltura biologica, muffa grigia, marciumi del grappolo, vino

### SUMMARY

#### OBSERVATIONS ON THE ACTIVITY OF MICROBIAL ANTAGONISTS AND NATURAL SUBSTANCES AGAINST *ASPERGILLUS CARBONARIUS* AND OCHRATOXIN A CONTAMINATION OF GRAPES

Ochratoxin A (OTA) is a common contaminant of several foods and feeds all over the world. The Reg. (CE) n. 123/2005 established in 2 µg/kg the maximum tolerable OTA concentration in wine and other grape-derived products. The prevention of OTA contamination has to be carried out in vineyards controlling the development on grape of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. In organic agriculture, compounds that can be used against the fungus are few. Several natural substances were tested in the years 2006-2007 on 'Primitivo' and 'Negroamaro'. In presence of low levels of disease pressure occurred, a low or no effectiveness of the tested natural substances was observed against bunch roots and OTA contamination in must.

**Keywords:** organic agriculture, grey mould, bunch rots, wine

### INTRODUZIONE

Il Reg. CEE 2092/91 disciplina l'agricoltura biologica anche in viticoltura; la fase successiva di trasformazione enologica e, quindi, la produzione di vini biologici non è invece normata. Ciononostante, la commercializzazione di vini recanti la dicitura "vino biologico" piuttosto che "vino prodotto da uve da agricoltura biologica" è molto comune. In Italia la viticoltura biologica ha la tendenza mostrata dall'agricoltura biologica in generale. Dopo un decennio di crescita a ritmi molto elevati a partire dal 1991, la sospensione degli incentivi economici ha determinato un brusco ridimensionamento delle superfici coltivate che, negli

ultimi anni, si sono tuttavia stabilizzate. La necessità di mezzi tecnici idonei a contenere la dannosità di vari patogeni fungini è particolarmente sentita in viticoltura biologica; i pochi mezzi disponibili, infatti, non sempre permettono di garantire qualità e salubrità delle uve e del vino.

Il Reg. (CE) n. 123/2005, e successive modifiche, ha stabilito in 2 µg/kg la concentrazione massima tollerabile di ocratossina A (OTA) in vino, mosto, succhi d'uva e bevande a base di succo d'uva. L'intensa attività di ricerca svolta negli ultimi anni ha portato ad accertare che lo sviluppo di *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom sull'uva nel vigneto è la causa principale della contaminazione da OTA dei mosti e dei vini (Pollastro *et al.*, 2005a). Un adeguato contenimento del micete riduce sensibilmente il livello di contaminazione da OTA dei vini (Pollastro *et al.*, 2005b, 2006a).

La presente nota riporta i risultati relativi alla valutazione dell'efficacia di sostanze naturali e antagonisti microbici nei confronti del micete e degli effetti sulla contaminazione da OTA nei mosti.

### MATERIALI E METODI

Nel 2006 le valutazioni sono state condotte in un vigneto di "Primitivo" (prova A), nel 2007 in un vigneto di "Primitivo" (prova B) ed uno di Negroamaro' (prova C). Caratteristiche salienti dei vigneti e date di vendemmia sono riportate nella tabella 1. I programmi di intervento posti a confronto hanno previsto trattamenti in pre-chiusura del grappolo (B), invaiatura (C), 10 giorni dopo l'intervento C (D) e 10 giorni dopo l'intervento D (E). Caratteristiche dei prodotti e dosi impiegate sono indicate nella tabella 2.

I trattamenti sono stati eseguiti con una pompa a spalla a volume normale (Arimitsu, mod. SD 251K) erogante l'equivalente di 1.000 l/ha o con una solforatrice a spalla della capacità di 5 kg (Pietro Ferrari Padova, mod. PL60).

