

EFFETTI DELLA DISTRIBUZIONE MECCANICA SULLA VITALITÀ DEL NEMATODE ENTOMOPATOGENO *STEINERNEMA CARPOCAPSAE*

G. ADE¹, A. LANZONI², R. MARTELLI¹, F. PEZZI¹, A. UGUZZONI¹

¹ Dipartimento di Economia e Ingegneria Agrarie, Università di Bologna
Viale G. Fanin, 50, 40127 Bologna

² Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna
Viale G. Fanin, 50, 40127 Bologna
roberta.martelli@unibo.it

RIASSUNTO

La distribuzione di nematodi entomopatogeni (EPN) nel controllo di fitofagi in agricoltura biologica e convenzionale è abitualmente effettuata con le comuni irroratrici impiegate per la distribuzione di agrofarmaci. La ricerca si propone di valutare la risposta biologica, in termini di vitalità, del nematode entomopatogeno *Steinernema carpocapsae* (Weiser) sottoposto a diversi effetti di stress meccanico che possono riscontrarsi nella irrorazione. In particolare, sospensioni liquide del nematode sono state sottoposte a diversi livelli di pressione statica e a diverse condizioni di agitazione e distribuzione impiegando diverse tipologie di ugelli. I risultati preliminari non mostrano un effetto significativo della pressione statica (fino a 14 bar) sulla vitalità dei nematodi. Il passaggio attraverso la pompa a girante flessibile e gli ugelli induce una diminuzione del 7% della vitalità, ma nessuna differenza si rileva tra gli ugelli utilizzati. La prova di agitazione combinata con lo svuotamento del serbatoio ha mostrato che una più bassa intensità di riciclo, realizzata, se necessario, riducendo la velocità della presa di potenza riduce la mortalità dei nematodi. In tutti i casi la concentrazione dei nematodi in corrispondenza dello svuotamento del serbatoio è stata del 20% superiore a quella iniziale.

Parole chiave: nematodi entomopatogeni, organismi ausiliari, irrorazione meccanica, stress meccanici, *Steinernema* spp.

SUMMARY

EFFECTS OF MECHANICAL DISTRIBUTION ON THE VIABILITY OF THE ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE *STEINERNEMA CARPOCAPSAE*

The entomopathogenic nematodes (EPN) distribution in pest control in organic and conventional agricultural is usually done with the common sprayers used for the agrochemical distribution. The aim of the research was the assessment of the biological response, in terms of viability, of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Weiser) submitted to some mechanical stresses that can be encountered during spraying, like static pressure, flow through flat fan nozzles and hydraulic agitation in the tank. No significant effects were found when submitting the nematodes to static pressures up to 14 bar. Simulating the suspension passing once through the pump and the nozzles showed a 7% decrease of viability, but no difference comparing the different nozzles. The test of agitation combined with the emptying of the tank showed that lower intensity of recycling, achieved, if necessary, reducing the pto speed are helpful in keeping the nematodes alive. In all cases the concentration of nematodes close to the emptying of the tank was 20% higher than with the tank full.

Keywords: entomopathogenic nematodes, beneficial organisms, sprayers, mechanical stress, *Steinernema* spp.

INTRODUZIONE

Il nematode entomopatogeno *Steinernema carpocapsae* riveste un importante ruolo nella lotta biologica ed integrata contro diversi fitofagi (in particolare larve di Lepidotteri dei

fruttiferi, Nottuidi, Coleotteri ed Ortotteri). In Italia è oggi impiegato con successo nel controllo biologico dei due nuovi parassiti delle palme: il punteruolo rosso, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier e la *Paysandisia archon* Burmeister. Il nematode può essere distribuito con l'irrigazione o tramite distribuzione meccanica sulla coltura o direttamente sul suolo.

