



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN "SCIENZE CHIMICHE"

CICLO 25

COORDINATORE Prof. Carlo Alberto Bignozzi

Valutazione degli effetti di tecnologie elettrochimiche avanzate nella lotta contro patologia del
Pomodoro, in laboratorio ed in serra

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/02

Dottorando

Dott. Arevalo Moscoso Pablo Wilson

Tutore

Prof. Achille De Battisti

Anni 2010/2014

ABSTRACT

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI TECNOLOGIE ELETTROCHIMICHE AVANZATE NELLA LOTTA CONTRO PATOLOGIE DEL POMODORO, IN LABORATORIO ED IN SERRA

Si definisce patogeno di una pianta quell'organismo che, per completare una parte o tutto il suo ciclo vitale, cresce all'interno della pianta e, così facendo, determina effetti dannosi sulla pianta ospite stessa.

Dal momento che le piante sono continuamente minacciate dall'attacco dei patogeni, e vista la loro condizione di immobilità (che ne preclude ogni possibilità di fuga), ogni cellula è strutturata in modo tale da essere in grado di difendersi. Le piante possiedono sia delle difese pre-esistenti (sempre presenti), già precostituite ed individuabili tanto in barriere costruttive quanto in composti tossici o metaboliti secondari con proprietà antimicrobiche, sia difese inducibili, che conferiscono resistenza contro la maggior parte dei patogeni. Infatti, attraverso l'evoluzione, le piante hanno selezionato uno o più geni di resistenza (detti "geni R") che le proteggono dalle infezioni.

I noti problemi correlati con l'utilizzo dei fitofarmaci hanno spinto alla ricerca di nuove sostanze, possibilmente più "amichevoli" (nel senso di essere efficaci ma meno pericolose per l'ambiente). Negli ultimi anni si è stabilito che l'acqua elettrochimicamente attivata (AEA) ha una forte attività battericida e fungicida nei confronti di molti patogeni; ciò è primariamente riconducibile alla presenza dell'acido ipocloroso (forma di cloro attivo predominante a pH neutro). Le proprietà biocide dell'AEA, come dell'ipoclorito di sodio, hanno suscitato interesse nell'uso di tali sostanze anche in agricoltura, soprattutto in post-raccolta ma recentemente anche nella fase di pre-raccolta. Le sperimentazioni, eseguite su piante di pomodoro, hanno dimostrato che si possono ottenere risultati apprezzabili in campo a seguito dell'applicazione di AEA, così come di soluzioni di ipoclorito di sodio aventi pH e concentrazione di cloro libero opportuni. In particolare, si sono evidenziate differenze significative tanto nell'altezza raggiunta dalle piante trattate, rispetto al cosiddetto "controllo" (costituito da piante non trattate), quanto nell'incremento della produzione (esprimibile come libbre di prodotto per pianta).

Uno dei patogeni principali della pianta di pomodoro è rappresentato dal fungo Oidio (*Leveillula turica*): le sperimentazioni eseguite, mediante utilizzo dell'AEA, hanno evidenziato una maggiore resistenza al patogeno da parte delle piante trattate.

Dal momento che le piante di pomodoro trattate con AEA paiono manifestare un maggiore benessere, è plausibile che l'agente biocida in essa presente (l'acido ipocloroso) agisca in maniera diretta sulle piante stesse e non solo sui patogeni; ci si è pertanto posti l'obiettivo di approfondire tale influenza dal punto di vista cellulare e molecolare.

A tale scopo, lo studio è stato condotto sia su piante di tabacco, per le quali risultano disponibili informazioni sia dal punto di vista fisiologico che genetico-molecolare, che su piante di pomodoro. Entrambe le specie vegetali appaiono facilmente gestibili in condizioni di crescita controllata, in laboratorio o in apposita camera di crescita. La ricerca è stata realizzata attraverso la determinazione dei profili di espressione genica ottenuti dopo aver trattato le piante con AEA o con soluzioni di ipoclorito di sodio;

I risultati ottenuti su pomodoro mostrano come un primo trattamento con AEA sia in grado di incrementare rapidamente le quantità di mRNA relative ai geni che codificano per le proteine correlate alla patogenesi, quali PR-1a, PR-1b (proteasi), nonché quelle relative ai geni WRKY, legati ad altre attività connesse alla resistenza ai patogeni.

L'entità dell'effetto ottenuto suggerisce che la AEA non solo agisce come biocida nei confronti dei patogeni presenti sulle superfici fogliari della pianta, ma è anche in grado di innescare le difese endogene delle piante tramite un incremento nella produzione di proteine difensive rafforzandone in tal modo le difese. Il conseguente maggior benessere generale si riflette in una maggior crescita e in un sensibile miglioramento qualitativo della produzione.

CAPITOLO N° 1.

INTRODUZIONE

1..1. Problematica

Le perdite nella produzione agricola mondiale, causate da differenti patogeni, oscillano tra il 20% ed il 40%; almeno il 10% dei raccolti viene distrutto dai roditori e dagli insetti nei luoghi di immagazzinamento (1)(2). L'entità del problema varia in base alla regione, all'anno, e a seconda del tipo di coltivazione e di patogeno, che si manifesta come un fattore casuale. Così, per esempio, nel riso le perdite si aggirano intorno al 46%, mentre nel caso del grano raggiungono un 23.9%, e nella coltivazione delle patate si attestano al 32.3%. Tali dati sono da imputarsi per un 67% a malattie, mentre il restante 33% è dovuto ad erbacce e insetti (3).

L'uso di sostanze chimiche, come espediente per controllare patogeni e malattie, risale a svariati secoli orsono: Aristotele, nell'antica Grecia, e Catone a Roma, descrivono forme di fumigazione ed unguenti a base di zolfo.

All'inizio di questo secolo, lo zolfo, il rame e determinati veleni come la nicotina e l'arsenico, erano di uso abituale. Il grande salto nell'impiego di composti chimici è avvenuto con la seconda guerra mondiale, periodo in cui sono stati usati in forma massiva composti organoclorurati come DDT, lindano e dieldin, composti che vennero successivamente sostituiti dagli organofosfati, dai carbonati, e da una gamma sempre più ampia di erbicidi e fungicidi sintetici (1).

Fino alla fine degli anni '30, un controllo sulle diverse patologie era ottenuto tramite un utilizzo di prodotti chimici e pesticidi che si è limitato sostanzialmente a composti inorganici quali il mercurio e la miscela di solfato di rame e calce (la cosiddetta "poltiglia bordolese").

Attualmente, la maggioranza dei pesticidi utilizzati è costituita da composti organici prodotti sinteticamente. La chimica organica coinvolta nella produzione

di tali pesticidi è assai complessa; per questo motivo, il sistema di classificazione più utilizzato, nel caso dei pesticidi, è quello che si basa sul tipo di patologie che essi controllano; tra i gruppi principali vi sono: erbicidi, insetticidi e fungicidi (4).

Qualsiasi sostanza, o miscela di sostanze, destinata a prevenire, distruggere, repellere o mitigare qualsivoglia patogeno o vegetale nocivo, è classificabile quale pesticida; attualmente, in agricoltura, esistono più di 500 pesticidi con differenti formulazioni. I pesticidi possono essere classificati in base al loro target, alla loro modalità di azione, alle tempistiche della loro attività, o alla loro chimica (5).

Il principio di funzionamento di questi composti chimici è basato sulla loro tossicità, con riferimento ad almeno uno specifico target; d'altra parte, poiché il grado di specificità di tali composti non è assoluto, essi possono risultare tossici anche per altre specie, o almeno in grado di alterarne il comportamento.

Tali azioni non desiderate risultano spesso di fondamentali importanza, poiché in grado di modificare il processo agricolo o le funzioni biologiche del territorio. Infatti, si è stimato che meno dello 0,1% dei pesticidi applicati alle coltivazioni arriva realmente ad agire contro i patogeni target, mentre il resto permane nell'ambiente, rappresentando una contaminazione per suolo, acqua ed aria, e rappresentando quindi un veleno nei confronti di organismi verso i quali non era indirizzato (6).

Quella appena descritta è una realtà che ha diverse spiegazioni, alcune delle quali specifiche di determinati luoghi; tuttavia, nel loro insieme, le diverse motivazioni contribuiscono collettivamente a far sì che questo metodo di controllo dei parassiti sia considerato da molti specialisti, come assolutamente necessario (1). Ciò spiega come mai, negli ultimi anni, si sia verificato un sostanziale incremento nell'uso di queste sostanze; è il caso, ad esempio, della Germania, che nell'anno 2010 ha fatto uso di circa 9.420 tonnellate metriche di pesticidi, con un incremento di 800 tonnellate rispetto all'anno 2009 (7).

In linea con le crescenti esigenze ambientali (e con la crescente sensibilità sul tema), vi è pertanto la tendenza a ricercare molecole sempre più specifiche ed efficaci, che richiedano dosi applicative di minore entità: ciò rappresenta uno

sviluppo significativo, che ha mantenuto e stimolato in modo importante il mercato di questi prodotti.

1..2. Impatto dei pesticidi

La ricerca di mezzi efficaci per contrastare i diversi patogeni è una disputa costante. Le prime sostanze impiegate includevano metalloidi e metalli pesanti tossici, tra i quali piombo, arsenico e mercurio. Si è dimostrato che queste sostanze si accumulano nel suolo ed impediscono la crescita delle piante, arrivando inoltre ad interessare gli animali e l'uomo (8). Inoltre, tali sostanze risultano gradualmente meno efficaci, a causa del fatto che i patogeni generano resistenze. Per esempio, all'inizio del XX secolo, i coltivatori di agrumi arrivavano ad eliminare fino al 90% dei cocchi mediante la collocazione di un telo sopra l'albero infestato, e successivo trattamento a spruzzo con gas cianuro per un breve intervallo di tempo. Già nel 1930, la stessa tecnica è risultata capace di uccidere appena il 3% dei patogeni (2).

Nel corso del XIX secolo, gli scienziati hanno sintetizzato migliaia di composti organici, sebbene nella maggior parte dei casi non fosse nemmeno chiara la loro utilità. Negli anni '30, con l'espansione del settore agricolo, volta ad una veloce soddisfazione delle esigenze della crescente popolazione, e a seguito dei fallimenti dei primi pesticidi, gli agricoltori fecero ricorso a nuove sostanze, dimostrando l'utilità di tali composti chimici sintetici, noti come "di seconda generazione" (9).

Dopo alcuni anni di applicazione di queste nuove sostanze sintetiche, i problemi associati al loro utilizzo divennero evidenti, e vennero classificati in tre categorie:

1..2.1. Resistenza acquisita da parte dei patogeni

Il maggior problema degli agricoltori è rappresentato dal fatto che i pesticidi chimici sintetici perdono poco a poco la loro efficacia. Con il passare degli anni diventa necessario applicare quantità ogni volta maggiori di pesticidi (sempre nuovi e più poderosi) allo scopo di ottenere il medesimo grado di controllo. Nell'anno 1946 occorreva approssimativamente un chilo di pesticida per trattare

circa 60.000 quintali, ma già dopo alcuni anni, nel 1971, la stessa produzione necessitava di 64 chili di agente patogeno.

Con il passare degli anni, e con l'uso dei pesticidi, sono aumentate le specie ad essi resistenti, cosicché almeno 520 specie di insetti e aracnidi hanno dimostrato resistenza (9).

1..2.2. Recrudescenza e sviluppo di focolai secondari di parassiti

Il secondo problema dell'applicazione dei pesticidi organici sintetici nelle coltivazioni è rappresentato dal fatto che, quando il parassita è stato quasi eliminato, il problema non solo si riaccutizza, ma può crescere a livelli maggiori e più gravi. Anche le piccole popolazioni di insetti, che inizialmente non causavano preoccupazioni a causa del loro piccolo numero, improvvisamente cominciano a crescere ed a creare nuovi problemi. È il caso della coltivazione del cotone, dove gli acari si sono convertiti in un problema serio, ed il numero complessivo dei parassiti gravi del cotone è aumentato da sei a sedici.

1..2.3. Effetti negativi per l'ambiente e la salute degli esseri umani.

La preoccupazione principale della maggior parte delle persone è la possibilità di effetti nocivi per l'ambiente e per la salute conseguenti all'utilizzo dei pesticidi.

Tra gli anni 1950 e 1960, gli ornitologi evidenziarono una diminuzione radiale nella popolazione di molte specie, che si alimentavano in cima alla catena alimentare. Alcuni uccelli, quali l'aquila dalla testa bianca ed il falco pescatore (che è stato sul punto di estinguersi) risultarono particolarmente colpiti.

La contaminazione da composti organici è abbastanza diffusa, a causa dell'utilizzo di queste sostanze in ampie zone del pianeta e per il fatto che alcune di esse sono particolarmente inerti dal punto di vista chimico, ed in grado di trasferirsi da una fase all'altra, percorrendo grandi distanze attraverso diversi meccanismi di trasporto (9).

Nel 1999, il Servizio Geologico degli Stati Uniti ha riscontrato una contaminazione generalizzata delle risorse d'acqua; in particolare, più del 95% dei campioni raccolti nei corsi d'acqua e quasi il 50% dei campioni raccolti nei pozzi contenevano almeno un pesticida (10). In precedenza, l'Agenzia per la

Protezione dell'Ambiente degli Stati Uniti (EPA) aveva riportato che, a seguito del normale utilizzo agricolo, almeno 46 diversi pesticidi erano rinvenibili nelle acque sotterranee, e 76 nei corpi idrici superficiali (11).

Una volta nell'ambiente, l'agente pesticida può subire vari processi: primariamente il contaminante è oggetto di un certo grado di ritenzione, fenomeno che lo rende meno mobile, ma ne impedisce altresì il trasferimento ad altri mezzi, e ne ritarda la degradazione.

La degradazione dei pesticidi avviene grazie all'azione di funghi, batteri ed altri organismi, per i quali il pesticida costituisce una fonte di alimentazione, oppure a seguito di processi di decomposizione, che generalmente non coinvolgono organismi vivi, bensì fattori fisici come le radiazioni luminose (12).

1.3. Situazione in America Latina ed Ecuador

La crescita della popolazione può considerarsi un importante elemento per lo sviluppo dell'agricoltura: nel periodo compreso tra gli anni 1960 e 2010, la popolazione in America Latina e nei Caraibi si è sostanzialmente triplicata, superando le 581.383.000 unità, e con un tasso di crescita annuale pari all'1%. Di tale cifra, soltanto il 21% si trova nelle zone rurali, e solo il 15% delle persone economicamente attive lavorano nell'agricoltura (13).

Nonostante la crescente industrializzazione dell'agricoltura, la stragrande maggioranza degli agricoltori in America Latina è costituita da contadini o piccoli produttori, che coltivano ancora nelle valli e ai margini dei villaggi rurali con metodi tradizionali e di sussistenza. Le unità produttive contadine hanno raggiunto i 16 milioni circa alla fine del 1980, occupando approssimativamente 160 milioni di ettari e coinvolgendo 75 milioni di persone, che rappresentano quasi i due terzi della popolazione rurale dell'America Latina (7).

In Brasile, i piccoli produttori contadini controllano circa il 33% della superficie seminata a mais, il 61% di quella coltivata a fagioli ed il 64% delle aree di coltivazione della manioca. In Ecuador, il settore contadino occupa più del 50% della superficie destinata a colture alimentari quali il mais, i fagioli e l'orzo. In

Messico, i contadini occupano almeno il 70% delle aree destinate alla coltivazione del mais ed il 60% della superficie dedicata ai fagioli (14).

Tra i principali prodotti coltivati in America Latina si annovera la canna da zucchero, con una produzione annua di 823.067.350 tonnellate metriche; al secondo posto si trova la soia, con 136.036.250 tonnellate metriche, mentre al terzo posto compare il mais, con una produzione di 91.780.992 tonnellate metriche. Per quanto concerne i principali prodotti esportati, al primo posto si trova il grano, con 12.302.513 tonnellate metriche, mentre al secondo e terzo posto si hanno il mais e la soia, con 8.799.490 e 3.998.548 tonnellate metriche, rispettivamente (7).

Per migliorare i rendimenti delle coltivazioni in America Latina, vengono naturalmente utilizzati prodotti chimici di sintesi, il paese che primariamente fa uso di agro farmaci è la Colombia, con un valore di 14,50; segue l'Ecuador con 12,27 e successivamente il Cile, con 11,63; tutti i dati si riferiscono all'anno 2010 (13).

Un altro componente largamente utilizzato in agricoltura è rappresentato dai fertilizzanti. Analizzandone il consumo, tramite l'indicatore "utilizzo di nutrienti per ettaro di superficie coltivabile e di coltivazione permanente" (tonnellate di nutrienti/1000 ettari), risulta che il primo paese dell'America Latina per consumo di fertilizzanti è il Cile, con un valore di 72,33, seguito dall'Uruguay con 65,16 e dalla Colombia, con 58,59 (13).

La matrice produttiva dell'America Latina ha il suo fondamento principale nell'agricoltura, e questa realtà non è estranea all'Ecuador, per il quale l'attività agricola rappresenta uno dei pilastri fondamentali dell'economia; il territorio e la varietà climatica esistente permettono una grande diversità di coltivazioni.

La regione agricola più importante è la montagna, dove clima e suolo sono favorevoli alla coltivazione di cereali, semi oleosi, foraggio, frutta ed ortaggi; la produzione fornisce cibo principalmente per il consumo interno.

In altre aree si presentano condizioni favorevoli per le coltivazioni tropicali, ed esistono grandi zone in cui l'agricoltura è possibile solo con l'aiuto dell'irrigazione artificiale: in tali aree, la terra viene utilizzata per coltivazioni di alto valore, come frutta ed ortaggi. Ciò si realizza in particolare nelle province

costiere, che generano una produzione importante, principalmente per l'esportazione (15).

Nell'attività agricola predomina la coltivazione dei cereali, e spicca in particolare la produzione di mais duro, che nell'anno 2011 si è attestata in circa 830.150 tonnellate; questa produzione viene realizzata principalmente nelle regioni costiere e, a seconda del tipo di coltivazione, la zona si amplia verso ovest e verso il centro del paese, essendo Guayas, Manabí e El Oro le province più produttive. Il mais dolce, o choclo, presenta invece una produzione di 68.589 tonnellate metriche, e trova realizzazione principalmente nelle aree montane (Sierra) (15).

La coltivazione del riso si concentra nel centro-ovest del paese, nelle province del Guayas e Manabí, con una produzione di 1.477.941 tonnellate metriche, nell'anno 2011. Oltre ai prodotti già menzionati, vengono coltivati altri cereali, quali l'avena, la soia, il fagiolo ed il grano.

Le coltivazioni industriali sono molto varie, e comprendono semi oleosi commestibili, oleosi industriali ed altre coltivazioni suscettibili di industrializzazione.

In aggiunta, nelle regioni costiere si individuano coltivazioni di palma africana, con una produzione totale di 2.097.356 di tonnellate metriche nel 2011; la canna da zucchero presenta una produzione di 4.969.697 tonnellate metriche, mentre per il cacao ed il caffè la produzione ammonta a 22.463 e 23.829 tonnellate metriche, rispettivamente.

Le colture foraggere, la cui coltivazione è strettamente legata all'allevamento del bestiame, sono diffuse in tutto il paese: spiccano quelle di erba medica, di sorgo, orzo da foraggio e della segale, che provvedono al consumo interno.

La produzione orticola, all'interno del paese, è organizzata a zone ed è caratteristica soprattutto della regione andina, specialmente nelle province di Chimborazo, Carchi e Cotopaxi; si hanno poi esempi in aree più remote, quali Loja, Azuay, Cañar e Pichincha. Il più importante degli ortaggi è la patata, che ha raggiunto nell'anno 2011 una produzione di 339.038 tonnellate metriche a livello nazionale. A questa fanno seguito la manioca, con 68.413 tonnellate metriche, il broccolo, con 72.396 tonnellate metriche, ed il pomodoro da tavola,

con 36.221 tonnellate metriche, che non basta a coprire la domanda interna del paese.

La produzione di frutta è di considerevole importanza per il paese: l'esistente diversità di clima permette la coltivazione di frutta tropicale, subtropicale nonché caratteristica dei climi temperati. Le colture principali comprendono la banana, con una produzione nell'anno 2011 che ha superato i 7.427.000 tonnellate metriche; la produzione di maracuyá (frutto della passione) ha raggiunto le 52.684 tonnellate metriche, mentre quella di naranjilla ed ananas si è attestata a 20.005 e 126.454 tonnellate metriche, rispettivamente. Tutte le colture citate sono coltivate nella regione costiera dell'Ecuador; al contrario, il pomodoro da albero appartiene alla regione montuosa, ed ha raggiunto una produzione di 12.586 tonnellate metriche (15).

È degna di nota anche la floricoltura, prodotto di esportazione del paese, che trova collocazione principalmente nelle regioni montane ecuadoriane, su piccoli appezzamenti ad elevata produttività: spiccano in particolare le coltivazioni di garofani, gladioli, e rose (16).

L'Ecuador, come paese agricolo, ha fatto tradizionalmente ricorso ai pesticidi, per il trattamento delle colture agricole. Nell'anno 2009, sono state acquisite circa 4.351 tonnellate metriche di Propiconazol 25%, sostanza fungicida ad applicazione fogliare e con azione preventiva e curativa (agisce all'interno della pianta, controllando il patogeno; i migliori risultati si ottengono se il prodotto viene applicato quando la malattia è nelle prime fasi di sviluppo). Nell'anno 2012 sono state altresì acquistate 8.117 tonnellate metriche di Glifosato, l'erbicida più diffuso in ambito nazionale: si tratta di un aminofosfonato, analogo dell'amminoacido naturale glicina, ed è stato sviluppato per l'eliminazione di erbe ed arbusti. Sempre con riferimento all'anno 2012, l'acquisizione di prodotti per l'agricoltura è cresciuta del 14,1% rispetto alla domanda dell'anno 2011: risalta in particolare l'aumento del 5% del consumo di erbicidi; invece, con riferimento al 2013 (fino al mese di maggio) si registra un incremento del 67% nella linea degli insetticidi.

Poiché in Ecuador il ricorso ai pesticidi è una pratica ampiamente utilizzata dagli agricoltori, la loro cattiva gestione ha generato un preoccupante impatto

ambientale in certe aree del paese. Alcune sostanze chimiche, il cui utilizzo è stato vietato a livello mondiale, risultano presenti in diverse matrici ambientali, come riportato ad esempio nel libro VI della Qualità Ambientale, negli allegati 1-6.

La più alta concentrazione di composti organici persistenti è stata rilevata nei sedimenti del fiume Pisque, che drena le aree floricole di Cayambe, e nel suolo delle coltivazioni di banane di Quevedo: in tali aree, si sono rilevate concentrazioni preoccupanti rispettivamente di heptacoloro (11.3 ppb) e di DDE (30.7 ppb), metabolita del DDT, a conferma dell'ostinazione locale nell'utilizzo di questi pesticidi (17).

1.4. La ricerca di soluzioni alternative, a minore impatto ambientale

Nell'esercizio della medicina, è comune ricorrere a due metodologie per trattare le malattie infettive: eliminare o arrestare l'agente patogeno che causa il problema, oppure stimolare il sistema immunitario del paziente (2).

Questi medesimi approcci possono essere impiegati per il controllo dei parassiti delle coltivazioni. Il primo approccio si attua ricercando la tecnologia chimica in grado di sradicare o ridurre le infezioni, mentre il secondo prevede una gestione ecologica che stimoli il sistema di difesa mediante il ricorso ad organismi o ad alcune sostanze chimiche appropriate (4). La gestione secondo questi due approcci è nota sotto il nome di Gestione Biologica Integrata (MIP).

La Gestione Biologica Integrata si propone di gestire uno o più fattori ecologici o biologici, in modo tale che le colture risultino protette senza trasformazioni per il resto dell'ecosistema, e senza mettere a rischio l'ambiente o la salute dell'uomo. Secondo Bernard J. Nebel, la gestione biologica integrata prevede quattro azioni:

1.4.1. Controllo Culturale

Questa categoria si riferisce al comportamento nella gestione delle coltivazioni, come la rimozione di piante che fungono da attrazione. Ad esempio, esistono colture ad azione repellente, come il rosmarino (*Rosmarinus officinalis*), efficaci

contro lepidotteri, coleotteri e ditteri; il timo (*Thymus vulgaris*) è invece un repellente per il verme del cavolo (18).

Un'altra buona pratica agricola è rappresentata dalla rotazione delle coltivazioni durante l'anno, che richiede un'opportuna valutazione dell'importanza fitosanitaria dei nutrienti, una selezione dei semi, e un'opportuna associazione delle colture (19).

1..4.2. Controllo mediante ricorso a nemici naturali

Si configura nell'uso di nemici naturali, affinché controllino la specie obiettivo, senza andare ad intaccare altre specie benefiche. Gli entomologi calcolano che delle 50.000 specie conosciute di insetti, soltanto l'1% ha la possibilità di convertirsi in parassita, poiché uno o più nemici naturali ne controllano il loro sviluppo (9).

Tra i diversi esempi di questa pratica possiamo citare il ricorso a funghi come la *Beauveria bassiana* che agisce contro Coleotteri, Lepidotteri, ed insetti dell'ordine Hemiptera (comprendente circa 50.000-80.000 specie); analogamente, il *Verticillium chlamydosporium* è efficace contro i Nematodi. Con riferimento ai protozoi, il *Neogregaridia* agisce contro la peste del punteruolo del cotone (*Anthonomus grandis*) (20).

Esistono tre specie di batteri con capacità di esercitare un controllo sugli insetti: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus* e *Bacillus popilliae*: durante il loro processo di sporulazione, essi producono cristalli proteici con effetto insetticida e/o alcune tossine con la medesima efficacia.

1..4.3. Controllo Genetico

Quasi tutti gli insetti che si cibano di piante e gli organismi patogeni di queste attaccano solo una specie o alcune specie affini. Tale specificità è indice di una incompatibilità genetica tra i parassiti e le specie che non vengono da questi aggredite. La maggior parte delle strategie di controllo genetico prevede di impiantare nella specie ospite la medesima caratteristica incompatibile, vale a dire, la resistenza all'attacco da parte del parassita. Queste resistenze possono essere di tre tipi: (21)

1..4.3.1. Controllo con barriere chimiche

Queste barriere sono costituite da alcune sostanze chimiche prodotte dalle piante che intendiamo proteggere: tali sostanze hanno effetto fatale o repellente. Una volta che i genetisti trovano una barriera, utilizzano la selezione e la riproduzione incrociata per rafforzare tale caratteristica nella pianta designata. Un esempio è rappresentato dalla varietà di grano che resiste alla mosca fitofaga, producendo un agente tossico in grado di uccidere le larve che si alimentano della pianta stessa (22).

1..4.3.2. Controllo con barriere fisiche

Sono caratteristiche strutturali che impediscono l'attacco del parassita; queste caratteristiche vengono esaltate nelle piante inizialmente vulnerabili, mediante una riproduzione selettiva (4).

1..4.3.3. Controllo dei maschi sterili

Consiste nell'inondare le popolazioni naturali con maschi sterili, prodotti in laboratorio. Come esempio, possiamo citare il caso della lotta al verme piralide: in laboratorio vengono allevate quantità enormi di larve; quando queste si trasformano in ninfe, vengono sottoposte a radiazioni di energia sufficiente da farle divenire sterili. Esse vengono successivamente liberate nelle aree infestate, producendo risultati talmente efficaci che, ad esempio, negli Stati Uniti il parassita è stato completamente debellato.(22)

1..4.4. Controllo chimico naturale

Consiste nell'isolare, identificare, sintetizzare ed impiegare le sostanze chimiche (ormoni, feromoni) prodotte dagli insetti stessi, per sconvolgere il loro ciclo vitale; tale approccio è caratterizzato da un'elevata specificità nei confronti del parassita che si intende colpire, e risulta assolutamente non tossico. Un esempio è dato dall'insetticida denominato Mimic, una variante sintetica dell'ecdisone, l'ormone della metamorfosi degli insetti. Consente l'avvio della trasformazione delle larve, ma non la conclusione del processo, per cui le larve rimangono intrappolate nella loro vecchia pelle e finiscono col morire di fame; è specifico per falene, farfalle e nei confronti del verme della mela (4).

1..5. Le potenzialità dell'acqua elettrochimicamente attivata

Tra tutti i disinfettanti conosciuti, le soluzioni elettrochimicamente attivate manifestano la più alta attività biocida, unitamente ad una bassa o inesistente tossicità per gli organismi a sangue caldo.

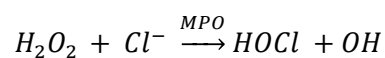
Gli ingredienti attivi di queste soluzioni sono composti contenenti ossigeno e cloro (acido ipocloroso, ipoclorito, biossido di cloro) e composti perossidici (radicali ossidrilici, anioni perossido, ossigeno di singoletto, anioni superossido, ozono, ossigeno monoatomico).

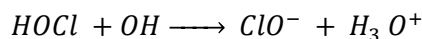
Una siffatta combinazione di ingredienti attivi impedisce lo sviluppo di una resistenza microbica all'effetto biocida di tali soluzioni; inoltre, la bassa concentrazione totale degli ingredienti attivi garantisce della loro sicurezza per l'uomo e per l'ambiente, per lunghi periodi.

Le soluzioni elettrochimicamente attivate sono agenti germicidi universali che possono essere applicati a tutti i livelli di disinfezione e pulizia, per trattamenti sterilizzanti, tanto per la sterilizzazione di superfici, quanto per applicazioni antisettiche. Non lasciano alcun residuo sintetico, sono scarsamente corrosive e non danneggiano le superfici dei dispositivi.

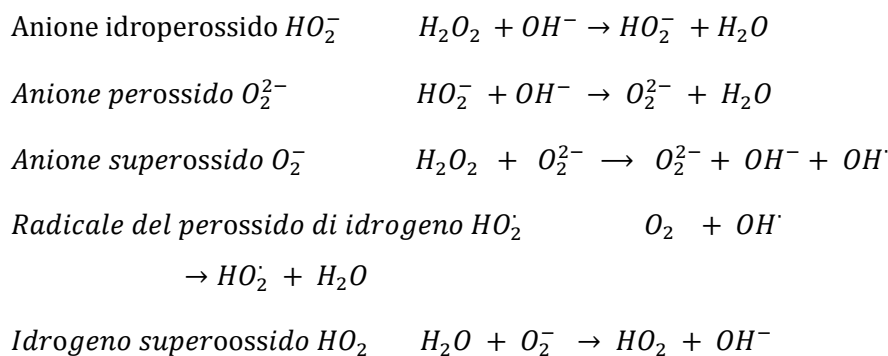
Come presentato in un gran numero di pubblicazioni scientifiche, gli organismi multicellulari, incluso l'uomo, sono in grado di sintetizzare complesse miscele di composti ossidanti metastabili (simili a quelli contenuti nelle soluzioni elettrochimicamente attivate) attraverso speciali strutture cellulari, per difendere l'organismo dai patogeni e dai composti estranei (23).

Gli ossidanti generati dai fagociti, che vengono attivati durante il meccanismo di difesa contro agenti patogeni, giocano un ruolo centrale nelle difese antibatteriche dell'ospite. L'attivazione dei fagociti causa la generazione del superossido (che poi si trasforma in ossigeno e perossido di idrogeno) ed il rilascio dell'enzima Myeloperoxidase (MPO). Tale enzima catalizza la reazione del perossido di idrogeno con gli ioni cloruro per dare HOCl, potente ossidante (24), secondo la reazione

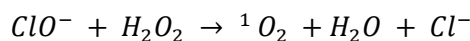




La formazione di H_2O_2 e di $HOCl$, in un brevissimo intervallo di tempo e in un piccolissimo volume del mezzo acquoso, viene inevitabilmente seguita da una serie di decomposizioni spontanee e d'interazione tra i prodotti di reazione, portando alla formazione di specie attive simili a quelle prodotte per radiolisi o elettrolisi dell'acqua:



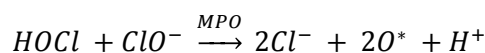
Contemporaneamente, risulta possibile anche la formazione di 1O_2 (ossigeno di singoletto), specie estremamente reattiva, la cui presenza è stata verificata durante le reazioni di fagocitosi:



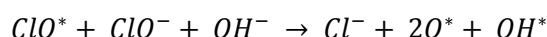
In presenza di $HOCl$ e di ClO^- è possibile, in mezzo acquoso, la formazione di radicali liberi ClO^\cdot , Cl^\cdot , e HO^\cdot :



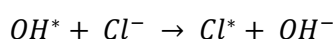
Secondo la teoria dei processi catalitici, il cammino più probabile sembra essere la formazione di un complesso attivato transiente con MPO; una sua successiva dissociazione porta alla formazione di O^\cdot :



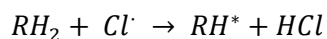
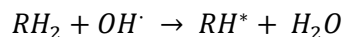
Il radicale ipoclorito può partecipare alle reazioni di formazione di O^\cdot e di HO^\cdot :



cui fa seguito la formazione di radicali cloruro:



I radicali formati prendono parte alla distruzione della cellula, ossidandone i biopolimeri



Una siffatta miscela, metastabile, di composti formati durante la fagocitosi, è un mezzo molto efficace per la distruzione dei microrganismi: esistono infatti molte possibilità di cambiamento (danno irreversibile) delle funzioni essenziali dei biopolimeri dei microrganismi, a livello di trasmissione elettronica.

Particelle metastabili con differenti valori di potenziale elettrochimico possiedono uno spettro di azione universale, cioè sono in grado di danneggiare tutti i grandi gruppi sistematici dei microrganismi (batteri, micobatteri, virus, funghi, spore) senza peraltro danneggiare i tessuti umani e altri organismi multicellulari (25).

Esistono diversi dispositivi elettrochimici che consentono la sintesi di soluzioni contenenti le suddette specie; a seconda del pH della soluzione sintetizzata, i cosiddetti "anoliti" sono specificati attraverso le sigle A, AN o ANK.

Partendo infatti da una soluzione salina (es. NaCl fino a 5 g/l), caratterizzata da un pH compreso tra 6.5 e 7.5 ed un potenziale redox (ORP) compreso tra +300 e +400 mV (rispetto ad AgCl), e facendola passare attraverso un reattore con diaframma, si possono ottenere anoliti differenti: l'anolita A (electrochemically activated acid anolyte) viene ottenuto mediante un solo passaggio della soluzione salina attraverso la camera anodica, con pH < 5.0; ORP tra +800 e +1200 mV (vs. AgCl) e con componenti attivi come Cl₂, HClO ed HCl; anche l'anolita AN (electrochemically activated neutral anolyte) è ottenuto mediante un unico passaggio della soluzione salina all'anodo, ma il processo è caratterizzato da una pressione all'interno della camera anodica maggiore rispetto a quella catodica; il prodotto presenta caratteristiche differenti dal precedente: pH = 6.0 ± 1.0; ORP tra +600 e +900 mV vs. AgCl, componenti attivi come HClO, ClO⁻, O₃, HO[·], ed HO₂[·]. Infine, l'anolita ANK (electrochemically activated neutral anolyte) viene ottenuto mediante un primo passaggio della soluzione salina al catodo (catolita: pH = 9 ÷ 12 e ORP = - 300 ÷ - 860 mV vs. AgCl), ed un successivo passaggio all'anodo, a dare un prodotto

con pH = 7.7 ± 0.5 , ORP compreso tra + 250 e + 800 mV vs. AgCl, e contenente componenti attivi come HOCl, ClO⁻, HO₂⁻, HO₂[•], HO[•], ¹O₂ e Cl[•] (26).

A causa dei diversi processi tecnologici impiegati per generarle, le soluzioni A, AN e ANK differiscono l'una dall'altra sia per le proprietà chimico-fisiche che per l'attività biocida correlata; al momento, l'anolita ANK pare essere la migliore tra le diverse soluzioni elettrochimicamente attivate.

ANK ha un "tempo di vita" sufficiente all'esecuzione della procedura di disinfezione; dopo il suo utilizzo, si degrada spontaneamente senza portare alla formazione di xenobioti (in biologia, sono così chiamati i prodotti di sintesi) tossici, e non richiede alcuna neutralizzazione prima di essere smaltito.

Una miscela di principi attivi metastabili elimina la capacità di adattamento all'effetto battericida di ANK dei microrganismi. Inoltre, la piccola concentrazione totale di ossigeno attivo e dei composti del cloro garantisce un'assoluta sicurezza per l'uomo e l'ambiente, anche a seguito di un uso prolungato dell'anolita.

ANK uccide i microrganismi di eziologia batterica, virale e fungina (Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, virus dell'epatite B, poliomielite da virus, HIV, adenovirus, gli agenti patogeni della tubercolosi, la salmonellosi, dermatomicosi e altre). La sua efficacia supera di gran lunga le clorammine, l'ipoclorito di sodio e la maggior parte degli altri disinfettanti ed agenti sterilizzanti.

ANK è facile da usare e di pronto uso negli ospedali. Contrariamente ad altri disinfettanti, può essere utilizzata come una soluzione multifunzionale a tutti i livelli di disinfezione, sia come detergente che come sterilizzante allo stesso tempo (26)(27).

1..6. Riferimenti Bibliografici

1. LUIS L. VÁZQUEZ MORENO. *Manejo Integral de las plagas*. 2008. Ciudad de La Habana: Palcograf, 2008. ISBN ISBN 978-959-05-0543-0.

2. NEBEL, Bernard J, WRIGHT, Richard T and JAVIER DÁVILA, Francisco. *Ciencias ambientales: ecología y desarrollo sostenible*. México: Prentice Hall, 1999. ISBN 9701702336 9789701702338.
3. JENNNY GUSTAVSSON CHRISTEL CEDERBERG and ROBERT VAN OTTERDIJK ALEXANDRE MEYBECK. *Perdidas y desperdicio de alimentos en el mundo* [online]. Alemania: FAO, 2011. [Accessed 19 July 2013]. ISBN 978-92-5-307205-7. Available from: <http://www.fao.org/docrep/016/i2697s/i2697s.pdf>
4. ELMER L. COOPER, L. DEVERE BURTON. *Agrociencia: Fundamento y Aplicaciones*. 4. Cengage Learning, Mx - Cengage, 2009.
5. DE OLIVEIRA NOBRE AZEVEDO, A.S. *Assessment and Simulation of Atrazine as Influenced by Drainage and Irrigation: An Interface Between RZWQM and ArcView GIS* [online]. Iowa State University, 1998. Available from: <http://books.google.com.ec/books?id=ShjyNwAACAAJ>
6. PIMENTEL, David and LEVITAN, Lois. Pesticides: Amounts Applied & Amounts Reaching Pests. *BioScience*. February 1986. Vol. 36, no. 2, p. 86–91. a9hReports on findings which suggest that less than .1 % of pesticides applied to crops reaches target pests. How excess pesticide moves through the environment, contaminating soil and water; Amount of pesticides used in the U.S.; Uneven distribution of pesticides; Ways in which pesticides travel through the atmosphere, water, and plants.
7. FAO. *FAOSTAT*. [no date].
8. DOMÈNECH, Xavier. *Química ambiental de sistemas terrestres*. Barcelona [etc.] : Reverté, 2006. ISBN 8429179062 9788429179064.
9. NEBEL, Bernard J. and RICHARD T. WRIGHT. *CIENCIAS AMBIENTALES*. Sexta. México: PRENTICE HALL, 1999. ISBN 970-17-0233-6.
10. KEMBLE, Nile E., HARDESTY, Douglas K., INGERSOLL, Christopher G., KUNZ, James L., SIBLEY, Paul K., CALHOUN, Daniel L., GILLIOM, Robert J., KUIVILA, Kathryn M., NOWELL, Lisa H. and MORAN, Patrick W. Contaminants in Stream Sediments From Seven United States Metropolitan Areas: Part II—Sediment Toxicity to the Amphipod *Hyalella azteca* and the

Midge *Chironomus dilutus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 6 November 2012. Vol. 64, no. 1, p. 52–64. DOI 10.1007/s00244-012-9815-y.

11. ARIAS-ESTÉVEZ, Manuel, LÓPEZ-PERIAGO, Eugenio, MARTÍNEZ-CARBALLO, Elena, SIMAL-GÁNDARA, Jesús, MEJUTO, Juan-Carlos and GARCÍA-RÍO, Luis. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. February 2008. Vol. 123, no. 4, p. 247–260. DOI 10.1016/j.agee.2007.07.011.

12. DAVIS, Mackenzie Leo and GONZÁLEZ Y POZO, Virgilio. *Ingeniería y ciencias ambientales*. México: McGraw-Hill, 2005. ISBN 9701049780 9789701049785.

13. EL BANCO MUNDIAL. *Datos | El Banco Mundial* [online]. Línea. Banco Mundial, [no date]. [Accessed 13 August 2013]. Base de Datos. Available from: <http://datos.bancomundial.org/>

14. ALTIERI, Miguel A. Applying agroecology to enhance the productivity of peasant farming systems in Latin America. *Environment, Development and Sustainability*. 1999. Vol. 1, no. 3-4, p. 197–217.

15. MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA, ACUACULTURA Y PESCA. SINAGAP | Superficie, Producción y Rendimiento. *Sistema de Información* [online]. [Accessed 13 August 2013]. Available from: <http://servicios.agricultura.gob.ec/sinagap/index.php/superficie-produccion-y-rendimiento>

16. 1-2012: SINAGAP | Comercio Exterior - Comercio Exterior [online]. Línea. Ministerio de Agricultura, Ganaderia, Acuacultura y Pesca, 2012. [Accessed 12 August 2013]. Comercio Exterior. Available from: <http://servicios.agricultura.gob.ec/sinagap/index.php/boletines-comercio-exterior?download=1:boletin-no-1-enero-2012&start=15>

17. MONTAÑO ARMIJOS, Mariano de Jesús. INVENTARIO DE PLAGUICIDAS COPs EN EL ECUADOR. [online]. 2011. [Accessed 13 August 2013]. Available from: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/16314>

18. CAMPOS-ALMENGOR, O. Manejo integrado de la broca del café en una finca de producción comercial en Guatemala. In : Simposio sobre Situación Actual y Perspectivas de la Investigación y Manejo de la Broca del Café en Costa Rica, Cuba, Guatemala y México. Sociedad Mexicana de Entomología y El Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, Chiapas, México [online]. 2005. p. 38–45. [Accessed 14 August 2013]. Available from: <http://www.bionica.info/biblioteca/Barrera2005SimposioBrocaCaf%C3%A9.pdf#page=50>
19. FAUTO H. CISNEROS. *El manejo integral de plagas* [online]. Lima Perú : La Molina, 1992. [Accessed 22 July 2013]. Available from: <http://cipotato.org/library/pdfdocs/ResGuide41146.pdf>
20. GONZÁLEZ-CASTILLO, Marily, AGUILAR, Cristóbal Noé and RODRÍGUEZ-HERRERA, Raúl. Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. *Revista Científica* [online]. 2012. Vol. 4, no. 8. [Accessed 15 August 2013]. Available from: <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM8/5.pdf>
21. AGRIOS, George N and Guzmán Ortiz. *Fitopatología*. México: UTEHA : Noriega, 1995. ISBN 9681851846 9789681851842.
22. Agrociencia. Fundamentos y Aplicaciones/ Agriscience Fundamentals and Applications. Cengage Learning Latin America, 2009. ISBN 9786074811162 6074811164.
23. V. M. BAKHIR, B. I. LEONOV, S. A. PANICHEVA, V. I. PRILUTSKY and N. Y. SHOMOVSKAYA. Issues of chemical composition and operating properties of chlorine based inorganic liquid chemical germicides :: Vitold Bakhir Electrochemical Systems and Technologies. *Published in VNMT magazine* [online]. 2003. Vol. # 4. [Accessed 16 August 2013]. Available from: <http://www.bakhir.com/publications/10-HClO-NaClO-Article.htm>
24. Y. KAWAI,, H. KIYOHAWA, Y. KIMURA, Y. KATO, K. TSUCHIYA and J. TERAOKA. *Biochemistry*. 2006.
25. S.A. PANICHEVA. Medical and technical systems and technologies for synthesis of electrochemically activated solutions. *Moscow: VNIIMT*. 1999. P. 122.

26. V.M. BAKHIR, Y.G. ZADOROZHNY, B.I. LEONOV, S.A. PANICHEVA and V.I. PRILUTSKY. Some aspects of getting and using electrochemically activated anolyte ANK. In : *Proceeding of the Third International Symposium "Electrochemical activation in medicine, agriculture and industry."* Moscow: VNIIMT, 2001. p. 3–24.
27. V.B. ROVINSKAYA and O.I. SUHOVA. An experience of electrochemical activated solutions use in multifield hospital. In : *Electrochemical activation in medicine, agriculture and industry.* Moscow: VNIIMT, 1997. p. 70–72.

CAPITOLO N° 2.

AGRICOLTURA IN ECUADOR

L'Ecuador fin dall'inizio è stato un Paese fondamentalmente agricolo in funzione dell'hacienda tradizionale tanto nella regione andina quanto sulla costa del Pacifico e la sua produzione riforniva sia la domanda interna sia i mercati esterni.

L'auge del cacao (1880-1920) e bananiero (1959-1960) ha generato un aumento della domanda di manodopera nelle piantagioni della costa. Questo processo è stato la causa di importanti flussi migratori dalle Ande verso la costa e ha accelerato il processo di urbanizzazione in questa zona, in particolare attorno al centro commerciale e marittimo di Guayaquil (1).

A partire dagli anni '60 sono iniziati profondi cambiamenti nell'economia del Paese. Come conseguenza della crisi della produzione bananiera, l'abbassamento del prezzo del caffè e la crisi politica interna dell'Ecuador. Questi fattori sono stati quelli che hanno permesso un cambio nella matrice produttiva del Paese alla ricerca della diversificazione dell'economia e la trasformazione della produzione verso una modernizzazione del settore agricolo.

La storia moderna dell'Ecuador è caratterizzata, nell'ambito economico, dall'auge e la crisi dei settori di esportazione. Tradizionalmente lo sviluppo dei settori delle esportazioni agricole è stato un fattore determinante nella dinamica dell'economia ecuadoriana. Negli ultimi anni si è sviluppata l'agricoltura non tradizionale che viene utilizzata soprattutto per l'esportazione di prodotti come banane, cacao, fiori e altre.

I prodotti che tradizionalmente l'Ecuador ha esportato nel mondo, hanno avuto una tendenza crescente negli ultimi cinque anni, come per esempio, banana y platano da USD 1,302 milioni nel 2007, nel 2011 sono stati esportati USD 2,246 milioni. Cacao e derivati hanno avuto un accrescimento graduale delle loro esportazioni, nel 2007 sono stati esportati USD 239 milioni e nel 2011 sono stati esportati USD 586 milioni. Nel novembre 2012 le esportazioni di questo

prodotto sono di USD 403 milioni. Anche il caffè e derivati hanno avuto una tendenza crescente nelle loro esportazioni in questi ultimi cinque anni, da USD 123 milioni nel 2007, nel 2011 si sono esportati USD 260 milioni e nel novembre 2012 USD 237 milioni (2).

In relazioni ai prodotti primari non tradizionali dall'Ecuador al mondo sono costituiti principalmente da Fiori naturali che nell'anno 2007 sono stati esportati per un valore di USD 469.424,00 nel 2012 USD 700.709,00, mentre la Frutta è stata esportata nel 2012 per USD 59.952,00 e il Tabacco nel 2012 per USD 41.392 en ramo. La tendenza delle esportazioni di questi prodotti si è mantenuta crescente durante questi ultimi cinque anni principalmente per quanto riguarda i Fiori naturali (2)(3).

Mentre la produzione di coltivazioni tradizionali per il consumo interno presenta una decrescita come nel caso degli ortaggi come il pomodoro da tavola di cui nell'anno 2007 si producevano 61.987,00 tonnellate metriche e nell'anno 2011 sono state prodotte solo 36.221,00 tonnellate metriche con un rendimento di 22,60 tonnellate metriche/ettaro, la patata nel 2010 ha generato 386.798,00 tonnellate metriche con un rendimento di 8,74 tonnellate metriche/ettaro mentre nel 2012 sono state generate 339.038 tonnellate metriche e un rendimento di 7,78 tonnellate metriche/ettaro per cui è stato necessario comprare questi prodotti per soddisfare le necessità del mercato interno (4).

Per il nostro studio delle coltivazioni in Ecuador inizieremo con le coltivazioni tradizionali da esportazione per poi analizzare le coltivazioni da consumo interno tradizionali.

2..1. Banana o platano (Musa spp.)

L'inizio del "boom" bananiero in Ecuador comincia tra gli anni 1944 e 1948. Si dice che come conseguenza di un forte uragano che ha colpito le coste dei Caraibi e ha distrutto le piantagioni di questa frutta nei Paesi produttori dell'America Centrale, i signori Clemente Yerovi Indaburu e Plaza Lasso sono stati coloro che hanno lavorato attivamente nell'implementazione e l'espansione delle coltivazioni e nello sviluppo di questo nuovo prodotto da esportazioni,

riuscendo a fare in modo che l'Ecuador 1952 si convertisse nel più importante esportatore di banane del mondo.

È molto importante, risaltare la solidità dell'esportazione bananiera, nel contesto dell'economia del Paese, considerando che l'esportazione della frutta, prima e dopo il boom del petrolio, mantiene una posizione di forza, come generatrice di ingressi e di posti di lavoro per il popolo ecuadoriano, di molto superiore rispetto ad altri settori produttivi.

Nel 2010, il settore bananiero ecuadoriano ha esportato 265'587,828 casse, producendo un ingresso approssimativo di 1.900 milioni di dollari in qualità di imposte. Situando le banane in qualità di primo prodotto di esportazione del settore privato del Paese e uno dei principali contribuenti nel bilancio nazionale. Le esportazioni ecuadoriane di banane, rappresentano il 32% del commercio mondiale, il 3.84 % del PIL totale del Paese, il 50% del prodotto interno lordo (PIL) Agricolo e il 20% delle esportazioni private.

Gli investimenti nell'area di produzione raggiungono una stima di \$4.000 milioni di dollari tra piantagioni coltivate di banane, infrastrutture, imballaggio, porti, costituendosi una delle più importanti per l'importo e le dimensioni che hanno nell'economia nazionale. A questo bisogna aggiungere circa USD 800 milioni in industrie collaterali (5).

Gli investimenti nell'attività e nelle industrie collaterali generano lavoro per più di un milione di famiglie ecuadoriane, quindi più di 2,5 milioni di persone situate in nove province che dipendono dall'industria Bananiera Ecuadoriana.

2..1.1. Descrizione botanica

Musa paradisiaca è una pianta erbacea descritta per la prima volta nell'anno 1753. Appartiene alla famiglia delle *Musacee*. La tassonomia del genere *Musa* è *complessa* e comprende ibridi che hanno dato origine a denominazioni genetiche molto particolari, generalmente indicate come *Musa x paradisiaca*. Il platano è considerato come *Musa paradisiaca* varietà Harton, ed esistono i platani congo, guayabo, dominico. Lo pseudo-fusto del platano misura 2-5 m, e la sua altezza può raggiungere 8 m con le foglie. È una pianta stolonifera, con foglie verticali, oblunghe da 1 a 2 m di lunghezza per 30-55 cm di larghezza, arrotondate sulla punta e alla base, la faccia superiore è verde chiaro e quella inferiore più tenue. La sua infiorescenza pendente misura da 1 a 1,5 m, con brattee violacee da 15

a 30 cm de lunghezza, persistenti o decidue, oblunghe-lanceolate o oblunghe-ovate, fiori bianchi o cremosi da 3 a 5 cm de lunghezza. I frutti consistono di una bacca di tre o sei lati, sono bacche con un grado di curvatura e una lunghezza variabili, nelle varianti commerciali i frutti nascono senza semi (6)(7)(8).