Al momento della vendemmia aziendale, sono stati prelevati 40-50 grappoli per parcella (3-5 grappoli per pianta). Ciascun grappolo è stato singolarmente ispezionato per contare le bacche interessate da muffa grigia, marciume acido o marciumi secondari causati da *Aspergillus* sp. o *Penicillium* sp.. I dati ottenuti sono stati impiegati per calcolare la diffusione della malattia (percentuale di grappoli infetti) e il numero medio di bacche infette per grappolo infetto. I campioni di uva di ciascuna parcella sono stati pigiodiraspati e campioni di mosto (100 ml) sono stati impiegati per le successive determinazioni. Per l'analisi micologica, aliquote (100 µl) di mosto e idonee diluizioni decimali sono state distribuite sulla superficie di un substrato semi-selettivo per la rilevazione di *A. carbonarius* (Pollastro *et al.*, 2006b) in capsule Petri (100 mm). Le colonie sviluppatesi entro 5 giorni a 25±1°C sono state contate e identificate sulla base delle caratteristiche morfologiche e microscopiche. L'OTA è stata quantificata mediante analisi in HPLC seguendo il metodo descritto da Visconti *et al.* (1999).

Per l'analisi statistica, i dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza ed al test di Duncan (1955).

Tabella 1. Caratteristiche salienti dei vigneti che hanno ospitato la sperimentazione

Prova	Vitigno	Località	Sesto d'impianto (m)	Piante parcella	Data della Vendemmia
A	Primitivo	Manduria (TA)	2,0 x 1,3	12	07/09/2006
B	Primitivo	Manduria (TA)	2,0 x 1,3	9	30/08/2007
C	Negroamaro	Cellino San Marco (BR)	2,0 x 1,3	10	5/09/2007

Tabella 2. Tesi poste a confronto

Tesi n.	Sostanza attiva	Formulato Commerciale	Società	Dose (g o ml/ha)
1	Testimone	-	-	-
2	Pinolene	Vapor gard	Intrachem Bio Italia	8000
3	Sodio bicarbonato +olio minerale	Sodio bicarbonato RPE + Newoil	Carlo Erba +Scam	5000 + 2000
4	Bentonite + calce idrata superventilata	Superbenton + Fiore di calce	Dal Cin + Adriatica legnami srl	40000 + 25000
5	Ossicloruro di rame	Cuprocaffaro	Isagro Italia	4000
6	Idrossido di rame	Kocide 2000	Du Pont	2000
7	Solfiti alcalini e alcalino terrosi	Solfobenton	Dal Cin	80000

Date dei trattamenti: Prova A: 5 luglio, 8 agosto, 18 agosto, 30 agosto; Prova B: 20 giugno, 10 agosto, 17 agosto; Prova C: 21 giugno, 7 agosto, 17 agosto, 28 agosto

### RISULTATI

I dati relativi alla diffusione delle diverse forme di marciume del grappolo sono riassunti nella tabella 3, quelli relativi al numero di bacche infette per grappolo infetto nella tabella 4.

Tabella 3. Diffusione (% di grappoli infetti) delle diverse forme di marciume del grappolo

Prova/cultivar	Tesi	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Marciume acido
Prova A "Primitivo"	1 Testimone	7,9 a	0,0 a	28,2 a	18,8 a
	2 Pinolene	7,9 a	0,5 a	27,8 a	15,4 a
	3 Sodio bicarbonato + olio minerale	7,5 a	0,0 a	24,0 a	12,5 a
	4 Bentonite + calce idrata	5,4 a	0,0 a	18,8 a	12,7 a
	5 Ossicloruro di rame	10,5 a	0,0 a	20,9 a	21,4 a
	6 Idrossido di rame	9,2 a	0,0 a	26,2 a	24,3 a
	7 Solfiti alcalini e alcalino terrosi	15,3 a	0,0 a	34,1 a	22,2 a
Prova B "Primitivo"	1 Testimone	11,5 b B	0,8 a	2,5 a	0,0 a
	2 Pinolene	16,0 b AB	0,0 a	3,3 a	4,7 a
	3 Sodio bicarbonato + olio minerale	5,8 b B	0,0 a	0,9 a	1,8 a
	4 Bentonite + calce idrata	11,2 b B	0,9 a	0,0 a	4,7 a
	5 Ossicloruro di rame	15,5 b AB	0,7 a	5,4 a	2,4 a
	6 Idrossido di rame	35,0 a A	0,0 a	0,8 a	0,8 a
	7 Solfiti alcalini e alcalino terrosi	19,4 b AB	0,0 a	0,0 a	2,4 a
Prova C "Negroamaro"	1 Testimone	12,9 a	0,0 a	1,7 a	8,6 a
	2 Pinolene	17,3 a	0,0 a	0,8 a	16,9 a
	3 Sodio bicarbonato + olio minerale	15,0 a	0,0 a	3,8 a	11,4 a
	4 Bentonite + calce idrata	12,7 a	0,0 a	0,9 a	5,0 a
	5 Ossicloruro di rame	18,1 a	1,5 a	3,0 a	15,8 a
	6 Idrossido di rame	12,5 a	0,0 a	1,7 a	16,7 a
	7 Solfiti alcalini e alcalino terrosi	13,3 a	0,0 a	0,0 a	7,7 a

