

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

Misure respirometriche in un microcosmo biotico per il rilevamento della CO₂



Relatori

prof.ssa Demichela Micaela

prof.ssa Bosco Francesca

Candidato

Laura Ferro

Novembre 2023

Indice

1. Introduzione.....	1
1.1 Il mercato delle nocciole e la contaminazione da micotossine	1
1.2 Micotossine e pericoli ad essi associati	1
1.3 Casi di contaminazione da Aflatossine (AF).....	2
1.4 Scopo della tesi.....	4
2. Micotossine.....	5
2.1 Micotossine: pericolo di rilevanza mondiale.....	5
2.1.1 Micotossine nelle nocciole: dalla raccolta al prodotto finale	6
2.1.2 Aflatossine.....	6
2.2 Funghi produttori di micotossine.....	7
2.3 Fattori associati alla contaminazione.....	7
2.4 Legislazione in merito alle micotossine	8
2.5 Metodi di rilevamento delle micotossine.....	9
2.5.1 Rilevamento di AF nelle nocciole in Italia.....	9
3. Criteri di allertamento.....	11
3.1 Criteri di allertamento per la valutazione delle micotossine nelle nocciole	11
3.2 Fattori interni ed esterni alla filiera produttiva	11
3.3 Descrizione del modello	12
3.3.1 Temperatura e umidità relativa (pre-raccolta).....	13
3.3.2 Raccolta ed essiccazione	13
3.3.3 Condizioni di stoccaggio e trasporto	14
3.3.4 Varietà di raccolto e danni alle colture.....	15
4. Materiali e metodi.....	17
4.1 Microcosmi.....	17
4.1.1 Parametri monitorati all'interno dei microcosmi	17
4.1.2 Allestimento dei microcosmi	18
4.2 Analisi respirometriche.....	20
4.2.1 Valutazione della CO ₂ prodotta [mg]	20
4.2.2 Valutazione dell'RO ₂ mediante RESPIROMETRIC Sensor.....	21
4.3 Analisi delle aflatossine.....	21
4.3.1 Preparazione del campione	21
4.3.2 Determinazione delle aflatossine	22
4.3.3 Lettura Spettrofotometrica dei campioni	23
4.4 Descrizione delle prove effettuate	23

5. Risultati e discussione	26
5.1 Analisi Respirimetriche	26
5.1.1 Visualizzazione dello sviluppo della biomassa nel tempo	31
5.2 Effetto della geometria del microcosmo sulla crescita microbica	34
5.3 Velocità specifica di consumo di O ₂ (RO ₂) e QR.....	36
5.4 Valori cumulati di O ₂ consumato e CO ₂ prodotta in mg/kg di nocciole	38
5.5 Effetti della temperatura sulla Respirimetria	40
5.6 Determinazione delle aflatossine.....	42
5.7 Confronto tra la CO ₂ prodotta e i valori di aflatossine	44
6. Monitoraggio continuo tramite sensore BME688.....	47
6.1 Gestione della sicurezza alimentare	47
6.1.1 Rete di raccolta dati.....	47
6.2 Sensore BME688.....	47
6.2.1 Output forniti dal sensore.....	48
6.3 Test del sensore in un microcosmo biotico	49
6.3.1 Test 1-Misura della CO ₂	51
6.4 Composti organici volatili (VOC)	55
6.4.1 Misura indiretta della crescita fungina mediante i VOC.....	55
6.4.2 Test 2-Misura dei VOC e della CO ₂	56
6.5 Risultati test 1 e 2	60
7. Conclusioni e sviluppi futuri	61
Riferimenti bibliografici.....	63
<i>Ringraziamenti</i>	66

1. Introduzione

1.1 Il mercato delle nocciole e la contaminazione da micotossine

Il maggiore pericolo associato alla filiera delle nocciole è rappresentato dalle micotossine, contaminanti naturali, prodotte dal metabolismo secondario di funghi filamentosi appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. [1]

La presenza di micotossine negli alimenti è un problema di rilevanza mondiale che costituisce una seria minaccia in quanto in grado di causare patologie sia acute che croniche.

L'elevato consumo delle nocciole, utilizzate come ingrediente chiave nei prodotti da forno e dolciari a livello globale, ne ha consolidato l'importanza economica, suscitando crescenti preoccupazioni per la salute dei consumatori. Ciò è dovuto al fatto che le micotossine sono molto difficili da eliminare dalla catena alimentare, in quanto relativamente stabili al calore e dunque in grado di resistere alle normali condizioni di cottura o ai processi dell'industria alimentare quali la pastorizzazione. Ciò causa una grande perdita di prodotto, oltre a costituire un pericolo per la salute. Si stima che il 25% dei raccolti globali sia contaminato da funghi, alcuni dei quali potenzialmente capaci di produrre micotossine [2].

Il nocciolo (*Corylus avellana* L.) è una pianta originaria dell'area del mediterraneo e della penisola Balcanica, diffusi poi in tutta Europa e nel nord America.

Tra le specie più rilevanti troviamo *Corylus avellana*, conosciuta come nocciolo comune, *Corylus maxima* e *Corylus colurna*, nota anche come nocciolo turco. Nel nocciolo, il prodotto consumato non è il frutto in sé, ma il seme (la noce) che contiene.

L'Italia costituisce il secondo produttore di nocciole (preceduto dalla Turchia), coprendo il 22% del mercato globale, seguita da Stati Uniti con il 5% e Spagna con il 3% (FAOSTAT, 2013). La produzione di nocciole è diffusa in tutta Italia, con coltivazioni principali (in ordine di superficie utilizzata) nel Lazio, Piemonte, Campania e Sicilia (ISTAT 2020).

In Italia sono presenti due varietà di nocciole riconosciute con il marchio IGP (Indicazione Geografica Protetta): la Tonda delle Langhe (piemontese) e la Tonda di Giffoni (campana).

Nel panorama alimentare, le nocciole, rivestono un'importanza rilevante per la salute e l'alimentazione umana grazie al loro valore nutrizionale. Infatti, nel 2003 la "Food and Drug Administration" (FDA), ha riconosciuto le nocciole come alimento benefico per il cuore.

1.2 Micotossine e pericoli ad essi associati

Le micotossine più rilevanti per il loro impatto sulla salute umana ed animale e sull'agricoltura globale includono: aflatossine (AF), ocratossina A (OTA), zearalenone (ZEA), fumonisine (FUM), deossinivalenolo (DON) e altri tricoteceni ed infine patulina [2].

Le AF più importanti vengono identificate come B1, B2, G1 e G2. In particolare, l'AFB1 è stata classificata dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) come un cancerogeno di Gruppo 1 [3].

Si è stimato che esse siano collegate al 28% dei casi di carcinoma epatocellulare, (tumore al fegato più comune) e possono inoltre causare intossicazioni, indebolire la risposta immunitaria e ritardare la crescita nei bambini [4].

I risultati di una revisione di valutazione del rischio [5] pubblicate tra il 2016 e il 2022, sulla base di 2812 notifiche di incidenti da AF registrati da RASFF (Sistema di allarme rapido per alimenti e mangimi), hanno evidenziato un significativo rischio potenziale per la salute derivante principalmente dalle categorie di prodotti e alimenti quali noci, prodotti a base di frutta a guscio e semi oleosi. La percentuale di incidenti RASFF relativi alla sicurezza alimentare associati a questa categoria di alimenti è pari al **74,28%**.

Per le nocciole, la % di Notifiche RASFF analizzate in questo studio è pari al 9,28 % mentre la % più elevata (40,04%) è riferita alle arachidi seguita dai pistacchi (18,10%) (Figura 1.1).

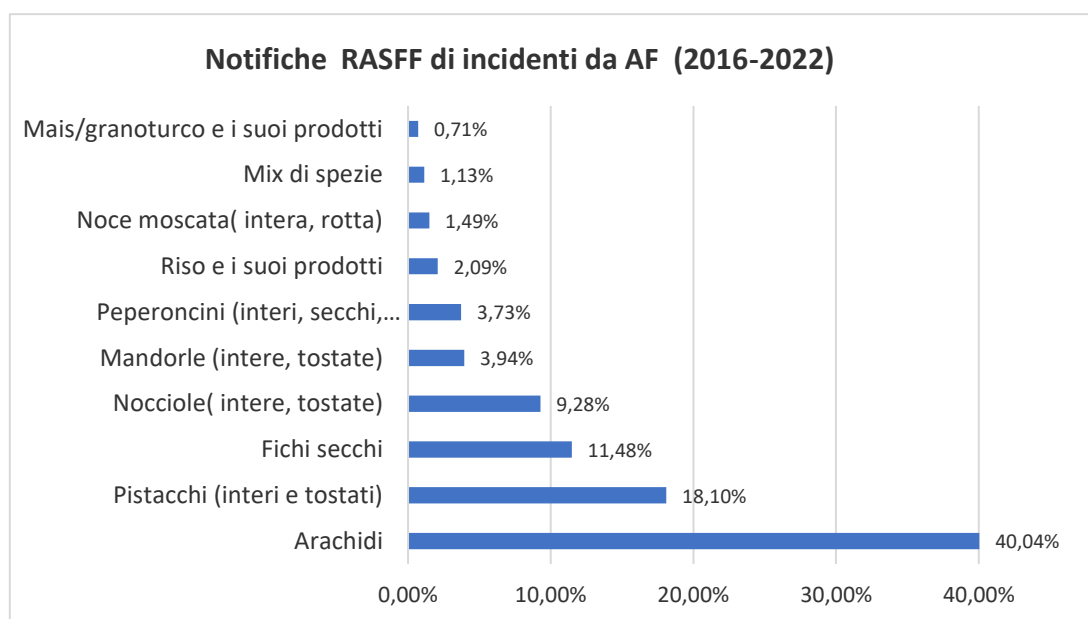


Figura 1.1 Notifiche RASFF (%) di incidenti da aflatossine [5]

È emersa dunque la necessità di condurre ulteriori valutazioni del rischio nei paesi con un elevato numero di segnalazioni RASFF relative alla contaminazione da micotossine, tra cui Turchia, Stati Uniti, Argentina, Cina e India.

1.3 Casi di contaminazione da Aflatossine (AF)

Un'indagine [6] condotta dall'Autorità Marittima del Porto Doganale di Salerno nel periodo 2008-2009, relativa alla presenza di aflatossine nei prodotti importati dall'Italia da diversi Paesi, ha evidenziato che un campione su cinque di pasta di nocciole superava i limiti fissati dal Regolamento (UE) N. 165/2010

Infatti, per le nocciole destinate al consumo umano diretto, è stato fissato un limite di 2 µg/kg per l'AFB1e di 4 µg/kg per le AF totali (B1, B2, G1 e G2). In presenza di trattamenti fisici prima del consumo umano o dell'utilizzo come ingrediente per prodotti alimentari, i limiti fissati sono di 5 µg/kg per l'AFB1 e 10 µg/kg per le AF totali.

N° di campioni	Tipologia	AF tot [µg/kg]
1	Pasta di nocciole	1,07
2	Pasta di nocciole	1,26
3	Pasta di nocciole	1,77
4	Pasta di nocciole	1,19
5	Pasta di nocciole	6,3

Tabella 1.1 Campioni di pasta di nocciola contaminati da AF

Inoltre, tutti e cinque i campioni di pasta di nocciole, che si ottiene macinando le nocciole tostate fino ad ottenere una consistenza viscosa, sono risultati contaminati da AF (Tabella 1.1).

In un ulteriore studio effettuato su 93 campioni di nocciole intere (con guscio, decorticate, crude e tostate), acquistate nel Nord Italia ma provenienti dall'Italia, Turchia, Stati Uniti e Spagna è stato rilevato che il contenuto di AF nei campioni turchi era pari 0,33 µg/kg mentre in quelli italiani era pari a 0,14 µg/kg (Tabella 1.2) [7]. Un campione di nocciole con guscio proveniente dagli Stati Uniti presentava il più alto livello di contaminazione da AF pari a **1,16 µg/kg** (soprattutto AFG1). Tutti i valori ottenuti in questo studio erano tuttavia al di sotto dei limiti imposti dal Regolamento CE 165/2010. Infatti, negli Stati Uniti, la Food and Drug Administration (FDA) ha fissato per le nocciole un limite di 20 µg/kg per le aflatossine totali (B1, B2, G1 e G2).

Nocciole	Campioni	Positivi	Media AF [µg/kg]
Italiane	78	28	0,14
Turche	9	6	0,33
Altri paesi	6	1	0,19

Tabella 1.2 Campioni di nocciole contaminate da AF

L'incidenza maggiore (**45%**) di campioni positivi è stata riscontrata nella granella e farina di nocciola (caratterizzata tuttavia dal livello più basso di AF pari a **0,53 µg/kg**) mentre quella più bassa nelle nocciole crude decorticate.

1.4 Scopo della tesi

La necessità di prevedere la potenziale presenza di micotossine associate alla contaminazione fungina ha portato all'analisi di parametri interni ed esterni alla catena di produzione delle nocciole; lo scopo è quello di evidenziare le criticità associate alle diverse fasi di produzione evitando che questo pericolo diventi un vero e proprio rischio per la salute umana [8].

Nel terzo capitolo della seguente tesi sono stati dunque analizzati i fattori interni ed esterni alla filiera delle nocciole, con lo scopo di identificare le possibili condizioni che favoriscono la produzione di aflatossine su tale matrice alimentare.

Questo modello concettuale (non ancora validato) mira a fornire un valido strumento per supportare i valutatori del rischio e/o i gestori del rischio del governo e/o dell'industria con l'obiettivo di orientare misure appropriate da intraprendere al fine evitare che questa minaccia si trasformi in un rischio concreto per la salute umana.

Nella sezione sperimentale del seguente lavoro di tesi è stato monitorato un parametro utile per la previsione precoce dell'attività metabolica di funghi produttori di aflatossine nelle nocciole. Si tratta della CO₂ prodotta dalla biomassa fungina in un sistema chiuso. Infatti, questo parametro "di allerta" che indica la possibile contaminazione da micotossine potrebbe rivelarsi molto utile per migliorare la gestione post-raccolta delle nocciole.

Lo scopo di tale sperimentazione è quello di correlare la CO₂ prodotta con la concentrazione di aflatossine prodotte dal metabolismo secondario dei funghi sviluppati sul monolayer di nocciole.

Per procedere con tale verifica, sono state allestite diverse prove di laboratorio che prevedevano l'incubazione di un monolayer di nocciole all'interno di microcosmi.

In particolare, si sono considerate due diverse geometrie di microcosmo, una cilindrica caratterizzata da un volume di 1,062 l e una tronco-conica di 1,050 l.

L'analisi respirometria associata alla crescita fungina è stata analizzata nel quarto e quinto capitolo, distinguendo attraverso l'analisi di prove effettuate in due diverse condizioni di temperatura, ovvero a temperatura ambiente non controllata e a temperatura costante di 25°C.

I principali parametri analizzati nella seguente sperimentazione sono stati determinati mediante:

- Valutazione della CO₂ prodotta nel tempo
- Valutazione della velocità specifica di consumo di O₂ (RO₂)

La misura della CO₂ [mg] prodotta durante l'incubazione è stata effettuata in modo discontinuo tramite la sua cattura nella soluzione di NaOH presente all'interno dei microcosmi e alla successiva titolazione. La velocità specifica di consumo di ossigeno (RO₂) è stata ottenuta attraverso una equazione che sfrutta la differenza di pressione registrata dal RESPIROMETRIC Sensor all'interno dei microcosmi. Ciò ha consentito di calcolare l'ossigeno consumato dalla biomassa durante la sua crescita.

L'ultimo capitolo della presente tesi tratta del sensore BME688, testato all'interno dei microcosmi con lo scopo di avere una misura continua della CO₂ prodotta in quanto parametro utilizzato come "indicatore" della crescita fungina e della conseguente produzione di micotossine.

2. Micotossine

2.1 Micotossine: pericolo di rilevanza mondiale

Bennett ha definito le micotossine come prodotti naturali generati da funghi che, anche a basse concentrazioni, possono causare reazioni tossiche nei vertebrati superiori e in altri animali [9]. Il termine "micotossina" deriva dalla combinazione della parola greca "mykes", che significa "fungo", e della parola latina "toxicum", che significa "veleno".

Le micotossine possono essere presenti in vari prodotti agricoli, tra cui cereali, arachidi, uva, vini, noci, frutta secca, caffè, cacao, spezie, semi oleosi, frutta e altre colture foraggere (Figura 2.1).

La presenza di micotossine negli alimenti è un problema di rilevanza mondiale che costituisce una seria minaccia in quanto in grado di causare patologie sia acute che croniche.

In particolare, nei Paesi in via di sviluppo, la combinazione di un controllo qualitativo insufficiente, tecnologie di produzione limitate e cattive condizioni di conservazione favoriscono la proliferazione di funghi con la conseguente produzione di micotossine [11].

Inoltre, le micotossine sono molto difficili da eliminare dalla catena alimentare, causando una perdita di prodotto e danni economici, oltre a costituire un pericolo per la salute [10].

Le micotossine più rilevanti per il loro impatto sulla salute umana ed animale e sull'agricoltura globale includono: aflatossine (AF), ocratossina A (OTA), zearalenone (ZEA), fumonisine (FUM), deossinivalenolo (DON) e altri tricoteceni e patulina [2].

Le più pericolose sono le aflatossine, in grado di contaminare molti alimenti con effetti cancerogeni, genotossici, teratogeni, nefrotossici ed epatotossici [11].

Le AF più importanti vengono identificate come B1, B2, G1 e G2. In particolare, l'AFB1 è stato classificato dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) come un cancerogeno di Gruppo 1 [3].

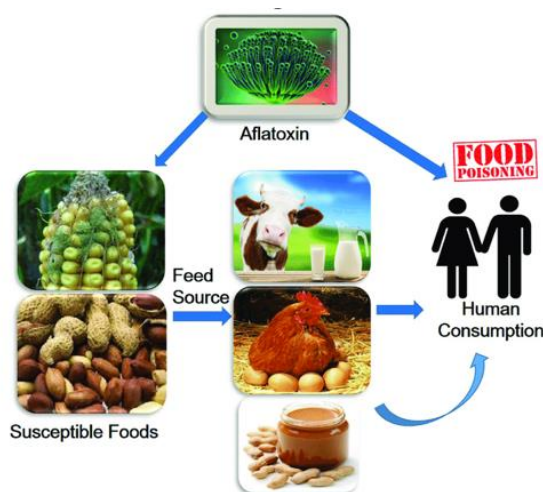


Figura 2.1 Contaminazione da Aflatossine. Figura tratta da Kumar, P., *et al.*, 2017, Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management.

2.1.1 Micotossine nelle nocciole: dalla raccolta al prodotto finale

Il maggiore pericolo associato alla filiera delle nocciole è rappresentato dalle micotossine, metaboliti secondari tossici di basso peso molecolare prodotti da funghi filamentosi.

La presenza di nutrienti quali lipidi e carboidrati nelle nocciole favorisce lo sviluppo di funghi patogeni e saprofiti in grado di produrre micotossine. Le nocciole sono infatti caratterizzate da una grande componente lipidica (tra il 55% e il 70% del peso secco) e in particolare da acidi grassi mono e polinsaturi, specialmente acido oleico e linoleico mentre risultano povere di acidi grassi saturi [1]. Ricche di macronutrienti tra cui proteine (11-17 %) e carboidrati (10-22 %), le nocciole forniscono anche un buon apporto di fibre e vitamine (tra cui le vitamine C ed E) oltre ad essere caratterizzate da antiossidanti come flavonoidi, tocoferoli, polifenoli e squalene. Secondo i dati ARPA (2013), l'analisi della frutta secca, frutta a guscio e relativi derivati, ha evidenziato un tasso di contaminazione da aflatossine pari a 20% e 58 % rispettivamente, anche se al di sotto dei limiti di legge fissati. In particolare, le nocciole presentavano un livello di contaminazione dell'81% mentre le castagne raggiungono l'89%.

La contaminazione da micotossine può avvenire durante l'intero processo di produzione delle nocciole, dal campo al prodotto finale [7]. Questo rischio è particolarmente elevato dopo la rimozione del guscio, che funge da protezione contro i funghi. Infatti, qualsiasi danno al guscio, derivante da insetti, screpolature naturali o danni meccanici durante la raccolta, può aumentare la probabilità di contaminazione fungina e di conseguenza, la formazione di aflatossine.