2.1.2. Patogeni e malattie

2.1.2.1. Moko (*Pseudomonas solanacearum*)

Questa importante malattia del platano e della banana è causata dal batterio *Ralstonia solanacearum* Raza 2 (9). La malattia non colpisce solamente la famiglia delle musacee, ma anche altre 24 famiglie. Nel primo caso si può arrivare fino alla perdita totale delle piante colpite, ma i maggiori costi di gestione sono relazionati con l'applicazione di misure di eradicazione di focolai e tempo perso durante il quale non si possono seminare le aree colpite con platano e/o banana.

Il batterio può sopravvivere nel suolo senza vegetazioni per mesi e addirittura per vari anni, nelle radici degli ospiti, questo dipende dalle condizioni ecologiche e dalla flora prevalente in ogni luogo. È necessario tenere in considerazione che può esserci un gran numero di erbacce nei settori infestati dal batterio, ma con reazione asintomatica. Nei diversi ospiti le radici possono venire infettate dal batterio attraverso ferite naturali o causate da piaghe e attrezzi. Nei tessuti infettati i batteri si moltiplicano nei fasci vascolari e diventano rapidamente sistemici (10).

2.1.2.2. Sigatoka nera (*Mycosphaerella fijiensis*)

La Sigatoka nera, o striscia nera della foglia causata da *Mycosphaerella fijiensis*, è la malattia che presente il maggior impatto economico nella coltivazione delle *musacee*. È una delle malattie più nocive delle coltivazioni nella storia della fitopatologia della banana (11).

Tra i sintomi si possono menzionare punti color caffè rossastro nella parte inferiore della foglia che avanza progressivamente, riduzione dell'area fogliare funzionale della pianta, cosa che colpisce la crescita della pianta, il processo fotosintetico, e la presenza di un buon numero di foglie funzionali al momento del raccolto.

Il trattamento di questa patologia, si è basato essenzialmente sull'uso di fungicidi. Sono stati utilizzati fungicidi derivati da benzimidazoli, triazoli, imidazoli, morfoline, ammine y carbammati. Le coltivazioni con resistenza a benzimidazoli hanno portato come conseguenza un aumento apprezzabile del numero di trattamenti con fungicidi. Per questo si sono cercate alternative non chimiche di gestione che contemplano varianti di risanamento, misure culturali, nutrizione, applicazione di modalità di defogliazioni, applicazione di bioprodotto, con risultati variabili a seconda del contesto produttivo e delle condizioni epidemiologiche. Queste vengono adottate sempre di più con l'intenzione di eliminare la dipendenza dall'uso di pesticidi (12).

2..1.2.3. Marciume acquoso del pseudotrunko o batteriosi (*Dickeya chrysanthemi*)

Nelle piante colpite si osserva inizialmente una bruciatura sul bordo delle foglie più vecchie che successivamente avanza a tutta la lamina fogliare, creando un ingiallimento totale della foglia. Il sintomo principale negli pseudotrunki consiste in macchie acquose, traslucide, di colore giallastro all'inizio e tra rossastro e castano scuro nelle ultime fasi. Questo colpisce la parte basale della pianta producendo una debilitazione che può portarla a piegarsi.

La malattia è di natura endemica, ragion per cui è distribuita in tutte le regioni in cui si coltivano musacee. I batteri dei marciumi blandi possono svilupparsi e mantenersi in attività in un'ampia varietà di temperature.

Tra i fattori che favoriscono l'attacco *Dickeya sp.* ci sono i periodi larghi di siccità alternati a forti piogge e lo squilibrio nutrizionale, semi infettato, attrezzi, acqua, nematodi e insetti che provocano lesioni alle radici e facilitano il suo ingresso come *Metamasius hemipterus*.

Per prevenire la malattia bisogna pulire adeguatamente gli strumenti utilizzati nel campo che possono provocare lesioni con una soluzione di ipoclorito di sodio al 20%, utilizzare semi convenzionalmente sani, seminare in zone ben drenate, realizzare fertilizzazioni secondo le necessità delle piante, e applicare glifosato al 20% in situ mediante iniezione nel pseudotrunko (13).

2..1.2.4. Marciume della corona per complesso fungino

Il marciume della corona è una causa principale di perdita di frutti nelle banane da esportazione. Il complesso di funghi causali si moltiplica nelle foglie secche,

brattee e i resti floreali delle dita, i quali si muovono nella frutta raccolta e si installano durante la rifilatura e il lavaggio dei frutti nel processo di beneficio e imballaggio. I funghi più frequentemente coinvolti sono *Fusarium pallidoroseum*, *Colletotrichum musae* e *Verticillium theobromae* tra altri.

Per la loro gestione si include il risanamento permanente della piantagione, realizzare tagli puliti delle corone, lavaggio con acqua corrente e/o con cloro; trattamenti per immersione, aspersione o cascata dei fungicidi thiabendazol, imazalil, prochloraz, azoxystrobina; la diminuzione del tempo tra raccolto sul campo e refrigerazione della frutta, sono stati utilizzati inoltre estratti citrici, oli essenziali di diverse piante (*Ocimum basilicum*) e il controllo fisico, come l'applicazione di parafilm al settore della corona esposto dopo il trattamento con allume e i trattamenti con calore.

2..2. Cacao (*Theobroma cacao* L.)

Il cacao è un frutto di origine tropicale di un'altezza tra 5-8 metri, le sue foglie sono di forma allungata di colore verde scuro e i suoi fiori sono piccoli con petali lunghi. La dimensione, il colore e la forma dei frutti è variabile, anche se la maggior parte misura 30 cm con buccia grossa e una consistenza simile al cuoio (14).

Le varietà di cacao che si commercializzano sono molte, tra le più importanti ci sono il Forastero, che presenta un frutto caratterizzato da una buccia dura con grani dal sapore amaro di colore viola, e il Criollo, caratterizzato da un frutto dall'aroma squisito.

Il mercato mondiale del cacao fino distingue due ampie categorie di cacao in grano: il cacao in grano "fino o di aroma" e il cacao in grano "corrente o ordinario". D'altra parte, il cacao del Camerun, prodotto da alberi di tipo Trinitario e la cui polvere ha un colore rossastro e distinto, è catalogato come cacao ordinario (15).

Il cacao è il prodotto da esportazione più antico dell'Ecuador, rappresenta uno dei principali prodotti del settore agricolo ecuadoriano, almeno fino all'inizio dell'auge bananiero e petroliero, generando risorse e lavoro, contribuendo allo

sviluppo e al progresso dell'economia ecuadoriana, soprattutto agli inizi del XX secolo e fino all'anno 1920 quando le piantagioni di cacao sono state devastate dalla scopa della strega. Durante gli anni, il cacao in grano e industrializzato si è mantenuto come importante fonte di ingressi per il Paese. Secondo statistiche della Banca Centrale dell'Ecuador, quest'attività ha significato una media del 5,4% del totale delle esportazioni tradizionali non petroliere durante il periodo Gennaio-Febbraio 2012. Inoltre, durante lo stesso periodo, gli ingressi per l'esportazione del cacao hanno rappresentato approssimativamente un 6,3% delle esportazioni non petroliere. Nell'anno 1997, la popolazione economicamente attiva dedicata alla produzione del cacao è stata di circa 141.777 persone (17)(16).

Il contributo dell'Ecuador in merito alla produzione mondiale di cacao, pur essendo importante (3%), è di molto inferiore al resto dei Paesi africani, che, per esempio, tra Costa d'Avorio, Indonesia e Ghana comprendono circa il 70% della produzione mondiale all'anno 2000.

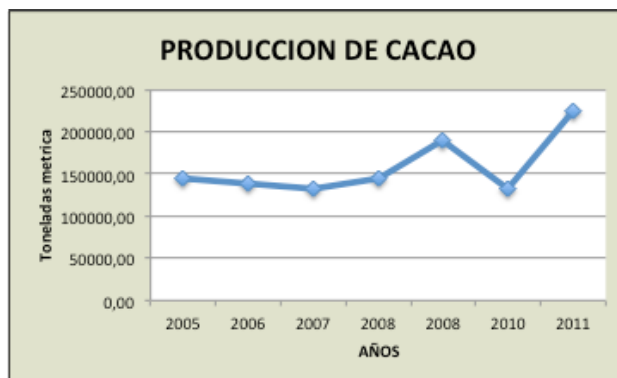


Figura 1 Produzione di Cacao Fuente: Banco Central del Ecuador

Il grosso della produzione mondiale di cacao si concentra tra i 500 metri sul livello del mare, i migliori risultati si ottengono sotto i 200 metri. Il cacao ha bisogno di un clima costantemente piovoso caratterizzato da precipitazioni non inferiori ai 1.500 millimetri annuali.

In materia di suoli il cacao non è molto esigente, ma si può dire che il cacao tipo criollo ha bisogno di terre con un alto contenuto di humus e il forastero ha bisogno di una buona proporzione di materia organica.

Una pianta di cacao ci mette da 3 a 5 anni per produrre il suo primo raccolto, anche se esistono varietà che producono a un'età inferiore. Il tempo in cui l'albero di cacao è produttivo può arrivare ai 25 anni, dipendendo da fattori

come l'atmosferico, la varietà dell'albero di cacao, mantenimento, che influiscono sul tempo di vita della piantagione.

Il raccolto di maggior volume ha luogo in aprile, maggio e giugno. Le principali provincia ecuadoriane produttrici di cacao sono Los Ríos con il 35%, Guayas con il 25%, Manabí con il 14%, Esmeraldas con l'8%, El Oro con il 5% y Pichincha con il 4% della superficie produttrice.

La produzione del cacao ecuadoriano è legata alle condizioni dell'ecosistema, cosa che comporta un rendimento diverso rispetto ad altri Paesi produttori. Tra i fattori più importante che influiscono sul rendimento troviamo la cattiva distribuzione delle piogge; scarse ore di luce; malattie, come la monilia e la scopa della strega; insetti defogliatori; età avanzata degli alberi; perdita di fertilità del suolo; mancanza di zonificazione delle coltivazioni; problemi di commercializzazione interna, tra altri.

In Ecuador, la superficie coltivata si considera in 100.000 ettari dei quali, il 90% della superficie coltivata di cacao corrisponde a piccoli agricoltori con una superficie da 1 a 20 ettari, il 9% a medi agricoltori tra 21 e 50 ettari, e solamente l'1% con una superficie superiore a 50 ettari.

Si stima che il basso rendimento esistente sia fondamentalmente dovuto alla cattiva gestione della produzione del cacao, per questo si cerca di migliorare la qualità di questo prodotto con il fine di trarre un maggior beneficio.

Un altro problema che attraversa il settore è l'alto costo dei fertilizzanti. Questo ha influito sulla mancanza di mantenimento degli alberi di cacao e di conseguenza, su una maggior propensione ad essere colpiti da malattie. L'alto costo della manodopera, per la scarsità di persone qualificate per realizzare questo lavoro, è un altro fattore che colpisce l'industria del cacao in Ecuador.

Esistono inoltre, molte piaghe e malattie a cui è esposta una piantagione di cacao. In America, la scopa della strega è la più importante e lo sviluppo di cloni capaci di resisterle è l'opzione migliore che si possa adottare.

2.2.1. Patogeni e malattie del Cacao

2.2.1.1. La scopa della strega

Il cacao presenta diversi patogeni ad alta incidenza, tra i quali si trova il *fungo M. pernicioso* che è l'agente che causa la malattia della scopa della strega.

Questo patogeno è la causa delle maggiori perdite della produzione a livello mondiale.

Tra le sue caratteristiche microbiologiche risalta un micelio morfologicamente variabile e generalmente dipendente dal biotipo, che gli dà l'ospite o addirittura il modo di coltivazione.

Il controllo del fungo si ottiene con metodi fisici, chimici, biologici e ci si è concentrati sullo sviluppo di ceppi integrati e resistenti che permettono la gestione più economica, efficiente e conveniente per gli agricoltori (18).

Il controllo chimico delle malattie dei frutti di cacao, in Ecuador, principalmente della moniliasi, fino ai primi anni '80, quando si è potuta dimostrare l'efficacia del Clorotalonil e dell'ossido rameoso, soli o mischiati. Applicazioni di questi prodotti si mantengono fino ad oggi come la migliore alternativa chimica per la gestione delle malattie del cacao.

In merito si raccomanda che per ottenere una maggiore efficienza delle applicazioni, queste si devono concentrare "picchi" di produzione, considerando di mantenere protette i frutti durante i primi tre mesi di sviluppo (19).

2..2.1.2. Mal di machete (*Ceratocystis fimbriata*)

Una delle poche malattie che può uccidere l'albero di cacao si trasmette con l'aiuto dello scarafaggio di corteccia, insetto del genere *Xyleborus*, il quale attacca le piante malate nelle loro prime tappe e fa dei tunnel, dai quali esce abbondante segatura, che contiene migliaia di spore del fungo che vengono facilmente disperse dal vento, dagli insetti e da ogni tipo di animali.

Il fungo infetta sempre il cacao attraverso lesioni nei tronchi e nei rami principali e infetta il sistema vascolare della pianta.

I primi sintomi visibili sono marciume e ingiallimento delle foglie. In un periodo tra due e quattro settimane, l'intera chioma si secca, rimanendo le foglie morte attaccate all'albero per un certo tempo (20).

Non esiste un fungicida specifico contro il fungo; dato il comportamento della malattia, generalmente un albero che mostra i sintomi non si può più recuperare, eccetto quando la zona colpita è un ramo che può essere eliminato tagliando sotto l'area malata e includendo parte del tessuto sano e applicando immediatamente una pasta cicatrizzante (19).

2..2.1.3. Pannocchia Nero (*Phytophthora palmivora*)

È la malattia più importante del cacao in tutte le aree di produzione del mondo, con una minor proporzione in America. Anche se il fungo può attaccare piante giovani e diverse parti dell'albero di cacao, come cuscinetti floreali, rami epicormici, germogli, foglie, rami, tronco e le radici, il danno principale lo subiscono i frutti. Sono colpiti soprattutto i frutti più bassi, considerando che gli spruzzi dell'acqua della pioggia o dell'innaffiamento portano le spore che sono sul suolo e infettano i frutti. Nel frutto l'infezione compare sotto forma di macchie brune, scure, approssimativamente circolari, che rapidamente si ingrandiscono e si estendono su tutta la superficie attraverso il pannocchia (19). Si possono proteggere i frutti e le foglie con un fungicida a base di rame al 0,5%. Durante il periodo piovoso si applica quattro volte lasciando trascorrere 15 giorni tra ogni applicazione. Nei mesi più piovosi è necessario usare il fungicida ogni settimana, fino a che diminuisca la frequenza e l'intensità delle piogge (20).

Per quanto riguarda le piante in vivai, conviene prevenire l'attacco di *Phytophthora* e di altre malattie; per questo fine si raccomanda l'applicazione di fungicidi come il Kocide-101, Dithane-M45 o altri fungicidi a base di rame (20).

2..3. Caffè (*Coffea arabica spp*)

Il caffè si produce in 20 delle 22 province del Paese, cosa che dimostra la grande importanza socioeconomica del settore: il Paese ha una superficie seminata di 113.028 ettari dei quali la superficie raccolta è di 78.709 ettari nell'anno 2012 (49)(50). L'Ecuador è uno dei 14 Paesi, tra circa 70, in cui si ha una produzione mista, ossia, vengono coltivate le specie commerciali arabica (*Coffea arabica*) e robusta (*Coffea canephora*). Le specie arabica si possono incontrare dal livello del mare fino ai 2.500 (m slm), anche se producono meglio tra i 1.000 e i 2.000 m slm, in un clima temperato, precipitazioni stagionali moderate con suoli ricchi di nutrienti e le piante della specie robusta, al contrario, si possono trovare a altitudini minori ai 1.000 m slm, dove ci sono suoli abbastanza poveri di nutrienti, precipitazioni frequenti, clima caldo e umido (21).

Così come negli altri Paesi produttori, la produzione del caffè è un'attività familiare che richiede molta manodopera e genera lavoro rurale e urbano. Si sono iniziate le coltivazioni di caffè in Ecuador a partire dall'anno 1860; per la sua capacità di adattarsi a climi e suoli diversi è stato possibile coltivarlo in terreni marginali che possiedono limitate alternative di produzione. L'Ecuador esporta caffè secondo la specie (arabica o robusta) e secondo la sua lavorazione (lavato, naturale, solubile, liofilizzato o tostato e macinato) raggiungendo valori di esportazione di 116.749.050 USA FOB equivalente a un volume di 35.433 tonnellate metriche (22).

Le statistiche della Banca Centrale dell'Ecuador mostrano che, Le imposte per il caffè rappresentano in media il 2,5% delle esportazioni non tradizionali e il 2,25% delle non petroliere e l'0,88% delle esportazioni totali (16). Le cifre dell'anno del caffè 2012 indicano che il caffè è sceso nelle esportazioni per un valore del 20% delle imposte per esportazioni di caffè corrispondenti all'anno 2011 (16).

2.3.1. La Ruggine del Caffè (*Hemileia vastatrix*)

La ruggine è senza dubbio la malattia più dannosa del caffè. Non solo è molto importante per chi coltiva il caffè ma è anche la più conosciuta e di peggior fama tra tutte le malattie delle piante tropicali. Questa malattia non solo ha prodotto e continua a produrre perdite economiche enormi, ma le sue devastazioni servivano anche per sottolineare agli agronomi della metà del secolo scorso l'enorme importanza dello studio delle malattie delle piante.

La ruggine non uccide gli arbusti del caffè da un giorno all'altro, il danno è graduale ed è localizzato sulle foglie, arrivando a ridurre considerabilmente in pochi anni la produzione delle piantagioni, se non si prendono le misure adeguate di controllo. È probabile che questa malattia si sia originata, in Africa nordorientale. Da lì si pensa che si sia disseminata (23).

Nel 1970, la ruggine del caffè fu individuata in Brasile, causando un allarme giustificato nel continente americano, che produce più del 65% del caffè mondiale, questa malattia è stata individuata anche in Paraguay, Argentina, Colombia, Ecuador e Venezuela.

In generale tutte le specie di caffè vengono attaccate in maggiore o minore misura da *H. vastatrix*, come anche le specie selvatiche. La pianta del caffè è

suscettibile all'attacco della ruggine durante tutte le tappe del suo sviluppo, dallo stato cotiledonale fino alla tappa produttiva sul campo.

La ruggine del caffè è causata da *Hemileia vastatrix* appartiene alla famiglia Pucciniaceae. La famiglia è definita dalle caratteristiche delle teliospore, usualmente pedicelate e lateralmente libere, o se lateralmente unite.

La malattia si caratterizza per presentare piccole macchie rotonde, giallo arancia e polverose sulla parte inferiore delle foglie, e tende a unirsi con altre infezioni per formare una lesione più o meno irregolare che a volte può includere gran parte della superficie fogliare.

Nelle prime fasi si nota solo una macchia pallida, giallastra, sulla parte inferiore della foglia. Questa macchia è traslucida e se si esamina controluce si osserva la somiglianza con una macchia d'olio. Uno o due giorni dopo la comparsa, la macchia prende un colore arancione e la superficie diventa polverosa perché si formano spore.

È stata raccomandata l'applicazione di zolfo in polvere o in soluzione come la poltiglia bordolese che è una miscela che conteneva 15% di solfato di rame ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 8% di calce (CaO). La formula 1-1-100 si riferiva a un chilogrammo di solfato di rame, un chilogrammo di calce viva e 100 litri di acqua (54).

L'ossicloruro di rame è il fungicida più utilizzato per il controllo della ruggine del caffè, nel mondo. La sua formulazione può essere: concentrato, emulsionabile, o polvere bagnabile. Alcuni prodotti commerciali con ossicloruro di rame come ingrediente attivo sono: Cobox, Cepsosan 311, Super D, Zimiltox forte. L'ossicloruro di rame è compatibile con la maggior parte degli insetticidi, fungicidi e fertilizzanti fogliari di uso frequente della coltivazione del caffè (24).

2.4. Pomodoro

Il pomodoro fresco è uno degli ortaggi più richiesti dai consumatori sia a livello mondiale che interno, i quali lo usano come ingrediente per insalate e come condimento. Tuttavia, la produzione nazionale è in ritardo di fronte alla crescente richiesta, dal punto di vista dell'uso agroindustriale, è stata messa da parte dalle crescenti importazioni (5.123 tonnellate metriche) di concentrato di

pomodoro, prodotto che risulta più economico per l'industria agricola. In questo contesto, si può affermare che questo prodotto ha un potenziale crescente tanto per il consumo fresco quanto per la sostituzione di importazioni di concentrati.

In Ecuador il pomodoro è uno degli ortaggi che ha avuto una crescita maggiore negli ultimi anni, visto che sono state abbandonate le coltivazioni tradizionali; la superficie seminata di pomodoro nell'anno 2012 è stata di 3115,48 ettari producendo 62.955,88 tonnellate metriche stabilendo un incremento di un 45% in relazione all'anno precedente. Tuttavia, i rendimenti nell'anno 2012 sono stati di 20,46 tonnellate per ettaro mentre il primo esportatore di pomodoro, il Messico, ha un rendimento di 39,5 tonnellate metriche per ettaro (26)(27)(28), per cui il paese, anche a causa di fattori fitosanitari, climatici ed economici, è arrivato al punto di dover importare questo ortaggio dal Cile per coprire le necessità dell'industria.

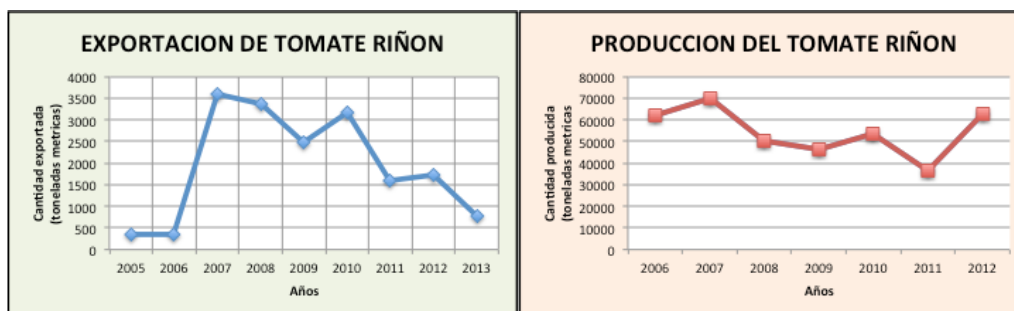


FIGURA 2 Produzione ed esportazione di pomodori Fonte: Banca Centrale dell' Ecuador

Questo ortaggio originario dell'America è stato naturalizzato in Europa dopo la conquista e attualmente viene prodotto in tutto il mondo specialmente nei Paesi mediterranei in una varietà considerabile di dimensioni, colori e resistenza a malattie.

Negli ultimi cinque anni i principali Paesi produttori di pomodoro fresco sono: Spagna, Messico, Marocco, Giordania, Belgio-Lussemburgo, Stati Uniti, Repubblica Araba, Siria, Italia, Turchia, Francia, Canada e Brasile mentre i principali Paesi importatori sono Stati Uniti, Germania, Francia, Regno Unito, Canada, Arabia Saudita (29). In Ecuador le zone calde delle Ande ecuadoriane producono pomodoro destinato alle insalate, mentre, nella regione del litorale si produce pomodoro destinato all'industria di concentrati e sughi. Le provincia di

Imbabura, Chimborazo, Cotopaxi e Loja rappresentano il 60% dell'area coltivata del Paese.

2.4.1. Botanica

Il pomodoro da tavola (*Solanum lycopersicum*) è una specie solanacea appartenente alla sezione *Lycopersicon*. È caratterizzata da un tronco principale lungo con ramificazioni. Possiede foglie alterne da 15 a 45 cm di lunghezza. I tronchi e le foglie sono di colore verde e ruvide al tatto, emettono un odore caratteristico. I fiori sono di colore giallo e si raggruppano in grappoli che ne contengono da tre a sette, in cime inserite sul tronco principale. Si propaga per semi. Per avere un tronco poco rigido, bisogna seminarlo come rampicante con un tutore. La densità media è tra 15.000 e 20.000 piante per ettaro. Il raccolto inizia tra 90 e 120 giorni dopo la semina. Cresce in luoghi caldi e freschi (tra 20 e 23°C) e con un'intensità luminosa alta. Si semina preferibilmente in suoli profondi con un buon drenaggio e leggermente acidi.

2.4.2. Varietà

Il pomodoro può essere determinato o indeterminato in termini di abitudini di crescita. Il pomodoro di tipo determinato cresce fino a una certa altezza per poi interrompere il suo sviluppo; si caratterizza per avere un ciclo vegetativo relativamente corto e il tipo indeterminato presenta dimensioni indefinite (non obbedisce ad uno specifico schema di altezza); si caratterizza per crescere, fiorire e produrre frutti durante tutta la stagione di crescita, per questo è utilizzato principalmente per il mercato del pomodoro da tavola.

Gli ibridi, sono i più utilizzati attualmente dovuto ai vantaggi che presentano; tra questi, la resistenza a malattie, una rendita maggiore per pianta e una migliore qualità di produzione.

Su scala mondiale ci sono 44 varietà per il consumo del frutto fresco e 24 per l'industria; in Ecuador, le varietà che riscontrano una maggiore accoglienza e consistenza sono otto: fortuna, sheila, charleston, titán, pietro, fortaleza, cherry e chonto.

2.4.1. Patologie e malattie

2.4.1.1. Malattie virali

Le malattie che causano maggiori perdite nella coltivazione del pomodoro sono quelle causate da virus. Questi, possono moltiplicarsi solo all'interno delle cellule viva dell'ospite usando i loro meccanismi di replicazione, trascrizione e traduzione in proteine. Per questo motivo non è possibile usare metodi diretti per mezzi chimici, visto che i prodotti che interferiscono con la replicazione del virus lo fanno anche con la cellula dell'ospite. Non sono nemmeno disponibili agenti che permettono di bloccare l'assorbimento e la penetrazione del virus all'interno della cellula vegetale. Questa differenza rispetto alle malattie causate da funghi, batteri o piaghe, con cui si possono usare prodotti chimici più o meno efficaci, spiega l'importanza delle malattie virali nel pomodoro (30).

Le malattie che causano maggiori perdite nella coltivazione del pomodoro sono quelle causate da virus. Questi, possono moltiplicarsi solo all'interno delle cellule viva dell'ospite usando i loro meccanismi di replicazione, trascrizione e traduzione in proteine. Per questo motivo non è possibile usare metodi diretti per mezzi chimici, visto che i prodotti che interferiscono con la replicazione del virus lo fanno anche con la cellula dell'ospite. Non sono nemmeno disponibili agenti che permettono di bloccare l'assorbimento e la penetrazione del virus all'interno della cellula vegetale. Questa differenza rispetto alle malattie causate da funghi, batteri o piaghe, con cui si possono usare prodotti chimici più o meno efficaci, spiega l'importanza delle malattie virali nel pomodoro (31). Questo virus può essere trasmesso da mezzi meccanici, anche se la sua trasmissione più frequente sul campo la realizzano gli afidi. Un altro virus che attacca il pomodoro è il mosaico del cetriolo (CMV, cucumber mosaic virus), è uno dei virus con più piante ospitanti, ne sono state segnalate più di 25 famiglie, tra le quali si trovano le solanacee e le musacee, il virus del cetriolo è facilmente identificabile perché mostra un sintomo conosciuto come "lacci di scarpe" (Shoe-string), o malattia delle foglie filiformi (34), a causa della tendenza delle piante infettate a produrre foglie sempre più strette e filiformi. Inoltre, il CMV produce un mosaico forte, aborto di fiori e crescita ridotta (34). Un altro virus importante è il virus abbronzato del pomodoro (TSWV, tomato spotted wilt virus), il cui vettore principale è la Trips occidentale (*Frankliniella occidentalis*).

Tra i suoi sintomi principali troviamo la comparsa di punti o macchie necrotiche che a volte colpiscono i piccioli e i tronchi, riduzione della crescita della pianta, i frutti maturi presentano aree arrotondate di colore giallo che contrasta con il fondo rosso (32). Infine, il virus dell'accartocciamento fogliare giallo del pomodoro (TYLCV, Tomato Yellow Leaf Curl Virus), il quale viene trasmesso dalla mosca bianca (*Hemisia tabaci*) e dalla specie *Trialeurodes vaporariorum* (33). I sintomi più comuni del TYLCV sono la dimensione ridotta delle foglie, a volte con ingiallimento intenso, riduzione della crescita e curvatura delle foglie verso l'alto.

I controlli comuni per evitare questi tipi di virus si sono concentrati principalmente sulla riduzione ed eliminazione delle fonti principali del virus limitando la propagazione degli insetti. Inoltre è risaputo che il virus può vivere nelle parti secche della pianta per quasi 50 anni, di conseguenza è necessaria l'eliminazione delle piante ospiti, distruzione delle piante attaccate, controllo degli afidi e disinfezione degli attrezzi da lavoro (35); nonostante ciò non si è riusciti ad ottenere un controllo efficiente per evitare perdite nelle coltivazioni, per cui si raccomanda come controllo effettivo di queste malattie, l'uso di varietà resistenti certificate che assicurino un alto rendimento nella produzione finale (33).

2..4.1.2. Mosca Bianca

Le mosche adulte hanno quattro ali e sono lunghe circa 1.5 mm. L'identificazione e differenziazione degli adulti di *B. tabaci* e *T. vaporariorum* si realizza in base alla posizioni delle ali. *T. vaporariorum* ha le ali orizzontali, mentre *B. tabaci* le ha inclinate sul corpo. Allo stesso modo le larve sono facili da differenziare; visto che *T. vaporariorum* presenta tutto il perimetro pieno di peli o setole, mentre *B. tabaci* contiene al massimo 7 paia di setole.

2..4.1.2.1. Sintomi e danni alle coltivazioni

Le piante infettate presentano meno vigore e le foglie sono coperte da melata. La mosca bianca si alimenta dei tessuti delle foglie, estraendo la linfa dalla pianta ostacolandone così la crescita. Nelle piante infette le foglie diventano giallastre e cadono. Si sviluppa un fungo simile alla peronospora sulle foglie coperte dalla rugiada viscosa prodotta dalla mosca bianca.

2..4.1.2.2. Gestione

La gestione della mosca bianca richiede un programma integrato che si concentri sulla prevenzione e si basi sull'integrazione del controllo biologico quando ciò sia possibile. Alcuni esempi di gestione integrata sono la collocazione di reti ai lati delle serre; pulizia delle erbacce e dei tessuti di coltivazione morti, e la collocazione di trappole gialle.

La vespa parassita (*Encarsia formosa*) è un esempio di nemico naturale che si può usare in condizioni di serra, ma bisogna tenere in considerazione che la riproduzione di questo parassita potrebbe essere limitata con temperature inferiori ai 24 °C.

Bisogna selezionare attentamente gli insetticidi, visto che alcuni sono più efficaci quando vengono usati contro le mosche adulte. In certi casi, c'è bisogno di applicazioni regolari di insetticidi per controllare la popolazione adulta che emerge verso la fine della generazione. In quanto alla *Bemisia argentifolii*, i prodotti che contengono l'olio di neem sono tossici per le ninfe giovani ed inibiscono la crescita e sviluppo delle ninfe più grandi.

2..4.1.3. CANCRO BATTERICO (*Clavibacter michiganensis*)

Il cancro o sifiloma iniziale batterico causato da *Clavibacter michiganensis*, anche se relativamente sporadico in incidenza presenta una natura così distruttiva che dev'essere praticato un controllo sulla selezione e gestione dei semi, preparazione e gestione del substrato della serra, e selezione e preparazione del suolo per la produzione in campo aperto. È una malattia vascolare e superficiale con un'ampia gamma di sintomi che risultano nella perdita dell'area fotosintetica, marciume e morte prematura, così come produzione di frutti non commerciabili. L'organismo si trasmette attraverso il seme e può sopravvivere per periodi corti nel suolo, nella struttura della serra e negli attrezzi, e per periodi più lunghi nei residui vegetali.

2..4.1.3.1. Sintomi e danni alla coltivazione

Le piante sono vulnerabili in ogni tappa del loro sviluppo. Le piantine infettate muoiono rapidamente o producono piante deboli. Se le condizioni per lo sviluppo della malattia non sono favorevoli le piantine possono generare piante apparentemente sane fino a che non sono piantate nel campo. I primi sintomi della malattia sono marciume, accartocciamento e abbronzatura delle foglie,

spesso solo da un lato della pianta. Se si realizza un taglio nel tronco si può osservare una decolorazione vascolare marrone.

I sintomi si dividono in: superficiali (per colonizzazione batterica dei tessuti superficiali) e sistemici (per invasione batterica del tessuto vascolare). Appaiono lesioni necrotiche fino a 6 mm di diametro sulla superficie delle foglie vecchie superiori, o punti circolari leggermente protuberanti di 3 mm di diametro. Si possono osservare macchie simili sul tronco e sui piccioli.

2.4.1.3.2. Gestione

Usare semi certificati, sani, o proveniente da piante sane e trapianti sani che siano stati sottoposti a uno stretto processo di ispezione, non essendo possibile distinguere le piantine sane da quelle infette nel momento del trapianto. In serra, fermare l'impollinazione e la fumigazione ad alta pressione per ridurre il ritmo di propagazione; ritirare le piante infette e quelle vicine mediante taglio rasoterra; disinfettare i vestiti e le calzature, attrezzi e cavi di tenuta con composti di ammonio come quelli usati per l'immagazzinaggio delle patate. Sul campo, se si trova la malattia all'inizio della stagione, bisogna arare il suolo a solchi per prevenire la propagazione nei campi vicini e ritirare le piante infette. Bisogna sterilizzare i letti e i suoli in serra per distruggere il batterio mediante vapore caldo o fumigante del suolo. Sul campo bisogna sotterrare i residui vegetali; alternare la coltivazione per almeno tre anni, ed eliminare le erbacce della famiglia delle solanacee. L'applicazione di rame può aiutare a proteggere le piante sane, soprattutto se ci sono solo sintomi superficiali.

2.4.1.4. CANCRO DEL TRONCO (*Alternaria sp.*)

Questa malattia è conosciuta come cancro del tronco per *Alternaria*, dovuto all'agente che la causa (*Alternaria sp.*). Colpisce principalmente piante della famiglia delle solanacee e specialmente il pomodoro e la patata.

2.4.1.4.1. Sintomi e danni alla coltivazione

Nei trapianti produce un cancro nero sul tronco rasoterra. In piena coltivazione le lesioni compaiono tanto sulle foglie quanto sui tronchi, i frutti e i piccioli. Sulla foglia si producono piccole macchie circolari o angolari, con cerchi concentrici marcati. Sul tronco e il picciolo si producono lesioni nere allungate, nelle quali a volte si possono osservare cerchi concentrici.

I frutti sono attaccati a partire dalle cicatrici del calice, provocando lesioni bruno-scure leggermente affossate e ricoperte da numerose spore del fungo.

Tra le fonti di dispersione si citano le solanacee silvestri e coltivate, semi infetti e resti di piante malate (30).

I conidi possono essere dispersi tramite spruzzi d'acqua, pioggia o vento.

Il rango di temperatura favorevole è tra 3 e 35 °C. La sporulazione viene favorita da notti umide seguite da giorni soleggiati e con alte temperature

2..4.1.4.2. Gestione

Per effettuare il controllo preventivo e tecniche culturali si raccomanda l'eliminazione di erbacce, piante e frutti malati; gestione adeguata della ventilazione e dell'innaffiatura; uso di semi sani o disinfettati, così come di trapianti sani e fertilizzazione equilibrata, e l'uso di sostanze chimiche con le varietà resistenti.

2..4.1.5. CENERE POLVEROSA (*Leveillula taurica*, *Erysiphe orontii* y *Oidium lycopersicum*)

Malattia causata da veri agenti tra i quali risaltano *Leveillula taurica*, *Erysiphe orontii* y *Oidium lycopersicum*. *L. taurica* è un parassita di sviluppo semi interno i cui conidiofori escono attraverso gli stomi; si manifesta in climi caldi e semiaridi, e possiede un'ampia gamma di ospiti.

E. orontii si manifesta in regioni temperate e tropicali. *O. lycopersicum* è un fungo di forma appressoria, con morfologia di conidio o conidiofori, che colpisce le coltivazioni in campo aperto e in serra. Possiede un'ampia gamma di ospiti, tra i quali le solanacee e le cucurbitacee (31).

2..4.1.5.1. Sintomi e danni alle coltivazioni

I sintomi di muffa da *L. taurina* sono macchie gialle sul fascio che diventano necrotiche al centro, potendosi osservare un feltro biancastro nella parte posteriore. In caso di un attacco forte la foglia si secca e cade. Le solanacee silvestri attuano come medio di inoculazione. Si sviluppa a 10-35 °C con un ottimo di 26 °C e umidità relativa del 70%.

Nel caso di *O. lycopersicum* si mostra micelio superficiale di colore bianco con occasionali bordi gialli sulle foglie e tronchi, ingiallimento, disseccazione, necrosi e defogliazione.

2..4.1.5.2. Gestione

Nel controllo preventivo e tecniche culturali si raccomanda l'eliminazione di erbacce e residui di coltivazione, e uso di varietà resistenti e trapianti sani. Si può praticare il controllo chimico con fungicidi. Il controllo di gestione integrata in serra è un'area particolarmente complessa per questa malattia.(31)

2..4.1.6. FUSARIUM (*Fusarium oxysporum* sp.)

Questa malattia ottiene il suo nome dal suo agente causale, il fungo *Fusarium oxysporum*. La disseminazione si realizza mediante semi, vento, lavori del suolo, piante malate o attrezzi contaminati. La temperatura ottima di sviluppo è di 28 °C.

Il fungo può rimanere nel suolo per anno e penetrare attraverso le radici fino al sistema vascolare (30).

2..4.1.6.1. Sintomi e danni alle coltivazioni

I primi sintomi corrispondono alla caduta dei piccioli sulle foglie superiori. Le foglie inferiori subiscono un ingiallimento che avanza verso l'apice e alla fine si seccano. Può manifestarsi un marciume verde della parte aerea, ma questo può essere reversibile. Dopo diventa permanente e la pianta muore.

In certe occasioni l'ingiallimento comincia dalle foglie inferiori e finisce per seccare la pianta. Se si realizza un taglio trasversale sul tronco si può osservare un oscuramento dei vasi.

2..4.1.6.2. Gestioni

Si può realizzare un controllo preventivo e tecniche culturali che consiste in un'alternanza delle coltivazioni, che reduce drammaticamente l'agente patogeno nei suoli infetti; eliminazione delle piante malate e dei residui di coltivazione; uso di semi certificati e trapianti sani; uso di varietà resistenti; disinfezione delle strutture e attrezzi di lavoro, e solarizzazione.

Il controllo chimico durante la coltivazione non è molto efficace, anche se si possono realizzare trattamenti preventivi (30).

2..5. Riferimenti bibliografici

1. ABAD MARY, BONIFAZ GABRIELA and LUDEÑA MARÍA. *Proyecto de inversión para la creación de una consultora agrícola técnica financiera en el cantón Daule* [online]. Tesis: Ingeniero Comercial. Guayaquil : Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2012. [Accessed 22 August 2013]. Available from: <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/20907/4/AGROSOL%20CONTENIDO%20PDF.pdf>
2. ECUADOR MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA, ACUACULTURA Y PESCA. *Sistema de información SINAGAP, Comercio Exterior, BASE DE DATOS* [online]. Quito Ecuador : Banco Central del Ecuador, 2012. [Accessed 12 August 2013]. Available from: <http://servicios.agricultura.gob.ec/sinagap/index.php/phocadownload-lista-categ>
3. ECUADOR. INSTITUTO DE PROMOCIÓN DE EXPORTACIONES E INVERSIONES. *GUIA COMERCIAL 2013* [online]. 2013. Dirección de inteligencia Comercial e inversiones. [Accessed 27 April 2013]. Available from: http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/02/PROEC_GC2013_ECUADOR.pdf
4. ECUADOR MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA, ACUACULTURA Y PESCA. *Sistema de información SINAGAP, Producción, BASE DE DATOS* [online]. Quito Ecuador : Ministerio de Agricultura, Ganaderia, Acuacultura y Pesca, 2012. [Accessed 12 August 2013]. Available from: <http://servicios.agricultura.gob.ec/sinagap/index.php/phocadownload-lista-categ>
5. ECUADOR, Instituto de Promoción de Exportaciones e inversiones e Inversiones. *Análisis sectorial de banano* [online]. August 2011. Pro Ecuador. [Accessed 28 August 2013]. Available from: <http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2011/09/PROEC-AS2011-BANANO.pdf>
6. TERRANOVA EDITORES. *Enciclopedia agropecuaria Terranova*. Santafé de Bogotá, Colombia : Terranova, 2001. ISBN 9589271219.
7. HERNÁNDEZ, M. and VIT OLIVIER, Patricia. *El plátano. Su cultivo, valor alimentario y consumo, enfermedades y plagas. La Habana. Instituto Cubano del Libro. 137pp* [online]. 1973. [Accessed 28 August 2013]. Available from: <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/30260>

8. GISPERT, Carlos and OCÉANO (FIRM). *Enciclopedia práctica de la agricultura y la ganadería*. Barcelona: Océano/Centrum, 1999. ISBN 8449414113 : 9788449414114.
9. BELALCÁZAR, Sylvio, ROSALES, Franklin E. and POCASANGRE, Luis E. El “Moko” del plátano y banano y el rol de las plantas hospederas en su epidemiología. *Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos*. 2003. P. 159.
10. *IN050667_es.pdf* [online]. [Accessed 29 August 2013]. Available from: http://www.musalit.org/pdf/IN050667_es.pdf
11. PEREZ VICENTE, Luis. Enfermedades de banano y plátano: Análisis retrospectivo y perspectivas. *Producción Agropecuaria*. 2009. Vol. 2, no. 1, p. 11–18.
12. MANCILLA, Alexis Hernández, GONZÁLEZ, Angela Porras and VICENTE, Luis Pérez. Epidemiología de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en Cuba. II. Pronóstico Bio-Climático de los Tratamientos contra la Enfermedad en Plátanos (*Musa* spp. AAB). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2000. Vol. 18, no. 1, p. 27–35.
13. COLOMBIA, Instituto Colombiano Agropecuario. *Manejo fitosanitario del cultivo del plátano (musa spp.)* [online]. 2012. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. [Accessed 29 August 2013]. Available from: <http://www.ica.gov.co/getattachment/08fbb48d-a985-4f96-9889-0e66a461aa8b/-nbsp;Manejo-fitosanitario-del-cultivo-de-platano.aspx>
14. LUCÍA GRAZIANI DE FARIÑAS, LIGIS ORTIZ DE BERTORELLI, JOHANNA ANGULO and PABLO PARRA. Características físicas del fruto de cacao tipos criollo, forastero y trinitario de la localidad de cumboto, venezuela. *Agronomía Tropical* [online]. 2002. Vol. 53, no. 3. [Accessed 6 September 2013]. Available from: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/tcat_52.htm
15. CHAMA, Zea. Situación fitopatológica del cacao criollo en tres localidades del occidente del país. [online]. [Accessed 6 September 2013]. Available from: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/inia_divulga/numero%204/moya_

a.pdf

16. ECUADOR, BANCO CENTRAL DEL ECUADOR. *Evaluación de la balanza comercial 2012* [online]. Quito Ecuador : Banco Central del Ecuador, 2012. [Accessed 6 September 2013]. Banco Central. Available from: <http://www.bce.fin.ec/documentos/Estadisticas/SectorExterno/BalanzaPagos/balanzaComercial/ebc201204.pdf>
17. ECUADOR, COORDINACIÓN GENERAL DEL SISTEMA DE INFORMACIÓN NACIONAL. *Reporte de la producción del CACAO* [online]. Quito Ecuador : Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, 2013. [Accessed 7 September 2013]. Available from: <http://servicios.agricultura.gob.ec/sinagap/index.php/superficie-produccion-y-rendimiento>
18. PURDY, LH and SCHMIDT, RA. Status of Cacao witches' broom: Biology, Epidemiology, and Management. *Annual Review of Phytopathology*. 1 September 1996. Vol. 34, no. 1, p. 573–594. DOI 10.1146/annurev.phyto.34.1.573.
19. PORRAS, V.H and SANCHEZ L. *Enfermedades del cacao* [online]. 1991. [Accessed 9 September 2013]. Tecnologías, Comunicación y desarrollo. Available from: [http://books.google.com.ec/books?id=hGgqAAAAYAAJ&pg=PA7&lpg=PA7&dq=Mazorca+negra+\(+Phytophthora+palmivora+\)&source=bl&ots=i9iUeEUoNs&sig=C7SqSZwqJZtsYMAUw3sIW7FsjMo&hl=es&sa=X&ei=1lluUrCyHIK09QSP1oFg&ved=0CG4Q6AEwCA#v=onepage&q=Mazorca%20negra%20\(%20Phytophthora%20palmivora%20\)&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=hGgqAAAAYAAJ&pg=PA7&lpg=PA7&dq=Mazorca+negra+(+Phytophthora+palmivora+)&source=bl&ots=i9iUeEUoNs&sig=C7SqSZwqJZtsYMAUw3sIW7FsjMo&hl=es&sa=X&ei=1lluUrCyHIK09QSP1oFg&ved=0CG4Q6AEwCA#v=onepage&q=Mazorca%20negra%20(%20Phytophthora%20palmivora%20)&f=false)
20. BENÍTEZ, Marcel Francisco Ayala. *Manejo Integrado de Moniliasis (Moniliophthora roreri) en el Cultivo de Cacao (Theobroma cacao L.) Mediante el Uso de Fungicidas, Combinado con Labores Culturales* [online]. Ingeniero Agropecuario. Guayaquil, Ecuador : Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2008. [Accessed 9 September 2013]. Available from: http://www.cib.espol.edu.ec/Digipath/D_Tesis_PDF/D-42610.pdf
21. ECUADOR, ASOCIACIÓN NACIONAL DE EXPORTADORES DE CAFÉ. *Café en Ecuador: Manejo de la Broca del Fruto* [online]. Manta : anecafé, 2002. [Accessed 10 September 2013]. Available from: http://dev.ico.org/projects/cabi_cdrom/PDFFiles/ECUADOR.pdf

22. ECUADOR MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA, ACUACULTURA Y PESCA. *Exportaciones a nivel de partida arancelarias del café* [online]. Quito Ecuador : Banco Central del Ecuador, 2013. [Accessed 10 September 2013]. Available from: <http://sinagap.magap.gob.ec/Sina/paginasCGSIN/VisorReporte.aspx>
23. GA-BRIEL CA-DEN-A- GÓMEZ¹ and A-LVA-RO GA-ITÁN-BUSTA-MA-N-TE. Las enfermedades del café: logros y desafíos para la caficultura colombiana del siglo XXI. *Manejo integrado de plagas y agroecología*. 2007. Vol. 77, p. 89–93.
24. ZEAS RAMÍREZ KARINA SOLEDAD. *Investigar el café zarumeño de la provincia del Oro y propuesta gastronómica* [online]. Tesis de pregrado, Administrado Gastronómico. Quito Ecuador : Tecnológica Equinoccial, 2010. [Accessed 10 September 2013]. Available from: http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/9687/1/41726_1.pdf
25. MEXICO, DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL. *Ficha Técnica Roya del Cafeto.pdf* [online]. 2013. [Accessed 12 September 2013]. Available from: <http://amecafe.org.mx/downloads/FichaT%C3%A9cnicaRoyadelCafeto.pdf>
26. ECUADOR, COORDINACIÓN GENERAL DEL SISTEMA DE INFORMACIÓN NACIONAL. *Reporte de área sambrada del tomate riñón a nivel nacional* [online]. Quito Ecuador : Ministerio de Agricultura, Ganaderia, Acuacultura y Pesca, 2013. [Accessed 10 September 2013]. Available from: <http://sinagap.magap.gob.ec/Sina/paginasCGSIN/VisorReporte.aspx>
27. ECUADOR, COORDINACIÓN GENERAL DEL SISTEMA DE INFORMACIÓN NACIONAL. *Reporte de producción del tomate riñón a nivel nacional* [online]. Quito Ecuador : Ministerio de Agricultura, Ganaderia, Acuacultura y Pesca, 2013. [Accessed 10 September 2013]. Available from: <http://sinagap.magap.gob.ec/Sina/paginasCGSIN/VisorReporte.aspx>
28. MÉXICO, SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESCA. *Produce México 39,5 toneladas de jitomate por cada hectárea* [online]. Boletines. México D:F. MÉXICO : Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo rural, Pesca y Alimento, 2010. [Accessed 15 September 2013]. Available from: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=309:pr

oduce-mexico-54-toneladas-de-tomate-por-cada-
hectarea&catid=6:boletines&Itemid=335

29. ITALIA, ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAD PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. *Fichas Técnica: Tomate (Lycopersicon esculentum)* [online]. Ficha Tecnicas. Roma Italia, [no date]. [Accessed 15 September 2013]. Available from:

http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/tomate.htm#a2

30. BLANCARD, D. *Enfermedades del tomate: observar, identificar, luchar* [online]. Mundi-Prensa, 1990. ISBN 9788471142658. Available from: <http://books.google.com.ec/books?id=dnz9AI9qNZIC00039>

31. BLANCARD, D. *ENFERMEDADES DEL TOMATE* [online]. Mundi-Prensa, 2011. ISBN 9788484764274. Available from: <http://books.google.com.ec/books?id=-a0SAQAAQBAJ00001>

32. PLAGAS, Proyecto Manejo Integrado de and TROPICALES, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza Programa de Mejoramiento de Cultivos. *Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de tomate* [online]. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE, Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales, 1990. ISBN 9789977570617. Available from: <http://books.google.com.ec/books?id=FnIOAQAIAAJ>

CAPITOLO N° 3.

SINTESI ELETTROCHIMICA DI SPECIE CON ATTIVITÀ BIOCIDA

3.1. Reazioni in ambiente acquoso

3.1.1. Elettrodo a idrogeno

L'idrogeno è il combustibile del futuro, grazie al suo alto calore di combustione ed alla sua grande capacità di energia per unità di volume se paragonato al petrolio; inoltre, i prodotti di combustione dell'idrogeno sono eco-compatibili. Esso è considerato il miglior combustibile, in particolare per il trasporto, sulla base dei seguenti criteri: la versatilità, l'efficienza di utilizzo e la sicurezza (1); per tali ragioni, la reazione elettrochimica di sviluppo di idrogeno è attualmente di particolare interesse, e viene studiata su svariati materiali elettrodici (2)(7).

Ad esempio, nell'elettrolisi dell'acqua per la produzione di idrogeno, sono stati testati elettrodi costruiti con diversi materiali elettroattivi come il platino (Pt), il nichel (Ni), l'acciaio inossidabile AISI304 (SS) e l'acciaio a basso tenore di carbonio (LCS) (8).

I risultati hanno mostrato come quest'ultimo materiale elettrodico sia in grado di produrre idrogeno di grande purezza, con la massima densità di corrente e la più alta efficienza di produzione. Inoltre, l'acciaio al carbonio è stato utilizzato come substrato per la deposizione di *coatings* compositi a base di Ni+Ti, Ni+V e Ni+Mo, che sono stati preparati mediante codeposizione di particelle di Ti, V o Mo da bagni di nichel (9).

I catodi industrialmente utilizzati per la reazione di sviluppo di idrogeno (HER, *Hydrogen Evolution Reaction*) sono a base di ferro e nickel, e sono in genere caratterizzati da elevati sovrapotenziali nei confronti dell'evoluzione di idrogeno (rispettivamente di 380 e 480 mV), il che porta ad un grande consumo di energia elettrica.

Pertanto, negli anni recenti, numerose indagini si sono focalizzate sulla preparazione di nuovi materiali elettrodici ad elevata attività elettrocatalitica per la HER (10)(12). Inoltre, l'idrogeno può essere prodotto mediante una diretta scissione dell'acqua, utilizzando sistemi fotoelettrochimici. In questo ambito, la categoria dei nano-ossidi riveste particolare interesse, e tra questi è il caso di nominare l' α -Fe₂O₃ (13); TiO₂, WO₃, ZnO, SrTiO₃, Cu₂O ed SiO₂ sono alcuni degli ossidi semiconduttori utilizzati come fotoelettrodi in celle fotoelettrochimiche per la scissione dell'acqua (14)(16).

Con riferimento all'ambiente acido (in ambiente neutro o alcalino, è la molecola d'acqua a fornire la specie H⁺), la reazione di sviluppo di idrogeno coinvolge tre possibili steps di reazione (17):

1. $H^+ + e^- + M = (M-H)$ (Volmer, o di scarica elettrochimica)
2. $(M-H) + (M-H) = 2M + H_2$ (Tafel, o di ricombinazione chimica)
3. $(M-H) + H^+ + e^- = 2M + H_2$ (Heyrovsky, o di desorbimento elettrochimico)

Il meccanismo della reazione dipende dalle proprietà del materiale elettrodico sulla quale questa avviene, e può coinvolgere gli stadi 1 e 2, oppure gli stadi 1 e 3 (in sostanza, gli stadi 2 e 3 sono uno alternativo all'altro). Poiché il primo stadio è comune ai due possibili meccanismi di reazione, e prevede il consumo di protoni, l'ambiente di reazione diviene progressivamente meno acido (più alcalino).

3.1.2. Elettrodo ad ossigeno

E' stata ampiamente ed intensamente studiata, tanto a causa della sua complessità quanto dell'importanza fondamentale che essa riveste in molte tecnologie pratiche ed in processi industriali (18). In particolare, come schematicamente rappresentato in Fig. 1, essa è al centro di diverse tecnologie di energia rinnovabile, come ad esempio l'elettrolisi dell'acqua, le batterie metallo-aria, le celle a combustibile, ed altre applicazioni industriali.

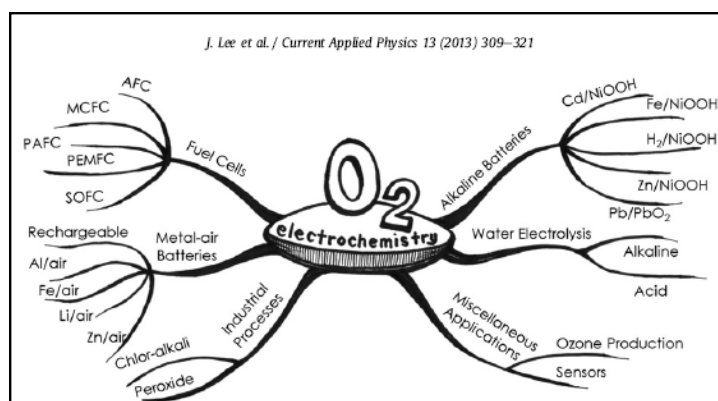


Figura 1. Tecnologie elettrochimiche dell'ossigeno e processi in cui esso svolge un ruolo fondamentale

L'elettrocatalisi di O_2 è un fenomeno nel quale la velocità delle reazioni di riduzione di ossigeno (ORR, *Oxygen Reduction Reaction*) e di sviluppo di ossigeno (OER, *Oxygen Evolution Reaction*), viene promossa dalla superficie elettrodica polarizzata da un potenziale elettrico. Per chiarire il concetto di elettrocatalisi di O_2 , vediamo un esempio, ovvero la reazione redox dell'acqua in mezzi liquidi molto acidi:



Ad un potenziale di 1,23 V, l'equilibrio redox riportato dalla (1) è in equilibrio termodinamico alla superficie dell'elettrodo; ciò significa che la velocità della reazione diretta eguaglia quella della reazione inversa, e non si registra alcuna corrente di reazione netta. Quando il potenziale elettrico si discosta dal potenziale di equilibrio in direzione positiva, gli elettroni si muovono dalla molecola d'acqua verso l'elettrodo, e si osserva una corrente di ossidazione (anodica) dovuta all'ossidazione dell'acqua per formare O_2 alla superficie dell'elettrodo. Al contrario, quando il potenziale elettrico si discosta dal potenziale di equilibrio in direzione negativa, gli elettroni si muovono dall'elettrodo verso la soluzione, e si osserva una corrente di riduzione (catodica) dovuta alla riduzione di O_2 per produrre acqua. Il potenziale aggiuntivo necessario a guidare la corrente elettrica attraverso la reazione elettrochimica è definito sovrapotenziale (19). La sovratensione necessaria per causare una certa corrente dipende principalmente dal materiale elettrodico. Il platino (Pt) è noto essere il migliore catalizzatore per la ORR; per la medesima reazione, l'elettrodo d'oro (Au) presenta una corrente molto più bassa, allo stesso sovrapotenziale, rispetto al Pt (18).

Fra le varie reazioni nell'elettrochimica dell'O₂, ORR e OER (Eq. (1)) sono di principale interesse ai nostri giorni, in quanto tali reazioni sono ostacoli ben noti che limitano il potere della densità di idrogeno (H₂) nelle celle a combustibile e l'efficienza energetica dell'elettrolisi dell'acqua, anche quando facilitate dall'impiego di catalizzatori metallici preziosi molto attivi, ma assai costosi.

In questo contesto, la progettazione di elettrocatalizzatori convenienti ed altamente attivi per le applicazioni di conservazione dell'energia è un elemento cruciale per il futuro sogno dell'economia energetica dell'idrogeno (20).

Successivamente alla scoperta di Nicholson e Carlisle del primo sistema di scissione dell'acqua, utilizzando la pila di Volta, si è evidenziato che molti tipi di materiali agiscono come catalizzatori per questa reazione. I primi elettrodi basati su ossidi di metalli di transizione, per lo sviluppo di ossigeno, vennero inventati da Beer nel 1960 ed inizialmente impiegati nel processo di produzione di cloro-soda, dal momento che si è dimostrato che materiali attivi per lo sviluppo di ossigeno risultano attivi anche per lo sviluppo di cloro (21)(22).

J. Lee et al. / Current Applied Physics 13 (2013) 309–321

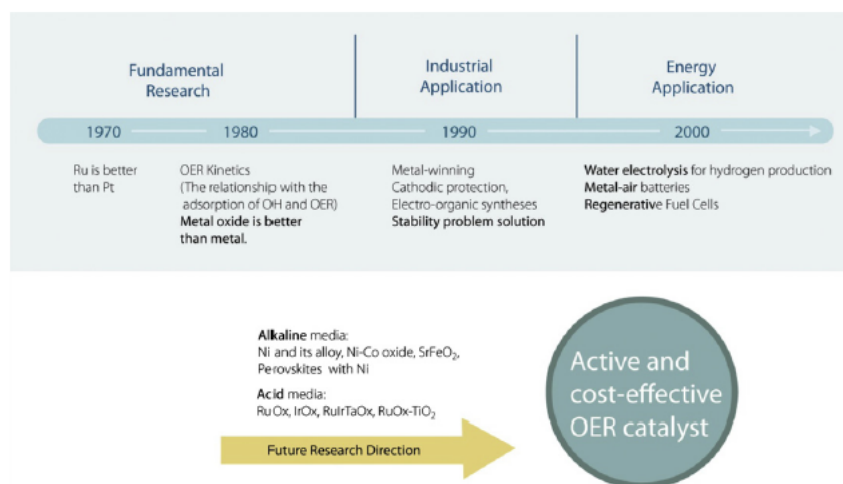


Figura 2. Breve cronologia storica dello sviluppo dei catalizzatore per l'OER, e tendenza della ricerca di futuri elettrocatalizzatori per tale reazione

Questi elettrodi consistono generalmente di un supporto di metallo passivato (es. titanio), rivestito con un film (pellicola) di ossidi di metalli nobili (RuO₂, IrO₂, PtO_x) (22). La Fig. 2 mostra la cronologia dello sviluppo di elettrocatalizzatori per l'OER, a partire dagli studi di base, fino ai processi industriali per l'uso della

corrente per la moderna trasformazione dell'energia, e dei dispositivi di conservazione.

Gli ossidi dei metalli di transizione (Ni, Co, Mn) e nobili (Ru, Ir) sono considerati i migliori materiali per gli anodi per la OER in mezzi alcalini ed acidi, rispettivamente, in quanto essi non possono essere ulteriormente ossidati con facilità.

Alcuni degli ossidi dei metalli di transizione (cioè PtO_2 , MnO_2 , Co_3O_4 e NiO) mostrano proprietà da semiconduttori, mentre altri (cioè RuO_2 , IrO_2 e RhO_2) mostrano una conducibilità metallica (23).

Tra gli ossidi dei metalli nobili, RuO_2 è il più attivo ma è anche piuttosto costoso. L'interesse per gli elettrodi di RuO_2 è iniziato a causa della sua scarsa reattività, ad alte densità di corrente, nelle celle cloro-soda (24)(25). Ha una conducibilità simile a quella di un metallo, in mezzi alcalini ed acidi, ma viene lentamente attaccato dagli elettroliti alcalini, ed in tal caso perde la sua attività. È solitamente preparato mediante decomposizione termica di sali metallici su substrati di Ti. Sono stati utilizzati per la OER elettrodi di tipo sinterizzato con legante in teflon, a film sputterato e a singolo cristallo di RuO_2 , il quale mostra pendenze di Tafel (parametro correlato al meccanismo della reazione) variabili a seconda dell'orientamento del cristallo (26)(28). Basandosi sulle cinetiche sperimentali osservate per la OER, sono stati proposti diversi meccanismi, uno dei quali coinvolge il meccanismo ciclico di ossidazione-riduzione insieme alla dissoluzione (21,27). La dissoluzione degli elettrocatalizzatori a base di RuO_2 è stata ampiamente studiata e si è trovato che essa ha luogo anche se le proprietà dell'elettrocatalizzatore sono buone; in generale, qualsiasi aumento dell'attività elettrocatalitica porta ad una diminuzione della stabilità anodica (21).

Studi simili sono stati condotti per confrontare la stabilità di Ru metallico ed RuO_2 : si è riscontrato che elettrodi a base di RuO_2 sono stabili alla corrosione tra 1,5 e 1,8 V vs. SCE (29); tuttavia, essi manifestano un breve tempo di vita, a causa della formazione di RuO_4 (instabile) ed alla sua successiva dissoluzione (30)(31).

L' IrO_2 mostra una maggiore sovratensione per l'OER in ambiente acido, ma presenta una maggiore resistenza alla corrosione, dovuta ad un'attività

catalitica leggermente inferiore rispetto ad RuO_2 . Gli elettrodi ad IrO_2 sono solitamente preparati mediante decomposizione termica, deposizione elettrolitica da precursori di Ir, e sputtering di film sottili (32,33). È stato segnalato il verificarsi di disattivazione sotto condizioni di polarizzazione a lungo termine, collegate all'aumento della valenza del catione di Ir (34).

Un approccio per migliorare la stabilità e la resistenza alla corrosione degli anodi citati è quello di mescolare il componente cataliticamente attivo con altri metalli (per es. Pt (35)) ed ossidi metallici (Ta_2O_5 (36), TiO_2 (37), SnO_2 (38), ZrO_2 (39), e Sb_2O_5 (40)) per formare ossidi misti. Diversi studi hanno utilizzato miscele di RuO_2 ed IrO_2 , anche in combinazione con altri metalli di transizione, come catalizzatori per l'OER. Si è stabilito che le miscele di RuO_2 e IrO_2 presentano una migliore stabilità nell'elettrolita solido polimerico (SPE) nelle celle per elettrolisi dell'acqua, mentre RuO_2 e TiO_2 mostrano un effetto sinergico (27). Questo approccio è illustrato nello studio di Mamaca et al. (41), che hanno mostrato come la presenza di Ir contribuisca alla stabilità, contro la dissoluzione di Ru.

Per quanto riguarda gli ossidi dei metalli non nobili, l'elettrodo a Nichel (Ni) per l'OER è quello più pratico negli elettrolizzatori in acqua alcalina. Il Ni e le sue leghe presentano molte delle caratteristiche desiderabili per gli elettrodi pratici per OER. Gli elettrodi a Ni poroso sono di solito usati sia per lo sviluppo di idrogeno che per quello di ossigeno nelle celle di elettrolisi dell'acqua, per aumentare l'area di contatto a tre fasi e per realizzare alta densità di potenza e densità di corrente di funzionamento (42). Essi sono altamente resistenti alla corrosione e relativamente poco costosi.

Il sovrapotenziale per l'OER su elettrodi di Ni è maggiore di quanto desiderato, ma può essere opportunamente ridotto con l'utilizzo di elettrocatalizzatori o aumentando l'area superficiale effettiva dell'elettrodo, come nel caso del Ni Raney.

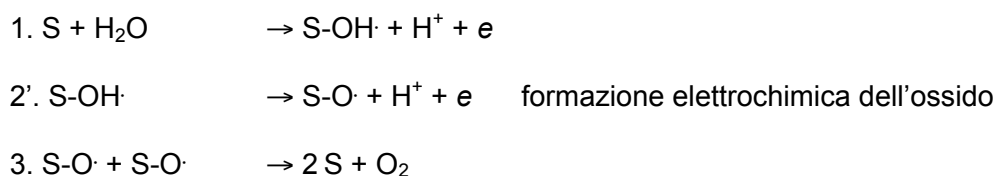
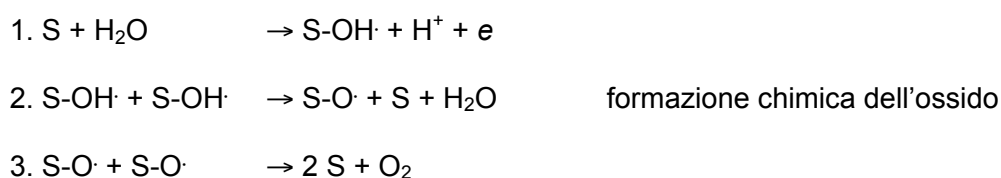
Un'altra classe di composti per ORR ed OER in mezzi alcalini è rappresentata dagli ossidi spinello (AB_2O_4 , dove A rappresenta un catione bivalente e B un catione trivalente), che presentano interesse in termini di attività, disponibilità, basso costo, stabilità termodinamica, bassa resistenza elettrica e compatibilità

ambientale (43). Gli ossidi di tipo spinello sono preparati con tecniche che includono la decomposizione termica (44), la spray pyrolysis (45), il sol-gel (46), la deposizione elettrostatica a spruzzo (47), e le precipitazioni (48). In aggiunta agli ossidi spinello, sono ampiamente studiate le perovskiti (ABO_3 , dove per convenzione internazionale per A si intende un elemento di grande raggio ionico e per B un elemento di piccolo raggio ionico): il loro reticolo cristallino può ospitare una grande varietà di ossidi di metalli di transizione, grazie alla capacità di distorcere la propria struttura a simmetria cubica.

In ambiente alcalino, la sequenza di attività per i vari ossidi, ad un fissato sovrapotenziale, è la seguente: $RuO_x > RhO_x > NiO_x \sim IrO_x > PtO_x > PdO_x$ (49).

E' stata studiata anche l'OER in soluzioni acide utilizzando PbO_2 , e si è scoperto che essa dipende dalla struttura dell'ossido (50); sebbene PbO_2 non abbia una buona attività elettrocatalitica, rispetto ad RuO_2 ed IrO_2 , la sua elevata resistenza alla corrosione lo rende utile come materiale elettrodico per l'industria. E' stato testato come materiale anodico anche l' MnO_2 , da solo o in miscela con RuO_2 (51).

Sono di seguito riportati i possibili meccanismi di reazione per lo sviluppo di ossigeno (in ambiente acido; nel caso di mezzi alcalini, si considera l'anione OH^- al posto della molecola d'acqua):



Come per lo sviluppo catodico di idrogeno, al primo stadio *di scarica* (in realtà, è improprio definirlo come tale, dal momento che la molecola d'acqua è elettricamente neutra) fanno seguito due stadi tra loro alternativi (2 e 2'), uno avente natura chimica e l'altro natura elettrochimica. In ogni caso, si ottengono

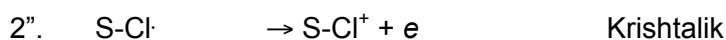
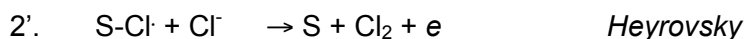
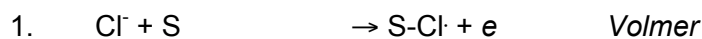
radicali $O\cdot$ chimicamente adsorbiti alla superficie dell'elettrodo, che successivamente evolvono reagendo tra loro per dare la molecola di O_2 .

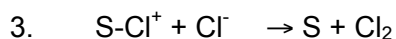
L'ossidazione della molecola d'acqua (stadio 1) comporta il rilascio di protoni e conseguentemente una progressiva acidificazione del mezzo in cui ha luogo la reazione.

3.1.3. Elettrodo a cloro

Le reazioni di sviluppo anodico di ossigeno e di cloro sono le più importanti dal punto di vista pratico; mentre la seconda è importante di per sé stessa, come processo tecnologico, la prima risulta essere la più ovvia reazione anodica accoppiata ad un gran numero di processi catodici, per esempio nell'elettrolisi dell'acqua per la produzione di idrogeno e nei processi di "*metal electrowinning*", sebbene in alcuni casi quest'ultimo processo sia condotto a partire da soluzioni di cloruri metallici, con conseguente sviluppo di cloro come reazione anodica (52). Dal momento che l'acqua è il componente principale della maggior parte delle soluzioni elettrolitiche di uso pratico, lo sviluppo di ossigeno è sempre una possibile reazione collaterale a quella dello sviluppo di cloro, ed è per questo da tenere in considerazione per quanto riguarda la stabilità e la resistenza alla corrosione degli elettrodi utilizzati.

La reazione di sviluppo di cloro è semplice, e dal punto di vista del meccanismo di reazione assomiglia a quella di sviluppo di idrogeno; di seguito sono descritti i possibili stadi di reazione:





in tutti i casi, S-Cl[•] corrisponde ad un radicale Cloro adsorbito (fisicamente o chimicamente) alla superficie dell'elettrodo.

La reazione procede di regola con basse pendenze di Tafel in un intervallo di valori compresi tra 0.03 e 0.04 V per decade di densità di corrente (53).

3..1.3.1. Problemi di selettività

Non sorprende affatto che la reazione di evoluzione di cloro (ChIER, *Chlorine Evolution Reaction*) sia una delle reazioni più studiate in elettrochimica. Il potenziale elettrodico standard per la ChIER a 25 °C, calcolato dall'energia standard di Gibbs di formazione di Cl⁻, è pari a 1,358 V (vs. NHE) in ambiente acido.

La produzione anodica di cloro da soluzione acquosa sarebbe impossibile, su basi termodinamiche, lungo tutto l'intervallo di pH; essa può avere luogo in un piccolo intervallo di valori di pH acidi in quanto lo sviluppo di O₂, pur essendo termodinamicamente favorito (1,299V vs. NHE), mostra in tali condizioni un sovrapotenziale più elevato.

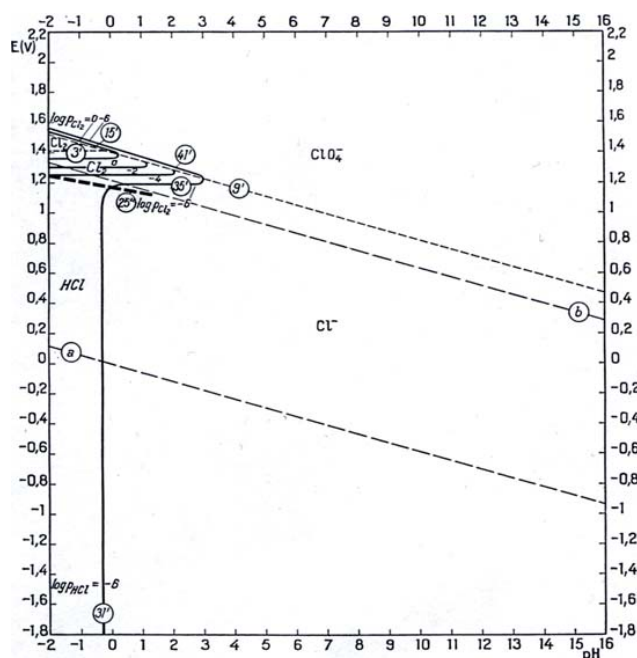
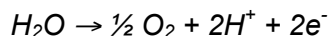


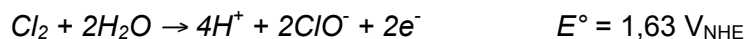
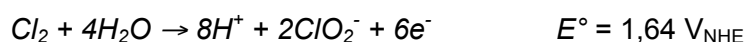
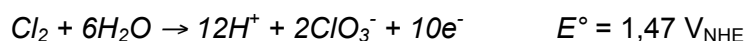
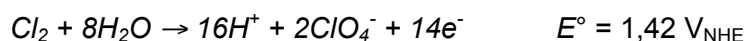
Figura 3. Diagramma Potenziale-pH per il sistema cloro-acqua a 25 °C

Come detto sopra, lo sviluppo di ossigeno avviene, teoricamente, a potenziali più bassi rispetto alla ChIER, e la sua formazione può avere luogo durante la reazione di ossidazione dei cloruri. D'altra parte, la reazione di sviluppo di ossigeno:



porta alla locale acidificazione della soluzione, con conseguente spostamento della reazione verso potenziali più anodici; in tal senso, la reazione di sviluppo di O_2 da soluzioni di cloruri è detta "self-retarding" (54).

Il cloro, come gli altri alogeni, è relativamente solubile in acqua; oltre alla molecola solvatata di cloruro, è possibile che siano presenti in soluzione diverse specie clorate, come risultato di svariate reazioni chimiche (55):



L'esistenza e la stabilità di queste specie dipende anche dal pH della soluzione, e dalla loro solubilità, come si può notare dai diagrammi di Pourbaix (Figure 4-7).

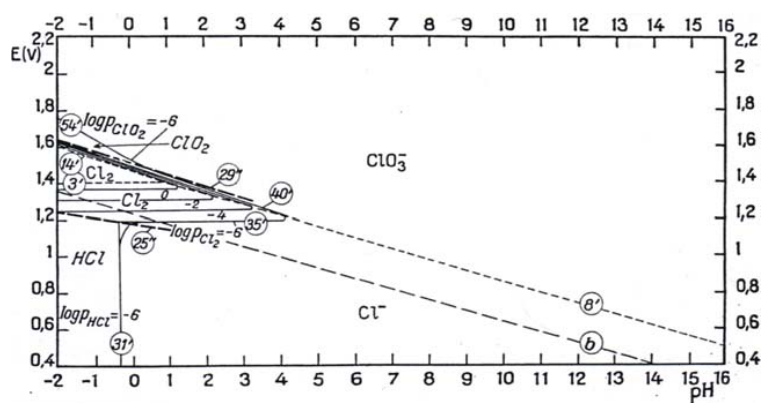


Figura 4. Stabilità relativa dei clorati. Equilibrio tra le specie disciolte Cl^- , Cl_2 , ClO_3^- e le specie gassose HCl , Cl_2 , ClO_2

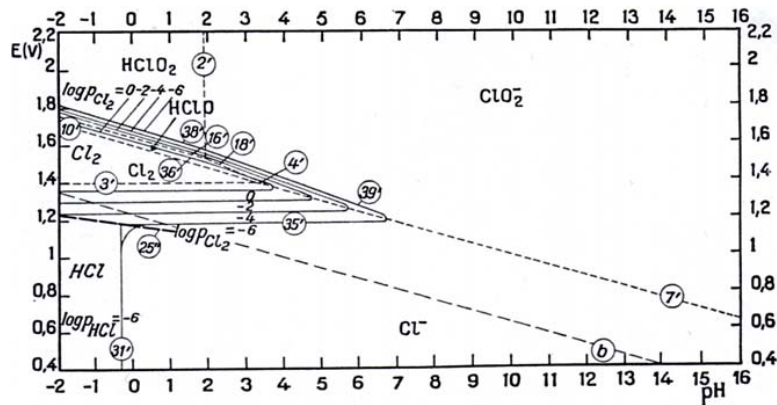


Figura 5. Stabilità relativa dei cloriti. Equilibrio tra le specie disciolte Cl^- , Cl_2 , HClO , HClO_2 , ClO_2^- e le specie gassose HCl , Cl_2

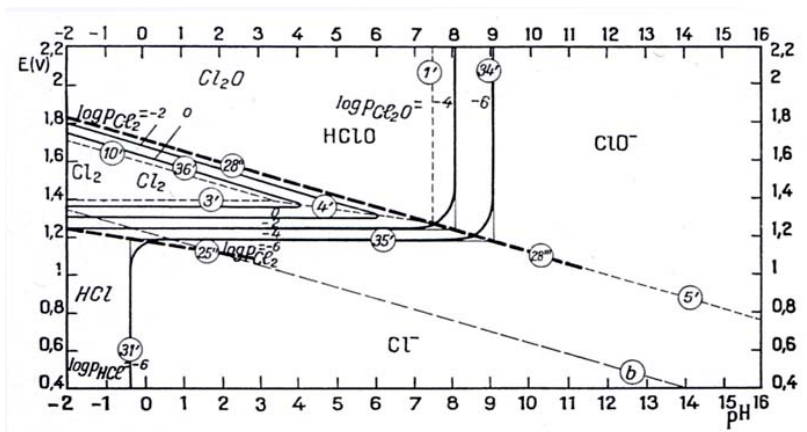


Figura 6. Stabilità relativa dell'ipoclorito. Equilibrio tra le specie disciolte Cl^- , Cl_2 , HClO , ClO^- e le specie gassose HCl , Cl_2 , Cl_2O

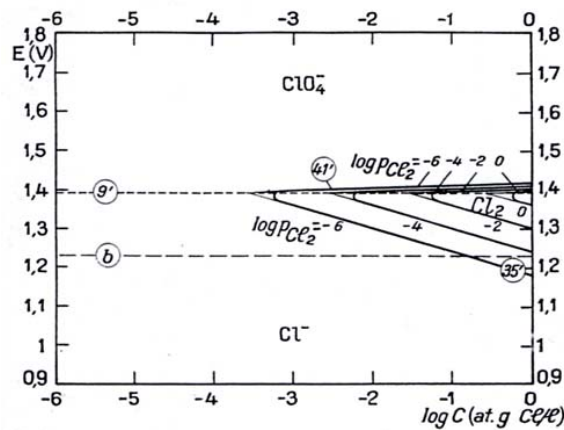


Figura 7. Diagramma di equilibrio Potenziale-concentrazione per il sistema cloro-acqua a $25\text{ }^\circ\text{C}$ ($\text{pH}=0$).

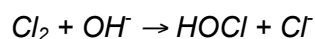
La formazione delle varie specie clorurate è generalmente possibile a causa della concomitante reazione di sviluppo di ossigeno; sebbene quest'ultima sia

“autoritardante”, essa avviene durante l’evoluzione di cloro, diminuendo l’efficienza di corrente per lo sviluppo di cloro. La OER avviene specialmente a basse concentrazioni di cloruri, condizione in cui risulta favorita la produzione di ipoclorito.

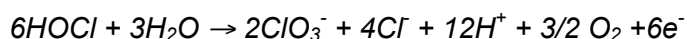
La reazione di sviluppo di cloro avviene con bassi sovrapotenziali sulla maggior parte dei materiali, mentre quella di ossigeno ha luogo generalmente con alti sovrapotenziali e con marcata dipendenza dal materiale elettrodico; il motivo sta nel fatto che la prima è tanto più favorita dal punto di vista cinetico rispetto alla seconda, tanto minore è il pH della soluzione.

Nelle condizioni dell’elettrolisi industriale (salamoia satura, pH da 2 a 4), il cloro viene liberato unitamente ad una certa quantità di ossigeno, differente a seconda del materiale elettrodico utilizzato; alcuni studi hanno mostrato che 4 risulta essere il valore limite del pH, oltre il quale il contenuto di ossigeno nel gas diviene inaccettabile. Al di sotto di tale valore di pH, è il valore del sovrapotenziale di sviluppo dell’ossigeno (dipendente dal materiale elettrodico) a giocare un ruolo fondamentale.

Ad alti valori di pH, e in soluzioni a bassa concentrazione di cloruri, l’efficienza per lo sviluppo di cloro diminuisce, dando spazio ad altre reazioni collaterali, come ad esempio alla formazione di acido ipocloroso:



Inoltre, l’ossidazione elettrochimica dell’acido ipocloroso può portare allo sviluppo di ossigeno gassoso:



Di conseguenza, l’efficienza dello sviluppo di cloro (selettività per il cloro rispetto all’ossigeno) dipende dalla concentrazione e composizione dell’elettrolita, dalla temperatura, dalla densità di corrente e dalla natura dell’elettrodo.

L’efficienza di sviluppo di cloro su anodi ricoperti di RuO₂ viene ad essere del 97% nelle celle industriali. Sebbene i bassi sovrapotenziali per lo sviluppo di ossigeno siano una caratteristica propria degli anodi a base di RuO₂, i loro

valori sono ancora sufficientemente troppo elevati perché l'ossigeno si possa sviluppare al posto del cloro se ci si trova ad un pH prossimo a 2. A basse densità di corrente, il rendimento in cloro è basso e lo sviluppo di ossigeno può ancora essere privilegiato, ma il rendimento aumenta all'aumentare di j . Quest'ultimo aspetto viene spiegato dal fatto che la curva $E-\log j$ relativa allo sviluppo di ossigeno è più ripida rispetto a quella per lo sviluppo di cloro, ossia, a parità di densità di corrente, il sovrapotenziale dello sviluppo di ossigeno è molto più alto di quello dello sviluppo di cloro; ne segue che la selettività per il cloro aumenta all'aumentare di j . La selettività viene anche favorita da un aumento della temperatura.

L'efficienza dello sviluppo di cloro diminuisce al diminuire della concentrazione di cloruri: infatti, una elevata densità di corrente provoca il progressivo consumo di ioni cloruro alla superficie dell'elettrodo (non ripristinabili dall'afflusso di ioni dal volume della soluzione), favorendo la reattività della molecola d'acqua, con conseguente liberazione di ossigeno.

Quando la concentrazione dei cloruri in soluzione è bassa, il rendimento diminuisce linearmente con l'aumentare del pH nell'intervallo da 1 a 3, effetto dovuto alla posizione relativa delle curve di polarizzazione parziale e non alle reazioni omogenee in soluzione. Inoltre, il rendimento diminuisce quando il pH della soluzione è maggiore di 4 (54).

3.2. Studi di meccanismo

Il cloro è uno dei più importanti prodotti dell'industria elettrochimica; questo è il motivo per il quale molti ricercatori hanno studiato nuovi materiali che potessero migliorare le prestazioni degli elettrodi di grafite. I primi studi riguardanti la ChIER vennero condotti ad elettrodi di Pt: Frumkin e Tedoradse studiarono la ionizzazione di Cl_2 in soluzione fortemente acida, variando la concentrazione di Cl^- (56); in quel lavoro, fu suggerito un meccanismo di reazione per la ionizzazione del cloro nel quale entrambi gli stadi elettrochimici sono cineticamente determinanti, in ugual misura. Tra i primi studi vi è altresì la stima dei potenziali standard della reazione Cl^-/Cl_2 a differenti temperature (57). L'elettrodo utilizzato era un foglio di Tantalio ricoperto con una lega Pt/Ir (55 e

45%, rispettivamente), sufficientemente resistente alla corrosione in condizioni ossidanti di sviluppo di cloro; l'elettrolisi era eseguita in una soluzione di HCl 4M, variando la temperatura da 25 a 80 °C. Il lavoro riporta il potenziale standard calcolato a differenti temperature, l'energia libera standard, ecc.. Successivamente, gli stessi autori studiarono i processi anodici e catodici per la ChIER su Ti ricoperto di Pt-Ir e Ti ricoperto da Pt (58); i test vennero condotti in soluzione di NaCl, saturata con Cl₂, cambiando la concentrazione sia dell'NaCl che del Cl₂.

Yokoyama ed Enyo studiarono la ChIER ad elettrodi di Pt, Ir e Rh, in soluzioni acquose di HCl (59); lo studio venne focalizzato sul meccanismo di reazione e condusse alla proposta di differenti meccanismi per ciascun materiale elettrodico. Uno dei materiali più studiati è certamente RuO₂ 30 mol% -TiO₂ 70 mol%, essendo quest'ultimo uno dei primi DSA prodotti. Erenburg e collaboratori scrissero un certo numero di articoli concernenti la ChIER (60-63); tali studi vennero condotti con lo scopo di capire il meccanismo di reazione, dal momento che l'efficienza di un particolare elettrodo era già stata esplorata. Furono condotti esperimenti in soluzioni di NaCl + HCl con Cl₂ disciolto; le pendenze di Tafel, i numeri stechiometrici e gli ordini di reazione per Cl⁻, Cl₂ e H⁺ furono determinati per entrambe le reazioni, catodica ed anodica. Sulla base di un grande numero di studi su questo materiale, venne proposto un meccanismo per la ChIER nel quale il pH gioca un ruolo importante; questo meccanismo verrà descritto nel dettaglio successivamente.

Nel 1974, Janssen studiò la ChIER su diversi tipi di grafite (64); furono studiate le differenze tra elettrodi di grafite vecchi e nuovi, come anche le conseguenti differenze di meccanismo. Venne anche studiata la formazione di uno strato di ossido alla superficie dell'anodo; la cosa interessante era che il grado di ricoprimento dato dal cloro atomico aumentava all'aumentare del potenziale anodico, sugli elettrodi di grafite sia vecchi che nuovi, suggerendo il desorbimento elettrochimico come stadio cineticamente determinante per il meccanismo di ChIER su grafite. Alcuni anni più tardi, Janssen *et al.* (65) studiarono la ChIER su RuO₂ 30 mol% -TiO₂ 70 mol%, e su elettrodi di RuO₂ puro: non vennero evidenziati effetti dovuti alla rugosità della superficie né al numero degli strati depositati. Sugli elettrodi di RuO₂-TiO₂ si trovò che tanto la

pendenza di Tafel quanto la corrente diminuivano con il tempo di elettrolisi; la pendenza cambiava da 50 a 30 mV/decade; per contro, su quelli di RuO₂ puro, la pendenza rimaneva costante, come anche la densità di corrente. Ad entrambi gli elettrodi venne inoltre studiato l'effetto dello spessore dello strato attivo, della temperatura e del tempo (invecchiamento) sulla pendenza di Tafel e sulla densità di corrente; furono condotti esperimenti per chiarire il meccanismo della ChIER, e fu infine proposto il desorbimento elettrochimico quale stadio cineticamente determinante.

Arikado e collaboratori prepararono elettrodi basati su RuO₂, IrO₂, LaNiO₃, La_{0.6}Sr_{0.4}CoO₃, Eu_{0.1}W_{0.9}O₃, Ti/PtO₂ e Pt/MnO₂, e studiarono la loro attività catalitica ed il meccanismo della ChIER (66). Vennero ottenute molte informazioni significative: il sito attivo, su elettrodi ad ossido, è rappresentato in genere dal catione metallico; il ricoprimento dello ione cloruro sulla superficie elettrodica sembra dipendere non solo dalla concentrazione dei cloruri ma anche dal pH della soluzione; la corrente anodica mostra una dipendenza dal pH della soluzione. Per ogni materiale elettrodico, il meccanismo della ChIER dipende dalle interazioni tra i radicali adsorbiti Cl· e la superficie elettrodica; gli autori suggerirono che film elettrodici contenenti cationi di un metallo di transizione con orbitali t_{2g} parzialmente pieni ed e_g parzialmente vuoti seguono il meccanismo di Volmer-Heyrovsky, mentre film elettrodici contenenti cationi di un metallo di transizione con orbitali t_{2g} del tutto pieni o mezzi pieni ed e_g parzialmente pieni seguono il meccanismo di Volmer-Tafel. Le correnti di scambio risultano maggiori su questi ultimi.

Il desiderio di capire la ChIER su elettrodi ricoperti di RuO₂-TiO₂ portò molti ricercatori all'uso di nuove tecniche sperimentali, come l'impedenza AC. Burrows *et al.* studiarono la reazione di sviluppo di cloro e di ossigeno a varie composizioni di RuO₂-TiO₂ (67). La OER viene considerata una reazione parassita rispetto alla ChIER: essendo impossibile evitare la prima, la cosa migliore è studiare entrambe le reazioni sullo stesso elettrodo. Le migliori prestazioni per la ChIER furono ottenute con elettrodi contenenti il 20 e l'80% di RuO₂, poiché il meccanismo di reazione dipende dal ricoprimento dell'elettrodo. Le stesse composizioni erano le più attive anche per la OER, e il grafico

cambiava all'aumentare del potenziale. Gli autori furono in grado di calcolare la porzione non attiva per la OER per ogni composizione elettrodica.

Conway e Novak (68) studiarono il meccanismo di Cl⁻ su Pt, focalizzandosi sul ruolo della superficie del Pt (ossidata o non ossidata). Per evitare l'ossidazione del Pt, la quale non si sarebbe potuta evitare durante l'ossidazione dei cloruri da mezzo acquoso, fu usato come solvente il tetraidrofurano (THF). Per modificare il grado di ossidazione alla superficie di Pt, furono aggiunte alla soluzione di THF differenti quantità di acqua; fu studiata anche l'influenza della concentrazione di cloruri. Gli autori proposero un metodo per identificare il meccanismo di reazione anche quando la pendenza di Tafel non fosse immediatamente identificabile; lo stesso metodo rendeva altresì possibile la stima delle costanti cinetiche. La cosa interessante era che lo sviluppo di cloro avveniva più facilmente su un elettrodo parzialmente ricoperto da uno strato di ossido piuttosto che su un elettrodo con superficie metallica libera o su un Pt totalmente ossidato, essendo il cloro adsorbito legato più debolmente ai siti ossidati di Pt. La reazione di ricombinazione si applica in tutti i casi. In un altro articolo, gli stessi autori studiarono gli effetti dell'adsorbimento dello ione cloruro nelle cinetiche controllate dalla ricombinazione su Pt (69). La cinetica dello sviluppo anodico di cloro dipende dalla concentrazione dello ione cloruro attraverso un meccanismo di ricombinazione di Cl⁻, per il quale la costante di velocità dipende dall'assorbimento specifico dello ione Cl⁻ e dallo stato di ossidazione della superficie del Pt. Usando il metodo suggerito in (68), furono calcolate la costante di quasi-equilibrio e la costante di velocità; l'ordine di reazione era in accordo con gli effetti di adsorbimento specifico di Cl⁻ nella cinetica di ricombinazione.

Denton e collaboratori (70) studiarono elettrodi ad RuO₂-TiO₂ contenenti 20, 35 e 80 mol% di RuO₂, usando differenti concentrazioni di cloruro in ambiente acido. I valori delle pendenze di Tafel risultarono uguali a 40 mV/decade a basse densità di corrente, e a 120 mV/decade ad alte correnti, per tutte le composizioni degli elettrodi; tale risultato fu spiegato con un'inibizione del processo di ossidazione dovuta al prodotto Cl₂. Gli autori suggerirono che l'acido ipocloroso potesse formarsi per primo durante la sintesi del cloro.

Mozota e Conway (71) condussero uno studio ad elettrodi di IrO_2 , preparati attraverso una crescita elettrochimica del film di ossido, ed aventi differente spessore. Fu studiata la dipendenza del meccanismo di reazione dalla concentrazione dei cloruri e dalla morfologia elettrodica. Fu trovato un apparente miglioramento dell'elettrocatalisi con film di IrO_2 modificato, soprattutto a causa dell'aumento della area superficiale reale. Inoltre, lo spessore dimostrò di avere un ruolo importante sulla caduta ohmica: aumentando lo spessore, anche la caduta ohmica aumenta, ad alti potenziali anodici. Conway *et al.* proseguirono i loro studi sulla ChIER su anodi con strato sottile di RuO_2 , studiando il comportamento dell'intermedio adsorbito Cl^- nello sviluppo di cloro (72). Essi suggerirono che lo stato della superficie di RuO_2 determina la cinetica di ChIER, ed in particolare l'adsorbimento di Cl^- , con dipendenza apprezzabile dal potenziale anodico iniziale. Tale effetto potrebbe derivare da un cambiamento dello stato di ossidazione della superficie di RuO_2 dipendente dal potenziale o dalla temperatura; per esempio, dipendendo dal potenziale, più elevati stati di ossidazione di Ru sulla superficie, fino a Ru^{VI} , possono formarsi. Gli autori confermarono che il meccanismo di reazione era controllato dalla ricombinazione.

Nel 1984, Erenburg e Krishtalik condussero uno studio sull'influenza del pH sulla cinetica dello sviluppo di cloro (73); il materiale anodico era di nuovo RuO_2 30 mol% - TiO_2 70 mol%. La velocità di reazione aumentava all'aumentare del pH; l'ordine di reazione rispetto ad H^+ dipendeva sia dal pH sia dal potenziale elettrodico. L'ordine di reazione rispetto a Cl^- era indipendente dal pH ed era uguale ad 1. Tenendo conto dei dati sovrastanti, fu proposto da Erenburg (74) un nuovo meccanismo per la reazione di sviluppo di cloro: per la prima volta fu suggerito un ruolo per il sito attivo, e venne considerato l'adsorbimento di OH.

Consonni e Trasatti studiarono gli ossidi policristallini RuO_2 , IrO_2 , Co_3O_4 , NiCo_2O_4 , $\text{RuO}_2+\text{IrO}_2$ (75); furono condotti esperimenti in soluzioni di NaCl con e senza Cl_2 disciolto. Per tutti i materiali fu misurata la stessa pendenza di Tafel: 40 mV/decade; in tutti i casi, la ChIER risultava essere la reazione "facile" mentre l'OER era quella "impegnativa"; inoltre la reazione era influenzata dal pH. Kelly e collaboratori prepararono elettrodi di $\text{Ti}/(\text{Ir}_x\text{Ti}_{1-x})\text{O}_2$ e $\text{Ti}/(\text{Ru}_x\text{Ti}_{1-x})\text{O}_2$ (76); su entrambi tali materiali venne individuato un meccanismo di Volmer-

Heyrovsky, modificato per prendere in considerazione il ruolo degli ioni cloruro adsorbiti. Fu anche determinata la concentrazione superficiale del metallo elettroattivo e, di conseguenza, fu valutato il ruolo specifico dei siti attivi. Più tardi, furono studiate da diversi autori le miscele binarie di ossidi, basate su Ru e Ti (77-82).

Walton e collaboratori studiarono l'applicazione degli ultrasuoni come metodo per migliorare il trasporto di massa durante la reazione di sviluppo di cloro (83). In realtà, lo studio fu esteso anche alle reazioni di sviluppo di idrogeno ed ossigeno, utilizzando elettrodi di platino platinato; gli ultrasuoni erano prodotti mediante un bagno ad ultrasuoni. Questi ultimi mostrarono di migliorare tanto la reazione di sviluppo di idrogeno quanto quella di cloro; entrambe le reazioni erano reversibili e limitate dalla rimozione dei prodotti gassosi dalla superficie elettrodica. Inoltre, l'uso degli ultrasuoni prolungava il tempo di vita dell'elettrodo in condizioni di sviluppo di cloro.

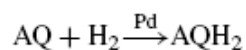
Da quanto detto, la maggior parte degli studi sui materiali anodici appare basata sul gruppo dei metalli del platino; un'altra direzione di ricerca concerne il rimpiazzo di parte del TiO_2 aggiunto in miscela con un altro metallo o ossido metallico. Questa via fu seguita da Faria, Boodts e Trasatti, quando decisero di preparare elettrodi $\text{Ru}_{0.3}\text{Ti}_{0.7-x}\text{Ce}_x\text{O}_2$ per studiare le reazioni di sviluppo di cloro ed ossigeno (84). Il meccanismo della ChIER rimane lo stesso a tutti gli elettrodi preparati; la sostituzione di Ti con Ce aumenta l'area superficiale, ma una sostituzione maggiore del 10% deprime l'attività catalitica. Inoltre, un intenso sviluppo di cloro consuma lo strato attivo (contenente CeO_2), essendo quest'ultimo meno stabile rispetto alle miscele basate su TiO_2 .

Un altro materiale testato per la ChIER fu il diamante altamente drogato con boro (BDD) (85-87); dal momento che il BDD mostra un elevato sovrapotenziale per l'OER, tale materiale potrebbe essere un buon candidato per la produzione di cloro da soluzioni diluite di NaCl. Questo materiale anodico garantisce un'eccellente stabilità, anche sotto condizioni anodiche drastiche; la pendenza di Tafel era costante per tutte le concentrazioni studiate di cloruro, e la reazione era dipendente dal pH della soluzione. Gli elettrodi di diamante furono poi "decorati" con RuO_2 : piccoli quantitativi di RuO_2 aumentano significativamente l'efficienza della produzione di cloro sulla superficie del BDD, mentre nel caso di

quantitativi più elevati il meccanismo della ChIER cambia radicalmente (ritorna ad essere quello dell' RuO_2 puro).

3..2.1. Elettrodo ad acqua ossigenata

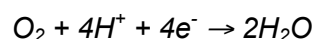
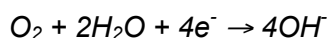
L'applicazione del perossido di idrogeno è continuamente in aumento in molti processi tecnologici (candeggio, trattamento delle acque di scarico, ecc.), a causa dei suoi numerosi vantaggi rispetto al cloro. Il perossido di idrogeno è una sostanza chimica "verde", perché i prodotti finali della sua decomposizione sono innocui. Fino ad ora, il perossido è stato prodotto attraverso una reazione chimica (processo all'antrachinone) (88,89); questa si basa sulla seguente sequenza di reazioni:



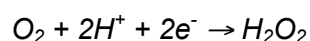
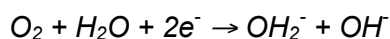
Nel primo stadio, l'antrachinone (AQ) viene idrogenato, in presenza di un catalizzatore, al corrispondente idro-antrachinone (AQH_2); nello stadio successivo, quest'ultimo viene ossidato dall'ossigeno molecolare, producendo H_2O_2 . Sfortunatamente, sono necessari molti passaggi in questo processo.

Il principale vantaggio della sintesi elettrochimica è che non è necessaria alcuna separazione.

La reazione di riduzione dell'ossigeno può avvenire attraverso due cammini diversi, tanto in mezzo alcalino (90)91) quanto in mezzo acido (92); uno di questi interessa lo scambio diretto di quattro elettroni:

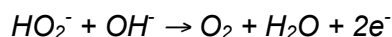


Il secondo cammino di reazione coinvolge soltanto due elettroni, e porta alla formazione di acqua ossigenata:

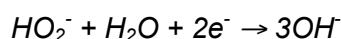


In entrambi gli ambienti, ci sono due reazioni parassite principali che determinano la perdita del prodotto o un abbassamento dell'efficienza di corrente osservata (93). Per quanto concerne l'ambiente alcalino esse sono:

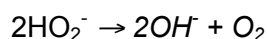
a) l'ossidazione elettrochimica di H_2O_2 alla superficie dell'anodo:



b) la riduzione elettrochimica di H_2O_2 alla superficie del catodo:



le quali, sommate, danno origine alla seguente reazione di disproporzione:

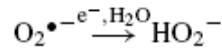
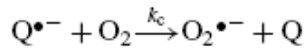
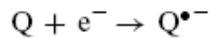


Queste reazioni possono avvenire tanto nel volume della soluzione (*bulk*) quanto alla superficie dell'elettrodo.

La produzione di perossido di idrogeno e la sua stabilità dipendono dal materiale costituente l'elettrodo: ad esempio, la riduzione dell'ossigeno su catodi di mercurio, oro e carbone conduce quasi interamente alla produzione di perossido di idrogeno. In tal caso, considerazioni di tipo pratico e/o di interesse ambientale fanno propendere per la scelta di un catodo a base di carbonio.

La riduzione elettrochimica di ossigeno su elettrodi di carbonio è stata studiata a fondo (94)(111); ciò è dovuto all'applicazione dei materiali a base di carbonio come supporti catalitici nelle celle a combustibile (95). Carbonio vetroso e grafite pirolitica sono da preferire per l'indagine degli aspetti meccanicistici della riduzione dell'ossigeno. Tuttavia, per applicazioni pratiche, sono stati principalmente impiegati materiali a base di carbonio poroso, a causa della loro elevata area superficiale (95). E' stato altresì dimostrato che elettrodi di carbonio sono elettro-chimicamente attivi per la riduzione di O_2 in ambiente alcalino (94-98).

E' stato proposto che la riduzione di O_2 su elettrodi di carbonio in soluzione alcalina avvenga attraverso la mediazione delle funzionalità carbonio-ossigeno (96-98, 109-111); secondo tale meccanismo, la specie reattiva è il radicale anione semichinone ($Q^{\cdot-}$), formatosi tramite la riduzione con un elettrone di gruppi chinone nativo (Q). In un successivo stadio chimico, il semichinone reagisce con l'ossigeno molecolare dando l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$):



La reazione che porta alla formazione dell'anione superossido è considerata cinematicamente determinante nella reazione di riduzione complessiva di ossigeno. Il radicale anione superossido formatosi disproporziona, oppure subisce un'ulteriore riduzione. Entrambi i processi producono HO_2^{-} in soluzione alcalina. Gli elettrodi di carbonio modificati al chinone catalizzano efficacemente la riduzione a due elettroni dell'ossigeno ad acqua ossigenata (109)(117).

L'indagine della cinetica e del meccanismo di riduzione di O_2 su elettrodi al carbonio poroso è un argomento più complicato. Lo studio della riduzione di O_2 ad elettrodi a disco-anello rotante è stato effettuato da Appel e Appleby (118): la percentuale di perossido formatasi è stata trovata essere pari a circa il 50% in soluzioni alcaline. Un ulteriore lavoro ha mostrato come il meccanismo di riduzione di O_2 su elettrodi al carbonio ad elevata superficie non coinvolga la coppia reversibile O_2/HO_2^{-} e sia cinematicamente limitata (119). Horita *et al.* studiarono l'effetto dell'ossidazione anodica del carbonio nero riguardo al suo comportamento verso la riduzione elettrochimica di O_2 (120); gli elettrodi anodicamente trattati hanno mostrato una maggiore attività per questo processo. Perez *et al.* indagarono la riduzione elettrochimica dell'ossigeno su rivestimenti porosi e sottili ad elettrodi a disco rotante in NaOH 1M (121). Lo strato del catalizzatore era costituito da carbonio in polvere (Vulcan XC-72) mescolato con un legante a base di PTFE. Furono chiaramente dimostrati i vantaggi dell'utilizzo di modelli a pellicola sottile piuttosto che di agglomerati per la valutazione delle prestazioni degli elettrodi.

La produzione elettrochimica di perossido di idrogeno è stata oggetto di particolare interesse negli ultimi anni. Sebbene fosse noto da tempo che elettrodi di carbonio producessero perossido a seguito della riduzione di

ossigeno, le indagini intensive in questo campo iniziarono nel 1970. I primi lavori con elettrodi "a letto" collegati alla produzione di perossido di idrogeno tramite riduzione di O_2 vennero condotti da Oloman e Watkinson (122)(124). Venne impiegato un letto fisso di particelle di grafite; gas ossigeno e idrossido di sodio venivano alimentati contemporaneamente dal basso della cella, e vennero studiati gli effetti del processo e le variabili di progetto della cella, sull'efficienza del processo. Venne prodotto perossido di idrogeno 0.8 M con un'efficienza dell'80%. Spalek *et al.* riportarono la formazione di perossido su *nerofumo* (carbone finemente suddiviso) in KOH 5 M con un'efficienza superiore al 90% (125). Questi elettrodi sono risultati stabili per diverse centinaia di ore di polarizzazione (126). I problemi della produzione elettrochimica del perossido di idrogeno sono stati studiati in dettaglio da Sudoh *et al.* (127,128), che utilizzarono grafite come elettrocatalizzatore per la riduzione di O_2 a perossido di idrogeno in un reattore a letto imballato; la più alta velocità di produzione di perossido venne ottenuta applicando una sovratensione di $-0,4V$. Kalu e Oloman sintetizzarono simultaneamente del perossido di idrogeno alcalino e sodio clorato nella stessa cella (129); venne prodotto del perossido fino a 0.8M.

Perossido di idrogeno e ozono sono stati simultaneamente sintetizzati in un reattore a flusso con membrana scambiatrice di protoni (130); oro, carbone attivo, nero di carbonio e grafite sono stati utilizzati come potenziali candidati per il catalizzatore del catodo.

Pletcher riassunse i miglioramenti nell'elettrogenazione del perossido di idrogeno e le sue applicazioni in sistemi pratici (131,132); è appena il caso di citare come la miscela di ioni Fe^{2+} e H_2O_2 (*reattivo di Fenton*) possa essere utilizzata per la distruzione dei composti organici. Per tali scopi, particolarmente interessanti da utilizzare risultano essere gli elettrodi a diffusione gassosa (GDE, *Gas Diffusion Electrode*), che generano perossido di idrogeno ad una velocità molto più elevata rispetto agli elettrodi piani (133). Anche il carbone vetroso reticolato (RVC) è stato utilizzato per la rimozione di sostanze organiche (134-136); è stato altresì dimostrato che H_2O_2 può essere elettrogenata in ambiente acido (137). Da Pozzo *et al.* confrontarono il comportamento di un elettrodo di grafite rispetto a quello di un elettrodo a

diffusione di gas per la produzione di perossido di idrogeno e la loro applicabilità ad un processo di elettro-Fenton (138): come previsto, il GDE mostrò un rendimento molto più elevato per la produzione di H₂O₂. Gli effetti del trattamento del carbonio per la riduzione di O₂ in soluzione alcalina sono stati studiati in (139): due materiali a base di carbonio (Vulcan XC-72 e Ketjenblack EC-300) sono stati sottoposti a svariati trattamenti ed è stato mostrato come tali procedure abbiano un effetto significativo sulle prestazioni dei GDE studiati. Molti sforzi nel campo della generazione elettrochimica del perossido di idrogeno sono stati fatti da Alcaide *et al.* (140-142) e più recentemente da Bertazzoli e collaboratori (143,144). Un aumento della produzione di perossido su RVC è stato infine osservato attraverso l'utilizzo di ultrasuoni (145).

3..2.2. Elettrodo ad ozono

L'ozono sta attualmente attirando un notevole interesse, date le sue numerose applicazioni nella chimica, in campo ambientale, nel cibo, e recentemente anche nell'industria medica (146-148).

A differenza del cloro, l'ozono non genera residui nocivi ed è circa sei volte più efficace del cloro, in termini di potere ossidante. Nel trattamento delle acque, l'ozono è più interessante a causa della sua emivita relativamente breve anche a normali temperature. Combinazioni di ozono e perossido di idrogeno o radiazione ultravioletta con l'acqua, possono generare potenti ossidanti utili nei processi di ossidazione avanzata, AOP (149). Per tali ragioni, la produzione di ozono ha recentemente rappresentato una prospettiva attraente (150).

Nella pratica, e da tempo, vengono utilizzati due approcci per generare ozono: la luce ultravioletta e la cosiddetta scarica per effetto corona (151). La prima modalità può essere utilizzata solo quando sono desiderate piccole quantità di ozono; sebbene più complicata e costosa, la scarica per effetto corona è in grado di produrre quantità molto elevate di ozono. Recentemente, la produzione elettrochimica di ozono, EOP, da elettrolisi dell'acqua, ha attirato molta attenzione grazie al suo basso costo e relativa semplicità (152-155): l'ozono viene prodotto all'anodo e gas idrogeno viene prodotto al catodo di una cella elettrolitica, secondo le seguenti equazioni:





In ogni caso, comunque, la reazione anodica compete sempre con la OER:



Pertanto, per generare ozono, è necessaria un'ottimizzazione che consenta di rallentare la reazione di sviluppo di ossigeno, così da poter raggiungere il massimo di resa in ozono. Fondamentalmente, diversi fattori sono in grado di influenzare l'EOP, quali il materiale anodico (sono favoriti gli anodi che possiedono un alto sovrapotenziale rispetto allo sviluppo di ossigeno), il tipo di elettrolita, la concentrazione e l'acidità (il meccanismo di adsorbimento può cambiare con l'aggiunta di anioni che possiedono un'elevata tendenza all'adsorbimento), nonché i parametri di elettrolisi e la temperatura (abbassando la temperatura, all'interfaccia anodo/elettrolita diminuisce la dissociazione termica dell'ozono) (156-159).

Per lungo tempo, il biossido di piombo è stato considerato il migliore candidato per la EOP, e venne riportato un rendimento di corrente superiore al 7% ad una densità di corrente di 600 mA/cm² in H₂SO₄ 5M (156). La dimensione e la morfologia delle particelle di biossido di piombo appaiono essere in grado d'influenzare notevolmente le prestazioni dell'elettrodo (160,161). Tuttavia, l'uso di materiali contenenti Pb non è desiderabile, ed è attualmente vietato; il platino, d'altra parte, è molto meno efficiente rispetto al biossido di piombo, per quanto riguarda la produzione di ozono (meno del 2% ad una densità di corrente di 400 mA/cm²) (156); tale efficienza può essere elevata all'8,5% abbassando la temperatura a -67 °C in H₂SO₄ 5M (156).

Recentemente, leghe di tantalio-platino sono risultate promettenti per l'EOP: a temperatura ambiente si è ottenuto un rendimento di corrente fino al 6% a 20 mA/cm² (155,158,162-164). Tuttavia, tale materiale elettrodico è alquanto costoso e le procedure per la sua preparazione sono lunghe e complicate. Sono state altresì sperimentate leghe a base di titanio come materiali a basso costo per EOP (165): gli ossidi di titanio partecipano ad una vasta gamma di applicazioni industriali (166-168), e recentemente hanno esibito attività catalitiche ragionevoli verso la riduzione dell'ossigeno (169,170), e l'elettrolisi (171).

3.3. L'attivazione elettrochimica dell'acqua (AEA): proprietà chimico-fisiche

Nel 1802, 30 anni prima che M. Faraday scoprisse le leggi che governano l'elettrolisi, l'accademico russo V.V. Petrov scoprì, utilizzando una batteria ad alto voltaggio, che l'emissione di gas dovuta ad elettrolisi era accompagnata da una diminuzione del pH dell'acqua vicino all'anodo e da un aumento dello stesso in prossimità del catodo; egli divise quindi lo spazio tra i due elettrodi con un diaframma poroso, riuscendo ad ottenere per la prima volta soluzioni di anolita e catolita.

Nel 1807-1808, G. Davy, un ricercatore inglese, ottenne sodio e potassio metallici mediante elettrolisi; più tardi, essa venne utilizzata per ottenere magnesio ed alluminio.

Le prime raffinerie elettrochimiche del rame furono costruite nel 1870, dopo l'invenzione della dinamo. Nel 1886-1888 comparirono fabbriche che producevano elettrochimicamente alluminio e sali di acido ipocloroso. Nel 1890 vennero costruiti impianti per produrre cloro, alcali e sodio metallico, per la produzione di idrogeno e ossigeno dall'elettrolisi dell'acqua, e per il recupero di nickel, rame e zinco.

Ai giorni d'oggi, l'industria elettrochimica è una delle più grandi ed è molto versatile; infatti è utilizzata per:

- la raffinazione di metalli nobili;
- la produzione di metalli alcalini, alcalino-terrosi, ed altri metalli leggeri;
- lo sviluppo di idrogeno, ossigeno, cloro ed alcali;
- la sintesi elettrolitica di sostanze organiche ed inorganiche;
- la sintesi di ricoprimenti per metalli resistenti alla corrosione o a carattere ornamentale;
- le manifatture di accumulatori di elettricità.

Nel 1972, l'ingegnere russo V.M. Bakhir fu il primo a menzionare un fatto precedentemente sconosciuto: l'anolita ed il catolita, generati da un'acqua con basso grado di minerali disciolti e in un reattore elettrochimico con diaframma,

possiedono parametri fisici e chimici ed una reattività che differiscono piuttosto fortemente da quelli modello, ossia dalle corrispondenti soluzioni stabili di acidi o basi.

Per di più, la ricerca dimostrò come le differenze tra le proprietà chimico-fisiche possedute dai due tipi di soluzione non rimangono costanti e stabili nel tempo, e come le prime subiscano dei cambiamenti spontanei durante un periodo di tempo, detto “di rilassamento”, fino a raggiungere valori di equilibrio. Per tale motivo, Bakhir nominò tali soluzioni “attivate” durante tale periodo di rilassamento.

L’attivazione elettrochimica, come processo chimico e fisico, è un insieme di cambiamenti elettro-chimici ed elettro-fisici agenti sull’acqua e sugli ioni in essa disciolti, in condizioni di minima emissione di calore, all’interfaccia elettrodo-soluzione. Tale fenomeno trasforma l’acqua in uno stato metastabile (o attivato) caratterizzato da valori inusuali dei parametri chimici e fisici, incluso il potenziale di ossido-riduzione (connesso all’attività degli elettroni nell’acqua), la conducibilità elettrica, ed il pH.

L’obiettivo dell’attivazione elettrochimica è quello di sottoporre l’intero volume di liquido all’azione di massima intensità di un campo elettrico, con minima emissione di calore, condizioni soddisfatte solo nell’immediata vicinanza della superficie elettroica, nell’area del doppio strato elettrico; per questo motivo è necessario ricorrere a speciali reattori elettrochimici. Infatti, i reattori convenzionali sono stati ideati per realizzare processi elettrochimici convenzionali, e quindi non sono adatti al trattamento di soluzioni acquose diluite.

I primi dispositivi speciali per l’attivazione elettrochimica (i reattori elettrochimici a diaframma), furono sviluppati nel 1974-1975 da Bakhir e Zadorozhni. Alla fine del 1980, venne creata una cella elettrochimica modulare a flusso (FEM-1), ma l’applicazione commerciale dell’attivazione elettrochimica fu possibile soltanto con l’avvento di sistemi elettrochimici industriali basati su celle elettrochimiche modulari a flusso di terza generazione (FEM-3) e dei reattori RFE (insieme di celle FEM-3 di diverse configurazioni), che vennero sviluppate dai suddetti inventori.

La cella FEM differisce dai reattori elettrochimici convenzionali nei seguenti aspetti: è una cella modulare, ha piccole dimensioni, basso peso, alta produttività ed efficienza economica; per questi motivi, essa può essere adibita sia ad uso industriale che domestico.

Il diaframma è realizzato in materiale ceramico contenente ossidi di zirconio ed alluminio; è caratterizzato da una resistenza meccanica molto elevata, e da un'alta capacità filtrante, che impedisce il mescolamento fisico dei volumi di acqua catodico e anodico; inoltre, può sopportare un gradiente di pressione fino ad 1 atmosfera. Il materiale che costituisce il diaframma può adsorbire particelle cariche positivamente sulla superficie esposta all'anodo, e quelle di carica opposta sull'altra superficie, posta di fronte al catodo, causando una riduzione nella sua resistenza elettrica in soluzioni acquose diluite. Per tale motivo, esso è utilizzabile come un divisorio iono-selettivo.

Le camere elettrodiche della cella FEM sono spazi allungati, concentrici alle superfici cilindriche degli elettrodi e al diaframma; il rapporto delle loro dimensioni assicura una velocità media di movimento uguale per i microvolumi in ogni sezione trasversale, e facilita il contatto della massima quantità possibile dei microvolumi di acqua con le superfici elettrodiche.

La lunghezza ottimale delle camere elettrodiche assicura che la saturazione delle soluzioni con i gas sviluppati agli elettrodi non abbia effetti dannosi sulle caratteristiche funzionali ed energetiche della cella stessa, alle alte densità di corrente ed a basse velocità di flusso.

Nei dispositivi di trattamento elettrochimico dell'acqua, le celle possono essere connesse in una singola catena idraulica senza interruzione di flusso, non solo in serie ma anche in parallelo; ciò non è possibile usando reattori elettrochimici convenzionali. Entrambe le camere (anodica e catodica) delle varie celle possono essere connesse arbitrariamente in un circuito, e possono anche essere interposti dei dispositivi ausiliari tra gli elementi: flottatori, reattori catalitici, misuratori di flusso, di pressione e/o di velocità, sistemi di controllo della temperatura, ecc..

Le celle possono essere connesse elettricamente in parallelo, in serie o in serie-parallelo: ciò permette l'utilizzo del circuito come elettrolizzatore bipolare o

monopolare, o ancora come bipolare-monopolare senza che ciò comporti cambiamenti nella configurazione idraulica (172).

Per quanto concerne il *design* della cella modulare a flusso, ci fu una grande evoluzione a partire dal 1992, anno in cui venne brevettata la FEM-1, fino ad arrivare alla FEM-7, brevettata nel 2001. Quest'ultima è un piccolo elettrolizzatore con due elettrodi coassiali ed un diaframma; l'elettrodo più esterno funziona da catodo ed è costruito in Ti; l'elettrodo più interno funge da anodo: è anch'esso in Ti, ma ricoperto da uno speciale *coating*, in quanto anche dopo cinque anni di uso continuativo non mostra segni né di consumo né di distacco. Il diaframma in ceramica è fatto di ossidi di zirconio, alluminio e ittrio, ed è resistente all'azione di acidi, alcali e sostanze ossidanti o riducenti; la cella resiste fino a 5 atmosfere di pressione ed ha una vita di servizio praticamente illimitata. Se viene adoperata una soluzione salina poco concentrata, il sistema non necessita di alcun lavaggio; quando invece si utilizza una soluzione più concentrata, il diaframma dovrebbe essere regolarmente lavato con HCl al 5%, per circa 15-30 minuti, senza bisogno di smontare nulla. Il voltaggio su una singola cella dell'elettrolizzatore (mirato allo sviluppo di cloro) può variare dai 2,8 ai 4,5 V; la corrente varia dai 20 ai 35 A ed il contenuto totale di sali nella soluzione iniziale è compreso tra i 200 ed i 300 g/l (173).

Consideriamo il caso di una cella FEM munita di diaframma, che viene alimentata con acqua a contenuto salino assai limitato (< 1 g/L); nel comparto catodico della cella, quest'ultima viene sottoposta a trattamento riducente ed arricchita dei conseguenti componenti, come ad esempio OH^- , O_2^- , HO_2^- , H_2O^- ; attraverso la riduzione dell'acqua a ioni ossidrilici, si produce una soluzione alcalina (il cosiddetto catolita, $\text{pH} > 9$). L'acqua che fluisce nel comparto anodico viene sottoposta a trattamento ossidante, ed arricchita di composti ossidanti; nel caso l'acqua contenga minime quantità di cloruri, si può avere la formazione di specie quali ClO_2 , HOCl , ClO^- , Cl_2 , O_2 , O_3 , O^\cdot , HO^\cdot e HO_2^\cdot ; inoltre, attraverso l'ossidazione dell'acqua ad O_2 e la conseguente produzione di protoni, si ottiene una diminuzione del pH; l'anolita in uscita risulta dunque acido ($\text{pH} < 5$).

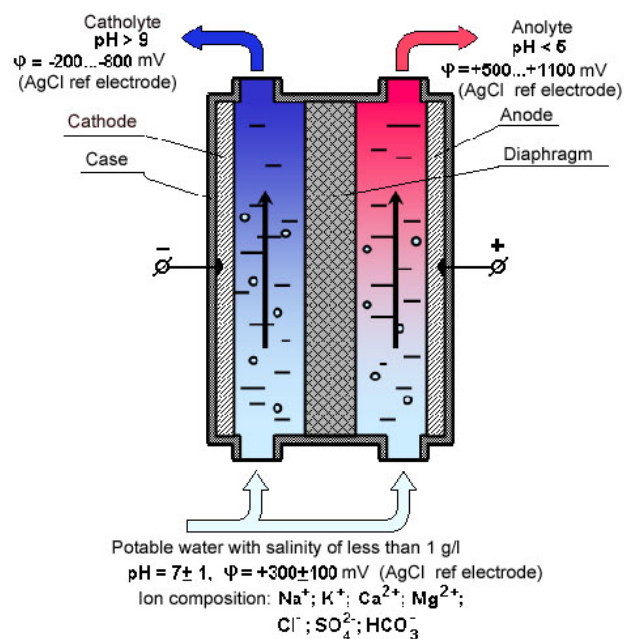


Figura 8. La cella FEM

La tabella che segue riporta le possibili reazioni che possono avere luogo nei due comparti elettrodi:

Tabella 1. Possibili reazioni che possono avere luogo nei due comparti elettrodi

Reazioni anodiche	Reazioni catodiche
$2\text{H}_2\text{O} - 4e \rightarrow 4\text{H} + \text{O}_2$	$2\text{H}_2\text{O} + 2e \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$
$2\text{H}_2\text{O} - 2e \rightarrow 2\text{H} + \text{H}_2\text{O}_2$	$\text{O}_2 + e \rightarrow \text{O}_2^-$
$\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} - 2e \rightarrow \text{O}_3 + 2\text{H}^-$	$\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2e \rightarrow \text{HO}_2^- + \text{OH}^-$
$\text{OH}^- - e \rightarrow \text{HO}^-$	$\text{HO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + e \rightarrow \text{HO}^- + 2\text{OH}^-$
$3\text{H}_2\text{O} - 6e \rightarrow \text{O}_3 + 6\text{H}^-$	$\text{O}_2 + 2\text{H}^- + 2e \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
$\text{O}_2 + 2\text{OH}^- - 3e \rightarrow \text{O}_3 + \text{H}_2\text{O}$	$e_{\text{catodo}} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow e_{\text{aq}}$
$\text{H}_2\text{O} - e \rightarrow \text{HO}^- + \text{H}^-$	$\text{H}^- + e_{\text{aq}} \rightarrow \text{H}^-$
$\text{H}_2\text{O}_2 - e \rightarrow \text{HO}_2^- + \text{H}^-$	$\text{H}_2\text{O} + e_{\text{aq}} \rightarrow \text{H}^- + \text{OH}^-$
$3\text{OH}^- - 2e \rightarrow \text{HO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	$\text{CO}_3^{2-} + 6\text{H}^- + 4e \rightarrow \text{HCHO} + \text{H}_2\text{O}$
$\text{H}_2\text{O} - 2e \rightarrow 2\text{H}^- + \text{O}^-$	$\text{CO}_3^{2-} + 8\text{H}^- + 6e \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} + 2\text{H}_2\text{O}$
$\text{H}_2\text{O} - e \rightarrow \text{H}^- + \text{OH}^-$	$2\text{CO}_3^{2-} + 4\text{H}^- + 2e \rightarrow \text{C}_2\text{O}_4^{2-} + 2\text{H}_2\text{O}$

$3\text{OH}^- - 2e \rightarrow \text{HO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	$2\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2e \rightarrow \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$
$2\text{Cl}^- - 2e \rightarrow \text{Cl}_2$	$\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2e \rightarrow \text{HCOOH}$
$\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O} - 2e \rightarrow \text{HOCl} + \text{H}^+$	$\text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}_2\text{O} + 2e \rightarrow \text{HCO}_2^- + 3\text{OH}^-$
$\text{Cl}^- + 2\text{H}_2\text{O} - 4e \rightarrow \text{HClO}_2 + 3\text{H}^+$	$2\text{SO}_4^{2-} + 5\text{H}_2\text{O} + 8e \rightarrow \text{S}_2\text{O}_3^{2-} + 10\text{OH}^-$
$\text{HCl} + 2\text{H}_2\text{O} - 5e \rightarrow \text{ClO}_2 + 5\text{H}^+$	$2\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}^+ + 2e \rightarrow \text{S}_2\text{O}_6^{2-} + 2\text{H}_2\text{O}$
$\text{Cl}^- + 4\text{OH}^- - 4e \rightarrow \text{ClO}_3^- + 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}_2\text{O} + 2e \rightarrow \text{SO}_3^{2-} + 2\text{OH}^-$
$\text{Cl}^- + 4\text{OH}^- - 5e \rightarrow \text{ClO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}^+ + 2e \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_3 + \text{H}_2\text{O}$
$\text{Cl}^- + 2\text{OH}^- - 2e \rightarrow \text{ClO}^- + \text{H}_2\text{O}$	$\text{NO}_3^- + 5\text{H}_2\text{O} + 6e \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + 7\text{OH}^-$
$\text{Cl}^- + 2\text{H}_2\text{O} - 5e \rightarrow \text{ClO}_2 + 4\text{H}^+$	$2\text{NO}_3^- + 2\text{H}_2\text{O} + 4e \rightarrow \text{N}_2\text{O}_4^{2-} + 4\text{OH}^-$
$2\text{SO}_4^{2-} - 2e \rightarrow \text{S}_2\text{O}_8^{2-}$	$\text{N}_2 + 5\text{H}^+ + 4e \rightarrow \text{N}_2\text{H}_5^+$
$2\text{H}_2\text{CO}_3 - 2e \rightarrow \text{C}_2\text{O}_6^{2-} + 4\text{H}^+$	$\text{Fe}^{2+} + 2e \rightarrow \text{Fe}$

La illustrazione che segue illustra il decorso delle proprietà chimico-fisiche di anolita e catolita, prodotti a partire da una soluzione di acqua potabile (sali disciolti totali pari a 0,22 g/L) avente pH circa neutro e potenziale redox inizialmente pari a +280 mV vs. Ag/AgCl (in lingua russa, mV è indicato come MB). I box 2 e 3 si riferiscono alle proprietà di anolita e catolita, misurate immediatamente dopo la loro generazione; i box 4 e 5 fanno invece riferimento alle proprietà dell'acqua iniziale, addizionata rispettivamente di HCl ed NaOH, in modo tale da riprodurre i valori di pH osservati per le soluzioni ottenute elettrochimicamente. φ rappresenta il valore del potenziale redox (ORP, *Oxidation/Reduction Potential*), mentre φ_{TEOP} indica il valore del potenziale teoricamente misurabile, sulla base dell'equazione di Nernst (il termine "teop" è espresso in lingua russa, e sta per "teorico"). Infine, nei box 6-9 e 10-13 sono riportati i parametri delle porzioni di acqua elettrochimicamente attivata (AEA) e dei rispettivi "controlli" (soluzione acida ed alcalina), misurati rispettivamente dopo 24 e 168 ore dalla loro preparazione.

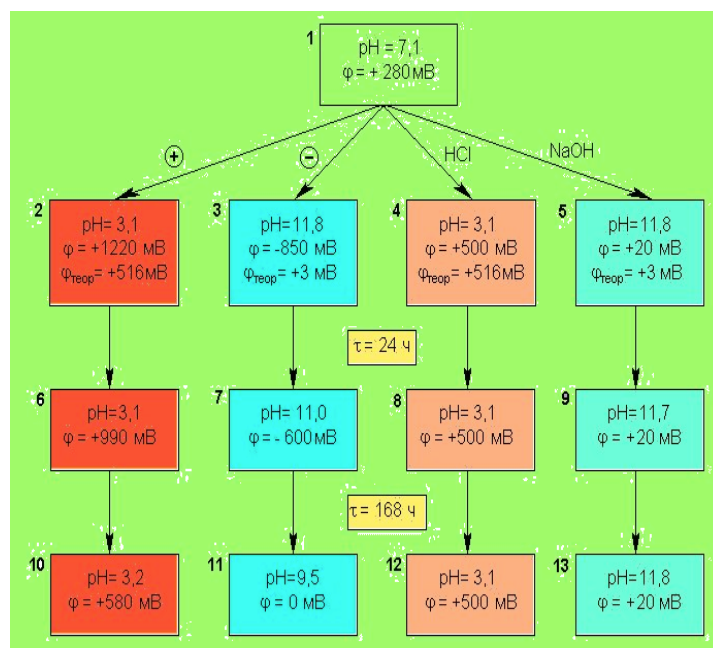


Figura 9. Proprietà chimico-fisiche di anolito e catolito

L'evoluzione temporale dei parametri chimico-fisici misurati rende conto della metastabilità delle specie presenti. La differenza tra "trattamento elettrochimico" (elettrolisi di una soluzione salina) ed "attivazione elettrochimica" è esemplificata dalla coppia di illustrazioni di seguito riportata, in cui sono esplicitati i prodotti delle reazioni agli elettrodi; somministrando la stessa quantità di carica, risultati differenti si ottengono sulla base di tempo di processo e temperatura. In aggiunta ai diversi prodotti chimici delle reazioni, esistono significative differenze tanto nella struttura dell'acqua quanto nei parametri energetici, evidenziabili attraverso reazioni a carattere catalitico e bio-catalitico.

I

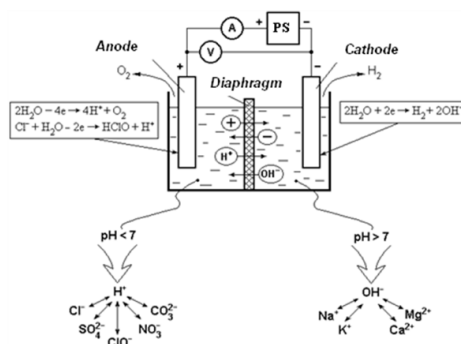


Figura 10. La differenza tra "trattamento elettrochimico" ed "attivazione elettrochimica"

I differente ambito applicativo degli approcci “elettrolitico tradizionale” e dell’attivazione elettrochimica è ben rappresentato dallo schema qui a lato, nel quale sono riportate le condizioni sperimentali che trovano tipicamente riscontro nei diversi ambiti: nel caso dei processi elettrolitici industriali, le soluzioni acquose utilizzate contengono da 1 a 10 g-eq/L di reagente (pari a 200-600 g/L) ed il consumo specifico di corrente elettrica varia tra 10^5 e 10^6 C/L; invece, nel caso dell’attivazione elettrochimica, la concentrazione salina è generalmente compresa tra 0,0001 e 0,02 g-eq/L (tra 0,001 e 5,0 g/L), ed il consumo elettrico specifico varia tra 40 e 4.000 C/L.

La differenza tra “trattamento elettrochimico” ed “attivazione elettrochimica

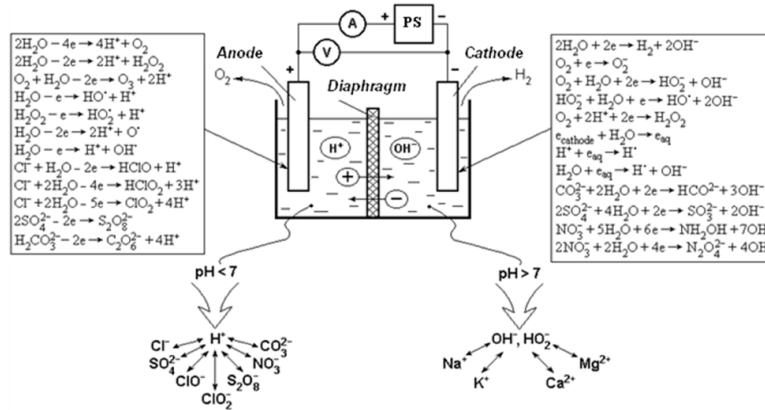


Figura 11. La differenza tra “trattamento elettrochimico” ed “attivazione elettrochimica

Per la maggior parte dei processi di attivazione elettrochimica dell’acqua, la potenza specifica richiesta varia tra 0,5 e 5 Wh/L. Nel caso di una cella FEM, posta a lavorare con soluzioni clorurate a differente concentrazione, i parametri corrente e potenziale variano in genere secondo le modalità desumibili dal seguente diagramma:

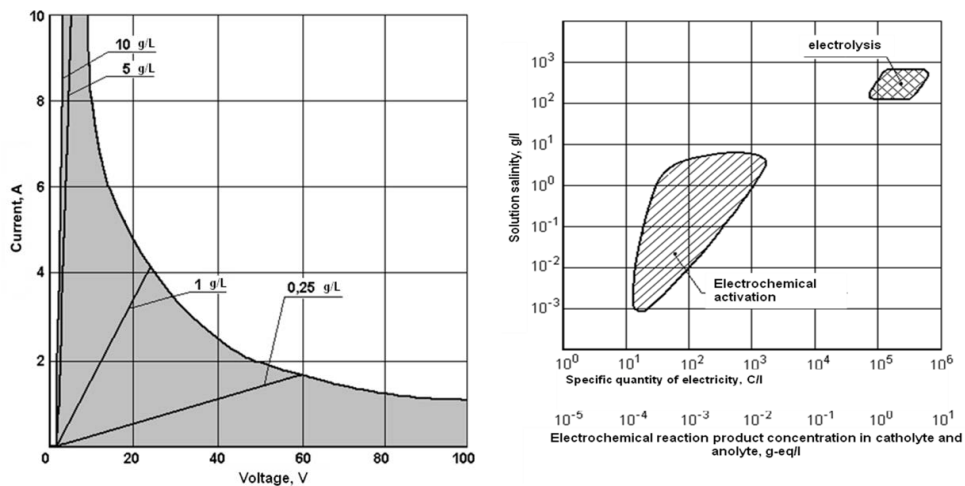


Figura 12. La differenza tra “trattamento elettrochimico” ed “attivazione elettrochimica.

Concludiamo questa presentazione delle caratteristiche salienti dell'acqua elettrochimicamente attivata, accennando alle sue proprietà antimicrobiche, attraverso un confronto con le specie di cloro attivo libero e combinato, reperibili sul mercato. Il confronto è relativo all'azione antimicrobica di soluzioni di acido ipocloroso (HOCl), ipoclorito di sodio (NaOCl), monoclorammina (NH₂Cl) ed anolita ANK (anolita avente pH neutro: le condizioni sperimentali che ne consentono la sintesi verranno discusse successivamente), nei confronti del batterio Escherichia Coli: sono riportate in grafico le quantità di prodotto (esprese in ppm di cloro attivo) ed i tempi di contatto richiesti per la distruzione del 99% del contenuto batterico in acqua a temperature comprese tra 2 e 6 °C.

Dal grafico appare evidente come l'anolita neutro abbia efficacia comparabile (se non lievemente superiore) a quella dell'acido ipocloroso, il quale, a sua volta, presenta attività antimicrobica ben superiore a quella dell'anione ipoclorito. Se la maggiore efficacia di HOCl rispetto a ClO⁻ è da imputarsi all'assenza di carica elettrica della prima molecola (che è così in grado di avvicinarsi e di penetrare la barriera cellulare del microrganismo target, in genere carica negativamente), l'efficacia dell'anolita è presumibilmente legata al suo contenuto in specie metastabili che, decomponendosi spontaneamente, consentono tutta una serie di reazioni in grado di alterare le funzioni vitali del microrganismo stesso.

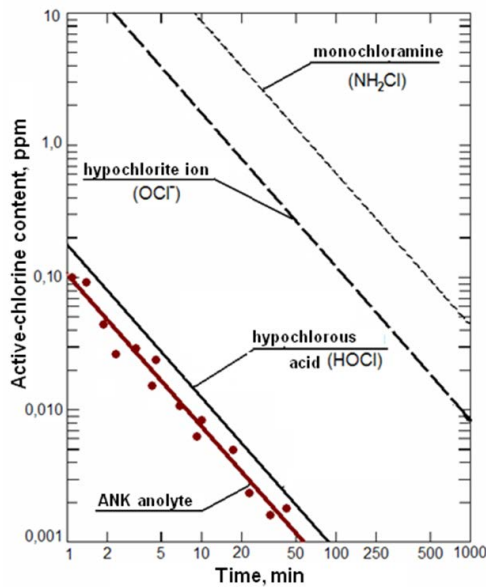


Figura 13. La differenza tra “trattamento elettrochimico” ed “attivazione elettrochimica.

La relazione tra natura chimica del composto ossiclorurato (HOCl oppure ClO^-) e la sua attività antimicrobica è ben esplicitata dallo schema che segue (tratto da: Faust S.D., Aly O.M., “Chemistry of water treatment” - Second Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group), nel quale viene riportato (in ordinata, grafico di destra) il tempo richiesto (in minuti) per l’inattivazione del 99,6 – 100% dei batteri considerati, in funzione della concentrazione (mg/L) del composto di cloro attivo, in genere considerando due diversi pH (e dunque in presenza di quantità più o meno significative di acido ipocloroso).

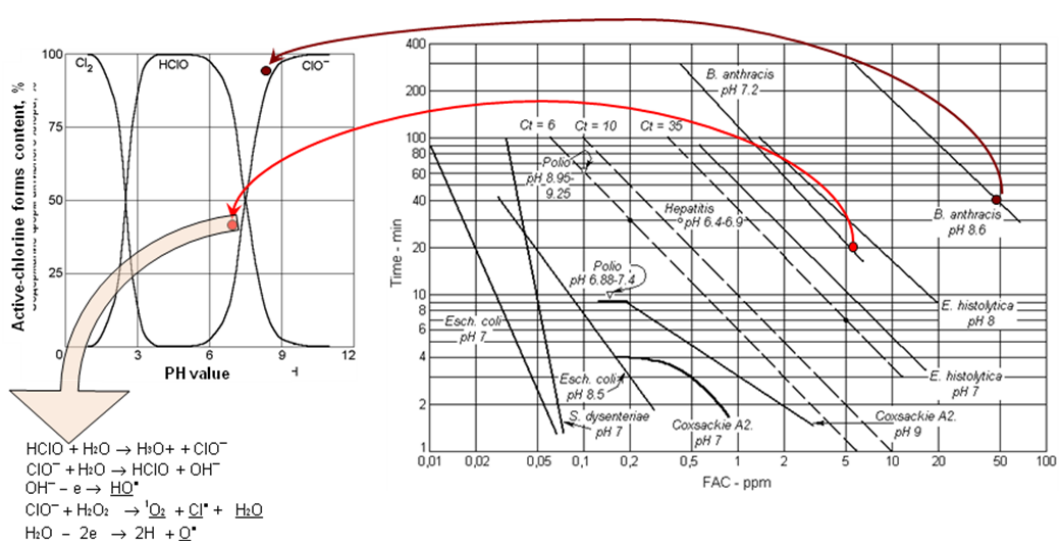


Figura 14. La differenza tra “trattamento elettrochimico” ed “attivazione elettrochimica

3.4. Riferimenti bibliografici

- (1) T.N. Veziroglu, F. Barbir. Transportation fuel-hydrogen. In: Energy technology and the environment, vol. 4. New York: Wiley; 1995. p. 2712.
- (2) Z. Shan, Y. Liu, Z. Chen, G. Warrender, J. Tian. International Journal of Hydrogen Energy 2008; 33: 28.
- (3) M.J. De Giz, G. Tremiliosi-Filho, E.R. Gonzalez, S. Srinivasan, A.J. Appleby. International Journal of Hydrogen Energy 1995; 20: 423.
- (4) Y. Wang, Z.W. Lu, X.P. Gao, W.K. Hu, X.Y. Jiang, J.Q. Qu, P.W. Shen. Journal of Alloys and Compounds 2005; 389: 290.
- (5) R.I. Arul. Journal of Applied Electrochemistry 2000; 30: 499.
- (6) H. Qing, L. Hui ren, C. Jianshe, W. Xujun. International Journal of Hydrogen Energy 2003; 28: 1207.
- (7) H. Qing, L. Hui ren, C. Jianshe, L. Xin, W. Xujun. International Journal of Hydrogen Energy 2004; 29: 243.
- (8) R.F. de Souza, J.C. Padilha, R.S. Gonçalves, M.O. de Souza, J. Rault-Berthelot. Journal of Power Sources 2007; 164: 792.
- (9) J. Panek, A. Budniok. Surface and Coatings Technology 2007; 201: 6478.
- (10) F. Rosalbino, D. Maccio, E. Angelini, A. Saccone, S. Delfino. Journal of Alloys and Compounds 2005; 403: 275.
- (11) M. Metikos-Hukovic, Z. Grubac, N. Radic, A. Tonejc. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical 2006; 249: 172.
- (12) W.K. Hu. International Journal of Hydrogen Energy 2000; 25: 111.
- (13) V.R. Satsangi, S. Kumari, A.P. Singh, R. Shrivastav, S. Dass. International Journal of Hydrogen Energy 2008; 33: 312.
- (14) U. Bjoerksten, J. Moser, M. Graetzel. Chemistry of Materials 1994; 6: 858.
- (15) A. Zaban, S.T. Aruna, S. Tirosh, B.A. Gregg, Y. Mastai. The Journal of Physical Chemistry B 2000; 104: 4130.

- (16) V.M. Aroutiounian, V.M. Arakelyan, G.E. Shahnazaryan. *Solar Energy* 2005; 78: 581.
- (17) G.H. Rau. *Energy Conversion and Management* 2004; 45: 2143.
- (18) D.K. Kinoshita, *Electrochemical Oxygen Technology*, first ed., Wiley-Interscience, 1992.
- (19) A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, second ed., Wiley, 2000.
- (20) R.L. Machunda, H. Ju, J. Lee. *Curr. Appl. Phys.* 2011; 11: 986.
- (21) S. Trasatti. *J. Electroanal. Chem.* 1980; 111: 125.
- (22) S. Trasatti. *Electrochim. Acta* 2000; 45: 2377.
- (23) Y. Matsumoto, E. Sato. *Mater. Chem. Phys.* 1986; 14: 397.
- (24) O. De Nora. *Chem. Ing. Tech.* 1971; 43: 182.
- (25) H. Beer. U.S. Patent 1,147,442 (1969).
- (26) C. Iwakura, K. Hirao, H. Tamura. *Electrochim. Acta* 1977; 22: 335.
- (27) R. Kotz, H.J. Lewerenz, P. Bruesch, S. Stucki. *J. Electroanal. Chem.* 1983; 150: 209.
- (28) M.W. Shafer, R.A. Figat, B. Olson, S.J. La Placa, J. Angilello. *J. Electrochem. Soc.* 1979; 126: 1625.
- (29) J.A. Harrison, D.L. Caldwell, R.E. White. *Electrochim. Acta* 1984; 29: 203.
- (30) F. Hine, M. Yasuda, T. Noda, T. Yoshida, J. Okuda. *J. Electrochem. Soc.* 1979; 126: 1439.
- (31) G. Lodi, E. Sivieri, A. De Battisti, S. Trasatti. *J. Appl. Electrochem.* 1978; 8: 135.
- (32) S. Gottesfeld, S. Srinivasan. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 1978; 86: 89.
- (33) G. Beni, L.M. Schiavone, J.L. Shay, W.C. Dautremont-Smith, B.S. Schneider. *Nature* 1979; 282: 281.
- (34) D.N. Buckley, L.D. Burke, J.K. Mulcahy. *J. Chem. Soc.* 1976; 72: 1896.

- (35) W. Yao, J. Yang, J. Wang, Y. Nuli. *Electrochem. Commun.* 2007; 9: 1029.
- (36) S. Ardizzone, C.L. Bianchi, G. Cappelletti, M. Ionita, A. Minguzzi, S. Rondinini, A. Vertova. *J. Electroanal. Chem.* 2006; 589: 160.
- (37) L.A. Da Silva, V.A. Alves, M.A.P. Da Silva, S. Trasatti, J.F.C. Boodts. *Electrochim. Acta* 1997; 42: 271.
- (38) E.N. Balko, P.H. Nguyen. *J. Appl. Electrochem.* 1991; 21: 678.
- (39) A. Benedetti, P. Riello, G. Battaglin, A. De Battisti, A. Barbieri. *J. Electroanal. Chem.* 1994; 376: 195.
- (40) G. Chen, X. Chen, P.L. Yue. *J. Phys. Chem. B* 2002; 106: 4364.
- (41) N. Mamaca, E. Mayousse, S. Arrii-Clacens, T.W. Napporn, K. Servat, N. Guillet, K.B. Kokoh. *Appl. Catal. B* 2012; 111-112: 376.
- (42) P. Ragunathan, S.K. Mitra, M.G. Nayar. *Int. J. Hydrogen Energy* 1981; 6: 487.
- (43) M. Hamdani, R.N. Singh, P. Chartier. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2010; 5: 556.
- (44) R. Boggio, A. Carugati, S. Trasatti. *J. Appl. Electrochem.* 1987; 17: 828.
- (45) P.S. Patil. *Mater. Chem. Phys.* 1999; 59: 185.
- (46) I. Serebrennikova, V.I. Birss. *J. Mater. Sci.* 2001; 36: 4331.
- (47) D. Lapham, I. Colbeck, J. Schoonman, Y. Kamlag. *Thin Solid Films* 2001; 391: 17.
- (48) B. Chi, J.-B. Li, Y.-S. Han, J.-H. Dai. *Mater. Lett.* 2004; 58: 1415.
- (49) M.H. Miles, Y.H. Huang, S. Srinivasan. *J. Electrochem. Soc.* 1978; 125: 1931.
- (50) P. Ruetschi, R.T. Angstadt, B.D. Cahan. *J. Electrochem. Soc.* 1959; 106: 547.
- (51) M. Morita, C. Iwakura, H. Tamura. *Electrochim. Acta* 1978; 23: 331.
- (52) R.U. Bondar, E.A. Kalinovskii, *Zh. Prikl. Khim.* 1975; 48: 2549.
- (53) S. Trasatti (Ed.), *Electrodes of Conductive Metallic Oxides*, part B, Elsevier, Amsterdam, 1981.

- (54) S. Trasatti. *Electrochim. Acta*, 1987; 32: 369.
- (55) F.A. Cotton, G.W. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, 1962.
- (56) A. Frumkin, G.A. Teodoradse. *Z. Elektrochem.* 1958; 62: 251.
- (57) G. Faita, P. Longhi, T. Mussini. *J. Electrochem. Soc.* 1967; 114: 340.
- (58) G. Faita, G. Fiori, J.W. Augustynski. *J. Electrochem. Soc.* 1969; 116: 928.
- (59) T. Yokoyama, M. Enyo. *Electrochim. Acta* 1970; 15: 1921.
- (60) R.G. Érenburg, L.I. Krishtalik, V.I. Bystrov. *Élektrokimiya* 1972; 8: 1740.
- (61) R.G. Érenburg, L.I. Krishtalik, I.P. Yaroshevskaya. *Élektrokimiya* 1975; 11: 1068.
- (62) R.G. Érenburg, L.I. Krishtalik, I.P. Yaroshevskaya. *Élektrokimiya* 1975; 11: 1072.
- (63) R.G. Érenburg, L. I. Krishtalik, I. P. Yaroshevskaya. *Élektrokimiya* 1975; 11: 1236.
- (64) L.J.J. Janssen. *Electrochim. Acta*, 1974; 19: 257.
- (65) L.J.J. Janssen, L.M. Starmans, J.G. Visser, E. Barendrecht. *Electrochim. Acta* 1977; 22: 1093.
- (66) T. Arikado, C. Iwakura, H. Tamura. *Electrochim. Acta* 1978; 23: 9.
- (67) I.R. Burrows, D.A. Denton, J.A. Harrison. *Electrochim. Acta* 1978; 23: 493.
- (68) B.E. Conway, D.M. Novak. *J. Electroanal. Chem.* 1979; 99: 133.
- (69) B.E. Conway, D.M. Novak. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1979; 75: 2454.
- (70) D.A. Denton, J.A. Harrison, R.I. Knowles. *Electrochim. Acta* 1979; 24: 521.
- (71) J. Mozota, B.E. Conway. *J. Electrochem. Soc.* 1981; 128: 2142.
- (72) B.E. Conway, G. Ping, A. De Battisti, A. Barbieri, G. Battaglin. *J. Mater. Chem.* 1995; 1: 725.
- (73) R.G. Érenburg, L.I. Krishtalik, N.P. Rogozhina. *Élektrokimiya* 1984; 20: 1183.
- (74) R.G. Érenburg. *Élektrokimiya* 1984; 20: 1601.

- (75) V. Consonni, S. Trasatti. *J. Electroanal. Chem.* 1987; 228: 393.
- (76) E.J. Kelly, C.E. Vallet, C.W. White. *J. Electrochem. Soc.* 1990; 137: 2482.
- (77) L. Tomcsányi, A. De Battisti, G. Hirshenberg, K. Varga, J. Liszi. *Electrochim. Acta* 1999; 44: 2463.
- (78) V.V. Panić, A. Dekanski, S.K. Milonjić, R.T. Atanasoski, B.Ž. Nikolić. *Colloid and Surf. A* 1999; 157: 269.
- (79) V.V. Panić, A. Dekanski, S.K. Milonjić, R.T. Atanasoski, B.Ž. Nikolić. *Electrochim. Acta* 2000; 46: 415.
- (80) J.L. Fernández, M.R. Gennero de Chialvo, A.C. Chialvo. *Electrochim. Acta* 2002; 47: 1129.
- (81) J.L. Fernández, M.R. Gennero de Chialvo, A.C. Chialvo. *Electrochim. Acta* 2002; 47: 1137.
- (82) J. L. Fernández, M. R. Gennero de Chialvo, A. C. Chialvo. *Electrochim. Acta* 2002; 47:1145.
- (83) D. J. Walton, L. D. Burke, M. M. Murphy. *Electrochim. Acta* 1996; 41: 2747.
- (84) L. A. De Faria, J. F. C. Boodts, S. Trasatti. *Electrochim. Acta* 1997; 42: 3525.
- (85) S. Ferro, A. De Battisti, I. Duo, Ch. Comninellis, W. Haenni, A. Perret. *J. Electrochem. Soc.* 2000; 147: 2614.
- (86) A. De Battisti, S. Ferro, M. Dal Colle. *J. Phys. Chem. B* 2001; 105: 1679.
- (87) S. Ferro, A. De Battisti. *J. Phys. Chem. B* 2002; 106: 2249.
- (88) M.C. Clerici, P. Ingallina. *Catal. Today* 1998; 41: 351.
- (89) J.S. Campos-Martin, G. Blanco-Brieva, J.L.G. Fierro. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006; 45: 6962.
- (90) I. Morcos, E. Yeager. *Electrochim Acta* 1970; 15: 953.
- (91) R. Zurilla, R. Sen, E. Yeager. *J. Electrochem. Soc.* 1978; 125: 1103.
- (92) Southampton Electrochemistry Group, *Instrumental Methods in Electrochemistry*, Ellis Horwood, England, UK, 1993.

- (93) D. Pletcher, F.C. Walsh. *Industrial Electrochemistry*, Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK, 1993 (Chapter 5).
- (94) M.R. Tarasevich, A. Sadkowsky, E. Yeager, in: B.E. Conway, J.O'M. Bockris, E. Yeager, S.U.M. Khan, R.E. White (Eds.), *Comprehensive Treatise of Electrochemistry*, vol. 7, Plenum Press, New York, 1983, p. 301.
- (95) K. Kinoshita, *Electrochemical Oxygen Technology*, Wiley, New York, 1992.
- (96) E. Yeager. *Electrochim. Acta* 1984; 29: 1527.
- (97) E. Yeager. *J. Mol. Catal.* 1986; 38: 5.
- (98) D.A. Tryk, C.R. Cabrera, A. Fujishima, N. Spataru, in: J. Prakash, D. Chu, D. Scherson, M. Enayetullah, I. Tae Bae (Eds.), *Proceedings of International Symposium on the Fundamental Understanding of Electrode Processes in Memory of Professor Ernest B. Yeager*, PV 2003-30, The Electrochemical Society, Pennington, NJ, 2005, p. 45.
- (99) I. Morcos, E. Yeager. *Electrochim. Acta* 1970; 15: 953.
- (100) R.J. Taylor, A.A. Humffray. *J. Electroanal. Chem.* 1975; 64: 63.
- (101) M. Brezina, A. Hofmanova. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1973; 38: 985.
- (102) C. Paliteiro, A. Hamnett, J.B. Goodenough. *J. Electroanal. Chem.* 1987; 233: 147.
- (103) J. Xu, W. Huang, R.L. McCreery. *J. Electroanal. Chem.* 1996; 410: 235.
- (104) H.-H. Yang, R.L. McCreery. *J. Electrochem. Soc.* 2000; 147: 3420.
- (105) T. Nagaoka, T. Sakai, K. Ogura, T. Yoshino, *Anal. Chem.* 1986; 58: 1953.
- (106) V.B. Baez, D. Pletcher. *J. Electroanal. Chem.* 1995; 382: 59.
- (107) T. Yano, D.A. Tryk, K. Hashimoto, A. Fujishima. *J. Electrochem. Soc.* 1998; 145: 1870.
- (108) Z.W. Zhang, D.A. Tryk, E.B. Yeager, in: S. Sarangapani, J.R. Akridge, B. Schumm (Eds.), *Proceedings of the Workshop on the Electrochemistry of Carbon*, The Electrochemical Society, Pennington, NJ, 1984, p. 158.
- (109) M.S. Hossain, D. Tryk, E. Yeager. *Electrochim. Acta* 1989; 34: 1733.

- (110) K. Tammeveski, K. Kontturi, R.J. Nichols, R.J. Potter, D.J. Schiffrin. *J. Electroanal. Chem.* 2001; 515: 101.
- (111) A. Sarapuu, K. Vaik, D.J. Schiffrin, K. Tammeveski. *J. Electroanal. Chem.* 2003; 541: 23.
- (112) K. Vaik, A. Sarapuu, K. Tammeveski, F. Mirkhalaf, D.J. Schiffrin. *J. Electroanal. Chem.* 2004; 564: 159.
- (113) F. Mirkhalaf, K. Tammeveski, D.J. Schiffrin. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2004; 6: 1321.
- (114) K. Vaik, D.J. Schiffrin, K. Tammeveski. *Electrochem. Commun.* 2004; 6: 1.
- (115) K. Vaik, U. Maeorg, F.C. Maschion, G. Maia, D.J. Schiffrin, K. Tammeveski. *Electrochim. Acta* 2005; 50: 5126.
- (116) A. Sarapuu, K. Helstein, D.J. Schiffrin, K. Tammeveski. *Electrochem. Solid-State Lett.* 2005; 8: E30.
- (117) M. Kullapere, G. Jurmann, T.T. Tenno, J.J. Paprotny, F. Mirkhalaf, K. Tammeveski. *J. Electroanal. Chem.* 2007; 599: 183.
- (118) M. Appel, A.J. Appleby. *Electrochim. Acta* 1978; 23: 1243.
- (119) A.J. Appleby, J. Marie. *Electrochim. Acta* 1979; 24: 195.
- (120) K. Horita, Y. Nishibori, T. Ohshima. *Carbon* 1996; 34: 217.
- (121) J. Perez, A.A. Tanaka, E.R. Gonzalez, E.A. Ticianelli. *J. Electrochem. Soc.* 1994; 141: 431.
- (122) C. Oloman, A.P. Watkinson. *Can. J. Chem. Eng.* 1976; 54: 312.
- (123) C. Oloman, A.P. Watkinson. *J. Appl. Electrochem.* 1979; 9: 117.
- (124) C. Oloman. *J. Electrochem. Soc.* 1979; 126: 1885.
- (125) O. Spalek, J. Balej, K. Balogh. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1977; 42: 952.
- (126) O. Spalek, J. Balej. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1981; 46: 2052.
- (127) M. Sudoh, H. Kitaguchi, K. Koide. *J. Chem. Eng. Jpn.* 1985; 18: 364.