I valori medi relativi a ciascuna prova seguiti da lettere diverse, sulla colonna, sono differenziabili statisticamente al livello di probabilità di P = 0,05 (minuscole) e P = 0,01 (maiuscole)

Tabella 4. Numero medio di bacche infette per grappolo infetto delle diverse forme di marciume del grappolo

Prova/ cultivar	Tesi	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Botryotinia</i> <i>fuckeliana</i>	Marciume acido
Prova A “Primitivo”	1 Testimone	14,2 b AB	0,0 a	29,1 abc AB	19,5 bc B
	2 Pinolene	31,6 a A	0,3 a	39,2 ab AB	62,2 a A
	3 Sodio bicarbonato + olio minerale	16,0 b AB	0,0 a	44,1 a A	27,4 bc AB
	4 Bentonite + calce idrata	2,4 b B	0,0 a	23,1 bc AB	21,8 bc AB
	5 Ossicloruro di rame	12,3 b AB	0,0 a	36,1 ab AB	23,0 bc AB
	6 Idrossido di rame	7,4 b B	0,0 a	15,7 c AB	28,2 bc AB
	7 Solfiti alcalini e alcalino terrosi	10,8 b AB	0,0 a	25,5 abc AB	16,3 c B
Prova B “Primitivo”	1 Testimone	4,0 a	0,3 a	1,8 ab	0,0 b
	2 Pinolene	8,2 a	0,0 a	7,5 a	7,3 b
	3 Sodio bicarbonato + olio minerale	3,6 a	0,0 a	0,8 ab	1,0 b
	4 Bentonite + calce idrata	3,6 a	0,3 a	0,0 b	1,8 b
	5 Ossicloruro di rame	26,3 a	0,3 a	6,7 ab	1,8 b
	6 Idrossido di rame	9,9 a	0,0 a	2,3 ab	0,8 b
	7 Solfiti alcalini e alcalino terrosi	98,6 a	0,0 a	0,0 b	25,8 a
Prova C “Negroamaro”	1 Testimone	4,0 ab	0,0 a	0,5 a	5,5 a
	2 Pinolene	4,4 ab	0,0 a	0,5 a	19,3 a
	3 Sodio bicarbonato + olio minerale	6,4 ab	0,0 a	0,8 a	17,7 a
	4 Bentonite + calce idrata	4,7 ab	0,0 a	0,8 a	13,6 a
	5 Ossicloruro di rame	10,5 a	2 a	0,7 a	29,5 a
	6 Idrossido di rame	2,8 b	0,0 a	0,8 a	7,1 a
	7 Solfiti alcalini e alcalino terrosi	3,8 ab	0,0 a	0,0 a	14,6 a

I valori medi relativi a ciascuna prova seguiti da lettere diverse, sulla colonna, sono differenziabili statisticamente al livello di probabilità di  $P = 0,05$  (minuscole) e  $P = 0,01$  (maiuscole)