Inoltre, condizioni inadeguate di coltivazione, raccolta, essiccazione, manipolazione, imballaggio, stoccaggio e trasporto ne influenzano la contaminazione [8].

2.1.2 Aflatossine

La frutta a guscio è un prodotto con un rischio da moderato ad alto di contaminazione da aflatossine (AF) perché prodotte in condizioni ambientali che favoriscono la crescita dei funghi e la produzione di AF da parte dei funghi aflatossigeni [12].

Le aflatossine sono una classe di metaboliti secondari strettamente correlati dal punto di vista strutturale (Figura 2.2) e sono sostanze tossiche prodotte principalmente da *A. flavus* e *A. parasiticus*. Tuttavia, mentre l'*A. flavus* genera esclusivamente aflatossine B1 (AFB1) e B2 (AFB2), l'*A. parasiticus* è in grado di produrre AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 [3].

Le lettere B e G derivano dalle iniziali delle parole inglesi "blue" e "green" che fanno riferimento al tipo di fluorescenza emessa da tali sostanze quando sottoposte a luce ultravioletta. In Italia, le principali problematiche relative alle aflatossine derivano dall'importazione di prodotti alimentari provenienti da Paesi con un clima caldo-umido, che facilita la loro formazione. Inoltre, cattive pratiche agronomiche o condizioni di stoccaggio e trasporto non ottimali aumentano il rischio di contaminazione da parte di AF [7].

Le AF manifestano proprietà cancerogene, teratogene, epatotossiche, mutagene e immunosoppressive provocando effetti correlati sia a fenomeni di tossicità acuta che cronica nell'uomo e negli animali. Infatti, si è stimato che essi siano responsabili del 28% del totale dei casi mondiali di carcinoma epatocellulare (HCC), la forma più comune di cancro al fegato [4].

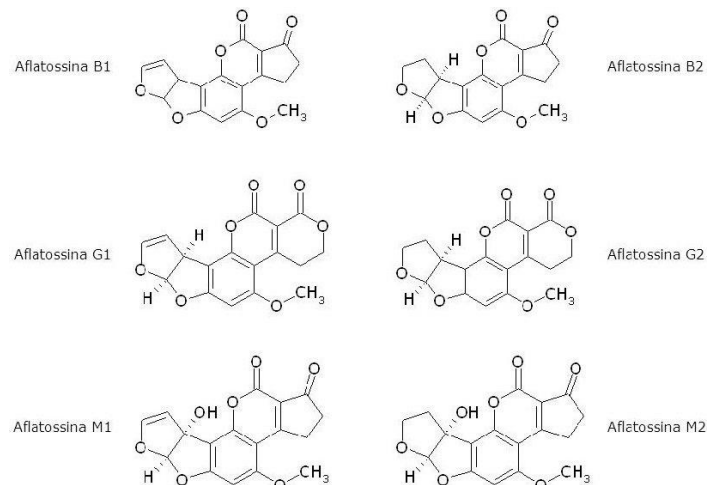


Figura 2.2 Struttura delle Aflatossine.

Tratta da <https://www.rivistadiagraria.org/articoli/anno-2019/rischio-tossicologico-micotossine-negli-animali-nelluomo/?print=print>

2.2 Funghi produttori di micotossine

I principali funghi presenti nella frutta secca appartengono ai generi *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Il genere *Fusarium* è maggiormente presente in campo mentre i restanti due sono riscontrabili principalmente nelle fasi post raccolta. I generi fungini principalmente isolati dalle nocciole nelle diverse fasi produttive sono: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*. La letteratura, fa riferimento alla presenza di *A. flavus* e *A. parasiticus* come principali produttori di aflatossine in questa matrice alimentare. Tuttavia, anche il genere *Penicillium* è risultato presente in campioni di nocciole turche e italiane, la maggior parte delle quali erano nocciole essiccate [1].

La maggiore incidenza di *A. flavus*, rispetto a *A. parasiticus*, dipende probabilmente dalla sua capacità di adattarsi alle parti aeree delle piante oltre che al suolo (EFSA 2007). Inoltre, è in grado di sopravvivere come agente patogeno e saprofita prima e dopo la raccolta in quanto fungo xerofilo in grado di resistere a stress ambientali quali la bassa attività dell'acqua, consentendogli di competere e spesso prevalere su altre specie fungine [4].

2.3 Fattori associati alla contaminazione

Temperatura, umidità, ambiente, pH, attività dell'acqua (a_w), nutrienti, tipo di substrato, stato fisiologico e interazioni microbiche costituiscono importanti fattori che determinano la crescita dei funghi e la produzione di micotossine [11].

Inoltre, fattori chimici (impiego di fungicidi e fertilizzanti), biologici, dovuti ad esempio a situazioni di stress quali siccità, variazioni di temperatura e umidità che influenzano il metabolismo dei funghi, e fisici (metodi di raccolta e lavorazione) contribuiscono alla contaminazione e alla produzione di micotossine.

Le temperature ideali per lo sviluppo dei funghi sono generalmente comprese tra 15 e 30 °C con un optimum di 20-25 °C mentre i valori di pH sono compresi tra 3 e 8 (con un pH ottimale pari a 5).

Il genere *Aspergillus* si adatta a temperature di 30 e i 40 °C e richiede un a_w di 0,73 per una crescita ottimale mentre il genere *Penicillium* presenta una buona crescita a temperature più basse (tra i 25 e i 30 °C) e necessita di a_w tra 0,78 e 0,80.

Un altro parametro rilevante che influenza la contaminazione è l'attività dell'acqua (a_w), che rappresenta la parte attiva del contenuto di umidità del substrato (rispetto all'umidità totale che invece include anche l'acqua legata).

La colonizzazione fungina, si verifica più frequentemente di quella batterica in quanto avviene per valori di a_w inferiori a 0,85 con un valore minimo di 0,61.

La produzione di funghi tossigeni, responsabili dello sviluppo delle micotossine, presenta dei limiti più delineati che dipendono dalla natura del substrato oltre che dalle condizioni ambientali. Ad esempio, la produzione delle micotossine è favorita da livelli di a_w superiori a quelli richiesti per lo sviluppo fungino. Infatti, mentre il valore minimo di a_w per la crescita dei funghi tossigeni è di 0,79, quello necessario per la produzione delle tossine varia da 0,80 fino a 0,99 nel caso della produzione di patulina [13].

L'Aspergillus flavus e *l'Aspergillus parasiticus*, principali generi fungini presenti nelle nocciole, sono caratterizzati da valori ottimali di temperatura compresi rispettivamente tra **28-35°C**, e **33-35°C** mentre per entrambi il valore ottimale di a_w è pari a **0,95-0,99** [14].

Uno studio effettuato sulla crescita di *A. flavus* e sulla produzione di AF sulla frutta a guscio (pistacchi e castagne) ha evidenziato che la temperatura costituisce il fattore ambientale maggiormente responsabili della contaminazione durante lo stoccaggio [4].

Nel caso dei pistacchi la temperatura si è dimostrata un fattore chiave che influenza la produzione di AF. Per le castagne è stato evidenziato che la temperatura ideale per la proliferazione fungina è di 30°C mentre le massime concentrazioni di AFB1 e AFB2 sono state rilevate a 40°C. Dunque, nonostante le condizioni di temperatura non fossero ideali per la crescita fungina, la biosintesi di AF è avvenuta in modo ottimale. Infatti, le condizioni ottimali di crescita fungina non coincidono con quelle per la produzione di micotossine [3].

2.4 Legislazione in merito alle micotossine

Nei diversi Paesi del mondo, le micotossine, così come gli altri contaminanti alimentari, sono soggette a normative che riguardano i limiti specifici consentiti per alimenti, mangimi e materie prime e forniscono inoltre linee guida sui metodi di campionamento e di analisi da adottare all'interno della Comunità Europea. Il processo di campionamento è disciplinato dal Regolamento (CE) 178/2010 della Commissione Europea.

In particolare, quest'ultimo, si riferisce ai diversi metodi di campionamento per cereali e prodotti derivati, frutta secca, spezie, latte e prodotti derivati, caffè e relative lavorazioni, succhi di frutta, derivati di mela e alimenti per l'infanzia (Commissione Europea, 2014) [2].

Il campionamento delle nocciole risulta una procedura complessa a causa dell'eterogeneità della contaminazione che può essere distribuita nelle varie derrate alimentari e soprattutto a causa delle basse concentrazioni dei contaminanti (ppm, ppb o ppt) ad esse associate.

Ad esempio, un singolo seme di arachidi fortemente contaminato da aflatossine in un campione da 10 kg è riuscito a provocare una contaminazione da AF che è al di fuori dei limiti consentiti dalla normativa europea [15].

Il Regolamento (CE) n. 178/2002 ha stabilito per la prima volta i principi ed i requisiti generali della legislazione alimentare regolamentando ogni fase della produzione, elaborazione e distribuzione di alimenti e mangimi.

Successivamente, il Regolamento (CE) n. 1881/2006, in cui sono stati fissati i livelli massimi per le principali micotossine (AF, OTA, Patulina, DON, ZEN, FB, tossine T-2 e HT-2) nei prodotti destinati al mercato, è stato modificato con i regolamenti (UE) n. 165/2010 in relazione ai livelli specifici di aflatossine (AF). Questi definiscono i livelli massimi in alimenti quali arachidi, altri semi oleosi, frutta a guscio, frutta secca, riso, mais e cereali.

Per le nocciole è stato fissato un limite di 2 µg/kg per l'AFB1 e di 4 µg/kg per le AF totali (B1, B2, G1 e G2). In presenza di trattamenti fisici prima del consumo umano o dell'utilizzo come ingrediente per prodotti alimentari, i limiti sono di 5 µg/kg per l'AFB1 e 10 µg/kg per le AF totali. Negli Stati Uniti, la Food and Drug Administration (FDA) ha fissato per nocciole un Livello di Azione di 20 µg/kg per le aflatossine totali (B1, B2, G1 e G2).

2.5 Metodi di rilevamento delle micotossine

I metodi tradizionali per la rilevazione delle micotossine comprendono la gascromatografia (GS), la cromatografia su strato sottile (TLC) e la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) che può essere accoppiata con rilevatori a raggi ultravioletti (UV), a fluorescenza (FLD) o alla spettrometria di massa (MS).

La TLC, primo metodo cromatografico ad essere utilizzato per la determinazione delle micotossine, viene utilizzata come metodo di screening visivo rapido per alcune micotossine per consentirne una valutazione qualitativa. Tuttavia, la necessità di quantificare, con un'elevata sensibilità e selettività le diverse micotossine negli alimenti, ha portato all'utilizzo di metodi cromatografici come l'HPLC accoppiata con rilevatori UV e FLD o alla MS [16].

Tra i metodi immunologici per la rilevazione delle micotossine vi è ELISA (enzime-linked immunosorbent assay). Il metodo ELISA risulta meno costoso, più semplice da usare, e richiede meno tempo rispetto alle tecniche HPLC, le quali però offrono una maggiore affidabilità nella quantificazione dell'analita. Infatti, tra gli svantaggi dell'uso del kit ELISA vi sono: possibili risultati di falsi negativi/positivi, problemi di interferenza matriciale e reazione incrociata con le micotossine [17].

2.5.1 Rilevamento di AF nelle nocciole in Italia

Considerando gli studi sul monitoraggio di AF prodotti a base di nocciole, di seguito è stato analizzato un articolo [7] che tratta di un'analisi condotta su campioni di nocciole con lo scopo di quantificarne le AF totali (B1, B2, G1, G2) presenti.

L'analisi di questo articolo è motivata dal fatto che sono stati presi in considerazione il più ampio numero di campioni di nocciole in Italia. I 93 campioni di nocciole intere analizzate (con guscio, decorticate, crude e tostate), sono state acquistate nel Nord Italia e provenivano dall'Italia, Turchia, Stati Uniti e Spagna.

Il metodo di rilevazione utilizzato è la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS-MS) con ionizzazione elettrospray (ESI).

L'analisi sui campioni di nocciole analizzati di peso 0,5 kg (tra cui anche la granella e farina di nocciole) ha mostrato che 35 campioni su 93 (37,6%) erano contaminati da AF con una maggiore incidenza nelle nocciole provenienti dalla Turchia (66,7%) rispetto a quelle di origine italiana (35,9%). In particolare, il contenuto di AF nei campioni turchi era pari **0,33 µg/kg** mentre in quelli italiane era pari a **0,14 µg/kg** e **0,19 µg/kg** nei restanti.

Il livello di contaminazione più elevato è stato riscontrato nelle nocciole con guscio a causa di un campione proveniente dagli Stati Uniti che presentava il più alto livello di contaminazione da AF pari a **1,16 µg/kg** (soprattutto AFG1). Tutti i valori ottenuti in questo studio si presentavano tuttavia al di sotto dei limiti imposti dal Regolamento CE 165/2010.

3. Criteri di allertamento

3.1 Criteri di allertamento per la valutazione delle micotossine nelle nocciole

Numerosi sono i fattori che influenzano la contaminazione fungina e il conseguente sviluppo di micotossine ad esso associato. In particolare, temperatura e a_w (attività dell'acqua) sono stati identificati come due fattori limitanti durante lo stoccaggio in uno studio effettuato sulla crescita di *A. flavus* [4].

Da ciò deriva la necessità di analizzare i principali fattori che influenzano la contaminazione nell'intera filiera delle nocciole al fine di sviluppare strategie di prevenzione e controllo per evitare che questo pericolo diventi un vero e proprio rischio per la salute umana.

Nella presente tesi è stato dunque effettuato lo studio di un modello concettuale (non ancora validato) [8] che mira a fornire un valido strumento per supportare i valutatori del rischio e/o i gestori del rischio del governo e/o dell'industria con l'obiettivo di orientare misure appropriate da intraprendere per prevenire la contaminazione da aflatossine.

Infatti, l'utilizzo di indicatori monitorati continuamente o misurati in determinati punti temporali, a cui sono associate le corrispondenti categorie di rischio e un punteggio corrispondente al rischio di insorgenza di micotossine, possono essere utilizzati come criteri di allertamento nell'ottica di garantire una maggiore sicurezza alimentare.

3.2 Fattori interni ed esterni alla filiera produttiva

Il modello a “semaforo” analizzato nel seguente capitolo [8], evidenzia che fattori esterni (Figura 3.1) alla filiera di produzione delle nocciole sono in grado di contribuire ad un aumento del rischio di contaminazione.

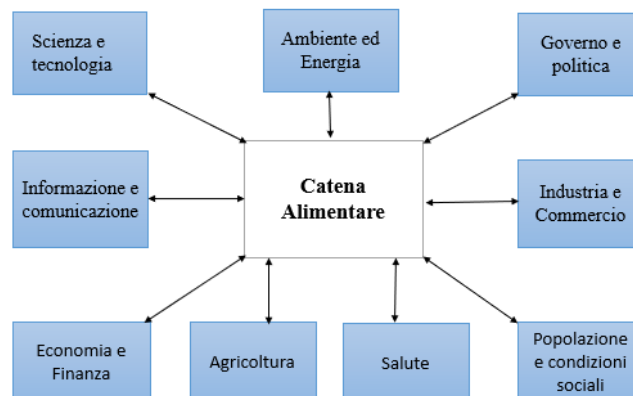


Figura 3.1 Fattori esterni alla catena alimentare tratto da Jeurissen *et al.*[8] con modifiche

L'approccio olistico su cui si basa il modello, ottenuto attraverso l'integrazione di fattori sia interni che esterni alla catena produttiva, consente l'identificazione dei fattori responsabili di un aumento del rischio derivante dalla contaminazione.

Tale modello, descritto precedentemente da *Noteborn*, utilizza i fattori indicati in Figura 3.1.

Tuttavia, i settori influenti considerati per l'identificazione degli indicatori del modello qui analizzato sono: "Catena alimentare", "Ambiente ed energia" ed "Agricoltura".

3.3 Descrizione del modello

Il modello analizzato di seguito si presenta come un foglio di calcolo Excel ed è facilmente interpretabile dall'utente che è in grado di determinare come viene derivato il rischio complessivo di insorgenza delle micotossine. La flessibilità del modello consente l'adattamento ad altri tipi di frutta a guscio determinando e includendo le categorie di rischio, i valori limite e i fattori di importanza specifici per merce.

I componenti del seguente modello si basano su dati di letteratura, studi effettuati su campi di nocciole e studi di esperti che hanno selezionato i principali indicatori per l'identificazione precoce delle micotossine.

Il seguente "modello a semaforo" utilizza indicatori rilevanti di tipo qualitativo, semiquantitativi o quantitativi monitorati continuamente o misurati in determinati punti temporali.

Gli indicatori utilizzati in questo modello sono:

1. temperatura e umidità relativa (pre-raccolta)
2. raccolto e l'essiccazione
3. condizioni di stoccaggio e trasporto
4. varietà delle colture e danni alle colture

Ogni indicatore presenta due o tre categorie di rischio a cui sono associati i valori di allerta corrispondenti indicati con "rosso", "giallo" o "verde" e riferiti rispettivamente a un rischio di contaminazione alto, intermedio o basso. La presenza di più indicatori con un valore di avviso giallo o rosso indica una maggiore probabilità che si verifichi un determinato pericolo.

Per la temperatura, che costituisce un indicatore continuo, sono stati definiti dei valori soglia per distinguere tra le categorie di rischio.

Il risultato di questo modello può essere ulteriormente perfezionato incorporando fattori aggiuntivi, tra cui fattori di importanza, di relazione e i fattori di urgenza.

In questo studio sono stati considerati i soli fattori di importanza (utilizzati per pesare gli indicatori in base alla loro importanza predittiva rispetto al verificarsi del pericolo) che, in questo caso costituiscono dei fattori di importanza provvisoria in quanto fanno riferimento a giudizi di esperti ottenuti in mancanza di dati adeguati (ad esempio riguardo gli studi sul campo). Per questi indicatori sono stati definiti alcuni sotto-indicatori misurabili che rappresentano i parametri del modello.

3.3.1 Temperatura e umidità relativa (pre-raccolta)

Temperatura e l'umidità relativa durante la coltivazione costituiscono due indicatori strettamente correlati e vengono dunque considerati in combinazione (Tabella 3.1).

A partire dai dati di letteratura, in cui si riporta che le condizioni di temperatura e umidità relativa ottimali per la produzione di aflatossine nella frutta a guscio sono rispettivamente di 25-30°C e 97-99% e che le condizioni di stress come la siccità ne favoriscono la contaminazione, sono stati definiti due sotto-indicatori indicati con **(a)** e con **(b)** che rappresentano rispettivamente:

- a)** numero di giorni con un'umidità relativa >97% e una temperatura >25 °C nel periodo che intercorre “dall’inizio della formazione dei chicchi” fino alla raccolta.
- b)** Numero di giorni con un'umidità relativa >97% e una temperatura compresa tra 10 e 25°C o un'umidità relativa compresa tra 70 e 97% e una temperatura >25°C nel periodo che intercorre “tra l’inizio della formazione dei chicchi” fino alla raccolta.

Valore soglia	Valore di allerta
$a > 7$	rosso
$0 < a \leq 7$ o $b > 7$	giallo
$a = 0$ e $b \leq 7$	verde

Tabella 3.1 Sotto-indicatori riferiti al parametro “Temperatura e umidità relativa.”

Tabella tratta da Jeurissen *et al.*[8] con modifiche

3.3.2 Raccolta ed essiccazione

I tre sotto-indicatori per la fase di raccolta ed essiccazione indicati in Tabella 3.2 fanno riferimento a studi effettuati su nocciole turchesche per una durata di tre anni in cui sono stati analizzati sia i parametri ambientali (temperatura e umidità) che agronomici (raccolta, essiccazione e conservazione).

Sotto-indicatore	Valore soglia	Valore di allerta
Tempo di raccolta	troppo presto o troppo tardi	rosso
	in tempo	verde
Contatto con il suolo durante la raccolta o l'essiccazione	contatto con il suolo	rosso
	nessun contatto con il suolo	verde
Livello di umidità del seme prima della conservazione	> 6 %	rosso
	≤6%	verde

Tabella 3.2 sotto-indicatori riferiti al parametro “Raccolta ed essiccazione”.

Tabella tratta da Jeurissen *et al.*[8] con modifiche

Nel Code of Practice (COP) per la frutta a guscio viene indicato che la raccolta dovrebbe avvenire prima possibile dopo la maturazione. Ciò potrebbe limitare le malattie derivanti da funghi e infestazioni di insetti. Inoltre, un raccolto tempestivo riduce le possibilità di contaminazione, in quanto aumenta la probabilità che lo scafo esterno rimanga intatto fornendo una barriera contro le spore fungine e gli insetti.

Un ritardo o un anticipo nella raccolta possono aumentare il rischio di contaminazione in quanto le nocciole precoci potrebbero essere più vulnerabili alle aflatossine, mentre, quelle mature, che cadono naturalmente a terra, sono più soggette alla contaminazione da funghi.

Per minimizzare il contatto con il terreno, è consigliabile utilizzare metodi come la raccolta su teloni effettuata scuotendo gli alberi, in quanto da alcuni studi, è emerso che le nocciole che rimangono a contatto con il suolo durante la raccolta o l'essiccazione tendono ad avere livelli di aflatossina significativamente superiori rispetto a quelle non esposte direttamente al terreno. A seguito della raccolta è necessario effettuare l'essiccazione il prima possibile raggiungendo un livello di umidità inferiore al 6%.

Si preferisce utilizzare l'essiccazione meccanica, rispetto all'essiccazione al sole, in quanto più rapida e non influenzata dalle condizioni climatiche e dalla possibile contaminazione da funghi e parassiti.

3.3.3 Condizioni di stoccaggio e trasporto

Uno studio condotto su nocciole turche ha evidenziato che condizioni di temperatura e umidità relativa controllate (5° C e 65% di umidità relativa) hanno evitato la contaminazione nonostante la presenza osservata dei funghi produttori di aflatossine.

Ne deriva che i tre sotto-indicatori definiti dagli esperti per le condizioni di trasporto e stoccaggio sono:

- livello di umidità del seme durante lo stoccaggio
- umidità relativa nell'impianto di stoccaggio
- differenze di temperatura durante il giorno

Valore soglia	Valore di allerta
$a > 6\%$ o $(b > 70\% \text{ e } c > 10^\circ\text{C})$	rosso
$a \leq 6\%$ o $(b \leq 70\% \text{ e } c \leq 10^\circ\text{C})$	verde

Tabella 3.3 Sotto-indicatori riferiti al parametro “Stoccaggio e condizioni di trasporto”.

Tabella tratta da Jeurissen *et al.*[8] con modifiche

Per prevenire la proliferazione di *A. flavus* e *A. parasiticus*, funghi responsabili dello sviluppo delle aflatossine nella frutta a guscio, è necessario che l'umidità relativa nell'ambiente di stoccaggio sia mantenuta al di sotto del 70%. Inoltre, temperature tra 0 e 10 °C sono ottimali per ridurre al minimo il deterioramento e la crescita dei funghi durante la conservazione prolungata della frutta a guscio.

La formazione di condensa, (dovuta ad esempio a grandi differenze di temperatura), in grado di aumentare il rischio di crescita di funghi, può essere dunque evitata mantenendo un'umidità relativa inferiore al 70% e una temperatura inferiore a 10 °C.

3.3.4 Varietà di raccolto e danni alle colture

Un sotto-indicatore considerato è la suscettibilità della varietà coltivata (cultivar) ai funghi produttori di micotossine o ai diversi fattori di influenza (ad esempio gelo, malattie microbiche e fungine). Una efficace barriera contro la contaminazione fungina è fornita dal guscio duro delle nocciole. Tuttavia, qualsiasi danno al guscio, derivante da attacchi di insetti, screpolature naturali o danni meccanici durante la raccolta aumentano il rischio di contaminazione fungina con possibile produzione di aflatossine (Tabella 3.4). Risulta dunque essenziale che gli agricoltori tengano sotto controllo gli insetti che potrebbero danneggiare le nocciole, oltre a considerare che condizioni di alte temperature e forti piogge possono favorire la proliferazione di funghi.

Sotto-indicatore	Categoria di rischio	Valore di allerta
Suscettibilità ai funghi produttori di micotossine	alta	rosso
	intermedia	giallo
	bassa	verde
Danni alle colture determinati mediante ispezione visiva	danno elevato al raccolto	rosso
	danno intermedio al raccolto	giallo
	basso danno al raccolto	verde

Tabella 3.4 Sotto-indicatori riferiti al parametro “Varietà e raccolto e danni alle colture”.

Tabella tratta da Jeurissen *et al.*[8] con modifiche

Questo modello, strutturato come un foglio di lavoro Excel (Figura 3.2) si basa sull'utilizzo degli indicatori sopra descritti, integrati con le relative categorie di rischio e i valori soglia associati. Nelle prime due colonne è presente le descrizioni degli indicatori e dei sotto-indicatori. La colonna successiva, denominata "description input", indica per ciascun sotto-indicatore l'ordine di grandezza o i possibili valori dell'input dell'utente presenti nella colonna quattro (costituente l'unica colonna utilizzata dall'utente del seguente modello). Nella quinta colonna vi sono le categorie di rischio indicate attraverso i colori (rosso, giallo, verde) con i relativi valori soglia mentre, la sesta colonna, etichettata come "score", indica la categoria di rischio corrispondente all'input dell'utente (colonna quattro) calcolata dal modello.

Indicator	Description (sub-)indicator	Description Input	User input	Cut off value	Score	Importance factor	Total score	Maximum total score
Temperature (T) and relative humidity (RH)	a days RH>97% AND T>25°C in the period from 'flowering/growth of the nut' until harvest	number of days	10	a>7	2	8	16	16
				0<a≤7 OR b>7				
	b days RH>97% AND T between 10-25°C OR RH between 70-97% and T>25 °C in the period from 'flowering/growth of the nut' until harvest	number of days	6	a=0 AND b≤7				

Figura 3.2 Modello a semaforo tratto da Jeurissen *et al.*[8] con modifiche

Le categorie di rischio utilizzate sono: "verde" (score=0 ovvero rischio basso), "giallo" (score=1 ovvero rischio intermedio) e "rosso" (score=2 ovvero alto rischio) mentre i fattori di importanza riportati sono provvisori. Per ciascun indicatore, il modello restituisce il "total score" (attraverso il prodotto tra "score" per il suo fattore di importanza) con il colore appropriato corrispondente. Inoltre, il modello restituisce il "massimum total score" moltiplicando il più alto valore ottenuto nella colonna 6 (score) per il suo fattore di importanza. Il punteggio complessivo ("overall score"), che indica la categoria di rischio, è stato calcolato come percentuale della somma dei "maximum total score" per tutti gli indicatori.

In particolare, le categorie di rischio sono:

- "verde" (basso rischio di insorgenza di micotossine, 0-33% del "total score")
- "giallo" (rischio intermedio di insorgenza di micotossine, 34-66% del "total score")
- "rosso" (alto rischio di insorgenza di micotossine, 67-100% del "total score").

Il punteggio complessivo ("overall score") ottenuto è pari al 70%, ovvero corrispondente ad un alto rischio di insorgenza di micotossine. Ciò che si evince è che l'elevato numero di giorni con un'alta umidità relativa e temperatura elevata ("total score" pari a 16) e, il contatto con il suolo durante la raccolta/essiccazione (total score pari a 8) sono i fattori che contribuiscono maggiormente al punteggio complessivo.

4. Materiali e metodi

4.1 Microcosmi

Lo sviluppo della biomassa fungina sul monolayer di nocciole è stato monitorato all'interno di microcosmi statici allestiti come di seguito descritto. I microcosmi si presentano come sistemi chiusi ermeticamente all'interno dei quali sono state condotte delle misure respirometriche della CO_2 prodotta e dell' O_2 consumato).

Le nocciole utilizzate durante tutta la sperimentazione sono nocciole sgusciate destinate al consumo umano.

4.1.1 Parametri monitorati all'interno dei microcosmi

I parametri monitorati nella seguente sperimentazione, in relazione al tipo di microcosmo utilizzato sono:

1. I mg di CO_2 catturati dalla soluzione di NaOH all'interno dei microcosmi;
2. La velocità specifica di consumo di Ossigeno (RO_2) ottenuta mediante il RESPIROMETRIC Sensor

La valutazione della respirazione associata all'attività microbica all'interno dei microcosmi, si basa sulla stima della CO_2 [mg] catturata dalla soluzione di NaOH, e alla successiva titolazione con HCl (1,5 M) in presenza dell'indicatore fenolftaleina e dell'agente precipitante BaCl_2 [19]. L'utilizzo del RESPIROMETRIC Sensor (VELP scientifica) ha invece consentito, tramite la differenza di pressione registrata dal sensore, la valutazione della velocità specifica di consumo di ossigeno (RO_2) all'interno del microcosmo mostrato in Figura 4.1 che si presenta come una bottiglia di forma tronco-conica. Questo è caratterizzato al suo interno da un tubo che garantisce l'inserimento delle pastiglie di soda e dal sensore attraverso un tappo in plastica su cui è alloggiato il Respirometric Sensor.



Figura 4.1 Microcosmo con Respirometric Sensor

Il sensore (Figura 4.2) è in grado di trasmettere i valori di pressione (in un range tra 500 e 1100 hPa) al DataBox (Figura 4.3) che memorizza i risultati e, insieme al software RESPIROSoft, consente la trasmissione wireless dei dati dal sensore al PC anche quando non è connesso a quest'ultimo.



Figura 4.2 Respiriometric Sensor



Figura 4.3 DataBox VELP

4.1.2 Allestimento dei microcosmi

Le due diverse configurazioni di microcosmo, distinte per la loro geometria, utilizzate durante la sperimentazione sono:

1. Barattolo di forma cilindrica a chiusura ermetica (Figura 4.4) con un volume di 1,062 l dotato di un coperchio con guarnizione;
2. Bottiglia di forma tronco-conica (Figura 4.5 e 4.6) con un volume di 1,050 l.

La preparazione dei microcosmi prevedeva, in entrambi i casi, l'inserimento di 20 ml di acqua sterile sul fondo per il mantenimento dell'umidità al 40% e l'utilizzo di un monolayer di nocchie caratterizzato da un peso secco di 37 grammi (8% di umidità) il cui campionamento è stato randomico.

Nei microcosmi di forma cilindrica denominati con V_x (Figura 4.4) si è inserito un sistema di supporto caratterizzato da un treppiede in plastica fissato a una rete su cui è stato posizionato il monolayer di nocchie. Invece, nel microcosmo di forma tronco-conica, la rete che funge da supporto per il monolayer è stata inserita dal collo della bottiglia e posizionata a 1 cm dal fondo.



Figura 4.4 Tipologia V_x

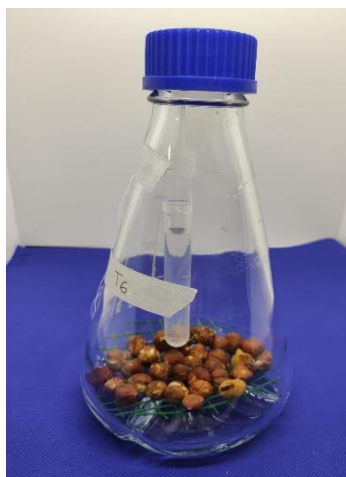


Figura 4.5 Tipologia T_x



Figura 4.6 Tipologia S_x

Per il microcosmo di forma tronco-conica si sono considerate due configurazioni di allestimento che si differenziano in base alla diversa tipologia di chiusura (Tabella 4.1).

Per il microcosmo indicato con T_x (Figura 4.5) la chiusura è stata garantita mediante tappo in plastica, mentre il microcosmo indicato con S_x (Figura 4.6) attraverso un tappo in plastica su cui è alloggiato il RESPIROMETRIC Sensor.

Sistema di chiusura	denominazione	Volume [L]
Tappo con guarnizione	V_x	1,062
Tappo sensore	S_x	1,050
Tappo semplice	T_x	1,050

Tabella 4.1 Sistema di chiusura dei microcosmi

Nei microcosmi indicati con V_x e T_x (Figura 4.4 e 4.5) il sistema di cattura della CO_2 era rappresentato da una provetta in plastica sospesa all'interno dei microcosmi contenente 12 ml di soluzione di NaOH.

Nella configurazione S_x la provetta contenente la soluzione di NaOH (12 ml) è stata inserita all'interno del tubo nero mostrato in Figura 4.6 ed inoltre, sono state introdotte 6 pastiglie di soda nel raccogliatore degli alcali. Tale configurazione di microcosmo ha garantito l'ottenimento sia della CO_2 prodotta che dell' O_2 consumato (grazie alla presenza del RESPIROMETRIC Sensor), contrariamente ai precedenti in cui si è valutata soltanto l'anidride carbonica.

Per la preparazione della soluzione di NaOH è stata impiegata acqua distillata decarbonata mediante bollitura per 1 h.

Prima dell'allestimento dei microcosmi, tutto il materiale sopra descritto è stato sottoposto a sterilizzazione (20 minuti, 121°C, 2 atm). Inoltre, per ogni prova effettuata è stata allestito un microcosmo abiotico di controllo in cui anche le nocchie sono state sterilizzate.

4.2 Analisi respirometriche

La valutazione della respirazione associata all'attività microbica all'interno dei microcosmi è stata monitorata mediante la stima della CO₂ [mg] catturata dalla soluzione di NaOH e attraverso l'utilizzo del RESPIROMETRIC Sensor. Quest'ultimo ha consentito la valutazione della velocità specifica di consumo di ossigeno (RO₂) e dunque dell'ossigeno consumato dalla biomassa fungina formatasi all'interno dei microcosmi.

4.2.1 Valutazione della CO₂ prodotta [mg]

Per valutare la respirazione associata all'attività microbica, si è utilizzato un sistema di cattura della CO₂ [mg] che sfrutta la presenza della soluzione di NaOH all'interno di un sistema chiuso. La soluzione di NaOH, estratta da ciascun microcosmo, è stata titolata periodicamente con HCl (1,5 M) in presenza dell'indicatore fenolftaleina e dell'agente precipitante BaCl₂ [19].

Dopo ogni titolazione, è stata inserita nella provetta una nuova soluzione di NaOH (12 ml) e infine il microcosmo è stato richiuso rapidamente così da evitare l'assorbimento della CO₂ proveniente dall'ambiente circostante.

Il principio su cui si basa tale analisi respirometrica, deriva dalla capacità delle molecole di NaOH di legarsi alla CO₂ rendendolo indisponibile e dunque non più in grado di reagire con l'HCl (agente titolante).

Attraverso l'uso di una buretta da 50 ml, che consentiva il dosaggio dell'HCl in un becher contenente la soluzione di NaOH, l'indicatore e l'agente precipitante, è stato dunque possibile relazionare con una formula empirica il volume di HCl utilizzato per portare la soluzione al viraggio (da rosa intenso a bianco), con la quantità di CO₂ calcolata con l'equazione 4.1 [19].

$$CO_2(mg) = (V_0 - V) * f \quad (4.1)$$

Dove:

- V₀ = volume di HCl usato per titolare i bianchi (mL)
- V = volume di HCl usato per titolare i campioni (mL)
- f = fattore di conversione (ricavato dalla formula f = 22 * M della soluzione di HCl usata per titolare considerando che 1 mL di NaOH 0,05 N corrisponde a 1,1 mg di CO₂).

4.2.2 Valutazione dell' RO_2 mediante RESPIROMETRIC Sensor

La tipologia di microcosmo S_x è stata allestita sfruttando come sistema di chiusura il RESPIROMETRIC Sensor in grado di fornire i valori di BOD (Domanda Biochimica di Ossigeno) attraverso la misura diretta dell'ossigeno consumato da parte della biomassa microbica presente.

L'intero sistema precedentemente descritto (sensore, DataBox e software) è utilizzato per valutare la respirazione microbica del suolo, tuttavia, la versatilità di tali apparecchiature garantisce l'esecuzione di qualsiasi test respirometrico. Per tale motivo, nel presente lavoro di tesi si è sfruttata la variazione di pressione registrata dal sensore per valutare, attraverso l'equazione 4.2 [18], la velocità specifica di consumo di ossigeno (RO_2).

$$RO_2 = 32000 * V_{fg} * \frac{\Delta P}{t R T m_{sd}} \quad (4.2)$$

Dove

- RO_2 è la velocità specifica di consumo di O_2 valutato sulla base del peso secco delle nocciole ($mg\ O_2 / g\ h$)
- 32000 è la massa molare dell'ossigeno (mg/mol);
- V_{fg} è il volume di gas libero, in litri;
- R è la costante dei gas ($83,14\ hPa\ l/mol \cdot K$);
- T è la temperatura in kelvin;
- m_{sd} è il peso secco in grammi;
- ΔP è la differenza di pressione misurata in ettopascal;
- t è il tempo trascorso, in ore.

Per evitare che il sistema andasse in depressione, a causa dell'assorbimento della CO_2 in soluzione di NaOH, i microcosmi sono stati aperti ogni 3/4 giorni per un periodo costante pari a 15 minuti e successivamente richiusi per il proseguimento della prova.

In questa tipologia di microcosmi, è stato possibile ricavare informazioni sia sull' O_2 consumato che sulla CO_2 prodotta (grazie alla titolazione della soluzione di NaOH inserita in una provetta all'interno del tubo nero che costituisce il collo della bottiglia).

4.3 Analisi delle aflatossine

4.3.1 Preparazione del campione

Nella fase di preparazione per l'analisi delle aflatossine, i campioni precedentemente congelati sono stati scongelati e sottoposti a una fase di lavaggio.

Ogni tipologia di campione (20 grammi), è stata inserita all'interno di provette Falcon a cui sono stati aggiunti 30 ml di acqua sterile. Successivamente i campioni sono stati centrifugati per 10 min a una velocità di 3000 rpm così da consentire la separazione della biomassa immobilizzate sulle noccioline. A seguito di ciò i campioni sono stati inseriti in stufa a 60°C per 24h per consentirne l'asciugatura.

4.3.2 Determinazione delle aflatossine

La determinazione delle aflatossine totali (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) è stata effettuata mediante il kit ELISA RIDASCREEN Aflatoxins Total (R-BIOPHARM AG). Si tratta di un immunodosaggio enzimatico competitivo che consente l'analisi quantitativa delle aflatossine. Il kit utilizzato contiene i reagenti richiesti per il dosaggio: enzima coniugato, soluzione di anticorpo, soluzione substrato/cromogeno e soluzione di lavaggio. È presente, inoltre, una piastra multi pozzetto da 96 posizioni. Il meccanismo del test si basa su una reazione antigene-anticorpo. Infatti, i pozzetti della piastra sono rivestiti con anticorpi di cattura diretti contro anticorpi anti-aflatossine.

Gli standard di aflatossine inclusi nel kit sono caratterizzati dalla seguente concentrazione:

Standard 1= 0 µg/L

Standard 2= 0,05 µg/L

Standard 3= 0,15 µg/L

Standard 4= 0,45 µg/L

Standard 5= 1,35 µg/L

Standard 6= 4,05 µg/L

Prima dell'utilizzo del kit, tutti i reagenti sopra descritti sono stati portati a temperatura ambiente (20-25°C). La procedura indicata dal bugiardino prevede l'inserimento (mediante micro-pipette) in un certo numero di pozzetti (in genere si considera un duplicato ad eccezione degli standard) di 50 µL di standard e di 50 µL di campione.

In corrispondenza dei pozzetti utilizzati sono stati poi inseriti nel seguente ordine:

- 50 µL di enzima coniugato
- 50 µL di soluzione di anticorpo

Successivamente, la piastra è stata posta in agitazione per 30 minuti al buio in termostato a temperatura di 25°C (1° incubazione).

Durante questa prima fase, si ha una competizione tra le aflatossine libere (presenti negli standard e nei campioni) e l'aflatossina coniugata con l'enzima per gli stessi siti di legame degli anticorpi specifici anti-aflatossina. Quest'ultimi vengono contemporaneamente legati dagli anticorpi di cattura che sono immobilizzati sulla piastra.

Trascorsi i 30 minuti dalla 1° incubazione, il contenuto dei pozzetti è stato rimosso picchiettando per 3 volte di seguito la piastra su un foglio di carta assorbente.

Il lavaggio dei pozzetti è stato effettuato inserendo 250 µL di soluzione di lavaggio, successivamente rimossa con la stessa procedura descritta prima che è stata ripetuta altre due volte. A seguito di tale lavaggio, l'enzima coniugato non legato viene rimosso dai pozzetti. Successivamente sono stati inseriti 100 µL di soluzione di substrato/cromogeno e si è sottoposta nuovamente la piastra in agitazione per 15 minuti (2° incubazione). L'aggiunta del substrato enzimatico/cromogeno (con successiva incubazione) fa sì che l'enzima coniugato legato converta il cromogeno incolore in un prodotto azzurro. Prima della terza e ultima incubazione in cui la piastra è stata nuovamente posta in agitazione, si è introdotto nei pozzetti 100µL di soluzione di stop che consente il viraggio da blu a giallo.

4.3.3 *Lettura Spettrofotometrica dei campioni*

Entro 30 minuti dalla 3° incubazione, è stata valutata l'assorbanza a 450 nm attraverso un lettore di micropiastre. L'assorbimento che è stato rilevato è inversamente proporzionale alla concentrazione di aflatossina nel campione.

L'andamento della curva standard, grazie al quale è stato possibile determinare la concentrazione di aflatossine, è stato ottenuto attraverso la formula 4.3 (dove A% è rappresentativa dell'assorbanza percentuale).

$$A\% = \frac{\text{Assorbanza dello standard 0 del campione}}{\text{Assorbanza dello standard 0}} \quad (4.3)$$

Sfruttando le concentrazioni note di aflatossine degli standard espressi in µg (Aflatossine)/Kg(nocciole) e diagrammandoli in un grafico semilogaritmico con i valori di assorbanza ottenuti dagli standard si sono ricavate le concentrazioni di aflatossine nei campioni.

4.4 *Descrizione delle prove effettuate*

Di seguito verranno descritti i differenti microcosmi utilizzati in ciascuna delle prove effettuate per la seguente sperimentazione.

Prova 1:

- Microcosmo allestito in un barattolo a chiusura ermetica (V_x) in presenza di 20 ml di H₂O sterile sul fondo per mantenimento dell'umidità al 40% e di un monolayer di nocciole (con un peso secco di 37 grammi) posizionato sul supporto a treppiede in plastica in presenza della soluzione di NaOH (12 ml).
In aggiunta è stato allestito un microcosmo abiotico mantenuto in condizioni di sterilità caratterizzato da un monolayer di nocciole sterilizzate. Entrambi i microcosmi sono stati incubati per 93 giorni in condizioni di temperatura ambiente che oscillava tra 24-27°C.

Prova 2:

- Microcosmo allestito in un barattolo a chiusura ermetica (V_x) in presenza di 20 ml di H_2O sterile sul fondo per mantenimento dell'umidità al 40% e di un monolayer di nocciole (con un peso secco di 37 grammi) posizionato sul supporto a treppiede in plastica in presenza della soluzione di NaOH (12 ml).
In aggiunta è stato allestito un microcosmo abiotico mantenuto in condizioni di sterilità caratterizzato da un monolayer di nocciole sterilizzate. Entrambi i microcosmi sono stati incubati per 15 giorni in condizioni di temperatura ambiente che oscillava tra 24-27°C.

Durante la 3° prova i microcosmi sono stati allestiti in duplicato considerando le 3 differenti tipologie di microcosmo (V_x, T_x, S_x) descritte nel paragrafo 4.1.2.

In aggiunta è stato allestito un microcosmo abiotico mantenuto in condizioni di sterilità caratterizzato da un monolayer di nocciole sterilizzate.

Tutti i microcosmi sono stati mantenuti in termostato a temperatura costante di 25°C. In particolare si sono considerati:

- Due microcosmi allestiti in un barattolo a chiusura ermetica (V_x) in presenza di 20 ml di H_2O sterile sul fondo per mantenimento dell'umidità al 40% e di un monolayer di nocciole (con un peso secco di 37 grammi) posizionato sul supporto a treppiede in plastica in presenza della soluzione di NaOH (12 ml).
- Due microcosmi allestiti in bottiglie di forma tronco-conica la cui chiusura era garantita mediante un tappo in plastica (T_x) in presenza di 20 ml di H_2O sterile sul fondo per mantenimento dell'umidità al 40% e di un monolayer di nocciole (con un peso secco di 37 grammi) posizionato sul supporto (rete) in presenza della soluzione di NaOH (12 ml).
- Due microcosmi allestiti in bottiglie di forma tronco-conica la cui chiusura era garantita mediante il RESPIROMETRIC Sensor (S_x) in presenza di 20 ml di H_2O sterile sul fondo per mantenimento dell'umidità al 40% e di un monolayer di nocciole (con un peso secco di 37 grammi) posizionato sul supporto (rete) in presenza della soluzione di NaOH (12 ml) e di 6 pastiglie di soda nel raccoglitore degli alcali.

Durante la 4° prova i microcosmi sono stati allestiti in triplicato considerando 2 tipologie di microcosmo (T_x, S_x).

In aggiunta è stato allestito un microcosmo abiotico mantenuto in condizioni di sterilità caratterizzato da un monolayer di nocciole sterilizzate. Tutti i microcosmi sono stati mantenuti in termostato a temperatura costante di 25°C.

In particolare si sono considerati:

- Tre microcosmi allestiti in bottiglie di forma tronco-conica la cui chiusura era garantita mediante un tappo in plastica (T_x) in presenza di 20 ml di H₂O sterile sul fondo per mantenimento dell'umidità al 40% e di un monolayer di noccioline (con un peso secco di 37 grammi) posizionato sul supporto (rete) in presenza della soluzione di NaOH (12 ml).
- Tre microcosmi allestiti in bottiglie di forma tronco-conica la cui chiusura era garantita mediante il RESPIROMETRIC Sensor (S_x) in presenza di 20 ml di H₂O sterile sul fondo per mantenimento dell'umidità al 40% e di un monolayer di noccioline (con un peso secco di 37 grammi) posizionato sul supporto (rete) in presenza della soluzione di NaOH (12 ml) e di 6 pastiglie di soda nel raccogliatore degli alcali.

5. Risultati e discussione

5.1 Analisi Respirometriche

Il monitoraggio dello sviluppo della biomassa, sul monolayer di nocciole, è stato effettuato attraverso la misura della CO_2 prodotta, ottenuta tramite la sua cattura nella soluzione di NaOH opportunamente inserita all'interno del microcosmo.

Il periodo di incubazione più lungo, utilizzato per valutare lo sviluppo della biomassa nel tempo, è stato pari a 93 giorni (prova 1).

Per tutta la durata di questa 1° prova, il microcosmo V_X di forma cilindrica (a chiusura ermetica di 1,062 l) è stato mantenuto a temperatura ambiente (24-27°C) e periodicamente è stata effettuata la titolazione della soluzione di NaOH grazie alla quale è stato possibile ottenere il valore di CO_2 totale prodotto durante l'incubazione.

Ogni punto della curva mostrata in figura deriva dalla somma del valore di CO_2 ottenuto in un dato giorno mediante titolazione (calcolato attraverso l'equazione 4.1), con il valore ottenuto al punto precedente. Ciò ha permesso di rappresentare l'andamento della CO_2 cumulata nel tempo (Figura 5.1).

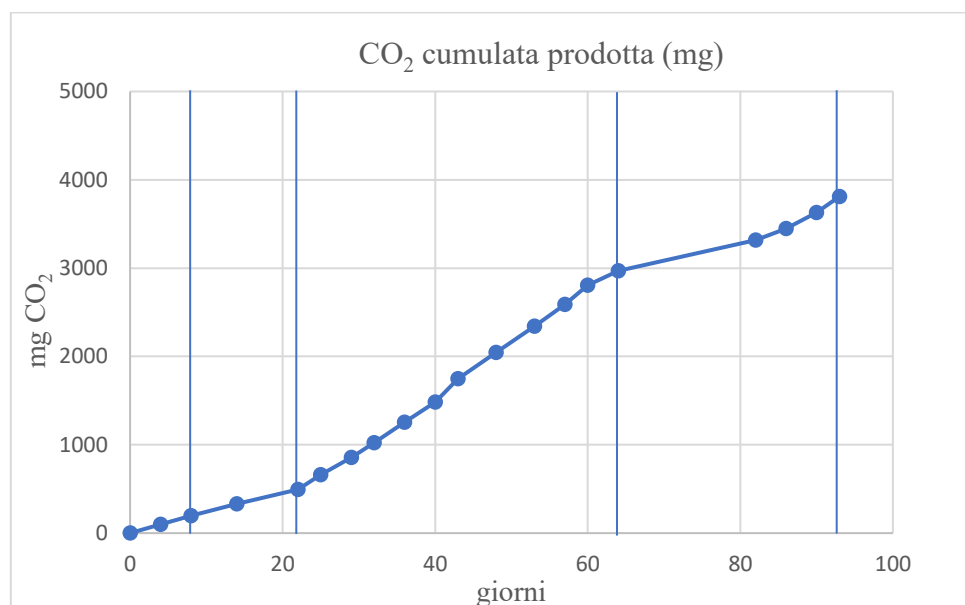


Figura 5.1 Andamento CO_2 cumulata [mg] 1° prova

L'andamento della curva mostra quattro diversi tratti di CO_2 prodotta e dunque di velocità di crescita. In particolare, il secondo tratto (tra 20 e 60 giorni), è quello che presenta una maggiore pendenza. Questa rappresenta la fase di crescita attiva in cui si ha il maggiore sviluppo di biomassa.

Nella tabella 5.1 sono riportati i valori cumulati in corrispondenza di ogni range temporale trascorso tra una titolazione e la successiva.

Respirometria: Prova 1	
Giorno	CO₂ cumulata [mg]
0	0
4	99
8	198
14	330
22	495
25	660
29	858
32	1023
36	1254
40	1485
43	1749
48	2046
53	2343
57	2590,5
60	2805
64	2970
82	3316,5
86	3448,5
90	3630
93	3811,5

Tabella 5.1 Valori di CO₂ cumulati per ogni range temporale (1° prova)

A parità di geometria di microcosmo (V_X) è stata effettuata una seconda prova della durata di 15 giorni, in cui si è osservata una maggiore produzione di CO₂ (Tabella 5.2). In questa, la valutazione della CO₂ prodotta mediante titolazione è stata effettuata a intervalli regolari di 24 h (ad eccezione per il fine settimana).

Respirometria: Prova 2	
Giorno	CO ₂ cumulata [mg]
0	0
1	759
2	1527
4	2289,3
7	3041,7
8	3794,1
9	4559,7
10	5322
11	6077,7
14	6816,9
15	7579,2

Tabella 5.2 Valori di CO₂ cumulati per ogni range temporale (2° prova)

Nella Figura 5.2 è possibile notare per la 2° prova un andamento di CO₂ cumulata nel tempo con una pendenza notevolmente maggiore rispetto alla prima prova.

Il confronto tra le due prove evidenzia che durante i primi 22 giorni della 1° prova la CO₂ prodotta dalla biomassa è stata notevolmente minore e con una pendenza molto più bassa. Ad esempio, in corrispondenza del quarto giorno, il valore di CO₂ cumulato era pari a 99 mg mentre nella seconda prova si è ottenuto un valore pari a 2283,1 mg. Per quest'ultima, tra il settimo e l'undicesimo giorno si osserva un andamento linearmente crescente con valori di CO₂ cumulata che crescono da 3041,7 mg a 5322 mg con una pendenza maggiore rispetto agli altri tratti.

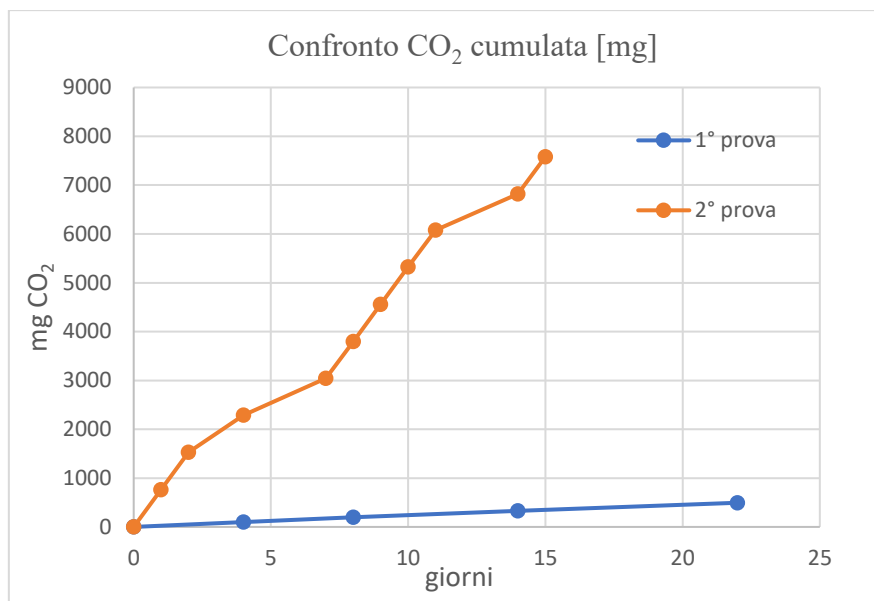


Figura 5.2 Andamento CO₂ cumulata [mg] 1° e 2° prova

L'incremento nella produzione di CO₂ osservato nella seconda prova potrebbe essere attribuibile al fatto che le nocciole, prima di essere impiegate nell'allestimento del microcosmo, sono state conservate per un lungo periodo di tempo a temperatura ambiente che variava tra 24 e 27°C. Infatti, la shelf-life dipende oltre che dalla temperatura e dall'umidità, anche dalla durata e dalla modalità di conservazione [21].

Le condizioni ottimali per ridurre al minimo il deterioramento e la crescita dei funghi durante la conservazione prolungata della frutta a guscio dovrebbero prevedere temperature comprese tra 0 e 10 °C e umidità relativa dell'ambiente al di sotto del 70%. Invece, grandi differenze di temperatura possono causare condensa e aumentare il rischio di crescita di funghi e produzione di micotossine. [8].

Analizzando la velocità di produzione della CO₂ (Figura 5.3) si può osservare che le pendenze rappresentative delle due prove sono notevolmente differenti.

Infatti a seguito delle 24 h di incubazione, la velocità di produzione di CO₂ relativa alla 2° prova è aumentata con una pendenza importante se confrontata con quella della 1° prova.

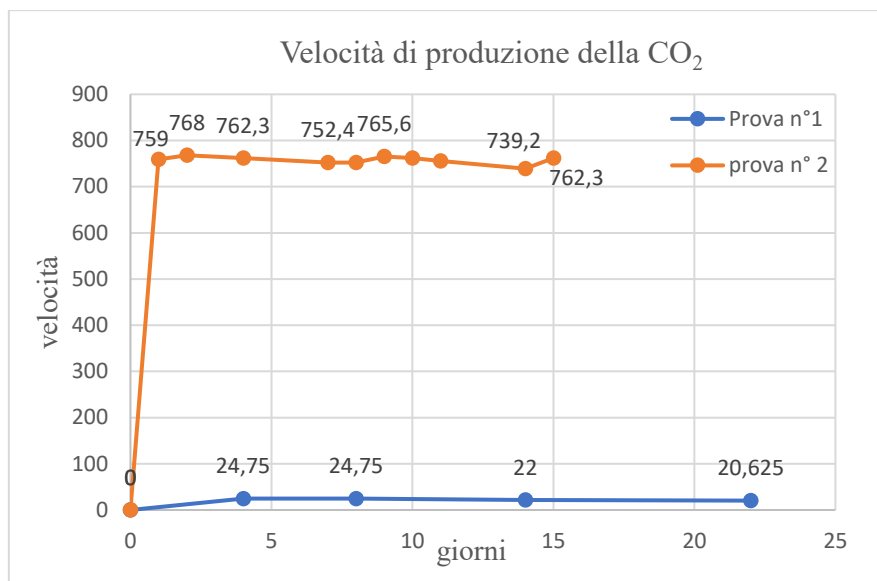


Figura 5.3 Confronto di velocità di produzione di CO₂ (prova 1 e 2)

I primi 22 giorni della 1° prova presentano invece un andamento di velocità circa costante per tutto l’arco temporale considerato e con valori numerici notevolmente minori come mostrato in Tabella 5.3.

Prova 1: Velocità di produzione di CO ₂	
Giorno	velocità
0	0
4	24,75
8	24,75
14	22
22	20,625

Tabella 5.3 Velocità di produzione della CO₂ (prova 1)

La maggiore velocità di crescita della CO₂ prodotta nella 2° prova (tabella 5.4) potrebbe essere dovuta al fatto che i microcosmi sono stati aperti ogni 24 h per effettuare la titolazione della soluzione di NaOH. Di conseguenza vi è stato un ricambio maggiore d’aria contenente O₂ necessario per la vita dei microrganismi. L’ossigeno infatti costituisce uno dei parametri estrinseci responsabile della contaminazione durante la conservazione[20]. Dunque, i microrganismi aerobici sviluppati sul monolayer di nocciole, hanno avuto una maggiore quantità di ossigeno per degradare i nutrienti e produrre energia, acqua e anidride carbonica.

Prova 2: Velocità di produzione di CO₂	
giorno	velocità
0	0
1	759
2	768
4	762,3
7	752,4
8	752,4
9	765,6
10	762,3
11	755,7
14	739,2
15	762,3

Tabella 5.4 Velocità di produzione della CO₂ (prova 2)

5.1.1 Visualizzazione dello sviluppo della biomassa nel tempo

Le immagini sotto riportate mostrano la biomassa fungina sviluppatasi sul monolayer di nocciole incubate per un periodo di 93 giorni nella 1° prova.

Lo sviluppo del micelio sul monolayer di nocciole si è iniziato a intravedere dopo quattro giorni dall'incubazione per poi svilupparsi come una massa filamentosa come mostrato nella prima immagine dall'alto (Figura 5.4). Lo sviluppo di un micelio aereo si è iniziato a intravedere a partire dal 6° giorno mentre a partire dall'8° giorno di incubazione si è assistito alla formazione di spore fungine caratterizzate da un colore giallo/verde (seconda figura dall'alto).

Il micelio, durante l'incubazione si è diffuso sul monolayer di nocciole fino a ricoprirlo totalmente come mostrato in figura all'80° giorno di incubazione.

TEMPO	PROVA n°1 (V _x)
8 giorni dall'incubazione	
15 giorni dall'incubazione	
40 giorni dall'incubazione	
80 giorni dall'incubazione	
93 giorni dall'incubazione	

Figura 5.4 Evoluzione del microcosmo analizzato nella 1° prova

Prima del sacrificio, effettuato al 93° giorno, l'aspetto del monolayer era quello rappresentato in Figura 5.4. Successivamente, il monolayer di nocciole con la biomassa adesa (privata della

rete e del supporto) è stato sottoposto a refrigerazione con lo scopo di effettuare la determinazione delle aflatossine.

Nella Figura 5.5 sono state messe a confronto le due diverse prove analizzate nel paragrafo 5.1. In particolare, nella seconda prova, come precedentemente evidenziato, le nocciole utilizzate per l'allestimento del microcosmo erano state stoccate per un lungo periodo di tempo in condizioni non controllate e ciò, può aver contribuito ad aumentare il livello di contaminazione. Infatti, a partire dai primi quattro giorni di incubazione, si può notare nella prima figura a destra dall'alto, che una nocciola è totalmente circondata dal micelio. Questo è ancora più evidente nella seconda figura a destra, in cui le spore di colore giallo/verde avevano già ricoperto la quasi totalità del monolayer dopo soli 8 giorni mentre nella 1° prova ciò avveniva dopo 15 giorni.

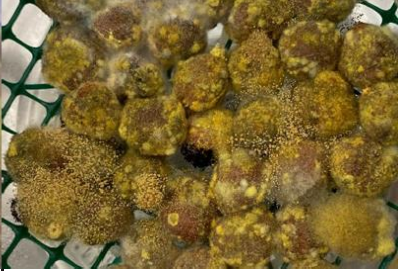
TEMPO	PROVA n°1 Microcosmo V _x	PROVA n°2 Microcosmo V _x
4 giorni dall'incubazione		
8 giorni dall'incubazione		
15 giorni dall'incubazione		

Figura 5.5 Confronto della biomassa formata sul monolayer di nocciole nella prova 1 e 2



Figura 5.6 Formazione di spore di colore nero (prova 2)

La Figura 5.6 mostra l'aspetto della biomassa immobilizzata sul monolayer relativa alla 2° prova prima di essere sacrificata. Anche in questo caso è stato possibile osservare la presenza del micelio bianco e, rispetto alla prova precedente, anche lo sviluppo di spore di colore nero indicativo della formazione di un nuovo fungo che nella 1° prova non si era sviluppato.

5.2 Effetto della geometria del microcosmo sulla crescita microbica

L'utilizzo del RESPIROMETRIC Sensor System ha implicato l'utilizzo di una nuova geometria di microcosmo di forma tronco conica rispetto a quella analizzata nelle prove precedentemente descritte (forma cilindrica). In questa sezione è stata descritta la prova n° 3 in cui sono state analizzate le 3 tipologie di microcosmo (V_x rappresentativo del barattolo a chiusura ermetica, T_x con tappo semplice, S_x in presenza del RESPIROMETRIC Sensor) mantenuti in termostato a 25°C. I volumi delle tre tipologie si presentavano molto simili tra loro. Infatti V_x è pari a 1,062 l mentre T_x e S_x presentano un volume di 1,050 l.

Durante l'allestimento del microcosmo è stato riscontrato che il campionamento randomico delle nocciole utilizzate ha portato alla presenza di alcune nocciole rotte e di altre senza tegumento (Figura 5.7).



Figura 5.7 Campionamento prova n°3

Diagrammando la CO₂ cumulata per ogni microcosmo allestito si può osservare dalla figura 5.8 che gli andamenti sono quasi sovrapponibili. Di conseguenza al variare della geometria la quantità di CO₂ prodotta non è cambiata.

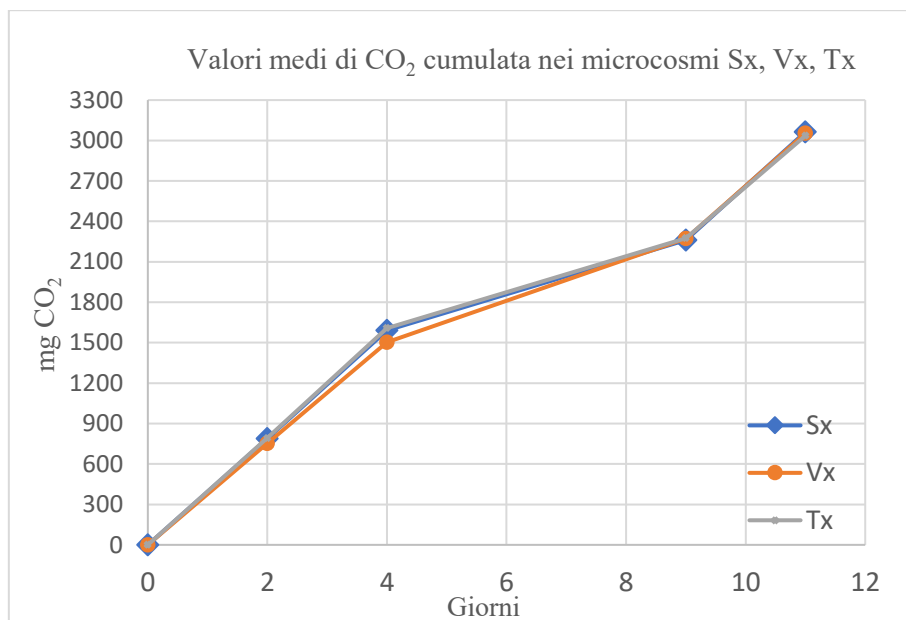


Figura 5.8 Andamento CO₂ [mg] cumulata (tre tipologie di microcosmo)

Considerando per ogni microcosmo un duplicato, i valori medi ottenuti di CO₂ cumulati sono stati rappresentati in Tabella 5.5.

Giorno	[mg] CO ₂ Microcosmo S_X	[mg] CO ₂ Microcosmo V_X	[mg] CO ₂ Microcosmo T_X
0	0	0	0
2	767,25±7,00036	762,3±4,66690	772,2±9,33381
4	1491,6±14,00071	1534,5±9,33381	1508,1±4,66690
9	2262,15±11,66726	2281,95±25,66798	2276,35±8,41457
11	3034,35±7,00036	3054,15±21,00107	3036±5,68120

Tabella 5.5 Valori medi di CO₂ [mg] per ogni tipologia di microcosmo

Visivamente si è osservato che dopo 4 giorni dall'incubazione, il microcosmo della tipologia T_x ha presentato in corrispondenza di una nocciola senza tegumento lo sviluppo di un micelio come mostrato nella prima figura al centro (Figura 5.9).

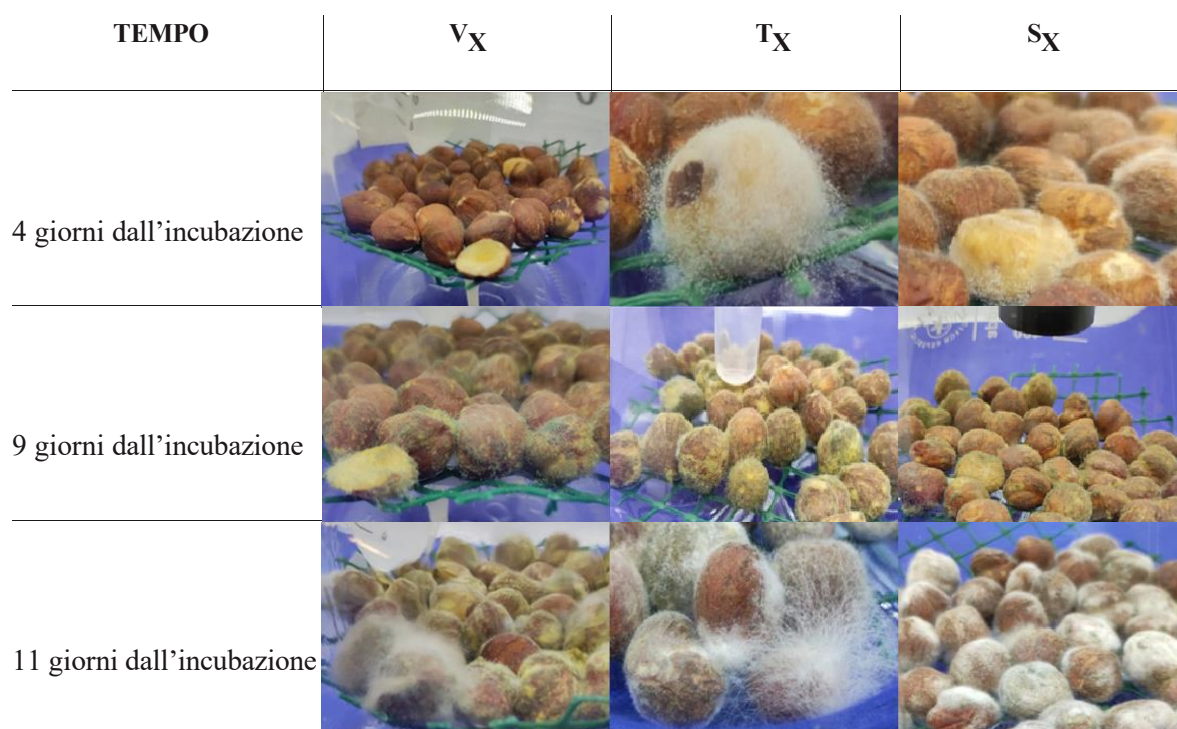


Figura 5.9 Confronto della biomassa formata per ogni tipologia di microcosmo

Durante l'incubazione, si è osservato che la distribuzione della biomassa nel tempo è avvenuta con la stessa tempistica in tutte e 3 tipologie di microcosmo. Infatti, la diversa geometria dei microcosmi, caratterizzati tuttavia da volumi simili tra loro, non ha influenzato lo sviluppo della biomassa nel tempo e neanche la respirometria ad essa associata.

5.3 Velocità specifica di consumo di O_2 (RO_2) e QR

L'utilizzo del RESPIROMETRIC Sensor ha consentito la valutazione della velocità specifica di consumo di ossigeno (RO_2) mediante l'equazione 4.2 che sfrutta la differenza di pressione registrata dal sensore per ogni range temporale considerato.

In questo paragrafo, verranno descritte due prove effettuate nei microcosmi precedentemente denominati S_x (geometria tronco-conica) in cui la chiusura ermetica è stata garantita mediante il RESPIROMETRIC Sensor. Ciò ha permesso di avere informazioni sia sull'ossigeno consumato che sulla CO_2 prodotta.

Come descritto nel capitolo precedente, il RESPIROMETRIC Sensor è stato testato per le analisi respirometriche sul suolo. Un valore di riferimento di RO_2 fornito dal costruttore utilizzando come campione 200 g di ammendante bio-organico ID EN99, un valore di V_{fg} pari a 1,037 l e un tempo di incubazione di 72 h a 298°K era pari a **43,9** mg O_2 /kg*h.

Per la seguente sperimentazione si è considerato un V_{fg} di 1,125 l e un peso secco del monolayer di nocciole di 37 grammi. La Tabella 5.6 rappresentativa della prova n°3, fa riferimento a due repliche di microcosmo della tipologia S_X durante la quale si stava testando il funzionamento del RESPIROMETRIC Sensor.

PROVA N°3: Valori di RO₂ e QR			
Giorno	Microcosmo	RO ₂ [mg O ₂ /h* kg]	QR medio
4	S_X	54,681 ±0,0135	8,944
9	S_X	66,697 ±0,0027	2,889
11	S_X	144,740 ±0,0522	3,602

Tabella 5.6 Velocità specifica di consumo di O₂ (RO₂) relativa alla 3° prova

A parità di condizioni, è stata effettuata un'altra prova (prova n° 4) in cui l'apertura dei microcosmi veniva effettuata ogni 5 giorni (Tabella 5.7). In questo caso, sono state considerate tre repliche del microcosmo della tipologia S_X e rispettivamente a 5, 10 e 20 giorni si è effettuato il sacrificio di uno di essi per consentire la determinazione delle aflatossine per tempi brevi di incubazione.

PROVA N°4: Valori di RO₂ e QR			
Giorno	Microcosmo	RO ₂ [mg O ₂ /h* kg]	QR medio
5	S_X	32,6816 ±0,0023170	5,764
10	S_X	93,6500 ±0,0002648	2,421
15	S_X	117,1349 ±0,00030378	2,533
20	S_X	93,8373	2,471

Tabella 5.7 Velocità specifica di consumo di O₂ (RO₂) della 4° prova

I valori di RO₂ ottenuti nelle due prove presentano lo stesso ordine di grandezza. Come mostrato nella figura 5.10, i massimi valori di RO₂ sono stati ottenuti per la 3° prova in corrispondenza dell'11° giorno (144,74 mgO₂/kgNocciole) mentre per la 4° prova al 15° giorno (117,13 mgO₂/kgNocciole)

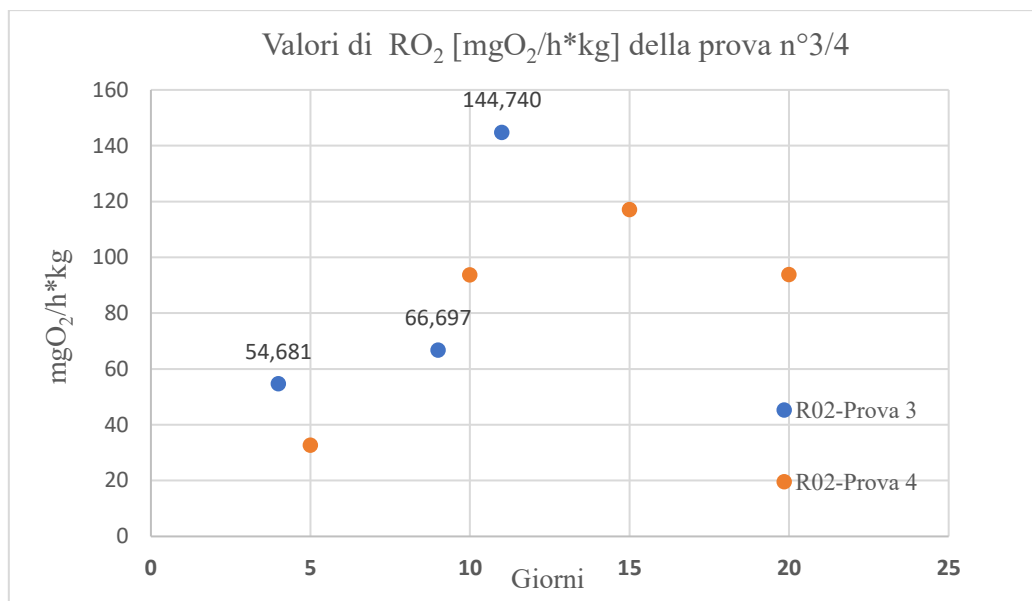


Figura 5.10 Valori di RO₂ della 3°e 4°prova

La valutazione dell'Ossigeno consumato e della CO₂ prodotta ha consentito l'ottenimento del quoziente respirometrico (QR). La prova n° 4 (Tabella 5.7) ha fornito valori medi di QR per ogni range di incubazione pari a 2,5 (escluso il primo periodo temporale) mentre il valore medio di QR nella prova n° 3 (tabella 5.6) era pari a 3,2 (escluso il primo periodo temporale).

I valori di QR ottenuti in questa sperimentazione mostrano una certa attendibilità in quanto uno studio di letteratura, in cui sono stati analizzati estratti citoplasmatici di vari ceppi di *A. parasiticus*, ha evidenziato per il ceppo aflatoossigeno un valore di QR dopo 48 h di crescita pari a 1,28 mentre dopo 72 h pari a 3,1 [22].

5.4 Valori cumulati di O₂ consumato e CO₂ prodotta in mg/kg di nocciole

Nel grafico mostrato in Figura 5.11 sono stati diagrammati i valori cumulati nel tempo di O₂ consumato e CO₂ prodotta relativi alla prova n° 4. In corrispondenza ad ogni range temporale indicato (5-10-15-20 giorni) si è titolata la soluzione di NaOH così da ottenere la CO₂ prodotta.

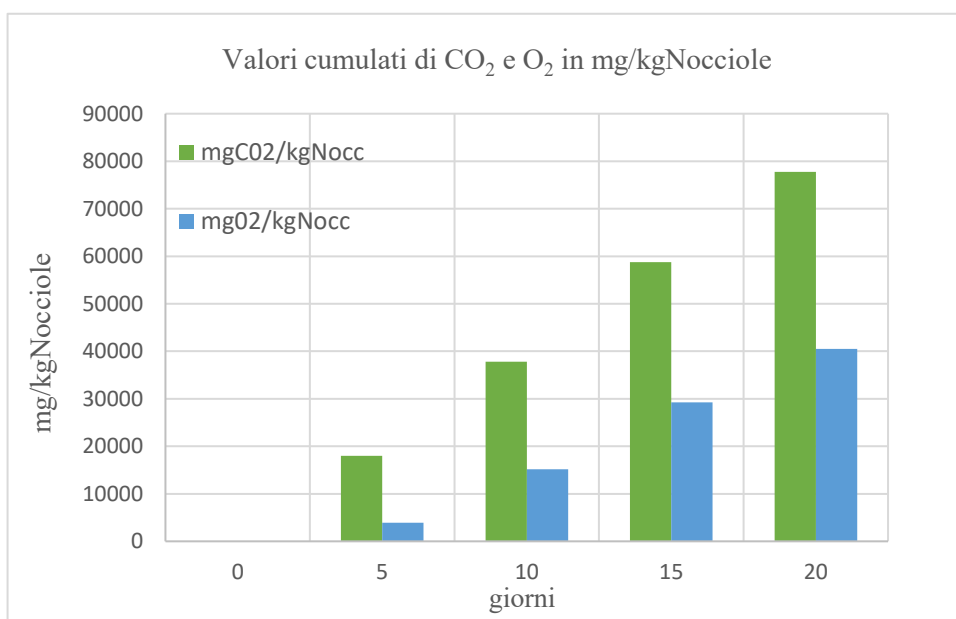


Figura 5.11 mg di CO₂ prodotti e mg di O₂ consumato per kg di nocciole (prova 4)

La Figura 5.11 evidenzia a intervalli regolari di 5 giorni il quantitativo di CO₂ prodotto e i mg di O₂ consumato dalla biomassa formatasi nel monolayer di nocciole.

Dopo i primi 5 giorni la quantità di O₂ consumato è risultata essere pari a 3,92E+03 mg/kg mentre la quantità di CO₂ prodotta pari a 1,80E+04 mg/kg (Tabella 5.8).

Nei range temporali successivi, si può osservare una relazione costante tra la CO₂ prodotta e l'O₂ consumato.

In corrispondenza dell'ultimo giorno di incubazione (20 giorni) si è avuta la massima quantità di anidride carbonica prodotta con un valore pari a 7,77E+04 mg/kg a cui corrispondeva il massimo valore di ossigeno consumato pari a 4,05E+04 mg/kg.

Prova n°4-Valori di CO ₂ e O ₂ [mg/kg]		
Giorni	mgO ₂ cumulato/KgNocciole	mgCO ₂ cumulato/kgNocciole
5	3,92E+03±0,00231	1,80E+04±19,9825
10	1,52E+04±0,00026	3,78E+04±28,5788
15	2,92E+04±0,00030	5,88E+04±13,4722
20	4,05E+04	7,77E+04±11,6673

Tabella 5.8 mg di CO₂ prodotta e O₂ consumato per kg di nocciole incubate

5.5 Effetti della temperatura sulla Respirometria

Per analizzare l'influenza della temperatura sulla respirometria, è stata fatta una distinzione tra le prove effettuate in condizioni di temperatura ambiente non controllata e quelle a temperatura costante di 25 °C mantenuta attraverso l'uso di un termostato. In particolare, senza considerare le diverse tipologie di microcosmo utilizzate, si è confrontato la respirometria ottenuta a temperatura ambiente non controllata (24-27°C) per la prova n° 2 con quella della prova n° 3 e 4 effettuate a temperatura costante di 25°C (Figura 5.12).

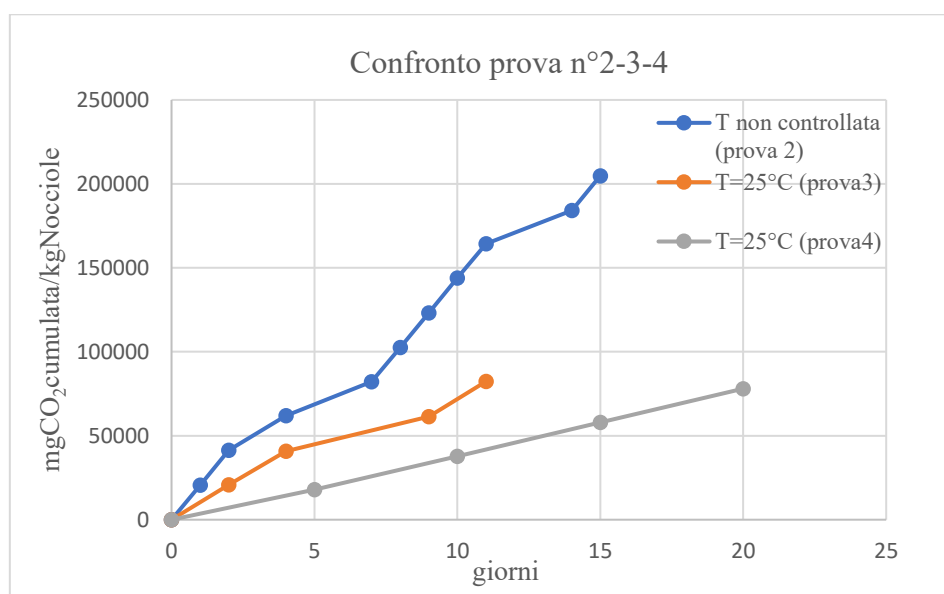


Figura 5.12 Andamento CO₂ per le prove a T controllata e Non controllata

A parità di grammi di nocciole, mL di soluzione di NaOH e mL di acqua distillata sul fondo del microcosmo per il mantenimento dell'umidità, dal grafico 5.12 risulta evidente come in condizioni di temperatura non controllata la quantità di CO₂ prodotta sia maggiore (Prova 2). Infatti, la temperatura (T) è uno dei fattori ambientali più critici che influenzano la crescita dei microrganismi. In base alla loro dipendenza dalla temperatura, i microrganismi possono essere suddivisi in tre categorie principali: psicrofili, mesofili e termofili.

Aspergillus flavus e *Aspergillus parasiticus*, principali specie fungine presenti nelle nocciole, sono caratterizzati da valori ottimali di temperatura compresi rispettivamente tra 28-35°C, e 33-35°C mentre per entrambi il valore ottimale di a_w (attività dell'acqua) è pari a 0,95-0,99[12].

Essi appartengono dunque alla categoria dei mesofili in quanto microrganismi che crescono meglio a temperature moderate, con valori ottimali tra 30°C e 37°C.

Uno studio effettuato su *A. flavus*, ha evidenziato che i principali fattori ambientali responsabili della crescita e della produzione di AF sulla frutta a guscio sono: temperatura e a_w .

Inoltre, situazioni di stress quali variazioni di temperatura e umidità influenzano il metabolismo dei funghi ne favoriscono la produzione[4].

Nelle Tabelle 5.9 e 5.10 sono riportati rispettivamente i valori numerici dei mg di CO₂ su kg di nocciole ottenuti per la prova n° 2, in cui la temperatura oscillava tra 24-27°C, e per le prove 3 e 4 a temperatura costante di 25°C.

Respirometria prova 2: T non controllata (24-27°C)	
Giorno	mgCO₂cumulata/kgNocciole
0	0
1	2,05E+04
2	4,13E+04
4	6,19E+04
7	8,22E+04
8	1,03E+05
9	1,23E+05
10	1,44E+05
11	1,64E+05
14	1,84E+05
15	2,05E+05

Tabella 5.9 Valori di CO₂ prodotti nella prova n°2

Respirometria prova n° 3-4: T costante di 25°C			
Giorni	mgCO₂cumulata/kgNocciole	Giorni	mgCO₂cumulata/kgNocciole
0	0	0	0
2	2,07E+04	5	1,80E+04
4	4,08E+04	10	3,78E+04
9	6,14E+04	15	5,79E+04
11	8,23E+04	20	7,80E+04

Tabella 5.10 Valori di CO₂ prodotti nelle prove n° 3-4

Anche visivamente si è osservato, per la prova n° 2, uno sviluppo di biomassa maggiore che è coerente con una produzione più elevata di CO₂. Infatti, a parità di tempo di incubazione, ciò che si osserva nel microcosmo a temperatura non controllata è una maggior contaminazione e dunque uno sviluppo più veloce di spore color giallo/verde che risultano evidenti 9 giorni dopo l'incubazione (Figura 5.13)

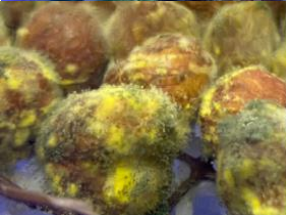
TEMPO	2° PROVA T non controllata (24-27°C)	3° PROVA T=25°C	4° PROVA T=25°C
4 giorni dall'incubazione			
9 giorni dall'incubazione			

Figura 5.13 Tabella che evidenzia visivamente l'influenza della temperatura della prova 2,3,4

5.6 Determinazione delle aflatossine

La determinazione delle aflatossine dei campioni precedentemente congelati è stata effettuata mediante il kit ELISA RIDASCREEN Aflatoxin Total. Nella Tabella 5.11, sono stati riportati i valori medi di aflatossine (AF) determinati espressi in μg per kg di nocciole per ciascun intervallo temporale considerato. Nel seguente paragrafo sono state prese in considerazione tutte le prove effettuate in questo lavoro di tesi, e in aggiunta un campione precedentemente incubato per 40 giorni. La determinazione delle aflatossine è stata inoltre effettuata su campioni di nocciole tal quale non incubate per valutare se quest'ultime fossero già contaminate. Dall'analisi condotta, il campione tal quale in esame ha presentato una concentrazione di aflatossine pari a **0.0694** μg per kg di nocciole.

Prova	Giorni	$\mu\text{gAF/kg Nocciole}$
Tal quale non incubate	0	0,0694 $\pm$ 0,0611
Prova 4 (S_X)	5	0,0750 $\pm$ 0,0087
Prova 4 (S_X)	10	0,2856 $\pm$ 0,0749
Prova 2 (V_X)	15	0,3401 $\pm$ 0,044
Prova 4 (S_X)	20	0,3061 $\pm$ 0,0334
Prova 3 (S_X)	30	0,3200 $\pm$ 0,0198
(V_X)	40	0,4001 $\pm$ 0,0230
Prova 1 (V_X)	93	0,6436 $\pm$ 0,0179

Tabella 5.11 Valori di Aflatossine determinate [$\mu\text{g/kg}$]

La Figura 5.14 evidenzia che maggiore è il periodo di incubazione, maggiore è la contaminazione da aflatossine.

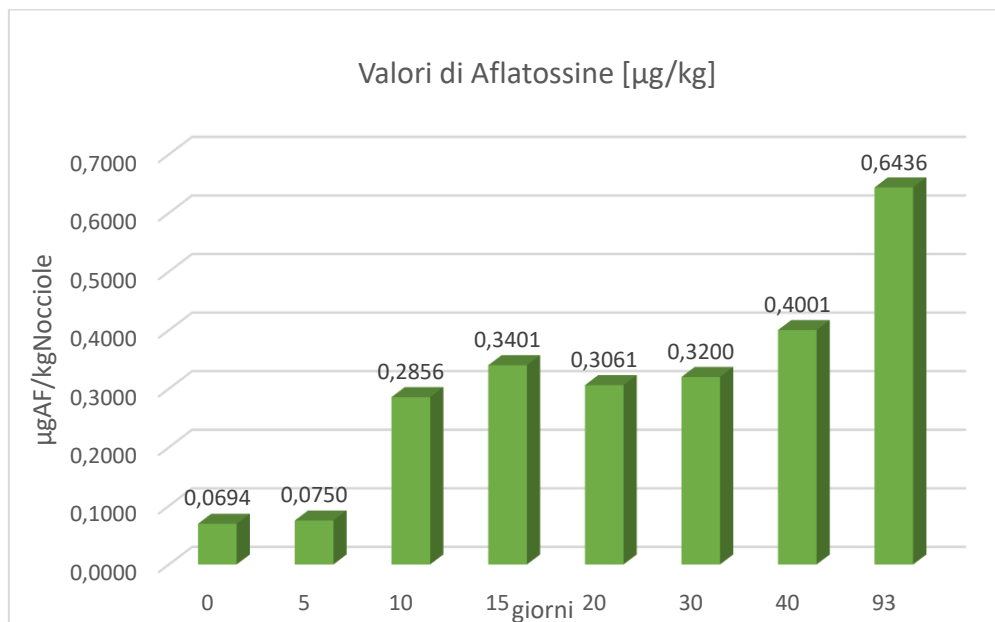


Figura 5.14 Valori di aflatossine espressi in µg/kg

Si può inoltre notare che il valore ottenuto per le nocciole incubate 5 giorni (0,0750 µg/kg) si presenta simile al valore delle nocciole tal quali (0,0694 µg/kg), mentre il campione relativo ai 10 giorni presenta una concentrazione di aflatossine notevolmente maggiore (0,2856 µg/kg) se confrontata ai valori precedenti.

I valori ottenuti in corrispondenza dei 93 giorni (0,6436 µg/kg) e dei 15 giorni (0,3401 µg/kg) fanno riferimento alle prove effettuate in condizioni di temperatura ambiente (rispettivamente 1° e 2° prova) che oscillava tra 24-27° C. In particolare, il valore ottenuto nella prova n°2 è risultato essere maggiore rispetto a quello ottenuto in corrispondenza dei 20 giorni nella prova effettuata a temperatura costante di 25°C (prova 4).

Tutti i valori ottenuti di aflatossine sono risultati inferiori a **4 µg/kg** che rappresenta il livello massimo consentito dai regolamenti (UE) n. 165/2010 di aflatossine totali (B1+B2+G1+G2) per arachidi, noci, frutta secca e prodotti trasformati destinati al consumo diretto o come ingrediente negli alimenti.

Uno studio [7] che tratta di un'analisi condotta su 93 campioni di nocciole provenienti dall'Italia, Turchia, Stati Uniti e Spagna, con lo scopo di quantificarne le AF totali (B1,B2,G1,G2) presenti, ha evidenziato le seguenti concentrazioni di AF mostrate nella Tabella 5.12.

Nocciole	Campioni	Positivi	Media AF [$\mu\text{g/kg}$]
Italiane	78	28	0,14
Turche	9	6	0,33
Altri paesi	6	1	0,19

Tabella 5.12 Studio effettuato su campioni di nocciole provenienti da diversi paesi

Da questo studio è emerso che le nocciole turche sono le più contaminate con un valore pari a 0,33 $\mu\text{g/kg}$. Tale valore si avvicina a quello ottenuto a seguito di 30 giorni di incubazione del monolayer di nocciole all'interno del microcosmo (0,32 $\mu\text{g/kg}$).

5.7 Confronto tra la CO_2 prodotta e i valori di aflatossine

Al fine di correlare la CO_2 prodotta con la concentrazione di aflatossine prodotte, si sono diagrammati i valori medi di CO_2 cumulati nel tempo con i corrispondenti valori di AF determinati nella medesima prova. In particolare, sono stati riportati i valori ottenuti nella prova n°4, rappresentativi dei diversi range di incubazione dei microcosmi (che erano stati allestiti in triplicato). Per una migliore comprensione è stato diagrammato anche il valore ottenuto in merito alla 1° prova, il cui tempo di incubazione è stato pari a 93 giorni, e il valore ottenuto per il campione di nocciole tal quale non incubato.

Si è dunque diagrammato nell'asse principale delle ordinate (asse a sinistra) i mg di CO_2 cumulati su kg di nocciole e sull'asse secondario delle ordinate (asse a destra) i μg di aflatossine per kg di nocciole incubate.

Dunque, nel grafico 5.13, si può visualizzare in corrispondenza di ogni range temporale la quantità di CO_2 cumulata valutata all'interno dei microcosmi e il valore di AF rilevato.

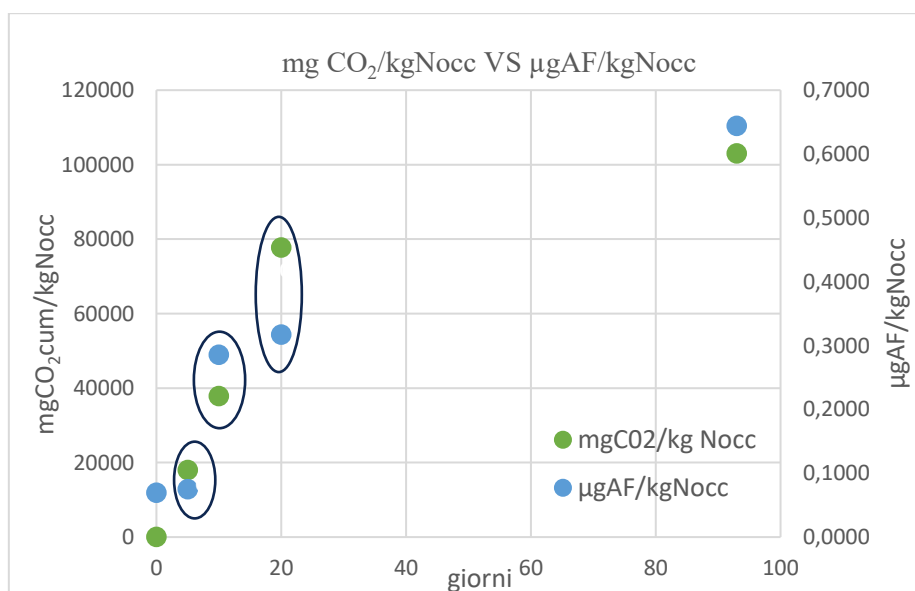


Figura 5.15 Valori di CO_2 e corrispondenti AF

Come già riportato, le nocciole ancor prima di essere incubate presentavano un certo livello di AF pari a 0,0694 µg/kg. In riferimento alla prova n° 4, evidenziata in figura 5.15 mediante cerchi, la quantità di CO₂ prodotta (mostrata in verde) cresce in modo significativo nei primi 20 giorni mentre i valori di micotossine (mostrati in blu) si mantengono circa costanti tra 10 (0,28558 µg/kg) e 20 giorni (0,30605 µg/kg).

Per la prova n°1, in cui i microcosmi sono stati incubati per 93 giorni (periodo di incubazione più lungo), in corrispondenza a un valore di CO₂ prodotto pari a 1,03E+05 mg/kg si è ottenuto un valore corrispondente di aflatossine pari a 0,64362 µg/kg (Tabella 5.13).

Prova	Giorni	µgAF/kgNocciole	mgCO₂cumulati/kgNocciole
Tal quale non incubate	0	0,0694±0,0611	0
prova 4 (<i>S_X</i>)	5	0,0750±0,00870	1,80E+04±19,9825
prova 4 (<i>S_X</i>)	10	0,28558±0,07491	3,78E+04±15,7975
prova 4 (<i>S_X</i>)	20	0,30605±0,03339	7,77E+04±7,0710
prova 1 (<i>V_X</i>)	93	0,64362±0,01790	1,03E+05

Tabella 5.13 Valori di micotossine [µg/kg] e corrispondenti valori di CO₂ [mg/kg]

Per evidenziare meglio la relazione che intercorre tra la produzione di CO₂ da parte della biomassa fungina e le aflatossine prodotte, si è costruito il seguente grafico in cui sono state riportate in ordinata i valori di AF e in ascissa i valori di CO₂ cumulati nei range temporali di 5-10-20 giorni (prova 4), 30 giorni (prova 3) e 40 giorni.

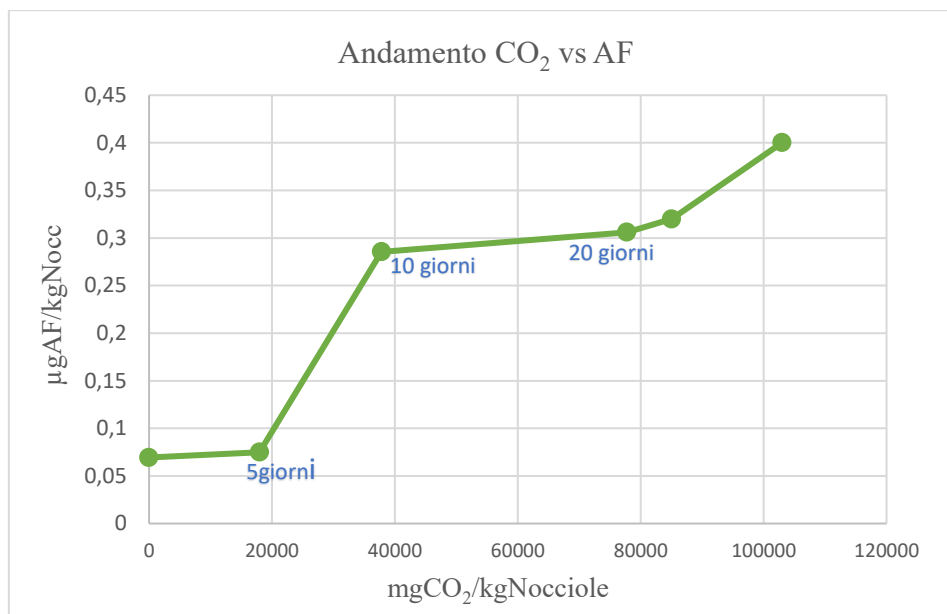


Figura 5.16 Valori medi di CO₂ cumulati in funzione delle micotossine

Dall'analisi del grafico 5.16, è possibile notare come il tratto caratteristico dei primi 5 giorni di incubazione e quello relativo al range tra 10 e 20 giorni indicano un aumento della CO₂ prodotta senza incrementi altrettanto importanti di AF. Accade l'opposto in corrispondenza del secondo tratto rappresentativo del range temporale tra 5 e 10 giorni di incubazione. Infatti, ad un grande incremento della concentrazione di AF non è stato riscontrato un corrispondente incremento di CO₂ prodotta. In particolare, la concentrazione di AF è aumentata di circa un ordine di grandezza (da 0,0749 a 0,2855 µg/kg) mentre la CO₂ da 1,80E+04 a 3,78E+04 mg/kg. Il tratto successivo tra 10 e 20 giorni, mostra invece che l'anidride carbonica prodotta è aumentata da 3,78E+04 a 7,77E+04 mg/kg con variazioni di aflatoxine da 0,2856 a 0,3061 µg/kg.

Ciò indica che condizioni ottimali di crescita fungina, e dunque di produzione di CO₂, non coincidono con quelle responsabili della produzione di micotossine [3]. Infatti la più alta produzione di aflatoxine si è verificata in una fase in cui non si è avuta una elevata respirazione e dunque una crescita attiva dei microrganismi fungini.

In quanto metaboliti secondari, le AF potrebbero essere dunque associate a una fase stazionaria di crescita probabilmente dovuta a una situazione di stress del fungo.

6. Monitoraggio continuo tramite sensore BME688

6.1 Gestione della sicurezza alimentare

In un contesto in cui le catene di approvvigionamento alimentare diventano sempre più estese e globali, affrontare le sfide legate alla sicurezza alimentare è di primaria importanza.

Ne deriva la necessità di sviluppare tecnologie in grado di migliorare il controllo e il monitoraggio della sicurezza alimentare mediante approcci tempestivi e mirati in grado di ridurre i rischi per la salute umana.

In questo capitolo verrà testato il funzionamento del sensore BME688 caratterizzato da un sistema di comunicazione wireless che consente la raccolta e la condivisione dei dati in modo continuo. Il sensore BME688 è stato progettato con lo scopo di ottenere una tecnologia economicamente ed energeticamente efficiente per la gestione della sicurezza alimentare sfruttando strumenti a basso costo [23]. In particolare, in questo lavoro di Tesi si è sfruttato il sensore BME688 per ottenere misure di CO₂ e di composti organici volatili VOC in un microcosmo biotico caratterizzato al suo interno da un monolayer di nocciole su cui si è sviluppata biomassa.

6.1.1 Rete di raccolta dati

Per superare il concetto di tracciabilità sono necessari approcci che possano inglobare nel controllo della sicurezza alimentare l'intera supply chain.

Le tecnologie più adatte per il monitoraggio non invasivo e in grado di coprire grandi distanze prevedono l'utilizzo di un sistema di Wireless Sensor Network (WSN).

Ciò consente una raccolta di informazioni più complete da condividere lungo la filiera produttiva, ovvero dalla raccolta degli alimenti fino al loro consumo.

La tecnologia wireless utilizzata per sviluppare il sensore BME688 è LoRa (Long Range).

Si tratta di una tecnologia di modulazione di frequenza a spettro espanso derivata dalla tecnologia di Chirp Spread Spectrum (CSS) sviluppata da Cycleo di Grenoble, in Francia. LoRa rappresenta la prima implementazione a basso costo dello spettro di diffusione chirp per uso commerciale e costituisce un protocollo di comunicazione che compete con altre reti wireless a bassa potenza (LPWAN) come IoT a banda stretta (NB IoT) o LTE Cat M1, SigFox e Ingenu [23].

6.2 Sensore BME688

Il BME688 è un sensore ambientale digitale in grado di effettuare misure di gas, umidità, pressione e temperatura nell'area di interesse sviluppato per dispositivi mobili e connessi in cui le dimensioni e il basso consumo di energia sono requisiti critici [24].

Progettato per interagire con due elementi software, ovvero la libreria **BME68x** e la libreria **BSEC**, che fornisce in output valori derivati e permette di effettuare la classificazione di gas. Attraverso la libreria BSEC (Bosch Software Environmental Cluster) è possibile ottenere, dal valore resistivo, un indice per la qualità dell'aria (IAQ) compreso tra 0 e 500, utilizzato per

valutare la qualità dell'aria nell'ambiente circostante al sensore. La classificazione e la codifica mediante colori dell'indice IAQ fa riferimento alla tabella 6.1.

indice IAQ	Qualità dell'aria
0-50	Eccellente
51-100	Buono
101-200	Leggermente inquinato
201-250	Moderatamente inquinato
251-350	Fortemente inquinato
>351	Estremamente inquinato

Tabella 6.1 indice IAQ

La libreria BSEC definisce inoltre le diverse modalità energetiche del sensore con le corrispondenti frequenze di lettura supportate.

I parametri tecnici forniti indicano che il consumo di energia del sensore varia in modo significativo a seconda della modalità di funzionamento. Per tale motivo il sensore dispone di modalità a bassissimo consumo (ULP) e a basso consumo (LP).

Infatti, il consumo di corrente del sensore può essere estremamente basso in alcune modalità (ad esempio, 2,1 μ A) ma anche relativamente alto (ad esempio, 3,9 mA) quando è in modalità di scansione dei gas [24].

6.2.1 Output forniti dal sensore

Il BME688 è un sensore a base di ossido di metallo che rileva i gas attraverso il processo di adsorbimento (e successiva ossidazione/riduzione) sul suo strato sensibile.

Per quanto riguarda il rilevamento dei gas, il sensore è stato testato con acido solfidrico, etanolo, monossido di carbonio e alcuni composti organici volatili prodotti durante l'espiazione (b-VOC) che includono:

1. Isoprene/2-metil-1,3 Butadiene
2. Acetone
3. Etano

Tale miscela di b-VOC (breath-VOC), testati nel range tra 0,5-15 ppm, fa riferimento ai composti più importanti nel respiro esalato da esseri umani sani secondo diverse pubblicazioni sugli studi sull'analisi del respiro [24]. Inoltre, il sensore BME688 fornisce una misura indiretta della CO₂ [ppm] derivante da una stima ottenuta dalla correlazione media tra i VOC misurati nell'alito umano e la CO₂ attraverso la relazione 6.1.

$$CO_2 = a * VOC + b \quad (6.1)$$

Dove:

- CO_2 rappresenta il livello di CO_2 stimato,
- VOC rappresenta il livello di VOC misurato dal sensore BME688
- “a” e “b” sono i coefficienti determinati attraverso l'analisi di regressione

Dunque, la CO_2 è calcolata mediante regressione lineare utilizzando dei coefficienti specifici ottenuti attraverso il processo di calibrazione e l'analisi dei dati. I coefficienti “a” e “b” vengono calcolati in maniera automatica dalla libreria BSEC e sono costanti impiegate in ogni calcolo della CO_2 . È importante sottolineare che tali coefficienti sono intrinsecamente dipendenti dai valori precedenti ottenuti dal sensore, consentendo così una stima più precisa della concentrazione di CO_2 , in quanto il sensore tiene conto sia del valore effettivo che del suo ambiente [25].

6.3 Test del sensore in un microcosmo biotico

Per valutare il funzionamento del sensore BME688, sono stati effettuati due test distinti.

Nel primo test, il sensore è stato configurato per restituire il valore della CO_2 (ppm), mentre nel secondo test si è monitorato sia l'anidride carbonica che i composti organici volatili (VOC) prodotti dalla biomassa formatasi all'interno del microcosmo.

Durante la sperimentazione eseguita, il sensore BME688 è stato inserito all'interno del microcosmo biotico come mostrato in figura 6.1 e 6.2. Inoltre, poiché le misure di gas richiedono una maggiore potenza è stato necessario mantenere un'alimentazione continua per il monitoraggio a lungo termine.



Figura 6.1 Microcosmo con sensore



Figura 6.2 Sensore BME688

In particolare, per ogni test effettuato, sono stati preparati due microcosmi secondo il seguente schema:

- **Microcosmo 1:** allestito in un barattolo a chiusura ermetica in presenza di 32 ml di H₂O sterile sul fondo per mantenimento dell'umidità al 40% e di un monolayer di nocciole (con un peso secco di 37 grammi) posizionato sul supporto a treppiede in plastica in presenza del sensore BME688 (Figura 6.3);
- **Microcosmo 2:** allestito in un barattolo a chiusura ermetica in presenza di 20 ml di H₂O sterile sul fondo per mantenimento dell'umidità al 40% e di un monolayer di nocciole (con un peso secco di 37 grammi) posizionato sul supporto a treppiede in plastica in presenza della soluzione di NaOH (12 ml) come mostrato in figura 6.4; In aggiunta è stato allestito un sistema di “controllo” (che si presentava come quello in figura 6.4) mantenuto in condizioni di sterilità e caratterizzato da un monolayer di nocciole sterilizzate.



Figura 6.3 Microcosmo 1



Figura 6.4 Microcosmo 2

Per ogni test è stato considerato un microcosmo 1 (Figura 6.3) in cui era presente il sensore BME688 e un microcosmo 2 (Figura 6.4) in presenza della soluzione di NaOH con relativo controllo.

Per la misura della CO₂ nel microcosmo 2, è stato necessario aprire il sistema e titolare la soluzione di NaOH successivamente sostituita. Questa procedura, ripetuta per 15 giorni, ha consentito l'ottenimento del valore di anidride carbonica giorno per giorno (capitolo 4).

La presenza del sensore BME688 nel microcosmo 1 ha permesso invece una misura continua di CO₂ (test 1, test 2) e una misura continua di VOC (test 2) registrata ogni 5 minuti.

Di conseguenza, al fine di avere per ogni microcosmo valori di anidride carbonica (o di VOCs) riferiti allo stesso tempo di incubazione, i due microcosmi sono stati aperti in contemporanea

ogni 24 h (a eccezione del fine settimana) per un intervallo di 15 minuti e successivamente richiusi. Di conseguenza, tra tutti i valori forniti dal sensore, sono state considerate le misure registrate dal sensore prima dell'apertura del microcosmo.

6.3.1 Test 1-Misura della CO₂

Al fine di relazionare la CO₂ valutata in modo discontinuo tramite la sua cattura nella soluzione di NaOH (e alla successiva titolazione) con la CO₂ registrata dal sensore in modo continuo, si è effettuato un primo test in laboratorio. Come descritto nel paragrafo precedente, sono stati monitorati due diversi microcosmi:

- Microcosmo 1: misura continua di CO₂ registrata dal sensore BME688
- Microcosmo 2: misura discontinua di CO₂ effettuata ogni 24 h.

Per relazionare i due microcosmi, nel caso del microcosmo 1, sono stati presi in considerazione i livelli di CO₂ (ppm) registrati dal sensore prima dell'apertura del microcosmo (vedi tabella 6.2). Tuttavia, il primo valore, pari a 500 ppm, corrisponde alla registrazione effettuata 5 minuti dopo la chiusura del microcosmo.

Di conseguenza, questo valore rappresenta la concentrazione di CO₂ presente nell'ambiente esterno al microcosmo, poiché il sensore rileva una variazione nella quantità di anidride carbonica, ma non fornisce il valore esatto corrispondente senza un confronto con un valore precedente. Generalmente, i livelli di CO₂ compresi tra 400 e 1000 ppm sono tipici di interni abitati e ben ventilati [26].

Test 1: Microcosmo 1	
Data	CO₂ cumulata [ppm]
15-05-2023	500
16-05-2023	1563
17-05-2023	3786
19-05-2023	5213
22-05-2023	5744
23-05-2023	6144
24-05-2023	10274
25-05-2023	12104
26-05-2023	13854
29-05-2023	15214
30-05-2023	15726

Tabella 6.2 Valori di CO₂ cumulati [ppm]

La titolazione della soluzione di NaOH presente nel microcosmo 2 ha restituito i valori di CO₂ cumulati mostrati in tabella 6.3.

Test 1: Microcosmo 2	
Data	CO₂ cumulata [mg]
15-05-2023	0
16-05-2023	759
17-05-2023	1527
19-05-2023	2289,3
22-05-2023	3041,7
23-05-2023	3794,1
24-05-2023	4559,7
25-05-2023	5322
26-05-2023	6077,7
29-05-2023	6816,9
30-05-2023	7579,2

Tabella 6.3 Valori di CO₂ cumulati [mg]

La schermata dei valori di CO₂ restituita dal sensore BME688 a partire dalla prima misura registrata il 15/05/23 (ore 12:00) si presentava come in figura 6.5.

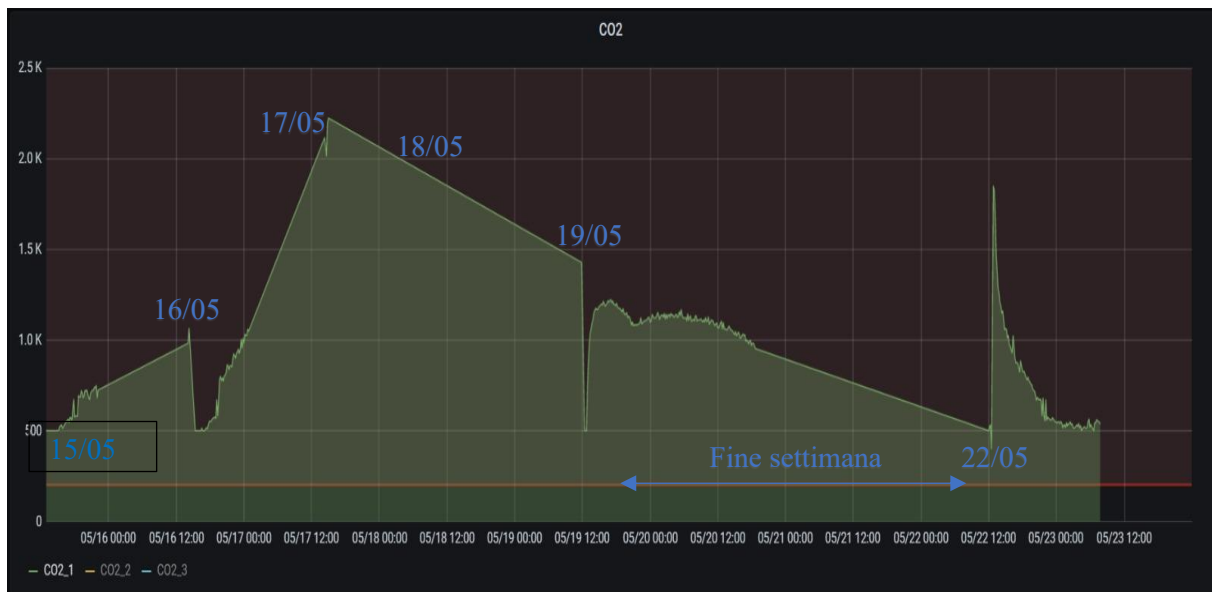


Figura 6.5 Schermata relativa ai ppm di CO₂ restituita dal sensore BME688 (15/05-23/05/23)

A seguito dell'apertura del microcosmo biotico contenente il sensore, il valore di CO₂ è diminuito raggiungendo la condizione iniziale (circa 500 ppm) per poi aumentare a seguito della chiusura. Trascorse le prime 24 h, il valore di CO₂ registrato è raddoppiato rispetto a quello iniziale (500 ppm) mentre 48 h dopo si è ottenuto un valore circa cinque volte maggiore. Tuttavia, il 18/05/23 (a partire dalle ore 16:00) a causa di un malfunzionamento non sono stati registrati valori fino alle ore 12:00 del giorno successivo in cui è stato necessario agire manualmente. I valori puntuali registrati dal sensore ogni 24h prima dell'apertura del microcosmo sono riportati in tabella 6.4.

Microcosmo 1-Valori puntuali	
Data	CO₂ [ppm]
15-05-2023	500
16-05-2023	1063
17-05-2023	2223
18-05-2023	\
19-05-2023	1427
22-05-2023	531
23-05-2023	400
24-05-2023	4130
25-05-2023	1830
26-05-2023	1750
29-05-2023	1360
30-05-2023	512

Tabella 6.4 Valori di CO₂ puntuali [ppm]

A seguito del fine settimana, in cui il microcosmo non è stato aperto, in data 22/05/23 si è ottenuto un valore simile a quello iniziale (531 ppm) mentre il giorno successivo si è registrato il più basso valore di CO₂ pari a 400 ppm. A seguito di ciò, il sensore è stato posizionato all'incirca a 1 cm dal monolayer di nocciole (contrariamente a quanto fatto in precedenza) e trascorsi 5 minuti dalla chiusura, l'andamento di CO₂ è risalito in modo repentino fino a 12 500 ppm (figura 6.6) per poi diminuire fino a 4130 ppm (valore registrato prima dell'apertura del microcosmo 24 h dopo). Nei giorni successivi, i valori registrati presentavano una media pari a 1600 ppm a eccezione dell'ultimo giorno di incubazione.

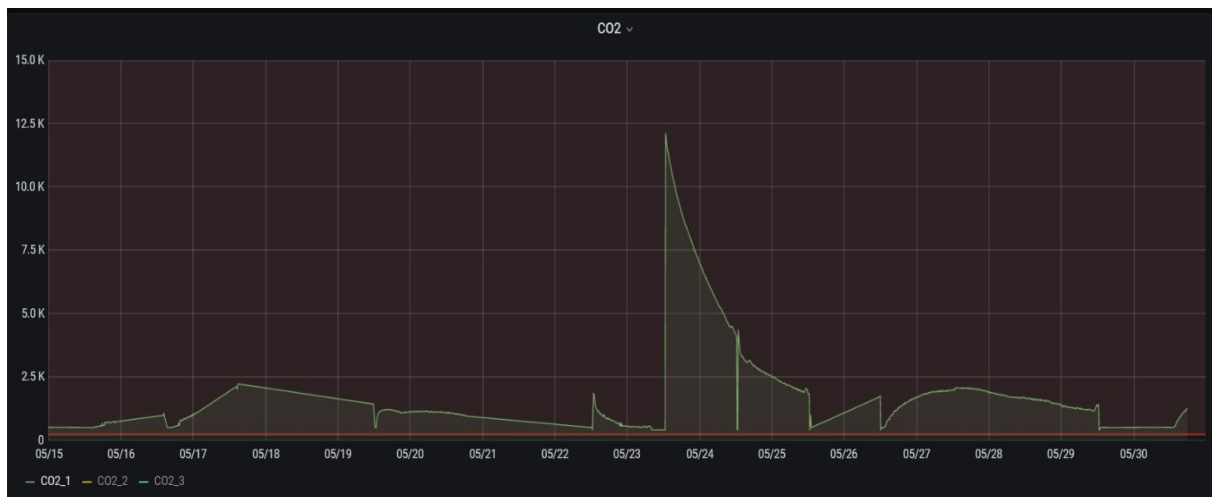


Figura 6.6 Schermata relativa ai ppm di CO₂ (15/05-30/05/23)

6.4 Composti organici volatili (VOC)

Data la capacità del sensore BME688 di rilevare in modo diretto i composti organici volatili (VOC), è stato effettuato un secondo test in laboratorio.

I VOC sono composti a basso peso molecolare in grado di evaporare facilmente a temperatura e pressione atmosferiche normali [27].

Molti studi hanno evidenziato che i funghi durante la crescita producono VOC sotto forma di una miscela estremamente diversificata di composti chimici che presentano spesso un odore caratteristico. Questa miscela gassosa può contenere acidi, alcoli, aldeidi, composti aromatici, esteri, eterocicli, chetoni, terpeni, tioli e altro ancora [28].

Sono stati identificati più di 300 VOC distinti nei funghi, che variano in base al tipo di substrato, ai livelli di umidità, alla temperatura, alla durata di crescita dei funghi e alle interazioni con altri organismi. Alcuni studiosi usano il termine volatoma per riferirsi a questa complessa e dinamica miscela metabolica, che rappresenta l'insieme completo dei composti prodotti da un organismo in un momento specifico. [27].

6.4.1 Misura indiretta della crescita fungina mediante i VOC

I VOC fungini sono stati studiati in contesti legati al deterioramento degli alimenti causato dall'attività metabolica dei microrganismi che contribuiva all'insorgenza di sapori e odori indesiderati. Ad esempio, tali composti sono stati utilizzati per rilevare la presenza di contaminazione fungina in una fabbrica di marmellata e prodotti da forno, oltre che come indicatori di muffa in cereali immagazzinati.

Infatti, alcuni studi effettuati su cereali hanno evidenziato che la più alta produzione di metaboliti fungini volatili precede la produzione di tossine. In particolare, la coltivazione di *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx su diversi substrati di agar a base di cereali e su chicchi di avena ha consentito di dimostrare che la produzione di metaboliti volatili è ben correlata alla produzione di CO₂ [29].

Da un ulteriore studio che ha analizzato sei specie fungine (*Penicillium brevicompactum*, *P. glabrum*, *P. roqueforti*, *Aspergillus flavus*, *A. versicolor*, e *A. candidus*) inoculate su chicchi di grano è emerso che la correlazione aumentava al crescere del tempo di incubazione, ovvero considerando la produzione cumulata di CO₂ riferita a ciascun fungo e i VOC totali prodotti [30]. Da ciò deriva la possibilità di utilizzare i metaboliti volatili come indicatori precoci per rilevare la presenza di funghi micotossigeni. Infatti, i composti volatili prodotti sia da *Aspergillus nidulans* che da *A. parasiticus* hanno influenzato la biosintesi delle aflatossine mentre i terpeni volatili sono stati correlati alla formazione di micotossine tricotecene da parte di diverse specie di *Fusarium* [27].

I COV sono stati anche studiati in relazione alla loro capacità di inibire la produzione di micotossine. Ad esempio, il 2-etil-1-esanolo è riuscito a inibire la crescita di *A. parasiticus* ma allo stesso tempo ne ha aumentato l'accumulo di aflatossina, mentre il 2-buten-1-olo (alcol crolilico) ha esercitato effetti dose-dipendenti sia nell'incremento che nella riduzione della produzione di aflatossine. L'etilene, composto volatile ben noto per la sua attività biologica, ha invece inibito la produzione di aflatossine in modo dose-dipendente [27].

6.4.2 Test 2-Misura dei VOC e della CO₂

Data l'importanza associata allo studio dei VOC di origine fungina, si è sfruttata la capacità del sensore BME688 di rilevare in modo diretto i VOC per effettuare un secondo test utilizzando un microcosmo 1 (figura 6.3) e un microcosmo 2 (figura 6.4) come descritto nel paragrafo 6.3. Per il secondo test il sensore BME688 è stato configurato per restituire sia i livelli di CO₂ che i composti organici volatili (VOC) prodotti all'interno del microcosmo 1.

Nel microcosmo 2 invece si è valutata l'anidride carbonica prodotta a seguito della titolazione della soluzione di NaOH effettuata ogni 24 h (tabella 6.5).

Test 2: Microcosmo 2	
Data	CO₂ cumulata [mg]
26-06-2023	0
27-06-2023	759
28-06-2023	1485
29-06-2023	2234,1
03/07/2023	2979,9
04/07/2023	3732,3
05/07/2023	4481,4
06/07/2023	5243,7
07/07/2023	5986,2
10/07/2023	6741,9
11/07/2023	7467,9
12/07/2023	8203,8

Tabella 6.5 Valori cumulati di CO₂ [mg] prodotti nel microcosmo 2

Il primo valore di b-VOC pari a 0,49 ppm (tabella 6.5) corrisponde alla registrazione effettuata 5 minuti dopo la chiusura del microcosmo e deriva da una differenza tra i b-VOC presenti nell'ambiente esterno al microcosmo e quelli presenti all'interno. I restanti valori fanno riferimento alla CO₂ e ai VOC rappresentativi dell'ultima misura registrata dal sensore prima dell'apertura del microcosmo.

Test 2: Microcosmo 1 (valori cumulati)		
Data	VOC [ppm]	CO ₂ [ppm]
26-06-2023	0,49	510
27-06-2023	1,01	1580
28-06-2023	2,81	2650
29-06-2023	4,61	12100
03/07/2023	6,61	13140
04/07/2023	7,62	13951
05/07/2023	8,37	14632
06/07/2023	23,9	16652
07/07/2023	83,9	19264
10/07/2023	85,68	20324
11/07/2023	208,68	24064
12/07/2023	308,68	26896

Tabella 6.6 Valori cumulati di CO₂ e VOC [ppm] prodotti nel microcosmo 1

Per analizzare i valori registrati dal sensore BME688, si è effettuata una media dei dati di VOC e CO₂ ottenuti ogni 24 h. Inizialmente i valori ottenuti hanno mostrato andamenti tra loro coerenti (figura 6.7) così come ci aspettavamo. Infatti, la CO₂ è ricavata dal sensore in modo indiretto attraverso la relazione 6.1 che dipende dai composti organici volatili.

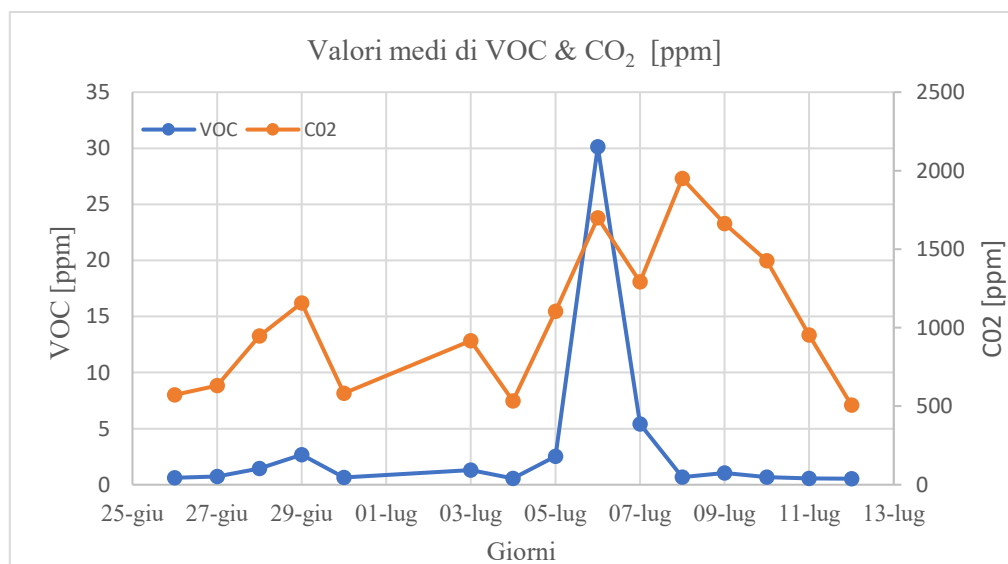


Figura 6.7 Andamento valori medi di b-VOC e CO₂ registrati dal sensore

Tuttavia, in data 30/07/23 il sensore ha registrato una minore quantità di dati (57 contro 146 il giorno precedente) come mostrato in tabella 6.7. Inoltre, in data 6/07/23 alle ore 18:21 si è ottenuto un valore massimo di VOC pari a 312,86 ppm (il più alto valore di VOC registrato durante questa prova) senza un corrispondente aumento di CO₂. A seguito di ciò, il comportamento dei due andamenti non è più risultato coerente anche in relazione al numero dei dati raccolti dal sensore.

Giorno	b-VOC medi [ppm]	Max b-VOC [ppm]	CO₂ media [ppm]	max CO₂ [ppm]	Dati raccolti
26-giu	0,6143 ± 0,1280	0,88	571,97 ± 89,9135	751	140
27-giu	0,7274 ± 0,2882	1,39	631,79 ± 163,2995	953	247
28-giu	1,4492 ± 0,7517	1,8	946,64 ± 239,3320	1065	247
29-giu	2,6659 ± 0,7517	3,92	1156,71 ± 319,1478	1408	146
30-giu	0,6576 ± 124,436	1,15	582,82 ± 124,4363	869	57
03-lug	1,2928 ± 0,1736	1,76	916,06 ± 60,4179	1055	136
04-lug	0,5706 ± 0,0906	0,72	532,77 ± 47,1814	580	67
05-lug	2,5316 ± 1,4782	5,22	1104,88 ± 347,4244	1535	76
06-lug	30,130 ± 67,3059	312,86	1698,97 ± 692,5154	3339	105
07-lug	5,4111 ± 12,0377	80,84	1292,87 ± 401,655	2742	63
08-lug	0,6772 ± 0,2165	1	1950,883 ± 95,3764	2077	136
09-lug	1,0489 ± 0,3177	1,81	1663,068 ± 123,3131	1917	130
10-lug	0,6801 ± 0,1524	0,88	1426,00 ± 8,2808	1440	35
11-lug	0,5508 ± 0,0715	0,7146	953,111 ± 483,4776	1473	35
12-lug	0,5375 ± 0,0761	0,76	506,944 ± 10,6662	535	35

Tabella 6.7 Valori medi di b-VOC e CO₂ prodotti registrati dal sensore

6.5 Risultati test 1 e 2

A seguito dei dati raccolti dal sensore nel primo test, si è cercato di relazionare i ppm di CO₂ ottenuti nel primo microcosmo con i valori di anidride carbonica (mg) valutati tramite titolazione nel secondo microcosmo.

I valori numerici ottenuti (dati non riportati) non sono risultati tuttavia confrontabili in quanto il sensore BME688 non si è dimostrato adatto alla seguente sperimentazione.

Esso, infatti, restituisce una misura indiretta della CO₂ derivante da una correlazione media tra b-VOCs e CO₂ mediante coefficienti che vengono calcolati in maniera automatica dalla libreria BSEC.

Sfruttando dunque la capacità del sensore BME688 di rilevare in modo diretto i VOC prodotti si è deciso di effettuare un secondo test. Sulla base ai dati acquisiti dal sensore all'interno del microcosmo 1, è risultato evidente che i valori ottenuti da un certo momento in poi non si sono dimostrati attendibili. Le anomalie legate ai risultati ottenuti potrebbero essere derivate da tre aspetti principali tra loro collegati. Il primo aspetto riguarda la capacità del sensore di fornire una stima dell'output in questione solo in relazione alle variazioni osservate tra le condizioni attuali del sensore e quelle dell'ambiente circostante. Dunque, l'apertura del microcosmo contenente il sensore ogni 24 h ha esposto tale strumento a continue fluttuazioni di condizioni ambientali totalmente differenti. Da un lato, infatti, vi era un sistema chiuso di 1,062 l contenente il monolayer di noccioline (e la relativa biomassa formata) e dall'altro l'ambiente esterno costituito dal laboratorio didattico.

Ciò potrebbe aver portato al raggiungimento di condizioni di saturazione che hanno comportato stime errate da parte del sensore.

Inoltre, dall'analisi dei dati di letteratura effettuata, non è stato possibile stabilire una correlazione tra la miscela di b-VOC (isoprene, acetone, etano) rilevata dal sensore e quelli emessi dai microrganismi fungini [30].

7. Conclusioni e sviluppi futuri

Il presente lavoro di tesi è stato suddiviso in 3 sezioni principali. Nella prima sezione, si è focalizzata l'attenzione sulla crescente problematica associata alla presenza di aflatossine nelle nocciole, sia nel mercato italiano che in quello estero.

Infatti, diversi campionamenti effettuati su nocciole e prodotti correlati hanno rivelato la presenza di queste sostanze tossiche in grado di provocare patologie sia acute che croniche.

Tra il 2016 e il 2022 sono state registrate numerose notifiche RASFF (Sistema di allarme rapido per alimenti e mangimi) riguardanti incidenti legati alla presenza di aflatossine nelle nocciole.

Per comprendere la problematica legata a tale contaminazione, è stata effettuata un'analisi di un documento di letteratura che mette in luce alcuni importanti indicatori associati al potenziale rischio di insorgenza di aflatossine nelle nocciole, evidenziando come tale rischio possa insorgere sin dalla fase di raccolta.

Dall'analisi di questo modello concettuale, è emerso che il più alto rischio di insorgenza di aflatossine nelle nocciole è associabile a condizioni di umidità relativa e temperatura elevate nella fase pre-raccolta, oltre che al contatto con il suolo durante la raccolta/essiccazione.

Da ciò deriva la necessità di implementare strategie di controllo che consentano di prevedere la potenziale presenza di micotossine nelle nocciole prima che queste siano immesse sul mercato.

La seconda sezione di questa tesi, ovvero la parte sperimentale, è stata dedicata al monitoraggio della CO₂ come nuovo parametro di "allerta" per la previsione precoce dell'attività metabolica dei funghi produttori di micotossine nelle nocciole.

Attraverso l'allestimento di diverse prove di laboratorio che prevedevano l'incubazione di un monolayer di nocciole all'interno di un sistema chiuso (microcosmo), è stata monitorata la CO₂ [mg] prodotta dalla biomassa fungina formata su tale matrice.

L'anidride carbonica è stata valutata, in modo discontinuo, tramite la sua cattura nella soluzione di NaOH presente all'interno dei microcosmi e alla successiva titolazione.

Sono state considerate due diverse geometrie di microcosmi: una di forma cilindrica con un volume di 1,062 l e l'altra di forma tronco-conica con un volume di 1,050 l.

Ciò ha permesso di constatare che, indipendentemente dalla forma, ma considerando volumi simili, la distribuzione della biomassa sulle nocciole è avvenuta in modo uniforme con la stessa tempistica.

Tra le tipologie di prove effettuate, è stata fatta una distinzione tra condizioni di temperatura costante mantenuta tramite termostato (25°C) e temperatura ambiente non controllata che oscillava tra 24-27°C. Da tali prove si è riscontrato che i microcosmi mantenuti a temperatura costante di 25°C hanno mostrato visivamente una minore contaminazione e dunque uno sviluppo più lento di spore di colore giallo/verde sul monolayer di nocciole.

Questa osservazione è stata confermata anche dal punto di vista della produzione di CO₂, che si è dimostrata inferiore nei microcosmi mantenuti a temperatura costante.

Da ciò si può affermare la temperatura costituisce un parametro ambientale che presenta un impatto significativo sulla contaminazione microbica. In particolare, è stato dimostrato che

variazioni nelle condizioni di temperatura possono rappresentare una situazione di stress in grado di accelerare il metabolismo dei funghi responsabili della produzione di aflatossine.

La respirometria associata alla crescita fungina è stata inoltre valutata attraverso il Respirometric Sensor, mediante il quale è stata ottenuta la velocità specifica di consumo di ossigeno (RO_2) e di conseguenza l'ossigeno consumato. Questo ha consentito il calcolo di alcuni valori di quoziente respirometrico (QR) attraverso il rapporto tra la CO_2 prodotta e l'ossigeno consumato.

Per cercare di correlare la CO_2 prodotta con la concentrazione di aflatossine formate a seguito dell'incubazione, i campioni di nocciole sono stati analizzati mediante il kit ELISA RIDASCREEN Aflatoxins Total. Tutti i campioni analizzati nella seguente sperimentazione sono risultati contaminati da aflatossine (AF) con concentrazioni al di sotto di 4 $\mu g/kg$, che costituisce il limite fissato dai regolamenti (UE) n. 165/2010 per le AF totali (B1, B2, G1 e G2) nelle nocciole destinate al consumo umano.

Dalla sperimentazione condotta è emerso che ad un aumento nella produzione di CO_2 corrispondeva un aumento della concentrazione di aflatossine.

Questi risultati hanno consentito di dimostrare che la CO_2 prodotta a seguito dell'attività fungina può essere utilizzata come indice di una potenziale presenza di aflatossine nelle nocciole.

In particolare, diagrammando la CO_2 prodotta in funzione dei valori di aflatossine, è emerso che gli incrementi rilevanti nelle concentrazioni di AF si verificavano durante i periodi in cui non si aveva una altrettanto significativa produzione di CO_2 .

Ciò ha confermato quanto riportato in letteratura, ovvero che le condizioni ottimali di crescita fungina, e quindi per la produzione di CO_2 , non coincidono con quelle responsabili della produzione di micotossine.

Nella terza e ultima sezione della presente tesi è stato testato all'interno dei microcosmi il sensore BME688 con l'obiettivo di monitorare in modo continuo la CO_2 nel tempo. Tuttavia, il sensore in questione non si è rivelato adatto in quanto fornisce una misura indiretta della CO_2 prodotta [ppm].

Ne deriva dunque la necessità di utilizzare un'altra tipologia di sensore adatto all'integrazione all'interno del microcosmo, in grado di restituire una misura affidabile e continua dell'effettiva CO_2 prodotta dalla biomassa fungina che potrebbe svilupparsi in una matrice alimentare come le nocciole. L'impiego di tali strumenti potrebbe certamente favorire una più approfondita comprensione dell'effetto della crescita fungina sulla formazione di aflatossine ad essa associata durante la conservazione delle nocciole.

L'integrazione di sensori di CO_2 potrebbe infatti rivelarsi utile nell'ottica di un sistema di stoccaggio di nocciole su larga scala, in cui il monitoraggio e la prevenzione di questa contaminazione costituisce una sfida complessa per garantire la sicurezza e la qualità delle nocciole destinate al consumo umano.

Riferimenti bibliografici

- [1] Spadaro, D., Prencipe, S., Valente, S., Piombo, E., Garibaldi, A., & Gullino, M. L., 2019, Presenza di funghi micotossigeni e gestione del rischio di contaminazione da micotossine nella frutta secca. *PROTEZIONE DELLE COLTURE*, 12, 17-25.
- [2] Mollea, C., & Bosco, F. (2015). Mycotoxins: Are They Perceived as a Serious Threat for the Human Health? *Chemical Engineering Transactions*, 44, 133-138.
- [3] Alshannaq, A., & Yu, J. H., 2017. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International journal of environmental research and public health*, 14(6), 632.
- [4] Tai, B., Chang, J., Liu, Y., & Xing, F., 2020. Recent progress of the effect of environmental factors on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production on foods. *Food Quality and Safety*, 4(1), 21-28.
- [5] Bhardwaj, K., Meneely, J. P., Haughey, S. A., Dean, M., Wall, P., Zhang, G., ... & Elliott, C. T., 2023. Risk assessments for the dietary intake aflatoxins in food: A systematic review (2016–2022). *Food Control*, 109687.
- [6] Imperato, R., Campone, L., Piccinelli, A. L., Veneziano, A., & Rastrelli, L., 2011. Survey of aflatoxins and ochratoxin a contamination in food products imported in Italy. *Food Control*, 22(12), 1905-1910.
- [7] Prelle, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L., 2012. Aflatoxin monitoring in Italian hazelnut products by LC-MS. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 5(4), 279-285.
- [8] Jeurissen, S., Seyhan, F., Kandhai, M., Dekkers, S., Booij, C., Bos, P., & van der Fels-Klerx, H., 2011. An indicator based “traffic light model” to pro-actively assess the occurrence of mycotoxins in tree nuts. *World Mycotoxin Journal*, 4(4), 405-412.
- [9] Bennett, J. W., 1987. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathologia. *Mycopathologia*, 100, 3-5.
- [10] Salvatore, M. M., Andolfi, A., & Nicoletti, R., 2023. Mycotoxin Contamination in Hazelnut: Current Status, Analytical Strategies, and Future Prospects. *Toxins*, 15(2), 99.
- [11] Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., & Varzakas, T., 2020. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods. *Foods*, 9(2), 137.

- [12] Arrus, K., Blank, G., Abramson, D., Clear, R., & Holley, R. A., 2005. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *Journal of Stored Products Research*, 41(5), 513-527.
- [13] Tolomeo M., 2007. Determinazione dell'ocratossina A in prodotti derivati da suini allevati con metodo biologico". Tesi di Laurea. Università degli studi di Pisa
- [14] Manna, M., & Kim, K. D., 2017. Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grain storage. *Mycobiology*, 45(4), 240-254.
- [15] Blanc, M., 2006. Sampling: the weak link in the sanitary quality control system of agricultural products. *Molecular nutrition & food research*, 50(6), 473-479.
- [16] Bacaloni, A., Cavaliere, C., Cucci, F., Foglia, P., Samperi, R., & Laganà, A., 2008. Determination of aflatoxins in hazelnuts by various sample preparation methods and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1179(2), 182-189.
- [17] Santos, A. O., Vaz, A., Rodrigues, P., Veloso, A. C., Venâncio, A., & Peres, A. M., 2019. Thin films sensor devices for mycotoxins detection in foods: Applications and challenges. *Chemosensors*, 7(1), 3.
- [18] VELP Scientifica. Determination of Microbial Soil Respiration with Respirometric Sensor System for Soil Analysis
- [19] Mollea C., 2003, Simulazione e monitoraggio in microcosmo della degradazione di un composto tossico volatile ad opera di microrganismi fungini. Tesi di Dottorato di Ricerca. Politecnico di Torino, Torino
- [20] Gama, T., Wallace, H. M., Trueman, S. J., & Hosseini-Bai, S., 2018. Quality and shelf life of tree nuts: A review. *Scientia horticulturae*, 242, 116-126.
- [21] Contini, M., Cecchini, M., Massantini, R., Monarca, D., & Moschetti, R., 2013. Proprietà nutrizionali-salutistiche e conservazione della frutta secca in guscio. *LE FORESTE, LA NATURA EL'ENERGIA*.
- [22] Narasaiah, K. V., Sashidhar, R. B., & Subramanyam, C., 2006. Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. *Mycopathologia*, 162, 179-189.
- [23] SALS: Gestione della sicurezza alimentare lungo la supply chain Task 2.3 – Strumenti di monitoraggio e gestione dei dati. Dipartimento di Scienza Applicata a Tecnologia, 2023, Politecnico di Torino, Torino.

- [24] Bosch Sensortec-<https://www.bosch-sensortec.com/products/environmental-sensors/gas-sensors/bme688>
- [25] The Things Network. LoRaWAN PHY Data Rate and Frame Format. Accessed on 10/08/2023. 2023. url: <https://www.thethingsnetwork.org/docs/>
- [26] Marinov, M. B., Ganev, B. T., & Nikolov, D. N., 2021. Indoor air quality assessment using low-cost commercial off-the-shelf sensors. In 2021 6th International Symposium on Environment-Friendly Energies and Applications (EFEA) (pp. 1-4). IEEE.
- [27] Inamdar, A. A., Morath, S., & Bennett, J. W., 2020, Fungal volatile organic compounds: more than just a funky smell?. Annual review of microbiology, 74, 101-116.
- [28] Hung, R., Lee, S., & Bennett, J. W., 2015, Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. Applied microbiology and biotechnology, 99, 3395-3405.
- [29] Börjesson, T., Stöllman, U., & Schnürer, J., 1990, Volatile metabolites and other indicators of *Penicillium aurantiogriseum* growth on different substrates. Applied and Environmental Microbiology, 56(12), 3705-3710.
- [30] Börjesson, T., Stöllman, U., & Schnürer, J., 1992, Volatile metabolites produced by six fungal species compared with other indicators of fungal growth on cereal grains. Applied and Environmental Microbiology, 58(8), 2599-2605.

Ringraziamenti

Questo lavoro di Tesi rappresenta la conclusione di un percorso di studi che mi ha consentito di arricchire le mie conoscenze portando anche a una crescita umana e professionale.

La mia determinazione, tenacia e forza di volontà mi hanno permesso di raggiungere questo importante traguardo.

Desidero ringraziare i miei relatori, la prof.ssa Micaela Demichela e la prof.ssa Francesca Bosco per avermi dato l'opportunità di lavorare a questo progetto di Tesi e per il loro contributo durante questo percorso. Ringrazio anche la dott.ssa Chiara Mollea per avermi seguita e supportata in questo lungo periodo di sperimentazione.

Ringrazio inoltre i miei genitori per il sostegno e la fiducia durante questi anni a Torino e con loro anche Giulia e Peppe che hanno creduto in me.

Di grande conforto è stato l'aiuto di Ester e Chiara, mie care amiche e grandi sostenitrici nei momenti di difficoltà e con le quali ho condiviso tanto. Infine, ringrazio le mie coinquiline, Mirella e Agnese che mi sono state vicine durante questa avventura a Torino.