- (128) M. Sudoh, H. Kitaguchi, K. Koide. *J. Chem. Eng. Jpn.* 1985; 18: 408.
- (129) E.E. Kalu, C. Oloman. *J. Appl. Electrochem.* 1990; 20: 932.
- (130) P. Tatapudi, J.M. Fenton. *J. Electrochem. Soc.* 1994; 141: 1174.
- (131) D. Pletcher. *Acta Chem. Scand.* 1999; 53: 745.
- (132) D. Pletcher. *Electrogenerated Hydrogen Peroxide - From History to New Opportunities*, vol. 4, no. 1, January 1999. <http://www.electrosynthesis.com>.
- (133) T. Harrington, D. Pletcher. *J. Electrochem. Soc.* 1999; 146: 2983.
- (134) C. Ponce de Leon, D. Pletcher. *J. Appl. Electrochem.* 1995; 25: 307.
- (135) A. Alvarez-Gallegos, D. Pletcher. *Electrochim. Acta* 1998; 44: 853.
- (136) A. Alvarez-Gallegos, D. Pletcher. *Electrochim. Acta* 1999; 44: 2483.
- (137) Z. Qiang, J.-H. Chang, C.-P. Huang. *Water Res.* 2002; 36: 85.
- (138) A. Da Pozzo, L. Di Palma, C. Merli, E. Petrucci. *J. Appl. Electrochem.* 2005; 35: 413.
- (139) M. Pirjamali, Y. Kiros. *J. Power Sources* 2002; 109: 446.
- (140) F. Alcaide, E. Brillas, P.-L. Cabot, J. Casado. *J. Electrochem. Soc.* 1998; 145: 3444.
- (141) E. Brillas, F. Alcaide, P.-L. Cabot. *Electrochim. Acta* 2002; 48: 331.
- (142) F. Alcaide, E. Brillas, P.-L. Cabot. *J. Electroanal. Chem.* 2004; 566: 235.
- (143) J.C. Corti, R.S. Rocha, M.R.V. Lanza, R. Bertazzoli. *J. Electroanal. Chem.* 2007; 601: 63.
- (144) J.C. Corti, J.A. Nunes, M.R.V. Lanza, R. Bertazzoli. *J. Appl. Electrochem.* 2007; 37: 527.
- (145) J. Gonzalez-Garcia, C.E. Banks, B. Sljukic, R.G. Compton. *Ultrason. Sonochem.* 2007; 14: 405.
- (146) L. James, A.K. Puniya, V. Mishra, K. Singh. *J. Sci. Ind. Res.* 2002; 61: 504.
- (147) M. Bortman, P. Brimblecombe, M.A. Cunningham, W.P. Cunningham, W. Freedman (Eds.), *Environmental Encyclopedia*, Gale, 2003.

- (148) V. Bocci, N. Di Paolo. *Ozone Sci. Eng.* 2004; 26: 195.
- (149) P. Tatapudi, J.M. Fenton. *J. Electrochem. Soc.* 1994; 141: 1174.
- (150) K. Arihara, C. Terashima, A. Fujishima. *J. Electrochem. Soc.* 2007; 154: 71.
- (151) J. Chen, J.H. Davidson. *Plasma Chem. Plasma Process.* 2003; 23: 501.
- (152) L.M. Da Silva, L.A. De Faria, J.F.C. Boodts. *Pure Appl. Chem.* 2001; 73: 1871.
- (153) L.M. Da Silva, M.H.P. Santana, J.F.C. Boodts. *Quim. Nova* 2003; 26: 880.
- (154) L.M. Da Silva, L.A. De Faria, J.F.C. Boodts. *Electrochim. Acta* 2003; 48: 699.
- (155) K. Kaneda, M. Ikematsu, K. Kitsuka, M. Iseki, H. Matsuura, T. Higuchi, T. Hattori, T. Tsukamoto, M. Yasuda. *Jpn. J. Appl. Phys. (Part 1)* 2006; 45: 6417.
- (156) P.C. Foller, C.W. Tobias. *J. Electrochem. Soc.* 1982; 129: 506.
- (157) M.I. Awad, S. Sata, K. Kaneda, M. Ikematsu, T. Okajima, T. Ohsaka. *Electrochem. Commun.* 2006; 8: 1263.
- (158) D.V. Franco, L.M. Da Silva, W.F. Jardim, J.F.C. Boodts. *J. Braz. Chem. Soc.* 2006; 17: 746.
- (159) J. Wang, X. Jing. *Electrochemistry (Japan)* 2006; 74: 539.
- (160) J. Wang, X. Li, L. Guo, X. Luo. *Appl. Surf. Sci.* 2008; 254: 6666.
- (161) K. Kaneda, M. Ikematsu, M. Iseki, D. Takaoka, T. Higuchi, T. Hattori, T. Tsukamoto, M. Yasuda. *Chem. Lett.* 2005; 34: 1320.
- (162) K. Kaneda, M. Ikematsu, Y. Koizumi, H. Minoshima, T. Rakuma, D. Takaoka, M. Yasuda., *Electrochem. Solid-State Lett.* 2005; 8: J13.
- (163) K. Kaneda, M. Ikematsu, M. Iseki, D. Takaoka, T. Higuchi, T. Hattori, T. Tsukamoto, M. Yasuda. *Jpn. J. Appl. Phys. (Part 1)* 2006; 45: 5154.
- (164) A.M. Mohammad, K. Kitsuka, K. Kaneda, M.I. Awad, A.M. Abdullah, M. Ikematsu, T. Ohsaka. *Chem. Lett.* 2007; 36: 1046.
- (165) Y.-Q. Li, S.-Y. Fu, G. Yang, M. Li. *J. Non-Cryst. Solids* 2006; 352: 3339.

- (166) K.-S. Lee, I.-S. Park. Scripta Mater. 2003; 48: 659.
- (167) L.L. Amy, G. Lu, T. John. Chem. Rev. 1995; 95: 725.
- (168) J.-H. Kim, A. Ishihara, S. Mitsushima, N. Kamiya, K.-I. Ota. Electrochim. Acta 2007; 52: 2492.
- (169) S.V. Mentus. Electrochim. Acta 2004; 50: 27.
- (170) W. Nam, G.Y. Han. J. Chem. Eng. Jpn. 2007; 40: 266.
- (171) S.V. Mentus. Electrochim. Acta 2005; 50: 3609.
- (172) V.M. Bakhir in: Zhizn & Bezopasnost Magazine (Life and Safety, rus.) 2002; 3: 302.
- (173) V.M. Bakhir, Yu.G. Zadorozhny, B.I. Leonov, S.A. Panicheva. Russian Patent 2,176,989 (2001).

CAPITOLO N° 4.

UTILIZZO DELL'AEA NELLA CONSERVAZIONE POST-RACCOLTA DEI PRODOTTI ORTOFRUTTICOLI

L'impiego dell'acqua elettrolizzata potrebbe rappresentare una valida alternativa per la disinfezione di frutta e verdura. Fino ad ora, e nella maggioranza delle ricerche rivolte verso lo studio dell'efficacia di questo nuovo prodotto, è stato proposto il trattamento post-raccolta per immersione o per risciacquo del frutto o del vegetale nella forma ossidante di acqua elettrolizzata, e viene rivolta attenzione tanto al prodotto integro quanto a quello tagliato.

4..1. Disinfezione dei Vegetali

Alcuni batteri patogeni possono contaminare i vegetali freschi durante la loro lavorazione e persistere anche al momento della vendita al consumatore; altri patogeni possono invece svilupparsi durante la fase di stoccaggio del prodotto. Taglio e sminuzzamento degli ortaggi freschi restano comunque le cause principali della loro contaminazione microbica.

I bacilli Gram-negativi mesofili e psicotropici sono i microorganismi predominanti nella contaminazione dei vegetali freschi tagliati; tra questi, i più frequenti appartengono alla specie *Pseudomonas*. Dal momento che il risciacquo del prodotto con acqua di rubinetto si è dimostrato essere un procedimento troppo blando per rimuovere gli organismi infestanti, si è dovuto ricorrere ad un lavaggio più approfondito con agenti efficaci nella riduzione della carica batterica. I composti chimici solitamente utilizzati a questo scopo sono: l'ipoclorito di sodio, il bisolfito di sodio, il biossido di zolfo, il biossido di cloro, il cloruro di calcio, gli acidi organici e l'ozono (1). Tra questi, la soluzione acquosa di ipoclorito di sodio è il disinfettante più comune, ma è efficace solo a concentrazioni di cloro attivo tali da poter causare dei danni dal punto di vista qualitativo nel vegetale, e degli effetti corrosivi nell'attrezzatura con cui questo

viene a contatto. L'ipoclorito, inoltre, reagendo con la materia organica, non solo perde rapidamente la sua attività antimicrobica, ma può generare composti organoclorurati potenzialmente carcinogenici.

Una valida alternativa al suo utilizzo sembra essere rappresentata dall'acqua elettrolizzata, la cui attività antimicrobica dipende dalla metodologia del trattamento, dalla concentrazione di cloro attivo disponibile, dal pH della soluzione trattante e dal tipo di vegetale da trattare. A tale proposito, due sono le procedure pratiche che consentono di ottenere i migliori risultati:

- la prima consiste nell'immersione dell'ortaggio in acqua elettrolizzata e nel successivo risciacquo con acqua di rubinetto;
- la seconda consiste nell'immersione dell'ortaggio nella soluzione disinfettante e nella successiva asciugatura con un getto d'aria sterile (a temperatura ambiente: ~ 23°C), senza alcun risciacquo post-trattamento.

Riguardo alla concentrazione di cloro attivo, una soddisfacente attività antimicrobica si ottiene già a valori prossimi ai 50 ppm (mg/L), ai quali il prodotto vegetale non va incontro a scolorimento e/o degradazione qualitativa. In tali condizioni, inoltre, l'attrezzatura con cui la soluzione attivata viene in contatto non subisce corrosione. I risultati di letteratura indicano che acque elettrolizzate, con pH prossimi alla neutralità, manifestano una miglior attività antibatterica sul prodotto fresco, senza andarne ad intaccare le qualità estetiche ed organolettiche. E' infine importante mettere in rilievo la necessità di fare un distinguo fra i tipi di vegetali da trattare, e quindi considerare l'area di contatto del vegetale con l'agente battericida. A questo proposito, dal confronto di *Izumi* tra carote, peperoncini, spinaci, radicchio giapponese, cocomeri e patate, si desume che l'effetto biocida dell'acqua elettrolizzata, influenzato dall'anatomia e dalla microstruttura dei tessuti di ciascun vegetale, è più alto sugli spinaci ed in genere su tutti i vegetali a foglia larga, e più basso su patate e peperoncini tagliati.

C'è da fare un appunto alla procedura da seguire per il trattamento: l'efficacia antimicrobica dell'acqua elettrolizzata è maggiore sulla superficie esterna del tessuto vegetale, piuttosto che sulla porzione interna. Ciò indicherebbe che la

contaminazione interna del tessuto è più difficile da abbattere rispetto ad una superficiale (1).

Si può fare un'ulteriore considerazione: analogamente alle forme classiche di disinfezione a base di cloro, anche quella con acqua elettrolizzata mostra maggiore efficienza antimicrobica su un brodo di coltura piuttosto che sulla superficie del vegetale. Il motivo principale è da attribuirsi alla reazione con la materia organica, presente sul vegetale ma assente nel brodo di coltura.

4..1.1. **La carota**

Il lavoro di *Workneh* e collaboratori (2) presenta un confronto tra il trattamento disinfettante più utilizzato, basato su soluzione acquosa di ipoclorito di sodio, e l'innovativo trattamento disinfettante con acqua elettrolizzata ossidante (il cosiddetto anolita).

Le carote sono state raccolte manualmente dal terreno quando hanno raggiunto la giusta maturazione ed immediatamente trasportate al laboratorio dove, prima di essere sottoposte a trattamento disinfettante, sono state lavate con acqua di rubinetto alla temperatura di 4 °C. A questo punto sono state suddivise in 18 gruppi da 2 Kg ciascuno e sono state trattate, parte per immersione in acqua elettrolizzata ossidante (pH 6.8, durata 5, 10 o 20 min), parte per immersione in una soluzione acquosa contenente ipoclorito di sodio (100 mg/L) per 20min, parte ancora per immersione in acqua deionizzata sterile alla temperatura di 1 °C per 20 min. Una volta trattate, le carote sono state asciugate, impacchettate in sacchetti micro-forati (impiegati solitamente per la vendita al pubblico) e stoccate per 16 giorni alla temperatura di 1 °C. Dopo la fase di stoccaggio, si è rilevato come il trattamento antimicrobico effettuato con anolita risulti indipendente dal tempo di esposizione della carota all'agente trattante. Sono sufficienti 5 min di esposizione per ottenere la drastica riduzione di batteri aerobi, coliformi, muffe e lieviti, e per limitare la loro velocità di crescita durante la fase di stoccaggio. Dopo tale trattamento non si sono osservati né muffe né segni di putrescenza, nemmeno a seguito di un periodo di conservazione sufficientemente lungo. Dai risultati ottenuti si evince come l'efficacia del trattamento con anolita (T = 5min) sia pressoché corrispondente a quella del trattamento con la soluzione acquosa di ipoclorito (T = 20 min). Tuttavia, dopo

lo stoccaggio, mentre l'aspetto superficiale delle carote trattate con anolita risulta liscio e splendente, quelle trattate con acqua ed ipoclorito risultano scolorite e leggermente segnate. Inoltre, il trattamento con anolita presenta effetti minori sulla fisiologica perdita di peso e di durezza del prodotto, rispetto a quelli con acqua ed ipoclorito.

4..1.2. **Il pomodoro**

Di notevole interesse è la disinfezione del pomodoro, dal momento che non è stato affrontato solamente lo studio della disinfezione tramite acqua elettrolizzata acida, ma si è preso in considerazione anche il trattamento con una forma di acqua elettrolizzata neutra. Nello studio affrontato da *Deza et al.* (3) sono stati scelti dei pomodori assolutamente sani, privi di tagli sulla buccia, i quali sono stati lavati con acqua di rubinetto per 1 min, quindi asciugati sotto un flusso laminare di aria sterile per 15 min, ed infine inoculati con vari ceppi di tre specie batteriche patogene (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes*) e di una specie batterica non patogena di *Escherichia coli*, quest'ultima impiegata come standard europeo per testare l'attività battericida di disinfettanti ed antisettici. I pomodori così contaminati sono stati trattati per immersione con acqua elettrolizzata neutra. Dai risultati ottenuti si è potuta valutare la massima riduzione di carica batterica superficiale già dopo un trattamento di 30 secondi alla concentrazione di cloro attivo di 89 mg/L. Risultati analoghi sono stati ottenuti per tutte le specie batteriche: ciò conferma l'ampio spettro d'azione dell'acqua elettrolizzata nello svolgimento dell'attività biocida. Inoltre, anche nel caso del pomodoro, è importante sottolineare il mantenimento delle buone qualità organolettiche del prodotto dopo la disinfezione.

4..1.3. **La lattuga**

Molti articoli riportano il trattamento post-raccolta della lattuga. Nella ricerca di *Park et al.* (4) è stata valutata l'efficacia dell'acqua elettrolizzata acida (cloro attivo 45 ppm, pH 2.5 ed ORP 1130 mV) nell'annientare ceppi batterici delle specie *E.coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* inoculati sulla lattuga, e si è dimostrato che essa ha un potere battericida molto simile a quello di una soluzione acquosa di ipoclorito agli stessi valori di pH, ORP e cloro attivo. In quest'ultimo caso, la riduzione di carica batterica è leggermente superiore per

l'*E. coli* (2.78 log₁₀UFC/foglia) piuttosto che per la *L. monocytogenes* (2.38 log₁₀UFC/foglia). La differenza evidente tra i due tipi di antimicrobico considerati sta nell'influenza che la durata del trattamento ha sulla sua efficacia: infatti, mentre la soluzione acida di ipoclorito presenta sull'*E. coli* effetto crescente con l'aumentare del tempo di contatto, l'acqua elettrolizzata acida non ha questo problema, dal momento che la durata del trattamento (1 o 3 minuti) non ne influenza in alcun modo l'attività. Il trattamento con acqua elettrolizzata non appare peraltro modificare le proprietà organolettiche delle lattughe trattate, a parte un leggero scolorimento.

Casadiego e collaboratori (5) hanno confermato la maggiore efficacia dell'acqua EO (cloro attivo 29 ppm e pH 2.8) nell'inattivazione del batterio *L. monocytogenes* in un brodo di coltura piuttosto che sulla superficie delle foglie di lattuga, ed hanno suggerito la possibilità di migliorarne gli impieghi pratici sul vegetale aumentando la concentrazione di cloro attivo o combinando la sua azione con quella di una soluzione acquosa al 6% di acido acetico o di altri agenti antimicrobici.

Nel loro articolo sul trattamento della lattuga per inattivare ceppi batterici di *E. coli* O157:H7 e *Salmonella*, Koseki et al. (6) mettono in luce la possibilità di effettuare un pre-trattamento con acqua elettrolizzata alcalina (AIE), prima di praticare il trattamento vero e proprio con acqua elettrolizzata acida (AcE). L'acqua AIE è poco efficace come disinfettante ma il suo impiego come pre-trattante può potenziare l'effetto antimicrobico dell'acqua AcE, determinando un'ulteriore riduzione di carica batterica (pari a 1.8 log₁₀UFC/g per l'*E. coli* ed a 1.7 log₁₀UFC/g per la *Salmonella*). L'acqua elettrolizzata alcalina agisce dunque da detergente/bagnante, interponendosi tra la fase acquosa e la superficie del vegetale e migliorando la compatibilità tra loro. Questa sorta di azione preparatoria delle superfici determina un aumento delle qualità del risciacquo disinfettante. La disinfezione della lattuga in condizioni di leggero riscaldamento può portare non solo ad un ulteriore effetto antibatterico su entrambi i patogeni analizzati, ma anche ad un miglioramento dell'aspetto e delle qualità organolettiche del prodotto. Dal momento che l'impiego di acqua elettrolizzata acida, se leggermente riscaldata (50 °C), può comportare un rilascio di Cl₂ gassoso, Koseki et al. consigliano di sottoporre a riscaldamento l'acqua

elettrolizzata alcalina pre-trattante. I risultati migliori di disinfezione sulle foglie di lattuga si sono dunque ottenuti con un pre-trattamento di 5 minuti con acqua AIE a 50 °C e successivo trattamento di 5 minuti con acqua AcE a 4 °C.

Da quanto fin qui esposto risulta indubbiamente che l'acqua elettrolizzata ossidante a pH acido è agente disinfettante di massima efficacia; essa può tuttavia perdere rapidamente la sua attività battericida, poiché, proprio a causa della sua acidità, rilascia velocemente Cl₂ sotto forma di gas. Una soluzione troppo acida può altresì produrre fitotossicità e lievi danni alla salute degli operatori.

Nell'articolo di *Yang et al.* (7) si sono individuati intervalli di pH ottimali per la disinfezione, che confermano quanto precedentemente riportato. In particolare, è stato documentato come i trattamenti con acqua elettrolizzata con valori di pH compresi tra 4 e 9, su lattuga inoculata con ceppi di *Salmonella Typhimurium*, *E. coli O157:H7* e *L. monocytogenes*, provochino una riduzione di carica batterica rispettivamente compresa tra 1.5 e 2.0 e tra 1.7 e 2.1 log₁₀UFC/g. In particolare, nel caso in cui il trattamento antibatterico sia effettuato a valori di pH pari a 4 oppure a 9 si ha una riduzione di carica batterica di circa 1.7 log₁₀UFC/g, mentre nel caso in cui sia effettuato a valori di pH pari a 7 consenta una riduzione di carica batterica di 2.0 log₁₀UFC/g. Gli autori sostengono che le differenze di attività, al variare del pH, non sono statisticamente significative, tuttavia i trattamenti a pH neutro consentono di preservare la qualità visuale del prodotto trattato.

A questo proposito, *Guentzel et al.* (8) hanno studiato l'uso dell'acqua elettrolizzata ossidante prossima alla neutralità (pH 6.5, ORP 800-900 mV, cloro attivo tra 20 e 120 ppm), valutando la sua efficacia antimicrobica su foglie di lattuga (qualità *iceberg*) e di spinaci, pre-impacchettate e conservate alla temperatura di 4 °C prima dell'inoculo. I ceppi immessi erano delle specie batteriche *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ed *Enterococcus faecalis*. I risultati dimostrano una maggiore attività biocida sulle foglie di spinaci rispetto a quelle di lattuga. Il motivo è probabilmente attribuibile alla particolare conformazione delle foglie di lattuga della qualità *iceberg*, le quali, rispetto alle foglie di spinacio, sono strette ed arricciate. In esse, dunque, il batterio trova degli anfratti in cui potersi

annidare, senza essere colpito dall'agente disinfettante. In ogni caso, il problema può essere attenuato aumentando il tempo di contatto con l'antimicrobico, e sottoponendo a vigorosa agitazione le foglie di lattuga immerse nelle soluzioni trattanti. L'impiego di acqua elettrolizzata con pH prossimo alla neutralità, oltre ad essere un efficace antimicrobico, non lascia residui tossici sulla superficie delle foglie trattate ed è sicuro per l'ambiente e per il consumatore.

4..1.4. **Il cavolo, i germogli ed il riso**

Tanti sono i tipi di vegetali sottoposti a studi di disinfezione con acqua elettrolizzata. Nell'articolo di *Achiwa et al.* (9) è riportato, anche nel caso del cavolo fresco tagliato, il confronto diretto tra la soluzione acquosa di ipoclorito di sodio (cloro attivo 200-210 mg/L e pH ~10) e l'acqua elettrolizzata acida (cloro attivo 20-40 mg/L e pH ~2.5), e ciò consente di osservare come quest'ultima non solo sia più rapida ed efficace dell'altra nella disinfezione, ma sia anche meno aggressiva per il frutto e per l'ambiente e non rilasci composti potenzialmente cancerogeni.

Nello studio di *Koide et al.* (10), l'efficacia di disinfezione dell'acqua elettrolizzata leggermente acida (SIAEW: pH 6.1, 20 mg/l di cloro disponibile) su cavolo tagliato di fresco è stata confrontata con quella di una soluzione di ipoclorito di sodio (soluzione di NaOCl: pH 9.6, circa 150 mg/L di cloro attivo). La SIAEW ha ridotto di circa 1,5 log₁₀CFU/g i batteri aerobi totali e di 1,3 log₁₀CFU/g le muffe ed i lieviti, rispetto al cavolo fresco tagliato prima dell'immersione. Dall'analisi statistica dei risultati è emerso che l'efficacia disinfettante della SIAEW è equivalente o superiore rispetto a quella della soluzione a base di NaOCl. I risultati hanno anche indicato che la SIAEW, se conservata in modo corretto (al buio ed in contenitore sigillato) può mantenere costante il suo contenuto in cloro disponibile.

I germogli sono divenuti oggetti di studio, poiché sono stati associati a numerose malattie di origine alimentare di recente acquisizione; infatti, esse aumentano la propria virulenza in ambienti caldi ed umidi, dove si ricreano le condizioni ideali per la crescita dei patogeni. Si accresce così la probabilità che le infezioni aumentino durante il periodo della germinazione dei semi. Gli studi

di *Sharma & Demirci* (11) hanno dimostrato che l'impiego di acqua elettrolizzata nella sua forma ossidante, ad una concentrazione di cloro attivo pari a 64.5 mg/L, consente di ridurre la carica di *Escherichia coli O157:H7* sui germogli alfa-alfa di circa il 91.1% dopo i primi 2 minuti di trattamento, e del 99.8% dopo 64 minuti. Inoltre, pare che il trattamento con acqua EO non provochi alcun danno visibile ai germogli.

Secondo *Kim et al.* (12) un trattamento antimicrobico con ipoclorito di calcio (20 mg/L) dei semi alfa-alfa riduce la carica batterica (*Salmonella*) fino a livelli non rilevabili. L'analisi sui germogli generati da questi semi ha tuttavia mostrato il persistere di patogeni, per un valore superiore a 6 log₁₀UFC/g. Si deve pertanto ritenere che una parte dei batteri rimanga intrappolata nei germogli, risultando così poco accessibile a qualunque agente antibatterico. In alternativa, l'uso dell'acqua EO (cloro attivo 84 mg/L) conduce a risultati più soddisfacenti e gli effetti sono ulteriormente rafforzati applicando una sonicazione, grazie alla quale i batteri intrappolati nei germogli vengono meglio raggiunti dall'agente antimicrobico.

A proposito dei trattamenti sterilizzanti del riso, il lavoro di *Isobe et al.* (13) evidenzia la necessità di impiegare una combinazione di due forme di acqua elettrolizzata, sia per non intaccare le buone qualità del prodotto, sia per ottenere migliori risultati di disinfezione. L'uso di acqua elettrolizzata alcalina, prima del trattamento con acqua elettrolizzata acida, allarga lo spettro d'azione antimicrobica anche alle spore batteriche resistenti al calore, come quelle molto tenaci del batterio *Bacillus subtilis*. Sulla base di questi presupposti, *Isobe et al.* hanno potuto definire una metodologia ideale per la disinfezione del riso, che viene qui di seguito proposta: il prodotto viene trattato per 5 minuti con acqua elettrolizzata alcalina (pH 11.6 ed ORP -576 mV) per rimuovere la polvere di crusca dalla cuticola esterna, quindi viene immerso per 30 minuti in acqua elettrolizzata acida (pH 2.7, ORP 1481 mV, cloro attivo 51.5 ppm) per essere sterilizzato.

4.1.5. **Arachidi**

Nel lavoro di *Xiong et al.* (14), l'acqua elettrolizzata neutra (NEW) e l'acqua elettrolizzata acida (AcEW) dimostrano di possedere un'efficacia fungicida

significativamente differente nei confronti di *Aspergillus flavus* (*A. flavus*), agente patogeno dei semi di arachidi, portando alla completa inattivazione del fungo dopo un tempo di contatto rispettivamente pari a 90 e 120 secondi ed ad una concentrazione di cloro disponibile pari a 30 ppm. Gli autori dello studio ipotizzano che la differenza di efficacia non sia dovuta tanto alla struttura dell'acqua, ma alla maggior presenza di radicale OH nella NEW rispetto alla AcEW. Ciò è stato dimostrato dall'analisi di dati ottenuti attraverso spettroscopia UV, ¹⁷O-NMR e di risonanza di spin elettronico. Il radicale OH distrugge le strutture cellulari dei conidi di *A. flavus* e ne danneggia anche la normale funzione cellulare, causando la perdita di K⁺ e Mg²⁺.

Zhang et al. (15) hanno studiato l'efficacia di AcEW in merito alla decontaminazione da aflatossina B₁ (AFB₁) su arachidi. I risultati hanno evidenziato che dopo che le arachidi contaminate sono state imbevute con la soluzione AcEW (secondo un rapporto liquido:solido pari a 5:1 (v/m)) per 15 minuti a temperatura ambiente, il contenuto di AFB₁ è diminuito da 34,80 mg/kg a circa 5 mg/kg (riduzione dell'85%). L'eliminazione di AFB₁ è risultata relativamente elevata quando la temperatura dell'ambiente era di 25 °C o 45 °C ed il tempo di contatto pari a 15 minuti. Inoltre, né le proprietà nutrizionali delle arachidi, né il loro colore sono significativamente variati dopo il trattamento. La concentrazione di cloro disponibile risulta essere il fattore primario nella eliminazione della AFB₁, ed anche il pH della soluzione gioca un ruolo importante: il cloro sotto forma di HOCl è probabilmente più efficace rispetto a quello in forma ClO⁻.

4.1.6. **Disinfezione della Frutta**

Anche la frutta raccolta, integra o tagliata, richiede l'impiego di nuovi metodi di disinfezione, più efficaci e meno dannosi, volti a conservare più a lungo le qualità del prodotto e a salvaguardare la salute del consumatore. Lo studio della disinfezione tramite acqua elettrolizzata, quasi esclusivamente ossidante, è stato rivolto a cocomeri, fragole, pere, meloni, mele, pesche ed uva. Di seguito un dettaglio dei lavori reperibili in letteratura.

4..1.7. **Cocomeri e fragole**

Lo studio di *Koseki et al.* (16) è stato effettuato su cocomeri e su fragole perfettamente sani; ciascun cocomero è stato tagliato in piccole porzioni di 5 cm di altezza, tutte dello stesso peso, esattamente corrispondente a quello delle singole fragole intere.

Due sono stati i metodi di disinfezione sperimentali: nel primo, il frutto è stato immerso per 10 minuti in acqua elettrolizzata acida (cloro attivo 30 ppm); nel secondo approccio, il trattamento per immersione con acqua elettrolizzata è stato ridotto a 5 minuti e gli è stato associato un pre-trattamento di ulteriori 5 minuti con acqua elettrolizzata alcalina. Interessante è risultato il confronto tra i due frutti interi: i cocomeri hanno una buccia molto resistente e difficile da attraversare, per cui sono difficili da sterilizzare con ogni tipo di disinfettante, inclusa l'acqua elettrolizzata acida. L'impiego dell'acqua AIE come agente pre-trattante, proprio per la sua proprietà di tensioattivo, pare incentivare l'azione disinfettante dell'acqua AcE, portando ad una riduzione di carica batterica superficiale pari $2 \log_{10}$ UFC/cocomero.

D'altro canto, le fragole si deteriorano molto più facilmente, a causa della loro alta suscettibilità alle infezioni da funghi e alla loro conformazione superficiale, non omogenea e molto complessa. Questo frutto tollera poco qualsiasi forma di disinfezione, inclusa quella con acqua elettrolizzata acida, e si comporta in modo opposto al cocomero nella risposta ai due metodi di disinfezione: la fragola non richiede un pre-trattamento, quanto piuttosto un'unica immersione di 10 minuti in acqua AcE. Il motivo è da attribuirsi alla necessità, per questo frutto complesso, di stare a contatto con l'agente sanitizzante almeno 10 minuti, tempo minimo per consentire l'interessamento della parte più esterna frutto.

4..1.8. **Pere**

Lo studio di *Al-Haq et al.* (17) pone l'accento sulla contaminazione delle pere con il fungo *Botryosphaeria berengeriana*, che induce la formazione di cancri e marcescenza nei frutti, ed individua nell'acqua elettrolizzata ossidante una valida alternativa ai trattamenti disinfettanti canonici, i quali possono indurre resistenza nel fungo stesso. Le pere (*Pyrus communis* L., La France) sono state conservate alla temperatura di 1 °C per un massimo di tre settimane prima

del loro trattamento, e portate in una camera a 20 °C con umidità relativa superiore al 90% dalle 3 alle 6 ore prima dell'inoculo con il fungo. Sono state sottoposte ad inoculo tanto pere tagliate quanto frutti integri, tutti perfettamente sani, in modo da valutare l'efficacia d'azione dell'agente disinfettante. I tagli praticati sulle pere sono in parte profondi (4 mm di profondità x 1 mm di lunghezza), in parte più superficiali (2 mm di profondità x 1 mm di lunghezza) e sono dislocati in 4 punti attorno al picciolo.

L'inoculo è stato praticato per immersione nel brodo fungino, nel caso delle pere integre, o per iniezione diretta nel taglio praticato, nel caso delle pere tagliate. Il trattamento antibatterico è stato quindi effettuato, solamente per le pere non tagliate, con acqua elettrolizzata ossidante avente caratteristiche variabili, essendo stata utilizzata una cella indivisa: il valore massimo di ORP impiegato era intorno ai 1170 mV, pressoché stabile ad un pH tra 2.6 e 3.6. Dallo studio effettuato emerge, in primo luogo, come la pera perfettamente integra non subisca alcuna forma di contaminazione nella polpa, poiché il fungo non è in grado di attraversare la buccia. Nelle pere in cui sono stati praticati i tagli, la contaminazione ha luogo e la disinfezione è facilmente controllabile solo nel caso in cui il taglio sulla buccia sia superficiale, dal momento che l'acqua EO reagisce immediatamente con il fungo localizzato negli strati più superficiali della polpa della pera. Il disinfettante sembra non essere in grado di controllare la crescita batterica nella polpa del frutto che si trova ad una profondità superiore ai 2 mm. La distruzione delle spore fungine richiede tempi più lunghi rispetto ai batteri. Più in particolare, se l'acqua elettrolizzata ossidante è in grado di aggredire i batteri nell'arco di 30 secondi di esposizione, l'attacco alle spore fungine richiede una decina di minuti per esplicare il massimo della sua efficacia. Tempi di esposizione più lunghi influenzano l'integrità del frutto, causando infiltrazioni d'acqua al suo interno, in grado poi di facilitare il diffondersi delle infezioni.

4.1.9. **Mele e meloni**

Lo studio di *Wang et al.* (18) mette a confronto due metodi classici di disinfezione (con acido perossiacetico ed ipoclorito di sodio) con il metodo innovativo basato su acqua elettrolizzata acida. La ricerca è stata effettuata su mele di varietà '*Golden delicious*' e meloni di varietà '*Cantalupo*', entrambi

acquistati in un supermercato locale, disinfettati sotto raggi UV per 20 minuti e tagliati con un coltello sterile in porzioni cilindriche delle stesse dimensioni. Le porzioni di mela sono state private della buccia, mentre su quelle di melone è stata mantenuta la scorza.

Ciascun frutto è stato inoculato con una miscela di 5 ceppi della specie patogena *Escherichia coli* O157:H7, ma le modalità di inoculazione sono differenti a seconda del tipo di frutto: infatti, mentre le mele sono state immerse nella miscela batterica, nel caso dei meloni sono state realizzate delle macchie superficiali utilizzando il brodo microbico (maculatura).

In base ai risultati raccolti, la sterilizzazione battericida con acqua elettrolizzata acida (cloro attivo 68-70 mg/L, ORP 1150 mV e pH 2.7) pare avere un'efficacia superiore a quella dell'ipoclorito di sodio (cloro attivo 88 mg/L e pH 6.5) ma inferiore a quella della soluzione di acido perossiacetico (80 mg/L). In tutti e tre i casi, l'attività antibatterica è massima nel primo minuto di trattamento; si ha poi una progressiva diminuzione, probabilmente a causa della morfologia della superficie dei due frutti trattati. E' plausibile ritenere che nel primo minuto di disinfezione vengano aggredite le cellule batteriche localizzate sulla superficie, quindi più esposte all'agente disinfettante; a tempi più lunghi la disinfezione si estende verso quelle cellule batteriche che, intrappolate all'interno delle cavità presenti sulle superfici dei frutti, sono più difficili da raggiungere. Poiché il melone *Cantalupo* presenta una superficie rugosa, mentre la mela *Golden delicious* tagliata risulta porosa, è facile comprendere come ciò possa rappresentare un serio problema, che costringe a prolungare la durata del processo di disinfezione.

L'attività antimicrobica dell'acqua elettrolizzata sarebbe, come già detto più volte, di maggiore impatto qualora si esprimesse direttamente su un brodo di coltura batterico, piuttosto che sulla superficie dei frutti. Ciò è confermato dallo studio di Okull e La Borde (19), i quali hanno rivolto l'attenzione su tre temi principali: in primo luogo, hanno valutato l'efficacia del trattamento sterilizzante, con acqua elettrolizzata ossidante, in una sospensione acquosa di spore del batterio *Penicillium expansum*. Successivamente, hanno analizzato la capacità del trattamento nel prevenire il decadimento di mele tagliate, inoculate con il batterio; in terzo luogo, hanno constatato l'assoluta mancanza di

contaminazioni in altra frutta posta a contatto con la soluzione disinfettante, successivamente al suo impiego. Il fungo *Penicillium expansum* è stato preso come riferimento, poiché esso rappresenta la principale causa di decadimento per le mele dopo la loro raccolta. Le mele oggetto dello studio, di qualità *Macintosh*, sono state raccolte e conservate a 4 °C; poco prima dell'inoculo, sono state lavate, asciugate e portate a temperatura ambiente. Su ciascuna di esse sono stati praticati dei tagli circolari di 8 mm di diametro e 3 mm di profondità, in 5 punti equidistanti tra loro; l'inoculo è stato quindi realizzato mediante immersione del frutto in una miscela di spore di *Penicillium expansum* per un tempo di 10 secondi. Al fine di valutare l'efficacia della disinfezione, si è impiegata acqua elettrolizzata ossidante sia concentrata (pH 3.1, ORP 1133 mV, cloro attivo 59.6 mg/L) che diluita al 25% con acqua distillata (pH 6.5, ORP 851 mV, cloro attivo 10.1 mg/L). A seguito di trattamento con acqua EO concentrata per 300 secondi, sul brodo di coltura si registra una riduzione di carica sporigena superiore a 4 log₁₀UFC/g, che si riduce a 2 log₁₀Ufc/g nel caso del trattamento con la soluzione disinfettante diluita. Per quanto riguarda invece il trattamento diretto sui frutti, si è osservato che l'acqua elettrolizzata, come altri mezzi canonici di disinfezione (tra cui le soluzioni di ipoclorito, 100 o 200 mg/L), non è in grado di prevenire il decadimento in corrispondenza dei tagli infetti sulla mela poiché, anche in questo caso, le spore localizzate nei tessuti interni del frutto risultano protette dal contatto con gli agenti antimicrobici. La scarsa efficacia è altresì imputabile alla possibile interazione, già menzionata in precedenza, tra il disinfettante ed il materiale organico presente sulla superficie delle mele, che porta ad un consumo dell'agente attivo. L'immersione delle mele in taniche contenenti acqua elettrolizzata ossidante riduce la contaminazione tra una mela e l'altra in corrispondenza delle lacerazioni non ancora infette.

4.1.10. **Pesche ed uva**

Nello studio effettuato da *Guentzel et al.* (20) è stato valutato il potenziale utilizzo dell'acqua elettrolizzata ossidante quasi neutra (pH = 6,3-6,5) per quanto concerne l'inattivazione delle colture pure di *Botrytis cinerea* e *Monilinia fructicola*, nonché la riduzione dell'infezione fungina dovuta a questi organismi sulla superficie dei frutti. Per entrambi i microrganismi, il trattamento in colture

pure, con acqua EO a concentrazioni di 25, 50, 75 e 100 ppm di cloro residuo totale (TRC) e con un tempo di contatto di 10 minuti, provoca una riduzione di 6 \log_{10} spore/mL. Relativamente ai frutti, in un primo caso si è realizzato un trattamento per immersione; in un secondo caso, il trattamento per immersione è stato fatto seguire da uno per spruzzo di acqua EO, per valutare la sua capacità di prevenire o ritardare l'insorgenza di infezioni sulla superficie dei frutti, durante la realizzazione di imballaggi post-raccolta e su scaffali di vendita al dettaglio. Un trattamento per immersione in acqua EO (per 10 minuti) della superficie inoculata di pesche con *M. fructicola* è in grado d'impedire l'infezione per 3 giorni, determinando un'incidenza dell'infezione del 12,5% ed una malattia a livello di gravità pari al 6% dopo 5 giorni di conservazione a 25 °C. L'immersione in acqua EO di uva da tavola verde, inoculata con *B. cinerea*, impedisce l'infezione per 7 giorni, determinando un'incidenza di infezione dell'1% ed una malattia a livello di gravità pari al 2% dopo 10 giorni di conservazione a 25 °C. Nel caso delle pesche, un trattamento per immersione fatto seguire da uno per spruzzo con acqua EO (al giorno) riesce ad impedire l'infezione per 12 giorni, determinando un'incidenza di infezione del 10% e una malattia a livello di gravità pari al 6%, dopo 14 giorni di conservazione a 25 °C.

Un trattamento dell'uva per immersione, seguito da trattamento giornaliero a spruzzo con acqua EO, è in grado d'impedire l'infezione per 24 giorni, determinando un'incidenza di infezione del 2% e una malattia a livello di gravità pari al 2%, dopo 26 giorni di stoccaggio a 25 °C.

I risultati di questo studio suggeriscono che le soluzioni preparate per via elettrochimica possono risultare efficaci per la sanificazione delle superfici dei frutti nel post-raccolta. prima di essere imballati, e possono altresì aumentare la durata di conservazione della frutta in ambienti commerciali.

4..2. Trattamenti su pianta

Alla luce delle ultime considerazioni, appare d'interesse stabilire se si possano ottenere risultati migliori di disinfezione, qualora questa venga praticata sul frutto prima della raccolta dalla pianta di origine. A questo proposito è necessario che l'agente antimicrobico si disperda lungo l'intera superficie del

frutto e della pianta: è facile dunque comprendere come una nebulizzazione spray possa rappresentare il sistema ideale, dal momento che consente di coprire grandi superfici e raggiungere gli anfratti nascosti più superficiali, nei quali i patogeni potrebbero dislocarsi.

L'applicazione spray diretta su pianta va certamente considerata solamente per agenti disinfettanti di comprovata innocuità nei confronti dell'ambiente e delle persone.

Riguardo all'uso dell'acqua elettrolizzata spray, ben pochi sono al momento gli articoli che hanno affrontato studi in merito.

4.3. Il porro

Nello studio affrontato da *Achiwa et al.* (21) sono stati presi in esame i porri, ortaggi interessanti poiché possono essere conservati a temperatura ambiente (crudi e tagliati) per lungo tempo, prima di essere consumati. Le parti commestibili di questo ortaggio sono esposte a diretto contatto con l'ambiente esterno e sono quindi fortemente soggette a contaminazioni microbiche. Il porro può essere coltivato anche in ambiente acquoso, laddove è più esposto ad infezione batterica rispetto alla coltura su suolo. Per valutare l'efficacia dell'acqua elettrolizzata sulla disinfezione dei porri, il trattamento del prodotto agricolo è stato effettuato durante la sua crescita.

Il metodo di disinfezione applicato consiste nel nebulizzare 50 ml di acqua elettrolizzata sulle piante, una volta a settimana, dalle ore 14 alle ore 15, mediante un sistema di acqua a riciclo forzato. Tre sono i tipi di acqua elettrolizzata utilizzati: una parte delle piante di porro è stata nebulizzata con il tipo alcalino, una parte con il tipo acido, ed una parte con un'alternanza dei due precedenti tipi.

E' interessante osservare che l'acqua elettrolizzata, direttamente applicata su pianta, non viene più ottenuta a partire da NaCl, bensì da KCl, poiché il sodio, a differenza del potassio, è causa di disidratazione delle piante fino a provocarne la morte. Il sistema sperimentale di disinfezione, messo a confronto con lotti di porri coltivati non sottoposti a nebulizzazione e con lotti sottoposti a

nebulizzazione di acqua di rubinetto, conferma ancora una volta la notevole efficacia antibatterica dell'acqua elettrolizzata. Si esclude pertanto che possa essere la metodologia stessa di applicazione spray a determinare l'effetto disinfettante. L'impiego di acqua elettrolizzata spray induce soprattutto la crescita della pianta; in particolare, l'impiego di una miscela dei due tipi di acqua elettrolizzata (acida ed alcalina) consente di aumentare la lunghezza delle foglie e del gambo, ed il contenuto in amminoacidi liberi. Anche in questo studio viene riportato il confronto diretto con una soluzione di ipoclorito: è evidente il fatto che anche quest'ultima è in grado di promuovere la crescita del vegetale, ma risulta altresì indiscutibile la maggiore efficacia dell'uso alternativo delle due forme combinate di acqua elettrolizzata. Se la soluzione di ipoclorito comporta un aumento nel numero di foglie di scarto ed un evidente scolorimento delle parti verdi della pianta, l'uso dell'agente innovativo in questione attenua fortemente l'insorgenza di tali effetti collaterali. Infine, l'impiego di acqua elettrolizzata nebulizzata aumenta il peso del prodotto fresco (ciò appare plausibile, dal momento che tale vegetale è composto per il 90% da acqua), senza intaccarne la qualità.

Per quanto riguarda l'attività antimicrobica, l'uso alternato di acqua elettrolizzata acida ed alcalina porta ad una riduzione significativa di tutti i batteri viventi, presenti sulla superficie dei porri, in modo analogo a quanto ottenibile con il solo impiego di acqua elettrolizzata acida. In definitiva, lo studio di *Achiwa et al.* dimostra, ancora una volta, come l'uso di acqua elettrolizzata acida dia buoni risultati, da un punto di vista strettamente antibatterico; tuttavia, quando il suo utilizzo viene associato a quello dell'acqua elettrolizzata alcalina, risulta possibile ottenere un miglioramento nelle proprietà organolettiche del vegetale, incentivando una buona crescita della pianta.

4.4. Le fragole

Nel lavoro di *Guentzel et al.* (22), il trattamento di *Botrytis cinerea* o *Monilinia fructicola* con acqua EO neutra (a 50 o 100 ppm di cloro residuo totale (TRC)), in coltura pura, ha portato ad una riduzione della popolazione fungina di un fattore di 10^6 e ad una inattivazione pari al 100%.

I trattamenti con Captano 50WP (captano), Rovral (iprodione), Iprodione 4LAG (iprodione), o Switch 62,5 WDG (cyprodinil e fludioxonil), se applicati assieme ad acqua EO (contenente 50 o 100 ppm di cloro), inibiscono efficacemente la crescita di *B. cinerea*, come evidenziato da una riduzione della popolazione fungina, di un fattore pari a 10^6 .

L'uso dei fitofarmaci sopra citati, in combinazione con acqua EO (contenente 50 o 100 ppm di cloro), consente di ridurre la popolazione di *M. fructicola* di un fattore pari a 10^6 , con il 100% di inattivazione.

Le piante di fragola spruzzate una volta a settimana con acqua EO (pH = 6,3-6,5 e TRC pari a 50 o 100 ppm), se confrontate con piante trattate con sola acqua (0 ppm TRC), non mostrano segni significativi di fitotossicità ($P > 0,05$).

L'applicazione di acqua EO (pH = 6,3-6,5 e TRC pari a 100 ppm) due volte a settimana su piante di fragola infette da *B. cinerea*, è risultata più efficace ($P < 0,05$) rispetto ad un unico trattamento a settimana con Captano, ed efficace tanto quanto un unico trattamento a settimana con captano, in combinazione con un trattamento a settimana con acqua EO. Quest'ultima modalità di trattamento appare significativamente più efficace ($P < 0,05$) rispetto ad un unico trattamento a settimana con captano.

Infine, l'immersione delle fragole in acqua EO (50 o 100 ppm TRC) non lascia residui di cloro sui frutti, rispetto al bianco (immersione in acqua). I risultati di questo studio suggeriscono che l'acqua EO potrebbe essere utilizzata per la gestione dell'infezione causata da *B. cinerea* su piante di fragola in campo ed anche come soluzione disinfettante per macchine da raccolta, serre, così come nelle strutture commerciali, per prevenire o gestire le infezioni di *B. cinerea* e *M. fructicola*.

4..5. Trattamenti delle acque di processo provenienti dall'industria di IV gamma

Gómez-López et al. (23) hanno valutato l'effetto delle condizioni operative (densità di corrente, velocità di flusso del ricircolo e livello di drogaggio degli elettrodi) sull'efficacia di elettrodi di diamante drogati con boro (BDD) per

quanto riguarda l'inattivazione di microrganismi e la diminuzione della richiesta chimica di ossigeno (COD), nell'acqua di lavaggio di lattuga inizialmente caratterizzata da un COD pari a 725 mg/L ed inocolata con una miscela di 5 ceppi di *Escherichia coli* O157:H7.

Nell'acqua di lavaggio, durante i trattamenti, sono stati monitorati i cambiamenti nella popolazione dei patogeni, il COD, il pH, la temperatura, il potenziale redox ed il cloro libero e totale.

Considerando le caratteristiche specifiche della fase di lavaggio inclusa nella trasformazione di IV gamma, il processo di disinfezione dell'acqua di lavaggio dovrebbe essere veloce. Le condizioni caratterizzate da alta densità di corrente (180 mA/cm^2), alta velocità di flusso (750 L/h) ed alto livello di drogaggio per l'elettrodo (8000 mmol/mol) sembrano fornire una efficienza di disinfezione adatta a diminuire la probabilità di "cross contamination" batterica nelle industrie di IV gamma, in aggiunta al risparmio sul consumo di acqua e alla diminuzione della quantità di acque reflue effluenti.

4..6. Riferimenti bibliografici

- (1). Izumi H. (1999): Electrolyzed water as a disinfectant for fresh-cut vegetables. *Journal of Food Science*, 64, 536-539.
- (2). Workneh T.S., Osthoff G., Pretorius J.C., Hugo C.J. (2003): Comparison of anolyte and chlorinated water as a disinfecting dipping treatment for stored carrots. *Journal of Food Quality*, 26, 463-474.
- (3). Deza M.A., Araujo M., Garrido M.J. (2003): Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis, and *Listeria monocytogenes* on the surfaces of tomatoes by neutral electrolyzed water. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 482-487.
- (4). Park C.M., Hung Y.C., Doyle M.P., Ezeike G.O.I., Kim C. (2001): Pathogen reduction and quality of lettuce treated with electrolyzed oxidizing and acidified chlorinated water. *Journal of Food Science*, 66, 1368-1372.
- (5). Casadiego L.P., Cuartas V.R., Mercado M., Díaz M., Carrascal A.K. (2005): Effectiveness of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Listeria*

monocytogenes in lettuce. *Revista de la Facultad de Ciencias - Pontificia Universidad Javeriana*, 10, 97-108.

(6). Koseki S., Yoshida K., Kamitani Y., Isobe S., Itoh K. (2004): Effect of mild heat pre-treatment with alkaline electrolyzed water on the efficacy of acidic electrolyzed water against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on lettuce. *Food Microbiology*, 21, 559-566.

(7). Yang H., Swem B.L., Li Y. (2003): The effect of pH on inactivation of pathogenic bacteria on fresh-cut lettuce by dipping treatment with electrolyzed water. *Journal of Food Science*, 68, 1013-1017.

(8). Guentzel J.L., Lam K.L., Callan M.A., Emmons S.A., Dunham V.L. (2008): Reduction of bacteria on spinach, lettuce, and surfaces in food service areas using neutral electrolyzed oxidizing water. *Food Microbiology*, 25, 36-41.

(9). Achiwa N., Katayose M., Abe K. (2003): Efficacy of electrolyzed acidic water for disinfection and quality maintenance of fresh-cut cabbage. *Food Preservation Science*, 29, 341-346.

(10). Koide S., Takeda J., Shi J., Shono H., Atungulu G.G. (2009): Disinfection efficacy of slightly acidic electrolyzed water on fresh cut cabbage. *Food Control*, 20, 294-29.

(11). Sharma R.R., Demirci A. (2003): Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfalfa seeds and sprouts with electrolyzed oxidizing water. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 231-237.

(12). Kim C., Hung Y.C., Brachett R.E., Lin C.S. (2003): Efficacy of electrolyzed oxidizing water in inactivating *Salmonella* on alfalfa seeds and sprouts. *Journal of Food Protection*, 66, 208-214.

(13). Isobe S., Lee C., Yoshida K. (2004): Sterilization effect of electrolyzed water on rice food, in "Rice is life: scientific perspectives for the 21st century", Proceedings of the World Rice Research Conference, Tsukuba, Japan, pp. 270-272.

(14). Xiong K., Liu H., Liu R., Li L. (2010): Differences in fungicidal efficiency against *Aspergillus flavus* for neutralized and acidic electrolyzed oxidizing waters. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 67-75.