In entrambi gli anni è stata in generale osservata una modesta diffusione delle diverse forme di marciume che, nel 2007, è stata ancora più contenuta per il particolare andamento stagionale (scarsissima se non nulla piovosità e temperature elevate, anche superiori a 45°C, nel periodo compreso fra fine giugno e fine luglio). Il marciume secondario da *Penicillium* sp. è stato pressoché assente e non ha mai interessato più dell'1,5% dei grappoli (prova B, “Negroamaro”, tesi 6, ossicloruro di rame). Nel 2006, muffa grigia, marciume acido e marciume secondario da *Aspergillus* sp. hanno interessato, nell'ordine, il 28,2, 18,8 e 7,8% dei grappoli non trattati con un numero medio di bacche infette per grappolo rispettivamente di 29,1, 19,5 e 14,1. Nel 2007, il marciume secondario da *Aspergillus* sp., il marciume acido e la muffa grigia hanno interessato, nell'ordine, il 12,2, 4,3 e 2,1% dei grappoli delle viti non trattate con numero medio di bacche infette per grappolo di 4,0, 2,8 e 1,2. Ad eccezione del marciume acido, più abbondante su “Negroamaro”, non sono state osservate differenze di rilievo fra i due vitigni.

Nella prova A, con l'unica eccezione dei solfiti alcalini e alcalino terrosi, tutti i programmi di protezione hanno ridotto lo sviluppo della muffa grigia con valori compresi fra 0,1 (idrossido di rame) e 34% (bentonite + calce idrata) seppure senza il conforto della significatività statistica. L'anno successivo, in presenza di una bassissima incidenza di

malattia, una discreta inibizione è stata esercitata da sodio bicarbonato + olio minerale (tesi 4), bentonite + calce idrata (tesi 5), idrossido di rame (tesi 7) e solfiti alcalini e alcalino terrosi (tesi 8) su ‘Primitivo’ (prova B) e da pinolene (tesi 2), bentonite + calce idrata (tesi 5) e solfiti alcalini e alcalino terrosi (tesi 8) su ‘Negroamaro’ (prova C). Sodio bicarbonato + olio minerale e bentonite + calce idrata sono stati nei due anni i programmi più efficaci verso le forme di marciume secondario da *Aspergillus* sp..

I dati relativi alla contaminazione fungina da *A. carbonarius* ed alla contaminazione da OTA nel mosto sono riportati nella tabella 5. Nonostante il modesto livello di contaminazione, nessuno dei programmi saggiati ha permesso significative riduzioni nei confronti del testimone non trattato. Di contro, pinolene il bicarbonato + olio minerale sembra aver favorito la contaminazione da OTA e l’ossicloruro di rame quella fungina.

Tabella 5. Contaminazione fungina e da OTA nel mosto dopo la pigiodirasatura

Prova/ cultivar	Tesi		<i>Aspergillus carbonarius</i> (x 10 <sup>3</sup> cfu/ml)	OTA (µg/kg)
Prova A “Primitivo”	1	Non trattato	19,6 b	0,17 a
	2	Pinolene	29,9 b	0,20 a
	3	Bicarbonato + olio minerale	156,5 ab	0,34 a
	4	Bentonite + calce idrata	48,8 b	0,13 a
	5	Ossicloruro di rame	272,8 a	0,34 a
	6	Idrossido di rame	155,5 ab	0,28 a
	7	Solfiti alcalini e alcalino terrosi	35,9 b	0,23 a
Prova B “Primitivo”	1	Non trattato	2,4 a	0,01 b
	2	Pinolene	6,7 a	0,10 ab
	3	Bicarbonato + olio minerale	3,2 a	0,20 a
	4	Bentonite + calce idrata	1,0 a	0,00 b
	5	Ossicloruro di rame	0,0 a	0,02 b
	6	Idrossido di rame	0,0 a	0,02 b
	7	Solfiti alcalini e alcalino terrosi	1,0 a	0,04 ab
Prova C “Negroamaro”	1	Non trattato	0,1 a	0,02 a
	2	Pinolene	0,9 a	0,15 a
	3	Bicarbonato + olio minerale	0,8 a	0,05 a
	4	Bentonite + calce idrata	0,0 a	0,02 a
	5	Ossicloruro di rame	0,1 a	0,00 a
	6	Idrossido di rame	0,0 a	0,00 a
	7	Solfiti alcalini e alcalino terrosi	1,0 a	0,04 a