Nella distribuzione meccanica di questi antagonisti è comunemente utilizzata una normale macchina irroratrice, ma esiste la concreta possibilità che tale operazione possa indurre uno stato di stress riconducibile a brusche variazioni di pressione e sollecitazioni meccaniche, cui sono sottoposti gli organismi in diversi punti del loro percorso all'interno della macchina, in particolare durante il passaggio attraverso la pompa e gli ugelli. Ulteriori stress meccanici possono essere indotti dall'effetto della agitazione idraulica o pneumatica all'interno del serbatoio (Nilsson e Gripwall, 1999; Łaczyński *et al.*, 2004) e dall'innalzamento della temperatura provocata dal rimescolamento della sospensione prodotto dal sistema di agitazione (Łaczyński *et al.*, 2006). Gli studi sulla riduzione della vitalità dei nematodi in seguito a distribuzione meccanica non forniscono tuttavia risposte univoche. Infatti, mentre Fife (Fife *et al.*, 2003, 2004) riporta come un singolo passaggio attraverso differenti tipi di pompa, quando la differenza di pressione non supera 13,8 bar, non influenzi la vitalità di *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis megidis* e *Steinernema carpocapsae*, Nilsson e Gripwall (1999) hanno osservato una riduzione di vitalità del 10% di *S. feltiae* in seguito a passaggi attraverso la pompa a pistoncini. A sua volta, Grewal (2002) riporta l'effetto negativo dell'eccessiva agitazione idraulica sulla vitalità dei nematodi e Łaczyński *et al.* (2004) indicano un decremento lineare della vitalità di *H. bacteriophora* rispetto alla durata della agitazione idraulica.

Il presente lavoro intende valutare gli effetti di alcuni parametri meccanici della distribuzione sulla vitalità dell'entomofago quando sottoposto a diversi livelli di stress meccanico che possono riscontrarsi nella distribuzione. Per attribuire lo stress meccanico provocato al nematode dalle specifiche componenti della distribuzione (pressione statica, pressione dinamica, rimescolamento) sono state effettuate 3 differenti prove per valutare l'influenza dei seguenti aspetti meccanici sulla vitalità dell'organismo:

- pressione statica;
- risposta alla distribuzione con irroratrice tradizionale con diverse tipologie di ugelli;
- effetto della pompa e dell'agitatore.

MATERIALI E METODI

È stato impiegato un formulato commerciale, NemoPAK-S[®], di larve essiccate di *S. carpocapsae* contenente 625.000 individui per grammo in miscela di chitosano (polisaccaride ottenuto dalla chitina dei crostacei). Prima di ogni prova è stata effettuata la reidratazione dei nematodi prelevando 2 g di prodotto diluiti in 1 litro di acqua (22 °C) proveniente da un pozzo artesiano per simulare la composizione abituale della sospensione distribuita in campo. Successivamente è stato prelevato un campione di 0,25 litri ulteriormente diluito in 5 litri di acqua ottenendo una concentrazione finale della sospensione di 62.500 individui per litro.

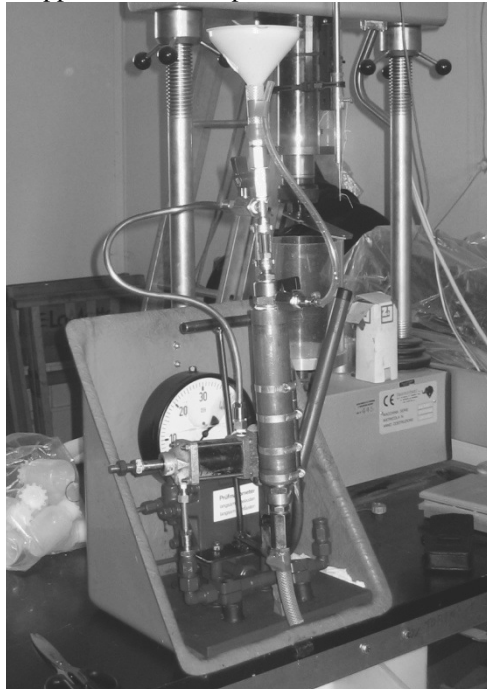
Per ogni test effettuato veniva prelevato un campione di 100 ml di sospensione e conservato in provette di plastica al buio e alla temperatura di 14-16 °C per 18-20 ore per limitare la riduzione della sopravvivenza del nematode in seguito alla conservazione (Molyneux, 1985). Circa 30 minuti prima del conteggio era estratto, tramite pipetta tarata, un campione di nematodi (1 ml) e lasciato a temperatura ambiente al buio per favorire la mobilità e agevolare il conteggio degli individui (Łaczyński *et al.*, 2006). I sub campioni, diluiti con 3 ml di acqua

