

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dip. **AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI E  
AMBIENTE**

Dip. **TERRITORIO E SISTEMI AGRO-FORESTALI**

Tesi di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Agrarie

**ANALISI TECNICA E VALUTAZIONE DEI  
PARAMETRI DI FUNZIONAMENTO E DI EFFICACIA  
DI UN'IRRORATRICE AD OZONO IN VIGNETO  
CONTRO *Plasmopara viticola***

**RELATORE:**

Dott. Luigi Sartori

**CORRELATORE:**

Dott. Marco Sozzi

**LAUREANDO:**

Federico Dorigatti

Matricola 2023307

**Anno Accademico 2021-2022**

## INDICE

1.	RIASSUNTO.....	3
2.	ABSTRACT .....	4
3.	INTRODUZIONE .....	5
3.1.	Impatto ambientale della difesa in viticoltura.....	5
3.2.	Politiche ambientale nazionali ed Europee di contenimento .....	9
3.2.1.	Regolamento Unione Europea.....	9
3.2.2.	Piano azione nazionale italiano (PAN).....	13
3.3.	Strategie possibili.....	14
3.3.1.	Agire sulla normativa .....	14
3.3.2.	Utilizzo di biopesticidi.....	15
3.3.3.	Tecnologie alternative .....	20
3.4.	Obbiettivi della tesi .....	23
4.	PROPRIETÀ E UTILIZZI DELL'OZONO IN AGRICOLTURA.....	24
4.1.	Caratteristiche generali dell'ozono .....	24
4.2.	Proprietà fisico-chimiche dell'ozono.....	26
4.2.1.	Solubilità dell'ozono in acqua.....	26
4.2.2.	Stabilità dell'ozono .....	27
4.2.3.	Reattività dell'ozono .....	27
4.2.4.	Fattori che alterano la reattività e l'efficacia.....	28
4.3.	Usi dell'ozono in agricoltura .....	29
4.3.1.	L'utilizzo dell'ozono nella zootecnia e nella piscicoltura .....	30
4.3.2.	L'utilizzo per sanificazione delle apparecchiature .....	31
4.3.3.	L'utilizzo come fumigante del suolo .....	32
4.3.4.	L'utilizzo come agente di conservazione di frutta e verdura nel post-raccolta ...	32
4.3.5.	L'utilizzo per la degradazione di pesticidi in frutta e verdura.....	34
4.3.6.	L'utilizzo per il controllo dei funghi e per il miglioramento delle caratteristiche qualitative di grano e farina .....	35

5.	MATERIALI E METODI .....	37
5.1.	Irroratrice e impianto di ozonizzazione .....	37
5.2.	Test lato irroratrice.....	41
5.2.1.	Prove dentro il serbatoio.....	41
5.2.2.	Prove al gruppo di controllo e confronto con il serbatoio .....	41
5.2.3.	Prove all'ugello.....	42
5.3.	Test lato vegetazione.....	44
6.	RISULTATI E DISCUSSIONE .....	47
6.1.	Cinetica dell'ozono all'interno del serbatoio .....	47
6.2.	Confronto valori ORP nelle diverse posizioni di misurazione .....	48
6.3.	Valori ORP al banco di prova e differenze fra gli ugelli .....	50
6.4.	Confronto dei risultati sperimentali con altre pubblicazioni.....	52
7.	CONCLUSIONI.....	55
8.	BIBLIOGRAFIA .....	58

## 1. RIASSUNTO

La difesa delle colture tramite l'impiego di prodotti fitosanitari rappresenta una pratica estremamente consolidata e messa in campo da molteplici anni. Tuttavia è sempre attuale il dibattito che verte sul loro utilizzo e mette in risalto i risvolti negativi legati in particolare alla salute umana, all'impatto ambientale e alla biodiversità. La Comunità Europea dall'introduzione della direttiva 2009/128/CE ha imposto una significativa restrizione all'uso dei pesticidi, stabilendone un quadro normativo; a cui si aggiunge la nuova proposta di aggiornamento emanata in data 22 giugno 2022 che si prefigge di imporre una drastica riduzione del 50% del consumo di tali prodotti entro il 2030. La ricerca di protocolli alternativi, che devono risultare efficaci senza effetti negativi su ambiente e salute umana assume considerevole importanza. Un primo approccio possibile è quindi rappresentato dalla nuova frontiera dell'ozono ( $O_3$ ). Si tratta di un gas fortemente ossidativo, in grado di decomporsi spontaneamente senza rilasciare residui nell'ambiente di utilizzo. L'efficacia di tale prodotto è legata principalmente alla difesa dalle patologie fungine più diffuse del settore viticolo quali oidio e peronospora.

L'obiettivo del seguente elaborato mira a descrivere le caratteristiche e le proprietà che contraddistinguono l'ozono e i suoi possibili utilizzi nel settore agricolo. Uno studio più completo e approfondito è stato eseguito tramite analisi tecniche e prove sul funzionamento di un'irroratrice munita di sistema di ozonizzazione Ecofarm. L'obiettivo principale delle analisi ha riguardato la misurazione ripetuta del potenziale di ossidoriduzione (ORP) dell'acqua ozonizzata lungo tutti i percorsi all'interno della condotta idraulica e all'esterno degli ugelli per garantire la stabilità ed evitare le eccessive perdite. Una contemporanea analisi tecnica delle differenze riscontrabili sulla scelta del protocollo di funzionamento e delle varie componenti dell'irroratrice ha permesso la ricerca della situazione ideale per la ottenere la massima efficacia del trattamento. Sono stati testati diversi tipi di ugelli per valutare l'effetto delle diverse dimensioni delle goccioline e del flusso d'aria sul potenziale redox finale. Tutte le prove sono state effettuate presso l'Officina meccanica del dipartimento TeSAF dell'Università di Padova (Legnaro-PD, Italia) dal 07/02/2022 al 18/02/2022. I risultati ottenuti rivelano come il potenziale redox dell'acqua ozonizzata all'interno dei componenti dell'irroratrice è influenzato da un ritardo dovuto alla necessità del raggiungimento di un equilibrio elettrochimico. Inoltre, le differenze statistiche riscontrate nel potenziale redox di OW agli ugelli e sul banco di prova mostrano un'influenza della dimensione della goccia sul potenziale redox della stessa dopo l'irrorazione.

## 2. ABSTRACT

The defense of crops through the use of phytosanitary products is an extremely consolidated practice that has been implemented for many years. However, now there are some discussion about their negative implications linked in particular to human health, environmental impact and biodiversity. Since the introduction of Directive 2009/128 / EC, the European Community has imposed a significant restriction on the use of pesticides, establishing a regulatory framework for their sustainable use. In addition Ue commission add the new update proposal issued on 22 June 2022 which aims to drastically reduce the consumption of these products by 50% by 2030. Searching alternative protocols without negative impact on the environment and human health assumes great importance. A first possible approach is represented by the new frontier of ozone. Ozone (O<sub>3</sub>) is a highly oxidative gas, which decomposes spontaneously without releasing residues in the environment. The major effect of this product is about the defense against the most common fungal diseases in the wine sector such as powdery mildew and downy mildew.

The paper aims to describe the characteristics and properties that distinguish ozone and its possible uses in the agricultural sector. A more complete study was carried out through technical analyzes and tests in a common sprayer enriched with an Ecofarm ozonation system. The main goals of the tests was based on many redox potential (ORP) misuration to the ozonated water along all the paths inside the hydraulic pipeline and outside the nozzles. It was necessary to maintain stability and avoid excessive time wasters along the different parts of sprayer. A simultaneous technical analysis were conducted to the operating protocol and on the various components of the sprayer to allow the ideal situation for the maximum effectiveness of the treatment. Different types of nozzles were tested to evaluate the effect of different wheel and airflow sizes on the final redox potential. All tests were carried out at the mechanical garage of the TeSAF department of the University of Padua (Legnaro -PD, Italy) from 07/02/2022 to 18/02/2022. The results obtained show how the redox potential of the ozonated water inside the sprayer components need some times to reach an electrochemical equilibrium. In addition, the differences found in the redox potential of OW at noozles and on the bench test indicating an influence of the droplet size on the redox potential of the drop after spraying.

### 3. INTRODUZIONE

#### 3.1. Impatto ambientale della difesa in viticoltura

L'accesso a cibi sicuri è un diritto fondamentale per ogni cittadino del mondo indipendentemente dallo status economico e sociale (FAO, 2017). Si ipotizza con un significativo margine di sicurezza che il settore agricolo andrà incontro nell'immediato futuro a molte sfide nello sforzo di salvaguardare la produzione alimentare in rapporto alla crescita esponenziale della popolazione del pianeta. Il rapporto delle Nazioni Unite nel 2019 sistemava che la popolazione umana dell'intero universo raggiungerà i 9.7 miliardi di unità nel 2050 e 10.9 miliardi nel 2100 (Nazioni Unite, 2019). In considerazione dei dati esposti, nel prossimo decennio l'industria alimentare dovrebbe portare la propria produzione ad un aumento del 15% e successivamente del 50% entro il 2050 per poter soddisfare le esigenze nutrizionali della popolazione della terra. In questo contesto il settore agroalimentare si trova a dover mettere come prioritario nei propri obiettivi quello della sostenibilità. In agricoltura il termine sostenibilità descrive la necessità di soddisfare il fabbisogno alimentare della crescente popolazione umana, garantendo al contempo il minimo impatto sull'ambiente e sulla redditività delle persone. Ci si trova nella necessità di colmare il divario tra l'aumento previsto della domanda di risorse alimentari e la produzione mondiale di cibo che viene, sempre in maniera maggiore, ostacolata dall'impatto dei cambiamenti climatici nonché dalla mancanza di acqua e altre risorse. Concentrando l'analisi sulla protezione delle piante emerge che dal rapporto FAO del 2017 (FAO, 2017) le perdite di rendimento annuali causate da parassiti e agenti patogeni sono stimate tra il 20 e il 40% della produzione mondiale. La causa maggiore è imputabile al cambiamento climatico che contribuisce ad aumentare l'incidenza di malattie, virus, insetti e sullo sviluppo di quest'ultimi alla resistenza ai pesticidi (Pu et al., 2020). L'utilizzo di agrofarmaci, sintetici o naturali, in agricoltura permette di controllare la diffusione di parassiti, erbe infestanti e malattie delle piante. In relazione alla tipologia di parassiti controllati i prodotti fitosanitari si classificano in: erbicidi, insetticidi, fungicidi, rodenticidi e nematocidi. L'uso di tali prodotti presenta significativi vantaggi legati alla difesa delle colture che sarebbero di contro più facilmente suscettibili a gravi danneggiamenti da parte dei patogeni stessi. L'obiettivo è mantenere le piante sane per la salvaguardia delle produzioni e garantire una migliore qualità e quantità delle risorse alimentari. La produzione e l'utilizzo di prodotti fitosanitari, sebbene presentino numerosi vantaggi in campo agricolo, presentano ancora numerosi rischi legati ad un sull'ambiente e con una ricaduta sulla salute umana. Secondo il rapporto "Environmental and Health Impacts of Pesticides and Fertilizers and Ways to Minimize Them" (United Nations

Environment Programme, 2022) la domanda di pesticidi, e la loro produzione e relativo consumo è aumentata costantemente negli ultimi decenni. A livello globale, nel 2020, l'uso totale di principi attivi di pesticidi in agricoltura è risultato pari a 2,7 milioni di tonnellate mentre l'applicazione per superficie coltivata è stata di 1,8 kg/ha (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021). Il commercio totale di prodotti formulati nel 2020 ha raggiunto circa 7,2 milioni di tonnellate, per un valore di 41,1 miliardi di dollari. Nonostante una stabilizzazione raggiunta negli ultimi decenni, l'uso totale medio di pesticidi è aumentato di quasi il 50% rispetto agli anni '90, con l'uso per superficie coltivata in aumento da 1,2 a 1,8 kg/ha. L'applicazione globale è aumentata in questi due periodi per l'utilizzo di erbicidi, fungicidi, battericidi e insetticidi, con aumenti della quota di erbicidi (dal 41 al 52 % del totale dei pesticidi) e riduzioni della quota di fungicidi (dal 25 al 23 %) e insetticidi (dal 24 al 18 %). Nel 2020 si è registrato un aumento del 30% delle quantità totali scambiate di pesticidi. Secondo il rapporto dell'Organizzazione per l'alimentazione e l'agricoltura il paese leader per consumo di pesticidi è rappresentato dagli Stati Uniti d'America (408 000 tonnellate nel 2020) con i primi paesi europei quali Francia e Italia che si collocano rispettivamente al quinto e al nono posto con 64 000 e 57 000 ton. Dall'analisi della FAO il trend in Europa sul consumo dei pesticidi, grazie ad una rigorosa politica agricola perseguita dalla Comunità europea, che monitora e controlla l'utilizzo dei prodotti in commercio, registra un dato positivo: l'incremento tra gli anni '90 e l'ultimo decennio è fermo al 3%. L'Europa ha inoltre la percentuale più bassa di uso di insetticidi (12%), e l'utilizzo per area di terreno coltivato è al di sotto della media mondiale, con circa 1,6 kg/ha. I pesticidi sono per definizione composti biologicamente attivi e rappresentano una delle poche categorie di sostanze chimiche somministrate intenzionalmente nell'ambiente il cui uso può comportare rischi per l'uomo e altri organismi non bersaglio. La gravità di questi rischi e la probabilità che si verifichino dipende principalmente dalla dose di prodotto utilizzato, dalla situazione d'uso, dagli organismi o dagli ecosistemi esposti e dai tempi di esposizione. Tuttavia, i pesticidi sono ampiamente utilizzati in agricoltura in quanto i rischi stimati e ipotizzati sono giudicati accettabili a condizione che vengano messi in atto e applicate tutte le necessarie e specifiche misure di mitigazione. Inoltre la tossicità e i potenziali rischi per l'ambiente e la salute sono periodicamente esaminati in dettaglio. In particolare i residui sono costantemente monitorati in un'ampia gamma di mezzi ambientali, comprese le acque superficiali e sotterranee, il suolo e l'aria. Tuttavia, ovunque i pesticidi siano stati misurati, si è riscontrato che sono onnipresenti, in molti casi superano gli standard nazionali per le acque superficiali e non mostrano tendenze al ribasso nel tempo, lo stesso dicasi per il suolo. I pesticidi si trovano nei fiumi e nei laghi a causa dei vicini campi agricoli e degli scarichi industriali. Nonostante la

massa del suolo funge da deposito l'elevata affinità degli agrochimici con il terreno comporta la contaminazione da pesticidi delle risorse idriche superficiali come ruscelli, estuari laghi e delle acque sotterranee che si trovano a stretta interconnessione con i corpi idrici di superficie. Le piccole concentrazioni di pesticidi che si accumulano nell'acqua possono essere a loro volta amplificati dalla catena alimentare e penetrare nelle specie acquatiche divenendo dannose per la salute dell'uomo. Si è potuto riscontrare, infatti, che in alcuni casi la concentrazione di pesticidi nell'acqua potabile ha superato il limite massimo di percentuale di 0,1 µg/l fissato dall'Unione Europea; così come la qualità del suolo influenzata negativamente dal modificarsi di parametri chimici e biologici con conseguenze sulla resa delle colture. I potenziali effetti negativi sull'ambiente destano molteplici preoccupazioni. Quando si esegue un trattamento fitosanitario soltanto una parte della miscela contenente la sostanza attiva raggiunge il "bersaglio" mentre il resto viene disperso nell'ambiente. La percentuale di miscela dispersa è legata a molteplici fattori quali la deriva, la volatilità, il ruscellamento e la lisciviazione. L'intensità di ciascuno di questi fenomeni dipende dalle caratteristiche proprie della sostanza attiva (es. struttura della molecola, solubilità in acqua, tendenza a legarsi al terreno, ecc.), ma anche dalle caratteristiche dell'ambiente (es. tessitura del suolo, conformazione del terreno, presenza di corpi d'acqua, clima, ecc.). I prodotti fitosanitari una volta dispersi nell'ambiente sono soggetti a processi di degradazione microbica, chimica o fotodecomposizione con la formazione di una o più sostanze chimiche diverse da quella di partenza o a variazione di concentrazione sia della sostanza attiva che dei metaboliti nei diversi comparti ambientali (suolo, aria, acqua) per i processi di degradazione e di dispersione ambientale. Al termine dei vari processi i prodotti fitosanitari possono essere degradati in sostanze non più tossiche: essere trattenuti dal terreno, essere assorbiti dalla vegetazione e quindi immessi nella catena alimentare, sia umana sia animale o raggiungere le falde sotterranee. I maggiori effetti negativi si evidenziano in caso di monocoltura, dove si ha un impiego ripetuto e costante degli stessi principi attivi. Uno dei contesti più diffusi di tale situazione sono le zone di viticoltura. L'uso a lungo termine di pesticidi organici e inorganici nei vigneti porta ad un aumento delle concentrazioni di questi inquinanti nel suolo e in altri comparti ambientali (Komárek et al., 2010). La contaminazione con metalli e inquinanti organici, insieme all'erosione e alla lavorazione del terreno, riduce la qualità dei suoli e attiva significative minacce ambientali e tossicologiche. I terreni dei vigneti sono generalmente altamente degradati in termini di proprietà biochimiche e sono quindi più suscettibili alla contaminazione. In generale, l'uso intensivo di fungicidi nei vigneti è attualmente motivo di preoccupazione pubblica, a causa della conseguente presenza di residui di pesticidi nell'acqua e nei prodotti vitivinicoli utilizzati per il consumo umano. I fungicidi a base di rame



sono i principali prodotti di difesa utilizzati nei vigneti di tutto il mondo per prevenire la peronospora (*Plasmopara viticola*), malattia devastante della vite ampiamente diffusa in tutto il mondo. Sebbene la loro efficacia sia estremamente consolidata è noto come un uso prolungato in medesimi suoli ne favorisca l'accumulo. Wightwick et al. (2008) hanno rilevato concentrazioni di rame (Cu) comprese tra 130 e 1280 mg/kg nel suolo superficiale dei vigneti europei mentre Mirlean et al. (2007) hanno evidenziato in Brasile concentrazioni di rame fino a 3216 mg/kg. Tale dato risulta significativo e interessante se si considerano le concentrazioni di rame di fondo naturale nei suoli, che in tutto il mondo sono in genere inferiori a circa 20 mg/kg con eventuali massimi fino a 100 mg/kg. In molti Stati del mondo ci si è interrogati sui rischi che l'accumulo di rame nei suoli agricoli può comportare per la salute umana, ecologica e di sostenibilità dei terreni agricoli, rivelando grosse preoccupazioni in merito agli effetti fitotossici del rame sulle piante supportati anche da ampi e significativi studi in materia (Wightwick et al., 2008). Diversi studi hanno anche dimostrato che concentrazioni elevate di rame influiscono negativamente sulla fertilità dei suoli dei vigneti. Quando il rame entra nel terreno, a seguito del dilavamento delle foglie della vite e di fuoriuscite accidentali dei fungicidi, la sua speciazione cambia rapidamente e il rame viene assorbito e (co)precipitato nel terreno. Le concentrazioni di rame nei suoli non inquinati sono influenzate dalla matrice organica dei suoli e raggiungono una media di 30 mg/kg. La sua solubilità, come quella relativa agli altri metalli, dipende fortemente dal pH del suolo e sarà più facilmente disponibile a valori di pH inferiori a 6 (Boudesocque et al., 2007). In terreni di vigneto acidi il rame può migrare più facilmente attraverso i profili del suolo e quindi causare inquinamento delle acque sotterranee con la mobilità del rame nei suoli che può aumentare a valori di pH superiori a 7,5. Tali proprietà di assorbimento/complessazione lo rendono uno dei metalli meno mobili nei terreni. In risposta alle preoccupazioni ambientali sull'uso di fungicidi a base di rame, come il suo accumulo nei suoli agricoli e il potenziale impatto sull'ecologia del suolo, le autorità di regolamentazione in alcuni paesi europei hanno imposto restrizioni all'uso di tali fungicidi. Ad esempio, l'uso del rame è stato vietato nei Paesi Bassi e la Svizzera ne ha limitato la quantità applicabile per ettaro (Wightwick et al., 2008).

Oltre al rame in viticoltura sono molto spesso utilizzati fungicidi organici sintetici provenienti da diverse classi chimiche e con un assorbimento e trasporto nell'ambiente che varia in funzione delle loro proprietà fisico-chimiche (Wheeler WB, 2002). Il comportamento, la persistenza e la mobilità dei pesticidi sono strettamente associati a diversi processi che si verificano nei suoli quali l'assorbimento-desorbimento, la volatilizzazione, la degradazione chimica e biologica, l'assorbimento da parte delle piante e la lisciviazione (Komárek et al., 2010). L'adsorbimento è uno dei processi chiave che influenza le concentrazioni di pesticidi nel suolo a sua volta è

correlato alla loro solubilità in acqua, ai coefficienti di ripartizione ottanolo-acqua ( $K_{ow}$ ), ai coefficienti di distribuzione ( $K_d$ ) e ai coefficienti di ripartizione del carbonio organico ( $K_{oc}$ ). Il coefficiente di  $K_{ow}$  indica la distribuzione di un pesticida tra acqua e ottanolo e fornisce una stima della ripartizione tra una fase acquosa e una fase lipofila/organica. Più alto è  $K_{ow}$ , più è probabile che un pesticida si leghi alla materia organica nel suolo e nei sedimenti o possa entrare nei tessuti viventi. Il coefficiente di distribuzione  $K_d$  (L/kg) descrive la distribuzione del pesticida tra la fase solida e quella liquida, con valori di  $K_d$  più elevati che indicano un maggiore adsorbimento alla matrice del suolo. In generale, i pesticidi con valori di  $K_{oc}$  più elevati presentano un rischio minore di contaminazione delle acque sotterranee. I fattori che influenzano l'adsorbimento dei pesticidi coinvolgono le proprietà fisico-chimiche del composto, la dimensione molecolare, la struttura molecolare, l'ionizzabilità, la solubilità in acqua, la lipofilia e volatilità e le proprietà del suolo in rapporto alle dimensioni delle particelle, pH, contenuto di ossidrilossido e contenuto di argilla (Komárek et al., 2010). L'invecchiamento dei fungicidi organici, così come inorganici, nel suolo possono creare legami più forti tra le particelle del suolo e i fungicidi con un aumento del tempo di contatto che fa diminuire la disponibilità dei pesticidi per la degradazione e ne aumenta l'emivita (Sayen et al., 2009).