I valori medi relativi a ciascuna prova seguiti da lettere diverse, sulla colonna, sono differenziabili statisticamente al livello di probabilità di P = 0,05 (minuscole) e P = 0,01 (maiuscole)

## CONCLUSIONI

La necessità di contenere entro 2 µg/kg la concentrazione di OTA nei derivati dell'uva (Reg. (CE) N. 123/2005 e successive modifiche) richiede l'adozione di interventi per limitare lo sviluppo di *A. carbonarius* anche in vigneti condotti in regime di agricoltura biologica. Con le prove esposte si è inteso valutare l'attività di sostanze naturali e di composti rameici verso le varie forme di marciume del grappolo, nonché la contaminazione del mosto da *A. carbonarius* e da OTA. I risultati non sembrano molto incoraggianti, anche se non sono esaustivi e necessitano di ulteriori approfondimenti. Infatti, nonostante l'andamento meteorologico nelle due annate di prove non sia stato favorevole ai marciumi del grappolo, nessuna delle sostanze naturali o i composti rameici hanno permesso significative riduzioni nei confronti del testimone non trattato. Anzi, pinolene ossicloruro di rame e sodio bicarbonato + olio minerale sembrano aver favorito la contaminazione da *A. carbonarius* e da OTA nel mosto.

Una gestione adeguata del rischio di contaminazione di vini da OTA, soprattutto nel caso dei vigneti condotti in regime di agricoltura biologica, deve essere affrontata gestendo la coltura sin dal riposo vegetativo con interventi mirati a stabilire condizioni sfavorevoli allo sviluppo di *A. carbonarius*, fungo che, peraltro, negli ambienti meridionali è da considerarsi costantemente presente nel vigneto e con popolazioni più abbondanti proprio quando le uve sono pronte per essere vendemmiate.

### Ringraziamenti

Lavoro in parte finanziato dalla Regione Puglia D.G.R. n. 584/2003 Programma "Ricerca e sperimentazione, trasferimento e programmi a forte contenuto innovativo", intervento 2.2. BURP n. 112 del 7/09/2005 - Sottoprogetto 02 "La protezione integrata dalle malattie fungine: fattore di qualità e sicurezza alimentare nella filiera vitivinicola (Protvini)", dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR), progetto FAR n. 12818 SIVINA (D.M. n. 593/2000) - "Individuazione di metodologie innovative prontamente trasferibili per migliorare la sicurezza dei vini rossi di qualità del Salento" e da Intrachem Bio Italia Spa.

### LAVORI CITATI

- Duncan D.B., 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11, 1-42.
- Pollastro S., De Miccolis Angelini R.M., Natale P., Pastore C., Pascale M., Faretra F., 2005a. Observations on ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger*. *Atti International Workshop: Ochratoxin A in grapes and wine: prevention and control.*, 82 (riassunto).
- Pollastro S., Dongiovanni C., Santomauro A., Lepore A., Giampaolo C., Pollastro P., Perrelli D., Pastore C., Pascale M., Faretra F., 2005b. Influence of integrated protection of vineyards on ochratoxin producing fungi in South Italy. *Atti International Workshop: Ochratoxin A in grapes and wine: prevention and control.*, 71 (riassunto).
- Pollastro S., Dongiovanni C., De Miccolis Angelini R.M., Giampaolo C., Faretra F., 2006a. Protezione integrata e sicurezza alimentare: prevenzione della contaminazione dei vini da ocratossina A. *Atti Incontri fitoiatrici: Problemi fitosaniatri delle colture ortoflorofrutticole ed evoluzione delle strategie di difesa*, 27-31.
- Pollastro S., De Miccolis Angelini R.M., Faretra F., 2006b. A new semi-selective medium for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. *Journal of Plant Pathology*, 88, 107.
- Visconti A., Pascale M., Centonze G., 1999. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 864, 89-101.