distillata, erano disposti in capsule Petri con fondo a griglia, si procedeva quindi al conteggio dei nematodi tramite microscopio bioculare (modello Zeiss 12x - 100x) illuminando il campione con lampada ad incandescenza che proiettava la luce dall'alto verso il basso, per non provocare la morte dei nematodi poco vitali. Sono stati conteggiati soltanto i nematodi integri, mentre non sono stati considerati frammenti di nematodi in quanto potevano essere già presenti nel formulato commerciale (Łaczyński *et al.*, 2006). Il criterio di identificazione dei nematodi vivi rispetto ai morti era basato sul loro movimento attivo (Grewal, 2002) ed è stato utilizzato un ago per stimolare i nematodi che apparivano immobili. Per ogni campione è stata determinata la vitalità relativa, V_r , come percentuale sul numero totale di nematodi.

Valutazione dell'effetto della pressione statica

L'effetto della pressione statica è stato riprodotto tramite un banco prova costituito da un contenitore metallico della capacità di 150 ml collegato ad un martinetto idraulico ad azionamento manuale, dotato di manometro. Lo strumento consentiva di graduare la pressione applicata alla sospensione e di mantenere il carico per i tempi stabiliti (figura 1).

Figura 1. Attrezzatura per l'applicazione della pressione statica



Nel corso di questa prova è stata valutata la vitalità del nematode sottoposto a diversi livelli di pressione statica comparabili a quelli cui è sottoposto l'organismo durante la distribuzione tradizionale. Sono state considerate 6 differenti tesi caratterizzate da quattro livelli di pressione (0, 2, 8 e 14 bar) e, nell'ambito della pressione intermedia, da diversi tempi di applicazione (tabella 1), per ciascuna tesi sono state effettuate tre repliche.

Tabella 1. Resistenza alla pressione statica, pressioni e tempi applicati

Tesi	Pressione (bar)	Tempo (s)
1 test	0	0
2	2	15
3	14	15
4	8	5
5	8	15
6	8	25
7	8	35

Una volta esercitata la pressione per il tempo stabilito, da una valvola situata nella parte inferiore della camera di compressione è stato prelevato un campione di sospensione. I campioni sono stati sottoposti alla misura della vitalità relativa, come previsto nel protocollo di prove.

Valutazione stress meccanico indotto da passaggio attraverso gli ugelli

È stato predisposto un banco prova per la verifica, in laboratorio, dell'effetto del passaggio della sospensione di nematodi attraverso diverse tipologie di ugello.

Sono stati considerati tre tipi di ugello a ventaglio TeeJet XR (TeeJet, Spraying Systems, Wheaton, ILL, USA) caratterizzati da diversa portata (tabella 2). Per evitare l'introduzione di stress meccanici aggiuntivi, rispetto a quelli imputabili al passaggio attraverso gli ugelli, è stata utilizzata una pompa rotativa volumetrica a girante flessibile (Liverani mod. INV MIDEX 3/4) priva di filtro che garantisce, grazie alle sue caratteristiche costruttive, l'assenza dei picchi di pressione che si riscontrano in corrispondenza delle valvole nelle pompe a membrana e a pistoncini. La pompa era dotata di inverter che consentiva una regolazione del numero di giri (range 180 e 1400 giri/min). L'aspirazione avveniva tramite una condotta in gomma che aspirava la sospensione da un serbatoio di miscelazione in cui il prodotto era mantenuto costantemente in sospensione. Il tubo di mandata era collegato a una barra porta ugelli dotata dell'innesto per un solo ugello sostituito in corrispondenza delle diverse tesi.