Dalle autorità europee e locali dovrebbero essere incoraggiati approcci di difesa più sensibili all'uomo e all'ambiente verso una gestione integrata maggiormente attenta ai rischi attuali derivanti dall'utilizzo massiccio dei pesticidi.

## 3.2. Politiche ambientale nazionali ed Europee di contenimento

### 3.2.1. Regolamento Unione Europea

I prodotti fitosanitari (pesticidi) sono disciplinati dal Regolamento (CE) 1107/2009 (European Commission, 2009), volto a garantire un elevato livello di protezione della salute umana (consumatori, lavoratori, astanti e residenti) e dell'ambiente (aria, acqua, suolo). L'attività riguarda gli aspetti scientifici di valutazione tossicologica, chimica fisica, chimica analitica, residui sui prodotti di origine vegetale e animale, efficacia agronomica, aspetti ambientali, destino della molecola nei comparti aria, acqua e suolo e nei differenti organismi target ambientali. L'Istituto Superiore di Sanità (ISS) coordina gli esperti nei settori di valutazione, al fine di definire un documento finale da inviare al Ministero della Salute. Accanto a ciò, una rete di laboratori nazionali applica controlli ufficiali secondo prestabiliti piani di monitoraggio per valutare la qualità dei prodotti in commercio, a garanzia della salute umana e dell'ambiente con.

Non sono disponibili revisioni globali che valutino il contenuto e la qualità della legislazione sui pesticidi, né un'analisi sistematica delle lacune legali. Tuttavia, è possibile prendere visione degli orientamenti internazionali sull'elaborazione e il contenuto della legislazione sui pesticidi (FAO and WHO, 2020). Il codice di condotta internazionale FAO/OMS sulla gestione dei pesticidi (FAO and WHO, 2014) raccomanda a tutti i paesi che ne fanno uso di conoscere e considerare tutte le fasi del loro ciclo di vita. In molti paesi a livello mondiale e in particolare quelli ad alto reddito è presente una regolamentazione legiferata appositamente al fine di consentire un adeguato utilizzo dei pesticidi in grado di includere tutti i comportamenti conseguenti: autorizzazione, importazione, stoccaggio, trasporto, distribuzione, vendita, licenza, etichettatura e uso.

La normativa di riferimento che istituisce un quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi è la direttiva 2009/128/CE (European Commission, 2009). Agli Stati membri è consigliata l'attuazione di una lotta integrata che comporta una difesa fitosanitaria a basso apporto di pesticidi, privilegiando ogni qualvolta possibile i metodi non chimici che presentano il minor rischio per la salute umana e l'ambiente. Vengono altresì incentivate misure specifiche per la tutela dell'ambiente acquatico e della rete idrica. Agli Stati membri è richiesta l'applicazione di misure compatibili con le pertinenti disposizioni della direttiva 2000/60/CE basate sull'utilizzo preferenziale di pesticidi che non sono classificati pericolosi per l'ambiente acquatico, sull'applicazione delle tecniche di distribuzione più efficienti, sul ricorso a misure di mitigazione che riducano al minimo i rischi di inquinamento causato dall'eventuale dispersione dei prodotti irrorati, drenaggio e ruscellamento. Sono necessarie la creazione di aree di rispetto di dimensioni appropriate per la tutela degli organismi acquatici non bersaglio e di aree di salvaguardia per le acque superficiali e sotterranee utilizzate per l'estrazione di acqua potabile, nelle quali sia vietato applicare o stoccare pesticidi. Sono infine indicate le linee per l'adozione di piani d'azione nazionale al fine di definire gli obiettivi quantitativi, le misure e i tempi per la riduzione dei rischi e degli impatti dell'utilizzo dei pesticidi sulla salute umana e sull'ambiente. L'obiettivo diviene incoraggiare lo sviluppo e l'introduzione della difesa integrata e di approcci o tecniche alternative al fine di ridurre la dipendenza dall'utilizzo di tali prodotti. Gli obiettivi individuati comprendono diversi settori di interesse, come la protezione dei lavoratori, la tutela dell'ambiente, i residui, l'uso di tecniche specifiche o l'impiego in colture specifiche. I piani d'azione nazionali comprendono anche gli indicatori di controllo dell'impiego di prodotti fitosanitari contenenti sostanze attive ritenute rischiose.

In aggiunta all'attuale direttiva 2009/128/CE sull'uso sostenibile dei prodotti fitosanitari e al Regolamento (CE) 1107/2009 relativo all'immissione sul mercato di tali prodotti la Commissione Europea ha recentemente formulato delle proposte per un nuovo regolamento. Punto di partenza riguarda la revisione delle norme esistenti sull'uso sostenibile dei pesticidi con l'obiettivo di allinearle alle ambiziose strategie del Green Deal, Biodiversità e del Farm to Fork. Le proposte dovranno poi essere approvate dagli Stati membri in sede di Consiglio e Parlamento europeo, secondo la consueta procedura legislativa. Esse sono parte del pacchetto di misure atte a ridurre l'impronta ambientale sul sistema alimentare dell'UE contribuendo a mitigare le perdite economiche dovute ai cambiamenti climatici e alla perdita di biodiversità. Il primo obiettivo giuridicamente vincolante a livello dell'UE concerne la riduzione del 50% dell'uso e il rischio di pesticidi chimici, nonché l'uso dei pesticidi più pericolosi entro il 2030. Gli Stati membri dovranno fissare i propri obiettivi di riduzione nazionali entro parametri definiti per garantire il raggiungimento dei vincoli UE. Misure ulteriori garantiranno che tutti gli agricoltori e qualsiasi utilizzatore professionale di pesticidi pratici la gestione integrata dei parassiti (IPM). L'obiettivo riguarda il raggiungimento di un sistema di controllo dei parassiti rispettoso dell'ambiente che si concentri sulla prevenzione attraverso metodi alternativi e con pesticidi chimici da utilizzarsi solo in rari casi. Misura ulteriore sancirà il divieto di utilizzo di pesticidi in aree sensibili come aree verdi urbane, compresi parchi o giardini pubblici, parchi giochi, campi ricreativi o sportivi, percorsi pubblici e aree protette in conformità con Natura 2000 e qualsiasi area ecologicamente sensibile. Uno dei punti di maggiore rilievo della proposta riguarda la sua trasformazione in regolamento che sarà direttamente vincolante e uniformemente applicabile a tutti gli Stati membri. La proposta aiuterà a costruire sistemi alimentari sostenibili in linea con il Green Deal europeo fortificando la strategia "dal produttore al consumatore", garantendo una sicurezza alimentare duratura a salvaguardia della salute umana. La preoccupazione e l'attenzione generale sull'uso dei pesticidi e l'accumulo dei loro residui e metaboliti nell'ambiente è in continua crescita. Nella relazione finale della Conferenza sul futuro dell'Europa conclusasi il 9 maggio 2022 a Strasburgo è emerso come la richiesta di dare risposte concrete ai temi dell'uso e relativo rischio di pesticidi provenga direttamente dai cittadini europei. È stato inoltre rilevato come le attuali norme della direttiva in vigore a riguardo l'uso sostenibile dei pesticidi riveli carenze e punti deboli e siano attuate in modo discontinuo e non uniforme. I progressi compiuti nell'uso della gestione integrata dei parassiti e di altri approcci alternativi si sono rivelati insufficienti. I pesticidi chimici danneggiano la salute umana e causano il declino della biodiversità nelle aree agricole, contaminano l'aria, l'acqua e l'ambiente in generale. La Commissione propone pertanto regole chiare e vincolanti. La proposta trasforma la direttiva

esistente in un regolamento che sarà direttamente applicabile in tutti gli Stati membri e permetterà di affrontare i problemi attuando una più rigida e severa normativa. Gli Stati membri saranno vincolati a presentare alla Commissione relazioni annuali dettagliate sullo stato di avanzamento e sull'attuazione delle pratiche indicate dalle linee normative UE.

Un pacchetto di politiche chiave sosterrà gli agricoltori e altri utenti, con la transizione verso sistemi di produzione alimentare più sostenibili. Saranno delineate nuove regole della politica agricola comune per garantire che gli agricoltori siano compensati per eventuali costi relativi all'attuazione della nuova normativa. Verranno varate azioni più forti per aumentare la gamma di alternative biologiche e a basso rischio sul mercato e saranno incentivate la ricerca e lo sviluppo nell'ambito dei programmi Horizon dell'UE a sostegno di nuove tecnologie e tecniche e un piano d'azione biologico per rispondere agli obiettivi del Farm to Fork. La transizione sarà supportata anche dalla proposta sui dati della sostenibilità delle aziende agricole e degli sviluppi del mercato in relazione all'agricoltura di precisione, come gli atomizzatori che utilizzano la localizzazione geospaziale e le tecniche di riconoscimento dei parassiti.

Ogni Stato membro redigerà e pubblicherà su un sito web dedicato un piano d'azione nazionale contenente specifiche informazioni sugli obiettivi nazionali di riduzione per il 2030, i dettagli sui progressi pianificati in relazione agli elementi rilevanti per l'attuazione del presente regolamento e un collegamento alle parti pertinenti dei piani strategici della PAC, relativi alla Strategia Farm to Fork, per un sistema alimentare equo, sano e rispettoso dell'ambiente. Dovranno essere inoltre delineate le misure nazionali per incoraggiare l'uso di metodi non chimici da parte degli utilizzatori professionali attraverso incentivi finanziari, misure pianificate e adottate per sostenere, o garantire mediante requisiti vincolanti stabiliti dalla legislazione nazionale, l'innovazione, lo sviluppo e l'uso di metodi di controllo dei parassiti non chimici. Entro il 31 agosto di ogni anno, ciascuno Stato membro dovrà presentare alla Commissione una relazione annuale sullo stato di avanzamento e sull'attuazione dei vari obiettivi.

Agli utilizzatori professionali e ai consulenti relativi alla gestione integrata dei parassiti sarà fatto obbligo, prima di ricorrere all'applicazione di prodotti fitosanitari chimici, di applicare misure alternative per la prevenzione o la repressione degli organismi nocivi. Dovranno essere prediletti metodi di controllo biologico, fisici e altri metodi alternativi a quelli chimici. Quest'ultimi saranno da utilizzarsi solo se sono necessari per raggiungere livelli accettabili di controllo degli organismi nocivi a seguito di assenza di altre alternative. Sarà inoltre obbligatorio per gli utilizzatori professionali mantenere l'uso dei fitofarmaci chimici e delle altre forme di intervento affinché non vengano superati i livelli necessari al controllo degli organismi nocivi e che non costituiscano un aumento del rischio di sviluppo di resistenza nelle popolazioni di

microrganismi. L'uso di tutti i prodotti fitosanitari sarà vietato in tutte le aree sensibili e nel raggio di 3 metri da tali aree. Gli Stati membri stabiliranno le norme sulle sanzioni applicabili in caso di violazione del presente regolamento e adotteranno le misure necessarie per garantirne l'attuazione. Le sanzioni previste dovranno essere effettive, proporzionate e dissuasive.

### 3.2.2. Piano azione nazionale italiano (PAN)

In Italia, l'interesse per metodi produttivi che prevedono un uso più corretto dei prodotti fitosanitari, nel rispetto sia dei consumatori che dell'ambiente è riconducibile al "Piano azione nazionale" (MIPAAF, 2014). Obiettivo prioritario della difesa è il basso apporto di prodotti fitosanitari al fine di ridurre il rischio per l'ambiente, gli operatori, i consumatori, i residenti e gli astanti, derivante dall'impiego di tali prodotti. Allo stesso tempo, per ridurre l'impatto ambientale delle produzioni agricole, occorre promuovere una graduale riduzione delle quantità di prodotti fitosanitari impiegati.

Il Piano di azione nazionale italiano nasce da un articolato percorso e si caratterizza per obiettivi di lungo periodo. Esso si prefigge di guidare, garantire e monitorare un processo di cambiamento delle pratiche di utilizzo dei prodotti fitosanitari verso forme caratterizzate da maggiore compatibilità e sostenibilità ambientale e sanitaria, con particolare riferimento alle pratiche agronomiche per la prevenzione e/o la soppressione di organismi nocivi. Il Piano prevede soluzioni migliorative per ridurre l'impatto dei prodotti fitosanitari anche in aree extra agricole frequentate dalla popolazione, quali le aree urbane, le strade, le ferrovie, i giardini, le scuole, gli spazi ludici di pubblica frequentazione e tutte le loro aree a servizio. In linea con i contenuti della direttiva 2009/128/CE e del decreto legislativo n. 150/2012, il Piano si propone di raggiungere alcuni obiettivi generali al fine di ridurre i rischi associati all'impiego dei prodotti fitosanitari. L'attenzione è posta sulla riduzione dei rischi e gli impatti dei prodotti fitosanitari sulla salute umana, sull'ambiente e sulla biodiversità, sulla promozione all'applicazione della difesa integrata, dell'agricoltura biologica e di altri approcci alternativi, sulla protezione di utilizzatori dei prodotti fitosanitari e la popolazione interessata e sulla tutela dei consumatori oltre alla salvaguardia dell'ambiente acquatico e della biodiversità a tutela degli ecosistemi.

Le attività promosse nelle diverse Regioni e Province autonome hanno permesso inoltre di definire gli appositi Disciplinari di produzione integrata per le principali colture ortofrutticole e per la vite, la cui applicazione è stata fortemente incrementata, a partire dalla seconda metà degli anni '90, attraverso l'adozione delle misure agro-ambientali promosse con il regolamento n. 2078/92 (*EUR-Lex - 31992R2078 - EN - EUR-Lex*, 1992). Un forte impulso alla diffusione di questo metodo di coltivazione è derivato anche dalle richieste del mercato, sempre più orientato a garantire elevati standard di sicurezza, e dalla necessità di preservare gli agro ecosistemi. La

difesa integrata obbligatoria prevede l'applicazione di tecniche di prevenzione e monitoraggio delle infestazioni, delle infezioni e delle infestanti, l'utilizzo dei mezzi biologici di controllo dei parassiti, il ricorso a pratiche di coltivazione appropriate, l'uso di prodotti fitosanitari che presentino il minor rischio per la salute umana e l'ambiente tra quelli disponibili per lo stesso scopo.

### 3.3. Strategie possibili

#### 3.3.1. Agire sulla normativa

Negli ultimi decenni sono stati sviluppati e implementati molteplici strategie e programmi al fine di rafforzare la gestione dei parassiti e dei pesticidi in tutte le regioni del mondo. Tuttavia, la programmazione strategica dell'Ue ha spesso affrontato solo un aspetto specifico della gestione dei parassiti o dei pesticidi, come l'aggiornamento della legislazione sui pesticidi, la promozione della gestione integrata dei parassiti (IPM) o del biocontrollo, il rafforzamento della registrazione, il potenziamento dei laboratori di analisi dei residui di pesticidi, lo smaltimento degli stock di pesticidi obsoleti, la formazione degli agricoltori in buone condizioni pratiche agricole o trasformando tasse o sussidi sui pesticidi. Sebbene tali attività individualmente hanno ottenuto un discreto successo nella maggior parte dei paesi del mondo, non è cambiato radicalmente il modo in cui vengono gestiti i parassiti o ridotto i rischi derivanti dai pesticidi (United Nations Environment Programme, 2022) . L'intensità dell'uso di quest'ultimi è in continuo aumento e i residui sono onnipresenti nell'ambiente, mentre la resistenza ad essi continua ad aumentare con il continuo verificarsi di avvelenamento professionale da pesticidi e l'inquinamento delle acque superficiali e sotterranee. È prioritario quindi elaborare e implementare le politiche nazionali di gestione sostenibile dei parassiti e dei pesticidi. (United Nations Environment Programme, 2022). Numerose misure vengono adottate nei paesi per promuovere una sana gestione dei pesticidi e ridurre i rischi per l'ambiente e la salute. Tuttavia, il grado in cui tali misure sono state attuate o hanno avuto successo varia notevolmente tra i paesi e le regioni. Sono necessarie politiche nazionali e regionali integrate che affrontino tutti gli aspetti della gestione dei parassiti promuovendo la sostenibilità a lungo termine. Tali politiche, che finora sono state quasi assenti dovrebbero cooperare per la messa a punto di misure normative ed economiche atte a garantire l'impegno di fornire informazioni indipendenti e pertinenti in materia; trovare modi efficaci per raggiungere e formare gli agricoltori e il personale addetto all'estensione oltre a sviluppare tecnologie innovative accessibili alle parti interessate. In secondo luogo appare necessario sviluppare e aggiornare la legislazione nazionale sui pesticidi includendo tutti gli elementi del ciclo di vita degli stessi. In molti paesi è urgente

aumentare l'efficacia dell'ispezione e del controllo delle attività legate ai pesticidi durante la produzione, l'importazione, la distribuzione, la vendita, lo smaltimento e l'uso. I modi per aumentare l'efficacia includono il rafforzamento dei servizi di ispezione, della collaborazione con altre forze dell'ordine e la creazione laboratori specializzati per il controllo della qualità dei prodotti utilizzati. È possibile ottenere una maggiore efficacia delle ispezioni e dell'applicazione sviluppando linee guida e prodotti di conoscenza rispetto a ciò che è richiesto per la conformità. È inoltre indispensabile operare affinché vi sia maggiore consapevolezza del problema in seno al governo e consentire agli enti regolatori di svolgere efficacemente le ispezioni perseguendo attività di giudizio in presenza delle violazioni della legislazione sull'uso dei pesticidi. A ciò si affianca l'importanza di raccogliere dati statistici sulla produzione, importazione e vendita di pesticidi. Il monitoraggio dell'uso e degli effetti di questi prodotti è fondamentale per informare il processo decisionale e lo sviluppo delle politiche. Da parte degli organismi di governo dei paesi mondiali istituire o rafforzare la raccolta di statistiche nazionali sulla produzione, importazione e vendita di pesticidi diviene fondamentale. Il raggiungimento di tale obiettivo diviene legato all'inclusione della raccolta di informazioni sull'uso e lo smaltimento dei pesticidi nella legislazione di riferimento presente. Specificamente designando poteri e responsabilità, inclusa la capacità di imporre obblighi di rendicontazione a produttori, importatori, distributori e venditori di pesticidi. Sono necessari approcci integrati e più olistici che riducano la dipendenza dall'uso di pesticidi, comprese misure e incentivi a livello nazionale verso le aziende agricole locali.

### 3.3.2. Utilizzo di biopesticidi

La ricerca e lo sviluppo di pesticidi è un compito impegnativo, laborioso e costoso, volto alla scoperta di sostanze attive che presentino proprietà quali elevata efficacia anche a bassi dosaggi, bassa persistenza nell'ambiente ed elevata selettività. (Lykogianni et al., 2021). La scoperta di tali sostanze attive con nuovi meccanismi d'azione risulta cruciale per la protezione delle piante nel tentativo di combattere il problema della resistenza ai pesticidi. Nell'ultimo decennio, circa 105 sostanze attive sono state introdotte o sono in fase di sviluppo (Umetsu & Shirai, 2020). Tuttavia molto spesso sono riscontrabili ostacoli che influenzano la ricerca e lo sviluppo. In primo luogo i costi e le crescenti esigenze per l'approvazione delle sostanze attive. Vi è poi un fattore legato alla gestione dei vecchi principi attivi e al loro possibile utilizzo in nuovi tipi di formulazione. Inoltre, un fattore importante che influenza la ricerca e lo sviluppo di nuovi pesticidi è riscontrabile all'interno della filiera agrochimica che si inserisce nei mercati emergenti dei paesi in via di sviluppo, per i quali esiste un margine di profitto maggiore. Pertanto, il loro interesse si è concentrato su parassiti e colture prevalenti in queste regioni



(Phillips, 2020). Nonostante il numero di nuove sostanze attive dei pesticidi sintetici introdotti ogni anno sia diminuito negli ultimi 20 anni vi è stato un rapido aumento della quota di mercato dei biopesticidi. Tali prodotti sono basati su feromoni o altri attrattivi, derivati microbici e su qualsiasi prodotto di origine naturale (Lykogianni et al., 2021). In generale, i biopesticidi sono classificati come sostanze a basso rischio e hanno una maggiore accettazione da parte del pubblico, soprattutto quelli contenenti sostanze attive di derivazione naturale. Tuttavia va considerato che l'origine di un prodotto, sia esso sintetico o biologico, non fornisce informazioni sulla sua tossicità o impatto ambientale. I biopesticidi come i prodotti botanici e microbici presentano un basso rischio di sviluppo di resistenza principalmente a causa del loro meccanismo d'azione non specifico. I biopesticidi sono emersi come tecnologia praticabile per uso commerciale a fronte del divieto di utilizzo di molti pesticidi chimici, della registrazione facilitata di tali prodotti soprattutto negli Stati Uniti, e delle aspettative dell'opinione pubblica basate su alimenti privi di residui chimici. Tuttavia, nell'UE gli stessi vincoli normativi validi per i pesticidi limitano anche i biopesticidi risultando così poco commercializzati sul mercato, sebbene nel complesso dovrebbero essere considerati un altro strumento e non un modo autonomo e sostenibile di gestione dei parassiti. Attualmente, i biopesticidi venduti corrispondono al 5% dei fitofarmaci (Baylis, 2020). Precedenti studi hanno già riportato più di 2500 specie vegetali appartenenti a 235 famiglie, che hanno dimostrato la loro attività biologica contro diversi tipi di parassiti (Walia et al., 2014). Tuttavia, nonostante il notevole potenziale come fonti naturali per lo sviluppo commerciale di pesticidi botanici, non sono presenti in maniera significativa sul mercato, rimanendo in uso solo per piccole colture biologiche. I pesticidi di origine vegetale possono essere lavorati in vari modi: come materia vegetale grezza sotto forma di polvere, come estratti o come prodotti naturali vegetali puri, formulati in soluzioni o sospensioni. Sono già state segnalate diverse classi di composti naturali che promuovono l'attività dei pesticidi, ovvero: acidi grassi, glicolipidi, fenoli aromatici, aldeidi, chetoni, alcoli, terpenoidi, flavonoidi, alcaloidi, limonoidi, naftochinoni, saccaridi, poliesteri, saponine e sapogenine. Tuttavia, diversi fattori sembrano limitare la commercializzazione dei pesticidi botanici, quali: problemi nella produzione su larga scala, indisponibilità di materie prime, scarsa conservabilità, ridotta tossicità residua in condizioni di campo, limitazioni relative alla standardizzazione e raffinamento del prodotto finale. Inoltre, poiché il profilo fitochimico delle specie vegetali può variare in base al suo genoma/trascrittoma, e questa variazione dipende da diversi fattori edafico-climatici (ad es. temperatura, umidità relativa, livello di radiazione solare, altitudine, fotoperiodo e tipo di suolo) nonché da interazioni ecologiche (ad es. erbivoro o mutualismo), i produttori devono prestare maggiore attenzione al fine di mantenere l'efficienza e

garantire che i loro prodotti funzionino in modo coerente (standardizzazione) anche se l'approvazione normativa rimane il principale ostacolo. Un grave inconveniente alla commercializzazione di prodotti botanici è il costo elevato della lavorazione dei materiali vegetali per soddisfare gli standard di regolamentazione imposti dalle autorità. Pertanto, i principali pesticidi botanici commerciali attualmente in uso includono: piretrina, rotenone, azadiractina e oli essenziali.