- (15). Zhang Q., Xiong K., Tatsumi E., Li L., Liu H. (2012): Elimination of aflatoxin B1 in peanuts by acidic electrolyzed oxidizing water. *Food Control*, 27, 16-20.
- (16). Koseki S., Yoshida K., Isobe S., Itoh K. (2004): Efficacy of acidic electrolyzed water for microbial decontamination of cucumbers and strawberries. *Journal of Food Protection*, 67, 1247-1251.
- (17). Al-Haq M.I., Seo Y., Oshita S., Kawagoe Y. (2002): Disinfection effects of electrolyzed oxidizing water on suppressing fruit rot of pear caused by *Botryosphaeria berengeriana*. *Food Research International*, 35, 657-664.
- (18). Wang H., Feng H., Luo Y. (2006): Dual-phasic inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 with peroxacetic acid, acidic electrolyzed water and chlorine on cantaloupes and fresh-cut apples, *Journal of Food Safety*, 26, 335-347.
- (19). Okull D.O., Laborde L.F. (2004): Activity of electrolyzed oxidizing water against *Penicillium expansum* on suspension and on wounded apples. *Journal of Food Science*, 69, 23-27.
- (20). Guentzel J.L., Lam K.L., Callan M.A., Emmons S.A., Dunham V.L. (2010): Postharvest management of gray mold and brown rot on surfaces of peaches and grapes using electrolyzed oxidizing water. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 54-60.
- (21). Achiwa N., Katayose M., Yoshida K., Saito Y., Kusakari S., Abe K. (2005): Spray application of electrolyzed acidic and alkaline water on leeks for reduction of viable bacteria and growth promotion, *Food Preservation Science*, 31, 15-19.
- (22). Guentzel J.L., Callan M.A., Lam K.L., Emmons S.A., Dunham V.L. (2011): Evaluation of electrolyzed oxidizing water for phytotoxic effects and pre-harvest management of gray mold disease on strawberry plants. *Crop Protection*, 30, 1274-1279.
- (23). Gómez-López V.M., Gobet J., Selma M.V., Gil M.I., Allende A. (2013): Operating conditions for the electrolytic disinfection of process wash water from the fresh-cut industry contaminated with *E. Coli* O157:H7. *Food Control*, 29, 42-48.

CAPITOLO N° 5.

BIOLOGIA MOLECOLARE

5..1. Uso delle sostanze ottenute mediante processi elettrochimici in prove di laboratorio.

5..1.1. Resistenza delle piante ai patogeni

Si definisce come patogeno di una pianta quell'organismo che, per completare una parte o tutto il suo ciclo vitale, cresce nella pianta e così esercita effetti dannosi sulla pianta ospite (1).

Visto che le piante sono minacciate continuamente dall'attacco di agenti patogeni, e dato il loro stato di immobilità che esclude qualsiasi possibilità di fuga, ogni cellula è strutturata in modo da essere capace di difendersi.

Le piante possiedono meccanismi di difesa preesistenti (costitutivi) strutturali e biochimiche rappresentate da composti tossici o metaboliti secondari con proprietà antimicrobiche che limitano l'efficacia dell'infezione per una ridotta quantità di patogeni (2).

Le difese indotte nelle cellule dell'ospite devono essere in grado di portare a termine la trascrizione e sintesi di nuovi enzimi che conferiscono resistenza contro la maggior parte di patogeni. Di fatto, mediante l'evoluzione, le piante hanno selezionato uno o più geni di resistenza (chiamati "geni-R") che le proteggono dall'infezione (1).

Nel caso specifico della difesa dovuta a processi biochimici e fisiologici, riconosciamo due tappe, che si caratterizzano come segue:

- Tappa pre-infezione: la maggior parte delle piante contiene, ancor prima che ci sia un'infezione, i differenti metaboliti secondari con proprietà antimicrobiche. Questi composti possono essere presenti nelle loro forme biologicamente attive, o essere accumulati come precursori inattivi nei vacuoli della cellula, ed essere attivati e poi liberati dopo l'attacco di patogeni, o come risposta al danno tissutale.

- Tappa post-infezione: questo tipo di difesa comprende tutte le reazioni di risposta di geni a seguito delle infezioni della pianta, come reazione di ipersensibilità, l'attivazione delle proteine PR, l'esplosione ossidativa.

I patogeni hanno diversi geni che sono necessari per provocare la malattia: essi includono quelli essenziali per il riconoscimento dell'ospite, per l'aderenza a questo e alle sue strutture, per la penetrazione e la colonizzazione di tessuti delle piante, per la germinazione e la formazione di struttura d'infezione.

Inoltre, i patogeni possono produrre enzimi, tossine ed ormoni necessari per causare l'infezione, e questi prodotti si chiamano fattori di patogenicità. La pianta ospite è in grado di riconoscere il patogeno, attraverso l'identificazione di molecole segnale prodotte dal patogeno stesso (elicitori) o di enzimi che esso rilascia.

Per attivare rapidamente le risposte di difesa nell'invasione dell'agente patogeno, ogni cellula della pianta richiede un sofisticato sistema di vigilanza. I geni di resistenza (R) della pianta possono codificare per i recettori, presumibilmente collocati nella membrana plasmatica, in grado di "individuare" tali molecole segnale e poi identificare il patogeno con un meccanismo di riconoscimento ospite-patogeno. Le piante sane in questo processo devono essere pienamente funzionanti e in grado di riconoscere i segnali trasmessi dai patogeni.

Inoltre, la pianta dev'essere in grado di distinguere se questi segnali provengono da organismo patogeni dannosi o da microrganismi utili per loro, con i quali possano stabilire associazioni simbiotiche benefiche, che permettono, per esempio, di aumentare la loro capacità di assorbire i nutrienti.

Il riconoscimento di un agente patogeno nocivo provoca l'attivazione di una complessa serie di risposte di difesa, rapide e ben localizzate, il loro obiettivo è promuovere lo sviluppo di condizioni altamente sfavorevoli per la vita, la crescita e la riproduzione del patogeno.

L'attivazione completa di queste risposte si realizza all'incirca in 24 ore e risulta nella morte cellulare localizzata nel tessuto infettato, e si chiama la risposta ipersensibile (HR). Questa risposta è basata sulla produzione e la liberazione di composti antimicrobici, l'attivazione di enzimi già presenti, ma in un modo inattivo. Lo scopo di questo tipo di risposta è di sottrarre gli elementi nutrizionali necessari per la vita del patogeno.

Accadono fenomeni tali come l'apertura di canali di ioni e la formazione di ROS, si attivano anche i processi ossidativi, come la produzione di perossido di idrogeno o la deposizione di callosio (un polimero di β 1-3 glucano), con il fine di confinare il patogeno.

La risposta di ipersensibilità avviene anche attraverso l'attivazione di cascate di segnali, cosa che porta all'attivazione della trascrizione di geni di difesa (geni PR), questa, di fatto, genera molecole di segnale (messaggeri) che possono agire a distanza. Poche ore dopo l'attacco del patogeno, le risposte di difesa si producono anche nei tessuti distanti dal sito dell'infezione.

E questo è il procedimento che porta all'attivazione della risposta immune della pianta chiamata resistenza sistemica acquisita (SAR): questo tipo di resistenza sistemica è indotto ed è legato al tipo di organismo che ha attaccato la pianta (4).

5.1.2. L'acido salicilico (SA)

L'acido salicilico (SA) è un composto che rallenta lo sviluppo di malattie nelle piante attaccate dalle malattie, è sintetizzato in natura da una varietà di piante, come il tabacco, il cetriolo, il salice, l'abete, la liquirizia, viti e il suo nome deriva precisamente dalla pianta del salice, dalla quale si estrae.

Una ricerca dell'Università Statale di Washington, pubblicata il 4 gennaio 2009, ci ha permesso di comprendere come si modula la sintesi dell'acido salicilico. Si osserva come l'attacco dall'esterno da parte di un agente patogeno porta ad un aumento nel contenuto di ioni di calcio (Ca^{2+}) nelle cellule: questo incremento potrebbe ridurre l'effetto inibitore del gene, e la sintesi dell'acido salicilico sarebbe di conseguenza una maggiore.

Una pianta sana normale, in condizioni di buona salute, ha un basso livello di acido salicilico, e questo livello aumenta quando la pianta è minacciata da un'infezione o stress ambientale, tramite l'aumento di Ca^{2+} . Ma non si sa qual è il vincolo tra il calcio e l'acido salicilico. Il calcio si unirebbe alla proteina 'calmodulina' per preparare la pianta a produrre acido salicilico (SA).

La calmodulina (proteina modulata dal calcio) è una proteina che si trova nel citoplasma di tutte le cellule eucariote, che rileva i livelli dei segnali di emissione di calcio e i diversi enzimi sensibili al calcio.

Lo studio, diretto dal professor B.W. Poovaiah, ha cercato di comprendere il vincolo tra il calcio-calmodulina e l'attivazione del sistema di difesa della pianta, che produce acido salicilico.

Lavorando con *Arabidopsis thaliana*, il gruppo di ricerca del Professor Poovaiah ha confermato che il ruolo fondamentale nella difesa della pianta contro gli aggressori esterni sarebbe giocato da un'interazione propria di calcio/calmodulina. Uno stress o un'infezione che causi un forte aumento di calcio nella cellula della pianta porterebbe alla formazione del complesso calcio/calmodulina, che agisce come un segnale specifico per la produzione di acido salicilico.

È stato anche osservato che un aumento nel livello di acido salicilico causa un rallentamento nella crescita della pianta, forse con il fine di conservare la sua forza per la battaglia contro il patogeno, una pianta che produce alti livelli di acido salicilico sarà protetta dalle infezioni, ma crescerà più lentamente, e una che ne produca poco, se ne produce, crescerà più velocemente, ma sarà altamente esposta a infezioni.

Questo fatto implica l'esistenza di un meccanismo di regolazione interno alla pianta che equilibri il livello delle risorse disponibili che devono essere utilizzate per la crescita o per la difesa contro attacchi esterni.

Le piante che crescono in un ambiente con un ridotto livello di agenti patogeni hanno un ridotto livello di acido salicilico: in queste condizioni, la pianta attiva un basso livello di difese ed ha più risorse per la crescita, quando la pianta è infetta, la produzione di acido salicilico aumenta e si riduce la crescita per investire più risorse nella difesa (4).

La relazione tra l'acido salicilico (SA) e il sistema immunitario è stata oggetto di diversi studi. White, nel 1979, ha segnalato che trattando con acido salicilico è possibile ridurre l'intensità dei sintomi in piante di tabacco infettate con il virus del mosaico del tabacco (TMV).

Più tardi si è anche osservato che dopo l'inoculazione di TMV le piante di tabacco hanno prodotto acido salicilico e sono diventate più resistenti all'infezione. La sintesi di acido salicilico attiva il sistema di resistenza SAR (resistenza sistemica acquisita), che agisce mediante la regolazione di diverse proteine coinvolte nel sistema di difesa, le proteine PR.

5.1.3. Le proteine di difesa (PR)

Quando una pianta viene attaccata, composti di segnale (come l'acido salicilico) attivano la produzione e l'attivazione delle "proteine di difesa contro patogeni" (proteine legate alla patogenesi), più comunemente definite proteine PR. Le proteine PR sono state identificate per la prima volta nelle foglie di tabacco dopo una reazione di ipersensibilità causata da un'infezione con il virus della TMV mosaico (5). Successivamente, sono state identificate in molte specie di piante ed è stato anche scoperto che hanno un ruolo difensivo importante, visto che le proteine sono tossiche per i patogeni e permettono la difesa della pianta contro lo stress biotico (6).

Le proteine PR sono state divise in 17 famiglie in base a similitudini strutturali PR-1. Nonostante siano state ampiamente caratterizzate dal punto di vista molecolare, la loro funzione biologica è finora sconosciuta. Giocano un ruolo centrale nei meccanismi di difesa delle piante, perché sono fortemente indotte in risposta all'infezione da patogeni e i trattamenti con acido salicilico (6).

PR-2. Sono delle β -1,3-glucanasi; si accumulano come risultato di attacco di agenti patogeni, ma anche durante molti processi fisiologici, come la maturazione del frutto o la germinazione di semi. La loro espressione può essere indotta dallo stress, ormoni e da elicitori fungini.

PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11. Sono chitinasi, cioè enzimi che idrolizzano la chitina (un polimero costituito da unità di N-acetilglucosamina uniti da legami glucosidici β -1,4). Le sintesi si verifica in risposta a funghi, batteri e virus. Differiscono nella loro localizzazione cellulare nella struttura primaria e nell'attività contro diversi substrati (6).

PR-5. Presentano attività anti fungine contro un ampio spettro di funghi patogeni. Il loro meccanismo di azione è l'inibizione dell'elongazione delle ife e la germinazione di spore. Fanno parte di questo gruppo anche l'osmotina e la zeamatina.

PR-6. Sono inibitori di proteasi, che partecipano nella difesa contro insetti, altri animali erbivori, i microrganismi e i nematodi. Sono presenti durante lo sviluppo della pianta (6).

PR-7. Sono state identificate solo nelle piante di pomodoro; agiscono come endoproteinasi e si suppone che abbiano un'attività anti fungina (6).

PR-9. Sono perossidasi coinvolte nei processi di lignificazione e rafforzamento della parete cellulare. Rafforzano il sistema di difesa della pianta attraverso la costruzione o il rafforzamento delle barriere fisiche.

PR-10. Sono proteine con attività di ribonucleasica.

PR-12. Sono chiamate anche defensine e sono coinvolte nella protezione del seme nelle prime tappe di germinazione. Hanno anche un'attività anti-fungina, visto che sono capaci di inibire la crescita di funghi patogeni.

PR-13. Comprendono la tionina e hanno un'elevata attività anti-fungina.

PR-15, PR-16 e PR-17. La conoscenza di questa famiglia di proteine PR è piuttosto scarsa, visto che sono state riconosciute recentemente. PR-15 e PR-16 sono tipiche delle monocotiledoni e comprendono famiglie di ossidasi.

5.1.4. WRKY

Un fattore di trascrizione tipica della pianta normalmente contiene un dominio di unione al DNA, un dominio di regolazione della trascrizione, un sito oligomerizzazione e un dominio di localizzazione nucleare. I fattori di trascrizione interagiscono con elementi cis e regolano l'espressione di geni attraverso questi domini.

Le proteine WRKY dimostrano un'alta affinità di legame ad una sequenza di DNA, denominata Box W (C/T)TGAC(C/T), che si trova nella regione del promotore di molti geni.

Il box W è la sequenza consenso minimo richiesto per il legame specifico al DNA (7).

L'espressione dei fattori WRKY non è costitutiva, ma è forte e rapidamente indotta come risposta a stress biotici o abiotici in numerose specie di piante.

Attività duplici dei fattori di trascrizione possono dipendere dal tipo cellulare e dal tipo o livello di segnale. Il meccanismo di doppia funzionalità dei fattori di trascrizione permettono loro di agire come attivatori o repressori. I fattori di trascrizione WRKY sono implicati in vari processi biologici nelle piante, specialmente nella regolazione di difesa contro stress biotico e abiotico.

Tuttavia, c'è poca informazione disponibile sui WRKY nel pomodoro (***Solanum lycopersicum***). D'altra parte, i geni WRKY del pomodoro mostrano livelli di espressione temporale e spaziale distinti in diversi processi di sviluppo e in risposta a diversi tipi di stress biotici e abiotici. L'espressione dei geni WRKY 8,

23, 39 è stata osservata in risposta a siccità, stress salino e *Pseudomonas syringae* (8).

5.2. Tabacco (*Nicotiana tabacum*)

La *Nicotiana tabacum* è una pianta appartenente alla famiglia delle Solanacee, angiosperme dicotiledoni distinguibili dal fatto che i loro semi sono circondati da un frutto, che li protegge e facilita la disseminazione. Molte specie di questa famiglia producono alcaloidi psicoattivi, come la nicotina nelle piante di tabacco. La pianta di *N. tabacum* è originaria delle regioni tropicali e subtropicali dell'America, ma adesso si coltiva commercialmente in tutto il mondo. È molto sensibile alla temperatura, al vento, all'umidità della terra e al tipo di terreno. Le temperature tra 20-30 °C sono le migliori per una crescita adeguata, così com'è preferibile un'umidità atmosferica tra 80 e 85% e un basso livello di azoto nel suolo.

È una pianta annuale, poco ramificata, alta generalmente tra 1 e 2 metri ma può raggiungere fino a 2,5 metri. Ha foglie grandi verdi di forma ellittica e fiori di colore bianco rosaceo a forma di tromba. I semi sono molto numerosi e piccoli, di forma ovale e di colore marrone. Tutte le parti della pianta, eccetto i semi sono appiccicose e coperte da peli ghiandolari corti che essudano una secrezione che contiene nicotina. La concentrazione di nicotina è variabile, dipendendo dalla specie, dal tipo di terreno e dalle condizioni atmosferiche, in generale aumenta con l'età della pianta e si concentra, in particolare, nelle foglie. Una pianta di tabacco può contenere dal 2 all'8% di nicotina e all'incirca il 64% di questo totale risiede nelle foglie, mentre il 18% si trova nel fusto, il 13% nelle radici, e 5% nei fiori. I semi non la contengono (9).

Il tabacco è una pianta ampiamente utilizzata in esperimenti di laboratorio essendo relativamente semplice da crescere e rispondendo bene alle manipolazioni genetiche, tali come la trasformazione con *Agrobacterium tumefaciens* per ottenere piante geneticamente modificate. Lo studio, finanziato da Philip Morris e realizzato nell'Università Statale di Carolina del Nord, ha reso possibile l'ottenimento di una cartografia completa di tutto il genoma di questa pianta, la disponibilità di questa informazione implica che il

tabacco sia considerato una pianta modello per lo studio della biologia molecolare.

5..3. Tecniche molecolari per l'analisi di espressione genica

5..3.1. Estrazione dell'RNA

L'estrazione di RNA costituisce un passo di somma importanza, visto che da questo dipenderanno i risultati posteriori. Per l'estrazione di RNA è stato utilizzato il kit Plant Total RNA della Sigma. Si sono pesati approssimativamente 100 mg di foglie (ottenute dai campioni trattati e dalle piante testimoni), sono stati collocati in azoto liquido all'interno di un mortaio, dove sono state tritate aggiungendo Buffer de Lisi, che rilascia l'RNA e allo stesso tempo inattiva le ribonucleasi e l'interferenza da metaboliti secondari. I resti cellulari sono separati mediante centrifuga e l'RNA è catturato in una colonna mediante una soluzione di unione che prevede che il DNA genomico e polisaccaridi restino nella colonna. Il DNA genomico residuale viene lavato mediante soluzioni di lavaggio e l'RNA purificato è eluito in acqua libera di RNAsi. Si possono ottenere fino a 100 ug di RNA totale a partire da 100 mg di tessuto vegetale in un tempo di 30 minuti una volta che il tessuto è stato tritato. Il rendimento tipico è di 20-60 ug e dipende dal tipo di tessuto e stadio di sviluppo. In certi casi è consigliabile la rimozione del DNA genomico che può essere co-eluito assieme all'RNA, per l'applicazione della PCR in tempo reale.

5..3.2. Elettroforesi

L'elettroforesi è una tecnica per la separazione di molecole secondo la mobilità di queste in un campo elettrico. La separazione può essere realizzata sulla superficie idratata di un supporto solido, o attraverso una matrice porosa, o in soluzione. In base alla tecnica usata, la separazione obbedisce in maniera differente alla carica elettrica delle molecole e alla loro massa.

Il metodo più comune per l'analisi di miscele di proteine o di acidi nucleici usa come supporto un gel di agarosio usato ad una concentrazione del 1,5% in buffer TAE 1X, usando una camera di elettroforesi orizzontale con un voltaggio di 85 V e un amperaggio di 55 mA con un colorante di caricamento per aiutare

a caricare il campione e riuscire a seguire il progresso dei frammenti di DNA attraverso il gel (10).

5.3.3. Rivelazione e Visualizzazione

Quando è stata completata l'elettroforesi, le molecole più piccole sono migrate verso l'anodo. Allora si possono 'rivelare' mediante l'aggiunta di un colorante specifico per renderle visibili. Vengono usati composti come il bromuro di etidio, il Sybr green, per gli acidi nucleici, tintura d'argento, blu di coomassie o tintura fluorescente per le proteine. Allo stesso modo vengono usati altri metodi per visualizzare la separazione della miscela nel gel. Se il reattivo è fluorescente sotto la luce UV o BLUE, si può semplicemente fare una fotografia del gel sotto tale luce. Questo lavoro è stato realizzato con una foto documentatore E-GEL IMAGER LIFE THE con un transilluminatore di luce blu e con un filtro universale UV/SYBR (10).

Le bande in diversi campioni che si trovano alla stessa altezza contengono molecole che hanno attraversato il gel alla stessa velocità. Esistono marcatori speciali che contengono una miscela di molecole di dimensione conosciuta. Se si fa un'elettroforesi di una miscela sconosciuta e si aggiunge un determinato marcatore, le bande osservate nel marcatore possono essere comparate con quelle ottenute nella miscela sconosciuta per determinare la sua dimensione. Sapendo che lo spostamento delle molecole è proporzionale al logaritmo della massa, si può stimare il peso molecolare di una molecola di interesse comparandola con il profilo di migrazione dei marcatori. Ciò si realizza costruendo una curva con i valori del marcatore, dove l'asse (y) rappresenta il logaritmo del peso molecolare e l'asse (x) rappresenta l'Rf di ogni banda. Poi, si calcola l'Rf della molecola incognita e si estrapola nella curva del logaritmo il peso molecolare. Applicando l'antilogaritmo si ottiene il peso molecolare della molecola sconosciuta.

5.3.4. Quantificazione di RNA

La quantificazione dell'RNA è necessaria per conoscere la quantità di RNA che sarà usata nelle analisi di espressione genica.

Vi sono vari metodi per quantificare l'RNA, anche se uno dei più usati e conosciuti è il metodo mediante l'uso del fluorimetro. Il fluorimetro è una piattaforma che rileva la fluorescenza di una sostanza fluorescente specifica,

aumentando la fluorescenza in funzione della quantità di RNA presente. La quantità di RNA si calcola mediante l'uso di standard di calibrazione con una quantità conosciuta di RNA (11).

È molto importante conoscere le condizioni ottimali di funzionamento dello strumento e del kit di quantificazione. Le fluttuazioni di temperatura influenzano direttamente la concentrazione del campione, potendo dare causare sovra o sottostime di quantità.

È importante mantenere le condizioni adeguate per la quantificazione per ottenere risultati affidabili che non alterino i calcoli di espressione genica.

5.3.5. Trattamento con l'enzima DNAsi I

Il trattamento dei campioni di RNA con l'enzima DNAsi I è un procedimento mediante il quale si eliminano le tracce di DNA contaminante dall'estrazione di RNA, prima della PCR in tempo reale, mediante l'applicazione dell'enzima DNasi I della casa commerciale INVITROGEN (12)



Figura 1. Purificazione dell'RNA

Questo trattamento è essenziale per evitare l'amplificazione di molecole di DNA contaminante che si potrebbe incontrare nella soluzione di RNA. Essendo la PCR in tempo reale uno strumento di rilevazione molto sensibile, si possono amplificare frammenti di DNA contaminante, dando luogo ai noti "falsi positivi" che possono sovrastimare i livelli di espressione genica. Pertanto è necessario applicare questo trattamento solo se si stanno per realizzare analisi mediante PCR in tempo reale per evitare confusioni nei risultati.

5.3.6. Sintesi di cDNA

Per la sintesi di DNA complementare è stato usato Kit Transcriptor Universal cDNA Master, della casa commerciale ROCHE, il quale fornisce i componenti necessari per la sintesi di cDNA, includendo i primer, i nucleotidi, le soluzioni tampone e gli enzimi supplementari in due fiale che minimizzano gli errori di pipettamento. Si usa come template l'RNA ottenuto in una reazione di trascrizione inversa. Il primer utilizzato è un oligo dT che contiene esclusivamente timina la quale si ibriderà alla coda poli-A dell'RNA messaggero. È importante standardizzare le quantità di mRNA affinché le quantità prodotte di DNA complementare siano un riflesso dell'mRNA iniziale (13).

Tabella 1. Componenti del Kit Transcriptor Universal cDNA Master

COMPONENTE	VOLUME	CONCENTRAZIONE FINALE
Acqua grado PCR	X ul	-
Buffer di Reazione Transcriptor Universal	4 ul	1X
Trascrittasi inversa Transcriptor Universal	1 ul	1X
RNA totale	X ul	2,5 ul (fino a 1ug)

Tabella 2. Protocollo del Termociclorador

PASSI	AZIONE
Ibridazione	+25°C per 5 minuti
Trascrizione inversa	+55°C per 10 minuti
Denaturazione	+85°C per 5 minuti
Hold	+04°C (illimitato)

5.3.7. Reazione di PCR in tempo reale

L'analisi dell'espressione genica, essendo un processo molecolare, implica una serie di tecniche, le quali devono essere strettamente sviluppate e standardizzate, visto che la gestione della PCR in tempo reale è un processo molto sensibile e richiede alta precisione.

Questo processo include tecniche come l'estrazione e quantificazione dell'RNA, l'eliminazione del DNA contaminante, la sintesi del cDNA e la PCR in tempo reale.

Per la reazione di PCR in Tempo Reale è stato usato il Kit FastStart Essential DNA Green Master della casa commerciale ROCHE, che permette una rilevazione molto sensibile e una quantificazione definita di sequenze di DNA.

Mediante l'introduzione della PCR in Tempo Reale, è possibile la quantificazione dinamica. Questa tecnica permette l'analisi di dati nella fase di

amplificazione costante (fase logaritmica lineare) e fornisce risultati esatti per ottenere la Quantificazione Relativa. Quest'ultima è la più fattibile da realizzare, visto che non richiede curve di calibrazione e permette la comparazione tra i livelli di espressione del gene di interesse e di un gene di riferimento denominato costitutivo o "housekeeper". I geni costitutivi codificano per proteine le cui attività sono essenziali per il mantenimento della funzione cellulare, inoltre i loro livelli di mRNA sono simili nei diversi tipi cellulari. Tuttavia i livelli di espressione possono variare dipendendo dal tipo cellulare analizzato o modelli di espressione differenziati in vari tessuti.

Il sistema utilizzato usa il colorante Sybr Green che si intercala tra il DNA e ed emette fluorescenza una volta unito al DNA. La quantità di pigmento incorporato è proporzionale alla quantità di DNA generato. Il colorante emette la sua fluorescenza a 520 nm. L'inconveniente di questa tecnica è che il Sybr Green si unirà a qualsiasi DNA doppia catena, pertanto la formazione di dimeri di primer o prodotti non specifici verrà comunque considerata nella quantificazione. Per comprovare la specificità si analizza la curva di fusione o "melting curve", visto che ogni prodotto ha una temperatura di dissociazione diversa dipendendo dalla sua lunghezza e dal suo contenuto di basi. La prova, per essere valida, deve produrre un unico picco ben definito.

Tabla 3 Geni di Tabacco e Pomodoro

		GENI	
TABACCO		POMODORO	
<i>Geni</i>	<i>Funzione</i>	<i>Geni</i>	<i>Funzione</i>
PR-1a	Antifungina	PR-1a	Antifungina
PR-2	β -1,3-glucanasi	PR-1b	Proteasa
PR-3a	Chitinasi acida	ChiAc	Quitinasa
PR-4a	DNA-RNAse ?	ChiBas	Quitinasa
PR-5	Thaumatolike, antifungina	GLUac	Glucanasa
PR-17	Sconosciuta	GLUbas	Glucanasa
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase	PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
WRKY 3	Fattore Trascrizionale	WRKY 8	Fattore Trascrizionale
RBOH	Hypersensitive response-related protein	WRKY 23	Fattore Trascrizionale
HSR203J	Hypersensitive response-related protein	WRKY 32	Fattore Trascrizionale
Actin	Reference	Actin	Reference
EFNT1 α	Reference	EFNT	Reference

Per il presente lavoro sono stati investigati i livelli di espressione dei geni PR-1a e PR-1b usando come riferimento i geni dell'actina AC e del fattore di elongazione EF, la cui selezione si è basata sulla stabilità della sua espressione, applicando il seguente protocollo:

Tabella 4 Componenti del Kit FastStart Essential DNA Green Master Roche

COMPONENTE	VOLUME
Acqua grado PCR	3 ul
Primer per pcr	2 ul
Master Mix 2X	10 ul
Volume Totale	15 ul

Tabella 5 Protocollo per PCR Real Time

PROFILO DEL PROGRAMMA			
TEMPERATURA (°C)	RAMPA (°C/s)	HOLD (s)	ACQUISIZIONE
HOLD			
95	4	600	
AMPLIFICAZIONE IN 3 PASSI			
45 Cicli			
95	5	20	
60	4	20	
72	4	20	
FUSIONE			
65	4	60	
95	0.1	1	

Una volta realizzate le reazioni di amplificazione mediante PCR in tempo reale, si è verificata la presenza di ampliconi delle dimensioni previste mediante la migrazione dei prodotti delle reazioni finali in un gel di agarosio al 1,5%



Figura 2. Gel di agarosio al 1,5% dove si possono osservare i frammenti amplificati dei geni PR1a, PR1b, SIWRKY8, SIWRKY23 e SIWRKY39, i quali presentano le dimensioni attese, 200 bp, al compararli con il marcatore di peso molecolare di 100 pb.

5.4. Materiali

5.4.1. Preparazione di materiale vegetale.

Si è iniziato con l'acquisto di semi di pomodoro del genere *Lycopersicum* specie *esculentum* ibrido *Nemo-netta* F1 e tabacco, successivamente i semi sono stati lasciati sommersi in un bicchiere d'acqua per 12 ore a una temperatura di 20 °C, si produce un rapido assorbimento di H₂O da parte del seme. I semi sono stati poi lasciati su una carta filtro a riposo prima della semina, che è avvenuta negli alveoli di un vassoio da 20 x 10 alveoli, con un volume di 2-3 cm³ di substrato. Si lasciano germinare i semi in una camera di crescita a una temperatura di 17-18 °C con un'umidità dell'80% per 4 giorni senza luce, tempo in cui si nota la fuoriuscita dell'epicotile dal substrato, per poi procedere a trasferirlo in un'altra stanza di crescita con condizioni uguali alla prima stanza con la differenza che in questa i germogli si sottomettono a periodi di 12 ore di luce al giorno, per tre settimane per procedere a trapiantare in un recipiente di 1000 cm³ di substrato e lasciare per due mesi nella stanza somministrando acqua tre volte a settimana. Sono state ottenute circa 180 piante per vassoio.

5.4.2. Sostanze utilizzate

5.4.2.1. Acqua attivata (AEA)

Si ottiene attraverso l'elettrolisi di una soluzione di KCl che ha una concentrazione uguale a 5g/L e un pH iniziale di 3,5 (approssimato per aggiunta di HCl). L'elettrolisi è stata portata a termine in un cilindro da 1 litro, inserendo un reattore elettrochimico indiviso (senza diaframma) equipaggiato con due elettrodi, anche questi cilindrici e concentrici: il catodo (elettrodo collegato alla polarità negativa del generatore) è l'esterno dell'elettrodo, ed è di titanio; l'anodo (elettrodo collegato alla polarità positiva del generatore) è disposto all'interno, in una posizione concentrica, ed è ugualmente fatto di titanio, ma si caratterizza per la presenza di una pellicola "attiva" a base di ossidi di iridio e stagno. La soluzione ottenuta come risultato di un'elettrolisi di 1 ora, con una differenza di potenziale di 12 V, presenta un titolo in cloro attivo uguale ad approssimativamente 800 ppm, e un pH debolmente alcalino

(all'incirca 9, che si usa come tale per le prove con AEA a pH 9). Con il fine di operare con una soluzione a pH approssimativamente neutro, il pH è stato acidificato mediante l'aggiunta di piccole quantità di HCl (oppure acido acetico o fosfato acido di potassio) per ottenere un pH di 6,5 (questo è il pH utilizzato per le prove con AEA a pH 6,5).

5.4.2.2. Ipoclorito di Sodio

Si compone di una soluzione di NaClO (5g/l), si aggiusta il suo pH a 6,5 o a 9, ed appena prima dell'uso viene diluito in modo simile AEA per ottenere una concentrazione di cloro libero richiesta di 400 ppm.

5.4.2.3. La soluzione di controllo

Si compone di una soluzione salina di KCl (5g/l) non elettrolizzata, a un pH di 6,5 o 9, che, appena prima dell'uso, si diluisce in modo simile come si fa per l'AEA

5.4.2.4. Estratto di Coda di Cavallo

L'Estratto di Equiseto, o di Coda di Cavallo, è ottenuto dalla pianta erbacea ***Equisetum arvense L.***, della famiglia delle Equisenacee.

Ottenuta la pianta si procede a tagliare le foglie in piccoli pezzi con l'aiuto di una forbice. Una volta pronte le foglie si collocano in un recipiente e si aggiunge acqua fino a coprirle totalmente. Il contenitore viene chiuso e collocato in un luogo fresco per 12 ore approssimativamente, affinché le foglie rilascino le proprie sostanze nell'acqua.

Al termine di questo periodo si procede a scaldare questa miscela per 10-15 minuti a fuoco basso, dopo di che si lascia a riposo fino raffreddamento; alla fine di questo periodo si procede a setacciare il liquido (separarlo dal solido), questo liquido sarà pronto per essere applicato sulle piante. Una caratteristica di questo composto è il suo odore gradevole ed il suo colore caramello.

Successivamente si realizza una soluzione di 1/3, ossia una tazza di liquido di coda di cavallo per ogni 3 tazze d'acqua.

5.5. Il trattamento con le sostanze

Per ogni pianta trattata con AEA o qualsiasi altra delle sostanze da testare, è necessario un trattamento di controllo. Le soluzioni si spruzzano direttamente sulle foglie delle piante in questione, fino ad umidificarle completamente.

5.6. Obiettivo della ricerca

Dopo numerose prove sul campo, in cui è stata applicata acqua attivata AEA alle piante di pomodoro, è stato osservato che le piante trattate con AEA sembrano manifestare un benessere maggiore. E' plausibile che la AEA stia agendo direttamente sulle piante, e non solo sui patogeni, e così, pertanto, si è stabilito l'obiettivo di approfondire l'influenza dal punto di vista cellulare e molecolare. Per questo proposito, lo studio si è svolto su una pianta modello come la *Nicotiana tabacum*, e su pomodoro *Lycopersicum esculentum* che hanno disponibile l'informazione tanto dal punto di vista fisiologico quanto da quello di genetica molecolare. Inoltre, queste piante sono di facile gestione in condizioni di crescita controllata, come in laboratorio o stanza di crescita.

La ricerca si è svolta attraverso una sequenza di passi:

- Prove per la determinazione dei profili di espressione genica ottenuti dopo aver trattato le piante con AEA;
- Prove con sostanze ottenute da processi elettrochimici con tre valori di pH, per valutare come il "fattore di pH" influenzi l'efficacia del trattamento nella pianta.
- Prove con altre sostanze per determinare se i profili di espressione genica ottenuti sono uguali alle applicazioni delle sostanze ottenute dai processi elettrochimici

5.7. Risultati

I risultati delle prove molecolari di PCR in tempo reale e di successiva quantificazione relativa vengono espressi come "**Fold change**" ed indicano di quante volte il gene di interesse (ad esempio PR1) risulta più espresso nel

tessuto trattato con AEA (o altre sostanze) rispetto al tessuto di controllo. Questi valori si ottengono mediante l'uso di algoritmi complessi che servono per normalizzare le concentrazioni di acidi nucleici usati nelle prove di espressione genica (14), e per la normalizzazione dei dati ottenuti a partire da diverse prove biologiche (15).

5.7.1. Risultati di attivazione genica dopo trattamento con AEA a pH 6,5 su piante di tabacco

Le piante di tabacco che hanno un'età approssimativamente di 2 mesi sono state trattate con AEA che contiene 250 mg/l (ppm) di cloro attivo a pH 6,5, e con la soluzione di controllo di KCl, non elettrolizzata, sempre a pH 6,5. Dopo il trattamento si è proceduto a prelevare campioni a 6 e a 24 ore.

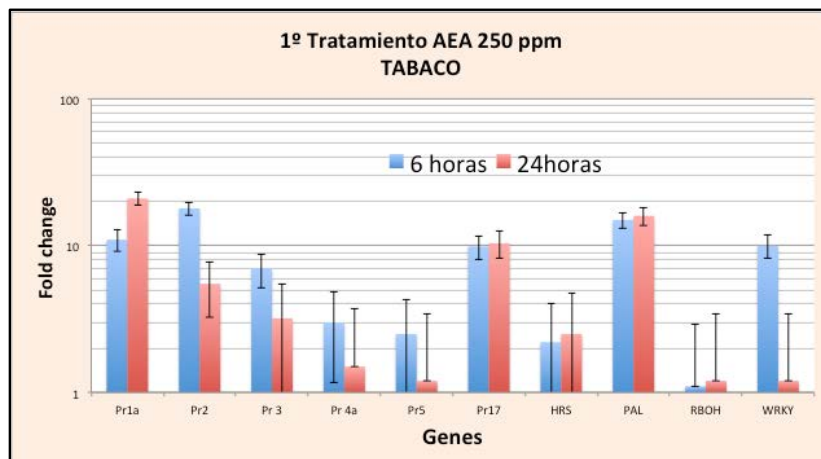


Figura 3. Livelli di espressione genica a 6 e 24 ore dal trattamento con AEA a 250 ppm. Fonte: Elaborazione propria.

La Figura N°3 mostra che un primo trattamento con AEA di 250 ppm è in grado di aumentare rapidamente le quantità di mRNA relativo ai geni che codificano per le proteine legate alla patogenesi, quali PR-1a, PR-2 (glucanasi), PR-3 (chitinasi), PR-4, PR-5 e PR-17, così come quelle relazionate con i geni PAL, HRS e WRKY, legati ad altre attività associate alla resistenza ai patogeni.

Le stesse piante sono state trattate di nuovo dopo 14 giorni (Figura 4), anche in questo caso, l'attivazione di geni è stata valutata 6 e 24 h dopo il trattamento.

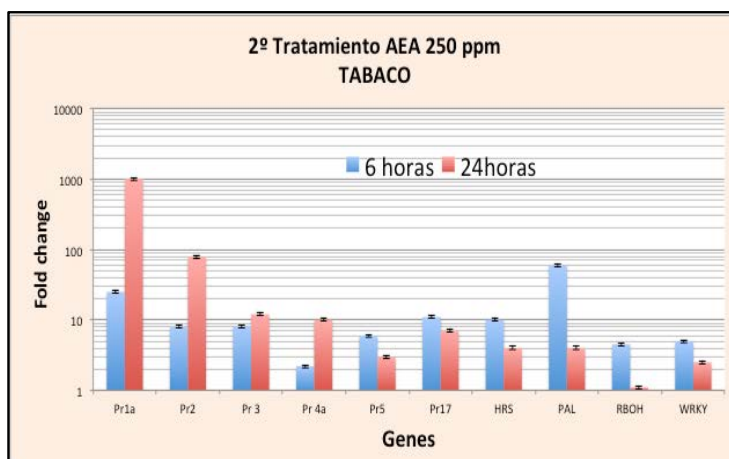


Figura 4. Livelli di espressione genica a 6 e 24 ore dal 2º trattamento con AEA a 250 ppm (14 giorni)
Fonte: Elaborazione Propria

L'applicazione di AEA induce quindi l'attivazione di numerosi geni di difesa sia proteine PR che altre proteine difensive. In particolare, il secondo trattamento è caratterizzato da un picco di attivazione dopo 24 ore: la PR-1 (proteina di difesa dipendente dall'acido salicilico) si esprime 1000 volte in più rispetto al proprio controllo. Questo effetto di potenziamento sembra indicare che la AEA è in grado di provocare un aumento nella produzione endogena di acido salicilico della pianta.

È stato realizzato anche un secondo trattamento ad una distanza temporale maggiore rispetto alla prima, e precisamente 35 giorni dopo il primo trattamento: in questo caso, l'espressione genica è stata investigata 24 e 48 ore dopo l'applicazione delle soluzioni.

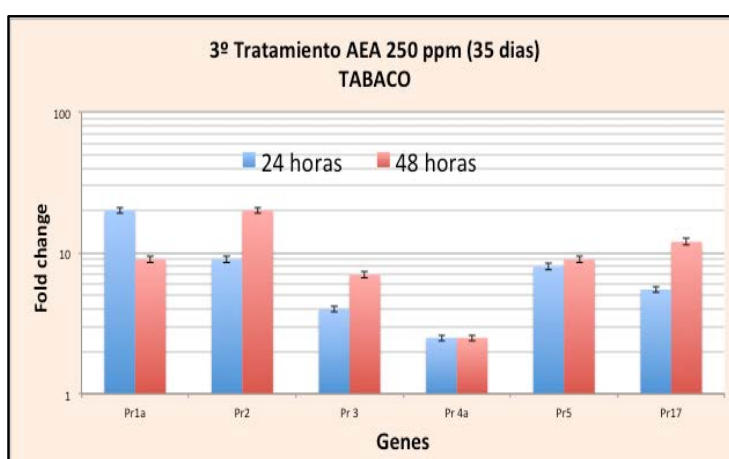


Figura 4. Livelli di espressione genica a 24 e 48 ore dal 2º trattamento di AEA a 250 ppm (35 giorni).
Fonte: Elaborazione Propria

Come si osserva nella Figura 4, un secondo trattamento 35 giorni dopo il primo determina un aumento nella trascrizione genica ristretto solo alla famiglia di proteine PR: i geni non presenti nel grafico (HSR, PAL, RbOH e WRKY) non mostrano una modulazione significativa. Confrontato con l'induzione di geni provocata dal trattamento dopo 14 giorni, il secondo trattamento dopo 35 giorni sembra essere meno potente, tuttavia, l'effetto induttivo resta comunque significativo. Questo suggerisce l'esistenza di una specie di "effetto memoria", in modo tale che la pianta "ricorda" di essere stata trattata con AEA: ripetizione di trattamenti rafforzano l'espressione dei geni di difesa nelle piante.

5.7.2. Risultati di attivazione genica dopo trattamento con AEA a pH 6,5 su piante di Pomodoro

Le piante di Pomodoro, aventi un'età di circa 2 mesi, sono state trattate con AEA che contiene 250 mg/l (ppm) di cloro attivo a pH 6,5, e con la soluzione di controllo di KCl, non elettrolizzata, sempre a pH 6,5. Dopo il trattamento si è proceduto a prelevare campioni a 6, 18 e 24 ore.

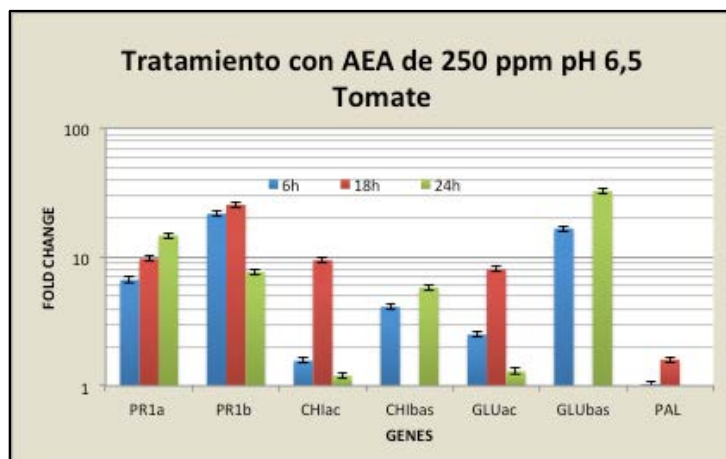


Figura 5 Livelli di espressione genica a 6, 18 e 24 ore dal trattamento con AEA a 250 ppm e pH 6,5.
Fonte: Elaborazione Propria

La figura 5 mostra come un primo trattamento con AEA con 250 ppm su piante di pomodoro è in grado di aumentare rapidamente le quantità di mRNA corrispondenti ai geni che codificano per le proteine PR-1a, PR-1b, CHIac, CHIbas, GLUac, GLUbas e PAL, legato ad altre attività di resistenza ai patogeni.

La figura 6 mostra come un primo trattamento con AEA a 500 ppm con un pH 6,5 su piante di pomodoro non induce una maggiore espressione dei geni di difesa rispetto a quella ottenuta con AEA a 250ppm.

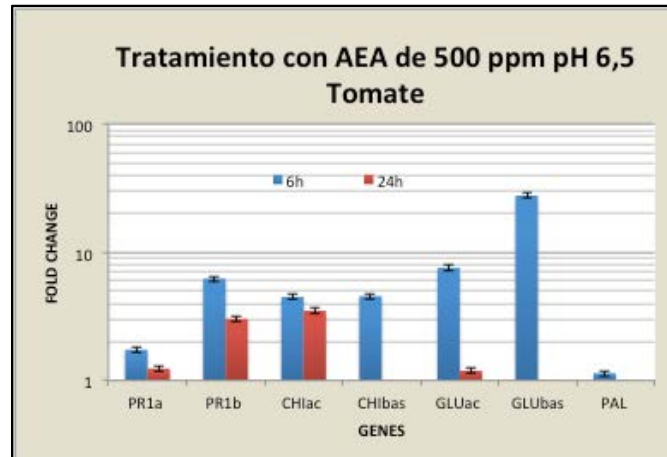


Figura 6. Livelli di espressione genica a 6 e 24 ore dal trattamento con AEA a 500 ppm e pH 6,5.
Fonte: Elaborazione Propria

La figura 7 mostra invece come un primo trattamento con AEA di 250 ppm con pH 9 su piante di pomodoro è in grado di aumentare rapidamente la quantità di mRNA dei geni legati patogenesi, PR-1a, PR-1b, CHlac, CHibas, mentre non induce l'attivazione di GLUac, GLUbas e PAL. Questo trattamento risulta quindi meno efficace se confrontato al trattamento di AEA di 250 ppm con un pH di 6,5.

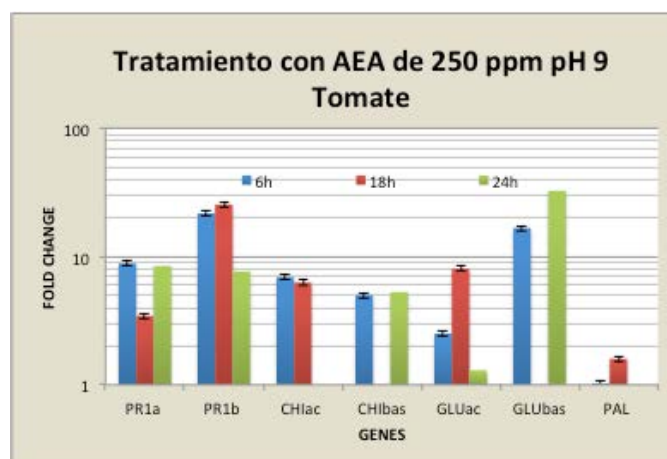


Figura 7. Livelli di espressione genica a 6, 18 e 24 ore dal trattamento con AEA a 250 ppm e pH 9.
Fonte: Elaborazione Propria

Analogamente, la figura 8 mostra come un trattamento con AEA a 500 ppm ed un pH 9 su piante di pomodoro non sia in grado di aumentare in modo

significativo la quantità di mRNA dei geni che codificano per le proteine legate alla patogenesi.

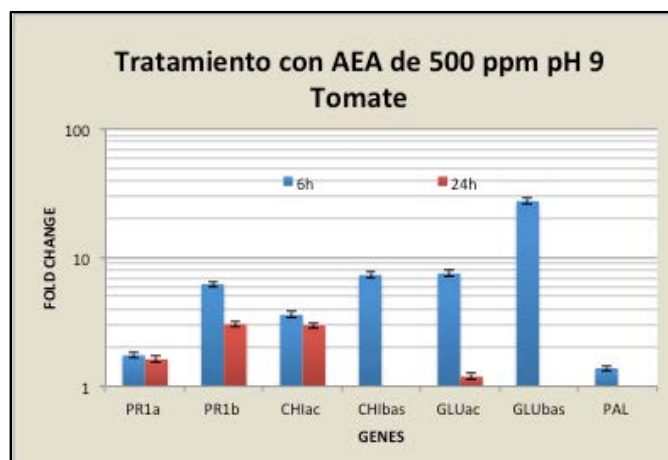


Figura 8. Livelli di espressione genica a 6 e 24 ore dal trattamento con AEA a 500 ppm e pH 9. Fonte: Elaborazione Propria

5.7.3. Risultati di attivazione genica dopo trattamento con ipoclorito di sodio a 400 ppm e pH 6,5 su piante di Pomodoro

È stato anche svolto un trattamento con ipoclorito di sodio a 400 ppm di cloro libero ed un pH di 6,5 (aggiustato con acido cloridrico). Questi valori sono stati scelti sulla base dei migliori risultati ottenuti in campo; le prove molecolari servivano per stabilire se il comportamento di questa soluzione è simile a quello dell'AEA.

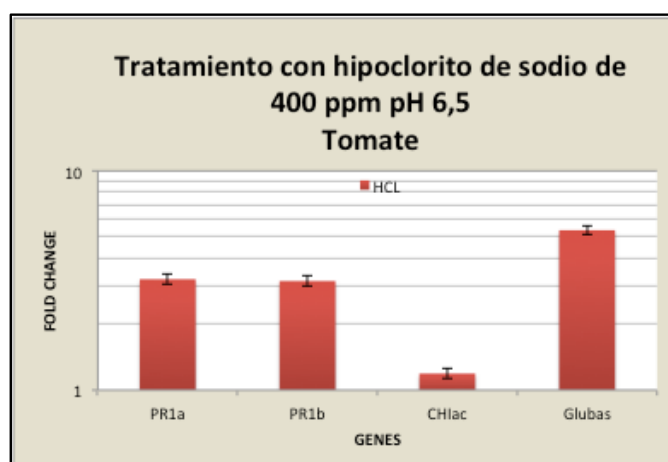


Figura 9. Livelli di espressione genica a 24 ore dal trattamento con ipoclorito di sodio a 400 ppm e pH 6,5. Fonte: Elaborazione Propria

La figura 9 mostra come un trattamento con ipoclorito di sodio a 400 ppm con pH 6,5 su piante di pomodoro sia in grado di stimolare in modo molto modesto

la trascrizione dei geni che codificano per le proteine PR-1a, PR-1b, CHIac e GLUbas.

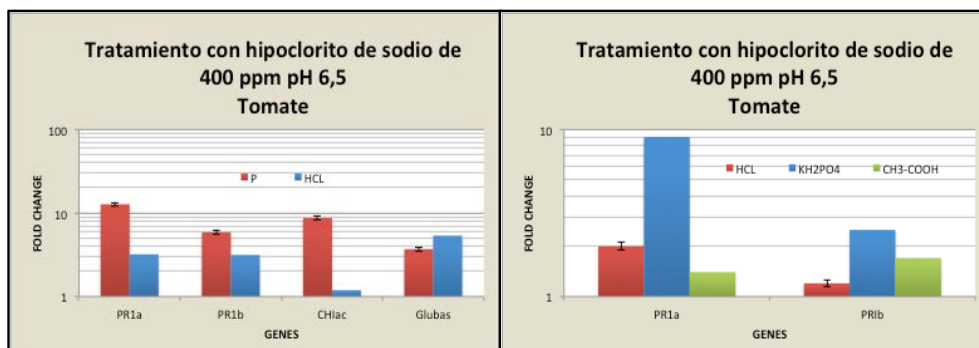


Figura 10. Livelli di espressione genica a 24 ore dal trattamento con ipoclorito di sodio a 400 ppm e pH 6,5 aggiustato con KH₂PO₄, HCl o CH₃COOH. Fonte: Elaborazione Propria

Nella figura 10 notiamo come l'acido usato per regolare il pH della soluzione di ipoclorito di sodio sia importante nell'attivazione genica. Il Fosfato diacido di potassio incrementa maggiormente la quantità di mRNA dei geni che codificano per le proteine PR-1a, PR-1b, rispetto alla soluzione di ipoclorito di sodio con pH regolato con HCl.