Tabella 2. Condizioni della prova di passaggio attraverso gli ugelli

Id	Ugello	Codice colore	Portata (L/min)	Pressione (bar)	Giri/min
1 test	-	-	-	-	-
2	XR11008	bianco	3,16	3	1400
3	XR11004	rosso	1,58	3	1150
4	XR11001	arancio	0,39	3	900
5	-	-	88	0	1400

In aggiunta alle tre tesi, differenziate per la diversa tipologia di ugello, è stato considerato il testimone, prelevato direttamente nella parte centrale del serbatoio, e la tesi 5 in cui il campione è stato prelevato senza il passaggio attraverso l'ugello, per mettere in evidenza l'eventuale differente vitalità dei nematodi che hanno subito il doppio passaggio attraverso

pompa ed ugello, da quelli che hanno subito solo l'eventuale condizionamento meccanico imputabile al passaggio attraverso la pompa. Per tutte le tesi sono state effettuate tre repliche.

Valutazione dello stress meccanico indotto dal ricircolo

È stato allestito un banco prova per la verifica, in laboratorio, dell'effetto congiunto del ricircolo in serbatoio e dell'erogazione attraverso gli ugelli sulla vitalità dei nematodi. La prova era finalizzata ad evidenziare un eventuale contributo alla mortalità dei nematodi da parte dell'eiettore in seguito all'azione di rimescolamento della sospensione.

Il sistema era costituito da un serbatoio con capacità 300 L dotato di miscelatore idraulico del tipo a idro-eiettore, da una irroratrice a barra di tipo tradizionale, con sistema di regolazione a pressione costante, dotata di ugelli a ventaglio e di pompa a bassa pressione a pistone-membrana (Comet BP 75, figura 2). Il filtro installato tra la pompa e il serbatoio era stato rimosso per consentire il passaggio dei nematodi.

Figura 2. Irroratrice a barra con pompa a membrana adottata per le prove di resistenza all'agitazione in serbatoio



Il sistema di rimescolamento era costituito da un eiettore che determinava l'agitazione della miscela. Per incrementare l'azione dell'agitatore, che alle basse pressioni impiegate era insufficiente, il circuito di ritorno nel serbatoio era parzializzato con una valvola. Sono stati considerati due livelli di agitazione, L_1 e L_2 , caratterizzati da due portate erogate dall'eiettore in corrispondenza di due regimi di rotazione della pompa rispettivamente di 252 e 380 giri/min (tabella 3).

Tabella 3. Condizioni della prova di agitazione in serbatoio con irroratrice tradizionale

Livello di agitazione	Portata eiettore (L/min)	Regime della pompa (giri/min)	Pressione di erogazione (bar)
L_1	23,9	252	$3 \pm 0,1$
L_2	36,9	380	$3 \pm 0,1$

Per entrambi i livelli di agitazione sono state considerate 4 tesi (tabella 4) la prima (testimone), costituita da un campione prelevato direttamente dal serbatoio. Le altre tesi sono state prelevate, all'uscita degli ugelli, a intervalli di tempo successivi in corrispondenza di volumi decrescenti della miscela nel serbatoio: 75%, 50% e serbatoio quasi vuoto. Tali livelli

di volume erogato corrispondono a entità di ricircolo e tempi di rimescolamento crescenti. Per tutto il tempo di erogazione la pressione è stata mantenuta a $3 \pm 0,1$ bar. Ogni campionamento è stato replicato tre volte.

Tabella 4. Test di resistenza all'agitazione, è indicato il numero medio teorico dei passaggi di ogni organismo nel circuito di ritorno-agitazione durante l'intero ciclo di svuotamento

Tesi	livello nel serbatoio (L)	numero medio di passaggi	
		L ₁	L ₂
1 test	300	0	0
2	225	0,11	0,16
3	150	0,16	0,25
4	25	0,96	1,47

RISULTATI

Effetto indotto dalla pressione statica

I valori medi della vitalità relativa risultano compresi tra il 58,1% del campione sottoposto ad un livello di pressione di 8 bar per 5 secondi e il 67,8% del testimone (tabella 5).