Durante l'ultimo decennio, sono stati testati diversi oli essenziali che hanno mostrato proprietà antimicotiche contro diversi agenti patogeni come *Plasmopora viticola*, *Botrytis cinerea* e *Fusarium spp.* La composizione chimica e le attività dei membri della famiglia delle Lamiaceae produttrici di oli essenziali sono state ampiamente studiate e l'attività antiossidante mostrata è stata attribuita principalmente all'acido carnosolico, all'acido rosmarinico e ad altri composti fenolici, mentre l'attività fungicida sembra essere dovuta a molecole come carvacrolo, timolo e p-cimene. L'uso di oli essenziali per controllare i patogeni delle piante è stato valutato su diverse specie con diversi patogeni (Rienth et al., 2019). Gli studi condotti su viti infettate da peronospora e trattate con oli essenziali di salvia (*Salvia officinalis*) hanno mostrato una riduzione del 94% della gravità della malattia. Tuttavia, a causa della resistenza alla pioggia molto bassa e del facile degrado degli oli essenziali, l'efficienza negli anni piovosi è risultata inferiore. Diversi studi hanno indicato che la fase gassosa dell'olio essenziale è più fungitossica della fase liquida di contatto, sebbene ciò sia stato dimostrato solo per la botrite nelle piastre di Petri (Rienth et al., 2019). Per una produzione agricola sostenibile, l'utilizzo del vapore di oli essenziali come trattamento diretto con diffusori o sotto forma di co-piantagioni che emettono oli essenziali misti a composti organici volatili potrebbe essere considerato un sistema integrato, in grado di controllare le malattie fungine. L'obiettivo a lungo termine è comprendere al meglio gli effetti prodotti dagli oli essenziali e identificarne, se possibile, quali componenti terpenici sono maggiormente efficaci. Vanno sviluppati sistemi in grado di consentire l'applicazione di oli essenziali e permettere la riduzione di applicazioni di pesticidi.

Il New Zealand Institute for Plant and Food Research Limited (PFR) ha sviluppato due biofungicidi per il controllo dell'oidio e della botrite. NP1 è un concentrato emulsionato di grasso anidro del latte (AMF), ottenuto da vacche da latte; NP2 è un concentrato emulsionato di puro olio di semi di soia. Le formulazioni sono a base di grassi/oli di derivazione naturale e contengono solo coformulanti derivati dall'industria alimentare e, pertanto, sono considerati a bassa tossicità. Le ricerche in campo hanno evidenziato come NP1 e NP2 garantiscano un controllo efficace di botrite e oidio sulle uve da vino coltivate in campo alla pari dei fungicidi sintetici. I test riguardanti la botrite sono stati eseguiti su tre varietà di uva da vino verde

(Chardonnay, Sauvignon Blanc, Riesling) mentre il controllo dell'oidio su Chardonnay e Riesling, in due diverse regioni geografiche (Hawke's Bay, Gisborne) per più stagioni e sotto una gamma completa di pressioni della malattia. La micro-vinificazione degli acini d'uva dai trattamenti NP e fungicidi completi prodotti sono stati valutati da un pannello sensoriale addestrato e sottoposti ad analisi dei residui chimici. I risultati hanno mostrato che i vini trattati con NP erano privi di residui e che non vi erano effetti negativi sulle caratteristiche sensoriali. Come per tutti i prodotti agricoli, il successo dell'implementazione delle NP dipende dalla comprensione dei loro potenziali svantaggi. Il targeting accurato dello spray, in particolare sotto forme di allevamento dense, rimane il fattore più critico per il successo di questi prodotti, poiché le NP sembrano avere un'azione di solo contatto. È necessario considerare anche l'effetto delle NP sulla maturità dei frutti, poiché il grado Brix è spesso inferiore di 1–1,5 unità al momento della raccolta. Tuttavia, sono necessarie anche ulteriori ricerche per determinare se la riduzione degli acidi nelle bacche è ritardata. Se la riduzione dell'acidità non viene ritardata, il frutto deve essere raccolto in Brix inferiore, nel qual caso l'uso di NP diventa un ulteriore strumento per la produzione di vini a bassa gradazione alcolica raccolti a Brix inferiori. Nel complesso, questa ricerca ha dimostrato che l'efficace controllo di oidio e botrite può essere ottenuto nei vigneti di uve da vino utilizzando prodotti a base lipidica naturale, senza alcun effetto negativo sulle rese, e offrendo l'ulteriore vantaggio di essere privo di residui, non facilmente superabile dalla resistenza ai patogeni e costituito da ingredienti generalmente considerati sicuri.

Un'altra categoria di biopesticidi che fungono da alternativa all'uso dei fungicidi sintetici è rappresentato dagli estratti di erbe. Uno studio condotto da Cohen et al. (2006) ha dimostrato che estratti acquosi di *Inula viscosa*, una pianta infestante perenne delle Asteracee, mostra attività antimicotica in vitro. Inoltre gli estratti di solventi organici sono risultati antibatterici. Cohen et al. (2017) hanno riferito che gli estratti di acetone dai germogli di *Inula viscosa* erano efficaci nel controllo della peronospora della patata, del pomodoro e di vite nelle camere di crescita. Nel loro insieme, i dati forniti dallo studio hanno mostrato che gli estratti a base di foglie di *Inula viscosa* con solventi organici sono efficaci per controllare la *Plasmopora viticola* sulle foglie di vite. La fonte "naturale" degli estratti, tuttavia, non garantisce la sicurezza agli utilizzatori e ai consumatori e non risulta altrettanto efficace nelle aree con maggiore pressione della malattia. La disponibilità di estratti di erbe di questo tipo sul mercato possono soddisfare la necessità di un prodotto adatto per i coltivatori biologici al fine di combattere la peronospora nella vite.

Un'altra categoria di recente interesse è rappresentata dai composti organici volatili (VOC), piccole molecole con basso massa molecolare (100–500 Da), alta pressione di vapore, basso punto di ebollizione e un carattere lipofilo che evapora e si diffonde facilmente attraverso

miscele eterogenee di solidi, liquidi e gas, come i pori del suolo pieni di gas e acqua. Sono prodotti da un'ampia varietà di organismi e svolgono ruoli cruciali nella comunicazione tra individui della stessa specie e forme di vita di regni diversi. Alcuni di tali composti organici volatili sono prodotti dai funghi presenti nel suolo che fungono da protezione delle piante mediante l'inibizione diretta della crescita dei fitopatogeni o mediante l'induzione della resistenza delle piante. Diversi studi hanno evidenziato l'importanza di *Trichoderma* spp. in alternativa ai fungicidi chimici contro i patogeni della vite (Lazazzara et al., 2021). Lazazzara et al. (2021) hanno analizzato cinque composti organici volatili di *Trichoderma* ( $\alpha$ -farnesene, cadinene, 1,3-ottadiene, 2-pentilfurano e 6-pentil-2H-piran-2-one) che hanno ridotto la gravità della peronospora sui dischi delle foglie della vite. In particolare, il 6-pentil-2H-piran-2-one e il 2-pentilfurano ha aumentato l'accumulo di callosi e rafforzato la sovraregolazione dei geni correlati alla difesa dopo l'inoculazione di *Plasmopora viticola*, indicando l'induzione della resistenza della vite. Inoltre, il 6-pentil-2H-piran-2-one ha sovraregolato l'espressione dei geni correlati alla difesa nei dischi fogliari inoculati in modo simulato e ha attivato l'HR dopo l'inoculazione di *Plasmopora viticola*, come possibile rinforzo dei meccanismi di difesa della vite contro questo patogeno. Pertanto, i segnali aerei prodotti da *Trichoderma* spp. possono essere percepiti dai tessuti vegetali come possibili mediatori delle comunicazioni fungo-pianta e come induttori di resistenza delle piante. Sebbene siano necessari ulteriori studi trascrittomici e funzionali per far luce sulla modalità d'azione dei composti organici volatili di *Trichoderma* nell'induzione dei meccanismi di difesa della vite contro la peronospora, il loro utilizzo potrebbe aprire nuove opportunità per lo sviluppo di biofungicidi di origine naturale.

Infine, una particolare categoria di prodotti con azione fungicida biocompatibile è rappresentata dall'applicazione fogliare di fertilizzanti (Gur et al., 2022). Tali composti possono servire come alternativa parziale per la fertilizzazione del suolo, evitando alcuni degli effetti negativi sull'ambiente come la lisciviazione dei nutrienti nelle falde acquifere. Precedenti studi hanno convenuto che l'applicazione fogliare di silicato di potassio riduceva l'oidio sulle foglie di vite. Reuveni et al. (1998) hanno dimostrato che l'applicazione fogliare di sali di fosfato controlla l'oidio nel cetriolo, nelle rose, nel melo, nel pesco e nella vite. È stata anche dimostrata l'efficacia dell'applicazione fogliare di micronutrienti, come Mn, Zn, B e Si, contro i patogeni delle piante, compreso l'oidio. In base a specifici studi di ricerca Gur et al. (2022) sono arrivati alla conclusione che il composto semplice Top KP<sup>+</sup> contenente potassio fosforo combinato con miscele pronte di micronutrienti quali zinco, boro, rame, ferro, manganese e molibdeno è altamente efficace come fungicida sintetico nel controllo dell'oidio su foglie e grappoli sensibili di vite coltivate in campo. I possibili meccanismi responsabili dell'efficacia di tale prodotto

includono l'inibizione preventiva dell'infezione e della colonizzazione delle foglie e delle bacche con l'oidio dovuta all'inibizione della germinazione dei conidi, alla plasmolisi dei miceli e alla produzione sovraregolata di composti antimicotici che potrebbero indurre resistenza sistemica. Il rapido assorbimento dei fertilizzanti da parte dei tessuti vegetali, la loro mobilità all'interno dei tessuti, la bassa tossicità animale, la sicurezza ambientale e il valore nutritivo li rendono adatti al controllo delle malattie.

### 3.3.3. Tecnologie alternative

La produzione e la ricerca di biopesticidi rimane una valida soluzione alternativa all'uso di pesticidi sintetici, tuttavia, negli ultimi anni si è riscontrato uno spostamento verso la produzione di piante geneticamente modificate prodotte con vari metodi, comprese le nuove tecniche RNAi e CRISPR che vengono utilizzate in combinazione con pesticidi appropriati, e verso l'uso di altre tecnologie alternative. L'aumento della coltivazione biologica della vite ha aumentato l'applicazione di fungicidi prodotti da fonte naturale e con minimi effetti negativi sui processi fisiologici delle piante, come nel caso della laminarina, considerata dall'EFSA a bassa tossicità ambientale. Tuttavia, sebbene alcuni prodotti ecologici siano considerati buoni candidati per ridurre la dipendenza dal rame nei vigneti, non esiste un trattamento efficace quanto il rame per il controllo della peronospora della vite. Una soluzione attuabile conduce all'uso di colture di copertura che potrebbero risultare utili al fine di ridurre il contenuto di rame nel suolo. Considerato che l'effetto fitoestrattivo delle coperture in viticoltura non sia sufficiente per eliminare l'intero volume di rame applicato annualmente come prodotto fitosanitario contro l'oidio, si suggerisce di utilizzare colture di copertura per ridurre le quantità di pesticidi lisciviati con il conseguente rischio di contaminazione delle acque sotterranee. Ortega et al. (2022) hanno condotto uno studio per verificare gli effetti delle colture di copertura per proteggere l'inquinamento delle acque sotterranee dall'applicazione di fungicidi nei vigneti. Nonostante 6 fungicidi siano stati applicati sul terreno, i risultati hanno mostrato come solo 3 (rame, zoxamide e dimetomorfo) sono stati lisciviati rispettivamente attraverso colonne di terreno sabbioso e argilloso, probabilmente a causa delle interazioni del suolo. L'uso di colture di copertura non è stato rilevante per la lisciviazione dei fungicidi in presenza di un evento piovoso e subito dopo l'applicazione del fungicida, ma ha ridotto la quantità di fungicidi percolati (rame e zoxamide) quando i fungicidi venivano applicati 24 h prima dell'evento della pioggia. Gli studi idroponici indicano che la vegetazione svolge un ruolo importante per quasi tutti i fungicidi studiati, aumentando i tassi cinetici del 51–67% e suggeriscono che l'aumento della biodiversità vegetale può migliorare l'attenuazione di alcuni fungicidi. Sono comunque necessari ulteriori studi per

scoprire l'impatto della copertura delle colture e della biodiversità sull'attenuazione dei fungicidi in condizioni agricole reali e su come vengano trasformati e dilavati nel suolo.

Nello scenario attuale, indicato dalla direttiva 2009/128/CE e il regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, che impongono agli agricoltori la riduzione delle applicazioni di fungicidi, a causa del loro impatto negativo sulla salute umana e sull'ambiente, lo sviluppo di strategie di gestione della malattia nuove e sostenibili è essenziale. Numerosi sono gli sforzi in corso con l'obiettivo di ottenere varietà resistenti, sfruttando strategie alternative ai classici strumenti biotecnologici, come gli OGM (organismi geneticamente modificati), che attualmente sono soggetti a una rigida regolamentazione. A tal fine, un nuovo approccio emergente, che consente di superare le procedure per una modifica stabile del genoma, è rappresentato dall'interferenza dell'RNA (RNAi) innescata dall'applicazione di molecole esogene di RNA a doppio filamento (dsRNA) (Marcianò et al., 2021). L'effetto del trattamento con dsRNA è stato recentemente studiato e proposto come nuovo strumento ecologico per la protezione delle colture da virus, funghi e insetti (Marcianò et al., 2021). La pianta è in grado di riconoscere i dsRNA introdotti nel citoplasma e produrre brevi molecole di RNA interferente (siRNA) che difendono la pianta dagli acidi nucleici esogeni. Uno studio condotto da Marcianò et al. (2021) ha valutato l'efficacia di un trattamento con dsRNA nel silenziare, attraverso RNAi, il gene S (VviLBDIf7) candidato responsabile della suscettibilità verso *Plasmopora viticola* in *Vitis vinifera*. A tale scopo, le foglie di Pinot nero sono state trattate con dsRNA e inoculate con il patogeno, per valutare l'espressione del gene S nei tessuti vegetali dopo il trattamento con dsRNA, la gravità della malattia e la produzione di sporangi. I risultati riportati grazie alla caratterizzazione fenotipica dei tratti quantitativi e qualitativi di *Plasmopora viticola* ha evidenziato l'efficacia del trattamento con una ridotta crescita del patogeno e tasso di sporulazione inferiore. Il controllo basato su RNAi ha diverse caratteristiche uniche che offrono ulteriori opportunità rispetto ai controversi pesticidi chimici. Le molecole attive del dsRNA possono essere progettate per indirizzare l'espressione di diversi geni senza la necessità di modificare la modalità d'azione dipendente dalla sequenza e, a seconda del gene mirato nel parassita, si possono ottenere effetti che vanno da sub letali a letali. Sebbene la selezione di bersagli RNAi efficaci possa essere un passo impegnativo un aumento della disponibilità di database del genoma per varie specie rende possibile progettare molecole di dsRNA selettive ed efficienti con effetti da zero a trascurabili in specie non bersaglio. Ciò presenta un vantaggio rispetto agli attuali pesticidi chimici con ampi spettri d'azione, che di solito interessano specie non bersaglio. Inoltre, il dsRNA è una molecola naturale che viene rapidamente degradata dalle nucleasi e dai raggi UV, in contrasto con alcuni pesticidi chimici

con maggiore persistenza nell'ambiente. Tuttavia, è necessaria un'ulteriore implementazione del metodo al fine di migliorare la consegna del dsRNA e ottenere un silenziamento più rapido del gene che potrebbe risultare compatibile con un uso sul campo, sebbene manchi ancora un'appropriata regolazione delle applicazioni di RNAi. Per un'efficace applicazione sul campo dei dsRNA come strumento di gestione della malattia, è necessario ottimizzare i seguenti aspetti: la concentrazione e la lunghezza delle molecole di dsRNA; la formulazione che dovrebbe prevenire la degradazione del dsRNA (l'incapsulamento potrebbe risolvere questo problema) e consentirne l'assorbimento nelle cellule; l'efficacia del riconoscimento del dsRNA da parte del percorso RNAi dell'organismo bersaglio. Nel complesso, il silenziamento mediato da RNAi apporta un significativo contributo alla gestione integrata dei parassiti, un approccio olistico che sfrutta tutti gli strumenti disponibili per la gestione efficace delle malattie (cioè varietà resistenti, pratiche agronomiche e controllo dei patogeni chimici e non chimici).

Un concetto generale e nuovo con un ampio spettro di applicazioni per cellule animali e vegetali, patogeni, nonché microrganismi è rappresentato dal trattamento fotodinamico (Ambrosini et al., 2020). Uno dei fattori chiave è rappresentato dalla molecola fotosensibilizzante (PS). Se irradiata con la luce essa produce specie reattive dell'ossigeno che sono tossiche per le cellule. Al contrario, la maggior parte dei PS presenta bassi livelli di citotossicità o genotossicità al buio. Inoltre, le applicazioni biologiche sono condotte al meglio con PS solubili in acqua che sono idealmente inclini a una rapida fotodegradazione, evitando così un accumulo di tossicità. I PS sono classificati in molti gruppi come porfirine, cloro, cumarine, furocumarine, ftalocianine e fenotiazine. Uno studio condotto da Ambrosini et al. (2020) ha analizzato la possibilità dell'utilizzo di porfirina anionica tetra-4-solfonatofenilporfirina tetra-ammonio (TPPS), una molecola che presenta quattro gruppi solfonati esterni legati da un anello tetrapirrolico, per controllare la botrite. Il TPPS oltre ad un basso livello di tossicità per le piante, rimane caricato negativamente in molti ambienti chimici anche a pH acido e non si aggrega in soluzione, permettendogli di permeare facilmente le cellule attraverso le pareti cellulari e le membrane. Pertanto, come primo e necessario passaggio, il TPPS è stato testato separatamente sui tre fondi di vite e su micelio di *Botrytis cinerea* con l'obiettivo di uccidere il patogeno della pianta senza influenzare la crescita e lo sviluppo delle piantine. Come seconda e ultima fase, le foglie staccate della vite infettate da micelio di botrite sono state testate con e senza pretrattamento con TPPS. I risultati hanno mostrato come TPPS sia stato in grado di uccidere l'agente patogeno *Botrytis cinerea* senza danneggiare le foglie della vite in vitro. Inoltre, questa molecola non produce alcun cambiamento biochimico né fenotipico sulle piantine coltivate. Questi esperimenti preliminari effettuati sono risultati molto interessanti

e in futuro potrebbero essere condotti in serra e in campo per determinare il reale potenziale ed efficacia del TPPS contro i patogeni delle piante. Tali risultati e scoperte risultano molto incoraggianti in quanto il trattamento fotodinamico è stato sviluppato utilizzando una bassa concentrazione di PS.

### 3.4. Obbiettivi della tesi

Il seguente elaborato si propone di descrivere le caratteristiche e le proprietà che contraddistinguono l'ozono e i suoi possibili utilizzi nel settore agricolo. Uno studio più completo e approfondito è stato eseguito con l'obiettivo di analizzare il funzionamento e l'efficacia di disinfezione dell'ozono all'interno di un'irroratrice. La peronospora è una delle più gravi malattie devastanti per la vite (Ortega et al., 2022) e sebbene esistano vari prodotti fitosanitari in grado di risolvere questo problema, la viticoltura ha tradizionalmente utilizzato i prodotti a base di rame come fungicida, che risulta essere il metodo maggiormente efficace per il suo controllo, ed è diventato un prodotto indispensabile per un gran numero di viticoltori in tutto il mondo. La dipendenza da questo prodotto risulta essere ancora maggiore nell'ambito dell'agricoltura biologica poiché non esistono alternative sintetiche accettate da utilizzare e i pesticidi a base di rame sono indispensabili per la coltivazione biologica della vite. Pertanto, l'uso continuato di questo tipo di prodotto in viticoltura ha innescato l'accumulo di questo metallo in diversi suoli di vigneti in Europa e nel mondo. Sebbene il rame sia fissato dal contenuto di materia organica e argillosa nel suolo, Sonoda et al. (2019) hanno osservato la mobilità del rame dovuta alla degradazione della materia organica, suggerendo una possibile contaminazione delle acque sotterranee. L'elevata ecotossicità potenziale del rame nelle acque dolci e il suo accumulo nei suoli europei hanno sollevato preoccupazioni nell'Unione Europea, portando a un restringimento della legislazione sull'uso dei prodotti a base di rame, limitandone l'utilizzo a 28 kg/ha di prodotto per sette anni (Regolamento di esecuzione della Commissione UE 2018/1981). Da tale contesto nasce la necessità di coniugare le proprietà antimicrobiche e inattivanti dell'ozono verso i funghi e la possibilità di riduzione del rame in viticoltura. Lo studio condotto e descritto nel presente elaborato ha esaminato in modo dettagliato il comportamento dell'acqua ozonizzata all'interno e all'esterno di un'irroratrice per valutarne un potenziale utilizzo, in alcune fasi di crescita della vite, come trattamento sostitutivo al fungicida rameico.