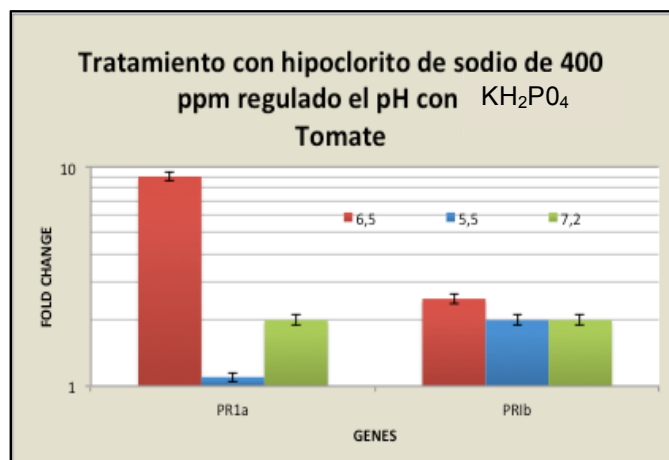


Figura 11. Livelli di espressione genica 24 ore dal trattamento con ipoclorito di sodio a 400 ppm con 3 pH differenti regolati con KH₂PO₄. Fonte: Elaborazione Propria

La figura 11 stabilisce inoltre che la soluzione di ipoclorito di sodio con un pH di 6,5 regolato con il KH₂PO₄ attiva l'espressione genica in proporzione maggiore rispetto alle soluzioni con pH 7,2 e 5,5.

5.7.4. Risultati di attivazione genica dopo il trattamento con altre sostanze su piante di Pomodoro

Nel trattamento 1 (figura 12) piante di pomodoro sono state spruzzate con una soluzione acquosa dell'estratto della pianta *Equisetum arvense*, coda di cavallo (T1). 24 ore dopo il trattamento si osserva l'attivazione dei geni PR1a e PR1b. Per quest'analisi sono stati considerati anche i geni WRKY di pomodoro, in particolare i geni WRKY 8, 23 e 39, noti come regolatori trascrizionali delle difese endogene in pomodoro. Nelle piante trattate con l'estratto di Equiseto non si nota un'attivazione significativa 24 ore dopo il trattamento, 48 ore dopo il trattamento si osserva che l'attivazione dei geni PR1b diminuisce, ma quella dei geni WRKY 8 e WRKY 23 cresce.

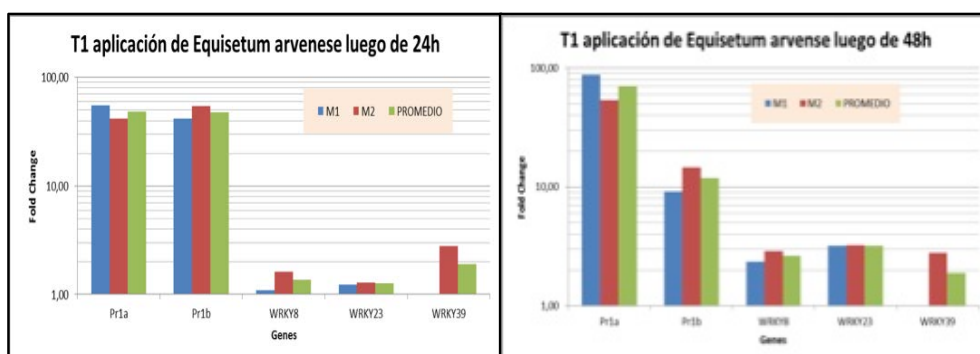


Figura 12 . Analisi dell'espressione dei geni PR1a, PR1b, SIWRKY8, SIWRKY23 e SIWRKY39, a 24 e 48 ore dall'applicazione di una soluzione che contiene estratto della pianta *Equisetum arvense*

Gli stessi geni sono stati anche valutati in piante di pomodoro trattate con ipoclorito di sodio a 400 ppm e a pH 6,5 (T2). 24 e 48 ore dopo questo trattamento (figura 13) non si nota un'attivazione considerevole dei geni WRKY, mentre i geni PR1a e PR1b rispondono molto bene, come già evidenziato in precedenza



Figura 1. Analisi dell'espressione dei geni PR1a, PR1b, SIWRKY8, SIWRKY23 e SIWRKY39, a 24 e 48 ore dall'applicazione di una soluzione di NaClO a 400 ppm di cloro e pH 6.5.

Analogamente l'analisi è stata svolta su piante trattate con una soluzione che contiene il fungicida Myclobutanil (T3) 24 e 48 ore dopo questo trattamento

non si nota un'attivazione considerabile dei geni WRKY, mentre i geni PR1a e PR1b rispondono molto bene ma solo nel campione prelevato a 48 ore dal trattamento.

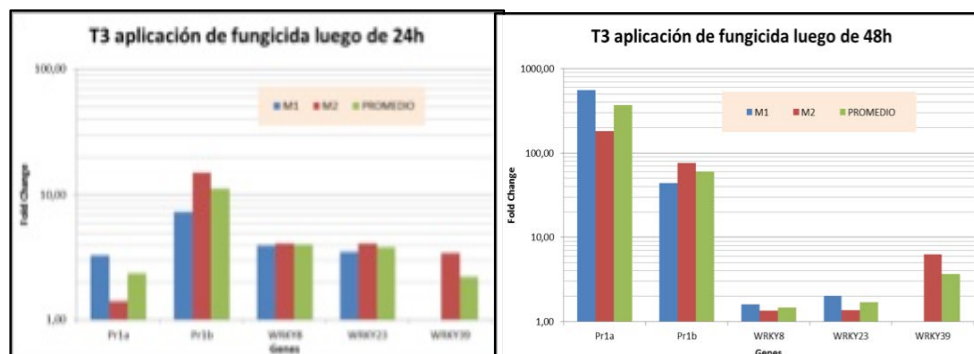


Figura 2. Analisi dell'espressione dei geni PR1a, PR1b, SIWRKY8, SIWRKY23 e SIWRKY39, a 24 e 48 ore dall'applicazione di una soluzione che contiene il fungicida Myclobutanyl

Dopo aver analizzato i risultati sorgono una serie di domande, tra queste, se i tre trattamenti applicati stanno attivando allo stesso modo e quale dei trattamenti genera una maggiore attivazione. Per ottenere un risultato statistico è stato applicato un disegno sperimentale completamente a caso con un fattore e tre livelli con una replica. Nel caso del gene PR1a a 48 ore, i trattamenti T1, T2 e T3 appaiono altamente significativi per avere un valore di p di 0.04 comparato con il valore di alfa di 0.05, di conseguenza si può concludere che i tre trattamenti originano un'attivazione genica differente. Per determinare quale è quello che presenta una maggiore attivazione è stata utilizzata la prova di Tukey con il 95% di probabilità, ottenendo che il T2 con il T3 sono completamente diversi: il T2 produce la maggiore attivazione mentre il T3 sembra simile al T1. Da quanto esposto si determina che il T2 è quello che attiva di più i geni PR1a.

Nel caso del gene PR1b (48 ore), è stata applicata la stessa analisi statistica del caso precedente, ottenendo un valore di p di 0,042 da compararsi con un valore di alfa di 0.05: esiste dunque una differenza significativa tra i tre trattamenti. La prova di Tukey ha determinato che il T3 è maggiore di T2 e che questo è simile a T1, ossia, il T3 attiva di più il Pr1b, come si nota nel figura 15. Per il gene WRKY 8, secondo il disegno statistico, otteniamo un valore di p di 0,06 che è maggiore del valore di alfa (pari a 0,05) per cui i trattamenti non appaiono significativamente diversi, avendo statisticamente un comportamento simile.

E' stata realizzata un'analisi simile alle precedenti anche per i geni WRKY23 e 39: i valori di p sono risultati pari a 0,197 e 0,739, rispettivamente, per cui i trattamenti non appaiono significativamente differenti tra loro.

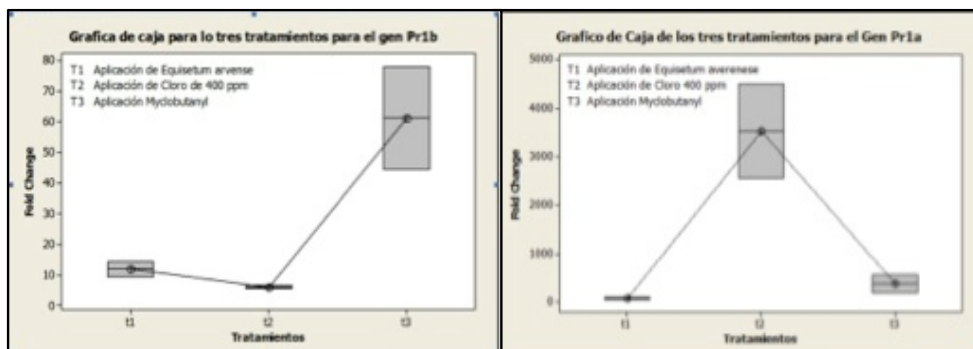


Figura 3. Grafica a box dell'espressione dei geni PR1a, PR1b per i tre trattamenti applicati alle piante di pomodoro alle 48 ore.

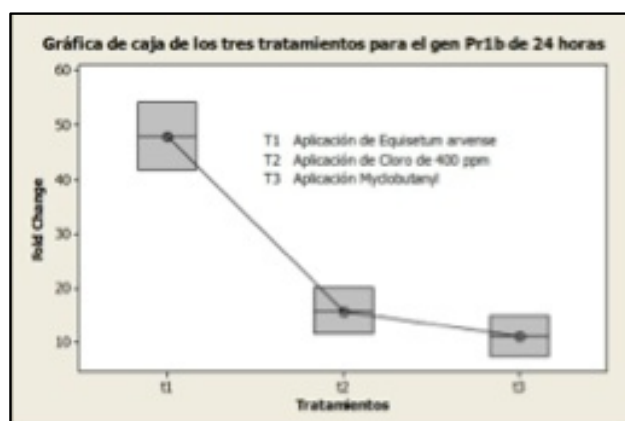


Figura 4 Grafica a box dell'espressione dei geni PR1b a distanza di 24 ore dall'applicazione, per i tre diversi trattamenti

Nel caso del gene PR1b (24 ore), è stata applicata la stessa analisi statistica del caso precedente, ottenendo un valore di p di 0,032 da compararsi con un valore di alfa di 0.05: esiste dunque una differenza significativa tra i tre trattamenti. La prova di Tukey ha determinato che il T1 è maggiore di T2 e che questo è simile a T3, ossia, il T1 attiva di più il Pr1b, come si nota nel figura 16.

5.8. Riferimenti bibliografici

- (1). AGRIOS, George N. *Fitopatologia*. México [etc.]: Limusa, 1995. ISBN 9681851846 9789681851842.
- (2). ALBA STELLA RIVEROS ANGARITA. *Inducción de resistencia en*

- plantas Interacción: Planta-Patógeno* [online]. IICA. San José : Agroamerica, 2010. ISBN 9789292481858. Available from: <http://books.google.com.ec/books?id=RyQwYtnw220C>
- (3). BUCHANAN, Bob B, GRUISSEM, Wilhenelm and JONES, Russell. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville, Md : American Society of Plant Physiologists, 2009. ISBN 9780943088396 0943088399 0943088372 9780943088372.
- (4). DU, Liqun, ALI, Gul S., SIMONS, Kayla A., HOU, Jingguo, YANG, Tianbao, REDDY, A. S. N. and POOVAIAH, B. W. Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature*. 26 February 2009. Vol. 457, no. 7233, p. 1154–1158. DOI 10.1038/nature07612.
- (5). VAN LOON, L.C. and VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. “Samsun” and “Samsun NN”: II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*. February 1970. Vol. 40, no. 2, p. 199–211. DOI 10.1016/0042-6822(70)90395-8.
- (6). VAN LOON, L. C. and VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1999. Vol. 55, no. 2, p. 85–97.
- (7). ZHAO MINGYU. WRKY transcription factor superfamily: Structure, origin and functions. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* [online]. 19 April 2012. Vol. 11, no. 32. [Accessed 30 December 2013]. DOI 10.5897/AJB11.549. Available from: <http://www.academicjournals.org/ajb/abstracts/abs2012/19Apr/Mingyu%20et%20al.htm>
- (8). HUANG, Shengxiong, GAO, Yongfeng, LIU, Jikai, PENG, Xiaoli, NIU, Xiangli, FEI, Zhangjun, CAO, Shuqing and LIU, Yongsheng. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*. *Molecular Genetics and Genomics*. 9 May 2012. Vol. 287, no. 6, p. 495–513. DOI 10.1007/s00438-012-0696-6.
- (9). NAN REN and MICHAEL P. TIMKO. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome* [online]. August 2001. Vol. 44, no. 559. [Accessed 31 December 2013]. Available from:

- <http://bibliotecavirtual.ups.edu.ec:2149/media/pq/classic/doc/79822379/fmt/pi/rep/NONE?hl=aflp%2Caflp%2Canalyses%2Canalysis%2Canalyses%2Canalysis>
- (10). BERG, Jeremy M, TYMOCZKO, John L and STRYER, Lubert. *Bioquímica*. Sexta. Barcelona [etc.]: Reverté, 2008. ISBN 9788429176001 8429176004.
- (11). INVITROGEN. *Qubit 2.0 Fluorometer* [online]. October 2010. [Accessed 27 December 2013]. Available from: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp32866.pdf>
- (12). INVITROGEN. *Deoxyribonuclease I, Amplification Grande* [online]. [Accessed 27 December 2013]. Available from: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/18068015.pdf>
- (13). ROCHE APPLIED SCIENCE. *FastStart Essential DNA Green Master* [online]. June 2011. [Accessed 27 December 2013]. Available from: https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/06402712001_en_04.pdf
- (14). VANDESOMPELE, Jo, DE PRETER, Katleen, PATTYN, Filip, POPPE, Bruce, VAN ROY, Nadine, DE PAEPE, Anne and SPELEMAN, Frank. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 2002. Vol. 3, no. 7, p. 34.
- (15). HOOGEWIJS, David, HOUTHOOFD, Koen, MATTHIJSENS, Filip, VANDESOMPELE, Jo and VANFLETEREN, Jacques R. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in *C. elegans*. *BMC Molecular Biology*. 2008. Vol. 9, no. 1, p. 9. DOI 10.1186/1471-2199-9-9

CAPITULO Nº 6.

APPLICAZIONE DI ACQUA ATTIVATA PER IL CONTROLLO DI OIDIO (*Leveillula taúrica*) NELLA COLTIVAZIONE DI POMODORO DA TAVOLA (*Lycopersicum esculentum*) IBRIDO NEMO NETTA

6..1. Caratteristiche della pianta di pomodoro

Il pomodoro è una pianta perenne di dimensioni arbustive e può svilupparsi in maniera strisciante, semi-eretta o eretta, si presenta in due varietà, quella con crescita limitata determinata e quella con crescita illimitata indeterminata. In merito al sistema radicale dispone di una radice principale che è corta e debole, radici secondarie che sono numerose e potenti e radici avventizie. Il fusto è un'asse con uno spessore che oscilla tra i 2 e i 4 cm alla base, sul quale vanno crescendo foglie, fusti secondari ed infiorescenze. Le sue foglie sono composte ed imparipinnate, con foglioline picciolate, lobulate e con bordo dentato, in numero da 7 a 9 e ricoperte di peli glandulari e dispongono di forma alternativa sul fusto. Il fiore è perfetto, regolare ed ipogino e consta di 5 o più sepal, di uno stesso numero di petali di colore giallo, disposti a forma elicoidale a intervalli di 135°, di uno stesso numero di stami saldati che si alternano ai petali e formano un cono staminale che avvolge il gineceo, e di un ovaio bi o pluriloculare. I fiori si raggruppano in infiorescenze di tipo racimoso (dicasio), generalmente in numero da 3 a 10.

Il frutto pluriloculare raggiunge pesi che oscillano tra pochi milligrammi e i 600 grammi, contiene il 94% di acqua, 3% di carboidrati, 1% di proteine, potassio 258mg/100g, fosforo 24mg/100g. Mentre i semi sono piccoli piani, giallastri-grigiastri, pelosi, imbevuti di una sostanza gelatinosa (1).

6..2. Effetto delle pratiche culturali e dei metodi di controllo

Molte attività dell'uomo hanno un effetto diretto o indiretto sulle malattie delle piante epifite, alcune delle quali favoriscono o riducono il loro tasso di frequenza. Fattori importanti sono la selezione e la preparazione del sito, la selezione del materiale di propagazione, le pratiche agricole e le misure di controllo (2).

6..3. Necessità edafoclimatiche

La gestione razionale dei fattori climatici in maniera unitaria è fondamentale per il funzionamento adeguato della coltivazione, visto che tutti i fattori sono strettamente relazionati e l'intervento su uno di questi incide sugli altri (4).

6..3.1. Temperatura

La temperatura ideale di sviluppo oscilla tra 20 e 30 °C durante il giorno e tra 10 e 17 °C durante la notte; temperature superiori ai 30-35 °C incidono sulla fruttificazione, sviluppo degli ovuli e lo sviluppo della pianta in generale. Temperature inferiori a 12-15 °C originano anche problemi nello sviluppo della pianta.

6..3.2. Umidità

L'umidità relativa ideale oscilla tra il 60 e l'80%. Umidità relative molto alte favoriscono lo sviluppo di malattie aeree e la screpolatura del frutto e rendono difficile la fecondazione. Anche un'umidità relativa bassa rende difficile il fissaggio del polline allo stigma del fiore.

6..3.3. Luce

L'illuminazione inadeguata della pianta ritarda la sintesi della clorofilla e determina uno sviluppo scarso. Nei momenti critici durante il periodo vegetativo risulta cruciale l'interrelazione esistente tra la temperatura diurna e notturna e l'illuminazione.

6..3.4. Suolo

Molto spesso i suoli contengono quantità eccessive di alcuni elementi essenziali o non essenziali, i quali ad alte concentrazioni sono pregiudiziali per le piante. La pianta di pomodoro non è molto esigente in quanto a suoli, a eccezione del drenaggio, preferisce comunque suoli sciolti di tessitura siliceo-argillosa e ricchi in materia organica. Nonostante ciò si sviluppa perfettamente anche in suoli argillosi insabbiati.

In quanto al pH, i suoli possono essere da leggermente acidi fino a leggermente alcalini quando sono sabbiosi. È la specie coltivata in serra che tollera meglio le condizioni di salinità tanto del suolo come dell'acqua di irrigazione.

6..3.5. Valutazione delle malattie delle piante

Nel valutare le malattie, l'interesse si concentra su:

- Incidenza della malattia: il numero o la porzione di piante, foglie, fusti e frutti che mostrano qualsiasi tipo di sintomo
- Severità della malattia: la porzione dell'area o quantità di tessuti ammalati della pianta
- Perdite di produzione.

La valutazione dell'incidenza della malattia è relativamente veloce e di facile realizzazione, ed è il mezzo più utilizzato negli studi epifitologici per determinare la presenza di una malattia in un campo coltivato.

La severità della malattia generalmente si esprime come la percentuale o porzione dell'area della pianta o volume del frutto, distrutto da un patogeno. Si usano di solito scale da 0 a 10 per esprimere le porzioni relative del tessuto colpito in un determinato periodo. Le perdite di produzione dovute a malattie si calcolano in termini di ritardi nella crescita di una coltivazione, o anche misurando l'area sotto la curva di sviluppo della malattia.

6..3.6. Applicazioni al fogliame

I composti chimici che si applicano nebulizzati o sotto forma di polveri sul fogliame delle piante si usano per controllare le malattie fungine e, in minor grado, per controllare le malattie batteriche. La maggior parte dei fungicidi e battericidi si devono applicare sulle superfici delle piante a seconda dell'avanzata del patogeno, per prevenire in questo modo l'infezione che questo

potrebbe comportare. L'applicazione in modo nebulizzato è molto più efficace dell'applicazione con polvere.

Ai fungicidi si aggiungono di solito composti che presentano una bassa tensione superficiale per incrementare la diffusione del principio attivo e aumentare quindi la zona di contatto tra il fungicida e la superficie spruzzata.

Tali composti devono essere applicati prima che il patogeno insorga, o almeno prima che abbia tempo di germinare, penetrare e stabilirsi nella pianta. L'intervallo di tempo compreso tra i trattamenti può variare da 7 a 14 giorni o più, dipendendo dalla malattia, la frequenza e durata delle piogge e delle stagioni dell'anno.

6..4. Caratteristiche dei funghi fitopatogeni

La maggior parte dei funghi hanno una forma vegetativa composta di filamenti microscopici più o meno allungati e ramificati che hanno pareti cellulari definite. Ogni ifa o micelio può avere uno spessore uniforme o può terminare in porzioni più strette o più larghe.

In certi funghi, il micelio è costituito da cellule che contengono uno o due nuclei per cellula e in altre il micelio è cenocitico.

Alcuni tra i funghi inferiori non possiedono un vero micelio e producono un plasmodio multinucleato o un sistema di filamenti di diametro differente e che variano costantemente denominato (2).

6..5. Sintomi che producono i funghi nelle piante

I sintomi che i funghi fitopatogeni producono nei loro ospiti sono di tipo locale o generale e possono comparire separatamente in ospiti distinti o apparire uno dopo l'altro in uno stesso ospite. In generale, i funghi producono una necrosi locale o generale o la morte dei tessuti vegetali infettati, ipertrofia ipoplasia o atrofia di piante complete o dei loro organi, e iperplasia o crescita eccessiva di queste o di alcuni dei loro organi (5).

I sintomi necrotici più comuni sono i seguenti:

- Macchie fogliari

- Cancro
- Marciume della radice
- Marciume basale del fusto
- Marciume blando o secco
- Scabbia

I sintomi che si associano all'ipertrofia o iperplasia e distorsione degli organi delle piante includono:

- Ernia delle radici

Oltre ai sintomi menzionati, si possono aggiungere altri gruppi di sintomi:

- Marciume
- Maculatura

6..6. Isolamento dei funghi

La maggior parte delle malattie delle piante si possono diagnosticare semplicemente osservandole o mediante il microscopio, cosa che rende non necessario l'isolamento del patogeno. Ma ci sono molte malattie in cui è impossibile identificare il patogeno che si può trovare mescolato con uno o più contaminanti oppure perché non si è sviluppato ancora e questo deve essere isolato ed identificato. Inizialmente dobbiamo prepararci per l'isolamento realizzando il seguente procedimento:

- Sterilizzazione del materiale
- Preparazione di soluzioni per trattare la superficie del tessuto infettato
- Preparazione di mezzi di coltivazione

Nel caso in cui l'infezione delle foglie di una pianta avanzi sotto forma di tizzone o macchia fogliare fungosa si procede secondo questo schema:

- Si realizzano tagli ai bordi della lesione e si collocano i pezzetti di foglia in una soluzione di cloro al 10 % a tempi diversi
- Si procede a trasferire i campioni con pinze sterili su fogli di carta sterili
- Si lascia riposare alcuni minuti sulla carta da filtro per eliminare l'eccesso di cloro
- Successivamente si procede a trasferire i campioni di foglia in una Petri contenente un mezzo di coltivazione

- Attorno al pezzetto di foglia si svilupperà una colonia fungina
- Per ottenere una coltivazione pura del patogeno si procede alla risemina di una porzione della colonia in un'altra piastra che contenga il mezzo di coltivazione (5).

6..7. Oidium

Nelle coltivazioni di pomodoro si presentano tre tipi:

- *Leveillula taurica*

Sotto il nome di *Leveillula taurica* si nasconde in realtà un complesso di specie che attacca un gran numero di piante coltivate o selvatiche. Questo fungo parassita obbligatorio è molto conosciuto tra le Solanacee, specialmente nel pomodoro. Particolarmente associato alle zone calde e secche, tropicali e subtropicali, questo fungo è in realtà più ampiamente esteso nel mondo, grazie al fatto che ha esigenze termiche e idriche abbastanza ampie (4).

In funzione delle situazioni di produzione, è in grado di colpire tanto le coltivazioni all'aria aperta quanto quelle coperte. A volte provoca danni considerevoli, che riducono fortemente la capacità fotosintetica delle piante e, pertanto, il loro rendimento. Sono state segnalate diminuzioni di produzione di varie decine di punti percentuale. Si sono constatate anche ripercussioni sulla qualità dei frutti (4).

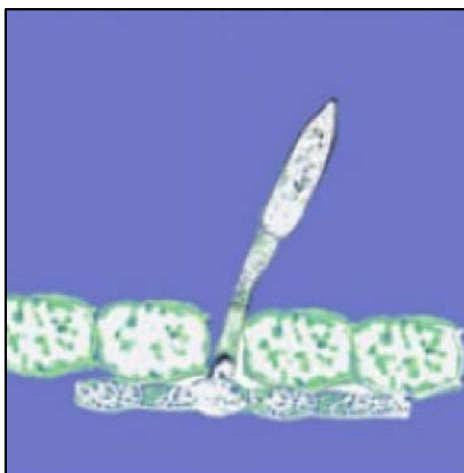


Figura 1. *Leveillula taurica*

Macchie al principio di colore verde pallido compaiono poco a poco sulla faccia superiore delle foglie di pomodoro. Queste macchie di forma arrotondata o angolare, quando i loro contorni sono delimitati dai nervi del limbo, ingialliscono inesorabilmente con il passare del tempo. Sulla faccia inferiore si osserva, in corrispondenza delle macchie, la presenza di una discreta peluria bianca che ricopre i tessuti.

- *Oidium neolycopersici*

Da due decenni, un nuovo oidio del pomodoro emerge in numerosi Paesi del mondo, provocando danni a volte considerevoli. Colpisce tanto le coltivazioni base coperte, quanto le coltivazioni all'aria aperta.

Contrariamente a *Levillula taurica*, questo oidio esterno produce immediatamente macchie polverose bianche, che coprono più la faccia superiore che quella inferiore delle foglioline del pomodoro. Questo feltro bianco è in realtà costituito da una rete miceliana che colonizza superficialmente il limbo, coronato da numerosi conidiofori che producono conidi ialini isolati o a volte in pseudo-catene da 4 a 6 spore quando l'umidità relativa è alta. Queste macchie si possono osservare anche sul fusto. I frutti non sembrano venire colpiti (4).

I tessuti infetti finiscono col diventare clorotici, imbrunire localmente e morire.

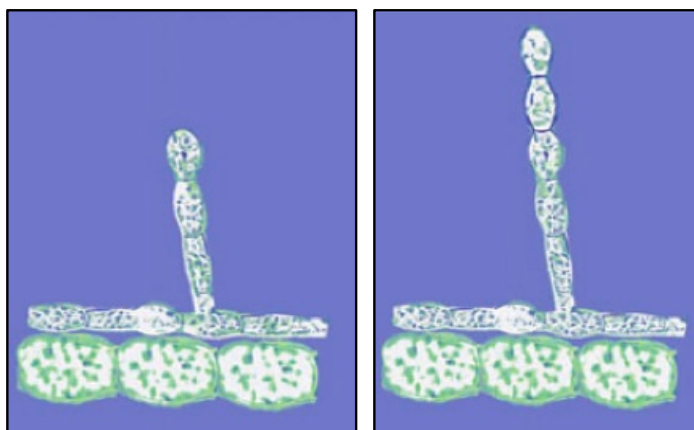


Figura 2. *Oidium neolycopersici* e *Oidium lycopersici*

- *Oidium lycopersici*

Questo fungo si trova in vari Paesi da molti anni con il nome "*Oidium lycopersicum*". Anche questo patogeno produce colonie polverose sia sulla faccia superiore sia su quella posteriore del limbo del pomodoro, così come sui

piccioli e sul calice dei frutti. Questo fungo biotrofico forma sempre conidi in catene da 3 a 5 spore.

6..8. Parte sperimentale

La sperimentazione è stata realizzata su una popolazione di 1000 piante di pomodoro da tavola varietà NEMO NETTA, distribuite nel seguente modo: 500 piante nella coltivazione in serra e 500 piante nella coltivazione all'esterno. Per rilevare l'informazione è stato considerato un campione del 20% della popolazione, ossia 200 piante. Queste sono state scelte a caso, ma distribuite equamente tra tutti i trattamenti di studio. Sono state considerate 6 piante per letto.

Il progetto è situato nella Fattoria Sperimentale Juan Lunardi dell'Università Politecnica Salesiana settore Yumacay cantone Paute provincia dell'Azuay Ecuador con coordinate 02°46'39" S - 78°45'32"W, ad un'altitudine di 2189 metri sul livello del mare, con una temperatura da 16 °C fino a 26 °C, con una piovosità annuale tra 600-800 mm e una velocità del vento media di 2 Km orari.

6..8.1. Isolamento

Per prima cosa è stato realizzato un campionamento casuale; i campioni sono stati presi da 6 file, da ogni pianta selezionata sono stati scelti tre rami e da questi tre foglie con affezioni fitopatogene. Delle foglie selezionate sono state valutate le caratteristiche e sono state scelte le più rappresentative per l'ottenimento dei microorganismi fitopatogeni, secondo la sintomatologia presentata. Sono stati realizzati tre campionamenti a distanza di una settimana l'uno dall'altro, per ottenere i microorganismi che colpiscono la pianta durante tutta la crescita.

- Semina

Successivamente, i campioni selezionati sono stati tagliati, lavati e seminati in Agar Nutritivo preparato in piastre Petri.



Figura 3. Semina di Funghi e Batteri Fonte: Elaborazione propria

Successivamente, per ottenere coltivazioni pure si è proceduto a riseminare in piastre Petri.



Figura 4. Coltivazioni pure

- Caratterizzazione dei funghi

In una piastra Petri si colloca stuzzicadenti in forma triangolare in modo tale che il porta oggetti non sia in contatto con la piastra Petri. Successivamente si colloca una goccia di agar nutritivo sul porta oggetti, quando questo si asciuga si procede a seminare il microorganismo e dopo si collocano 5 ml di acqua distillata nella piastra Petri distribuiti uniformemente. Le piastre saranno incubate in stufa ad una temperatura di 27 °C fino alla crescita dei microorganismi mediante osservazione visiva o microscopio.

Identificazione dei seguenti funghi: *Alternaria sp*, *Oidium sp*, *Verticillium sp*

- Caratterizzazione dei Batteri

Per la caratterizzazione dei Batteri è stata realizzata la Reazione di Gram per cui è stata fatta una preparazione microscopica per la tintura di Gram ed è stata osservata al microscopio la colorazione blu se Gram positivo e colorazione violetta o rosa se Gram negativo.

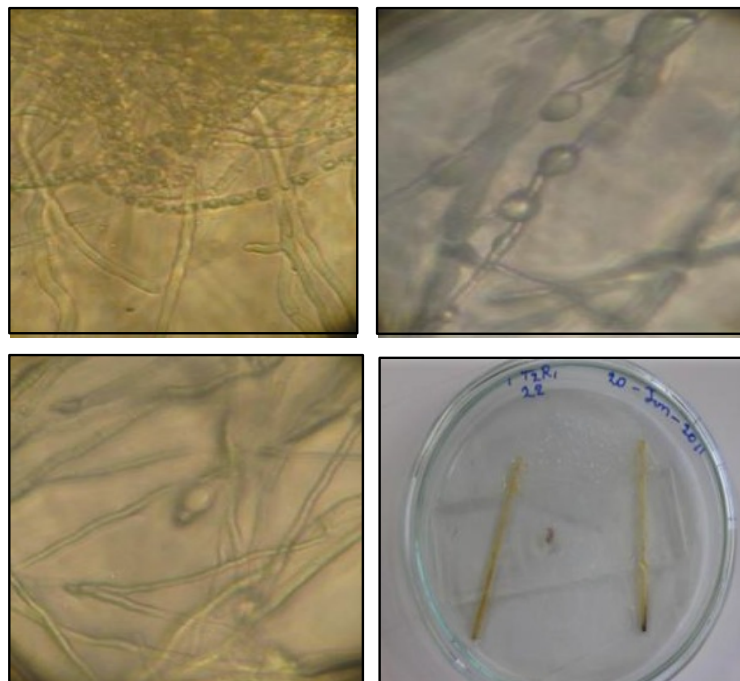


Figura 5. La caratterizzazione dei funghi

Un'altra prova che è stata realizzata è quella della formazione di spore. Il campione è stato stimolato mediante umidità e l'innalzamento della temperatura per vedere se si formano spore, la preparazione microscopica è stata poi colorata con verde di malachite al 5% ed è stata osservata al microscopio.

Si è anche proceduto a realizzare una crescita anaerobia in un incubatore anaerobio in cui si è osservato se è avvenuta o no una crescita del batterio.

Un'altra prova realizzata è la crescita in Agar YDC in cui sono stati seminati i batteri in piastre Petri ed è stata osservata la colorazione della colonia formata.

Se ha una colorazione gialla la prova è positiva.

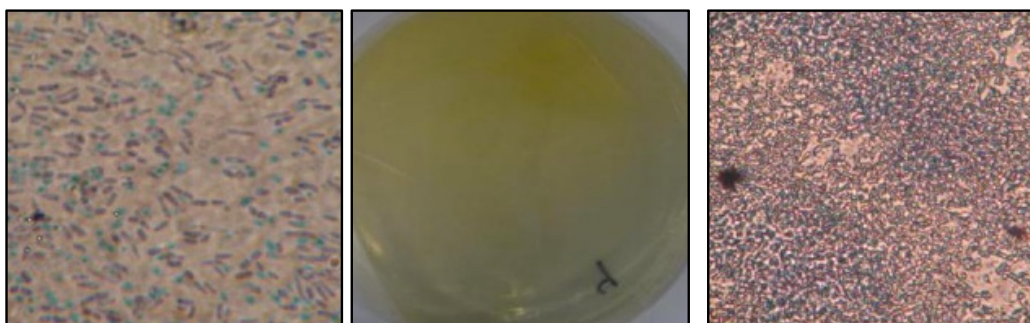


Figura 6. La caratterizzazione dei Batteri

Queste prove permettono di evidenziare la presenza di *Bacillus sp*, *Erwinia sp*, e *Pantoea*.

6.8.2. Applicazione di AEA in una coltivazione di pomodoro

6.8.2.1. Fattori di studio

- Variabile indipendente

Per il lavoro che si sta realizzando, stabiliamo come variabile indipendente l'applicazione della soluzione di AEA con quattro concentrazioni, come si descrive di seguito.

Tabella 1. Variabili Indipendenti

LIVELLI	NOME	CONCENTRAZIONI	REPLICHE
1	TRATTAMENTO 1	200 ppm AEA	4
2	TRATTAMENTO 2	400 ppm AEA	4
3	TRATTAMENTO 3	600 ppm AEA	4
4	TRATTAMENTO 4	SENZA APPLICAZIONE	4

Questi trattamenti sono stati disposti in maniera alternata nell'area sperimentale come descrive il seguente grafico.



Figura 7. Disposizione dei trattamenti nella serra e in campo aperto. Fonte: L'autore

- Variabili dipendenti

Come variabili dipendenti del nostro lavoro abbiamo:

- Altezza media delle piante (cm)
- Incidenza di oidio per trattamento (%)
- Produzione media (libbre/pianta)
- Contenuto di calcio e potasio nel frutto (mg/100g)

- Contenuto di cloro totale nel suolo

6..8.2.2. Area di lavoro

Il lavoro è stato realizzato su un'estensione di terreno di 600 m² sulla quale si è proceduto alla costruzione di una serra di 312 m² di area, con un fronte di 12 metri per 26 di lato. Con le stesse dimensioni della serra si disponeva di un'area di terreno per le coltivazioni in campo aperto.

6..8.2.3. Preparazione del terreno

È stata realizzata l'aratura meccanica a base di dischi e 15 giorni dopo è stato realizzato l'incrocio, tanto in serra come in campo aperto. Dopo 7 giorni sono stati alzati 18 letti in serra e 18 letti in campo aperto unendo 36 sacchi di letame di capra (*Capra aegagrus hircus*) in serra e 36 in campo aperto. I letti sono lunghi 10 m e larghi 0,80, e i camminamenti sono larghi 1,20 m.

Il sistema di irrigazione consiste in un tubo principale di 110 mm di diametro, si divide in due tubi secondari di 63 mm di diametro cadauno, il primo va dentro la serra e il secondo va nella coltivazione in campo aperto. A sua volta, da ognuno di questi tubi secondari, escono le canne di irrigazione per gocciolamento, che hanno un diametro di 20 mm e che sono distribuite in ognuno dei letti; due canne per ogni letto, che attraversano i letti per tutta la loro lunghezza, situate in modo parallelo ed equidistante. La distanza tra i contagocce delle canne è di 10 cm tra ogni contagocce.



Figura 8. Aree di coltivazione in serra e campo aperto. Fonte: L'autore

6..8.2.4. Semina

Durante la realizzazione del trapianto sono stati realizzati piccoli buchi lungo il letto a una distanza di 24 cm ed è stata realizzata la semina collocando le piante, compattando il suolo per avere un totale di 34 piante per letto.

In quanto all'irrigazione, è stata realizzata in una fase iniziale di 20-60 cc/giorno/pianta, nella fase di fioritura è stata di 200 cc/giorno/pianta, nella fase di allegazione di 600-800 cc/giorno/pianta e infine nella fase di fruttificazione 800-1200 cc/pianta/giorno.

In quanto al diserbo, esso è stato realizzato manualmente ogni volta che la coltivazione lo richiedeva, per mantenere in questo modo la coltivazione libera da erbacce che impediscono la crescita normale.

Il tutore è stato posto 25 giorni dopo il trapianto quando la pianta è a un'altezza di 25 a 30 cm. Per questo prima è stata legata la base della pianta più o meno alla seconda foglia e poi è stato collocato il nastro al di sopra del filo di ferro.

La potatura è stata realizzata quando i germogli ascellari (succhioni) avevano raggiunto una dimensione di circa 5 cm o quando si sono presentate foglie vecchie.

La fertilizzazione è stata realizzata con una soluzione che viene mescolata con l'acqua di irrigazione per essere poi distribuita per mezzo dei contagocce alla pianta considerando la crescita delle piante e la capienza di 36 cm³/min. È stato applicato humus liquido ogni quindici giorni nel sistema di irrigazione. Insieme al fertilizzante Kristalón nelle sue diverse presentazioni è stato applicato anche nitrato di calcio. Le fertilizzazioni sono state distribuite secondo un cronogramma stabilito.



Figura 9 Preparazione di suolo e semina. Fonte: L'autore

6..8.2.5. Preparazione dell'Acqua Attivata

L'acqua attivata si ottiene per elettrolisi di una soluzione salina di cloruro di Potassio commerciale (KCl) ad una concentrazione di 5 g/L e pH iniziale di 3,5 (regolato per aggiunta di HCl). L'elettrolisi è stata realizzata in un recipiente di plastica da 60 galloni, inserendo un reattore elettrochimico indiviso (senza diaframma) equipaggiato con due elettrodi, cilindrici e concentrici: il catodo

(elettrodo collegato al polo negativo del generatore) è l'elettrodo più esterno, ed è di titanio; l'anodo (elettrodo collegato al polo positivo del generatore) è disposto all'interno, in posizione concentrica, ed è anch'esso fatto di titanio, ma si caratterizza per la presenza di una pellicola "attiva" a base di ossidi di iridio e stagno. La soluzione ottenuta come risultato di un'elettrolisi di 17 ore, con una differenza di potenziale di 12 V, presenta un titolo in cloro attivo di circa 800 ppm, ed un pH debolmente alcalino (circa 9,). Con il fine di ottenere una soluzione a pH approssimativamente neutro, il pH è stato acidificato mediante l'aggiunta di piccole quantità di HCl (oppure acido acetico o Fosfato diacido di Potassio) per ottenere un pH di 6,5 (questo è il pH usato per le prove con AEA a pH 6,5).

L'Acqua Attivata (AEA) è stata applicata con una pompa di fumigazione manuale, ogni settimana di giovedì e considerando i vari trattamenti si sono prese in considerazione le diverse dosi. Il prodotto è stato applicato in modo tale che coprisse tutta la pianta su entrambe le pagine della foglia. È stato fatto in modo che il prodotto applicato in un trattamento non raggiungesse le piante degli altri trattamenti.

6.8.2.6. Risultati della coltivazione del 2010-2011

- Altezza della pianta

Come si vede da un esame della Figura 10, le piante coltivate in serra raggiungono un'altezza media di circa 167 cm, maggiore rispetto alle piante coltivate in campo aperto.

Il grafico conferma che la coltivazione che ha raggiunto lo sviluppo maggiore è quella in serra, ma mostra altresì che tra i diversi trattamenti, applicati alle coltivazioni tanto in serra quanto in campo aperto, non esiste una differenza significativa in relazione all'altezza della pianta. Applicando un "disegno a blocchi completamente a caso" (DBCA, anche conosciuto come il design a due vie, viene applicato quando il materiale è eterogeneo; unità sperimentali omogenee sono raggruppate a formare gruppi omogenei chiamati blocchi), l'analisi di varianza (ANOVA) riafferma che esiste una differenza tra l'altezza della coltivazione in serra ed in campo aperto, fornendo un valore di p di 0,00 e validando la non esistenza di una differenza significativa tra i trattamenti applicati alle coltivazioni (valore di p pari a 0,981).

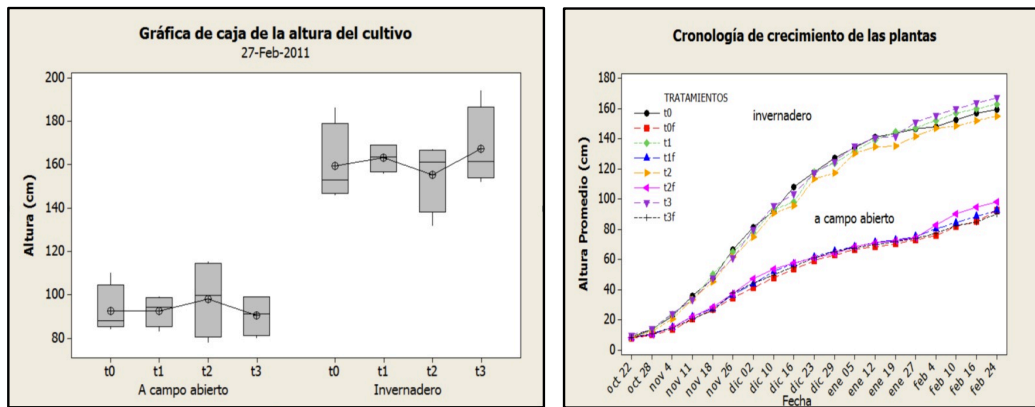


Figura 10. Crescita delle piante Fonte: L'autore

- Produzione

Per la valutazione della coltivazione si è stabilita come variabile dipendente la produzione totale dei trattamenti, durante i sei mesi di coltivazione. Sulla base dei dati espressi attraverso il grafico a barre (Figura 11), si evince che la coltivazione in campo aperto fornisce una produzione minore (633,5 libbre) rispetto alla coltivazione in serra (1957,9 libbre). In merito ai trattamenti applicati alle coltivazioni in serra, il trattamento che ha fornito la maggior produzione risulta essere il T2, con 525,5 libbre.

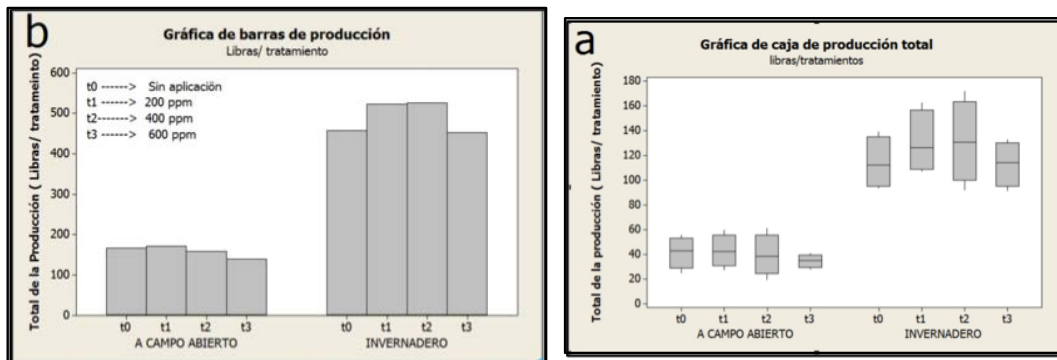


Figura 11. Grafici della produzione delle coltivazioni

Analizzando la Figura 11 (grafico di destra), si nota che non esiste una differenza significativa tra i singoli trattamenti applicati in serra ed in campo aperto, mentre viene ratificata la differenza tra le coltivazioni in campo aperto e in serra.

Applicando il “disegno a blocchi completamente a caso” (DBCA), l’analisi della varianza (ANOVA) afferma che esiste una differenza tra le produzioni delle coltivazioni in serra ed in campo aperto (p pari a 0,00) e convalida la non

esistenza di una differenza significativa tra i singoli trattamenti applicati alle coltivazioni (valore di p di 0,857).

- Incidenza di Oidio

Un'altra variabile dipendente analizzata nel corso del tempo della coltivazione è l'incidenza di oidio, che è stata realizzata ogni due settimane.

Secondo i dati espressi attraverso il grafico a barre (Figura 11), la coltivazione in campo aperto presenta un'incidenza minore (0,12%) rispetto alla coltivazione in serra (57,09%). In merito ai singoli trattamenti applicati nelle coltivazioni in serra, il trattamento che ha portato alla minore incidenza è il trattamento T2 con 46,125% mentre quello con la maggiore incidenza è il trattamento T0 (68,75%). Analizzando la figura 13b, si evince che non esiste una varianza tra i singoli trattamenti applicati in serra o in campo aperto, mentre viene confermata la differenza tra le coltivazioni in campo aperto ed in serra.

Applicando il "disegno a blocchi completamente a caso" (DBCA), l'analisi della varianza (ANOVA) conferma che esiste una differenza tra le produzioni delle coltivazioni in serra e in campo aperto (p pari a 0,00) e convalida altresì l'esistenza di una differenza significativa tra i singoli trattamenti applicati alle coltivazioni ($p = 0,006$).

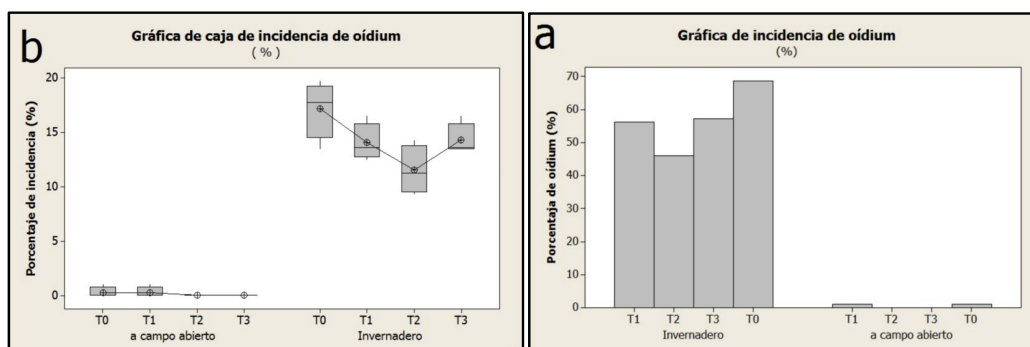


Figura 12. Grafici dell'incidenza di Oidium Fonte: L'autore

- Concentrazione di cloro totale nel suolo

Un'altra variabile dipendente, analizzata nel corso del test, è la concentrazione di cloro totale nel suolo, che è stata analizzata alla fine della coltivazione.

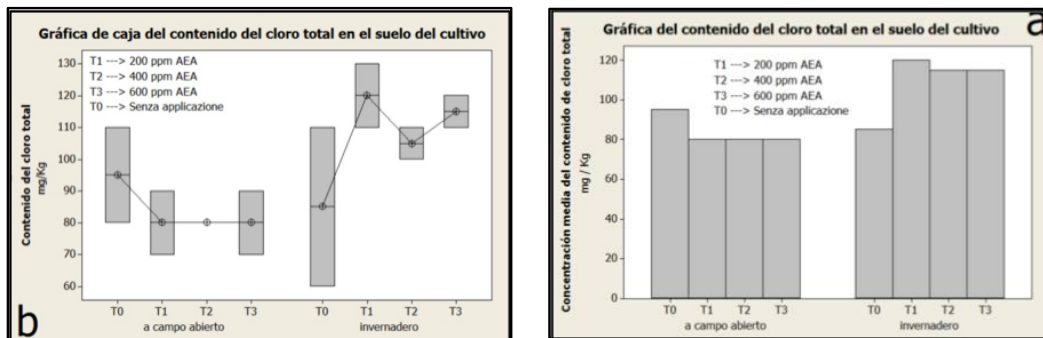


Figura 13. Grafici della concentrazione di cloro totale. Fonte: L'autore

Secondo i dati espressi attraverso il grafico a barre (Figura 13.a), la coltivazione in campo aperto mostra concentrazione minore (80 mg/Kg) rispetto alla coltivazione in serra (110 mg/Kg). In merito ai singoli trattamenti applicati nella coltivazione in serra, quello con la minor concentrazione di cloro totale è il T0 con 85 mg/Kg mentre quello che mostra la maggiore concentrazione è il T1 (120 mg/Kg).

Analizzando la figura 13, non pare esistere una differenza significativa tra i singoli trattamenti applicati in serra o in campo aperto, mentre risulta confermata la differenza tra le coltivazioni in campo aperto ed in serra.

A seguito dell'applicazione di un disegno a blocchi completamente a caso (DBCA), l'analisi della varianza (ANOVA) afferma infatti che esiste una differenza significativa tra le produzioni delle coltivazioni in serra e in campo aperto ($p = 0,032$) e convalida la non esistenza di una differenza significativa tra i singoli trattamenti applicati alle coltivazioni ($p = 0,840$).

- Contenuto di minerali nei frutti

In relazione alle caratteristiche dei frutti ottenuti dalle coltivazioni, si è proceduto a determinare il contenuto di minerali conseguente ai diversi trattamenti, tanto per le coltivazioni in serra quanto per quelle in campo aperto. Sono stati prelevati campioni di ogni trattamento e replica, e si è determinato il contenuto di metalli attraverso la tecnica del forno di grafite (assorbimento atomico).

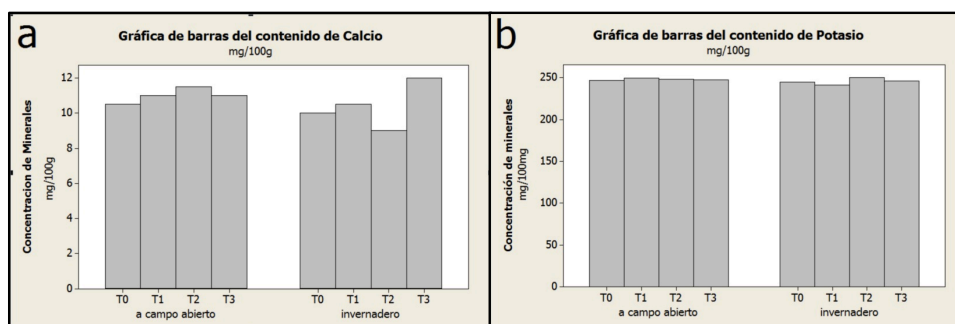


Figura 14. Grafico del contenuto di calcio (a) e Potassio (b) nei frutti della coltivazione Fonte: L'autore

In relazione al contenuto di calcio, le coltivazioni in serra ed in campo aperto presentano un quantitativo medio pari a 10,33 mg/100g, simile per i diversi trattamenti; anche relativamente al contenuto di potassio non si notano differenze significative tra le coltivazioni in serra ed in campo aperto, dal momento che le medie calcolate sui diversi trattamenti ammontano a 245,6 mg/100 g in serra, e a 248 mg/100 g in campo aperto.

6..8.2.7. Risultati della coltivazione del 2011-2012

- Variabile indipendente

Per il lavoro che si sta realizzando, fissiamo come variabile indipendente l'applicazione della soluzione di AEA a due differenti concentrazioni, come dettagliato di seguito.

Tabella 2 Variabili indipendenti

LIVELLI	NOME	CONCENTRAZIONE	REPLICHE
1	TRATTAMENTO 1	8% CINa	4
2	TRATTAMENTO 2	200 ppm AEA	4
3	TRATTAMENTO 3	400 ppm AEA	4
4	TRATTAMENTO 0	SENZA APPLICAZIONE	4

Questi trattamenti sono stati realizzati in maniera alternata, nell'area sperimentale, come riportato nel seguente grafico.

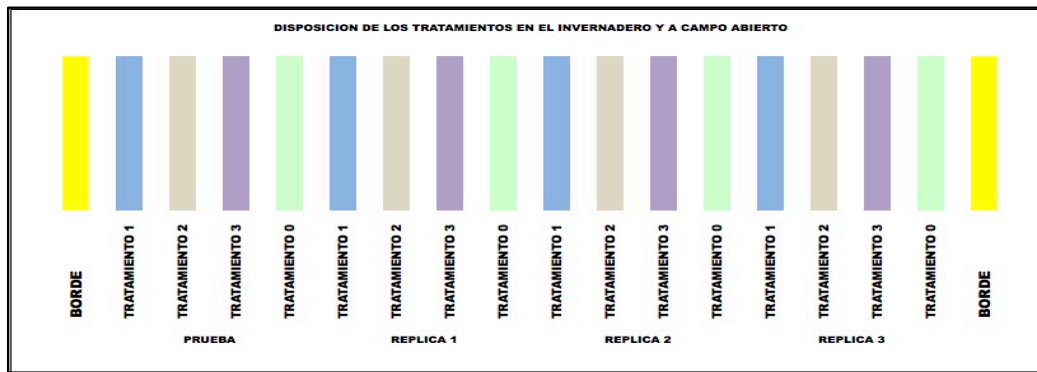


Figura 15. Disposizione dei trattamenti in serra e in campo aperto. Fonte: L'autore

- Variabili dipendenti

Come variabili dipendenti del nostro lavoro abbiamo:

- Altezza media delle piante (cm)
- Incidenza di oidio per trattamento (%).
- Produzione media (libbre/pianta)
- Contenuto di calcio e potassio nel frutto (mg/100g)
- Contenuto di cloro totale nel suolo

- Altezza della pianta

Come si vede nella Figura 16 le piante della coltivazione in serra raggiungono un'altezza media di circa 158 cm, superiore alle piante in campo aperto (94 cm).

Il grafico conferma che la coltivazione che ha raggiunto uno sviluppo maggiore è quella in serra, ma tra i trattamenti applicati tanto alla coltivazione in serra quanto a quella in campo aperto non vi sono differenze significative in merito all'altezza delle piante. Applicando l'analisi a blocchi randomizzati (DBCA), secondo l'analisi di varianza (ANOVA) si osserva che esiste una differenza tra l'altezza delle coltivazioni in serra e quelle in campo aperto, ottenendo un valore di p di 0,00 e validando l'assenza di una differenza significativa tra i singoli trattamenti applicati alle coltivazioni (valore di p pari a 0,063).

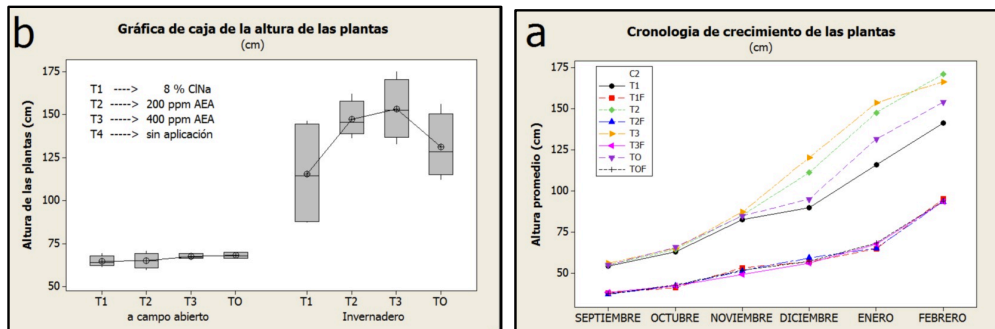


Figura 16. Grafici dell'altezza delle piante. Fonte: L'autore

- Produzione

Per l'analisi della nuova coltivazione è stata stabilita come variabile dipendente la produzione totale dei trattamenti durante i sei mesi di coltivazione. Secondo i dati espressi attraverso il grafico a barre si determina che la coltivazione in campo aperto (338,6 Libbre) presenta una produzione minore rispetto alla coltivazione in serra (1903,7 Libbre).

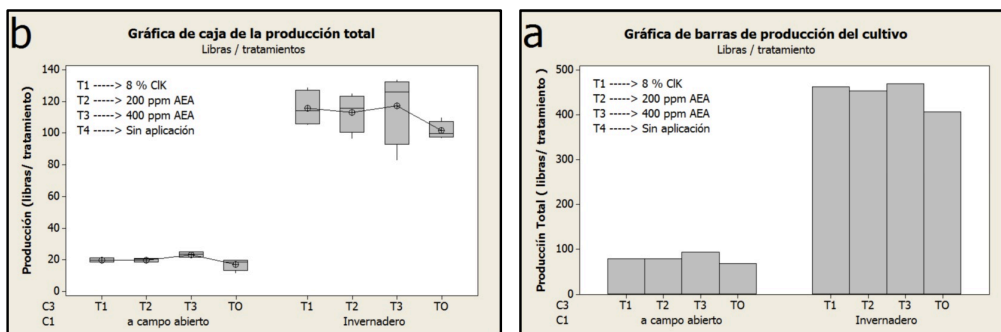


Figura 17. Grafico a casse e a barre della produzione della coltivazione. Fonte: L'autore

In relazione ai singoli trattamenti applicati alle coltivazioni in serra, il trattamento che ha raggiunto la maggiore produzione è il T3 con 468,7 Libbre come si vede nella Figura 17.

Applicando l'analisi a blocchi randomizzati (DBCA), secondo l'analisi di varianza (ANOVA) si osserva che esiste una differenza tra la produzione delle coltivazioni in serra e quelle in campo aperto (p pari a 0,00) mentre non esistono differenze significative tra i singoli trattamenti applicati alle coltivazioni (valore di p pari a 0,217).

- Incidenza di *Oidium*

Un'altra variabile dipendente presa in considerazione durante lo studio è l'incidenza di *Oidium* sp. che è stata analizzata ogni due settimane. Il lavoro in

campo è stato fatto in base ad un'analisi visiva del campione (30 piante per ogni trattamento), stimando in percentuale l'incidenza di infezione in ogni pianta; successivamente si è calcolata la media dei campioni.

Secondo i dati espressi attraverso il grafico a barre (Figura 18.a) si osserva che la coltivazione in campo aperto presenta un'incidenza minore (2,7%) da *Oidium* sp. rispetto alla coltivazione in serra (53,2%). In relazione ai trattamenti applicati nella coltivazione in serra, quelli che hanno raggiunto minor incidenza sono i trattamenti T3 e T2 con 46,1%, mentre quello con la maggiore incidenza è il trattamento T0 (51,5%), come si osserva nella Figura 18.

Analizzando la Figura 18.b si osserva che esiste una varianza tra i trattamenti applicati in serra e quelli in campo aperto e quindi una differenza tra le coltivazioni in campo aperto e in serra.

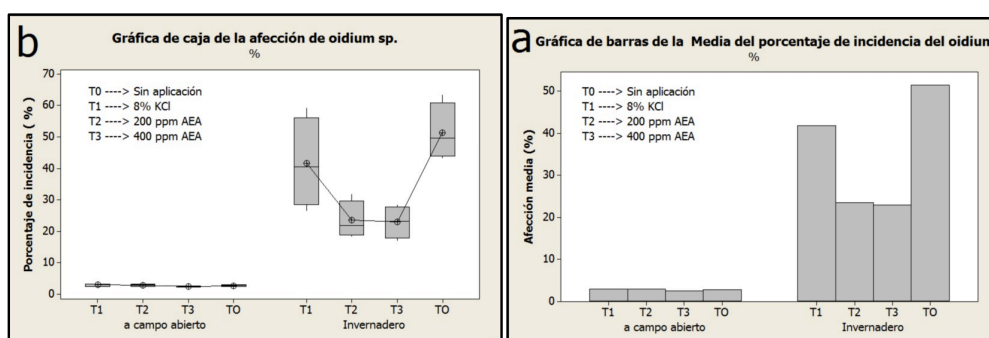


Figura 18. Grafici relativi all'incidenza di *Oidium* sp. Fonte: L'autore

Applicando il "disegno a blocchi completamente a caso" (DBCA), l'analisi della varianza (ANOVA) conferma che esiste una differenza tra le produzioni delle coltivazioni in serra e in campo aperto (p pari a 0,00) e convalida altresì l'esistenza di una differenza significativa tra i singoli trattamenti applicati alle coltivazioni ($p = 0,006$).

- Concentrazione di cloro totale nel suolo

Un'altra variabile dipendente, analizzata nel corso del test, è la concentrazione di cloro totale nel suolo, che è stata analizzata alla fine della coltivazione. Questa analisi è stata realizzata nei laboratori dell'Università di Cuenca mediante indagine fotometrica applicata a 16 campioni, 2 per trattamento, ovvero un totale di 8 campioni per coltivazione.

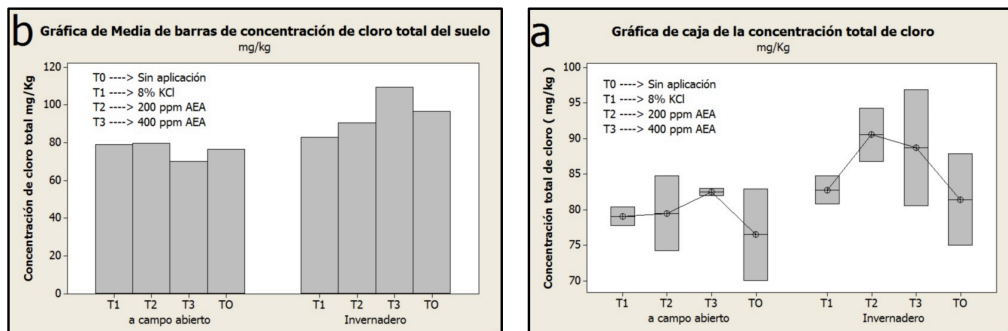


Figura 19. Grafici della concentrazione di cloro totale

Secondo i dati espressi attraverso il grafico a barre (Figura 20.b) si osserva che la coltivazione in campo aperto (79,39 mg/Kg) presenta un'incidenza minore rispetto alla coltivazione in serra (85,88 mg/Kg). Riguardo ai trattamenti applicati nella coltivazione in serra, quello con la minor concentrazione di cloro totale è il trattamento T0 con 81,4 mg/Kg mentre quello con la maggior incidenza è il trattamento T3 (88,7 mg/Kg) come si osserva nella Figura 19 b. Analizzando la Figura 19 a si osserva che non esiste una varianza tra i singoli trattamenti applicati in serra come in campo aperto.

6..8.3. Applicazione di ipoclorito di sodio su coltivazioni di pomodoro

6..8.3.1. Fattori di studio

- Variabile indipendente

Per il lavoro da realizzare abbiamo stabilito come variabile indipendente l'applicazione di 3 soluzioni con le concentrazioni elencate di seguito

Tabella 3 Variabili Indipendenti

LIVELLI	NOME	CONCENTRAZIONE	REPLICHE
1	TRATTAMENTO T0	Senza applicazione	4
2	TRATTAMENTO T1	8% NaCl	4
3	TRATTAMENTO T2	NaOCl 400 ppm	4

Questi trattamenti sono stati disposti in modo alternato nell'area sperimentale come mostra il seguente grafico.

- Variabili dipendenti

Come variabili dipendenti del nostro lavoro abbiamo:

- Altezza media delle piante (cm)
- Incidenza di oidio per trattamento (%)

- Produzione media (libbre/pianta)
- Contenuto di calcio e potassio nel frutto (mg/100g)
- Contenuto di cloro totale nel suolo

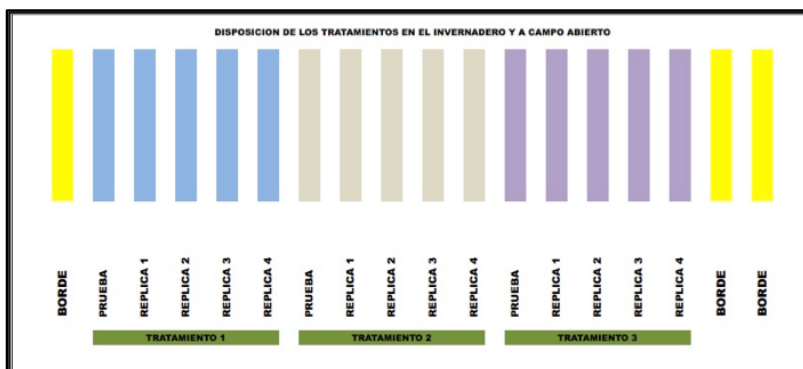


Figura 20 Disposizione dei trattamenti in serra e in campo aperto. Fonte: L'autore

6..8.3.2. Risultati della coltivazione del 2012-2013

- Altezza della pianta

Come si nota nella Figura 22, le piante della coltivazione in serra raggiungono un'altezza media di 168,9 cm, superiore rispetto alle piante in campo aperto.

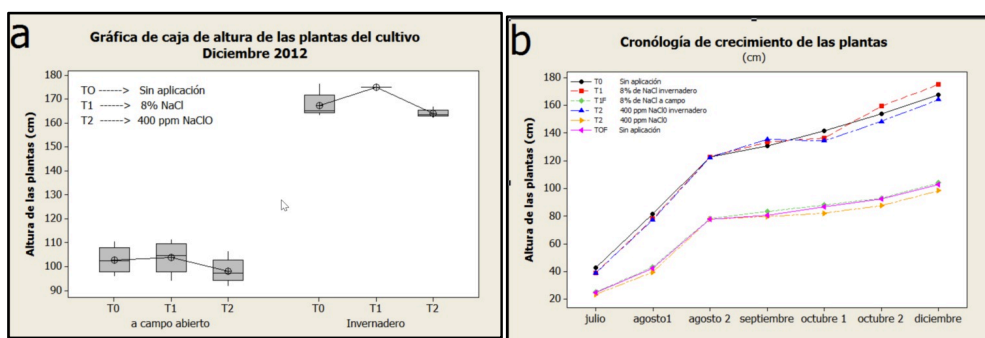


Figura 21. Cronologia di crescita delle piante e grafico a casse della crescita. Fonte: L'autore

Il grafico a box conferma che la coltivazione che ha raggiunto il maggior sviluppo è quella in serra, ma tra i singoli trattamenti applicati tanto alle coltivazioni in serra quanto a quelle in campo aperto non esiste una differenza significativa in relazione all'altezza delle piante. Applicando l'analisi a blocchi randomizzati (DBCA), secondo l'analisi di varianza (ANOVA) si osserva che esiste una differenza tra l'altezza della coltivazione in serra e quella in campo aperto (p pari a 0,00) e si conferma l'assenza di una differenza significativa tra i singoli trattamenti applicati alle coltivazioni (valore di p pari a 0,285).

- Produzione

Per la descrizione della nuova coltivazione è stata stabilita come variabile dipendente la produzione totale dei trattamenti durante i sei mesi della coltivazione. La raccolta è stata effettuata in modo manuale, usando recipienti di plastica da 30 litri di capacità, e si è poi proceduto alla pesatura e alla selezione dei frutti. Quelli di peso maggiore di 200 g sono stati considerati “grandi”, “medi” quelli compresi tra 100 e 199 g, e infine “piccoli” quelli minori di 100 g.

Secondo i dati espressi attraverso il grafico a barre si determina che la coltivazione in campo aperto (866 Libbre) presenta una produzione minore rispetto alla coltivazione in serra (3816 Libbre).

In quanto ai singoli trattamenti applicati alle coltivazioni in serra, quello che ha raggiunto la maggior produzione è il trattamento T2 con 1698 Libbre, come si nota nella Figura 22.

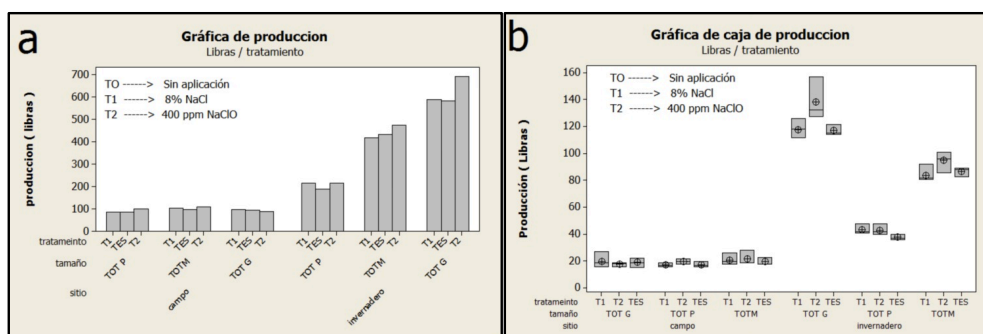


Figura 22. Grafici della produzione della coltivazione del 2012-2013

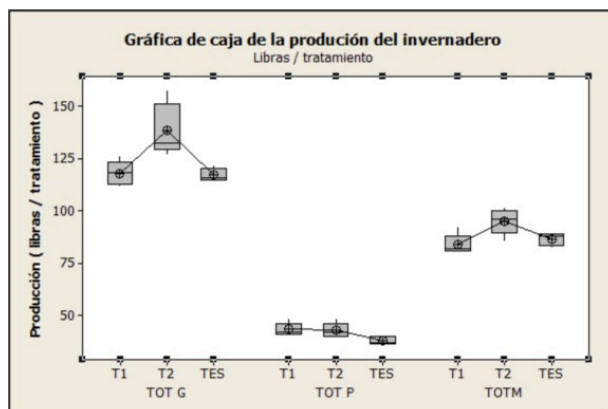
Applicando l’analisi a blocchi randomizzati (DBCA), secondo l’analisi di varianza (ANOVA) si osserva che esiste una differenza tra le produzioni delle coltivazioni in serra ed in campo aperto (p pari a 0,00) e si conferma l’assenza di una differenza significativa tra i singoli trattamenti applicati alle coltivazioni (valore di p pari a 0,574)

Inoltre possiamo notare nel grafico a box (Figura 23) che il T2 ottiene un’alta produzione della frutta di maggiori dimensioni, come stabilisce l’analisi di varianza (p pari a 0,00).

- Incidenza di *Oidium*

Un’altra variabile dipendente analizzata durante il tempo di coltivazione è l’incidenza di *Oidium* sp. eseguita ogni due settimane. Il lavoro sul campo è stato realizzato in base a un’analisi visiva del campione (30 piante per ogni

trattamento), valutando in percentuale l'incidenza dell'infezione in ogni pianta; successivamente è stata realizzata la media di ogni campione.



• Figura 23. Grafico della produzione in serra Fonte: L'autore

Secondo i dati espressi attraverso il grafico a barre (Figura 25.b) si osserva che la coltivazione in campo aperto (25,4%) presenta un'incidenza minore nell'infezione da *Oidium* sp. rispetto alla coltivazione in serra (38,3%). In merito ai singoli trattamenti applicati nelle coltivazioni in serra, quelli che hanno raggiunto un minor grado di infezione sono i trattamenti T2 e T1 con il 24,5%, ed il 30,7%, rispettivamente, mentre quello con la maggiore incidenza è il trattamento T0 (51,5%), come si nota nella Figura 24.a.

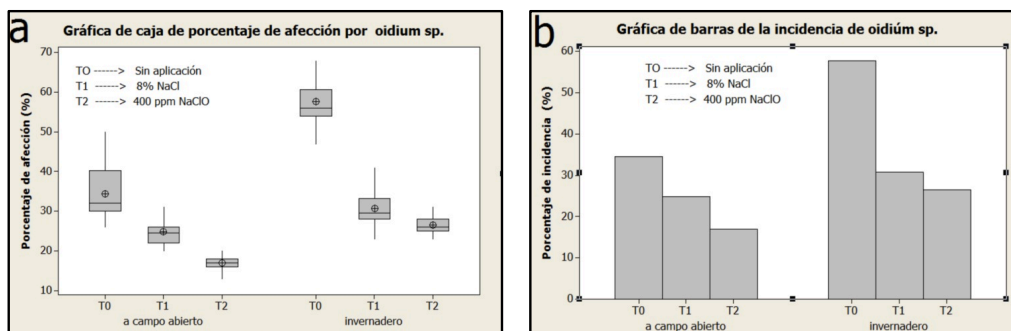


Figura 24 Grafici relativi all'incidenza di *Oidium* sp. Fonte: L'autore

Analizzando la Figura 25.b si osserva che esiste una varianza tra i singoli trattamenti applicati in serra ed in campo aperto, così come una differenza tra le coltivazioni in campo aperto e in serra.

Applicando l'analisi a blocchi randomizzati (DBCA), secondo l'analisi di varianza (ANOVA) si osserva che esiste una differenza tra le produzioni delle coltivazioni in serra e in campo aperto (p pari a 0,00) e si conferma altresì l'esistenza di una differenza significativa tra i singoli trattamenti applicati alle coltivazioni (valore di

p pari a 0,00). Nel grafico a box si osserva che quello con minor infezione è il trattamento T2 (400 ppm di NaOCl).

- Concentrazione di ione cloruro nel suolo

Un'altra variabile dipendente analizzata nella coltivazione è la concentrazione dello ione cloruro nel suolo, che è stata valutata alla fine della coltivazione. Questa analisi è stata realizzata nei laboratori dell'Università Politecnica Salesiana con il cromatografo ionico DIONEX ICS 2100 su 16 campioni, 2 per trattamento per un totale di 8 campioni per coltivazione.

Secondo i dati espressi attraverso il grafico a box (Figura 26) si osserva che la coltivazione in campo aperto (79,8 mg/Kg) presenta un'incidenza minore rispetto alla coltivazione in serra (136,2 mg/Kg). In merito ai singoli trattamenti applicati nella coltivazione in serra, quello con la minor concentrazione di ioni è il T2 con 134,5 mg/Kg mentre quello con maggior incidenza è il T0 (137 mg/Kg).

Secondo l'analisi della varianza (ANOVA), esiste una differenza significativa in relazione alle coltivazioni in serra e in campo aperto (p pari a 0,00), mentre tra i singoli trattamenti non esiste una differenza significativa (p pari a 0,063).

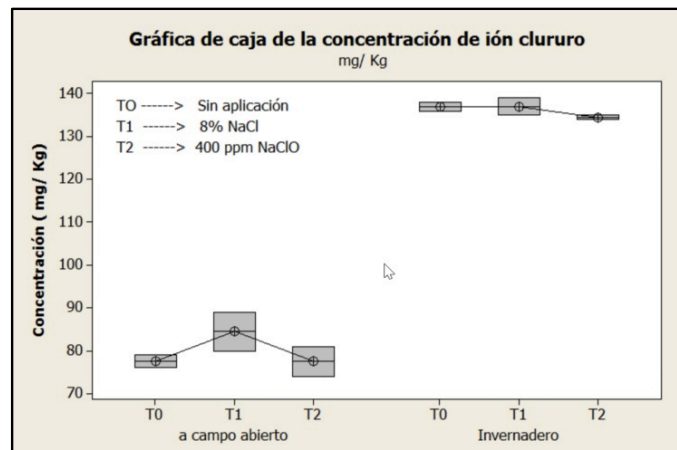


Figura 25 Grafico della concentrazione dello ione cloruro

- Contenuto di minerali nel frutto

In relazione al contenuto di minerali del frutto si è determinato il contenuto di calcio e sodio a seguito dei diversi trattamenti, tanto per le coltivazioni in serra quanto per quelle in campo aperto. Per questo sono stati prelevati 2 campioni per ogni trattamento, ed è stata determinata la concentrazione di sodio e calcio,

nei laboratori dell'Università Politecnica Salesiana, mediante il metodo spettrofotometrico ad assorbimento atomico con forno di grafite.

I risultati ottenuti per il sodio sono riportati in Tabella 4; quelli relativi al calcio in Tabella 5.

Tabella 4. Risultati delle analisi del contenuto di Sodio nel pomodoro coltivato (mg / 100g)

COLTIVAZIONE	SERRA		IN CAMPO APERTO	
PROVE	1	2	1	2
TRATTAMENTO				
T1	9,8	9,6	8,4	8,2
T2	9,7	9,3	8,8	8,2
T0	9,6	9,4	8,7	8,3

Tabella 5. Risultati delle analisi del contenuto di Calcio nel pomodoro coltivato (mg / 100g)

COLTIVAZIONE	SERRA		IN CAMPO APERTO	
PROVE	1	2	1	2
TRATTAMENTO				
T1	202,08	190,00	229,50	224,64
T2	205,34	189,23	232,34	222,23
T0	201,12	203,12	238,45	231,01

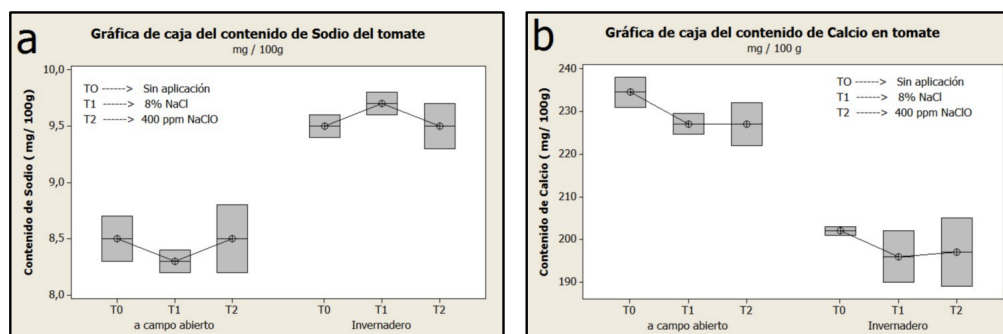


Figura 26. Grafici del contenuto di Sodio e Calcio nei pomodori. Fonte: L'autore

Analizzati i risultati ottenuti, il grafico a box (Figura 27.a) stabilisce l'esistenza di una differenza significativa tra le coltivazioni in serra ed in campo aperto (valore p pari a 0,00); inoltre, i frutti della serra presentano una concentrazione di sodio maggiore (9,6 mg/100g) rispetto a quelli in campo aperto (8,4 mg/100g).

In relazione ai singoli trattamenti applicati in serra notiamo dal grafico a box che non esiste una differenza significativa tra loro (valore p pari a 1,133).

Altro minerale studiato nei frutti è stato il Calcio (Tabella 11); analizzati i risultati ottenuti, il grafico a box (Figura 27.b) stabilisce l'esistenza di una differenza significativa tra le coltivazioni in serra e quelle in campo aperto (valore p pari a 0,00); inoltre, i frutti della serra presentano una concentrazione media di calcio minore (198,3mg/100g) rispetto a quelli ottenuti in campo aperto (229,5 mg/100g).

In relazione ai singoli trattamenti applicati in campo aperto notiamo nel grafico a box che non esiste una differenza significativa tra loro (valore p pari a 0,372).

- Caratteristiche fisiche del pomodoro.

In merito alle caratteristiche fisiche dei frutti, si sono determinati il pH, i gradi Brix e il contenuto di acqua per i diversi trattamenti dalle coltivazioni in serra e in campo aperto. Per questo sono stati prelevati 2 campioni per ogni trattamento e la determinazione dei vari parametri è stata effettuata presso i laboratori dell'Università Politecnica Salesiana: il grado brix è stato determinato mediante rifrattometro ABBE, il pH mediante un pHmetro Seven Multi METTLER TOLEDO, e la percentuale di acqua mediante un determinatore alogeno di umidità HB43-S.

I risultati relativi al contenuto di acqua sono riportati in Tabella 6.

Tabella 6. Risultati delle analisi del contenuto di acqua nei pomodori (%)

COLTIVAZIONE	SERRA			CAMPO APERTO		
PROVE	1	2	3		1	2
TRATTAMENTO						
T1	92,10	90,23	89,09	84,80	91,03	91,98
T2	92,42	92,42	89,97	87,21	90,10	90,05
T0	93,11	92,47	93,00	72,25	91,25	90,84

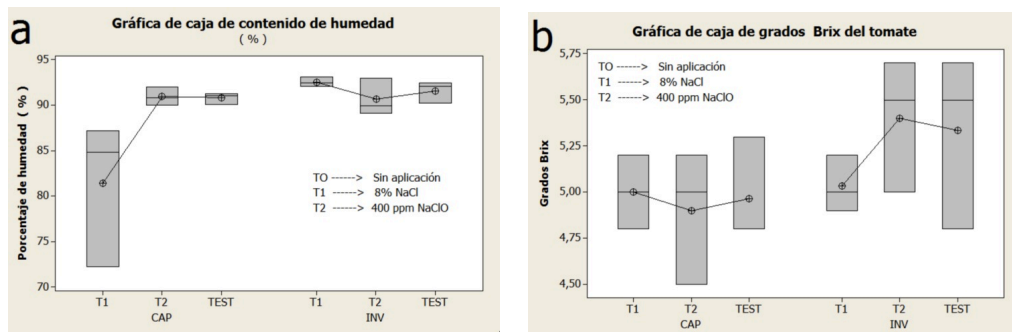


Figura 27. Grafico a box del contenuto di umidità e grado Brix. Fonte: L'autore

Analizzati i risultati ottenuti, il grafico a box (Figura 28.a) stabilisce l'esistenza di una differenza significativa tra le coltivazioni in serra e in campo aperto (valore p pari a 0,035), inoltre, i frutti della serra (91,6%) presentano un contenuto medio di acqua simile ai trattamenti T0 e T2 in campo aperto (87,7%). Solo il trattamento T1 in campo mostra una grande variabilità, ed il contenuto medio di acqua si attesta all'81,4%, dato più basso tra tutti i trattamenti.

In merito ai singoli trattamenti applicati in serra notiamo nel grafico a box che non esiste una differenza significativa tra loro (valore p pari a 0,106).

Un altro parametro fisico studiato nei frutti di pomodoro, tanto in serra quanto in campo aperto, è stato il contenuto di solidi solubili, espressi come gradi Brix, ottenendo i risultati presenti in Tabella 7.

Tabella 7. Risultati delle analisi del contenuto di solidi solubili nel pomodoro (°Bx)

COLTIVAZIONE	SERRA			CAMPO APERTO		
	1	2	3	1	2	3
PROVE						
TRATTAMENTO						
T1	5,0	4,9	5,2	5,0	5,2	4,8
T2	5,5	5,7	5,0	5,2	5,0	4,5
T0	5,7	5,5	4,8	4,8	4,8	5,3

Analizzando i risultati ottenuti, il grafico a box (Figura 28.b) mostra l'assenza di differenze significative tra i frutti delle coltivazioni in serra ed in campo aperto (valore p pari a 0,073); inoltre, i frutti in serra presentano un contenuto di solidi solubili (5,2 °Bx) simile a quelli ottenuti in campo aperto (4,9 °Bx).

In merito ai singoli trattamenti, applicati tanto in serra quanto in campo aperto, notiamo dal grafico che non esiste una differenza significativa tra loro (valore p pari a 0,719).

Infine, si è studiato il pH dei frutti di pomodoro, ottenuti in serra e in campo aperto; i risultati sono presentati in Tabella 8.

Tabella 8. Risultati delle analisi del pH

COLTIVAZIONE	SERRA			CAMPO APERTO		
PROVE	1	2	3	1	2	3
TRATTAMENTO						
T1	4,074	4,357	4,229	4,220	4,227	4,227
T2	4,276	4,371	4,398	4,230	4,261	4,198
T0	4,371	4,284	4,370	4,254	4,381	4,345

I dati ottenuti, e mostrati nel grafico a box di Figura 29, avvalorano l'assenza di una differenza significativa tra i frutti delle coltivazioni in serra e in campo aperto (valore p pari a 0,997); inoltre, il pH medio dei frutti in serra ($pH = 4,25$) risulta uguale a quello dei frutti ottenuti in campo aperto.

In merito ai singoli trattamenti, applicati tanto in serra quanto in campo aperto, notiamo nel grafico a box che non esiste una differenza significativa tra loro (valore p pari a 0,143).

6..8.4. Prova di germinazione dei semi

6..8.4.1. Principio

I semi costituiscono, nell'ambito del ciclo di vita delle piante, l'unità di dispersione ed il mezzo di continuazione della specie. Le caratteristiche di viabilità e vigore di una specie di interesse possono essere osservate in una curva di germinazione.

L'attivazione del seme è inibita in presenza di sostanze tossiche che colpiscono la sua germinazione. La divisione cellulare dei meristemi apicali può essere inibita, tanto per un ritardo nel processo di mitosi quanto per un'alterazione nel processo di allungamento cellulare, per questo la fitotossicità di un composto può essere determinata mediante la misurazione della germinazione dei semi.

6..8.4.2. Metodologia

- Selezioniamo i semi da usare e procediamo a lavarli con cloro al 5% per 15 minuti; sciacquiamo con acqua del rubinetto ed infine con acqua distillata.

- Collochiamo due dischi di carta da filtro Whatman No. 1 o 40 in cellulosa, in altrettante piastre Petri aventi un diametro di 110 mm.
- Prepariamo due soluzioni di ipoclorito di sodio, a 200 e 400 ppm rispettivamente, e successivamente procediamo a regolarne il pH con Fosfato diacido di Sodio, fino a raggiungere un valore pari a 6,5
- Distribuiamo in maniera omogenea 2 ml della prima soluzione sulla prima carta da filtro, ripetendo poi la procedura con la seconda soluzione (sulla seconda carta da filtro).
- Come testimone si usa una piastra Petri con 2 ml di acqua distillata.
- Collochiamo 40 semi per piastra Petri, distribuendoli in modo tale da permettere una crescita adeguata. Si fanno tre repliche per trattamento.
- Si incubano i semi in una camera di crescita ad una temperatura di 22 ± 2 °C e in totale oscurità per sei giorni.
- Trascorso il tempo stabilito, si effettua la conta dei semi germinati.

6..8.4.3. Risultati della prova di germinazione

Dopo aver realizzato la prova sono stati ottenuti i seguenti dati:

Tabella 9. Dati ottenuti nella prova di germinazione (%)

TRATTAMENTI	Sostanza	0	Giorno 3	Giorno 4	Giorno 5	Giorno 6
T2	400 ppm NaClO	0	20,0	62,5	72,5	72,5
T2	400 ppm NaClO	0	22,5	17,5	32,5	55,0
T2	400 ppm NaClO	0	20,0	50,0	75,0	75,0
T2	400 ppm NaClO	0	12,5	60,0	80,0	87,5
T1	200 ppm NaClO	0	20,0	42,5	47,5	85,0
T1	200 ppm NaClO	0	20,0	35,0	52,5	50,0
T1	200 ppm NaClO	0	17,5	52,5	57,5	82,5
T1	200 ppm NaClO	0	37,5	42,5	72,5	77,5
T0	Acqua distillada	0	32,5	57,5	77,5	77,5
T0	Acqua distillada	0	32,5	62,5	80,0	82,5
T0	Acqua distillada	0	15,0	10,0	10,0	20
T0	Acqua distillada	0	20,0	37,5	65,0	72,5

Con i dati di Tabella 15 si è realizzato un grafico lineare di medie riportando in ordinata la percentuale di germinazione e in ascissa i giorni di germinazione: dopo i 6 giorni di attesa, la maggior percentuale di germinazione corrisponde ai trattamenti con NaClO.

Sviluppando l'analisi della varianza (ANOVA) relativamente al sesto giorno della prova, si determina che non esiste una differenza significativa tra i diversi trattamenti (valore di p pari a 0,733) per cui si dimostra che essi agiscono allo stesso modo sui semi; in particolare, la presenza dell'ipoclorito di sodio non manifesta effetti tossici per questi ultimi (6).

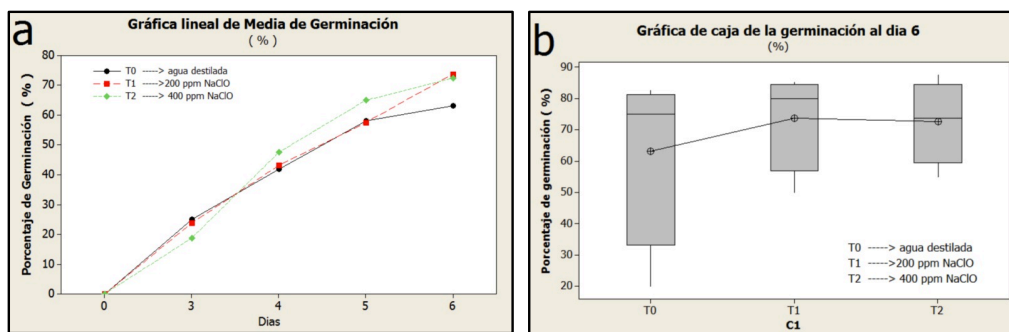


Figura 28. Grafici dei dati di germinazione. Fonte: L'autore

6..8.5. Prove per determinare la capacità biocida dell'Acqua Attivata e dell'ipoclorito di sodio

6..8.5.1. Funghi

- Preparazione della sospensione di conidi

In una piastra Petri con il patogeno si aggiunge un volume di acqua distillata di 2-3 ml, poi si procede a rimuovere il fungo dall'acqua facendo attenzione a non rimuovere l'agar, questa sospensione si filtra con una carta filtro sterile, questo filtrato si raccoglie in un bicchiere e si determinano le concentrazioni di conidi nella sospensione mediante la Camera de NueBager.

Verranno svolte (3) ...

- Misure della concentrazione ottimale della sospensione conidica

Si preparano diverse concentrazioni di conidi, successivamente si procede a controllarne lo sviluppo nella fase di germinazione in funzione del tempo (6, 12, 24 e 36 ore), osservando la crescita mediante microscopio. Si svolgono le prove con agitazione e senza agitazione, determinando in quale delle due si realizza la maggior crescita. Questi risultati consentono di stabilire la concentrazione ottimale di conidi (da usare per le prove di efficacia) ed il tempo ottimale di crescita.

- Determinazione della concentrazione efficace di acqua attivata

Si rimuove il fungo dalla piastra Petri con acqua, facendo attenzione a non rimuovere l'agar; si filtra la sospensione mediante carta filtro sterile, ed il filtrato si raccoglie in un bicchiere, per determinare la concentrazione dei conidi nella sospensione mediante Camera di NueBauer.

Poi si procede a depositare 20 µl di questa soluzione in ogni pozzetto di una piastra da 96 pozzetti, ciascuno con capacità di 200 µl, aventi fondo piano.

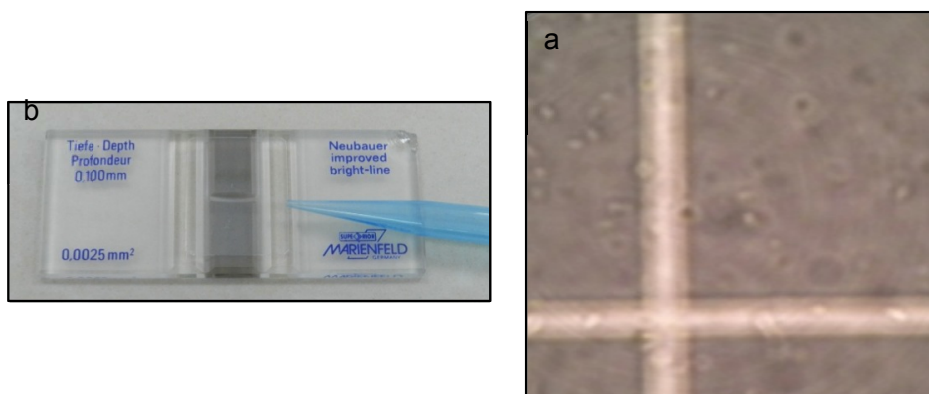


Figura 29. Conidi di *Oidium* sp. Lente 40X

Successivamente si procede a depositare in ogni pozzetto 180 µl della soluzione di acqua attivata o di ipoclorito di sodio, alle diverse concentrazioni e separatamente. Si osserva lo sviluppo dei conidi nel tempo (formano filamenti tutto intorno).

- Risultati

Si procede alla conta del numero di conidi in ogni pozzetto, dividendo ogni pozzetto in tre aree che contengono come minimo 50 conidi in ogni area (in totale almeno 150 conidi); si determina il numero dei conidi germinati per poi procedere a calcolare la percentuale di germinati ottenendo i risultati di seguito riportati.

Tabella 10. Attività fungicida di Acqua Attivata ed ipoclorito di Sodio su *Oidium* SP.(%)

SOSTANZA REPLICHE	AEA			IPOCLORITO DI SODIO		
	1 ppm	2 ppm	3 ppm	1 ppm	2 ppm	3 ppm
1	10,2	6,62	0	9,2	6,15	0
2	10,39	3,52	0	9,45	6,6	0
3	11,13	2,14	0	9,9	8,0	0

Tabella 11. Attività fungicida di Acqua Attivata ed ipoclorito di Sodio su *Verticillium* sp.(%)

SOSTANZA	AEA	IPOCLORITO DI SODIO
----------	-----	---------------------

REPLICHE	1 ppm	2 ppm	3 ppm	1 ppm	2 ppm	3 ppm
1	8,2	2,73	0	9,38	2,4	0
2	8,6	3,73	0	7,66	1,97	0
3	9,14	4,08	0	8,15	2,33	0

Tabella 12 Attività fungicida di Acqua Attivata ed ipoclorito di Sodio su *Alternaria* sp.(%)

SOSTANZA	AEA		IPOCLORITO DI SODIO	
REPLICHE	1 ppm	2 ppm	1 ppm	2 ppm
1	2,33	0	9,3	0
2	8	0	9,5	0
3	5,3	0	9,43	0

Secondo i risultati ottenuti, possiamo confermare la capacità fungicida tanto dell'acqua attivata (AEA) quanto dell'ipoclorito di sodio, a riprova di quanto ottenuto da precedenti studi (7)(8).

6..8.5.2. Batteri

- Elaborazione delle cellule primarie

I batteri, preventivamente isolati, sono stati coltivati ognuno in 20ml di acqua peptonata aggiungendo 0.5% di glucosio e incubando 24 ore a 35±2 °C. Alle coltivazioni sono stati aggiunti 2ml di glicerolo sterile; successivamente le sospensioni cellulari sono state distribuite in tubi eppendorf, ognuno contenente un volume di 1ml. I tubi sono stati depositati in sacchetti a chiusura ermetica, marcati e identificati, che sono stati conservati a – 20 °C durante tutto lo studio

- Preparazione delle soluzioni da usare

Le soluzioni di acqua attivata (AEA) ed ipoclorito di sodio sono state preparate nelle concentrazioni richieste, con acqua distillata come diluente.

È stato misurato il pH delle soluzioni, mediante pHmetro, che è stato regolato con fosfato diacido di sodio fino a un valore di 6,5.

- Valutazione delle soluzioni

I ceppi scongelati sono stati inoculati in beuta Erlenmeyer (100ml) con 20ml di acqua peptonata, aggiungendo 0.5% di glucosio, e sono stati incubati per 12 ore a 37°C.

Mediante una camera di Neubauer è stato quantificato per triplicato l'inoculo, usando come bianco acqua peptonata sterile addizionata dello 0.5% di glucosio. Le coltivazioni sono state diluite con acqua peptonata sterile

contenente lo 0.5% di glucosio, al fine di raggiungere una concentrazione di 10^6 UFC/ml

Per controllare la concentrazione iniziale è stato realizzato un riconteggio in piastra ottenendo valori simili agli anteriori.

Si sono prelevati 9 ml di soluzione (AEA o ipoclorito) alla concentrazione selezionata, ed è stato aggiunto 1 ml della soluzione che contiene il microorganismo. Effettuato il mescolamento, si è atteso un tempo di contatto di 10 minuti; successivamente, 1 ml dalla miscela è stato prelevato ed è stato seminato in piastra Petri. Si è operato effettuando una diluizione 1:10 della miscela microorganismo + disinfettante.

Di ognuna delle concentrazioni sono state realizzate 3 repliche, le piastre sono state incubate a 37°C, per 24 ore (3).

Tabella 13. Attività battericida di Acqua Attivata ed ipoclorito di Sodio su Bacillus sp.(#UFC/ml)

REPLICHE	AEA				IPOCLORITO DI SODIO			
	BIANCO	1 ppm	2 ppm	3 ppm	BIANCO	1 ppm	2 ppm	3 ppm
1	$5,13 \times 10^6$	$5,3 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	0	$5,20 \times 10^6$	$4,8 \times 10^5$	$3,2 \times 10^3$	0
2	$5,10 \times 10^6$	$5,3 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	0	$5,29 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^3$	0
3	$5,12 \times 10^6$	$5,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	0	$5,25 \times 10^6$	$5,2 \times 10^5$	$4,2 \times 10^3$	0

Tabella 14. Attività battericida di Acqua Attivata ed ipoclorito di Sodio su Erwinia sp.(#UFC/ml)

REPLICHE	AEA				IPOCLORITO DI SODIO			
	BIANCO	5 ppm	9 ppm	10 ppm	BIANCO	5 ppm	9 ppm	10 ppm
1	$5,11 \times 10^6$	$4,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	0	$4,90 \times 10^6$	$4,6 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$	0
2	$5,09 \times 10^6$	$4,4 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	0	$5,22 \times 10^6$	$4,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	0
3	$5,14 \times 10^6$	$4,7 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	0	$5,15 \times 10^6$	$4,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$	0

Tabella 15 Attività battericida di Acqua Attivata ed ipoclorito di Sodio su Pantoea sp. (#UFC/ml)

REPLICHE	AEA				IPOCLORITO DI SODIO			
	BIANCO	6 ppm	8 ppm	9 ppm	BIANCO	6 ppm	8 ppm	9 ppm
1	100	2000	1000	0	$4,7 \times 10^6$	5454	909	0
2	$3,418 \times 10^6$	4000	2000	0	$4,8 \times 10^6$	6363	1818	0
3	$3,420 \times 10^6$	6000	4000	0	$4,9 \times 10^6$	7272	2727	0

Sulla base dei risultati ottenuti in questa prova, possiamo confermare la capacità biocida tanto dell'acqua attivata AEA quanto dell'ipoclorito di Sodio, a conferma di quanto ottenuti in studi precedenti (7)(8).

6..9. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- (1). LARREA CALLES, Fernando. *Producción de tomate de mesa (Lycopersicum esculentum, Miller), utilizando la mezcla de diferentes sustratos* [online]. 2011. [Accessed 30 December 2013]. Available from: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/3033>
- (2). BLANCARD, D. *ENFERMEDADES DEL TOMATE* [online]. Mundi-Prensa, 2011. ISBN 9788484764274. Available from: <http://books.google.com.ec/books?id=-a0SAQAAQBAJ>
- (3). CYTED. *Manual de Técnicas de investigación*. 1995.
- (4). BLANCARD, D. *Enfermedades del tomate: observar, identificar, luchar* [online]. Mundi-Prensa, 1990. ISBN 9788471142658. Available from: <http://books.google.com.ec/books?id=dnz9AI9qNZIC>
- (5). AGRIOS, George N. *Fitopatología*. México [etc.]: Limusa, 1995. ISBN 9681851846 9789681851842.
- (6). FRENCH, E. R. and HEBERT, T. T. *Métodos de investigación fitopatológica* [online]. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1980. Available from: <http://books.google.com.ec/books?id=nR8PAQAAIAAJ>
- (7). Deza M.A., Araujo M., Garrido M.J. (2003): Inactivation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella Enteritidis, and Listeria monocytogenes on the surfaces of tomatoes by neutral electrolyzed water. Letters in Applied Microbiology, 37, 482-487.
- (8). Casadiego L.P., Cuartas V.R., Mercado M., Díaz M., Carrascal A.K. (2005): Effectiveness of electrolyzed oxidizing water for inactivating Listeria monocytogenes in lettuce. Revista de la Facultad de Ciencias - Pontificia Universidad Javeriana, 10, 97-108.

CAPITOLO N° 7.

CONCLUSIONI

Come discusso nei capitoli introduttivi, è prassi diffusa combattere i patogeni delle piante attraverso l'uso di sostanze di sintesi chimica: i pesticidi. Tali sostanze sono molto utilizzate, specie in agricoltura, e si stima che ogni anno ne vengano immesse nella biosfera circa 2.000.000 tonnellate, perturbando in modo grave e considerevole i normali equilibri ambientali.

I pesticidi si accumulano nel suolo e nelle acque di falda esercitando la loro attività antibiotica su organismi animali o vegetali; possono creare problemi alla biodiversità, causando la morte di organismi utili come antagonisti dei parassiti delle piante o insetti impollinatori, e contribuire al fenomeno del bio-accumulo attraverso la catena alimentare. L'azione tossica dei pesticidi colpisce anche l'uomo, contaminando i cibi e l'ambiente in cui vive. Di fondamentale importanza è quindi lo sviluppo di strategie agricole che minimizzino l'uso dei pesticidi. Una possibile risoluzione potrebbe essere rappresentata dall'utilizzo di soluzioni elettrochimicamente attivate (AEA). Queste presentano scarso impatto ambientale, basso livello di residui sui prodotti agricoli destinati al consumo e ancor più scarsa tossicità nei confronti dell'uomo e degli animali, visto che non contengono agenti chimici pericolosi. Presentano inoltre proprietà antimicrobica verso funghi, batteri, virus ed alcune forme di parassiti animali, grazie alla presenza di ingredienti attivi aventi nota attività biocida, come l'acido ipocloroso (HOCl) e lo ione ipoclorito (OCl⁻).

La soluzione elettrochimicamente attivata (AEA), in virtù della sua comprovata azione antimicrobica e antifungina, è stata provata sia su piante di tabacco, utilizzate come modello in biologia molecolare, che su piantagioni di effettivo interesse in Ecuador, quale quella del pomodoro.

Sulla base dei risultati ottenuti, e precedentemente discussi, è possibile trarre alcune importanti considerazioni:

- I dati molecolari ottenuti indicano che i trattamenti con le sostanze ottenute mediante tecnologia elettrochimica (tanto l'AEA quanto l'ipoclorito di sodio) a pH 6,5 sono capaci di innescare una modulazione genica difensiva in entrambe le specie investigate.
- Su tabacco, un secondo trattamento dopo 14 giorni, con AEA a 250 mg/L di cloro attivo, è in grado d'innescare una sorta di "effetto di potenziamento", inducendo un'attivazione genica molto potente.
- Le prove di campo indicano che il trattamento con AEA contenente cloro attivo a 400 ppm è efficace contro l'oidio.
- Il trattamento con cloro attivo a 400 ppm non altera in modo statisticamente significativo né le proprietà organolettiche del frutto, né le caratteristiche del suolo (in termini di concentrazione di cloro totale e cloruri).
- Se la regolazione del pH della soluzione AEA viene effettuata mediante aggiunta di fosfato diacido di potassio, la quantità di RNAm relazionata con i geni che codificano le proteine relazionate con la patogenesi risulta incrementata.
- Il trattamento con soluzione ipoclorito di sodio a 400 ppm di cloro attivo è quello che maggiormente attiva i geni PR1a, rispetto alla soluzione fungicida myclobutanyl, e all'estratto acquoso della pianta *Equisetum arvense*.

Si può pertanto affermare che le soluzioni AEA, ottenute mediante tecnologia elettrochimica avanzata, possiedono capacità di fitoprotezione delle piante di pomodoro contro i patogeni, unitamente ad una bassa fitotossicità e ad una considerevole efficacia nell'attivare le difese molecolari delle piante. La ripetizione delle applicazioni può incrementare gli effetti, favorendo una migliore risposta agli stress biotici. Il basso costo e l'assenza di rischi ambientali fanno sì che tali soluzioni rappresentino una promettente alternativa ai pesticidi convenzionali.