I risultati non hanno mostrato una variazione della vitalità dell'organismo, correlata agli stress meccanici indotti. In particolare la pressione statica non ha influito in modo significativo sulla vitalità del nematode nell'intero intervallo considerato (2, 8 e 14 bar) e nemmeno il diverso tempo di applicazione della pressione di 8 bar (5, 15, 25, 35 secondi) ha mostrato differenze significative.

Tabella 5. Effetto della pressione statica sulla vitalità relativa (V_r) degli organismi

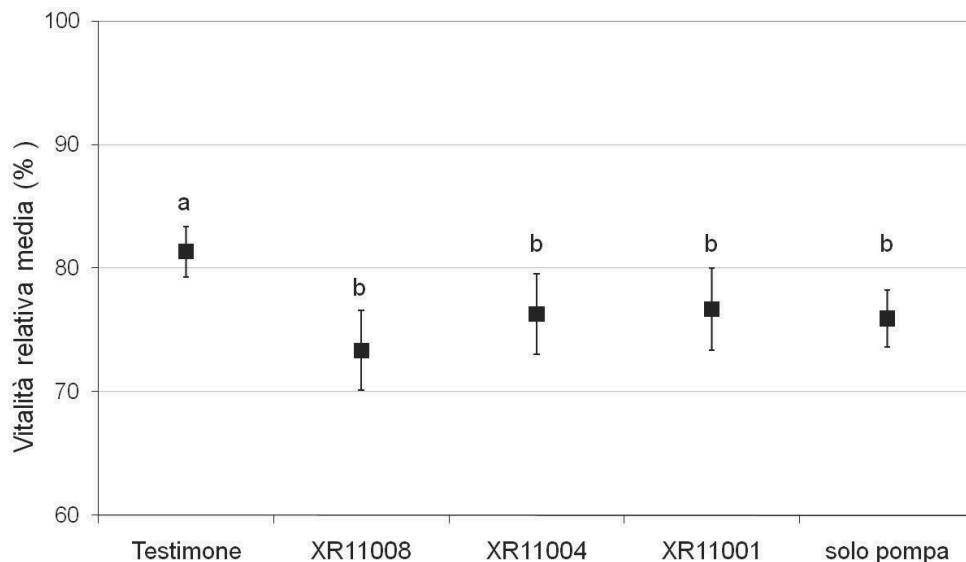
Tesi	Pressione (bar)	Tempo (s)	V_r (%)	Gruppi omogenei
1 test	0	0	67,8	a
2	2	15	59,9	a
3	8	5	58,1	a
4	8	15	58,9	a
5	8	25	64,1	a
6	8	35	61,0	a
7	14	15	64,0	a

Stress meccanico indotto dal passaggio attraverso gli ugelli

L'effetto congiunto del condizionamento meccanico provocato dalla pompa volumetrica rotativa a girante flessibile e dal passaggio della miscela attraverso gli ugelli mostra che il testimone presenta una vitalità superiore (81,3%) e significativamente differente ($p < 0,05$) rispetto a tutti i campioni sottoposti agli stress meccanici, compreso il caso di semplice passaggio attraverso la pompa a scarico libero (75,6%).

L'impiego di diverse tipologie di ugelli, invece, non ha condizionato in maniera significativa la vitalità del nematode e non ha determinato un incremento di mortalità rispetto al solo passaggio attraverso la pompa (figura 3).

Figura 3. Risultati della vitalità dei nematodi che hanno subito il passaggio attraverso gli ugelli (le barre di variazione esprimono l'intervallo fiduciale al 95%)



Stress meccanico indotto da una distribuzione tradizionale

Infine, il nematode sottoposto a due sistemi di agitazione non ha mostrato riduzioni significative della vitalità nei confronti del testimone per cui anche ripetuti passaggi attraverso l'eiettore non sembrano influenzare la vitalità del nematode durante la fase di irrorazione (tabella 6).

In tutte e due le prove, tuttavia, in prossimità dello svuotamento del serbatoio, la concentrazione di nematodi nella miscela è risultata superiore a quella iniziale di circa il 20%, segno di un'agitazione non del tutto soddisfacente.