## 4. PROPRIETÀ E UTILIZZI DELL'OZONO IN AGRICOLTURA

### 4.1. Caratteristiche generali dell'ozono

L'ozono è una molecola inorganica triatomica di ossigeno. Fu scoperto per la prima volta da Christian Friedrich Schonbein, professore dell'Università di Basilea, (1799–1868) nel 1840. Notò, infatti, che l'elettrolisi dell'acqua creava un gas odoroso con un odore pungente. Schonbein diede al gas un nome di origine greca “ozein”, ozono, che significa “atto di annusare”(Joseph et al., 2021). Si presenta altamente instabile con un'emivita molto breve in media di circa 22 minuti (Shezi et al., 2020). Tramite il rilascio di un singolo atomo di ossigeno mostra una grande tendenza a tornare al suo stato più stabile, l'ossigeno biatomico. A causa della sua rapida decomposizione in ossigeno, l'ozono non può essere accumulato e deve essere continuamente generato in situ. Tuttavia, tale processo, definito dai chimici potere ossidante, è ciò che lo rende molto attraente per molteplici usi e settori. Attraverso la sua applicazione è in grado di scomporre i composti macromolecolari costituenti l'integrità di batteri, protozoi, virus e funghi. Inoltre è sufficientemente solubile e stabile in modo che le proprietà di ossidazione e/o disinfezione possano essere sfruttate appieno. Lo svantaggio principale è rappresentato dall'elevato costo di capitale rispetto ad altre tecniche di ossidazione/disinfezione dovuto al fatto che l'ozono deve essere generato in loco. Inoltre è bene tenere in considerazione che l'ozono poiché rappresenta il più potente agente ossidante disponibile, è anche potenzialmente il più pericoloso degli ossidanti. Fin dalle prime fasi della ricerca sull'ozono si è riscontrata la necessità di sviluppare tecniche in grado di assicurare l'assenza di incidenti.

L'ozono è utilizzabile sia in stato gassoso che in quello acquoso, tuttavia, in relazione ad alcuni fattori l'efficacia di ciascuna forma può variare sensibilmente. (Shezi et al., 2020). I parametri che vanno presi in considerazione dipendono dal tipo di prodotto trattato, dallo stadio di sviluppo (età), dalla durata e dal metodo di trattamento (continuo o intermittente), dalla temperatura di conservazione e umidità relativa del prodotto stesso. Delle due forme di ozono esistenti quella allo stato gassoso è la forma più efficace da impiegare per trattamenti post-raccolta di frutta e verdura (Suslow, 1998) e in quanto puro non deve essere miscelato con alcun composto mantenendo una maggiore reattività e un'emivita più lunga. Sebbene anche l'ozono acquoso sia efficace, tuttavia presenta una serie di fattori che ne influenzano la purezza e si traduce in un'emivita più breve. Ad esempio, la qualità dell'acqua è un determinante importante dell'efficacia dell'ozono acquoso. Se si utilizza acqua ricca di sostanze organiche e inorganiche disciolte e sospese esse reagendo rapidamente con l'ozono ne riducono l'efficacia e l'azione antimicrobica (Shezi et al., 2020). Oltre a ciò, l'efficacia del gas allo stato acquoso è influenzata

anche dalla temperatura e dal pH dell'acqua, nonché dall'umidità relativa atmosferica durante lo stoccaggio; mentre l'efficacia dell'ozono gassoso è influenzata solo dalla quantità di gas generata all'interno dell'ambiente di stoccaggio e dalla velocità con cui viene ridotto ad ossigeno. L'elevata reattività dell'ozono lo rende in grado di reagire con qualsiasi altro elemento esso venga a contatto degradandolo. L'ozono inibisce la crescita dei funghi prevenendo la germinazione e la sporulazione di varie specie fungine (Shezi et al., 2020). Zhao et al., 2013 hanno rilevato che l'ozono gassoso promuove la biosintesi di antiossidanti come composti fenolici e flavonoidi. In aggiunta a ciò, l'esposizione all'ozono gassoso presenta un'ulteriore vantaggio di promuovere la biosintesi di più antiossidanti, rallentando i processi metabolici associati al deterioramento della qualità dei prodotti. L'inattivazione dei batteri da parte dell'ozono è un processo complesso perché esso attacca numerosi costituenti cellulari tra cui proteine, lipidi insaturi ed enzimi respiratori nelle membrane cellulari, peptidoglicani negli involucri cellulari, enzimi e acidi nucleici nel citoplasma e proteine e peptidoglicani negli strati di spore e capsidi virali. L'ozono può ossidare vari componenti dell'involucro cellulare inclusi acidi grassi polinsaturi, enzimi legati alla membrana, glicoproteine e glicolipidi portando alla fuoriuscita del contenuto cellulare e alla fine causando lisi (Khadre et al., 2001). Quando i doppi legami dei lipidi insaturi e dei gruppi enzimatici sulfidrilici vengono ossidati dall'ozono, ne consegue l'interruzione della normale attività cellulare inclusa la permeabilità e la morte rapida.

L'ozono può essere prodotto da ossigeno puro o aria contenente ossigeno attraverso metodi diversi come la scarica elettrica, metodi fotochimici (UV), radiochimici, chimici ed elettrolitici (Joseph et al., 2021). L'approccio più affidabile per la generazione di ozono sia in laboratorio che su scala industriale è rappresentato dal metodo basato sulla creazione di scariche elettriche grazie alla praticità alla versatilità e all'efficienza operativa anche in relazione a diverse esigenze di concentrazione di ozono (Wei et al., 2017). In quest'ultimo metodo, un'aria secca, priva di inquinanti o un gas contenente ossigeno viene fatta passare attraverso lo spazio di un campo elettrico ad alta energia (corona) tra due elettrodi separati da un materiale dielettrico. Una configurazione di generatore di ozono con tale metodologia fu proposta per la prima volta da Siemens nel 1857.

È consolidato che le reazioni elettrochimiche in soluzione acquosa siano in grado di produrre ozono con numerosi vantaggi come il funzionamento a bassa tensione, la semplice progettazione del sistema, e, in particolare, una ridotta perdita di ozono per decomposizione termica durante la manipolazione (Wei et al., 2017). Principalmente, l'ozono può essere generato dall'elettrolisi dell'acqua impiegando materiali anodici con un alto potenziale di evoluzione dell'ossigeno (ad esempio grafite, carbonio vetroso e leghe di piombo).

I processi di ozonizzazione dipendono dal pH e possono reagire con le sostanze bersaglio attraverso meccanismi diretti e indiretti. La via diretta coinvolge l'ozono molecolare mentre le vie indirette coinvolgono i radicali idrossilici (-OH) oltre ad ulteriori specie radicaliche. L'ossidazione delle sostanze bersaglio da parte dell'ozono molecolare avviene a pH acido mentre le vie indirette avvengono a pH alcalino. Il carattere elettrofilo dell'ozono gli consente di reagire in modo efficiente con gruppi funzionali insaturi, ammine, solfuri e altri composti riducenti. Le proprietà nucleofile di un atomo di ossigeno dell'ozono lo rendono reattivo con carbonile, legame carbonio-azoto contenente sostanze e acidi forti. Le reazioni di ozono molecolare con substrati possono essere classificati in 4 categorie: reazioni di ossido-riduzione, reazioni di ciclo addizione dipolare, reazioni di sostituzione elettrofila e addizione nucleofila. Il meccanismo di reazione indiretta dell'ozonizzazione è rilevante per il trattamento delle acque reflue. L'ozono a pH maggiore di 7 inizia a decomporsi nell'acqua per formare principalmente radicale idrossile (-OH) e altri radicali reattivi come idroperossido (-HO<sub>2</sub>), idrossile (-OH) e superossido (-O<sub>2</sub><sup>-</sup>) a pH alcalino. Il radicale idrossile che ha un elettrone spaiato è altamente instabile e reagisce immediatamente con gli altri composti per ottenere l'elettrone mancante.

## 4.2. Proprietà fisico-chimiche dell'ozono

### 4.2.1. Solubilità dell'ozono in acqua

La dissoluzione di gas parzialmente solubili in acqua, come nel caso dell'ozono, seguono la legge di Henry che afferma che la quantità di gas in soluzione, a una data temperatura, è linearmente proporzionale alla pressione parziale del gas. In termini più pratici la dissoluzione dell'ozono in acqua può anche essere espressa secondo il rapporto di solubilità (Sr) che si calcola come rapporto tra ozono disciolto in acqua (mg/L) e l'ozono in fase gassosa (mg/L). Il rapporto di solubilità aumenta al diminuire della temperatura dell'acqua (Khadre et al., 2001). Inoltre, quando una soluzione viene preparata facendo gorgogliare ozono in acqua, dimensioni delle bolle più piccole determinano una maggiore superficie di contatto che aumenta la solubilità. Khadre et al. (2001) hanno stimato la dissoluzione ottimale dell'ozono nell'acqua con un diametro delle bolle compreso tra 1 e 3 mm. Un'appropriata miscelazione o turbolenza aumenta il contatto con le bolle e la solubilizzazione in acqua (Khadre et al., 2001). La portata dell'ozono e il tempo di contatto influiscono sul trasferimento del gas all'acqua mentre purezza e pH dell'acqua sono correlati alla velocità di solubilizzazione. La presenza di minerali nell'acqua, infatti, catalizzando la decomposizione dell'ozono ne diminuisce la solubilità.

#### 4.2.2. Stabilità dell'ozono

L'ozono è relativamente instabile in soluzioni acquose decomponendosi continuamente e lentamente in ossigeno (Khadre et al., 2001). L'emivita dell'ozono in acqua distillata a 20 °C è generalmente considerata da 20 a 30 min. Il pH influisce notevolmente sulla stabilità dell'ozono nelle soluzioni acquose. Kim J-G. (1998) ha definito la stabilità dell'ozono in soluzione massima quando il pH era 5,0. La stabilità diminuisce all'aumentare del pH fino ad un valore soglia di pH pari a 9,0 ove non è più rilevabile ozono. Inoltre, in soluzioni acquose la stabilità è strettamente dipendente dalle caratteristiche della fonte d'acqua. La presenza di bicarbonato, carbonato, alcoli terziari e gruppi alchilici fungono da inibitori riducendo in modo sensibile la stabilità stessa. Un esempio è legato alla fonte idrica spesso utilizzata nella lavorazione degli alimenti contenente solitamente sostanze organiche e inorganiche facilmente ossidabili che reagiscono rapidamente con l'ozono diminuendone notevolmente l'emivita. Kim J-G., 1998 ha fatto gorgogliare ozono in acqua distillata, deionizzata e di rubinetto da due diverse fonti e in un tampone fosfato (0,5 M, pH 7). Il tasso di decomposizione dell'ozono è stato monitorato durante la conservazione a 25 °C per 8 minuti. La concentrazione di ozono è diminuita durante lo stoccaggio, ma i tassi di diminuzione sono stati maggiori nell'acqua tampone e nell'acqua del rubinetto rispetto all'acqua distillata e deionizzata. Questi dati indicano che l'ozono si degrada più velocemente nell'acqua tampone e nel rubinetto rispetto all'acqua più pura. È evidente che un pH elevato e la presenza di materiali che richiedono ozono ne favoriscano la decomposizione.

#### 4.2.3. Reattività dell'ozono

La molecola di ozono funge da dipolo con proprietà elettrofile e nucleofile. I composti organici e inorganici in soluzioni acquose reagiscono con l'ozono in uno dei due percorsi (Khadre et al., 2001): (a) Reazione diretta del composto organico con l'ozono molecolare; (b) Decomposizione dell'ozono in acqua in un radicale (per esempio, OH) che reagisce con il composto organico. Le reazioni dell'ozono molecolare sono selettive e limitate ai composti aromatici e alifatici insaturi ossidandoli. L'ossidazione dei gruppi sulfidrilici, che sono abbondanti negli enzimi microbici, può spiegare la rapida inattivazione di microrganismi e spore batteriche da parte dell'ozono che reagisce lentamente con i polisaccaridi, portando alla rottura dei legami glicosidici e alla formazione di acidi alifatici e aldeidi. La reazione con alcoli alifatici primari e secondari può portare alla formazione di idrossi-idroperossidi, precursori dei radicali idrossilici, che a loro volta reagiscono fortemente con gli idrocarburi (Khadre et al., 2001). Rey et al., 2008 hanno dimostrato che la N-acetil-glucosamina, un composto presente nel peptidoglicano delle pareti cellulari batteriche e nei capsidi virali, era resistente all'azione dell'ozono in soluzione acquosa a pH da 3 a 7. La glucosamina ha reagito in modo relativamente veloce con l'ozono, ma il glucosio

era relativamente resistente alla degradazione. Questa osservazione può spiegare, almeno in parte, la maggiore resistenza dei batteri gram-positivi rispetto a quelli gram-negativi; il primo contiene maggiori quantità di peptidoglicano nelle loro pareti cellulari. L'azione dell'ozono sugli aminoacidi e sui peptidi è significativa soprattutto a pH neutro e basico. L'ozono attacca l'atomo di azoto o il gruppo R o entrambi e reagisce lentamente con gli acidi grassi saturi. Gli acidi grassi insaturi si ossidano facilmente con l'ozono e si formano prodotti di addizione del ciclo. Il gas reagisce rapidamente con le basi azotate, in particolare la timina, la guanina e l'uracile; mentre con i nucleotidi rilascia gli ioni carboidrati e fosfato (Khadre et al., 2001).

#### 4.2.4. Fattori che alterano la reattività e l'efficacia

- Temperatura: il tasso di distruzione dei microrganismi da parte di un disinfettante generalmente aumenta con l'innalzarsi della temperatura. Secondo la teoria di van't Hoff-Arrhenius (Khadre et al., 2001), la temperatura determina in parte la velocità con cui il disinfettante si diffonde attraverso le superfici dei microrganismi e in parte quella di reazione con il substrato. Nel caso dell'ozono, invece, all'aumentare della temperatura esso diventa meno solubile e meno stabile, ma la velocità di reazione con il substrato aumenta. Achen & Yousef, 2001 hanno trattato mele contaminate da *Escherichia coli* con ozono a 4, 22 e 45 °C e hanno osservato che la conta del batterio sulla superficie è diminuita rispettivamente di 3,3, 3,7 e 3,4 unità  $\log_{10}$ . L'analisi statistica non ha mostrato differenze significative tra i tre trattamenti. La concentrazione di ozono residuo era massima alla temperatura più bassa (4 °C) e diminuiva all'aumentare della temperatura. Quando la temperatura di trattamento è aumentata, l'aumento della reattività dell'ozono ha compensato la diminuzione della sua stabilità, e quindi non è stato osservato alcun cambiamento apprezzabile nell'efficacia. Al contrario, J-G Kim (1998) ha osservato che l'ozono riduce più contaminanti microbici quando veniva applicato a temperature superiori alle temperature di refrigerazione.
- Valore del pH: a concentrazioni residue costanti di ozono, il grado di inattivazione microbica è rimasto praticamente invariato per pH compresi tra 5,7 e 10,1 (Khadre et al., 2001). L'ozono è più stabile a valori di pH bassi che ad alti, come indicato in precedenza. L'inattivazione dei microrganismi avviene principalmente attraverso la reazione con l'ozono molecolare quando il pH è basso. L'ozono si decompone ad alti valori di pH e i radicali risultanti contribuiscono alla sua efficacia. L'importanza relativa di questi due meccanismi di inattivazione può variare con il microrganismo e le condizioni di trattamento (ad esempio, presenza di contaminanti che richiedono ozono).

- Composti che degradano l'ozono: la presenza di sostanze organiche aumenta la resistenza dei microrganismi all'ozono. Khadre et al. (2001) hanno evidenziato una maggiore resistenza all'ozono di virus e batteri associati a cellule, detriti cellulari o feci rispetto a virus purificati che vengono prontamente inattivati con il disinfettante. Risultati simili sono stati trovati nel caso del rotavirus in sospensione rispetto al virus adsorbito per 1 ora ai monostrati cellulari (Khadre et al., 2001). Pertanto, la presenza di materia organica nell'acqua destinata all'uso nella lavorazione degli alimenti associata all'ozono è altamente indesiderabile. Inoltre, i sottoprodotti indesiderati dell'azione dell'ozono sui composti organici possono ridurre la durata di conservazione, modificare la qualità organolettica o compromettere la sicurezza del prodotto finale.

#### 4.3. Usi dell'ozono in agricoltura

Il settore agricolo utilizza numerosi prodotti chimici nella produzione e coltivazione di piante, e molto spesso i residui rilasciati nel terreno, con conseguente passaggio nel ciclo dell'acqua e all'interno delle colture stesse, conducono ad effetti negativi sia sulle persone che sull'ambiente circostante. In tale contesto si è da poco insidiata un'alternativa all'approccio tradizionale quale l'ozono. Utilizzato nell'industria agricola e in diversi processi tecnologici, si è già dimostrato molto efficace per il suo potere disinfettante, per le sue proprietà biocide e per la capacità di indurre nelle piante l'attivazione di processi biochimici associati alla risposta di resistenza ai microrganismi fitopatogeni. L'utilizzo dell'ozono in agricoltura migliora il ciclo di vita delle piante, in modo sostenibile, determinando incrementi della fotosintesi della clorofilla, ripresa vegetativa, maggiore resistenza delle piante stesse ed una produzione qualitativamente e quantitativamente superiore. L'ozono, infatti, può essere efficacemente utilizzato sia su terreno coltivato che fuori suolo, nei sistemi di raccolta dell'acqua piovana agricola, nelle filiere di produzione di semi e piantine, nel settore floricolo e nello stoccaggio post-raccolta per migliorare la qualità dei prodotti. Grazie al suo potere disinfettante viene utilizzato per contrastare ed eliminare i parassiti, come nel caso dei nematodi (Nicol et al., 2011). Essi provocano la rottura e la proliferazione cellulare senza controllo, creando, ai nodi delle radici, malformazioni che contrastano con il flusso fisiologico dell'acqua e, quindi, dei minerali e dei nutrienti, aumentando così la sensibilità delle piante alle malattie. Tale deterioramento del sistema nutritivo della pianta è spesso esteriorizzato da una crescita scremata e foglie gialle, insieme a una scarsa abbondanza di frutti. L'applicazione attraverso l'irrigazione diretta del terreno con acqua ozonizzata o mediante fumigazione a gas permette di ridurre l'incidenza del danno oltre ad apportare benefici all'ambiente circostante a seguito dell'eliminazione dei residui

presenti in natura e risparmi economici, poiché la sua materia prima è l'ossigeno. Un caso d'uso specifico, in agricoltura, che dimostra la validità e l'efficacia dell'ozono rispetto ai pesticidi è la coltivazione delle fragole, un frutto molto sensibile a molteplici malattie fungine e parassiti, che comportano un uso significativo di pesticidi, fungicidi e insetticidi. L'uso eccessivo di tali prodotti, pur essendo utilizzati per eliminare i parassiti sulle piante, potrebbe potenzialmente causare danni all'ambiente oltre che all'uomo e agli animali, a causa degli elevati residui rilasciati. Questo crea la necessità di ridurre l'uso e la sostituzione di tali prodotti con acqua ozonizzata si è rivelata una soluzione molto efficace, poiché l'ozono, a differenza della maggior parte prodotti chimici utilizzati non lascia residui. In aggiunta, l'ozono usato come sostituto dei prodotti chimici/farmaceutici, aumenta la quantità di ossigeno nel suolo e nell'acqua, fornendo le giuste condizioni per un terreno fertile e una migliore crescita delle piante. L'ozono è adatto anche per la sanificazione di prodotti agricoli, macchinari, materiale commestibile, superfici di contatto (Khadre et al., 2001). Può essere utilizzato anche per migliorare e riciclare l'acqua nei processi di lavaggio e lavorazione dei prodotti ortofrutticoli, riducendo così in modo significativo il consumo complessivo di acqua e allo stesso tempo consentendo il trasferimento delle risorse idriche ad usi più appropriati. È il caso di Taste Apple, uno dei maggiori produttori di mele caramellate negli Stati Uniti, che, per migliorare la qualità delle mele per i propri consumatori, ha deciso di utilizzare acqua ozonizzata al posto dell'acqua clorurata, ottenendo così un risparmio d'acqua superiore ai 45.000 l/settimana e una notevole riduzione degli agenti batterici della stessa (Sopher et al., 2002).

#### 4.3.1. L'utilizzo dell'ozono nella zootecnia e nella piscicoltura

Anche il settore zootecnico beneficia dell'uso dell'ozono in particolare funge da aiuto efficace nell'allevamento di bovini da latte e da carne, ovini, suini e conigli. Come già evidenziato, l'ozono può, con dosaggi appropriati, distruggere anche i batteri più resistenti, provocandone la morte per lisi ossidativa della membrana plasmatica entro 4,5 min e, analogamente, lo stesso principio può essere applicato nelle cellule, dove i virus, non riuscendo a replicarsi, sono inattivati. L'ozono diviene quindi un'opportunità e può essere utilizzato per abbassare la carica microbica, disciolto in acqua (0,2–0,5 mg per litro) o dispensato nell'ambiente a una concentrazione di 0,1/0,2 ppm (Valdenassi et al., 2016). L'uso dell'acqua ozonizzata nella zootecnia ha una serie di vantaggi che si traducono in un miglioramento delle condizioni generali di salute dell'animale. L'acqua non trattata potrebbe contenere una percentuale di batteri, virus, pesticidi e altre sostanze altamente nocive.

L'ozono può essere utilizzato anche nella piscicoltura (Powell & Scolding, 2018), sia in ingresso che in ricircolo negli allevamenti, ottenendo un netto miglioramento della qualità dell'acqua stessa per mezzo di: riduzione del carico di batteri, virus, protozoi e funghi patogeni per i pesci; eliminazione delle sostanze colloidali sospese nell'acqua e rimozione delle sostanze organiche disciolte; rimozione di ammoniaca e nitriti che possono essere tossici per i pesci. Un utilizzo efficace riguarda le fasi industriali di lavaggio e lavorazione del pesce nei passaggi che seguono la loro raccolta, ma precedono le fasi finali del confezionamento pre-commerciale e nelle fasi di lavaggio e toelettatura esterna prima della loro definitiva immissione nel circuito commerciale. In questa fase l'acqua ozonizzata può essere utilizzata sia per ridurre gli odori che per disinfettare il pesce, aumentandone la shelf-life di diversi giorni, riducendo la formazione di ammoniaca derivante dai processi di putrefazione ed evitando il rilascio di residui come il cloro nelle fasi di depurazione dei prodotti ittici filtrati (es. cozze, vongole veraci, telline, ecc.).

L'ozono può essere impiegato anche nel settore veterinario, grazie alle sue proprietà cicatrizzanti, antinfiammatorie e antisettiche. È utilizzato nella prevenzione e nel trattamento delle mastiti (Duričić et al., 2015), nella prevenzione della diffusione di epidemie da parassiti negli allevamenti, nella depurazione di magazzini per mangimi, nella disinfezione delle apparecchiature ambientali e nella decontaminazione microbiologica (Remondino & Valdenassi, 2018).

#### 4.3.2. L'utilizzo per sanificazione delle apparecchiature

L'ozono viene attualmente impiegato quale disinfettante potente e sicuro per controllare la crescita biologica di organismi indesiderati nei prodotti e nelle apparecchiature in uso nelle industrie alimentari e delle bevande. In soluzione liquida, l'ozono può essere utilizzato per disinfettare apparecchiature, acqua di processo, e alcuni prodotti alimentari. In forma gassosa, l'ozono è invece impiegato per la disinfezione di materiale di imballaggio alimentare. Un primo utilizzo come disinfettante per apparecchiature nacque nell'ottobre 1999 ad opera di Plumrose, un'azienda americana situata a Booneville nel Mississippi. L'obiettivo principale dell'azienda verteva sul desiderio di assicurare il massimo livello di protezione da potenziali agenti patogeni e microbi deterioranti, riducendo al minimo la necessità di conservare e maneggiare detergenti e disinfettanti chimici pericolosi. Plumrose decise di installare un sistema di ozono all'avanguardia per fornire acqua ozonizzata su richiesta per diverse operazioni di sanificazione nell'impianto di lavorazione. Il sistema fornì il massimo livello di sanificazione e consentì all'azienda di evitare l'uso e la manipolazione di sostanze chimiche pericolose. Grazie alla progettazione di tale



sistema di sanificazione a base di ozono comportò all'azienda un ambiente di lavoro più sicuro, un'ottima sanificazione e costi operativi ridotti.

L'ozono può essere utilizzato anche per trattare l'acqua di irrigazione, poiché il suo effetto disinfettante è ottimo alleato nella lotta contro parassiti e insetti nocivi, contro le infezioni batteriche e fungine nelle colture orticole all'aperto o nelle serre per uso alimentare umano e animale, con il vantaggio di essere privo di interventi a mezzo di prodotti chimici, farmaceutici o sintetici quali acqua ossigenata, derivati del cloro, dell'ammonio, acido peracetico, fungicidi e molti altri. L'effetto benefico dell'ozono nell'acqua di irrigazione si estende anche alla qualità delle colture stesse: i prodotti vegetali, stimolati nei canali linfatici aumentano il processo di fotosintesi che porta ad un valore estetico e dimensionale maggiore e ad una resa migliore. Inoltre, l'assenza di residui permette al suolo, alle falde acquifere e ai canali di irrigazione di ricevere acqua pura eliminando il rischio di inquinamento.

#### 4.3.3. L'utilizzo come fumigante del suolo

Per raccogliere la sfida di sviluppare alternative sicure per l'ambiente nei trattamenti di fumigazione del suolo Sopher et al. (2002) hanno condotto dieci prove sul campo utilizzando l'iniezione di gas ozono generato in loco sul suolo. I risultati ottenuti hanno dimostrato un'ampia efficacia del trattamento in grado di aumentare la resa delle piante e ridurre gli effetti dannosi dei patogeni su una varietà di colture e terreni in presenza di specifiche condizioni climatiche. Quando l'applicazione di preimpianto di ozono è stata confrontata con i controlli non trattati, sono stati osservati miglioramenti nella resa delle colture e nel vigore della piante. I risultati ottenuti dimostrano che il trattamento del suolo con ozono presenta una diminuzione della pressione dei patogeni del suolo dovuta agli effetti biocidi e una maggiore disponibilità di nutrienti dovuta all'ossidazione dei composti organici. Tuttavia è necessario un lavoro aggiuntivo per ipotizzare con maggiore precisione la risposta di crescita specifica raggiunta dall'ozonizzazione in diverse colture, suoli e condizioni climatiche.

#### 4.3.4. L'utilizzo come agente di conservazione di frutta e verdura nel post-raccolta

La riduzione delle perdite post-raccolta e il mantenimento della qualità dei prodotti freschi sono gli aspetti chiave dell'attuale sistema alimentare (Opara, 2013). L'elevata frequenza di perdite post-raccolta e sprechi alimentari ha causato un grave problema di insicurezza alimentare in tutto il mondo. Circa il 20-50% dei prodotti freschi raccolti non raggiunge il consumatore a causa delle perdite post-raccolta (Aulakh et al., 2013). Recenti studi hanno evidenziato la possibilità dell'utilizzo di ozono come soluzione in grado di ridurre il divario tra la fase di raccolta e di consumo finale del frutto (Shezi et al., 2020). Gli studi infatti rivelano che la

modalità d'azione dell'ozono è associata all'induzione dello stress ossidativo, che si traduce in maggiore sintesi di antiossidanti ossia molecole che svolgono un ruolo importante come meccanismo di difesa per frutta e verdura reagendo con i ROS. È stata segnalata inoltre l'influenza del trattamento con ozono anche sui composti fenolici dei prodotti freschi. Uno studio di Morais et al. (2015) ha rivelato che la fragola cv. "Oso Grande" trattata con ozono (1 g/h per 20 minuti e conservata a 4 ° C per periodi di 5, 10 e 15 giorni) ha prodotto composti fenolici più elevati rispetto al controllo non trattato (Shezi et al., 2020). Botondi et al., 2015 hanno infine rilevato che il trattamento con ozono (1,5 g/h per 18 ore) ha ridotto significativamente i livelli di contenuto di antociani nelle uve da vino trattate. Il trattamento con ozono (0–7,8 % p/v, per 0–10 min) ha sostenuto livelli più elevati di antocianina e ha ritardato significativamente il tasso di cambiamento di colore anche nel succo di frutta di mora (Shezi et al., 2020). La capacità dell'ozono di trattenere un contenuto più elevato di antociani è stata associata alla sovraregolazione del sistema di difesa antiossidante, che è stata probabilmente indotta dall'applicazione del trattamento.

Diversi studi hanno riportato l'efficacia dell'ozono nel mantenimento della qualità e nell'estensione della durata di conservazione di frutta e verdura. Minas et al., 2014 hanno riportato che il trattamento post-raccolta dei kiwi con ozono (0,5 µL/L) ha comportato un significativo ritardo nella maturazione dei frutti, il mantenimento della qualità e l'estensione della durata di conservazione a 20 °C. Ciò è stato attribuito alla capacità dell'ozono di diminuire la biosintesi dell'etilene inibendo la 1-aminociclopropene-1-carbossilato sintasi (ACS) e la ammino-ciclopropan-carbossilato ossidasi (ACO), che sono i principali enzimi che catalizzano la formazione dei precursori dell'etilene. I risultati di Minas et al. (2014) sull'effetto dell'ozono nel ridurre la biosintesi dell'etilene suggeriscono che esso inibisce l'attività del enzimi chiave che codificano la biosintesi dell'etilene come ACS e ACO. Ciò si traduce nella soppressione delle attività di entrambi gli enzimi e di rimando nella riduzione della produzione di etilene. Il trattamento con ozono ha soppresso un accumulo dell'enzima ACS e ne ha comportato la diminuzione durante la maturazione dei frutti. Inoltre, il trattamento con ozono ha ridotto il tasso di accumulo di ACO e lo ha mantenuto significativamente inferiore rispetto al frutto di controllo (non trattato). I risultati hanno suggerito che entrambi questi enzimi avrebbero potuto essere presi di mira dal trattamento con ozono reagendo direttamente o indirettamente con ciascuno di essi e riducendo le loro concentrazioni, nonché la risposta alla maturazione dei frutti. L'effetto dell'ozono come trattamento post-raccolta è quindi attribuibile alla sua capacità di ridurre il tasso di biosintesi dell'etilene inibendo le attività degli enzimi coinvolti nella formazione dei suoi precursori. Yaseen et al. (2015) hanno inoltre riferito che la conservazione delle mele ("Royal

Gala", "Golden Delicious" e "Fuji") a  $\pm 1$  °C con ozono gassoso (0,5  $\mu\text{L/L}$ ) ha portato a una qualità post-raccolta superiore dopo due mesi (60 giorni) di conservazione. Ciò è stato attribuito alla capacità dell'ozono di ridurre la popolazione fungina e la produzione di patulina, micotossina prodotta dai funghi *Aspergillus* e *Penicillium*.

#### 4.3.5. L'utilizzo per la degradazione di pesticidi in frutta e verdura

L'ozono assume potenzialmente una soluzione di notevole interesse per la rimozione dei pesticidi e per proteggere i consumatori dagli effetti negativi dei residui degli stessi sulla superficie degli alimenti. Il Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti unitamente ad altre agenzie di regolamentazione non hanno imposto restrizioni sull'uso dell'ozono come agente igienizzante, rendendolo di fatto un integrativo molto promettente nel settore alimentare. L'elevata natura ossidativa dell'ozono o dei radicali generati durante il processo di ozonizzazione provocano la degradazione molecolare dei residui di pesticidi. Recenti studi hanno suggerito che l'ozono ha un'eccezionale capacità di migliorare la sicurezza e la qualità degli alimenti attirando così gli interessi dell'industria alimentare. Nel complesso, l'ozono è riconosciuto come una tecnologia verde per l'industria alimentare perché la sua applicazione non provoca tracce tossiche sugli alimenti. Hwang et al. (2001) hanno documentato che una concentrazione di ozono di 1–10 mg/kg ha comportato una riduzione del 56–97% di mancozeb sulla superficie della mela trattata. Nel 2018, Karaca ha dimostrato la rimozione di sei pesticidi dall'uva esponendo i frutti in aria arricchita di ozono (0,64 mg m<sup>-3</sup>).

A causa della difficoltà pratica nell'applicazione dell'acqua ozonizzata nelle grandi strutture di stoccaggio, l'ozono gassoso diventa un'utile alternativa per il trattamento a lungo termine. Gli acini d'uva spruzzati con una miscela di soluzioni di iprodione, fenhexamid, pirimetanil, boscalid e ciprodinil sono stati sottoposti a 0,3  $\mu\text{L/L}$  di trattamento con aria arricchita con ozono, durante la conservazione in cella frigorifera (Pandiselvam et al., 2020). La conservazione nell'atmosfera ricca di ozono accelera i tassi di declino di ciprodinil, pirimetanil e fenexamid ma non di iprodione o boscalid, rispetto alla conservazione in atmosfera non controllata. Dopo 36 giorni di conservazione, la degradazione di pirimetanil, ciprodinil e fenexamide era rispettivamente di 3,6, 2,8 e 1,6 volte superiore nell'atmosfera di ozono rispetto al controllo in atmosfera non controllata. L'effetto della fumigazione dell'ozono sui residui di pyraclostrobin, pyrimethanil, cyprodinil e fenhexamid ha mostrato una riduzione significativa dei livelli di residui di pesticidi di circa il 100,0%, 83,7%, 75,4% e 68,5%, rispettivamente, dopo la fumigazione con 10000  $\mu\text{L/L}$  di ozono per 1 ora. Pertanto, la fase gassosa dell'ozono è da considerarsi un'alternativa affidabile al fine della rimozione dei residui di pesticidi. A tal riguardo è importante introdurre un'accurata

attenzione al fine di non causare stress post-raccolta alle merci. Va tenuto in considerazione che tale metodo è adatto solo per pochi prodotti selezionati poiché l'efficienza dell'ozono gassoso migliora nel lungo periodo di trattamento. Dai dati raccolti si evince che la rimozione dei pesticidi dipende principalmente dalla concentrazione di ozono, dalla temperatura e dal tempo di trattamento. L'ottimizzazione di questi parametri può rendere il trattamento con ozono più efficiente ed economico.

#### 4.3.6. L'utilizzo per il controllo dei funghi e per il miglioramento delle caratteristiche qualitative di grano e farina

Affinché nelle fasi di post-raccolta resti invariata la produzione, la qualità dei grani e dei cereali acquistati in campo, vanno presi in considerazione molteplici fattori (da biotici ad abiotici), come la temperatura, la velocità dell'aria di essiccazione, l'umidità dell'aria, la contaminazione, il degrado e le condizioni di conservazione. Condizioni inadeguate possono invece favorire la contaminazione fungina e il conseguente sviluppo di micotossine. Le specie fungine *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *Fusarium graminearum* sono i principali produttori di micotossine, altamente tossiche per la salute umana e animale, spesso presenti ad alti livelli nel grano e nei derivati (Granella et al., 2018). Il consolidamento di un metodo altamente efficace per ridurre la contaminazione da funghi è tutt'altro che definitivo. Per quanto riguarda l'applicazione dei valori guida per cereali e prodotti a base di cereali, il regolamento della Commissione 2010/165/CE ha stabilito un livello massimo di 4 mg/kg di aflatossine totali. Tuttavia, la maggior parte degli attuali metodi che coinvolgono processi chimici, fisici e biologici non si rivelano pratici, a causa del prolungato tempo, delle perdite nutrizionali o della bassa efficienza di disintossicazione. L'ozonizzazione sugli alimenti diviene un'opportunità come metodo di ossidazione per la decontaminazione degli aflatossine. L'agenzia statunitense Food and Drug Administration lo ha infatti segnalato come efficace agente di inattività fungina e di controllo delle micotossine associate al grano (Granella et al., 2018). I risultati di uno studio condotto da Granella et al. (2018) evidenziano che in presenza di un tempo di esposizione più elevato all'O<sub>3</sub> dei semi di grano e una temperatura dell'aria di essiccazione più elevata, segue un aumento dell'effetto fungicida e si ottengono livelli di funghi più bassi. I dati raccolti per la valutazione immediatamente dopo il processo di essiccazione e dopo lo stoccaggio evidenziano dopo 45 min di esposizione e 50° C di temperatura dell'aria di essiccazione una diminuzione osservata di 1,73 e 1,70 ufc/g nella conta totale dei funghi con riduzioni corrispondenti a 92,86% e 91,07% rispettivamente. I risultati ottenuti mostrano che l'ozonizzazione applicata alle fasi iniziali dell'essiccazione risulta essere una tecnica molto promettente al fine di migliorare la

qualità dei semi di grano e nel tentativo di ridurre la contaminazione fungina senza compromettere il loro stato fisiologico.

L'ozono gassoso e in soluzione acquosa sono stati applicati per modificare le funzionalità di vari prodotti a base di cereali, inclusi chicchi di grano, proteine, amido e farina. Il trattamento può influenzare positivamente i comportamenti di macinazione dei chicchi di grano (Zhu, 2018) ma un'eccessiva intensità tende ad ossidare i componenti chimici, eliminando largamente le micotossine e i relativi funghi. Introducendo gruppi carbonilici e carbossilici sull'amido si creano legami disolfuro nelle proteine, si ossidano i lipidi, diminuisce il contenuto di polifenoli e si inattivano gli enzimi endogeni. Il trattamento con ozono migliora la forza dell'impasto, mentre aumenta la viscosità della farina durante l'evento di incollaggio. Un trattamento eccessivo porta all'indebolimento dell'impasto e alla scissione molecolare delle proteine e dell'amido. Gli effetti del trattamento con ozono sulle proprietà dei componenti chimici nei cereali si traducono positivamente negli attributi di qualità dei prodotti alimentari finali. Il pane e la torta ad alto rapporto a base di farina moderatamente trattata tendono ad avere un volume specifico maggiore e grandi celle d'aria. Al contrario, i prodotti a base di farine eccessivamente trattate tendono ad avere un volume ridotto e una qualità minore. I risultati delle modifiche dipendono dalla concentrazione/quantità di ozono, dalla durata del trattamento e dalla temperatura, dall'umidità e dalle forme (farina vs nocciolo) del grano. In conclusione è possibile affermare che l'ozono in condizioni di reazione adeguate può essere un efficace agente "verde" in grado di creare funzionalità desiderate nei prodotti a base di cereali e di garantire in modo significativo la sicurezza alimentare. In tale settore divengono necessari, tuttavia, ulteriori studi e approfondimenti che possano far scoprire nuove potenzialità dell'ozono applicabile al settore preso in considerazione. Resta aperto lo studio relativo agli effetti dell'ozono su alcuni componenti chimici dei cereali, come il materiale della parete cellulare, le proteine del grano senza glutine e i polifenoli. Altri cereali come semi oleosi, pseudocereali e cereali senza glutine, che stanno guadagnando attenzione a causa della domanda dei consumatori, devono ancora essere soggetti a studi approfonditi. Altre tipologie di prodotti alimentari come i biscotti e la pasta (soprattutto gli alimenti gluten free) meritano ulteriori approfondimenti. Pre-trattamenti idonei di cereali e prodotti correlati (ad es. sgrassatura) prima della lavorazione con ozono aiuterebbero a ridurre la formazione di odori sgradevoli nei prodotti finali. La tecnologia dell'ozono potrebbe inoltre aiutare a prolungare la durata di conservazione microbiologica dei prodotti a base di cereali (ad es. CSB e spaghetti freschi) con contenuto di umidità medio/alto. Un trattamento dei prodotti a base di cereali combinato con altre strategie (ad es. altri additivi alimentari) permetterebbe di garantire una gamma ancora più ampia di funzionalità specifiche.

## 5. MATERIALI E METODI

### 5.1. Irroratrice e impianto di ozonizzazione

Obiettivo principale della sperimentazione è stato misurare l'andamento del potenziale redox (ORP) in un'irroratrice (ELK 88, Euro-piave, Cimadolmo -TV, Italia) munita di sistema di ozonizzazione Ecofarm.



*Figura 5.1. Generatore di ozono Airone G2000 - Ecofarm Storti montato su irroratrice portata ELK 88 Euro-piave (Cimadolmo -TV, Italia)*

L'irroratrice portata constava di un telaio costituito da profilati metallici in acciaio, trattati con procedimenti anticorrosione, per garantire il supporto a tutti i componenti fondamentali della macchina. Il telaio costituisce la base portante dell'atomizzatore e come tale deve garantire robustezza alle sollecitazioni, leggerezza e resistenza al contatto con i prodotti chimici. Nella parte superiore era presente il serbatoio in materiale plastico con un volume pari a 400 L. Esso si presentava di forma regolare e priva di spigoli per facilitare le operazioni di pulizia ed agevolare l'agitazione della miscela. Al suo interno era presente un sistema di agitazione basato sul ricircolo della miscela in sovrappressione rispetto alle richieste degli ugelli. Collegata al serbatoio era presente la pompa a 4 membrane necessaria per mettere in pressione il liquido nel circuito idraulico dell'atomizzatore e garantire una pressione e una portata adeguate ad ottenere la polverizzazione della miscela. La pompa, oltre a garantire una pressione e una portata sufficiente ad alimentare gli ugelli, deve sempre fornire un cospicuo surplus di portata (ricircolo), che viene

continuamente reimmesso nel serbatoio per garantire il mantenimento della corretta miscelazione della soluzione. Nell'atomizzatore utilizzato per la sperimentazione, come nella maggior parte dei casi, la pompa era azionata dalla presa di potenza (p.d.p.) del trattore. Ciò garantisce una portata proporzionale al numero di giri della presa di potenza del trattore. Maggiore è il numero di giri e maggiore è la portata. La pompa dev'essere quindi dimensionata tenendo conto della portata richiesta dagli ugelli installati a cui va sommata la quantità di ricircolo necessario per miscelare la soluzione nel serbatoio. Per garantire il controllo del mantenimento della portata costante, grazie al loro rapporto direttamente proporzionale, viene monitorata la pressione. Ogni atomizzatore è, infatti, dotato di un manometro collegato al gruppo pompa. Posteriormente all'atomizzatore erano presenti gli ugelli (12) divisi in due sezioni e il sistema di ventilazione necessario che investe le goccioline in uscita dagli ugelli stessi per trasportarle verso la vegetazione oggetto del trattamento. Grazie alla presenza di una ventola munita di pale ruotabili il flusso nebulizzato in uscita viene raddrizzato in modo da garantire una distribuzione uniforme del prodotto senza dispersioni. Tutte le prove sono state eseguite da fermo azionando l'atomizzatore con la presa di forza del trattore in dotazione all'Università (Tigre, Antonio Carraro, Campodarsego -PD, Italia).

Nella parte superiore all'atomizzatore era posto il generatore di ozono Airone G2000 Ecofarm realizzato dall'azienda costruttrice di macchine agricole Storti (Ecofarm Storti, Belfiore -VR, Italia), le cui caratteristiche sono riportate in Tab. 5.1. Si tratta di un sistema professionale ad ozono per il trattamento dell'acqua nel serbatoio dell'atomizzatore, mediante gorgogliamento.

*Tabella 5.1. Caratteristiche generatore ozono Airone G2000 - Ecofarm Storti*

<b>Caratteristiche generatore ozono</b>	<b>Valore</b>	<b>Unità misura</b>
Produzione massima ozono	20	g/h
Concentrazione ottimale ozono	70	g/m <sup>3</sup>
Alimentazione elettrica	12	V
Consumo	250	W
Peso	35	kg
Dimensioni A x B x C mm	800 x 420 x 250	mm

L'impianto di ozonizzazione funziona a 12V come nel caso della maggior parte degli impianti elettrici di trattori e macchine agricole e assorbe in media circa 18W. Il tempo per garantire l'ozonizzazione del volume dell'acqua contenuta nel serbatoio pari a circa 300 L varia da 7 a 16 minuti, in funzione della purezza, della temperatura e del pH dell'acqua oltre alle eventuali

impurità presenti all'interno del serbatoio. Prima dell'utilizzo dell'atomizzatore per il trattamento con ozono diviene fondamentale la pulizia di tutto l'impianto di erogazione (tubazioni ed ugelli) e se necessario l'aggiunta di alcune irrorazioni con la sola acqua per eliminare eventuali depositi di ossido o materiale biologico lungo le tubazioni.

Per la produzione dell'ozono viene utilizzato un sistema di scarica corona, il metodo più comune applicato in commercio; un'aria secca, priva di polvere e priva di olio o un gas di ossigeno puro viene fatta passare attraverso lo spazio di un campo elettrico ad alta energia (corona) tra due elettrodi separati da un opportuno materiale. La produzione di scariche elettriche agisce sull'ossigeno inducendone l'attivazione e portando alla formazione di ozono. Quest'ultimo gorgogliando in un serbatoio d'acqua da origine ad acqua ozonizzata (OW).

Il generatore montato sull'atomizzatore e utilizzato nella sperimentazione era dotato esternamente da una bombola di ossigeno con funzione di serbatoio di tale gas. Internamente per produrre le scariche elettriche che investono il flusso d'ossigeno per la produzione d'ozono erano presenti il trasformatore di corrente, il dielettrico in borosilicato raffreddato ad aria, il concentratore di allumina attivata di O<sub>2</sub>, il filtro a carboni attivi e l'essiccatore a membrana. Il generatore era a sua volta dotato di un controllore a logica programmabile (PLC) per la gestione del funzionamento del sistema. Ciò consente di poter azionare tramite un comando da remoto l'attivazione o l'interruzione del processo di formazione dell'ozono e di poter monitorare in modo costante il livello contenuto all'interno del serbatoio. Il PLC è infatti in comunicazione con una sonda insita all'interno del serbatoio che misura il potenziale redox della soluzione (ORP), parametro indiretto utilizzato per la stima del livello dell'ozono. Tramite un sistema a Bluetooth è presente un collegamento istantaneo e in tempo reale tra tale controllore ed un tablet esterno. L'operatore dispone da remoto la possibilità di controllo e monitoraggio di funzionamento del sistema di ozonizzazione. In un'ottica di applicazione pratica l'azienda costruttrice prevede la sostituzione del tablet con un monitor posto al sistema di guida del trattore.

Il generatore di ozono può garantire la massima efficienza di funzionamento anche in condizioni di movimento del trattore verso il vigneto. Inoltre il sistema di ozonizzazione può rimanere sempre attivo anche durante il trattamento per mantenere il potenziale redox fino al valore necessario compreso tra gli 850-900mV. La scelta del mantenimento di tale valore all'interno del serbatoio è legata, oltre alla capacità massima di solubilizzazione dell'ozono in acqua anche all'effetto sulla vegetazione. Secondo il produttore, infatti, a partire da un valore di ORP all'interno del serbatoio pari a 850 mV è possibile garantire l'efficacia antifungina del trattamento.



Il meccanismo d'azione dell'acqua ozonizzata avviene tramite contatto e necessita di una distribuzione di OW con volumi significativamente elevati compresi tra gli 800-1000 L/ha.



*Figura 5.2. Generatore ozono Airone G2000 - Ecofarm Storti*

L'altro sensore utilizzato per la sperimentazione nelle misurazioni del potenziale redox è stato il pH-metro Apera. Lo strumento utilizzato è il tester ORP60 di Apera Instruments (Wuppertal, Germania), progettato per il monitoraggio affidabile dell'ORP in soluzioni idriche regolari. Dotato di una sonda ORP in platino facilmente sostituibile, permette anche il riconoscimento automatico dei valori stabili in modo da rendere più facile e veloce la lettura. Prima delle misurazioni lo strumento è stato opportunamente tarato con la soluzione di calibrazione standard a 222 mV.



*Figura 5.3. Tester ORP60 di Apera Instruments (Wuppertal, Germania)*

La misurazione dell'ORP consente in maniera indiretta la misurazione della concentrazione di ozono in acqua. Tale parametro è in grado di identificare e monitorare la quantità di composti ossidanti o riducenti all'interno di una soluzione acquosa. La rilevazione di valori positivi indicano la presenza di ossidanti, al contrario valori negativi affermano la presenza di riducenti. L'ozono è uno dei maggiori composti ossidanti ed è per tale motivo che lo strumento rilevandone la presenza restituisce valori positivi.

Lo svolgimento di tutte le prove è avvenuto presso l'Officina meccanica del dipartimento TeSAF dell'Università di Padova (Legnaro -PD, Italia) durante il mese di febbraio 2022 (07-18 febbraio).

## 5.2. Test lato irroratrice

### 5.2.1. Prove dentro il serbatoio

La prima prova è stata effettuata all'interno del serbatoio monitorando ad intervalli regolari il livello di ozonizzazione dell'acqua. La prima operazione è stata il riempimento del serbatoio con un volume d'acqua pari a 300 L. L'acqua di partenza presentava una temperatura pari a 14,6°C, un pH di 7,66 e una conducibilità elettrica di 700  $\mu$ S. Successivamente, tramite un comando da remoto dal tablet è stato avviato il generatore posto superiormente all'atomizzatore. All'avvio del sistema di ozonizzazione ad intervalli regolari di 30 secondi è stato monitorato il livello di ozono dell'acqua. Lo strumento su cui si sono fatti i rilevamenti è il sensore già insito nella macchina e immerso nel serbatoio stesso. Tramite il collegamento Bluetooth fra il sensore e il tablet in dotazione è stato possibile, in tempo reale, monitorare i valori crescenti di concentrazione di ozono nell'acqua. Il parametro di misurazione utilizzato è stato il potenziale redox (ORP) espresso in millivolt. Obiettivo principale della prova era verificare l'avanzamento progressivo dell'ozonizzazione monitorandone l'andamento; secondariamente di misurare il tempo effettivo necessario per raggiungere il livello minimo di ozono necessario per l'efficace trattamento in campo. Sono state svolte due repliche per evidenziare eventuali differenze nella rilevazione dei dati. Prima dello svolgimento della nuova replica sono state ripristinate le medesime condizioni di partenza della prima prova. Il serbatoio è stato svuotato e nuovamente riempito con acqua cui si è ri-verificato il mantenimento dei parametri iniziali.

### 5.2.2. Prove al gruppo di controllo e confronto con il serbatoio

Il secondo test è stato eseguito misurando l'ORP subito dopo il sistema di controllo (Fig.5.4.) con l'obiettivo di evidenziare differenze che potevano sussistere con l'interno del serbatoio. Tramite il confronto simultaneo dei potenziali redox, internamente al serbatoio e al gruppo di controllo, si è verificata la possibilità di perdite di concentrazione d'ozono nell'acqua in tale

tratto dell'atomizzatore. Prima operazione è stata la pulizia completa con acqua della macchina in tutte le sue componenti partendo dal serbatoio fino a giungere agli ugelli. Fase successiva il riempimento del serbatoio con acqua. Il volume usato è stato pari a 300L, ad una temperatura di 14,6°C, conducibilità elettrica di 700  $\mu$ S e pH 7,66. Tramite il tablet, fornito dall'azienda costruttrice e connesso tramite Bluetooth al controllore a logica programmabile del generatore di ozono posto sopra l'atomizzatore, è stato avviato il processo di ozonizzazione dell'acqua. Dall'istante di avvio sono stati rilevati, ad intervalli regolari di 30 secondi, simultaneamente i dati ORP sia all'interno del serbatoio che al gruppo di controllo. Per il primo ci si è basati sul dato fornito dal sensore interno al serbatoio collegato tramite sistema Bluetooth al tablet in dotazione mentre per il secondo si è utilizzato il pH metro Apera. Quest'ultima sonda è stata installata in una tazza, sempre piena di acqua ozonizzata, in linea con la tubazione dell'irroratrice.



*Figura 5.4. Gruppo di controllo e posizione misurazione ORP con strumento Apera*

Per la conferma dei dati raccolti la prova è stata replicata svolgendo analisi nelle medesime condizioni della prova precedente ed effettuando una misurazione ulteriore. Contemporaneamente alle misurazioni ordinarie della prova, ad intervalli regolari di circa 1 minuto sono stati raccolti dei campioni di acqua ozonizzata estratta dal gruppo di controllo. A conclusione della prova sono stati misurati i vari potenziali redox di ogni singolo campione con un ulteriore confronto con il valore rilevato al medesimo tempo durante la prova stessa. Lo strumento utilizzato è stato il pH metro Apera in dotazione. L'obiettivo era duplice e voleva evidenziare dapprima l'eventuale differenza tra i vari campioni e in seguito la possibile variazione (decadimento) della concentrazione d'ozono rispetto alla misurazione effettuata al medesimo tempo durante la prova.

### 5.2.3. Prove all'ugello

La prima parte di prove all'ugello sono state condotte nelle medesime condizioni di quelle effettuate al serbatoio e al gruppo di controllo. Dopo la completa pulizia della macchina è stato

riempito il serbatoio d'acqua con volume di 300 L ed è stata avviata l'ozonizzazione. Le condizioni dell'acqua di partenza erano le medesime delle prove precedenti. La temperatura era di 14,6°C, la conducibilità elettrica di 700  $\mu$ S e il pH 7,66. Ad intervalli regolari di 30 secondi sono stati rilevati i potenziali redox dentro il serbatoio, al gruppo di controllo e all'uscita degli ugelli. La misurazione è avvenuta tramite il valore fornito dalla sonda insita all'interno mentre negli altri due punti è stata rilevata con il pH-metro in dotazione Apera. Per una migliore e più agevole operazione agli ugelli è stata incorporata una serie di tubicini in modo da convogliare il flusso in uscita. Per ogni singolo ugello è stato collegato un tubicino in materiale plastico che raccoglieva il liquido in pressione in uscita creando un flusso continuo anziché molteplici goccioline disperse in atmosfera. Ai fini della prova sono stati utilizzati solo i 6 ugelli del settore sinistro. Il settore destro è stato invece completamente chiuso dal gruppo di comando. Dei 6 ugelli scelti solo quello più centrale è stato utilizzato per la misurazione. Tramite il suo tubicino in plastica il flusso è stato convogliato in un contenitore aperto, sempre pieno fino a sommità di soluzione in uscita. In tale punto è stato inserito lo strumento di misurazione che rimaneva in tal modo sempre a contatto con flusso continuo di acqua ozonizzata. L'obiettivo delle prove era verificare l'eventuale differenza fra i vari punti sulla macchina identificando le eventuali perdite.



*Figura 5.5. Posizione misurazione valore ORP all'uscita degli ugelli*

Dalla rilevazione dei dati è emersa una discordanza tra il valore rilevato all'ugello, quello rilevato al gruppo di controllo e quello all'interno del serbatoio già nelle prime fasi di analisi. A seguito di tali rilevazioni si è analizzata la possibile causa della differenza. Dal punto di vista operativo si è quindi svolta una prova con acqua non ozonizzata monitorando ad intervalli regolari di 1 minuto il variare del valore nell'incremento del tempo. Dall'analisi dei dati non si è riscontrato nessun allineamento tra i due valori e si sono quindi attribuite le possibili cause al



ricircolo o al tubo di ritorno dell'acqua. Essi, infatti, risultando situati tutti in una zona molto vicina al sensore interno al serbatoio potevano ipoteticamente avere un'influenza sul valore misurato. È stata quindi svolta un'ulteriore prova con l'obbiettivo di verificare il variare del potenziale redox al variare di alcune condizioni all'interno del serbatoio. All'inizio sono stati avviati solo pompa e ricircolo dell'acqua con misurazioni del potenziale redox dapprima ad intervalli di 1 minuto, successivamente di 5 minuti e infine di 10 minuti. Dopo un periodo di 60 minuti è stato spostato il tubo del ricircolo e anche in tal caso con rilevazione dei dati ogni due minuti. Tuttavia, non verificando nessun allineamento tra i potenziali redox all'interno del serbatoio e agli ugelli si è provveduto, dopo un ulteriore periodo di 30 minuti, a chiudere il ricircolo. Per 15 minuti sono stati nuovamente rilevati dati di potenziali redox ad intervalli sempre costanti di due minuti. Non segnalando anche in questo caso nessun allineamento si è provveduto all'accensione dell'ozonizzazione. L'obbiettivo della prova era duplice: in primo luogo si è cercato di verificare l'allineamento dei dati; in un secondo momento monitorare la differenza dei due valori. Accendendo l'ozonizzazione si è cercato di rimarcare se la differenza tra i valori all'interno del serbatoio e agli ugelli si attestava in un minimo range o se aumentava o decresceva all'incrementare della quantità d'ozono in acqua.

### 5.3. Test lato vegetazione

Le prove successive sono state finalizzate alla misura della concentrazione di ozono effettiva simulando le condizioni di trattamento su pianta.



*Figura 5.6. Banco di prova con irroratrice in funzione per misurazione ORP simulando situazione sulla vegetazione in campo*

Ai fini del risultato finale è stato montato un banco di prova verticale (Paternator con dischi, Salvarani, Poviglio-RE, Italia) fino a raggiungere un'altezza di tre metri per simulare la vegetazione in campo (Fig. 5.5.). La prova consisteva nella misurazione dell'ORP in uscita dagli ugelli raccogliendo l'acqua ozonizzata dal banco di prova verticale. La prima operazione è stata il riempimento del serbatoio con acqua e la successiva accensione del sistema di ozonizzazione. Le misurazioni sono state effettuate a partire dal valore di ozonizzazione pari a 850 mV, valore di regime necessario per il trattamento. Successivamente sono stati azionati ugelli e ventola dell'atomizzatore per simulare le condizioni di trattamento in campo. Il risultato ottenuto è stata la formazione di goccioline di OW in fuoriuscita dagli ugelli che hanno raggiunto il banco di prova. Una volta raggiunto il bersaglio le goccioline convogliavano per caduta in un recipiente posto alla base del banco stesso. In tale punto era inserito lo strumento per la misurazione del valore ORP. Lo strumento utilizzato è stato il pH-metro in dotazione Apera. Simultaneamente nella sperimentazione è stato monitorato il valore ORP in prossimità dell'uscita dagli ugelli. Lo scopo della prova era monitorare la differenza di valore ORP rispetto all'ugello e quindi con le altre parti dell'atomizzatore esaminate nelle prove precedenti e allo stesso tempo stimare gli effetti dell'interazione dell'acqua ozonizzata con l'atmosfera. Successivamente sono state eseguite ulteriori prove nelle medesime condizioni con la sola variazione del tipo di ugelli. L'obiettivo era stimare in relazione al variare del tipo di ugello e quindi della dimensione della goccia a contatto con il banco di prova l'influenza sul valore ORP dell'acqua ozonizzata. Scopo secondario era quindi identificare il tipo di ugelli che avevano minore effetti negativi e quindi minore perdite di ORP rispetto al valore all'uscita dagli ugelli. Prima di effettuare le varie prove con le varie tipologie di ugelli si sono monitorate pressione e portata degli stessi. La portata è stata misurata collegando ad ogni singolo ugello un tubicino in plastica che convogliasse il flusso in uscita. Ogni tubicino conduceva ad un cilindro graduato e dopo un tempo pari a un minuto si procedeva alla verifica del livello di riempimento di ciascun cilindro e successivamente al confronto della portata dei vari ugelli. Se la taratura e il funzionamento di ciascun ugello è in linea con le attese il volume al cilindro graduato dovrebbe essere il medesimo per tutti gli ugelli utilizzati. La prova di pressione è stata invece svolta collegando un manometro ad ogni singolo ugello. Il valore di pressione fornito era confrontato con il valore effettivo impostato a priori dal gruppo di controllo dell'atomizzatore. La coincidenza dei due valori sottolinea la massima efficacia di funzionamento dell'ugello. Dalle prove di taratura effettuate sono state evidenziate delle anomalie nei valori e si è pertanto provveduto ad una pulizia accurata di ogni singolo ugello tramite aria in pressione e ri-effettuando tutti i test funzionali.

Per la sperimentazione al banco di prova sono stati testati tre diversi tipi di ugelli secondo la codifica a colori ISO 10625: verde, giallo e rosso (Tab. 5.2.). Ciascuna prova è stata effettuata a partire da un valore di ozonizzazione interno al serbatoio pari a 850 mV, con misurazione del valore in uscita agli ugelli e al banco di prova. Ogni tipologia di ugelli è stata testata in relazione al proprio range ottimale di pressione di funzionamento.

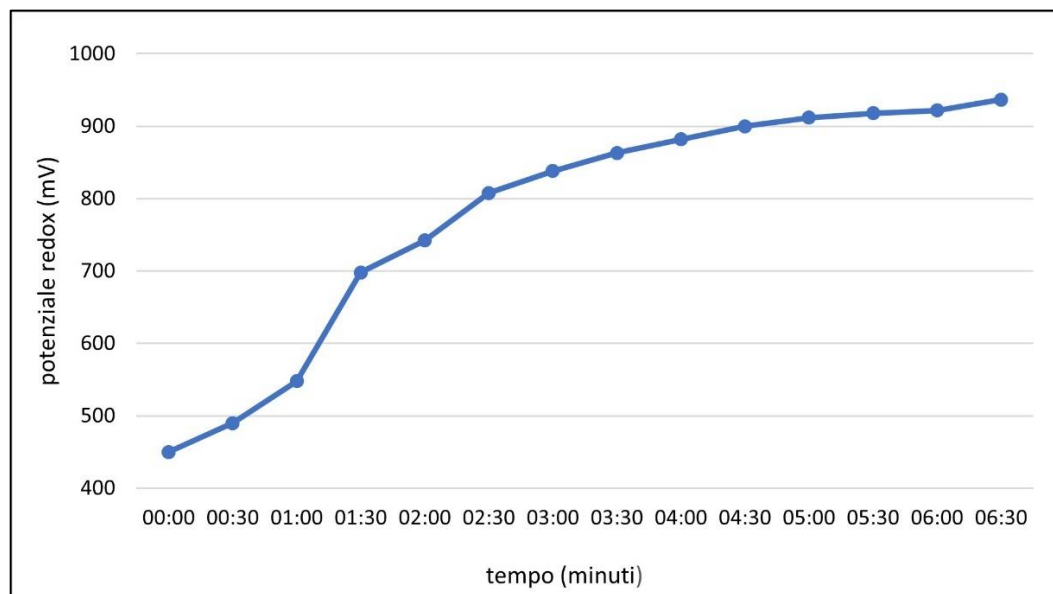
*Tabella 5.2. Caratteristiche e parametri funzionamento ugelli*

Codifica colori ugelli ISO 10625	Pressione ( $10^5$ Pa (Bar))	Velocità (km/h)	Dimensione della goccia
Verde	15	3.5	VF
Giallo	10	4.0	VF
Rosso	5	5.5	F

## 6. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 6.1. Cinetica dell'ozono all'interno del serbatoio

I test effettuati sulla cinetica dell'ozono all'interno del serbatoio hanno consentito di identificarne l'andamento e il tempo necessario al fine di raggiungere il valore minimo per effettuare con efficacia il trattamento in campo. La dinamica dell'ozono all'interno del serbatoio è mostrata in figura 6.1. Il primo valore misurato è compreso fra i 400 e i 450 mV e corrisponde al valore di ORP tipicamente presente in acqua.



*Figura 6.1. Dinamica ORP dell'ozono all'interno del serbatoio*

Dalla rilevazione dei dati si è evidenziato un aumento costante del potenziale redox all'interno del serbatoio scomponibile in tre sottofasi. In una prima fase, in linea teorica nel tempo stimato di un minuto, vi è una crescita più ridotta dovuta principalmente alla necessità dell'ozono di entrare in soluzione e disciogliersi in acqua. Nella fase precedente l'ozono deve saturare lo spazio di vuoto presente tra la superficie della soluzione e la parte superiore del serbatoio. Il volume d'acqua utilizzato è infatti solitamente pari a 300 L mentre il serbatoio di un atomizzatore presenta una capienza standard tra i 400 e i 500 L. Ciò fa sì che rimanga uno spazio occupato dall'aria. Superata tale fase, come evidenziato dal grafico, la crescita risulta maggiore per la sempre crescente presenza di ozono. La crescita esponenziale prosegue fino a raggiungere una stabilizzazione attorno a valori ORP fra i 900 e i 950 mV. Tale limite massimo raggiungibile è legato dalla quantità massima di ozono che l'acqua può accettare. In prossimità della saturazione di ozono in acqua la crescita di valore ORP diviene sempre inferiore fino a stabilizzarsi. Il tempo necessario per raggiungere tale livello è stato stimato attorno ad un tempo pari a 6-7 minuti. Si tratta di un lasso temporale abbastanza breve, tuttavia, ai fini dell'utilizzo



per il trattamento il valore soglia da raggiungere risulta inferiore. Secondo il costruttore il valore di regime necessario dovrebbe attestarsi attorno a 880 mV. Tale valore è raggiungibile con un tempo pari a circa 4 minuti (Tabella 6.1.).

*Tabella 6.1. Valori ORP all'aumentare del tempo all'interno del serbatoio*

tempo (minuti)	valore (mV)
00:00	450
00:30	490
01:00	548
01:30	698
02:00	742
02:30	808
03:00	838
03:30	863
<b>04:00</b>	<b>882</b>
04:30	900
05:00	912
05:30	918
06:00	922
06:30	937

## 6.2. Confronto valori ORP nelle diverse posizioni di misurazione

I test effettuati al gruppo di controllo e all'interno del serbatoio hanno mostrato delle differenze tra i valori. L'andamento di cinetica dell'ozono in entrambe le posizioni dell'atomizzatore risultano le medesime, tuttavia, i valori di ORP non assumo mai valori uguali nello stesso istante temporale (Fig. 6.2.). In una prima fase la distanza risulta maggiore in quanto vi è un ritardo nell'arrivo della soluzione al gruppo di controllo. Nella fase di avvio dell'ozonizzazione all'interno del serbatoio vi è un incremento crescente di concentrazione mentre al gruppo di controllo vi è l'arrivo di acqua meno ricca di ozono e quindi con valore ORP inferiore. Dai dati rilevati emerge come questo andamento prosegue fino ad un lasso temporale di 3-4 minuti dall'avvio dell'ozonizzazione. Al raggiungimento di un valore di stabilità all'interno del serbatoio attorno a 900 mV essa si traspone anche al gruppo di controllo. Da tale momento la differenza di valore ORP misurato fra i due punti permane ma si attesta secondo un range standard tra i 60-70 mV. Tale differenza si traduce in una perdita di potenziale redox che si

aggira attorno al 7% conseguentemente in perdita di concentrazione di ozono in acqua rispetto al serbatoio.

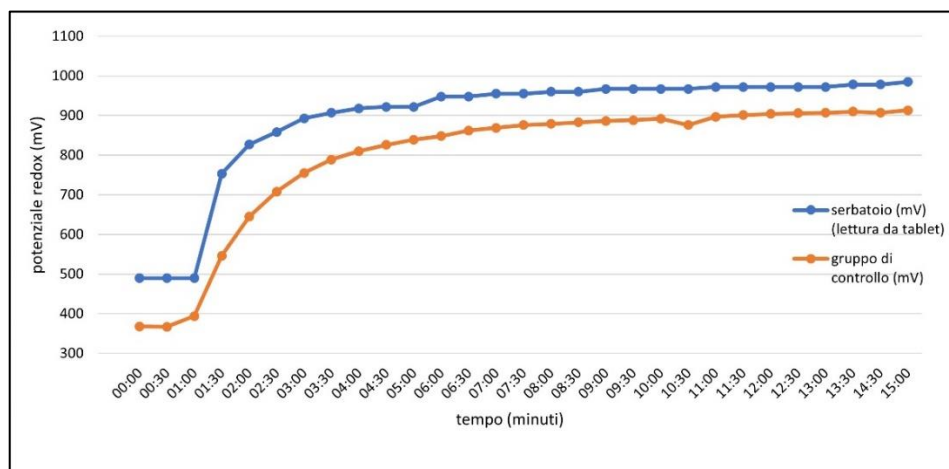


Figura 6.2. Dinamica ORP dell'ozono all'interno del serbatoio e al gruppo di controllo

Anche i test effettuati simultaneamente al serbatoio, al gruppo di controllo e agli ugelli mostrano il medesimo andamento riscontrato nei test sopra effettuati. Anche in tal caso vi è una cinetica simile con valori che si scostano maggiormente nella prima fase ma che superato il lasso temporale per la completa ozonizzazione del serbatoio acquistano stabilità. La perdita di ORP riscontrabile con gli ugelli risulta ancora maggiore rispetto alla perdita serbatoio-gruppo di controllo. La posizione degli ugelli a valle rispetto alle altre parti dell'atomizzatore con un conseguente maggior percorso che il flusso OW deve attraversare conduce a maggiori perdite che si attestano attorno ad una percentuali pari al 12% rispetto al serbatoio. Questo calo può essere causato dalla necessità di raggiungere un equilibrio elettrochimico in ogni parte dell'irroratrice, che hanno un potenziale redox diverso dall'OW.

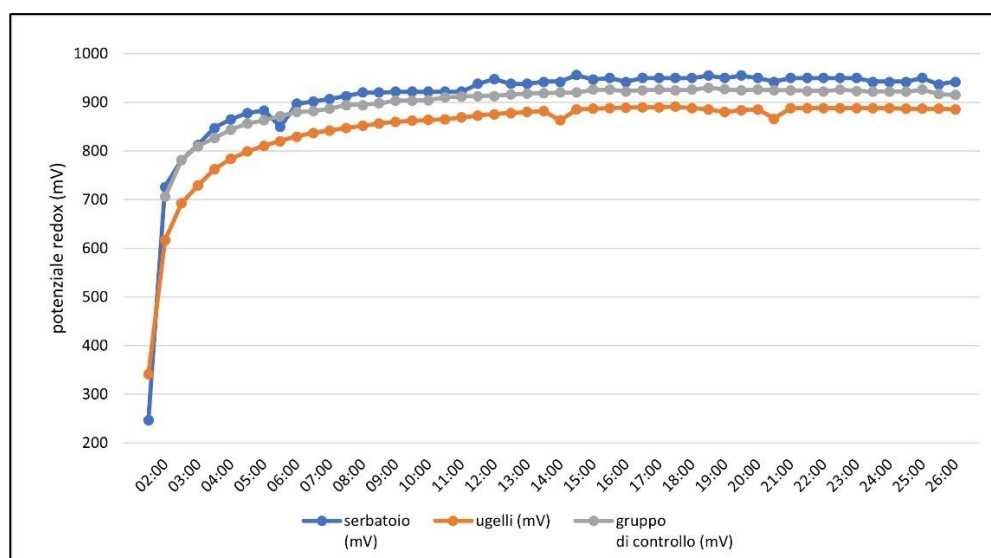


Figura 6.3. Dinamica ORP dell'ozono all'interno del serbatoio, al gruppo di controllo e agli ugelli

Dall'analisi dei dati emerge come il raggiungimento del valore di regime attorno agli 850-900 mV per la maggiore efficacia del trattamento in campo avvenga in un lasso temporale diverso nei vari punti analizzati. All'interno del serbatoio come già evidenziato dai precedenti test ciò accade attorno ad un tempo pari a 4 minuti, tuttavia, all'uscita degli ugelli in tale range temporale si sono raggiunti solamente 750-800 mV. Per il raggiungimento del valore ottimale all'ugello è necessario attendere all'incirca a 6-7 minuti. Ciò si traduce in un ritardo che se non considerato condurrebbe all'avvio del trattamento in un momento non ancora adeguato. Il lasso temporale per la possibilità di inizio del trattamento in campo è tuttavia mantenuto in un range basso e gestibile. Tale tempo risulta ottimale per l'agricoltore che ne fa uso in quanto è paragonabile o addirittura inferiore al tempo necessario alla preparazione dei fitofarmaci chimici.

### 6.3. Valori ORP al banco di prova e differenze fra gli ugelli

I test effettuati con l'aggiunta del banco di prova mostrano una cinetica simile alle precedenti prove. I valori ORP nelle quattro posizioni di misurazione (serbatoio, gruppo controllo, ugelli e banco) sono mostrati in Fig. 6.4. Tutte le curve ORP hanno evidenziato un'evoluzione simile nel tempo. Nelle fasi iniziali, l'ORP come nelle precedenti prove ha mostrato una crescita esponenziale fino a un punto di flessione. Successivamente, il valore aumenta più lentamente fino a raggiungere un asintoto orizzontale. Per approssimazione di lievi differenze, l'asintoto orizzontale è stato raggiunto dopo 250 secondi, tempo necessario per garantire la stabilità all'interno del serbatoio. La perdita di ORP riscontrata al banco di prova rispetto al serbatoio è pari al 29% rispetto al valore nel serbatoio.

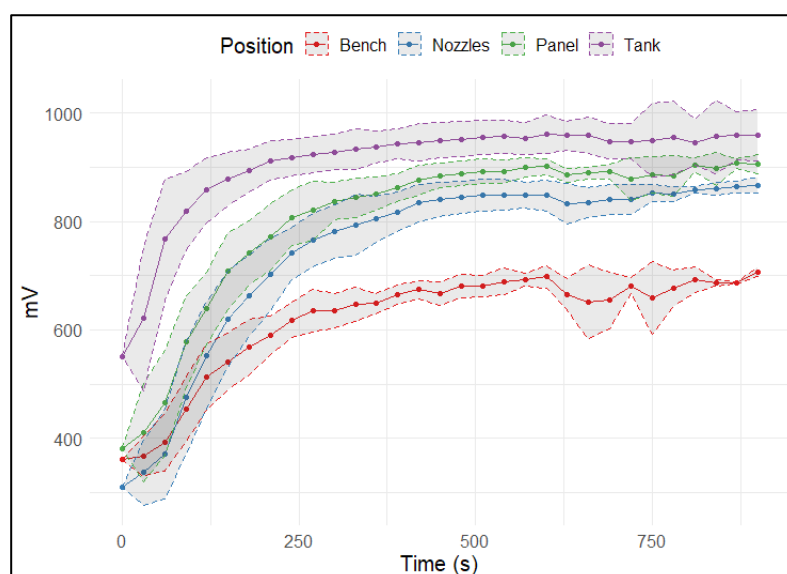


Figura 6.4. Dinamica ORP nelle 4 posizioni di misurazione (serbatoio, gruppo controllo, ugelli, banco di prova)

Il calo significativo dell'ORP al banco di prova può essere causato dall'interazione con l'atmosfera. Sulla base di tali dati sono stati testati diversi ugelli (verde, giallo, rosso) e pressioni. I valori di ORP sono stati normalizzati sui valori del serbatoio, per rimuovere gli effetti della dinamica. Inoltre, sono stati utilizzati solo i valori misurati dopo 250 secondi. La distribuzione ottenuta dai dati presi in considerazione è stata confrontata statisticamente con il test ANOVA e il test di portata di Tukey. L'ORP medio espresso come percentuale dell'ORP nel serbatoio è riportato in Tab. 6.1.

Tabella 6.1. Variazione dell'ORP agli ugelli e al banco prova

Posizione	Verde	Rosso	Giallo
Ugelli (mV)	65%	90%	86%
Banco (mV)	61%	74%	69%

Secondo l'analisi statistica, tutte le differenze erano statisticamente significative ( $p$ -value < 0,001). La distribuzione dell'ORP utilizzando diversi ugelli è mostrata in Fig. 6.5.

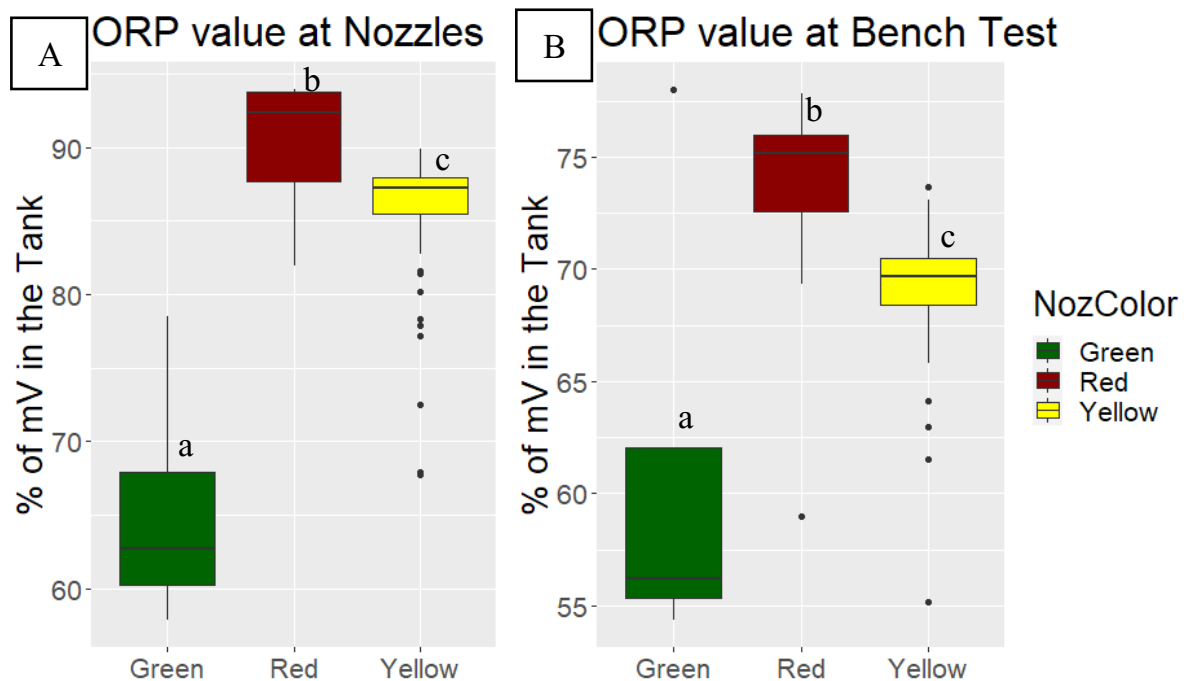


Figura 6.5. A) Distribuzione dell'ORP con diversi ugelli nel punto di misurazione dell'ugello B) Distribuzione dell'ORP con diversi ugelli nel punto di misurazione del banco di prova

#### 6.4. Confronto dei risultati sperimentali con altre pubblicazioni

L'ozono (O<sub>3</sub>) rappresenta un prodotto conveniente ampiamente utilizzato contro numerosi agenti patogeni fungini e batterici e da alcuni anni è divenuto estremamente attenzionato da moltissimi ricercatori. Recenti studi sono stati eseguiti al fine di verificare le proprietà micotiche del prodotto stesso. Numerose ricerche eseguite in laboratorio hanno evidenziato il rischio di letalità nei confronti degli agenti patogeni ed insetti (Savage et al., 2022). Modesti et al. (2019) ha condotto uno studio d'indagine sugli effetti dei trattamenti pre-vendemmia con acqua ozonizzata in vigna sulla popolazione microbica e sullo sviluppo e qualità dei frutti alla raccolta. I risultati hanno mostrato un effetto di riduzione solo sui funghi mentre, inaspettatamente, l'UFC era più alto per batteri e lieviti. Inoltre, sono stati riscontrati effetti positivi sulla concentrazione di zucchero ed è stato osservato un livello di acidità statisticamente significativo più elevato nell'uva trattata. Questi dati suggeriscono che i trattamenti dell'acqua ozonizzata ritardano leggermente il processo di maturazione. Inoltre, numerosi studi di ricerca eseguiti di recente si sono concentrati sulla prospettiva di utilizzare OW come fattore di stress abiotico al fine di stimolare i metaboliti secondari bioattivi nelle foglie e nei frutti della vite (Risoli & Lauria, 2022). Garcia-Martinez et al. (2021) hanno studiato l'impatto di diversi trattamenti OW sulla composizione chimica di acini d'uva e vini. La miscela di irrigazione e irrorazione OW ha portato ad un miglioramento del colore degli acini, nonché della concentrazione fenolica e del potenziale aromatico; mentre l'irrigazione ha avuto un impatto negativo sugli antociani e, più in generale, sul contenuto fenolico totale degli acini. Tuttavia, quando questi approcci sono stati associati all'irrorazione, il profilo del metabolita secondario dell'uva è migliorato significativamente (Risoli & Lauria, 2022). I responsabili della ricerca di cui sopra hanno messo in evidenza che in funzione alla metodologia di trattamento applicata si potrebbe verificare un'alterazione della qualità del vino. Nel complesso, lo studio effettuato ha mostrato ulteriormente quanto l'applicazione di basse dosi di OW non induca effetti dannosi sulle piante e, allo stesso tempo, inneschi frequentemente una molteplicità di reazioni a catena che possono portare all'accumulo di metaboliti secondari e all'attivazione dell'apparato antiossidante. È stato osservato che le stimolazioni biochimiche producono una maggiore resistenza all'infezione da agenti patogeni riducendo significativamente l'input agrochimico. Un ulteriore studio condotto di recente da Fumagalli et al. (2019) che comportava di verificare gli effetti quantitativi diretti dei trattamenti con ozono sui parametri come resa del raccolto e le variabili chimiche rilevanti che influenzano la quantità e la qualità del vino ha prodotto risultati che hanno permesso di fare un ulteriore passo di conoscenza verso questa nuova tecnologia. È stata utilizzata la tecnica della camera a cielo aperto che prevede la coltivazione di piante di vite a concentrazioni controllate di

O3. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che concentrazioni di ozono più elevate causano diminuzioni della resa delle colture, espressa come peso dei grappoli. Inoltre, le concentrazioni di diverse sostanze chimiche presenti nel mosto, che influenzano la qualità del vino prodotto, sono soggette a variazioni in caso di elevati livelli di ozono troposferico. È stato riscontrato che l'esposizione a concentrazioni elevate di O<sub>3</sub> ha ridotto le quantità di uva raccolte, con conseguenti perdite di produzione di vino (Fumagalli et al., 2019).

Dall'analisi in letteratura degli studi messi in campo di recente sugli effetti dell'ozono in viticoltura hanno consentito di ottenere dati potenzialmente e significativamente interessanti ma non ancora sufficienti per un quadro generale definitivo. L'ambito della ricerca condotto fin d'ora ha posto concentrato la maggiore attenzione sugli effetti diretti in campo e sui prodotti trattati. Diviene, pertanto, necessario sviluppare un protocollo adeguato relativo alle specie coltivate mirate (dosi e metodi di applicazione) per il trattamento dell'OW in modo da fornire un mezzo alternativo e promettente al fine del controllo delle malattie fungine e allo stesso tempo promuovere il valore nutraceutico dei prodotti agricoli. Dall'evidenza di tale necessità è stato sviluppato lo studio del presente lavoro di tesi. L'obbiettivo era verificare l'applicabilità dell'acqua ozonizzata facendo gorgogliare gas ozono in un serbatoio d'acqua. La sperimentazione si è concentrata sull'analisi di OW nelle varie fasi antecedenti la diffusione in campo che ha consentito di verificare il comportamento e definire la scelta corretta dei parametri di utilizzo e garantire un protocollo mirato evitando gli effetti dannosi dell'ozono precedentemente illustrati. È stato pertanto misurato l'ORP di OW in un prototipo di irroratrice progettato per usi in vigna. In primo luogo, l'ORP è stato misurato ripetutamente lungo tutti i percorsi all'interno della condotta idraulica e all'esterno degli ugelli. Successivamente sono stati testati diversi tipi di ugelli per valutare l'effetto delle diverse dimensioni delle goccioline e del flusso d'aria sul potenziale redox finale. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza come tutte le curve ORP nei vari punti di misurazione (serbatoio, gruppo controllo, ugelli, banco di prova) mostrino un'evoluzione simile nel tempo. Nelle fasi iniziali, l'ORP ha mostrato una crescita esponenziale fino a un punto di flessione. Successivamente, il valore dell'ORP ha presentato un incremento più lento fino a raggiungere un asintoto orizzontale, all'incirca dopo 250 secondi. L'ORP, inoltre, è diminuito del 7%, 12% e 29% dopo la pompa, agli ugelli e il banco di prova, rispettivamente, rispetto al valore nel serbatoio. È ipotizzabile che questo valore che mette in luce il calo possa essere causato dalla necessità di raggiungere un equilibrio elettrochimico in ogni parte dell'irroratrice. Il calo significativo dell'ORP al banco di prova può, invece, essere causato dall'interazione con l'atmosfera. Da ciò sono stati testati diversi ugelli per verificare le eventuali differenze significative. Dall'analisi ANOVA è emerso come ogni tipologia di ugelli abbia

un'influenza significativa nel valore ORP sia in prossimità di esso che all'arrivo sulla vegetazione, situazione simulata con i dati raccolti dal banco di prova. Un'unica ricerca analoga presente in letteratura condotta da Fujiwara & Fujii (2010) ha misurato da quattro diverse distanze utilizzando tre diverse dimensioni delle goccioline (espresse in termini di diametro medio Sauter; piccola, media, grande) la variazione di concentrazione di ozono disciolto (DOC) dell'acqua ozonizzata (OW) simulando la situazione di trattamento in campo. I risultati mostrano un DOC nell'OW al target di spruzzatura che assume un andamento decrescente alla diminuzione delle dimensioni delle goccioline. Ciò è in linea con i risultati ottenuti dall'analisi statistica nello studio di tesi. La tipologia di ugelli che conduce alla formazione di gocce più fini (verde per il lavoro di tesi) ha maggiori perdite di valore ORP. Dalle analisi emerge inoltre come il valore di concentrazione di ozono sia notevolmente ridotto spostandosi da una distanza di spruzzatura di 0,50 m ad una distanza di 0,75 m a meno di un settimo rispetto al valore iniziale (2,2 mg/L-1) nel serbatoio dell'irroratrice. Sulla base dei risultati di questi esperimenti, l'efficacia del controllo della malattia mediante spruzzatura di OW può essere migliorata riducendo al minimo la distanza di spruzzatura e utilizzando un ugello che produce una dimensione delle gocce di spruzzatura maggiore. Nessun studio fin d'ora si era invece concentrato sui dati di ORP all'interno dell'atomizzatore; mentre risulta essenziale per poter comprendere al meglio la cinetica dell'ozono all'interno del serbatoio e capire il modo e il tipo di componenti dell'irroratrice che influenzano la concentrazione di ozono all'arrivo sulla vegetazione. Quando l'ozono viene fatto gorgogliare nell'acqua, la reazione produce OW che deve raggiungere corrette concentrazioni per garantire tossicità per gli agenti patogeni, ma non sufficiente da danneggiare i tessuti delle piante. Stabilire e riconoscere i parametri di funzionamento utili a garantire le concentrazioni di distribuzione corrette assume un ruolo essenziale.

Lo studio di tesi condotto ha contribuito ad evidenziare e porre le basi preliminari per la scelta del protocollo corretto da utilizzare per il trattamento in campo.

## 7. CONCLUSIONI

Dal rapporto FAO del 2017 (FAO, 2017) le perdite di rendimento annuali causate da parassiti e agenti patogeni sono stimate tra il 20 e il 40% della produzione mondiale. La causa maggiore è imputabile al cambiamento climatico che contribuisce ad aumentare l'incidenza di malattie, virus, insetti e sullo sviluppo di quest'ultimi alla resistenza ai pesticidi (Pu et al., 2020). L'attuale strategia mondiale per contrastare tali problematiche è legata all'utilizzo di input chimici e soprattutto prodotti fitosanitari. Grazie al loro utilizzo a riguardo della difesa delle colture è stato stimata una mancata perdita fino al 45% dell'approvvigionamento alimentare mondiale. Anche nel settore vitivinicolo, sebbene rappresenti solo il 3,3% della superficie totale coltivata in Europa, l'uso di pesticidi per la produzione di uva e vino è notevolmente aumentato dopo la diffusione della peronospora della vite (*Plasmopora viticola*) e dell'oidio della vite (*Erysiphe necator*), che hanno causato gravi perdite di resa su *Vitis vinifera*. Oggi la viticoltura rappresenta, infatti, il primo settore di consumo di fungicidi in Europa. Tuttavia, sebbene i prodotti fitosanitari presentino numerosi vantaggi in campo agricolo, resta aperto il dibattito sul loro utilizzo e sui numerosi risvolti negativi sull'ambiente e sulla ricaduta per la salute umana e la biodiversità. La Comunità Europea, inoltre, ha imposto una notevole restrizione all'uso dei pesticidi, stabilendo un quadro normativo per l'uso sostenibile di tali prodotti basata su una gestione integrata dei parassiti stessi. Lo sviluppo di nuove pratiche per un'agricoltura meno impattante diviene oggi una questione di primo piano nella ricerca attuale. A tal riguardo un prodotto naturale e di basso impatto come l'ozono ha attirato l'attenzione di tutto il settore agricolo e agroalimentare grazie alla sua significativa attività disinfettante e antimicrobica. È un gas fortemente ossidativo, che si decompone spontaneamente senza lasciare residui nell'ambiente di utilizzo. Negli ultimi decenni grande importanza ha assunto come prodotto per molteplici usi nel settore agroalimentare. Viene infatti utilizzato come sanificante nei luoghi di lavoro, come fumigante del suolo, come agente di conservazione e di gestione dei pesticidi di frutta e verdura nel post-raccolta, per il miglioramento delle caratteristiche qualitative di grano e anche come trattamento post-vendemmia sulle uve per cambiamenti specifici nel profilo aromatico. L'O<sub>3</sub> rappresenta un prodotto conveniente ampiamente utilizzato contro numerosi agenti patogeni fungini e batterici. Tuttavia, poiché il gas ozono può influenzare negativamente la vegetazione e l'ambiente l'applicabilità dell'acqua ozonizzata (OW) è stata verificata facendo gorgogliare gas ozono in un serbatoio d'acqua. La reazione produce sostanze reattive dell'ossigeno (ROS), diminuendo il potenziale di ossidoriduzione (ORP) della soluzione. Dopo questo processo, l'OW è tossico per gli agenti patogeni, ma non abbastanza da danneggiare i tessuti delle piante. Tuttavia, poiché i ROS disciolti nell'acqua hanno un'emivita relativamente



bassa, è fondamentale impostare i parametri corretti dell'irroratrice per ottimizzare l'efficacia del controllo delle malattie delle piante. La dimensione delle goccioline e la distanza del target sono due dei modelli cruciali che influenzano l'efficacia del trattamento OW.

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo quello di descrivere le caratteristiche e le proprietà che contraddistinguono l'ozono e i suoi possibili utilizzi nel settore agricolo. Uno studio più completo e approfondito è stato eseguito con l'obbiettivo di analizzare in modo dettagliato il comportamento dell'acqua ozonizzata all'interno e all'esterno di un'irroratrice per valutarne la stabilità e le eventuali differenze. Molteplici misurazioni del potenziale di ossidoriduzione dell'acqua ozonizzata sono state effettuate lungo tutti i percorsi all'interno della condotta idraulica e all'esterno degli ugelli. Una contemporanea analisi tecnica delle differenze riscontrabili sulla scelta del protocollo di funzionamento e delle varie componenti dell'irroratrice ha permesso la ricerca della situazione ideale per la massima efficacia del trattamento. Sono stati testati diversi tipi di ugelli per valutare l'effetto delle diverse dimensioni delle goccioline e del flusso d'aria sul potenziale redox finale. Tutte le prove sono state effettuate su un'irroratrice ELK 88, Euro-piave (Cimadolmo -TV, Italia) sul quale era montato uno strumento generatore di ozono Ecofarm (Airone G2000, Ecofarm Storti, Belfiore -VR, Italia).

Il primo test è stato effettuato all'interno del serbatoio dell'irroratrice monitorando l'ORP con sonda incorporata, con l'obiettivo di stimare il tempo necessario per produrre OW. I risultati hanno mostrato come la cinetica dell'ozono all'interno del serbatoio segua un andamento in tre fasi. Una prima fase di crescita più lenta, una seconda di crescita più rapida e infine una stabilizzazione attorno ad un valore soglia tra i 900-950 mV.

Il secondo test è stato eseguito misurando l'ORP subito dopo il sistema di controllo per valutare l'influenza della pompa a membrana sull'OW. L'ORP è stato misurato contemporaneamente nel serbatoio e vicino al sistema di controllo a cui sono stati aggiunti simultaneamente i valori agli ugelli e all'arrivo su un banco di prova verticale misurati in una terza prova. I risultati hanno evidenziato perdite pari al 7%, 12%, 29% di ORP rispettivamente al gruppo di controllo, agli ugelli e al banco di prova rispetto al valore nel serbatoio. Dai test è emerso come il potenziale redox dell'OW all'interno dei componenti dell'irroratrice sia influenzato da un ritardo per raggiungere un equilibrio elettrochimico. Dall'analisi delle misurazioni effettuate è stato stimato che il tempo richiesto dall'atomizzatore per garantire il raggiungimento di tale equilibrio e conseguentemente il valore ottimale di ORP all'uscita dagli ugelli è stato di 250 secondi (6 minuti). Tale lasso temporale è ritenuto sufficientemente limitato e in linea con il tempo spesso utilizzato dall'agricoltore per la preparazione dei fitofarmaci chimici. Tale tempo per raggiungere l'equilibrio elettrochimico, considera anche gli ugelli in

funzione. Deve pertanto essere calcolato a partire dall'avvio degli ugelli. Infine, l'ultima prova ha valutato l'ORP convogliato dal flusso derivante dalle goccioline di OW a contatto con un banco di prova verticale. In questo studio sono stati testati diversi tipi di ugelli e pressioni di esercizio. Le differenze statistiche riscontrate nel potenziale redox di OW agli ugelli e sul banco di prova hanno suggeriscono come la dimensione delle gocce influisca sul valore ORP del prodotto dopo l'irrorazione, con un calo più critico in caso di goccia più fine, a causa di una superficie più elevata a contatto con l'atmosfera.

Lo studio si è posto come obiettivo quello di verificare in modo dettagliato il comportamento dell'acqua ozonizzata in tutte le componenti di un'irroratrice dal serbatoio, al gruppo di controllo e agli ugelli. Dalle analisi sono state evidenziate alcune perdite, tuttavia, con opportuni accorgimenti risultano ampiamente superabili. Le valutazioni successive hanno evidenziato delle differenze di efficacia in relazione alla tipologia di ugelli utilizzati. I dati ottenuti fungono da una prima analisi sull'applicabilità dell'ozono e i risultati preliminari sono promettenti e ne indicano un potenziale utilizzo in viticoltura. La riduzione dei prodotti fitosanitari nel prossimo futuro è una necessità affermata e l'applicazione dell'ozono può divenire una strategia possibile ed efficace. Sono tuttavia riscontrabili ancora alcuni limiti di utilizzo legati alla necessità di utilizzo di acqua con poche impurità che influisce negativamente sull'azione dell'ozono e alla scelta del tipo di protocollo corretto prima del trattamento in campo.

Resta importante e necessario per il futuro effettuare ulteriori studi maggiormente approfonditi al fine di verificarne la piena efficacia in campo.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Achen, M., & Yousef, A. E. (2001). Efficacy of Ozone Against *Escherichia coli* O157:H7 on Apples. *Journal of Food Science*, 66(9), 1380–1384. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2001.TB15218.X>
- Ambrosini, V., Issawi, M., Sol, V., & Riou, C. (2020). Photodynamic inactivation of *Botrytis cinerea* by an anionic porphyrin: an alternative pest management of grapevine. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-74427-9>
- Aulakh, J., Regmi, A., Fulton, J., & Alexander, C. (2013). *Estimating post-harvest food losses: Developing a consistent global estimation framework*. [https://ageconsearch.umn.edu/record/150363/files/AAEA\\_Poster\\_Post-harvest.pdf](https://ageconsearch.umn.edu/record/150363/files/AAEA_Poster_Post-harvest.pdf)
- Baylis, A. (2020). *Global Biopesticides Market Trends & Forecasts 2021 | IHS Markit*. <https://ihsmarkit.com/research-analysis/biopesticides-2021.html>
- Botondi, R., De Sanctis, F., Moscatelli, N., Vettraino, A. M., Catelli, C., & Mencarelli, F. (2015). Ozone fumigation for safety and quality of wine grapes in postharvest dehydration. *Food Chemistry*, 188, 641–647. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.05.029>
- Boudesocque, S., Guillon, E., Aplincourt, M., Marceau, E., & Stieveno, L. (2007). Sorption of Cu(II) onto vineyard soils: macroscopic and spectroscopic investigations. *Journal of Colloid and Interface Science*, 307(1), 40–49. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2006.10.080>
- Cohen, Wang, W. C., Ben-Daniel, B. H., & Ben-Daniel, Y. (2006). Extracts of *Inula viscosa* control downy mildew of grapes caused by *Plasmopara viticola*. *Phytopathology*, 96(4), 417–424. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0417>
- Cohen, Y., Baider, A., Ben-Daniel, B., & Ben-Daniel, Y. (2017). Fungicidal preparations from *Inula viscosa*. *Plant Protection Science*, 38(SI 2-6th Conf EFPP 2002), 629–630. <https://doi.org/10.17221/10575-PPS>
- Duričić, D., Valpotić, H., & Samardžija, M. (2015). Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: Current knowledge. *Animal Reproduction Science*, 159, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2015.05.017>
- EUR-Lex - 31992R2078 - EN - EUR-Lex. (1992). 30/06/1992. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A31992R2078>
- European Commission. (2009). *Direttiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio che istituisce un quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei prodotti fitosanitari*. 11, 1–26. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:02009L0128-20091125>
- European Commission. (2009). *REGOLAMENTO (CE) N. 1107/2009 DEL PARLAMENTO*

- EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 21 ottobre 2009 relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari e che abroga le direttive del Consiglio 79/117/CEE e 91/414/CEE.*
- FAO. (2017). *The future of food and agriculture-Trends and challenge.* <https://www.fao.org/3/i6583e/i6583e.pdf>
- FAO and WHO. (2020). International Code of Conduct on Pesticide Management - Guidance on Pesticide Legislation - Second edition. In *International Code of Conduct on Pesticide Management - Guidance on Pesticide Legislation - Second edition.* FAO and WHO. <https://doi.org/10.4060/CB0916EN>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2021). Pesticides use, pesticides trade and pesticides indicators. Global, regional and country trends, 1990–2019. *FAOSTAT Analytical Brief Series n. 29*, 22. <http://www.fao.org/publications/card/en/c/cb6034en>
- Granella, S. J., Christ, D., Werncke, I., Bechlin, T. R., & Machado Coelho, S. R. (2018). Effect of drying and ozonation process on naturally contaminated wheat seeds. *Journal of Cereal Science*, 80, 205–211. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2018.03.003>
- Gur, L., Cohen, Y., Frenkel, O., Schweitzer, R., Shlissel, M., & Reuveni, M. (2022). Mixtures of Macro and Micronutrients Control Grape Powdery Mildew and Alter Berry Metabolites. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/PLANTS11070978>
- Hwang, E. S., Cash, J. N., & Zabik, M. J. (2001). Postharvest treatments for the reduction of mancozeb in fresh apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 3127–3132. <https://doi.org/10.1021/JF010234H>
- Joseph, C. G., Farm, Y. Y., Taufiq-Yap, Y. H., Pang, C. K., Nga, J. L. H., & Li Puma, G. (2021). Ozonation treatment processes for the remediation of detergent wastewater: A comprehensive review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 106099. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.106099>
- Karaca, H. (2018). The Effects of Ozone-Enriched Storage Atmosphere on Pesticide Residues and Physicochemical Properties of Table Grapes. *Https://Doi.Org/10.1080/01919512.2018.1555449*, 41(5), 404–414. <https://doi.org/10.1080/01919512.2018.1555449>
- Khadre, M. A., Yousef, A. E., & Kim, J. G. (2001). Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. *Journal of Food Science*, 66(9), 1242–1252. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2001.TB15196.X>
- Kim J-G. (1998). *Ozone as an antimicrobial agent in minimally processed foods.*
- Komárek, M., Čadková, E., Chrástný, V., Bordas, F., & Bollinger, J. C. (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects.

- Environment International*, 36(1), 138–151. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2009.10.005>
- Lazazzara, V., Vicelli, B., Bueschl, C., Parich, A., Pertot, I., Schuhmacher, R., & Perazzolli, M. (2021). Trichoderma spp. volatile organic compounds protect grapevine plants by activating defense-related processes against downy mildew. *Physiologia Plantarum*, 172(4), 1950–1965. <https://doi.org/10.1111/ppl.13406>
- Lykogianni, M., Bempelou, E., Karamaouna, F., & Aliferis, K. A. (2021). Do pesticides promote or hinder sustainability in agriculture? The challenge of sustainable use of pesticides in modern agriculture. *Science of The Total Environment*, 795, 148625. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.148625>
- Marcianò, D., Ricciardi, V., Marone Fassolo, E., Passera, A., Bianco, P. A., Failla, O., Casati, P., Maddalena, G., De Lorenzis, G., & Toffolatti, S. L. (2021). RNAi of a Putative Grapevine Susceptibility Gene as a Possible Downy Mildew Control Strategy. *Frontiers in Plant Science*, 12(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.667319>
- Minas, I. S., Vicente, A. R., Dhanapal, A. P., Manganaris, G. A., Goulas, V., Vasilakakis, M., Crisosto, C. H., & Molassiotis, A. (2014). Ozone-induced kiwifruit ripening delay is mediated by ethylene biosynthesis inhibition and cell wall dismantling regulation. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 229, 76–85. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2014.08.016>
- MIPAAF. (2014). *National action plan for sustainable use of plant protection products*. 59–105.
- Mirlean, N., Roisenberg, A., & Chies, J. O. (2007). Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil). *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 149(1), 10–17. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2006.12.024>
- Nazioni Unite. (2019). *World Population Prospects 2019: Highlights | Multimedia Library - United Nations Department of Economic and Social Affairs*. 2019. <https://www.un.org/development/desa/publications/world-population-prospects-2019-highlights.html>
- Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D. L., Nijs, L. den, Hockland, S., & Maafi, Z. T. (2011). Current Nematode Threats to World Agriculture. *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*, 21–43. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3_2)
- Opara. (2013). A review on the role of packaging in securing food system: Adding value to food products and reducing losses and waste. *African Journal of Agricultural Research*. [https://www.researchgate.net/publication/247168325\\_A\\_review\\_on\\_the\\_role\\_of\\_packaging\\_in\\_securing\\_food\\_system\\_Adding\\_value\\_to\\_food\\_products\\_and\\_reducing\\_losses\\_and\\_waste](https://www.researchgate.net/publication/247168325_A_review_on_the_role_of_packaging_in_securing_food_system_Adding_value_to_food_products_and_reducing_losses_and_waste)

- Ortega, P., Sánchez, E., Gil, E., & Matamoros, V. (2022). Use of cover crops in vineyards to prevent groundwater pollution by copper and organic fungicides. Soil column studies. *Chemosphere*, 303(May). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134975>
- Pandiselvam, R., Kaavya, R., Jayanath, Y., Veenuttranon, K., Lueprasitsakul, P., Divya, V., Kothakota, A., & Ramesh, S. V. (2020). Ozone as a novel emerging technology for the dissipation of pesticide residues in foods—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 38–54. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.12.017>
- Phillips, M. W. A. (2020). Agrochemical industry development, trends in R&D and the impact of regulation. *Pest Management Science*, 76(10), 3348–3356. <https://doi.org/10.1002/PS.5728>
- Powell, A., & Scolding, J. W. S. (2018). Direct application of ozone in aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture*, 10(2), 424–438. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12169>
- Pu, J., Wang, Z., & Chung, H. (2020). Climate change and the genetics of insecticide resistance. *Pest Management Science*, 76(3), 846–852. <https://doi.org/10.1002/PS.5700>
- Remondino, M., & Valdenassi, L. (2018). Different Uses of Ozone: Environmental and Corporate Sustainability. Literature Review and Case Study. *Sustainability 2018, Vol. 10, Page 4783*, 10(12), 4783. <https://doi.org/10.3390/SU10124783>
- Reuveni, R., & Reuveni, M. (1998). Foliar-fertilizer therapy — a concept in integrated pest management. *Crop Protection*, 17(2), 111–118. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(97\)00108-7](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(97)00108-7)
- Rey, R. P., Núñez Sellés, A., Baluja, C., & Lorenzo Otero, M. (2008). Ozonation Kinetics Of Glucosamine And N-Acetyl Glucosamine In Aqueous Medium. <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/01919519508547349>, 17(4), 463–467. <https://doi.org/10.1080/01919519508547349>
- Rienth, M., Crovadore, J., Ghaffari, S., & Lefort, F. (2019). Oregano essential oil vapour prevents Plasmopara viticola infection in grapevine (Vitis Vinifera) and primes plant immunity mechanisms. *PLoS ONE*, 14(9), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222854>
- Sayen, S., Mallet, J., & Guillon, E. (2009). Aging effect on the copper sorption on a vineyard soil: column studies and SEM-EDS analysis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 331(1), 47–54. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2008.11.049>
- Shezi, S., Samukelo Magwaza, L., Mditshwa, A., & Zeray Tesfay, S. (2020). Changes in biochemistry of fresh produce in response to ozone postharvest treatment. *Scientia Horticulturae*, 269, 109397. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2020.109397>

- Sonoda, K., Hashimoto, Y., Wang, S. L., & Ban, T. (2019). Copper and zinc in vineyard and orchard soils at millimeter vertical resolution. *Science of The Total Environment*, 689, 958–962. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.06.486>
- Sopher, C. D., Graham, D. M., Rice, R. G., & Strasser, J. H. (2002). Studies on the Use of Ozone in Production Agriculture and Food Processing. *Proceedings of the International Ozone Association*, 1.
- Suslow. (1998). Basics of Ozone Applications for Postharvest Treatment of Fruits and Vegetab. *Perishables Handling Quarterly*. <https://ucanr.edu/datastoreFiles/234-198.pdf>
- Umetsu, N., & Shirai, Y. (2020). Development of novel pesticides in the 21st century. *Journal of Pesticide Science*, 45(2), 54–74. <https://doi.org/10.1584/JPESTICS.D20-201>
- United Nations Environment Programme. (2022). *Environmental and Health Impacts of Pesticides and Fertilizers and Ways to Minimize Them Envisioning a chemical-safe world*. <https://wedocs.unep.org/xmlui/bitstream/handle/20.500.11822/38409/pesticides.pdf>
- Valdenassi, L., Franzini, M., Garbelli, P., & Camolese, M. (2016). Oxygen-ozone activity in making factory farms antibiotic-free for prevention of antibiotic resistance. *Ozone Therapy*, 1(2), 42–44. <https://doi.org/10.4081/ozone.2016.6274>
- Walia, S., Saha, S., & Rana, V. S. (2014). Phytochemical pesticides. *Advances in Plant Biopesticides*, 295–322. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2006-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2006-0_15)
- Wei, C., Zhang, F., Hu, Y., Feng, C., & Wu, H. (2017). Ozonation in water treatment: The generation, basic properties of ozone and its practical application. *Reviews in Chemical Engineering*, 33(1), 49–89. [https://doi.org/10.1515/REVCE-2016-0008/ASSET/GRAPHIC/J\\_REVCE-2016-0008\\_FIG\\_008.JPG](https://doi.org/10.1515/REVCE-2016-0008/ASSET/GRAPHIC/J_REVCE-2016-0008_FIG_008.JPG)
- Wheeler WB. (2002). (9) (PDF) PESTICIDES: Synthesis, Activity and Environmental Aspects. [https://www.researchgate.net/publication/291688542\\_PESTICIDES\\_Synthesis\\_Activity\\_and\\_Environmental\\_Aspects](https://www.researchgate.net/publication/291688542_PESTICIDES_Synthesis_Activity_and_Environmental_Aspects)
- Wightwick, A. M., Mollah, M. R., Partington, D. L., & Allinson, G. (2008). Copper fungicide residues in Australian vineyard soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2457–2464. <https://doi.org/10.1021/JF0727950>
- Yaseen, T., Ricelli, A., Turan, B., Albanese, P., & D’Onghia, A. M. (2015). Ozone for post-harvest treatment of apple fruits. *Phytopathologia Mediterranea*, 54(1), 94–103. [https://doi.org/10.14601/PHYTOPATHOL\\_MEDITERR-14478](https://doi.org/10.14601/PHYTOPATHOL_MEDITERR-14478)
- Zhao, Z., Xu, G., Han, Z., Li, Q., Chen, Y., & Li, D. (2013). Effect of Ozone on the Antioxidant Capacity of “Qiushui” Pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai cv. Qiushui) during Postharvest Storage. *Journal of Food Quality*, 36(3), 190–197. <https://doi.org/10.1111/JFQ.12021>

Zhu, F. (2018). Effect of ozone treatment on the quality of grain products. *Food Chemistry*, 264, 358–366. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.05.047>