Tabella 6. Risultati della verifica della vitalità per i due livelli di agitazione-ritorno (i gruppi omogenei sono calcolati per $p < 0,05$)

Tesi	Livello del serbatoio (L)	Vitalità (%)	Gruppi omogenei	Vitalità (%)	Gruppi omogenei
		livello di agitazione L_1		livello di agitazione L_2	
1 test	300	89,2	a	94,5	a
2	225	88,3	a	91,1	b
3	150	85,1	a	92,4	b
4	25	87,0	a	91,2	b

CONCLUSIONI

I risultati delle prove hanno evidenziato che una pressione statica fino a 14 bar, anche protratta per alcuni secondi, non determina danni significativi allo specifico organismo esaminato (*S. carpocapsae*). Non si è ritenuto opportuno spingere oltre i livelli di pressione esaminati in quanto si è ipotizzato l'uso di ugelli a getto piatto, operanti normalmente a pressioni massime di 3 o 4 bar. Questo tipo di ugello, usato a pressione bassa, si ritiene sia adatto alla distribuzione di nematodi vivi, sia per la dimensione relativamente elevata delle gocce che produce, sia per l'assenza del vorticolatore, che renderebbe il flusso del liquido più turbolento.

L'effetto del passaggio attraverso gli ugelli è stato verificato impiegando una pompa di tipo rotativo a girante elastica. La scelta di questa pompa era stata inizialmente dettata dall'ipotesi che le tradizionali pompe alternative producessero picchi di pressione anomali, molto superiori alla pressione media. In questo modo si pensava di poter isolare l'effetto degli ugelli da quello della pompa. I risultati sembrano invece mettere in evidenza che la lieve differenza di vitalità riscontrata sia imputabile più alla pompa, che al calibro degli ugelli. Per contro, le prove di ricircolo eseguite con l'irroratrice tradizionale hanno evidenziato che l'entità del ripetuto passaggio degli organismi nell'impianto idraulico può condizionare la loro vitalità più di altri fattori, tra cui la pompa a membrana.

Si può ritenere dunque che in condizioni di pressione normali e con ugelli a ventaglio di qualsiasi calibro la distribuzione di *S. carpocapsae* possa essere eseguita con tranquillità anche con macchine tradizionali, mantenendo basso il livello del ritorno-agitazione, eventualmente riducendo il regime della p.d.p. e tenendo conto di certo aumento di concentrazione in prossimità dello svuotamento completo del serbatoio.

LAVORI CITATI

- Fife J.P., Derksen R.C., Ozkan H.E., Grewal P.S., 2003. Effect of pressure differential on the viability and infectivity of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 27, 65-72.
- Fife J.P., Ozkan H.E., Derksen R.C., 2004. Physical effect of conventional spray equipment on a biological pesticide. *Aspects of Applied Biology*, 71, *International Advances in Pesticide Application*, 495-502.
- Grewal S.G., 2002. Formulation and application technology. In: R. Gaugler, Editor, *Entomopathogenic Nematology*, CAB International, 265-287.
- Łaczyński A., De Moor A., Dierickx W., Moens M., Darius P., Sonck B., Ramon H., 2006. The Effect of hydraulic spraying on the viability of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. Short communication. *Crop Protection*, 25 (10), 1135-1141.
- Łaczyński A., De Moor A., Moens M., Sonck B., Ramon H., 2004. An application technique for biological plant protection products containing entomopathogenic nematodes. *Aspects of Applied Biology*, 71, *International Advances in Pesticide Application*, 489-493.
- Molyneux A., 1985. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. (Nematoda: Rhabditida) at various temperatures and their subsequent infectivity for insects. *Revue Nematol.*, 8, 165-170.
- Nilsson U., Gripwall E., 1999. Influence of application technique on the viability of the biological control agents *Verticillium lecanii* and *Steinernema feltiae*. *Crop Protection*, 18, 53-59.

Ricerca realizzata con il contributo dei fondi del progetto PRIN 2007, "Meccanizzazione della difesa da fitofagi in regime biologico", del Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca