



UNIMORE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SOSTENIBILITÀ INTEGRATA
DEI SISTEMI AGRICOLI

GESTIONE DEL RISCHIO DA AFLATOSSINA B₁ NEL MAIS AD USO ZOOTECNICO

ANALISI DEI PIANI DI AUTOCONTROLLO E VALUTAZIONE
DELL'EFFICACIA DI UN ADDITIVO ANTIFUNGINO

LAUREANDO:
FRANCESCO BIGLIARDI

RELATORE:
PROF. LUISA ANTONELLA VOLPELLI

CORRELATORI:
DOTT. MARCELLO GOZZI
DOTT. ALESSANDRO ZANETTI

ANNO ACCADEMICO 2025-2026

INDICE

1. Introduzione	1
1.1. Il settore mangimistico	1
1.2. Il mais nella filiera zootecnica	3
1.3. Fattori limitanti e vulnerabilità della coltura	7
2. Le aflatossine	11
2.1. Introduzione alle micotossine	11
2.2. Le aflatossine: aspetti generali	12
2.3. I funghi produttori di aflatossine	13
2.4. Proprietà fisiche e chimiche	16
2.5. Tossicità	17
2.6. Effetti sugli animali zootecnici	18
2.7. L'aflatossina M ₁	20
2.8. Meccanismi di produzione e fattori che la influenzano	21
2.8.1. Temperatura	22
2.8.2. Attività dell'acqua (a _w) e umidità	23
2.8.3. Atmosfera	25
2.8.4. Substrato	26
2.8.5. pH	26
2.8.6. Competizione microbica	27
2.8.7. Stress della pianta	27
2.8.8. Tempo	28
2.9. Meccanismi di incremento e degradazione della tossina durante lo stoccaggio	29
2.10. Utilizzo di conservanti in fase di stoccaggio	31
2.10.1. L'acido propionico	31
2.10.2. Il propionato d'ammonio e le formulazioni miste	32
2.10.3. Limiti dei conservanti	32
2.11. Normativa di riferimento	33
2.11.1. Quadro normativo per gli alimenti destinati al consumo umano	33
2.11.2. Limiti nei mangimi	35
2.11.3. Controlli ufficiali e sistemi di autocontrollo	36
2.11.4. Metodi di campionamento per la ricerca delle micotossine	37

3. Obiettivi della tesi	40
3.1. Analisi dei dati di autocontrollo aziendale	40
3.2. Valutazione della stabilità del cereale in condizioni di stress igroscopico	41
3.3. Determinazione della dose efficace di conservante	41
4. Analisi dei dati storici aziendali	43
4.1. La realtà aziendale: Progeo S.c.a. e il sistema di autocontrollo	43
4.2. Metodologia di estrazione ed elaborazione dei dati	48
4.3. Analisi statistica dei dati storici	50
4.3.1. Statistica descrittiva e visualizzazione grafica	50
4.3.2. t-test	57
4.3.3. ANOVA	65
4.3.4. Tukey HSD	69
4.3.5. Frequenza di positività	75
4.3.6. P-chart	84
4.4. Risultati dell'analisi statistica	89
4.4.1. L'omogeneità delle prime due annate	89
4.4.2. La divergenza della terza annata	92
4.4.3. Considerazioni conclusive sulla stagionalità	95
4.5. Discussione dei risultati	96
4.6. Implicazioni pratiche per la gestione degli approvvigionamenti	98
5. Metodologie analitiche impiegate nella sperimentazione	100
5.1. Determinazione delle aflatossine totali	100
5.2. Determinazione della Carica Batterica Totale (CBT)	101
5.2.1. Materiali e reagenti	102
5.2.2. Procedimento	103
5.2.3. Condizioni di incubazione	103
5.2.4. Lettura e calcolo dei risultati	103
5.3. Determinazione della Carica Micotica Totale (CMT)	104
5.3.1. Terreno di coltura	104
5.3.2. Procedimento	105
5.3.3. Condizioni di incubazione e calcolo dei risultati	105
5.4. Determinazione del contenuto di umidità	105

5.5. Considerazioni sulla natura distruttiva delle analisi	107
6. Prima fase sperimentale – Stoccaggio del mais a lungo termine	109
6.1. Caratterizzazione dei campioni	109
6.2. Condizioni di stoccaggio	111
6.3. Protocollo di campionamento e analisi dei parametri	113
6.4. Risultati	114
6.4.1. Umidità	114
6.4.2. Carica Batterica Totale (CBT)	118
6.4.3. Carica Micotica Totale (CMT)	120
6.4.4. Aflatossine totali	126
6.5. Il ruolo dell'infestazione da <i>Sitophilus</i> sp	129
6.6. La soglia critica di umidità	131
6.7. Considerazioni sul trattamento preventivo a basso dosaggio	132
7. Seconda fase sperimentale – Stress test al 20% di umidità	134
7.1. Razionale della prova	134
7.2. Procedura di umidificazione e trattamento con conservante	136
7.3. Condizioni di stoccaggio e protocollo di campionamento	137
7.4. Caratterizzazione dei campioni	139
7.5. Risultati del test preliminare	140
7.5.1. Umidità	141
7.5.2. Carica Batterica Totale (CBT)	141
7.5.3. Carica Micotica Totale (CMT)	142
7.5.4. Aflatossine totali	142
7.6. Risultati delle prove definitive	144
7.6.1. Umidità	144
7.6.2. Carica Batterica Totale (CBT)	146
7.6.3. Carica Micotica Totale (CMT)	149
7.6.4. Aflatossine totali	152
7.7. Considerazioni sulla dissociazione tra crescita fungina e produzione di tossina ..	155
7.8. Confronto con il test preliminare	157
7.9. Selettività del conservante	158
7.10. Analisi comparativa dei dosaggi	159

8. Discussione dei risultati e conclusioni	162
8.1. Introduzione al capitolo	162
8.2. Efficacia dose-dipendente del conservante	163
8.3. Velocità di deterioramento e finestra di intervento	164
8.4. Composizione della comunità fungina e rischio tossicologico	166
8.5. Limiti metodologici complessivi	168
8.6. Implicazioni pratiche per lo stoccaggio del mais	169
8.7. Prospettive di ricerca future	171
 Bibliografia	 173
 Ringraziamenti	 186

1. Introduzione

1.1 Il settore mangimistico

Il settore mangimistico è ciò che tiene insieme produzione agricola e tavola; infatti, i dati presentati da Assalzoo (Associazione Nazionale tra i Produttori di Alimenti Zootecnici) mostrano come, nel 2023, circa il 39% della spesa alimentare delle famiglie italiane sia stata destinata a prodotti della filiera agro-zootecnica (carne, latte, uova).

A livello globale la produzione di mangimi composti ha raggiunto nel 2024 oltre 1,3 miliardi di tonnellate, con una crescita dell'1,2% rispetto all'anno precedente (Alltech, 2025), conseguenza di una domanda di proteine animali che non accenna a rallentare, soprattutto in Asia e Africa. Questa crescita è trainata principalmente da pochi giganti globali, quali Cina, Stati Uniti, Brasile e India che insieme detengono il 52% del volume prodotto, come riportato in *Tabella 1* (Alltech, 2025).

Tab. 1 – I primi 10 paesi produttori di mangimi

Paese	Tonnellaggio mangimi 2024 (mln di t)	Tonnellaggio mangimi 2023 (mln di t)	Crescita (mln di t)	Crescita %	Classifica 2024	Classifica 2023
Cina	315,030	321,548	-6,518	-2,03%	1	1
Stati Uniti	269,620	267,787	1,834	0,68%	2	2
Brasile	86,636	84,581	2,055	2,43%	3	3
India	55,243	52,834	2,409	4,56%	4	4
Messico	41,401	40,837	0,564	1,38%	5	5
Russia	38,481	35,456	3,025	8,53%	6	6
Spagna	35,972	35,455	0,517	1,46%	7	7
Vietnam	25,850	24,997	0,853	3,41%	8	8
Turchia	24,502	23,374	1,128	4,83%	9	10
Giappone	24,297	24,264	0,033	0,14%	10	9

Fonte: Alltech, 2025 – Agri-Food Outlook 2025.

In Europa, la Spagna si conferma il principale produttore, seguito da Germania, Francia e Italia (FEFAC, 2024). In Italia il valore del fatturato dell'industria mangimistica è di circa 10 miliardi di euro, mentre la produzione si attesta a circa 15 milioni di tonnellate all'anno (*Tabella 2*), con tendenze di crescita soprattutto del comparto dei mangimi per bovini, in

particolare vacche da latte (+3,1%), e per ovini (+8,0%), confrontando i dati del 2024 rispetto al 2023 (Assalzoo, 2025). Nel contesto italiano è però evidente una forte dipendenza dalle importazioni soprattutto per quanto riguarda mais, soia, girasole, orzo, crusca, siero di latte in polvere e farina di pesce. Il mais la fa da padrone poiché è la principale fonte energetica per avicoli e suini, e difficilmente potrà essere sostituito a breve.

Tab. 2 – Produzione italiana di mangimi composti anno 2024
(quantità espresse in migliaia di tonnellate)

MANGIMI	Anno 2023	Anno 2024	% sul Totale	Var. % 2024/2023
PRODUZIONE TOTALE di cui:	15.357	15.458	100,0	+0,7
• VOLATILI di cui:	6.137	6.090	39,4	-0,7
- Polli da carne	3.116	3.147	20,4	+0,9
- Tacchini	898	861	5,6	-4,1
- Galline ovaiole	2.073	2.040	13,2	-1,6
- Altri volatili	50	42	0,3	-16,0
• SUINI	3.960	3.930	25,4	-0,8
• BOVINI di cui:	3.731	3.760	24,3	+0,8
- Vacche da latte	2.721	2.805	18,2	+3,1
- Bovini da carne	865	815	5,3	-5,8
- Bufali	145	140	0,9	-3,5
• ALTRI di cui:	978	1.111	7,2	+4,5
- Conigli	296	277	1,8	-6,4
- Ovini	315	340	2,2	+8,0
- Equini	60	65	0,4	+8,3
- Pesci	137	145	0,9	+5,8
- Altri animali	170	184	1,2	+8,2
• PET FOOD	551	564	3,7	+2,4

Fonte: Assalzoo, 2025.

In un mondo globalizzato, uno dei problemi risiede proprio nella movimentazione delle materie prime, che diventano molto più vulnerabili a condizioni di stoccaggio non ottimali. Devono infatti attraversare oceani, stazionare in silos per settimane, e questo le può esporre

a condizioni idonee allo sviluppo di funghi quali *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, in grado di produrre micotossine. Oltretutto, la variabilità climatica nelle zone di coltivazione contribuisce a rendere imprevedibile la qualità delle materie prime in ingresso. Il sistema italiano deve affrontare una sfida ancora più grande poiché è fortemente legato alle produzioni DOP e IGP, che richiedono profili nutrizionali molto rigidi. In questo caso, anche una contaminazione lieve può compromettere l'intero lotto e con esso il marchio.

Il quadro normativo europeo ha risposto a questa complessità con il Regolamento CE 1831/2003, che ha reso obbligatorio il sistema HACCP per tutta la filiera mangimistica. In questo modo, il controllo qualità è diventato un processo continuo di prevenzione del rischio, che non si basa più sulla sola analisi in ingresso. Infatti il mangime è un ecosistema biochimico in continua evoluzione nel tempo, che necessita strategie di monitoraggio e prevenzione dalla fase di ricevimento degli approvvigionamenti al confezionamento del prodotto finito, come parte integrante del processo produttivo.

1.2 Il mais nella filiera zootecnica

Il mais (*Zea mays*) è una pianta erbacea monocotiledone a ciclo annuale appartenente alla famiglia delle *Poaceae*. È diffuso a livello globale, e rappresenta il cereale più utilizzato nella nutrizione degli animali zootecnici, arrivando a costituire spesso il 50-60% della razione alimentare, soprattutto nelle diete di avicoli e suini. Il suo elevato contenuto di amido garantisce un rapporto tra resa energetica per ettaro e costo che nessun'altra materia prima è in grado di eguagliare. A questo si aggiunge la flessibilità d'uso: granella secca, pastone, insilato dell'intera pianta.

Grazie a decenni di selezione genetica e miglioramento varietale, oggi esistono numerose cultivar adattate a diversi climi, esigenze agronomiche e utilizzi finali. Tra queste, il mais Dentato è quello maggiormente impiegato in zootecnia, mentre le cultivar Flint, Farinosa, Dolce, Popcorn e Ornamentale sono impiegate nell'alimentazione umana (Solà-Oriol, 2019). Le cultivar OGM, ottenute tramite ingegneria genetica, sono state invece concepite principalmente per conferire resistenza ad agenti patogeni e/o erbicidi, incrementando così le rese produttive. Tuttavia, attualmente la coltivazione di mais geneticamente modificato è vietata in quasi tutti i paesi dell'UE, nonostante ne sia consentita l'importazione da paesi terzi.

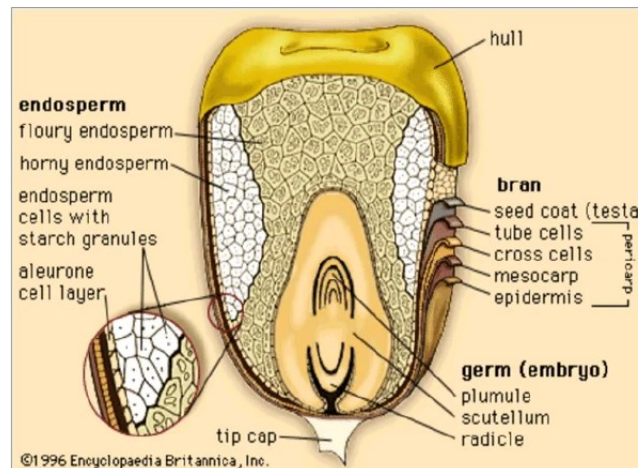


*Fig. 1 – Struttura interna di una cariosside di mais
(Fonte: Merriam-Webster Inc. 2006).*

Dal punto di vista strutturale, la cariosside del mais è composta approssimativamente per il 6% dal pericarpio, per l'11% dal germe (l'embrione) e per l'83% dall'endosperma. Più della metà di quest'ultimo è costituita da endosperma farinoso, ricco di amido (circa il 60-65% della cariosside), mentre la porzione rimanente è di natura cornea, formata da un tessuto proteico che ingloba i granuli di amido (come schematizzato in *Figura 1*); questa frazione, insieme a quella contenuta nel germe, porta il tenore proteico complessivo intorno al 7,5%. Sempre nel germe è stoccata una discreta quantità di lipidi (circa il 3,5%, il doppio rispetto ad orzo e frumento) che contribuisce conferirne le caratteristiche di fonte energetica (vedi *Tabella 3*).

Tab. 3 – Valori nutrizionali medi mais granella

Parametro	Tal quale	Sulla Sostanza Secca (SS)	Unità
Sostanza secca	86,3	100	%
Proteina grezza	7,6	8,8	%
Fibra grezza	2,3	2,6	%
Grassi grezzi	3,6	4,1	%
Ceneri	1,2	1,4	%
Ceneri insolubili	0,05	0,06	%
NDF	10,7	12,4	%
ADF	2,6	3,1	%
Lignina	0,5	0,6	%
Pareti cellulari insolubili in acqua	8,3	9,6	%
Amido	63,8	73,9	%
Zuccheri totali	1,7	2	%
Energia lorda (kcal)	3840	4450	kcal/kg
Energia lorda (MJ)	16,1	18,6	MJ/kg

Fonte: INRA, CIRAD, AFZ.

Infine, il contenuto limitato di fibra (circa il 2%) lo rende facilmente digeribile e con un valore energetico metabolizzabile (EM/kg) generalmente superiore a quello di altri cereali (Solà-Oriol, 2019). Secondo il sistema francese INRA, il valore energetico della granella di mais è pari a 1,27 UFL/kg di sostanza secca, collocandosi al di sopra dell'orzo (1,16 UFL/kg SS), assunto come riferimento convenzionale per il calcolo delle unità foraggere.

Il mais presenta però alcuni limiti, soprattutto sul fronte della qualità proteica, in quanto è carente in lisina e triptofano. Oltretutto, è composto principalmente da proteine strutturali e di riserva e questo ne abbassa ulteriormente il valore biologico rispetto ad altri cereali energetici come il frumento. Anche il profilo minerale risulta piuttosto limitato, con bassi livelli di calcio, sodio e microelementi, a cui si aggiunge una scarsa dotazione vitaminica. Il fosforo è relativamente elevato, ma circa il 70% di esso è in forma fitica, poco digeribile per i monogastrici (per i quali è necessaria l'integrazione con fitasi) (Solà-Oriol, 2019).

Gli ibridi ad alta produttività coltivati nella Pianura Padana hanno sempre contribuito a sostenere i grandi distretti di carne e latte del Nord Italia; tuttavia, negli ultimi vent'anni, le superfici coltivate a mais in Italia si sono ridotte costantemente. Siamo passati da oltre un

milione di ettari nei primi anni 2000 agli attuali 600.000 circa (vedi *Figura 2*). Questo fenomeno ha ridotto il tasso di autoapprovvigionamento a circa il 50%: la metà del mais impiegato nella filiera arriva dall'estero, soprattutto dai mercati dell'Europa dell'Est e delle Americhe (ISMEA, 2023).

Fig. 2 – Evoluzione delle superfici a Mais in Italia (000 ha)



Fonte: elaborazione ISMEA su dati ISTAT.

I motivi sono da ricercare nella concorrenza da parte di altre colture, nei costi di produzione crescenti e nel cambiamento climatico che rende la coltivazione del mais più difficoltosa, perlomeno in Pianura Padana. Infatti, temperature più alte combinate a siccità più frequenti e anticipate (ad esempio durante la fioritura), indeboliscono la pianta, che diventa più vulnerabile a patogeni e insetti fitofagi. La dipendenza dall'estero può essere un problema soprattutto per l'Italia, in quanto molti disciplinari DOP impongono vincoli sulla provenienza dei mangimi. Ad esempio, il disciplinare di produzione del Parmigiano Reggiano richiede che almeno il 50% della sostanza secca dei mangimi provenga dalla zona di produzione. Pertanto, il mais nazionale diventa un asset strategico dal punto di vista economico e legale. A questo si aggiunge una competizione interna alla filiera, aumentata soprattutto nell'ultimo decennio, a causa della forte crescita del settore del biogas in Italia come parte integrante della transizione energetica. Quest'ultimo, nonostante si basi principalmente sull'utilizzo di reflui zootecnici e sottoprodotti agricoli e industriali, può anche impiegare come materia

prima l'intera pianta di mais, contribuendo a ridurre la disponibilità del cereale sul mercato e a farne aumentare i prezzi.

1.3 Fattori limitanti e vulnerabilità della coltura

La coltivazione del mais è fortemente condizionata da vulnerabilità intrinseche alla coltura, alcune delle quali si sono amplificate proprio negli ultimi anni, a causa dei cambiamenti climatici. È importante comprenderle poiché un mais contaminato in post-raccolta è quasi sempre il risultato di un processo iniziato settimane prima in campo.

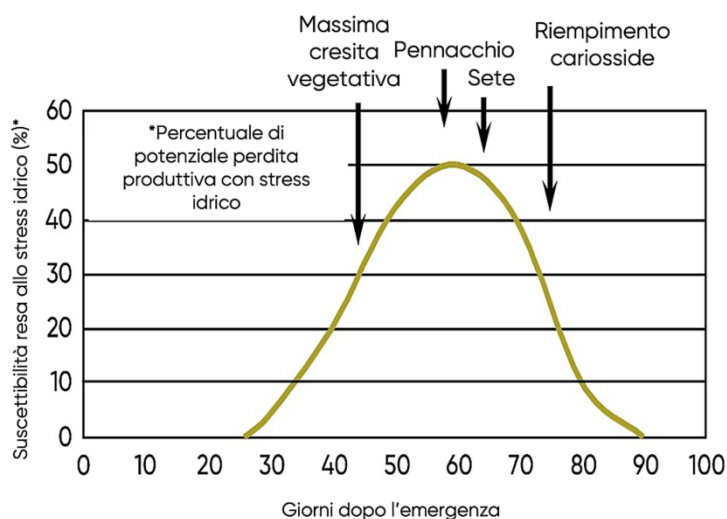


Fig. 3 – Suscettibilità della resa allo stress idrico per il mais
(Fonte: Sudar et al., 1981).

Parlando di avversità abiotiche, ossia di fattori fisici e chimici dell'ambiente, lo stress idrico è tra quelli che impatta maggiormente sulla produzione. Il mais è una pianta C4, efficiente dal punto di vista fotosintetico, ma con un fabbisogno idrico complessivo elevato. Nello specifico, risulta particolarmente sensibile nella fase di fioritura e impollinazione, ossia a circa 60-80 giorni dalla semina, come schematizzato in *Figura 3*. In quel frangente, bastano pochi giorni di deficit idrico per ridurre drasticamente la resa. Questo perché la carenza d'acqua va ad alterare la sincronizzazione tra l'emissione del polline e delle sete, portando alla mancata fecondazione di diversi ovuli. Di conseguenza, il numero di chicchi per spiga si riduce. Invece, uno stress idrico durante la fase di riempimento della granella va a diminuire il peso dei singoli chicchi. Al contrario, un eccesso d'acqua porta ad asfissia

radicale e predispone la pianta alla colonizzazione da parte di patogeni fungini che causano marciumi radicali e del colletto (*Pythium*, *Fusarium*).

Un altro fattore in grado di influenzare fortemente la crescita e lo sviluppo del mais è lo stress termico, e in particolare da caldo. Ancora una volta è la fase di fioritura ad essere la più vulnerabile: temperature superiori a 35 °C riducono la vitalità del polline, desincronizzano l'antesi e favoriscono l'aborto degli ovuli fecondati (*Figura 4*). Inoltre, le alte temperature aumentano la respirazione della pianta, e questo porta ad un minor accumulo di carboidrati nella granella (cariossidi più piccole), oltre ad accelerare la senescenza fogliare. Inoltre, dal punto di vista biochimico, il processo fotosintetico può essere alterato dalla denaturazione degli enzimi coinvolti nella fotosintesi e dall'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS).



Fig. 4 – Serie di spighe di mais mature con cariossidi abortite in seguito a fecondazione incompleta (Fonte: Thomison, 2007).

Lo stress termico può anche essere da freddo: in questo caso la germinazione e le prime fasi vegetative sono le più colpite. Con temperature al di sotto dei 10 °C si ha rallentamento o blocco della germinazione, mentre per le piante in crescita si riduce l'assorbimento di fosforo e microelementi, in quanto il loro *uptake* dipende dalla temperatura del suolo. Le gelate tardive primaverili (sotto 0 °C) possono essere letali o compromettere seriamente lo sviluppo della pianta; mentre le gelate autunnali anticipate, se intervengono prima della maturità fisiologica della cariosside, interrompono la fase di riempimento del seme, portando

alla produzione di granella ad alto contenuto idrico e di scarsa qualità. Oltretutto, stress idrico e termico giocano un ruolo fondamentale nel favorire lo sviluppo di funghi quali *Aspergillus* e *Fusarium* e conseguentemente nella contaminazione da micotossine del mais.

A favorire lo sviluppo di funghi micotossigeni, vi è anche il lepidottero *Ostrinia nubilalis*, la piralide del mais. Si tratta di una falena di medie dimensioni, la cui larva misura 20-25 mm di lunghezza. Lo svernamento avviene sotto forma di larva matura (in diapausa) all'interno dei residui vegetativi o nei tutoli, con i primi adulti che compaiono in primavera inoltrata (tra maggio e giugno). Il secondo volo, che origina la seconda generazione di larve, si prolunga per tutta l'estate con un picco tra luglio e agosto. Compie solitamente 2 generazioni all'anno: le larve della prima generazione si nutrono delle giovani foglie e del culmo, scavando profonde gallerie che indeboliscono la pianta; le larve della seconda generazione si nutrono delle cariossidi in via di sviluppo ad estate inoltrata, compromettendo direttamente la produzione (vedi *Figura 5*). Oltre a danneggiare il raccolto dal punto di vista quantitativo e qualitativo, le larve di seconda generazione provocano anche un danno indiretto: la distruzione del pericarpo della cariosside diventa infatti una via di penetrazione preferenziale per *Aspergillus* e *Fusarium*. Infatti, all'interno delle gallerie scavate dall'insetto si crea un microclima umido, ricco di sostanza organica sminuzzata, che favorisce la colonizzazione e la biosintesi della tossina (Mencarelli et al., 2013; Blandino et al., 2022).

Un altro fitofago che colpisce il mais è la diabrotica (*Diabrotica virgifera virgifera*), un coleottero crisomelide originario degli Stati Uniti ma ormai ampiamente diffuso in Europa. In questo caso, le uova vengono deposte nel terreno tra la fine dell'estate e l'inizio dell'autunno e svernano fino alla primavera successiva. Nel mese di maggio si schiudono, in corrispondenza della germinazione del mais, e iniziano subito a nutrirsi delle radici. In Europa l'insetto compie una sola generazione all'anno. Il danneggiamento dell'apparato radicale rende le piante più soggette ad allettamenti e ne riduce la capacità di assorbimento di acqua e nutrienti. Anche gli adulti danneggiano la pianta, seppur meno gravemente, cibandosi delle setole, del polline e causando erosioni delle pagine fogliari.

Infine c'è il problema delle infestanti che, a differenza di insetti e patogeni, competono direttamente con la coltura per le risorse fondamentali (acqua, luce, nutrienti). Nelle prime 6-8 settimane di crescita, la competizione è massima in quanto la coltura cresce lentamente e c'è molto spazio colonizzabile tra le file. Soltani et al. (2016), hanno stimato una perdita produttiva media potenziale del 50% in caso di mancato diserbo. Il problema è esacerbato

dalla comparsa di resistenze ai principali erbicidi sistemici e di pre-emergenza, come evidenziato in alcuni biotipi di *Amaranthus* (Heap, 2014). Questo rende insufficiente l'approccio chimico tradizionale: diventano fondamentali interventi agronomici quali rotazioni colturali e lavorazioni meccaniche.



Fig. 5 – Larva di Ostrinia nubilalis su spiga con evidente colonizzazione di muffe micotossigene (Fonte: Reyneri et al., 2016 - L'Informatore Agrario).

2. Le aflatossine

2.1 Introduzione alle micotossine

Le micotossine sono composti tossici prodotti da organismi fungini come metaboliti secondari, così definiti poiché non svolgono alcuna funzione biologica apparente per il fungo che li sintetizza. Dal punto di vista chimico, presentano un'elevata variabilità molecolare, e non possono essere definite come una classe chimica unica, anche se esistono gruppi affini (come aflatossine, tricoteceni e fumonisine). La sintesi di micotossine coinvolge numerose specie fungine anche molto diversificate, alcune tipiche di ambienti boschivi, altre in grado di contaminare le derrate alimentari. Queste ultime rappresentano una seria minaccia alla salute dell'uomo e degli animali. È proprio quest'ampia varietà di specie coinvolte, in grado di adattarsi ai diversi climi, che rende le micotossine un problema tanto delle aree tropicali quanto di quelle temperate. A oggi si conoscono circa trecento micotossine, delle quali soltanto il 7% circa raggiunge negli alimenti concentrazioni tali da costituire un rischio per la salute umana (Delledonne, 2010). I principali generi fungini responsabili della produzione di tossine sono: *Aspergillus* (aflatossine), *Penicillium* (ocratossina e patulina), *Fusarium* (zearalenone, fumonisine e tricoteceni).

La maggior parte di questi organismi si sviluppa su materia organica in decomposizione, sebbene alcune specie possano anche attaccare piante in buone condizioni di salute. In linea di massima, qualsiasi prodotto agricolo è potenzialmente esposto all'attacco delle muffe e alla conseguente produzione di tossine. Tra le colture più a rischio abbiamo i cereali in generale, la frutta a guscio, il caffè, il cacao, le spezie, i semi oleosi, i legumi secchi e i succhi di frutta, in particolare quello di mela. Anche in bevande come la birra e il vino sono state riscontrate tracce di micotossine (prodotte rispettivamente da cereali e uve contaminate), nonché nei salumi suini stagionati, dove la contaminazione avviene principalmente negli ambienti di stagionatura. Inoltre, le micotossine si inseriscono nella catena alimentare umana anche attraverso prodotti di origine animale come carne, uova, latte e formaggi, a seguito della contaminazione dei mangimi somministrati agli animali da allevamento.

Secondo la FAO, circa un quinto della produzione agricola mondiale sarebbe contaminata da micotossine, con perdite economiche nell'ordine di miliardi di dollari. Solo negli Stati Uniti si calcola un danno complessivo pari a circa un milione e mezzo di dollari. Il danno si

presenta su più fronti contemporaneamente: il prodotto fuori norma va smaltito o declassato, i mangimi contaminati abbassano le rese zootecniche, e poi ci sono i costi del monitoraggio (campionamenti, analisi di laboratorio, controlli in entrata). Inoltre, le stime riportate non tengono conto dei costi aggiuntivi a carico dei sistemi sanitari derivanti dal consumo di alimenti contaminati. I paesi in via di sviluppo, che dipendono in larga misura dalle esportazioni agricole, sono anche quelli con i sistemi di controllo più fragili. Questo si traduce spesso in una re-immissione nel consumo interno dei lotti scartati dal mercato globale, con gravi conseguenze per le fasce di popolazione più vulnerabili (Bhat et al., 1991).

2.2 Aflatossine: aspetti generali

Le aflatossine ad oggi identificate sono circa venti, tuttavia solo sei di esse (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂) vengono comunemente rilevate negli alimenti (*Figura 6*).

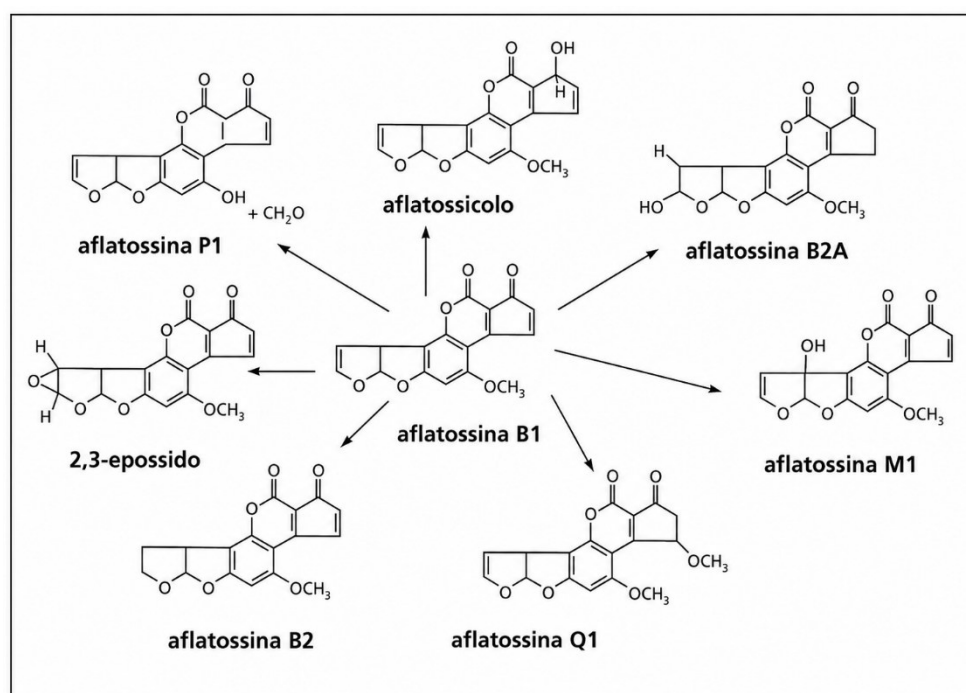


Fig. 6 – Differenti tipi di aflatossine (Fonte: Delledonne, 2010).

Le aflatossine B₂ e G₂ derivano rispettivamente da B₁, e G₁ a seguito dell'aggiunta di due atomi di idrogeno, mentre M₁ ed M₂ originano rispettivamente da B₁ e B₂ a seguito di idrossilazione (ossia l'aggiunta di un gruppo -OH). Le aflatossine vengono prodotte da almeno tre specie fungine: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, e si trovano in

un'ampia varietà di alimenti, tra cui cereali (il mais è tra quelli più a rischio), spezie, fichi, frutta a guscio, latte e derivati; con le concentrazioni più elevate riscontrabili generalmente nei prodotti provenienti da Paesi con clima caldo. Nel fegato e nelle urine di diversi mammiferi sono stati individuati due ulteriori metaboliti dell'aflatossina, denominati P₁ e Q₁. Le aflatossine M₁ e M₂, invece, sono i derivati presenti nel latte di bovine che hanno ingerito mangimi contaminati rispettivamente da AFB₁ e AFB₂, e che quindi hanno superato il “filtro animale” attraverso il meccanismo noto come “*carry-over*”.

2.3 I funghi produttori di aflatossine

Il nome *Aspergillus* fu coniato dal sacerdote Micheli nel 1729, il quale, osservando alcune muffe particolari, ne notò la somiglianza con l'aspersorio, detto in latino “*Aspergillum*”. Bisogna però attendere il 1847 affinché al genere *Aspergillus* venisse riconosciuto un ruolo patogeno: fu in quell'anno che Sluyter descrisse i primi casi documentati di malattia polmonare umana causata da tale fungo. Nel corso del tempo le ricerche a riguardo si intensificarono progressivamente, fino al 1926, quando Thom e Church pubblicarono il primo testo monografico dedicato, “*The Aspergilli*”, nel quale classificarono 69 specie distribuite in 11 raggruppamenti. Ad oggi le specie note sono più di 185 (Delledonne, 2010).

Come anticipato, le specie produttrici di aflatossine sono principalmente tre: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Pur appartenendo allo stesso genere, presentano differenze morfologiche, ecologiche e tossigene.

Aspergillus flavus è quella con cui ci si confronta più spesso. È un fungo cosmopolita, principalmente saprofita, ma anche patogeno opportunista. Infatti, può vivere nel suolo, decomponendo la materia organica morta, oppure colonizzare tessuti vegetali vivi, soprattutto se questi risultano stressati o danneggiati. In tal caso, predilige le parti aeree della pianta, come foglie, fiori, spiga. A livello morfologico, le colonie si presentano di un colore giallastro-verdastro, che si scurisce con la maturazione (*Figura 8*). Tuttavia, la sola analisi della colonia, non è sufficiente ad identificarlo con certezza; è infatti necessario osservare al microscopio le seguenti strutture del conidioforo (la porzione di ifa fungina da cui si generano i conidi, in *Figura 7*):

- La vescicola, ossia l'estremità rigonfia del conidioforo, che in *A. flavus* è di grandi dimensioni (fino a 50 µm di diametro).

- Le fialidi, ossia le cellule che producono i conidi (le spore). In questo caso bisogna osservare la loro posizione: possono trovarsi direttamente sulla vescicola (fialidi uniseriate) oppure possono essere sostenute da cellule intermedie dette metule (fialidi biseriate). *A. flavus* può essere uniseriato, biseriato o misto; tuttavia, la presenza di entrambe le forme nello stesso conidioforo è considerato un elemento diagnostico che lo distingue da altre specie.
- I conidi, che in *A. flavus* si presentano di forma variabile, con pareti sottili e finemente rugose (Pitt e Hocking, 2009).

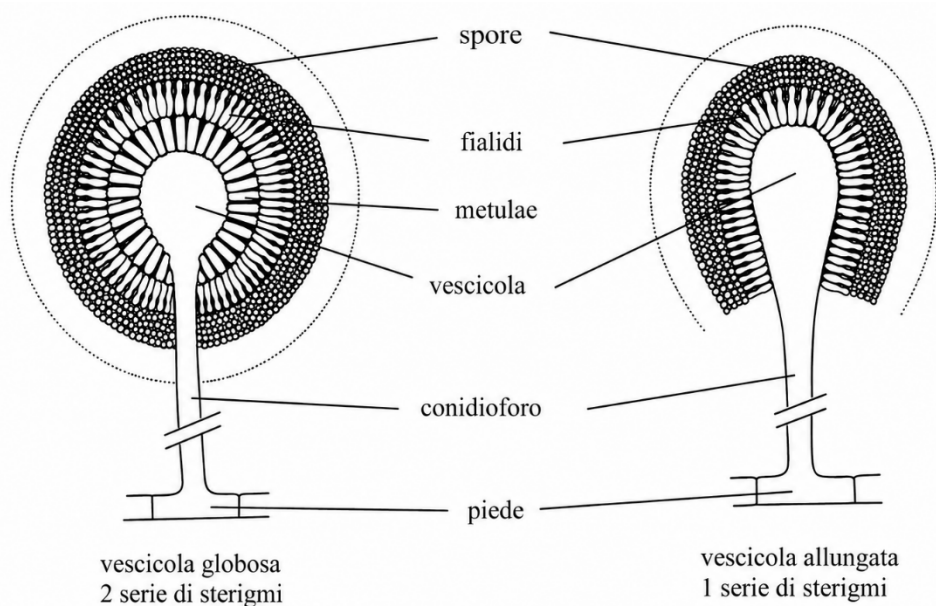


Fig. 7 – Schema del conidioforo (Fonte: Delledonne, 2010).

È interessante osservare anche gli sclerozi (ossia le strutture di resistenza formate per sopravvivere in condizioni ambientali avverse), poiché in *A. flavus* esistono due morfotipi distinti: il morfotipo S, che presenta sclerozi piccoli e una produzione elevata di aflatossine; e il morfotipo L, con sclerozi di grandi dimensioni e un comportamento tossigenico più variabile, con ceppi completamente atossici e altri altamente produttori (Ohkura et al., 2018). Dal punto di vista tossicologico, *A. flavus* produce aflatossine B₁ e B₂, e in alcuni casi anche acido ciclopiazonico (CPA), anche se non tutti i ceppi risultano tossigeni (Pitt e Hocking, 2009).

Aspergillus parasiticus è morfologicamente simile, sebbene le vescicole siano più piccole (raramente oltre i 30 µm). I conidi sono sferici con pareti spesse e decisamente rugose,

inoltre la presenza di fialidi biseriate è rara. A differenza di *A. flavus*, risulta essere più legato all'ambiente del suolo che alle parti aeree della pianta, inoltre la sua distribuzione geografica è più ristretta. Quasi tutti i ceppi di *A. parasiticus* conosciuti risultano tossigeni. Il profilo tossigenico comprende sia le aflatossine del gruppo B (B₁ e B₂) sia quelle del gruppo G (G₁ e G₂), ma non l'acido ciclopiazonico (Pitt e Hocking, 2009).

Aspergillus nomius è la specie meno nota delle tre, in quanto decisamente meno comune. La somiglianza morfologica ad *A. flavus* ha creato in passato qualche difficoltà diagnostica nella distinzione tra le due specie, tanto che questa è stata descritta per la prima volta solo nel 1987. Come *A. parasiticus*, produce aflatossine di tipo B e G, senza sintesi di acido ciclopiazonico (Pitt e Hocking, 2009). La specie è stata isolata sia in ambienti agricoli che non agricoli e, sebbene non sia ancora ben chiaro quale sia lo spettro di piante ospiti, recentemente è stata identificata sulle noci del Brasile, dove si è dimostrata capace di produrre aflatossine in associazione ad *A. flavus* (Midorikawa et al., 2014).

Dal punto di vista ecologico, le tre specie condividono la preferenza per climi caldi e umidi, tipici delle aree tropicali e subtropicali. Tuttavia, *A. flavus* ha dimostrato una maggiore plasticità ecologica, riuscendo a colonizzare anche ambienti più temperati, come i campi della Pianura Padana durante le stagioni estive più calde e siccitose.

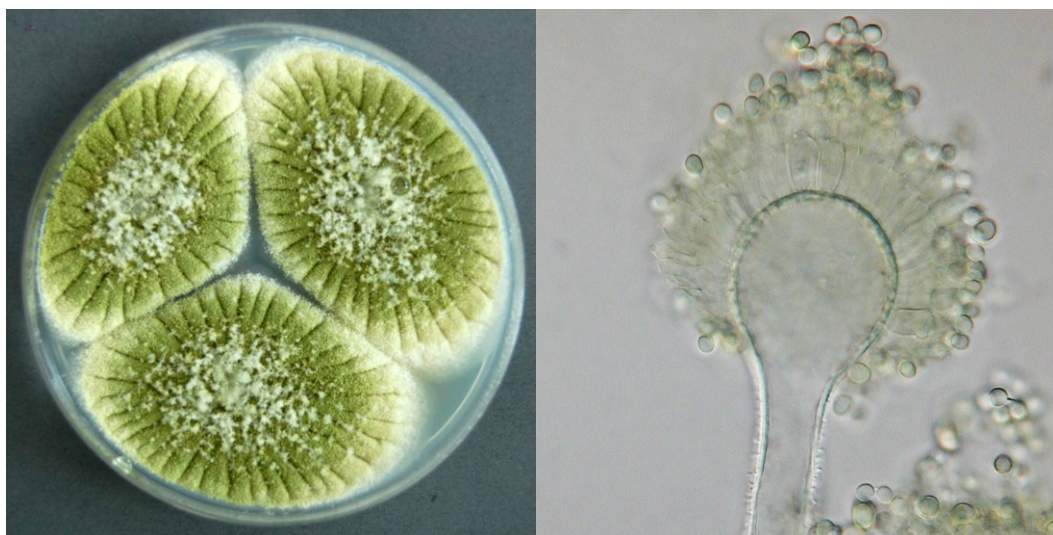


Fig. 8 – Colonie e conidioforo di *Aspergillus flavus*
(Fonti: Cannon, n.d.; Medmyco, n.d.).

2.4 Proprietà fisiche e chimiche

Le aflatossine si presentano come solidi cristallini inodori e incolori (o leggermente giallognoli). Essendo lipofile, la loro solubilità in acqua è scarsa (compresa tra 10 e 20 mg per litro), ma sono molto solubili in solventi organici a polarità moderata come cloroformio, metanolo e dimetilsolfossido. La proprietà più critica è la loro termostabilità: i normali trattamenti termici (bollitura, pastorizzazione) non sono sufficienti a inattivarle completamente (vedi *Tabella 4*). Per una decomposizione significativa è necessario sottoporle ad una temperatura di 150-200 °C; inoltre, anche quando degradate termicamente, i prodotti risultanti possono mantenere una certa tossicità, motivo per il quale questi trattamenti non garantiscono la sicurezza alimentare. Se esposte a radiazione ultravioletta (365 nm), le aflatossine mostrano proprietà fluorescenti; questa loro caratteristica viene utilizzata nei test di screening rapidi per rilevare la contaminazione nei raccolti.

Per quanto riguarda la stabilità al pH, risultano stabili in condizioni acide e neutre, tuttavia la presenza dell'anello lattonico le rende vulnerabili all'idrolisi in presenza di basi forti. Per questo motivo, sono stati studiati trattamenti con ammoniaca o ipoclorito come possibili metodi di decontaminazione dei prodotti contaminati; tuttavia, i dubbi sulla tossicità dei sottoprodotti derivanti dalle reazioni chimiche hanno limitato la diffusione di queste pratiche. Le aflatossine possono essere degradate dai raggi UV e dall'ossigeno in presenza di luce, anche se questo processo è troppo lento per una decontaminazione efficace in tempi brevi.

Tab. 4 – Percentuale di degradazione indotta dai trattamenti termici in alcuni alimenti contaminati da aflatossine

Prodotto	Metodo di trattamento	% degradazione
Arachidi	Torrefazione 150 °C x 30'	80
Arachidi	Torrefazione a secco	69
Pecan (noce americana)	Torrefazione 190 °C x 15'	80
Farina di grano	Panificazione 120 °C x 30'	80
Farina di mais	Cottura per ebollizione	28
Riso	Cottura per ebollizione	49
Latte	Riscaldamento 90 °C x 30'	9

Fonte: Delledonne, 2010.

2.5 Tossicità

Le aflatossine risultano nocive sia attraverso l'assunzione di grandi quantità in un'unica occasione (tossicità acuta) sia tramite l'esposizione prolungata a dosi ridotte ma ripetute nel tempo (tossicità cronica). Infatti, l'aflatossina B₁ è considerata uno degli agenti epatocarcinogeni più potenti attualmente noti; pertanto, anche un'esposizione cronica a concentrazioni molto basse attraverso la dieta rappresenta un fattore di rischio per la salute umana. Invece, l'avvelenamento acuto è un evento raro negli animali ed estremamente improbabile nell'uomo, sebbene in alcune aree del mondo (particolarmente in Africa e in Asia) possa occasionalmente verificarsi, in seguito al consumo di cereali contaminati come mais, riso, manioca e arachidi.

La tossicità acuta delle aflatossine è stata documentata in diverse specie animali, dai mammiferi ai pesci agli uccelli. Le specie più sensibili risultano essere anatre, tacchini e trote. Il grado di tossicità varia inoltre in funzione dell'età, del sesso e delle condizioni nutrizionali dell'animale: i soggetti giovani sono più vulnerabili, e in genere i maschi lo sono più delle femmine. Per la maggior parte delle specie, la dose letale (LD₅₀) varia tra 0,5 e 10 mg per kg di peso corporeo (*Tabella 5*). L'organo più colpito è il fegato, ma ad alte dosi possono essere compromessi anche l'apparato cardiovascolare e quello urinario. I polmoni vengono interessati solo in caso di inalazione di spore di *Aspergillus*. Inoltre, in alcune circostanze la tossina si può accumulare anche nel cervello. Poiché sono in grado di attraversare la barriera placentare, le aflatossine possono causare malformazioni fetali e riduzione del peso alla nascita. Gli effetti teratogeni sono documentati in numerose specie (Delledonne, 2010).

Le conseguenze più importanti per la salute umana sono quelle legate alla tossicità sub-acuta/cronica; in effetti, carcinoma epatico, epatite cronica, ittero, ingrossamento del fegato e cirrosi sono tutte patologie riconducibili ad un'ingestione reiterata di bassi livelli di aflatossina. L'effetto mutageno si osserva sia nelle cellule vegetali, sia nelle cellule animali, ma in quest'ultime non è da attribuire direttamente all'aflatossina B₁, bensì ad un suo metabolita. Infatti, una volta ingerita, l'AFB₁ viene processata nel fegato dagli enzimi del citocromo P450 (bioattivazione), con formazione dell'AFB₁-8,9-epossido, un intermedio altamente reattivo in grado di legarsi in modo covalente a DNA, RNA e proteine. In particolare, reagisce con la guanina formando l'addotto AFB₁-N7-Guanina; tale legame covalente causa mutazioni (prevalentemente trasversioni GC→TA) nel gene TP53 (un

oncosoppressore) (Hsu et al., 1991). Questo è il principale meccanismo alla base del carcinoma epatocellulare indotto da aflatossine. Poiché le aflatossine B₂ e G₂ non presentano il doppio legame terminale nell'anello furanico tra il carbonio 8 e il carbonio 9 (a differenza di B₁ e G₁), non possono essere attaccate dagli enzimi del citocromo P450 e, di conseguenza, non possono formare l'eossido reattivo. Per questo motivo B₂ e G₂ risultano molto meno tossiche, anche se rimangono comunque pericolose per la salute a lungo termine.

Tab. 5 – Tossicità acuta dell'aflatossina B₁

Specie	LD ₅₀ Orale (mg/kg)
Babbuino	2,0–2,2
Gatto	0,6
Pollo	6,5–18,0
Cane	0,5–1,0
Anatra	0,3–0,6
Cavia	1,4–2,0
Criceto	10,2–12,8
Macaco	7,8–8,0
Topo	7,3–9,0
Coniglio	0,3–0,5
Ratto	6,3–18,0
Pecora	2,0
Suino	0,6
Trota	0,5
Tacchino	1,4–3,2

Fonte: Monson et al., 2015.

2.6 Effetti sugli animali zootecnici

Oltre agli effetti cancerogeni ed epatotossici dell'aflatossina B₁, negli animali zootecnici vi sono ulteriori ripercussioni sia sulla salute sia sulle prestazioni produttive, a causa della maggiore esposizione alla tossina rispetto all'uomo. In primis, abbiamo l'immunosoppressione: infatti l'eossido reattivo dell'AFB₁, legandosi al DNA delle cellule immunocompetenti, ne inibisce la replicazione e la sintesi proteica. Inoltre, la tossina induce

stress ossidativo attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), le quali danneggiano le membrane cellulari dei linfociti e dei macrofagi. Ciò riduce la risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata, aumentando la suscettibilità a infezioni batteriche, virali e parassitarie (Kipkoech et al., 2025). Inoltre, l'immunosoppressione può compromettere l'efficacia dei vaccini, in quanto l'esposizione alla tossina ritarda e riduce la proliferazione linfocitaria specifica verso gli antigeni vaccinali (Meissonnier et al., 2008). Di conseguenza, la risposta anticorpale diventa insufficiente a garantire la protezione dal patogeno. Si tratta di un aspetto particolarmente rilevante negli allevamenti intensivi di pollame e suini, dove i programmi vaccinali sono fondamentali per il controllo delle malattie infettive.

Sebbene la micotossina notoriamente problematica per il sistema endocrino-riproduttivo sia lo zearalenone (ZEA), sono state osservate ripercussioni sulla fertilità degli animali anche associate all'aflatossina B₁. Il meccanismo di interferenza è sia diretto (tossicità gonadica) sia indiretto (alterazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi). Le femmine di mammifero mostrano irregolarità o soppressione del ciclo estrale, aumento del tasso di aborti e riduzione del peso alla nascita dei neonati (Francis et al., 2024). Oltretutto, poiché esposti già nelle prime fasi di vita all'AFM₁, i neonati mostrano immunodepressione e crescita rallentata. Nei maschi, invece, si verifica un calo della libido, associato ad alterazioni della spermatogenesi e danni istologici a carico dei testicoli (Lin et al., 2022). Nelle ovaiole si osserva una diminuzione del tasso di deposizione e del peso medio delle uova. Inoltre, il guscio tende ad assottigliarsi poiché il danno epatico causato dalla tossina compromette il metabolismo del calcio e della vitamina D. In aggiunta, si verifica una riduzione della fertilità delle uova destinate alla schiusa (Fouad et al., 2019).

Il calo delle prestazioni produttive degli animali è legato principalmente alla diminuzione dell'accrescimento ponderale, che si verifica attraverso meccanismi tra loro interconnessi. Innanzitutto, l'animale diminuisce l'ingestione volontaria di alimento; in parte per l'effetto tossico, in parte perché il mangime contaminato risulta meno appetibile. Inoltre, ciò che viene ingerito non viene assorbito al meglio, in quanto l'AFB₁ può danneggiare gli enterociti, compromettendo l'assorbimento dei nutrienti (Choi et al., 2025). Oltretutto il fegato, compromesso dalla tossina, riduce la sintesi proteica (albumina, proteine di trasporto) (John & Miller, 1969) causando ipoproteinemia, che si traduce in una riduzione del deposito muscolare e quindi nel peggioramento dell'indice di conversione alimentare. Nei casi peggiori, la presenza di alterazioni istologiche epatiche visibili porta al sequestro delle

carcasse o di parti di esse al macello. Anche la qualità della carne può essere compromessa, in particolare si può riscontrare una modificazione del profilo lipidico (aumento dei lipidi ossidati) (Cao et al., 2021).

Dal punto di vista della produzione di latte, oltre al già citato problema del *carry-over* di AFM₁, si osserva un calo quantitativo della produzione, generalmente dose-dipendente in base al livello di contaminazione della razione (Applebaum et al., 1982).

2.7 L'aflatossina M₁

Tutti i mammiferi che assumono aflatossina B₁ ne eliminano una parte sotto forma di aflatossina M₁ (detta anche "*milk toxin*") attraverso il latte. Nella bovina la percentuale di escrezione nel latte varia tra lo 0,17% e il 3%; tuttavia, in alcuni casi può arrivare fino al 6% dell'AFB₁ ingerita. La contaminazione compare già alla prima mungitura successiva al pasto contaminato e tende a scomparire entro 3-5 giorni dalla rimozione dell'alimento contaminato dalla dieta. Per quanto riguarda la B₁, non risulta essere presente nel latte vaccino, anche se è stata rinvenuta nel latte di bufala, in quello di altri mammiferi non ruminanti e nel latte materno umano (Delledonne, 2010).

Per stimare la contaminazione sull'intera mandria è possibile ricorrere alla seguente formula:

$$\text{AFM}_1 \text{ (ng/kg nel latte)} = 1,19 \times (\text{mg di AFB}_1 \text{ ingeriti/capo/giorno}) + 1,9$$

La relazione mostra una dipendenza lineare tra ingestione di AFB₁ e concentrazione di AFM₁ nel latte. 1,19 è il coefficiente di trasferimento medio, mentre l'intercetta di 1,9 rappresenta il livello minimo di fondo. Nel periodo immediatamente seguente al parto o in presenza di bovine ad alta produzione, il valore del coefficiente di trasferimento cresce, fino a triplicarsi, aumentando drasticamente il passaggio di tossina nel latte. Anche la presenza di infezioni può influenzare il *carry-over* (Delledonne, 2010).

L'aflatossina M₁ ha una tossicità acuta paragonabile a quella del composto da cui deriva, ma la sua capacità cancerogena a livello epatico è nettamente inferiore, stimata intorno al 2-8% rispetto alla B₁. Ciò nonostante, poiché il latte è un alimento di largo consumo e fondamentale nell'alimentazione infantile, la presenza AFM₁ rappresenta un rischio non trascurabile per la salute umana. Inoltre, la contaminazione da AFM₁ nel latte si ripercuote

anche su tutti i prodotti derivati, in particolare sui formaggi. Infatti, le caseine presentano sulla loro superficie regioni idrofobiche che fungono da siti di adsorbimento per la tossina. Il fattore di arricchimento, che determina una concentrazione di tossina più elevata nei formaggi rispetto al latte di partenza, dipende dal grado di stagionatura: nei formaggi molli la concentrazione di AFM₁ è da 2,5 a 3,3 volte superiore, mentre nei formaggi a pasta dura questo coefficiente è compreso tra 3,9 e 5,8 (Delledonne, 2010).

2.8 Meccanismi di produzione e fattori che la influenzano

La biosintesi delle aflatossine è frutto di una cascata enzimatica che coinvolge decine di geni. Tutto parte da acetil-coA e malonil-coA, i quali formano il primo intermedio stabile: l'acido norsolorinico (NOR). La via procede poi attraverso una serie di ossidazioni, riduzioni e ciclizzazioni che portano alla formazione di composti aromatici complessi come la sterigmatocistina, il precursore diretto delle aflatossine (*Figura 9*). Le fasi finali consistono in metilazioni e ossidazioni che generano le aflatossine B e G (Khan et al., 2021). Si tratta di un processo lungo e complesso in cui operano almeno 27 enzimi, codificati dai geni appartenenti al cluster AF (*aflatoxin*) (Caceres et al., 2020). All'interno del cluster, sono presenti sia i geni strutturali della biosintesi, sia i geni che regolano il processo di trascrizione, come aflR (regolatore principale) ed aflS (co-regolatore) (Yabe & Nakajima, 2004). L'interazione tra questi geni è strettamente legata alle condizioni ambientali; questa caratteristica li rende dei sensori molecolari dell'ambiente circostante.

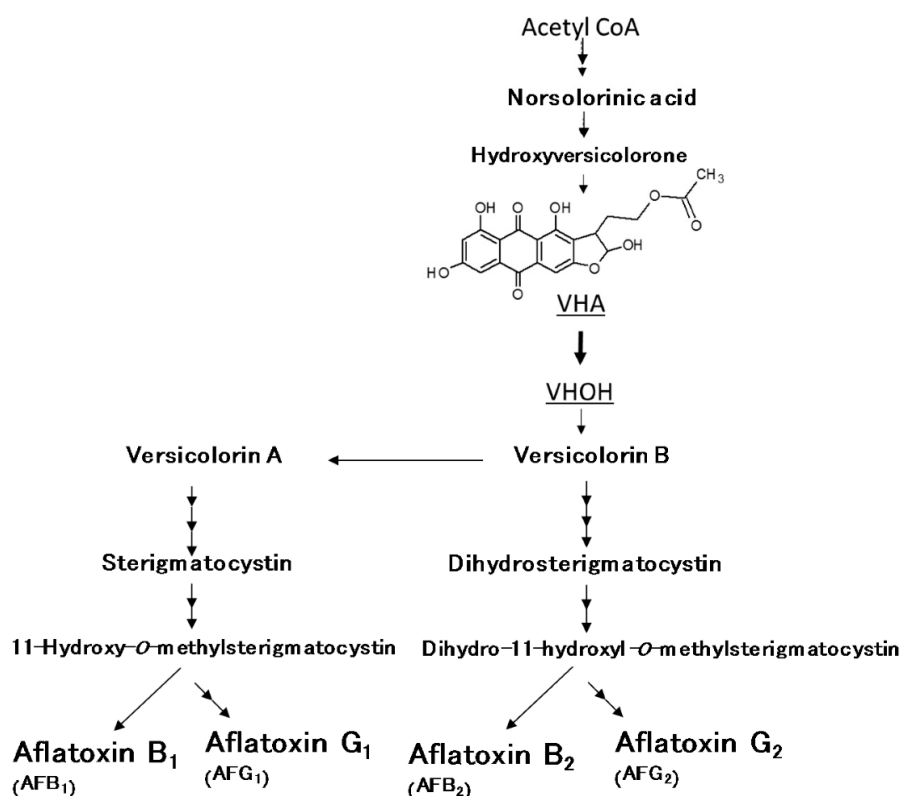


Fig. 9 – Via biosintetica delle aflatossine (Fonte: Kushiro et al., 2018).

2.8.1 Temperatura

La temperatura è in grado di influenzare il processo di biosintesi sia direttamente, attraverso la regolazione dell'attività enzimatica, sia indirettamente, attraverso la modulazione della velocità di crescita del fungo e dell'espressione genica. In particolare, i geni regolatori (aflR e aflS) vengono trascritti su un ampio intervallo di temperature; mentre i geni strutturali della biosintesi (aflD e aflO), ossia quelli che eseguono materialmente le reazioni enzimatiche, si attivano in modo selettivo quando la temperatura diventa ottimale (Gallo et al., 2016). Ciò significa che il fungo è potenzialmente sempre pronto a produrre tossina, ma lo fa veramente solo in una finestra ristretta di temperature, ossia tra 15 e 37 °C. Sotto i 10-12 °C o sopra i 40-42 °C la produzione si riduce drasticamente fino ad azzerarsi del tutto, anche se i limiti esatti dipendono dal ceppo fungino e dal tipo di substrato. Vista l'importanza della temperatura nella biosintesi, è importante notare come, secondo il modello di Battilani et al., un innalzamento globale di soli +2 °C sarebbe sufficiente a portare l'Europa stabilmente

nella fascia ad alto rischio per AFB₁ nel mais (*Figura 10*). Un problema che fino a qualche decennio fa riguardava quasi solamente le latitudini tropicali.

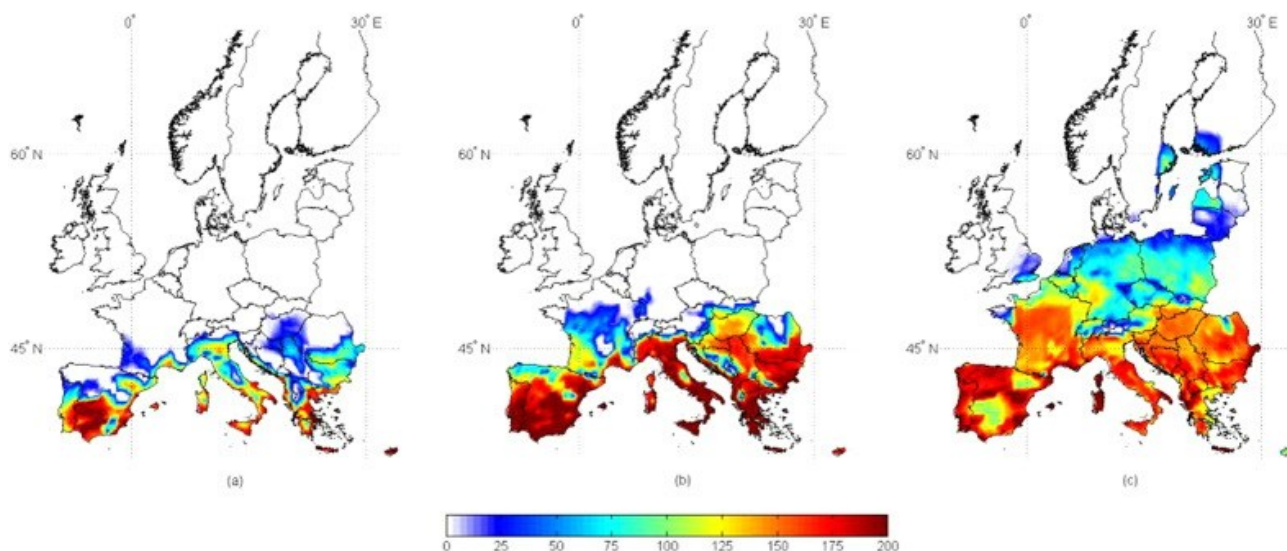


Fig. 10 – Mappe del rischio di contaminazione da aflatossine nel mais al momento del raccolto in 3 diversi scenari climatici: attuale, +2 °C, +5 °C (Fonte: Battilani et al., 2016).

2.8.2 Attività dell'acqua (a_w) e umidità

Tra tutti i fattori ambientali, l'attività dell'acqua (a_w) è probabilmente il più determinante per la crescita fungina e per la produzione di tossine. Si tratta del rapporto tra la pressione di vapore della derrata e la pressione di vapore dell'acqua pura. Poiché misura la quantità di acqua libera disponibile in un substrato, è direttamente correlata alla crescita microbica. Le condizioni ottimali per la crescita di *Aspergillus* si hanno ad una temperatura di 34 °C e un'attività dell'acqua di 0,95 a_w ; a temperature più elevate (42 °C) la crescita è molto lenta, anche con diversi valori di a_w (Al-Zaban, 2023). A valori di 0,78-0,80 a_w si può comunque avere una minima crescita di *A. flavus*, ma per la produzione di aflatossine è necessaria un'attività dell'acqua di almeno 0,82-0,85. La massima produzione di AFB₁ si ottiene a 28 °C con un' a_w di 0,96. A 20 °C e 0,90-0,93 a_w non si osserva nessuna crescita fungina né produzione di tossina (Gallo et al., 2016).

Un aspetto interessante riguarda la relazione tra stress idrico e induzione del cluster genico. Le combinazioni di a_w e temperatura che impongono una condizione di stress al fungo, determinano una significativa riduzione della velocità di crescita ma inducono comunque

l'espressione del cluster biosintetico delle aflatossine; tuttavia, la quantità di AFB₁ effettivamente prodotta in queste condizioni resta bassa (Schmidt-Heydt et al., 2009). Questa evidenza suggerisce che la produzione di aflatossine possa avere, almeno in parte, una funzione adattativa legata alla risposta allo stress.

Nel mais, la produzione di aflatossine può verificarsi in due diversi momenti del ciclo colturale: durante lo sviluppo e la maturazione della granella in campo, e/o nella fase di post-raccolta e stoccaggio. Mentre condizioni caldo-siccite favoriscono la biosintesi in campo, condizioni caldo-umide la favoriscono in stoccaggio. Pertanto, la FAO raccomanda di mantenere l' a_w del mais conservato a valori inferiori a 0,7, che è la soglia considerata sicura per le derrate.

Come è facile intuire, l'attività dell'acqua è legata all'umidità (contenuto idrico) del substrato; tuttavia, la relazione tra le due dipende dalla struttura fisica e chimica del materiale, pertanto non è possibile attribuire un unico valore di umidità considerato sicuro, ma ogni derrata va considerata a sé. Per la granella di mais, un valore di 0,7 a_w ad una temperatura standard di 25 °C, corrisponde generalmente ad un contenuto di umidità del 13,5-14,5% (a seconda della cultivar). È su questo range che si basa il limite di commercializzazione del mais, spesso fissato al 14%. Tuttavia, la relazione non è statica: se la temperatura aumenta, l'attività dell'acqua cresce anche se l'umidità resta invariata. Ad esempio, un mais con a_w di 0,7 a 25 °C, se riscaldato a 37 °C mostra un incremento del valore di a_w (*Figura 11*). È per questo motivo che spesso nella conservazione del mais a lungo termine si punta ad un'umidità pari o minore al 13% (che a 25 °C corrisponde ad una a_w di circa 0,68-0,69); in questo modo si ha un certo margine di sicurezza contro le fluttuazioni termiche nei silos.

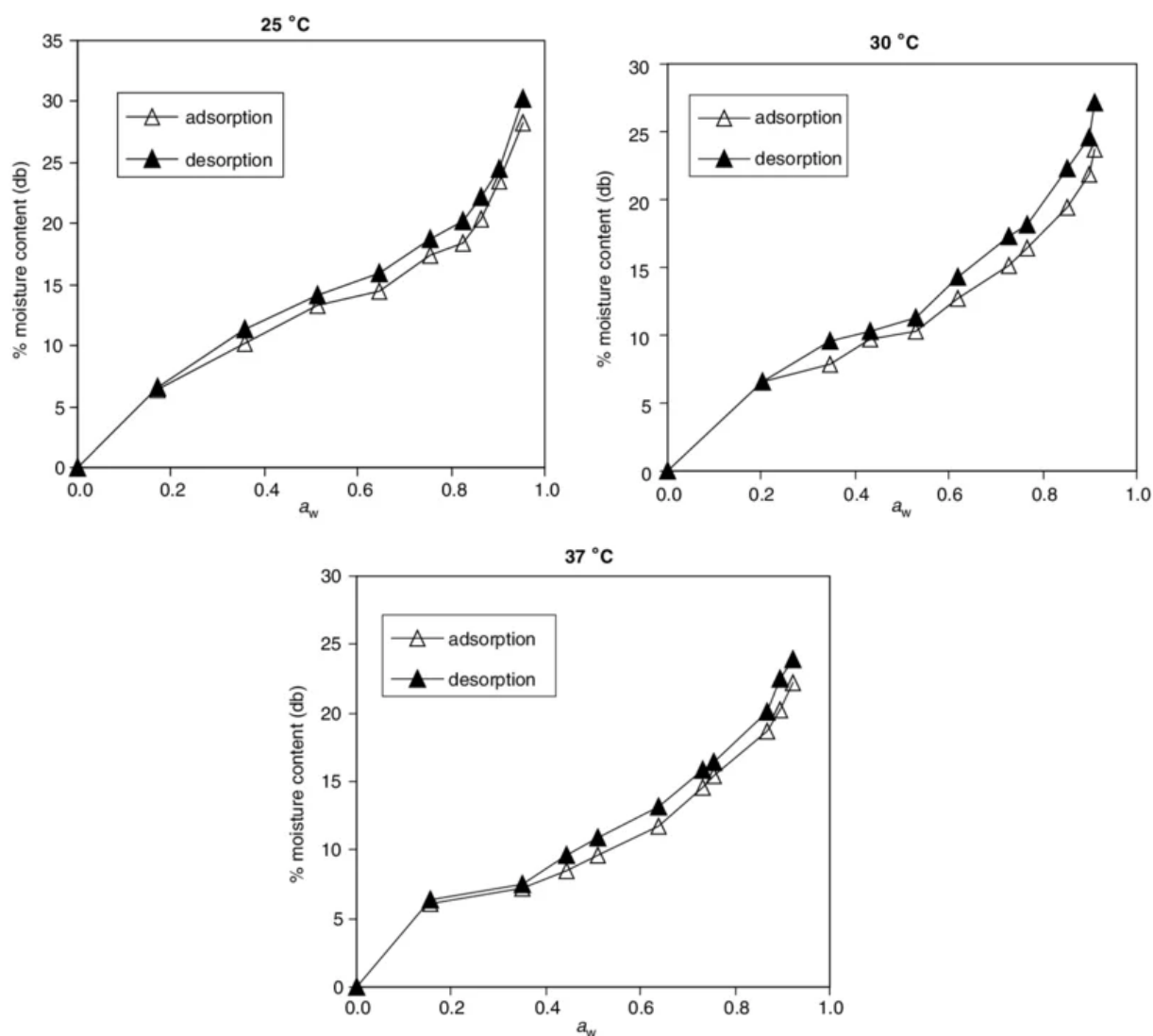


Fig. 11 – Curve isoterme di adsorbimento e desorbimento del mais a diverse temperature (25, 30 e 37 °C) (Fonte: Samapundo et al., 2007). All'aumentare della temperatura, la curva si sposta verso il basso: a parità di umidità, il valore di a_w aumenta.

2.8.3 Atmosfera

Aspergillus flavus è un fungo aerobio obbligato, pertanto un altro elemento indispensabile per la sua crescita e per la produzione di aflatossine è l'ossigeno, che è fondamentale per le diverse reazioni ossidative della cascata biosintetica dell'AFB₁. In condizioni di atmosfera azotata, con ossigeno quasi assente, la produzione di AFB₁ è molto limitata (seppur non annullata completamente). Se però in tale atmosfera sono presenti tracce d'aria, la biosintesi incrementa sensibilmente. D'altra parte, l'arricchimento con CO₂ (ad una concentrazione tra il 20 e il 40%) ostacola la formazione di aflatossine e la crescita fungina, soprattutto se combinato a bassi livelli di O₂; tuttavia, l'effetto dipende molto dal tipo di

substrato e dalla sua a_w (Clevström et al., 1983). Inoltre, il costo e la complessità tecnica limita l'applicazione su larga scala dell'atmosfera controllata per lo stoccaggio delle derrate. Comunque, il solo stoccaggio ermetico all'interno del silo, grazie alla respirazione degli organismi naturalmente presenti nel substrato, può portare nel giro di 10-14 giorni ad un'atmosfera con circa il 3% di ossigeno e il 15% di CO₂, condizioni che, pur non in grado di uccidere le muffe, ne inibiscono significativamente la crescita e la produzione di tossine (Villers, 2014).

2.8.4 Substrato

La natura del substrato è un elemento determinante per la crescita fungina e la produzione di aflatossine. I cereali e le oleaginose sono i substrati preferiti, grazie al loro contenuto in lipidi, carboidrati e azoto. In particolare, alcuni acidi grassi a lunga catena possono modulare l'espressione dei geni del cluster AF (Yan et al., 2015). Inoltre, la disponibilità di substrati ricchi in glucosio stimola la via biosintetica attraverso l'acetil-CoA, il precursore primario delle aflatossine.

2.8.5 pH

Anche il pH del substrato è importante; infatti, sebbene *Aspergillus flavus* possa crescere in un intervallo di pH piuttosto ampio (tra 2 e 11), la produzione di aflatossine è massima quando questo è lievemente acido, compreso tra 4 e 6 (*Tabella 6*), ossia il pH naturale dei cereali conservati. Quando il pH è neutro o alcalino la sintesi tende a ridursi, anche in presenza di condizioni ottimali per la crescita (Pitt & Hocking, 2009).

Tab. 6 – Condizioni ambientali associate alla crescita di *Aspergillus flavus* e alla produzione di aflatossine

Parametro	Crescita fungina (range)	Produzione aflatossine (range)	Valore ottimale (massima produzione AFB ₁)
Temperatura (°C)	10–43	15–37	28–30
Attività dell'acqua (a _w)	> 0,78–0,80	> 0,85	0,95–0,99
pH	2–11	4–6	4–6
Atmosfera	Aerobiosi	Aerobiosi	Aerobiosi

Fonti: Gallo et al., 2016; Al-Zaban, 2023; Clevström et al., 1983; Pitt & Hocking, 2009.

2.8.6 Competizione microbica

Da non sottovalutare è l'impatto della competizione con il microbioma associato al substrato vegetale. Infatti, è stato documentato un antagonismo naturale nei confronti di *Aspergillus flavus* da parte di batteri del genere *Bacillus*, di funghi come il *Trichoderma* e di alcune specie di lieviti. Ciò avviene attraverso diversi meccanismi, tra cui la competizione per i nutrienti, la produzione di composti volatili antifungini e l'inibizione diretta della crescita miceliare (Ren et al., 2020). Questi microrganismi possono essere utilizzati come mezzi di controllo biologico direttamente in campo. Una delle strategie di biocontrollo più studiate consiste nell'impiego di ceppi atossigeni di *A. flavus*; questi, una volta inoculati in campo, competono con i ceppi tossigeni per la colonizzazione del substrato, riducendo significativamente i livelli di aflatossine nel raccolto.

2.8.7 Stress della pianta

Come discusso nel capitolo precedente, lo stress della pianta ospite è un fattore predisponente alla colonizzazione fungina. In particolare, uno stress termico e idrico combinato risulta essere lo scenario peggiore in quanto compromette le difese della pianta. In particolare, nel mais la siccità causa microfessurazioni nel pericarpo della cariosside, mentre il caldo accelera la senescenza dei tessuti. Inoltre, si osserva una riduzione della sintesi di composti fenolici e di fitoalessine che, in condizioni normali, difendono la pianta dai patogeni. Anche la produzione di enzimi "difensivi" (es. chitinasi, glucanasi) diminuisce. Allo stesso tempo, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) aumenta (Guo et al., 2008; Fountain et al., 2015). Quando la pianta è stressata, accumula zuccheri semplici

nei tessuti come risposta osmotica, e ciò contribuisce a stimolare la via biosintetica delle aflatossine. I danni meccanici provocati dagli insetti, in particolare dalla piralide del mais (*Ostrinia nubilalis*), costituiscono porte d'ingresso privilegiate per il fungo. Nella fase di stoccaggio, la presenza nel cereale di insetti curculionidi come il punteruolo (*Sitophilus zeamais*, *Sitophilus granarius*) può favorire indirettamente la produzione di aflatossine: gli insetti, oltre a danneggiare i chicchi, con la loro attività metabolica creano microambienti favorevoli alla crescita fungina (aumento di umidità e temperatura), e veicolano le spore fungine da un chicco all'altro.

2.8.8 Tempo

Infine vi è il fattore tempo: le aflatossine non vengono prodotte istantaneamente, ma la loro sintesi richiede che il fungo abbia completato la fase di crescita vegetativa e sia passato ad un metabolismo secondario. In condizioni ottimali di temperatura e a_w , la produzione può iniziare già nelle prime 24-48 ore di colonizzazione del substrato, ma solo dopo 3-7 giorni la concentrazione raggiunge valori significativi. Più a lungo la derrata rimane in condizioni favorevoli alla crescita fungina, maggiore sarà la concentrazione di tossina accumulata.

A tal proposito, va precisato che la sintesi raggiunge il suo picco nel lasso di tempo che intercorre tra la maturazione fisiologica della pianta e il momento della raccolta. Nel mais, il processo di accumulo delle sostanze nutritive nella cariosside si conclude con la comparsa di uno strato separatore scuro detto "strato nero" alla base dei chicchi, che segnala la maturazione fisiologica: in questa fase, il contenuto di umidità del chicco si attesta attorno al 30-32% (Delledonne, 2010). Tra questo stadio e quello della cosiddetta "maturazione agronomica", la granella perde progressivamente umidità rimanendo sul campo. La durata di questo processo dipende da quanto precocemente si forma lo strato nero e dall'andamento climatico della stagione. Una volta interrotto il legame con la pianta madre, il chicco di mais diventa particolarmente vulnerabile alla colonizzazione fungina. È dunque importante minimizzare il tempo di permanenza della coltura in campo dopo la maturazione fisiologica, procedendo alla raccolta con un livello di umidità leggermente superiore rispetto a quello indicato per la cultivar, anche qualora l'andamento stagionale ne consentisse il posticipo. La granella non va lasciata asciugare in campo fino a valori di umidità prossimi a quelli richiesti per la conservazione pur di ridurre i costi di essiccazione, bensì deve essere raccolta quando l'umidità è compresa tra il 22% e il 24% (Delledonne, 2010). Inoltre, durante

le operazioni di trebbiatura è fondamentale limitare al minimo la rottura dei chicchi, assicurandosi che la mietitrebbia risulti correttamente calibrata. I setacci della trebbiatrice devono garantire una separazione efficace della granella dai residui vegetali, in quanto questi possono contenere l'inoculo fungino. Una volta completata la raccolta, la granella deve essere conferita il più rapidamente possibile al centro di stoccaggio, che deve procedere immediatamente all'essiccazione. Altrimenti, il prodotto umido, se lasciato in attesa sui carri o nei piazzali degli essiccatoi, va incontro rapidamente a processi ossidativi e fermentativi, con conseguente perdita di sostanza secca, innalzamento della temperatura della massa e accumulo di micotossine.

2.9 Meccanismi di incremento e degradazione della tossina durante lo stoccaggio

Lo stoccaggio non interrompe automaticamente il metabolismo del fungo presente sul prodotto. Ciò significa che durante la conservazione, in certe condizioni, l'aflatossina B₁ può continuare ad aumentare, soprattutto se il materiale entra in magazzino con un tenore di umidità ancora troppo alto, oppure se durante la permanenza si creano microambienti caldi e umidi. La letteratura mostra che negli stoccaggi prolungati si può osservare crescita fungina e produzione di aflatossine se le condizioni di conservazione non sono ottimali. Al contrario, quando l'umidità del cereale si mantiene al di sotto della soglia di sicurezza e la temperatura resta bassa, lo sviluppo fungino tende a bloccarsi o a rallentare fortemente (Villers, 2014). Di conseguenza, in magazzino i parametri più importanti sono: umidità del prodotto, umidità relativa dell'aria, temperatura, tempo di permanenza e disponibilità di ossigeno. Come già discusso, *A. flavus* e *A. parasiticus* non riescono a crescere né a produrre aflatossine a valori di attività dell'acqua inferiori a 0,70; allo stesso modo, le probabilità di sviluppo fungino si riducono decisamente quando l'umidità relativa scende al di sotto del 70% e la temperatura è inferiore a 10 °C.

Un aspetto interessante è che, durante lo stoccaggio, l'andamento dell'AFB₁ non è sempre lineare. In alcuni casi la concentrazione sale nelle prime fasi della conservazione e poi tende a stabilizzarsi o persino a diminuire verso la fine del periodo osservato. Un recente studio ha valutato la crescita fungina e la produzione di AFB₁ su campioni di riso conservato a diversi valori di temperatura (20 °C, 25 °C, 30 °C), umidità relativa (75%, 85%, 95%), e umidità del riso (12%, 15%, 18%) per un periodo di stoccaggio di 60 giorni. In particolare, a 30 °C e 95% UR, con umidità del riso al 12%, sia la crescita fungina che la produzione di

aflatossina hanno raggiunto un picco intorno al giorno 20, per poi diminuire, probabilmente a causa dell'esaurimento dei nutrienti e/o della degradazione biologica dell'aflatossina da parte di altri microrganismi (vedi *Figura 12*). Nello stesso studio è stato osservato che le condizioni che favoriscono la crescita fungina non coincidono necessariamente con quelle che massimizzano la produzione di tossina. Questo dato evidenzia che la relazione tra presenza di muffa e tossina non è assoluta: *Aspergillus* può crescere senza produrre sempre la stessa quantità di AFB₁. La sintesi di tossina può variare infatti in funzione della fase fisiologica del fungo, della disponibilità di nutrienti e delle condizioni microambientali, che non sono mai uniformi all'interno del prodotto stoccato (Ouma et al., 2024).

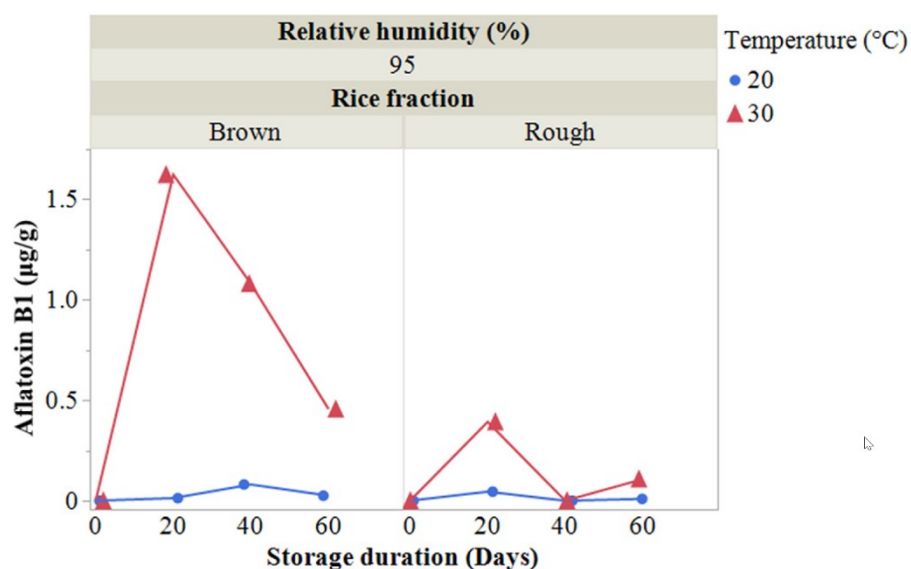


Fig. 12 – Variazioni nella produzione di aflatossine nel riso integrale e nel riso grezzo durante 60 giorni di conservazione a 20 °C e 30 °C con umidità relativa costante del 95% (Fonte: Ouma et al., 2024).

La possibile diminuzione dell'AFB₁ durante la conservazione, tuttavia, non va intesa come una "bonifica" naturale del prodotto. Le aflatossine sono composti molto stabili e, in condizioni normali di magazzino, non si degradano facilmente. Le riduzioni che talvolta si possono osservare sono solo parziali e lente. Diventano più rilevanti in presenza di luce UV, ossigeno e condizioni di pH estreme, ma senza queste condizioni la tossina è sostanzialmente persistente. Pertanto, quando in stoccaggio si osserva un calo della concentrazione, la spiegazione più plausibile è spesso il risultato di un insieme di fenomeni: cessazione o rallentamento della biosintesi, trasformazioni chimiche (in misura limitata),

legame della molecola alla matrice, perdita di omogeneità del campione nel tempo (che compromette la reale quantificazione della tossina nel prodotto).

2.10 Utilizzo di conservanti in fase di stoccaggio

L'impiego di conservanti ad azione antifungina sui cereali stoccati può essere una misura complementare alle buone pratiche di gestione già descritte al fine di ridurre il rischio aflatossine. Tra le diverse categorie di conservanti, gli acidi organici sono tra i più utilizzati in ambito mangimistico per la loro efficacia contro i funghi. Questo approccio non deve sostituire l'essiccazione e la corretta gestione dell'umidità; si tratta di una barriera chimica aggiuntiva utile in caso di partite a maggior rischio di contaminazione o qualora il controllo delle condizioni ambientali risulti difficoltoso.

2.10.1 L'acido propionico

L'acido propionico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) è un acido carbossilico a catena corta, liquido, volatile e dall'odore acre, presente in natura come prodotto del metabolismo anaerobico di batteri del genere *Propionibacterium*. Presenta un'elevata azione antimicrobica nei confronti delle muffe e di alcuni batteri, mentre l'efficacia sui lieviti è limitata. Essendo un acido debole, in un ambiente moderatamente acido (come l'ambiente esterno alla cellula microbica) rimane in forma indissociata (non carica); tuttavia, grazie alla sua liposolubilità, attraversa facilmente la membrana plasmatica della muffa per diffusione semplice. Una volta all'interno, poiché il citoplasma ha un pH vicino alla neutralità, si dissocia liberando ioni idrogeno (H^+) e anioni propionato ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$). L'accumulo di ioni H^+ nella cellula provoca un brusco calo del pH interno (Dijksterhuis et al., 2019; Mira & Teixeira, 2013). Per sopravvivere, la muffa deve espellere i protoni in eccesso riportando il pH a livelli fisiologici; per farlo utilizza pompe proteiche (come la H^+ -ATPasi), ma questo porta ad un veloce esaurimento energetico che blocca il metabolismo fungino (effetto fungistatico) (Mira & Teixeira, 2013). Inoltre, l'anione propionato altera il funzionamento di enzimi chiave per il metabolismo e compete con i metaboliti del ciclo di Krebs (Jay et al., 2005). L'acido propionico può anche alterare la fluidità e la permeabilità della membrana cellulare, rendendo difficile per la muffa assorbire i nutrienti necessari dal substrato. La massima efficacia si ottiene quando il pH del substrato è inferiore a 5-5,5. Se questo è troppo alto,

l'acido si dissocia all'esterno della cellula non riuscendo a penetrare nella muffa (Dijksterhuis et al., 2019).

A livello microbiologico, l'effetto antifungino dell'acido propionico si osserva già ad una concentrazione dello 0,05-0,5% circa (0,5-5 kg/t) (Baghdad, 2025), tuttavia nell'applicazione pratica sui cereali si possono impiegare dosi superiori per avere maggiori garanzie di efficacia. Nello specifico, per la scelta della dose è necessario valutare i seguenti fattori: temperatura di stoccaggio, umidità della granella, durata prevista dello stoccaggio, qualità di partenza della granella. Come è facile intuire, l'effetto inibitorio aumenta all'aumentare della dose e diminuisce all'aumentare dell'umidità del substrato. Anche il tipo di formulazione del prodotto influisce sulla dose operativa.

2.10.2 Il propionato d'ammonio e le formulazioni miste

Un limite operativo dell'acido propionico libero è la sua corrosività che rende la manipolazione complicata. Ciò ha spinto l'industria verso l'utilizzo di formulati misti che combinano l'acido con i suoi sali (es. propionato d'ammonio).

Il propionato di ammonio è il sale di ammonio dell'acido propionico. A differenza di quest'ultimo, il propionato di ammonio è più stabile e meno volatile. Si dissolve facilmente in acqua e rilascia l'acido propionico in maniera lenta e costante. La combinazione acido propionico + propionato di ammonio in rapporto 9:1 è stata studiata dalla FAO nell'ambito dei programmi di controllo delle aflatossine nel mais, dimostrandosi efficace nel controllare la crescita delle muffe e la sintesi di aflatossine.

Dal punto di vista pratico, i conservanti a base di propionati sono disponibili in formulazioni liquide o in polvere da applicare direttamente al momento dell'ingresso della granella nel silo tramite sistemi di dosaggio automatici integrati nei circuiti di carico.

2.10.3 Limiti dei conservanti

È bene specificare che il trattamento con conservanti inibisce la crescita fungina, ma non elimina le aflatossine già presenti prima del trattamento. Quindi si tratta di un sistema preventivo ma non decontaminante. Inoltre, l'aggiunta di acido propionico deve avvenire prima dell'eventuale esplosione microbica: se la muffa si è già formata l'effetto sulla crescita

è scarso. Oltretutto, alcuni studi hanno rilevato che a concentrazioni sub-letali (insufficienti a inibire la crescita fungina) l'acido propionico potrebbe paradossalmente stimolare la produzione di aflatossine. Infatti, mentre in condizioni normali la produzione di aflatossine inizia durante la fase di rallentamento della crescita fungina (fase stazionaria), in presenza di acido propionico a dosi sub-letali la sintesi può avvenire già durante la fase di crescita del micelio, come conseguenza dello stress indotto. Per garantire un'efficace protezione, risulta dunque fondamentale stabilire il corretto dosaggio del conservante (Al-Hilli & Smith, 1979; Ghosh & Häggblom, 1985; Molina & Giannuzzi, 2002).

2.11 Normativa di riferimento

La gestione del rischio da aflatossine in Europa si basa sul principio ALARA (As Low As Reasonably Achievable): significa che la normativa punta a ridurre l'esposizione del consumatore al livello più basso tecnicamente raggiungibile, compatibilmente con le buone pratiche agricole e industriali. Questo perché essendo le aflatossine genotossiche e cancerogene, non è scientificamente possibile individuare una dose priva di effetti avversi. Tuttavia, trattandosi di contaminanti ubiquitari in natura, l'obiettivo di un'esposizione pari a zero non risulta realisticamente perseguibile, poiché comporterebbe il rigetto di ingenti quantità di derrate agricole, con potenziali ripercussioni sulla stabilità delle scorte alimentari mondiali. L'approccio ALARA (introdotto dal Reg. (CEE) 315/93) rappresenta dunque il punto di equilibrio tra tutela della salute pubblica e sostenibilità tecnica ed economica della produzione.

2.11.1 Quadro normativo per gli alimenti destinati al consumo umano

Il Regolamento (CE) n. 1831/2003 ha sempre rappresentato il riferimento principale per i tenori massimi di contaminanti negli alimenti. Tuttavia, con la pubblicazione in Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del Regolamento (UE) 2023/915 della Commissione, del 25 aprile 2023, il precedente regolamento è stato formalmente abrogato. Il nuovo regolamento, entrato in vigore il 25 maggio 2023, ha riunito in un unico testo i limiti per una serie di contaminanti, tra cui le micotossine. A poco più di un anno dall'entrata in vigore, il Regolamento (UE) 2023/915 è stato ulteriormente aggiornato dal Regolamento (UE) 2024/1756, che ha modificato alcuni dei tenori massimi stabiliti.

Per quanto riguarda le aflatossine negli alimenti, il Regolamento (UE) 2023/915 fissa limiti diversi a seconda della matrice e della destinazione d'uso. I valori più restrittivi riguardano i prodotti più a rischio e le categorie di consumatori vulnerabili (es. alimenti per lattanti). Per cereali, frutta secca, spezie e prodotti derivati sono previsti limiti specifici per l'AFB₁ singola e per la somma delle quattro principali aflatossine (B₁ + B₂ + G₁ + G₂). Per i cereali ancora da sottoporre a cernita e/o trattamenti di trasformazione fisica le soglie sono generalmente più elevate perché si presume una successiva riduzione della contaminazione. In *Tabella 7* sono riportati i limiti specifici per i principali alimenti. Per avere un'idea di quale sia l'ordine di grandezza in gioco, si consideri che 1 µg/kg = 1 parte per miliardo (ppb); si tratta dunque di concentrazioni estremamente basse, ma necessarie se si vuole mantenere basso il rischio.

Un aspetto fondamentale della normativa europea riguarda il divieto di diluizione e di utilizzo di prodotti chimici per eliminare le aflatossine dai prodotti contaminati. Questo principio ha implicazioni pratiche rilevanti per gli operatori della filiera, che non possono in alcun modo “compensare” una contaminazione mescolando partite conformi con quelle che non lo sono.

Tab. 7 – Tenori massimi di aflatossine negli alimenti

Alimento	Tenore massimo (µg/kg)		
	B ₁	Somma di B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	M ₁
Frutta secca da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico	5,0	10,0	-
Frutta secca impiegata come unico ingrediente o prodotti trasformati a partire da frutta secca	2,0	4,0	-
Fichi secchi	6,0	10,0	-
Arachidi e altri semi oleosi da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico	8,0	15,0	-
Arachidi e altri semi oleosi impiegati come unico ingrediente o prodotti trasformati a partire da arachidi e altri semi oleosi	2,0	4,0	-
Frutta a guscio da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico	5,0	10,0	-
Frutta a guscio impiegata come unico ingrediente o prodotti trasformati a partire da frutta a guscio	2,0	4,0	-
Mandorle, pistacchi e semi di albicocca da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico	12,0	15,0	-
Mandorle, pistacchi e semi di albicocca	8,0	10,0	-
Nocciole e noci del Brasile da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico	8,0	15,0	-
Nocciole e noci del Brasile	5,0	10,0	-

Alimento	Tenore massimo (µg/kg)		
	B ₁	Somma di B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	M ₁
Cereali e prodotti derivati da cereali	2,0	4,0	-
Granoturco e riso da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico	5,0	10,0	-
Le spezie essiccate seguenti: <i>Capsicum</i> spp (nasi frutti secchi, interi o macinati, tra cui peperoncino, peperone in polvere, pepe di Caienna e paprika); Pepe (frutti di <i>Piper</i> spp, compreso pepe bianco e nero); Noce muscata (<i>Myristica fragrans</i>); Curcuma (<i>Curcuma longa</i>); Miscele di spezie essiccate contenenti una o più delle suddette spezie essiccate	5,0	10,0	-
Zenzero (<i>Zingiber officinale</i>) (essiccato)	5,0	10,0	-
Latte crudo, latte trattato termicamente e latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte	-	-	0,050
Formule per lattanti, formule di proseguimento e formule per bambini nella prima infanzia	-	-	0,025
Alimenti per la prima infanzia e alimenti trasformati a base di cereali destinati ai lattanti e ai bambini nella prima infanzia	0,10	-	-
Alimenti a fini medici speciali destinati ai lattanti o ai bambini nella prima infanzia	-	-	0,025

Fonte: Regolamento (UE) 2023/915.

Per latte crudo, latte trattato termicamente e latte destinato alla produzione di alimenti a base di latte il limite per l'AFM₁ è fissato a 0,050 µg/kg (50 ppt), mentre per il latte destinato ai lattanti e ai bambini nella prima infanzia questo scende a 0,025 µg/kg (25 ppt). Con la circolare n. 9487 del 7 marzo 2025, il Ministero della Salute ha introdotto un valore soglia di attenzione per l'AFM₁ nel latte, più basso del limite legale, fissato a 0,040 µg/kg. Se superato, il produttore deve comunicarlo all'autorità competente locale entro 24 ore e avviare azioni correttive sull'alimentazione degli animali. Il latte che supera il limite di legge viene dichiarato non conforme e deve essere ritirato dal mercato entro 12 ore dall'esito analitico e smaltito come materiale di categoria 2.

2.11.2 Limiti nei mangimi

Oltre alla normativa sugli alimenti, l'Unione Europea ha definito limiti specifici per i mangimi destinati agli animali zootecnici. Il Regolamento (UE) 574/2011, che ha modificato la Direttiva comunitaria 2002/32 sulle sostanze indesiderabili nei mangimi, fissa i limiti massimi tollerabili di aflatossine nei prodotti destinati all'uso zootecnico. Questa normativa prevede

per tutte le materie prime destinate alla produzione di mangimi un contenuto massimo di Aflatossina B₁ di 20 µg/kg (20 ppb). Per i mangimi composti destinati alle vacche da latte il limite è più restrittivo ed è fissato a 5 µg/kg, a causa del trasferimento dell'AFB₁ in AFM₁ attraverso il metabolismo animale e della conseguente contaminazione del latte. Nella filiera del Parmigiano Reggiano il Consorzio adotta da anni un criterio cautelativo più severo; infatti, nonostante nel disciplinare di produzione non risulti indicato un limite specifico per l'aflatossina B₁, normalmente si opera con una soglia prudenziale più bassa pari a 3 µg/kg di AFB₁ nei mangimi per le bovine da latte, per ridurre ulteriormente il rischio di AFM₁ nel formaggio. Anche per i mangimi è valido il divieto di miscelazione delle partite contaminate. In *Tabella 8* sono riportati i limiti specifici per categoria.

Tab. 8 – Limiti massimi di Aflatossina B₁ nei mangimi
(Valori espressi su mangime con 12% di umidità)

Categoria	Limite massimo Aflatossina B₁
Materie prime per mangimi	20 µg/kg
Mangimi complementari e completi	10 µg/kg
Mangimi composti per bovini da latte, vitelli, ovini da latte, agnelli, caprini da latte, capretti, suinetti e pollame giovane	5 µg/kg
Mangimi composti per bovini non da latte, ovini non da latte, caprini non da latte, suini adulti e pollame adulto	20 µg/kg

Fonte: Direttiva 2002/32/CE.

2.11.3 Controlli ufficiali e sistemi di autocontrollo

Il Regolamento (UE) 2017/625 disciplina i controlli ufficiali atti a garantire l'applicazione della normativa in materia di mangimi e di alimenti, oltre che le norme sulla salute e sul benessere degli animali. A tale scopo, le autorità competenti nazionali (in Italia il Ministero della Salute, i Servizi Veterinari delle ASL e gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali) pianificano e svolgono verifiche lungo tutta la filiera produttiva.

Accanto ai controlli ufficiali vi sono i sistemi di autocontrollo aziendali, basati sui principi HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) introdotti e resi obbligatori con il Regolamento (CE) 853/2004. La normativa attribuisce all'operatore un ruolo fondamentale nel garantire la sicurezza dei mangimi e degli alimenti che egli stesso immette in commercio,

infatti i piani di controllo ufficiali sono volti principalmente alla verifica della corretta applicazione dei sistemi di autocontrollo. L'operatore (può essere un agricoltore, uno stoccatore, un mangimificio o un caseificio) è tenuto a identificare i punti critici del proprio processo produttivo in relazione al rischio aflatossine, a definire valori soglia (limiti critici), ad eseguire analisi con frequenze adeguate e ad applicare misure correttive in caso di non conformità.

Le modalità di campionamento e analisi sono a loro volta regolamentate dal Regolamento (CE) n. 401/2006 per il mais ad uso umano e dal Regolamento (CE) n. 152/2009 per le materie prime zootecniche. Poiché sulla base del campionamento si decide la sorte delle varie partite, è molto importante che questo venga effettuato correttamente. Tale aspetto rende necessari protocolli che garantiscano la rappresentatività del campione, attraverso prelievi consoni alla partita da analizzare.

A livello internazionale, il Sistema Rapido di Allerta per Alimenti e Mangimi (RASFF), consente agli Stati membri di scambiarsi informazioni in tempo reale sui prodotti non conformi presenti sul mercato europeo. Il RASFF segnala periodicamente i ritiri dal mercato dei prodotti contaminati da aflatossine. I controlli riguardano anche gli alimenti e i mangimi importati da Paesi non facenti parte dell'UE, infatti spesso è proprio dalle importazioni che derivano i rischi maggiori. A tal proposito, l'Unione ha stabilito le regole che i Paesi esportatori devono rispettare per poter accedere al mercato comunitario.

2.11.4 Metodi di campionamento per la ricerca delle micotossine

Come anticipato, il Regolamento (CE) n. 152/2009 della Commissione, del 27 gennaio 2009, stabilisce i metodi di campionamento e di analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per animali. Questo regolamento ha abrogato la vecchia Direttiva 76/371/CE, che fissava i metodi di prelievo dei campioni per il controllo ufficiale degli alimenti per gli animali. Il nuovo regolamento si applica ad una vasta gamma di sostanze da ricercare, molte delle quali indesiderabili. Tra queste vi sono: le micotossine (come l'aflatossina B₁), gli additivi, gli OGM e i pesticidi. Il regolamento è entrato in applicazione dal 26 agosto 2009, ma ha subito nel corso degli anni diverse modifiche integrative. Il Regolamento (UE) n. 691/2013 della Commissione, del 19 luglio 2013, ha apportato modifiche ai metodi di campionamento e di analisi. Con il Regolamento di esecuzione (UE) 2024/771, in vigore dal 25 marzo 2024, la Commissione Europea ha aggiornato le disposizioni in materia di campionamento e di

analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali. Questa revisione ha comportato la riscrittura completa di tutti gli allegati del regolamento 152/2009, tenendo conto delle nuove conoscenze scientifiche e tecnologiche e dell'esperienza acquisita nel corso degli anni.

Alla base del regolamento vi è il principio di campionamento rappresentativo, che consiste nel prelevare una piccola frazione di un lotto in modo tale che la determinazione di una certa sostanza all'interno di tale frazione rappresenti il valore medio della sostanza nel lotto. Questo concetto è particolarmente importante nel caso delle micotossine, che tendono a distribuirsi in modo molto disomogeneo all'interno delle partite (la contaminazione si concentra nei cosiddetti "hot spot"). È dunque indispensabile prelevare più campioni elementari da diversi punti della massa da campionare, che andranno poi riuniti in un campione globale. Il campione elementare è la quantità prelevata da un singolo punto della partita campionata, mentre il campione globale è l'insieme dei campioni elementari prelevati dalla stessa partita. Per ogni partita è richiesto generalmente un solo campione globale. Poi vi è il campione ridotto, che è la parte rappresentativa del campione globale ottenuta mediante sua riduzione. Il campione finale è la porzione che viene effettivamente inviata al laboratorio per l'analisi.

Il numero di campioni elementari da prelevare dipende delle dimensioni della partita: partite più grandi richiedono un numero maggiore di prelievi elementari per garantire una rappresentatività adeguata. I campioni elementari devono essere prelevati in maniera casuale ma bilanciata, cercando di interessare ogni porzione della partita. Una volta costituito il campione globale, è necessario mescolare l'intera massa per ottenere un campione omogeneo. A tal proposito, poiché il grado di omogeneità delle micotossine in un campione costituito da materie prime in granella macinate è fortemente influenzato dalla granulometria del campione stesso, la macinazione fine è importante per ottenere un'omogeneizzazione ottimale. Dal campione globale si ricavano poi solitamente più campioni finali: uno destinato all'analisi di prima istanza, uno conservato per un'eventuale analisi di revisione su richiesta dell'operatore e, eventualmente, un campione di riferimento. Questi devono essere adeguatamente sigillati, etichettati ed accompagnati da un verbale di prelievo.

Le sostanze distribuite in modo uniforme (come certi additivi) consentono di impiegare procedure di campionamento più permissive, a differenza di contaminanti quali le micotossine, che invece prevedono requisiti più stringenti sia per quanto riguarda il numero

di campioni elementari da prelevare, sia per quanto riguarda la loro distribuzione spaziale all'interno della partita (vedi *Tabelle 9 e 10*).

**Tab. 9 – Requisiti quantitativi per il controllo delle sostanze distribuite in modo uniforme:
*Prodotti solidi alla rinfusa***

Dimensioni della partita campionata	Numero minimo di campioni elementari
≤ 2,5 tonnellate	7
> 2,5 tonnellate	√ di 20 volte il numero di tonnellate che costituiscono la partita campionata (*), fino a un massimo di 40 campioni elementari

(*) Se il risultato è un numero decimale, si arrotonda al numero intero superiore.

Fonte: Regolamento (CE) n. 152/2009.

**Tab. 10 – Requisiti quantitativi per il controllo delle sostanze distribuite in modo non uniforme:
*Prodotti solidi alla rinfusa***

Dimensioni della partita campionata	Numero minimo di campioni elementari
< 80 tonnellate	Pari al valore calcolato per le sostanze distribuite in modo uniforme moltiplicato per 2,5
≥ 80 tonnellate	100

Fonte: Regolamento (CE) n. 152/2009.

La modalità di prelievo varia a seconda che il mangime si trovi in condizioni di stasi o di movimento. Il campionamento statico avviene su merce ferma, stoccata in silos, sacchi, big bag o altri contenitori. In questo caso, i prelievi vengono effettuati in punti specifici ripartiti sulla massa, con apposite sonde o pale. Il campionamento dinamico, invece, si effettua sul prodotto in movimento (solitamente durante le operazioni di carico o scarico) ed è preferibile perché permette di intercettare il flusso dell'intera massa. Per quanto riguarda i mangimi confezionati, il prelievo deve essere eseguito tramite sonda o pala, prendendo una parte del contenuto da tutte le confezioni da campionare. Il regolamento prevede inoltre che gli strumenti utilizzati per il campionamento siano realizzati con materiali che non contaminino i prodotti da campionare e, se destinati ad essere riutilizzati, siano facilmente pulibili per evitare contaminazioni crociate tra una partita e l'altra.

3. Obiettivi della tesi

3.1 Analisi dei dati di autocontrollo aziendale

Il presente lavoro di tesi nasce dalla collaborazione con l'azienda mangimistica Progeo S.c.a., presso la quale è stato svolto il periodo di tirocinio. Per questa realtà produttiva, infatti, la gestione del rischio da aflatossine riveste un ruolo di primaria importanza.

Per mettere in atto una strategia di prevenzione efficace, è necessario innanzitutto comprendere la dinamica naturale del problema. Prima di investire in approcci sperimentali, è stato dunque fondamentale rispondere alla seguente domanda: gli approvvigionamenti di mais presso il mangimificio Progeo mostrano una variabilità statisticamente significativa nel contenuto di aflatossina nel corso dell'anno? Se sì, secondo quale andamento?

La fase iniziale del presente lavoro di tesi si è dunque focalizzata sull'analisi retrospettiva dei dati di autocontrollo aziendale prodotti da Progeo negli ultimi tre anni di gestione. L'azienda, come operatore del settore *feed*, mantiene un archivio storico sulle analisi del contenuto di AFB₁ nel mais in fase di accettazione dai fornitori, effettuate secondo protocolli standardizzati. Questi dati ci mostrano la reale variabilità della commodity in ingresso all'impianto, senza artefatti che potrebbero derivare da manipolazioni sperimentali, seppur con una loro variabilità intrinseca (fornitori, lotti, situazioni agronomiche e di raccolta differenti). Proprio per questo motivo, vanno analizzati con occhio statistico.

Oltre a descrivere il fenomeno, questa analisi può avere anche ricadute dal punto di vista operativo. Infatti, se le fluttuazioni nel contenuto di aflatossina dovessero rivelare un andamento stagionale statisticamente significativo, la logistica di approvvigionamento e la gestione del rischio potrebbero dover essere calibrate di conseguenza. Ad esempio, l'identificazione di periodi critici permetterebbe di implementare piani di campionamento e monitoraggio differenziati nel corso dell'anno, concentrando le risorse nei mesi più critici.

3.2 Valutazione della stabilità del cereale in condizioni di stress igroscopico

Alla prima fase di analisi dati, è seguito un approccio sperimentale volto a valutare il comportamento del mais durante lo stoccaggio in condizioni ambientali critiche (alta temperatura e umidità relativa). È infatti importante studiare la cinetica di assorbimento dell'umidità del cereale poiché quest'ultimo non è un sistema statico. Anche quando il mais viene stoccato ad un contenuto idrico idoneo, in presenza di particolari condizioni ambientali (che talvolta possono verificarsi all'interno delle celle di stoccaggio durante i periodi caldo-umidi dell'anno) può riacquistare umidità. La velocità di questo processo dipende da diversi fattori: la differenza di potenziale idrico tra l'ambiente e il cereale, la temperatura, la cultivar, il tempo di permanenza in queste condizioni.

L'obiettivo di questa fase è quindi quello di valutare come variano nel tempo (per un periodo di 102 giorni) l'umidità del cereale, il contenuto di aflatossina e i parametri microbiologici (Carica Batterica Totale [CBT] e Carica Micotica Totale [CMT]), quando il mais viene stoccato a 28 °C e 80-85% UR. Comprendere la dinamica di deperimento può essere particolarmente utile a livello predittivo per la gestione operativa dello stoccaggio.

Un secondo obiettivo consiste nell'identificare quale sia il punto critico di umidità del mais oltre il quale si innesca la proliferazione fungina e la produzione di aflatossine. Questa "soglia di allerta" può essere utilizzata per definire i limiti operativi entro i quali il cereale può essere conservato senza che intervengano processi di contaminazione.

3.3 Determinazione della dose efficace di conservante

Quando il mais mantiene condizioni di stoccaggio ottimali, il deterioramento non si verifica; tuttavia, questa situazione non sempre rispecchia la realtà aziendale. Talvolta può risultare difficoltoso mantenere le condizioni ambientali ottimali; inoltre esistono alcuni fattori difficili da prevenire come le infestazioni da insetti. Si è deciso quindi di analizzare l'efficacia dell'acido propionico nel proteggere la granella quando il rischio di deterioramento è elevato, ossia quando l'umidità del cereale supera il 19-20%.

Anche se la ricerca scientifica ha già validato l'efficacia dell'acido propionico e dei propionati nel controllare la crescita fungina e nel bloccare la produzione di aflatossine, le dosi di applicazione consigliate sono piuttosto variabili e non sempre riescono a garantire un'inibizione sufficiente. Risulta dunque fondamentale stabilire dei dosaggi sicuri in funzione

del contenuto di umidità del mais stoccato. In quest'ottica, si è scelto di testare l'efficacia di due diversi dosaggi (2 g/kg e 4 g/kg) nel prevenire il deperimento del cereale nell'arco di 25 giorni. Durante questo periodo, i campioni sono stati analizzati ad intervalli regolari per l'aflatossina e per i parametri microbiologici (CBT e CMT) per cercare di rispondere alla seguente domanda: esiste una relazione dose-risposta lineare oppure al di sopra di una certa soglia l'incremento di conservante non dà benefici aggiuntivi? Questa informazione è molto importante per definire il dosaggio minimo efficace e ottimizzare l'impiego della risorsa.

La quantificazione di CBT e CMT è stata fondamentale per identificare il deterioramento, che non è rilevabile con la sola analisi delle aflatossine. Infatti, anche quando il conservante è in grado di inibire la produzione di AFB₁, non è necessariamente efficace nel preservare la stabilità microbiologica del cereale. Per questo motivo, diventa cruciale definire la finestra temporale di protezione offerta dal conservante, ossia il numero di giorni che trascorrono prima che si osservi un incremento dei parametri microbiologici. Ancora una volta, questo dato può essere utilizzato per definire il margine di sicurezza che l'azienda dispone prima di dover intervenire con lo smaltimento del prodotto.

Inoltre, eventuali divergenze nell'andamento di CBT e CMT permettono di stabilire se esiste una selettività del conservante, ossia se questo inibisce in modo preferenziale i funghi rispetto ai batteri, o viceversa.

4. Analisi dei dati storici aziendali

4.1 La realtà aziendale: Progeo S.c.a. e il sistema di autocontrollo

Progeo S.c.a. è una società cooperativa agricola che opera nel settore mangimistico su scala nazionale. La natura cooperativa dell'azienda la colloca in un contesto produttivo strettamente legato alle esigenze degli allevatori soci e del territorio. L'azienda si inserisce in un'area vocata alla produzione del Parmigiano Reggiano; pertanto, il controllo della qualità delle materie prime, oltre a garantire la conformità normativa, deve assicurare anche il rispetto degli standard qualitativi richiesti dal Consorzio del Formaggio Parmigiano Reggiano.

In questo contesto, il sistema di autocontrollo aziendale è uno strumento operativo fondamentale, specialmente per la gestione del rischio micotossine, che riguarda in particolare il mais, la principale materia prima impiegata nella produzione dei mangimi. Allo scopo, Progeo dispone di un laboratorio interno dedicato al controllo qualità delle materie prime e del prodotto finito. Affinché una partita di mais possa entrare nell'impianto, deve essere prima sottoposta ad una serie di analisi per verificarne il contenuto di umidità e l'eventuale presenza di aflatossina B₁. Il campionamento avviene attraverso una sonda meccanica a comando remoto, che preleva materiale in più punti del carico trasportato su autotreno. Una volta aperto il cassone, un operatore guida la sonda nelle diverse zone del cumulo, in maniera tale da ottenere un campione il più possibile rappresentativo della partita. Le modalità di campionamento sono conformi a quanto stabilito dal Regolamento (CE) n. 152/2009, come dettagliato nel paragrafo 2.11.4.

Per essere accettata senza subire penalizzazioni o rifiuti, la granella di mais deve avere un livello di umidità massimo del 14%. Di conseguenza, il mais prelevato viene miscelato e poi analizzato mediante GAC (Grain Analysis Computer), uno strumento in grado di quantificare l'umidità del prodotto sfruttandone le proprietà elettriche (*Figura 13*). Poiché l'acqua modifica il comportamento dielettrico del cereale, un chicco più umido reagisce diversamente a un campo elettromagnetico rispetto a uno più secco. Quando si inserisce un campione nel GAC, lo strumento distribuisce il prodotto all'interno di una cella di misura. A quel punto vengono rilevati i parametri elettrici (es. costante dielettrica); questi vengono poi confrontati con curve di calibrazione specifiche a seconda del tipo di cereale, calcolando così la percentuale di umidità. Poiché la temperatura ha una forte influenza sulla misura, il GAC è

dotato anche di un sensore termico che corregge automaticamente il risultato. In alcuni modelli viene considerata anche la densità apparente: infatti, se i chicchi sono molto compatti e pesanti, all'interno della cella ci sarà più massa rispetto a un campione con chicchi spezzati o raggrinziti. Questa differenza modifica la risposta dielettrica letta dallo strumento, pertanto è necessaria una compensazione.



Fig. 13 – Grain Analysis Computer (GAC).

Lo stesso mais viene poi finemente macinato per essere sottoposto all'analisi dell'aflatossina. Allo scopo, viene impiegato il robot ALFA Nano (SafeFood), uno strumento automatico basato sul metodo *lateral flow* su *strip* (Figura 14). La macchina, grazie ad un sensore fotografico (telecamera) inserito al suo interno, scansiona la *strip* inserita per leggerne lo sviluppo analitico. I dati così acquisiti vengono trasformati in valori di concentrazione della tossina grazie ad una curva di calibrazione (specificata per il lotto di *strip* in uso). L'operatore seleziona la calibrazione corretta in base alla tossina da indagare e alla materia prima analizzata. Naturalmente deve essere impiegata una *strip* specifica per la micotossina da ricercare. Il procedimento è il seguente:

1. L'operatore pesa 40 g di campione in un becher dotato di miscelatore e filtro

2. La macchina, in maniera automatizzata, eroga all'interno del becher 200 mL di soluzione AQUA PreMix (un tensioattivo). Successivamente agita per circa 2 minuti e filtra.
3. In modo automatizzato avviene il prelievo di 100 µl dell'estratto e il trasferimento nel pozzetto circolare della *strip*, precedentemente inserita nello strumento con l'imboccatura rivolta verso l'interno. La *strip* rimane quindi posizionata su una superficie piana per 5 minuti, per consentire lo sviluppo del test.
4. A schermo, nello spazio apposito, appare la concentrazione di aflatossina rilevata. Il risultato è accompagnato da un segnale colorato che indica se la concentrazione rilevata supera o meno un certo limite imposto dall'operatore. Il segnale diventa verde se la concentrazione resta sotto il limite massimo inserito nello strumento, diventa rosso se la concentrazione supera tale limite.

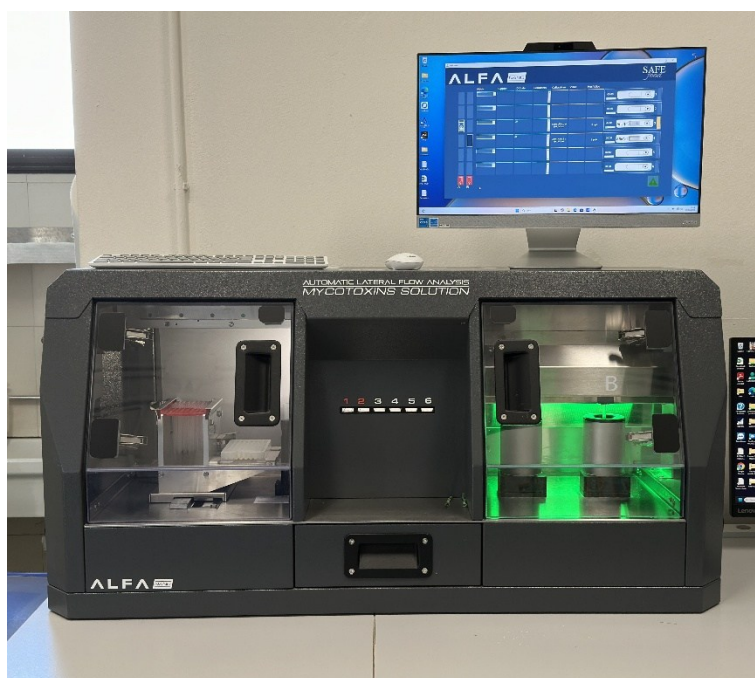


Fig. 14 – Robot ALFA Nano (SafeFood) per la ricerca delle micotossine con metodo lateral flow.

Le *strip* utilizzate per la ricerca delle aflatossine totali (B₁, B₂, G₁ e G₂), sfruttando la specificità di anticorpi monoclonali, consentono di quantificare la tossina a livelli compresi tra 2 ppb e 40 ppb. In *Tabella 11* sono riportati i limiti analitici (LOD e LOQ). Il meccanismo è il seguente (*Figura 15*): quando il campione viene gocciolato sulla *strip*, il liquido scorre per capillarità lungo il supporto. Nel tratto iniziale sono presenti anticorpi marcati che

riconoscono le aflatossine. Se il campione è privo di aflatossine, questi anticorpi rimangono liberi e poi vengono catturati nella linea di test da un complesso fissato sulla striscia, formato da aflatossina legata ad una proteina. In questo caso la linea di test appare scura. Più avanti, gli anticorpi in eccesso vengono comunque catturati dalla linea di controllo tramite un anticorpo anti-anticorpo, che serve a confermare che il test ha funzionato. Se invece nel campione sono presenti aflatossine, queste si legano subito agli anticorpi marcati. Di conseguenza, quando il complesso anticorpo-tossina raggiunge la linea di test non può legarsi, e quindi quest'ultima risulta debole o assente. La linea di controllo, invece, compare comunque perché contiene un anticorpo che riconosce direttamente gli anticorpi marcati, anche se legati all'aflatossina. Essendo un test competitivo, il segnale della linea di test è inversamente proporzionale alla quantità di aflatossina nel campione.

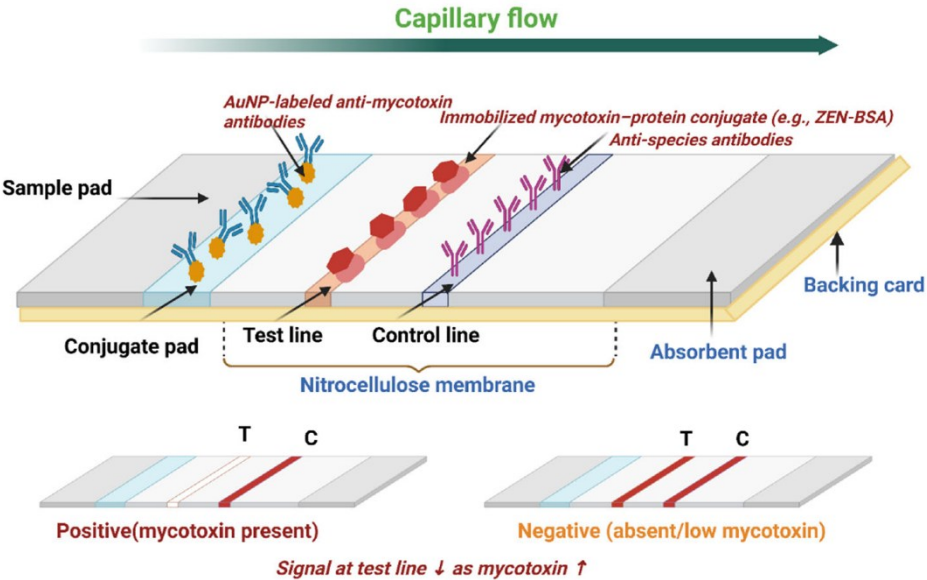


Fig. 15 – Schema di un test immunocromatografico a flusso laterale (LFA) competitivo per l'analisi delle micotossine (Fonte: Thenuwara et al., 2025).

Tab. 11 – Limiti analitici (Aflatossina B₁)

Parametro	Valore
LOD (limite di rilevabilità)	1 ppb
LOQ (limite di quantificazione)	2 ppb

Per quanto riguarda l'incertezza di misura, il risultato finale viene espresso come:

ppb finale = risultato (ppb) $\pm$ U

Dove U è calcolata come $U = 2\sigma$ (deviazione standard moltiplicata per un fattore di copertura 2), che garantisce un livello di fiducia di circa il 95%. In pratica, in fase di validazione del metodo, si eseguono più analisi sullo stesso campione (fino a 5) e si calcolano media e deviazione standard, da cui si ottiene il valore dell'incertezza U (pari a $\pm 1,2$ ppb). Poi nei campioni di routine, per i quali il Robot fornisce un risultato singolo, si applica l'U già validata ($\pm 1,2$).

La soglia d'attenzione per le aflatossine (oltre la quale il robot indica un segnale rosso) è fissata internamente a 2 ppb. Questo valore è un limite critico definito a livello aziendale per gestire strategicamente i flussi di prodotto in base alla loro qualità. Quando un'analisi restituisce un valore superiore a questa soglia, la partita viene nuovamente campionata per definire con precisione il livello di contaminazione. Questo parametro serve infatti a indirizzare il cereale verso celle di stoccaggio diverse a seconda della destinazione d'uso. Il mais con il minor livello di contaminazione viene riservato per le celle dedicate alla produzione di mangimi per bovine da latte, mentre partite più contaminate (ma pur sempre al di sotto del limite di legge di 20 ppb) vengono destinate alla produzione di mangimi di altre specie (es. suini e avicoli). Ovviamente le partite di mais che non rispettano i criteri minimi per la commercializzazione vengono immediatamente respinte.

Il sistema di autocontrollo di Progeo prosegue anche durante la produzione del mangime, dopo che il cereale è stato accettato e stoccato. In particolare, le celle di dosaggio che alimentano il mais al processo produttivo, vengono campionate tre volte al giorno (al mattino, al pomeriggio e alla sera) man mano che il materiale in esse contenuto viene consumato. Ciò consente di monitorare in continuo la qualità della materia prima utilizzata nella formulazione del mangime. In questo modo, vengono intercettate eventuali contaminazioni sfuggite al controllo in accettazione.

Il terzo livello di controllo riguarda il prodotto finito, il mangime, che viene analizzato per l'aflatossina B₁ e per le altre micotossine. Come discusso nel paragrafo 2.11.2, i valori massimi consentiti di AFB₁ variano a seconda della specie animale. Per i mangimi destinati a vacche da latte della filiera del Parmigiano Reggiano, il limite adottato è di 3 ppb.

Il *lateral flow* su *strip* è quindi il metodo analitico utilizzato in fase di accettazione, grazie alla sua rapidità d'esecuzione. Qualora però il risultato sia dubbio e/o particolarmente elevato da richiedere una maggiore precisione, si ricorre al metodo ELISA, che offre una quantificazione più affidabile. Lo stesso metodo viene anche utilizzato sistematicamente anche per l'analisi del prodotto finito.

4.2 Metodologia di estrazione ed elaborazione dei dati

I dati utilizzati per l'analisi statistica provengono dal gestionale aziendale NAV, il sistema informatico attraverso cui Progeo registra tutte le attività legate al controllo qualità delle materie prime. Per ogni campione analizzato, il sistema riporta la data di analisi, il metodo di analisi, il valore di aflatoossina espresso in ppb, la tipologia di mais (categoria merceologica) e il numero seriale dell'ordine di controllo qualità (OCQ), che identifica in maniera univoca la partita di mais. Per quanto riguarda le analisi del mais già stoccato, viene riportata la cella di dosaggio di provenienza. Per i mangimi, oltre alle suddette informazioni, si aggiunge la tipologia di formulazione analizzata.

Inizialmente i dati estratti includevano, oltre a quelli del mais in accettazione, anche quelli relativi alle celle di dosaggio e al prodotto finito. Tuttavia, in seguito si è deciso di escludere queste ultime due categorie perché non permettono di valutare un eventuale andamento stagionale dell'aflatoossina. Entrambe, infatti, risentono della selezione effettuata in ingresso, che elimina i lotti più contaminati. Nei mangimi, a questo fattore, si aggiunge la variabilità della formulazione, che può mitigare o incrementare il livello di tossina in seguito alla miscelazione con altri ingredienti.

Per quanto riguarda le variabili, sono state estratte solo quelle essenziali: il valore di AFB₁, la data e il numero OCQ associato. Quest'ultimo, anche se non è utile alle elaborazioni statistiche, consente di risalire al dato originale qualora risulti necessaria una sua verifica. Tutti i valori di AFB₁ estratti sono stati determinati con metodo *lateral flow*, come descritto nel paragrafo 4.1. Poiché l'obiettivo dello studio era individuare tendenze stagionali nel valore di AFB₁ a prescindere dall'origine del cereale, le informazioni relative alla tipologia di mais non sono state incluse nell'estrazione per evitare di frammentare eccessivamente il campione.

Tramite Power BI, strumento di business intelligence, è stato interrogato il database del gestionale. Da qui, i dati sono stati trasferiti manualmente su Microsoft Excel per le successive elaborazioni. Per alcuni test statistici più complessi è stato utilizzato il software JASP. Prima di procedere con le analisi, era però necessaria una prima fase di pulizia del dataset, per verificare la coerenza delle informazioni. Innanzitutto, sono stati rimossi i dati mancanti o non numerici, spesso frutto di analisi nulle. Questi elementi, se non rimossi, avrebbero potuto introdurre distorsioni nei calcoli. Dopodiché, sono stati corretti alcuni errori di formattazione. In particolare, in alcuni valori il separatore decimale era indicato con il punto anziché con la virgola. Questa difformità avrebbe impedito il corretto riconoscimento del dato come valore numerico da parte del software, compromettendo le elaborazioni successive.

Nel dataset erano presenti anche valori inferiori al LOD del metodo *lateral flow* (1 ppb), poiché durante l'analisi il software del robot ALFA Nano genera sempre un valore numerico attraverso un'estrapolazione matematica basata sulla curva di calibrazione. Sebbene questi valori debbano essere considerati stime puramente indicative, si è scelto di mantenerli grezzi per non perdere l'informazione sulla tendenza dei campioni a concentrazioni prossime allo zero.

Il periodo considerato copre le tre annate consecutive antecedenti all'avvio del progetto di tirocinio, cioè 36 mesi. L'intervallo temporale è stato scelto in maniera tale da disporre di un campione abbastanza ampio da consentire il confronto tra anni diversi e l'identificazione di eventuali tendenze stagionali. Come anticipato, i lotti analizzati provengono da fornitori diversi e dunque sono eterogenei per zona d'origine, clima e tecniche agronomiche. Si tratta di una variabilità inevitabile, intrinseca al sistema di approvvigionamento aziendale. Tuttavia, analizzando una grande quantità di dati, eventuali trend emergono comunque dal rumore di fondo.

Terminata la fase di pulizia, i dati sono stati suddivisi per mese e per anno di riferimento, oltre che per stagione (su base trimestrale). La suddivisione stagionale è la seguente: l'autunno include i mesi di ottobre, novembre e dicembre; l'inverno gennaio, febbraio e marzo; la primavera aprile, maggio e giugno; l'estate luglio, agosto e settembre. Dopodiché è stata condotta un'analisi esplorativa: per ogni mese/stagione/anno sono stati calcolati il valore medio e mediano di AFB₁, la relativa deviazione standard, il valore minimo e il valore massimo. Inoltre sono stati creati dei *box plot* su base annuale e uno su base triennale, in

modo tale da visualizzare graficamente l'andamento generale e la dispersione dei dati di ciascun periodo. In seguito, per tutti i mesi dei tre anni sono state conteggiate le analisi che superavano determinate soglie di concentrazione, fissate a 2, 3, 5 e 10 ppb. Da qui, sono stati definiti gli intervalli di concentrazione, ossia quante analisi rientrassero tra 2 e 3 ppb, tra 3 e 5 ppb, tra 5 e 10 ppb e oltre 10 ppb. Poi sono state calcolate le relative percentuali sul totale delle analisi di quel mese e sono state messe a grafico in funzione del tempo. Lo stesso è stato fatto su base stagionale.

Come si vedrà, i valori analizzati mostrano una marcata asimmetria verso destra (molti valori bassi, pochi picchi elevati). Questo è un problema, perché i test parametrici (come il t-test e l'ANOVA) assumono normalità della distribuzione. Pertanto, prima di procedere con le elaborazioni statistiche è stata applicata una trasformazione logaritmica ai dati mediante la formula $\log_{10}(x+1)$. Tale operazione permette di ottenere una distribuzione molto più vicina alla normale.

4.3 Analisi statistica dei dati storici

4.3.1 Statistica descrittiva e visualizzazione grafica

In *Tabella 12* sono riportati i principali indicatori descrittivi dei valori di AFB₁ rilevati sul mais in fase di accettazione, calcolati su base mensile, stagionale e annuale per il triennio considerato (ottobre 2022 – settembre 2025).

Tab. 12 – Analisi esplorativa (valori espressi in ppb)

Periodo	Media	Mediana	SD	Min	Max
ott-22	2,512	0,3	4,999	0	19,6
nov-22	1,360	0,2	3,321	0	19
dic-22	1,421	0,4	3,205	0	19,2
gen-23	1,635	0,2	3,656	0,01	19
feb-23	1,105	0,2	2,597	0	19,2
mar-23	1,169	0,2	3,038	0	19
apr-23	1,380	0,2	3,403	0	19,9
mag-23	0,637	0,2	1,940	0,01	19
giu-23	1,014	0,2	3,021	0,1	19,27
lug-23	0,350	0,2	0,785	0,05	7

Periodo	Media	Mediana	SD	Min	Max
ago-23	0,866	0,3	2,315	0	19
set-23	1,467	0,2	3,648	0	19,4
ott-23	1,658	0,3	3,785	0,1	19,5
nov-23	1,580	0,3	3,847	0,1	19,6
dic-23	1,956	0,3	4,097	0	19,24
gen-24	1,552	0,3	3,522	0,1	19,3
feb-24	1,548	0,3	3,787	0,05	19,6
mar-24	1,311	0,4	3,228	0	19,3
apr-24	0,811	0,3	1,813	0,1	13
mag-24	0,986	0,3	2,838	0,1	19,7
giu-24	0,887	0,3	2,431	0	19
lug-24	1,199	0,2	3,021	0	18,8
ago-24	0,648	0,2	1,794	0	19
set-24	1,683	0,2	3,947	0	19,3
ott-24	1,950	0,4	4,484	0,1	19,8
nov-24	0,878	0,2	2,377	0,1	19,3
dic-24	0,848	0,2	2,548	0,1	19,27
gen-25	1,217	0,2	3,468	0	19,6
feb-25	0,704	0,3	1,616	0,05	19
mar-25	1,458	0,3	3,648	0,1	19,5
apr-25	1,658	0,7	3,052	0,1	19,26
mag-25	1,919	0,6	3,445	0,2	19,8
giu-25	2,195	0,4	4,519	0,1	19,6
lug-25	1,603	0,3	3,433	0,2	19,8
ago-25	1,791	0,4	3,633	0,2	19,39
set-25	3,419	0,8	5,371	0,1	19,8
Autunno 2022	1,766	0,29	3,976	0,02	19,6
Inverno 2023	1,348	0,2	3,204	0,01	19,2
Primavera 2023	0,995	0,2	2,829	0,01	19,9
Estate 2023	0,931	0,2	2,620	0,01	19,4
Autunno 2023	1,720	0,3	3,901	0,1	19,6
Inverno 2024	1,469	0,3	3,499	0,05	19,6
Primavera 2024	0,915	0,3	2,501	0,1	19,7
Estate 2024	1,131	0,2	2,960	0,05	19,3
Autunno 2024	1,228	0,3	3,158	0,1	19,8
Inverno 2025	1,084	0,3	2,964	0,05	19,6
Primavera 2025	1,929	0,6	3,746	0,1	19,8
Estate 2025	2,372	0,5	4,425	0,1	19,8

Periodo	Media	Mediana	SD	Min	Max
Anno 22-23	1,301	0,2	3,276	0,01	19,9
Anno 23-24	1,317	0,3	3,283	0,05	19,7
Anno 24-25	1,643	0,4	3,644	0,05	19,8
Triennio	1,427	0,3	3,416	0,01	19,9

I campioni analizzati sono in totale 8984, di cui 3073 appartenenti all'annata 2022-2023, 2735 al 2023-2024 e 3176 al 2024-2025. Osservando la tabella, emerge in tutti i periodi analizzati una marcata differenza tra media e mediana, con quest'ultima sistematicamente più bassa. Ad esempio, a settembre 2025 la media è pari a 3,419 ppb, mentre la mediana è di 0,8 ppb; allo stesso modo, in ottobre 2022 la media raggiunge 2,512 ppb contro una mediana di 0,3 ppb. Questo scarto indica che la distribuzione è fortemente asimmetrica verso destra: la maggior parte delle partite ha una concentrazione di AFB₁ molto bassa (vicina allo zero); tuttavia, la presenza di pochi carichi molto contaminati sposta significativamente la media verso l'alto. Una situazione di questo tipo è tipica dei dati relativi alle micotossine, che tendono a seguire distribuzioni log-normali. I valori di deviazione standard risultano spesso simili o addirittura superiori alla media, a conferma di questa variabilità. Ad ottobre 2022, ad esempio, la media è di 2,512 ppb e la deviazione standard di 4,999 ppb; a settembre 2025 la media è di 3,419 ppb e la deviazione standard di 5,371 ppb.

In quasi tutti i mesi del triennio (inclusi quelli caratterizzati da medie contenute), il valore massimo si avvicina al limite di legge di 20 ppb. Le uniche eccezioni sono luglio 2023, con un massimo di 7 ppb, e aprile 2024, con un massimo di 13 ppb. Ciò significa che, indipendentemente dal periodo dell'anno, è sempre possibile ricevere partite di mais fortemente contaminate. Non ci sono dunque stagioni prive di casi critici.

Osservando l'andamento mensile, nel primo anno (ottobre 2022 – settembre 2023) ottobre 2022 è il mese con la media più alta dell'annata (2,512 ppb). Nei mesi successivi i valori medi diminuiscono progressivamente. In particolare, le medie di novembre e dicembre 2022 sono rispettivamente di 1,360 e 1,421 ppb; poi a gennaio e febbraio 2023 si ha un ulteriore calo. I valori medi più bassi dell'annata si registrano durante la primavera e l'estate 2023. Il minimo del triennio si verifica a luglio 2023 (0,350 ppb).

Nel secondo anno (ottobre 2023 – settembre 2024) l'andamento mensile è più regolare e non ci sono picchi particolarmente evidenti. Le medie oscillano infatti in un intervallo piuttosto ristretto. I valori più alti vengono raggiunti a dicembre 2023 (1,956 ppb), a settembre 2024 (1,683 ppb) e a ottobre 2023 (1,658 ppb). Tuttavia, la deviazione standard è sempre piuttosto elevata (4,097 ppb a dicembre) e indica anche in questo caso una forte dispersione dei dati.

Nel terzo anno (ottobre 2024 – settembre 2025) si osserva invece una situazione diversa rispetto ai due anni precedenti: settembre 2025 è il mese con la media più alta del triennio (3,419 ppb); anche maggio e giugno 2025 mostrano valori superiori alla media del triennio, con medie rispettivamente di 1,919 e 2,195 ppb. Degno di nota è pure ottobre 2024 (1,950 ppb).

Dal punto di vista stagionale, nel primo anno si osserva un andamento decrescente: l'autunno 2022 ha la media più elevata (1,766 ppb), seguito dall'inverno 2023 (1,348 ppb), dalla primavera 2023 (0,995 ppb) e infine dall'estate 2023 (0,931 ppb). L'andamento è simile anche nel secondo anno: l'autunno 2023 è la stagione con la media più alta (1,720 ppb), seguito dall'inverno 2024 (1,469 ppb), mentre primavera ed estate 2024 hanno valori più bassi e abbastanza simili tra di loro (0,915 e 1,131 ppb).

Nel terzo anno, invece, lo schema cambia: è l'estate 2025 ad avere la media più alta dell'anno (e del triennio), con 2,372 ppb. Segue poi la primavera 2025 con 1,929 ppb. Autunno 2024 (1,228 ppb) e inverno 2025 (1,084 ppb) rimangono invece sotto la media complessiva del triennio, contrariamente a quanto succede nei primi due anni.

Se consideriamo l'andamento complessivo dei tre anni, il primo e il secondo hanno medie quasi identiche: 1,301 ppb nel 2022-2023 e 1,317 ppb nel 2023-2024. Il terzo anno (2024-2025) presenta invece una media più elevata (1,643 ppb). La media complessiva dell'intero triennio è di 1,427 ppb.

Per rappresentare graficamente la distribuzione dei valori di AFB₁ e la loro variabilità nei diversi periodi, sono stati realizzati quattro *box plot*: uno relativo all'andamento stagionale dei tre anni e tre relativi all'andamento mensile all'interno della singola annata. Vista l'ampia dispersione dei dati, nei quattro grafici l'asse y è rappresentato in scala logaritmica. Le medie aritmetiche (calcolate sui dati reali) sono indicate all'interno di ciascun *box plot* con il

simbolo ×. Per migliorare la leggibilità, gli *outlier* non sono stati visualizzati all'interno dei grafici.

Il grafico riportato in *Figura 16* mostra l'andamento stagionale complessivo del triennio, mentre nelle *Figure 17, 18 e 19* sono rappresentate rispettivamente le annate 2022-2023, 2023-2024 e 2024-2025.

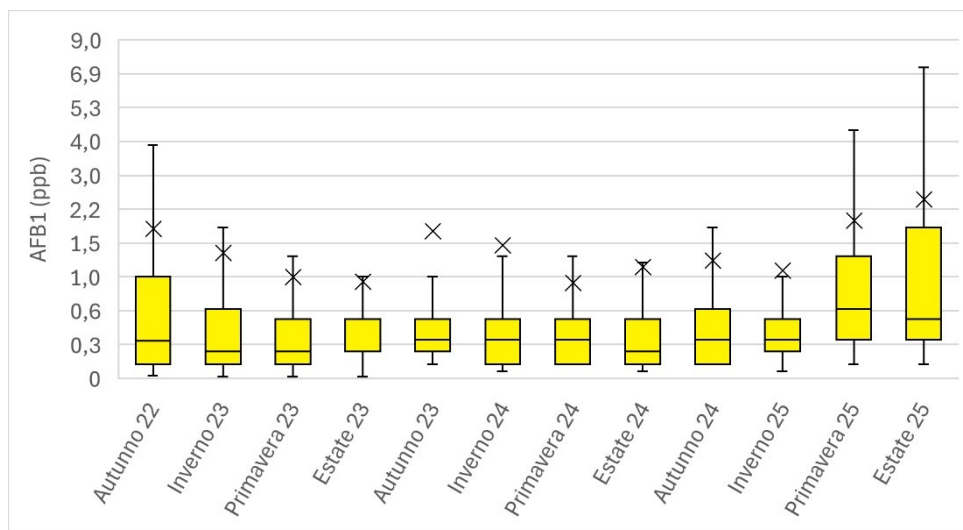


Fig. 16 – Andamento dei valori di AFB₁ su base stagionale. L'asse y è in scala logaritmica. La × rappresenta la media aritmetica dei valori per ciascun periodo. Dati relativi al triennio.

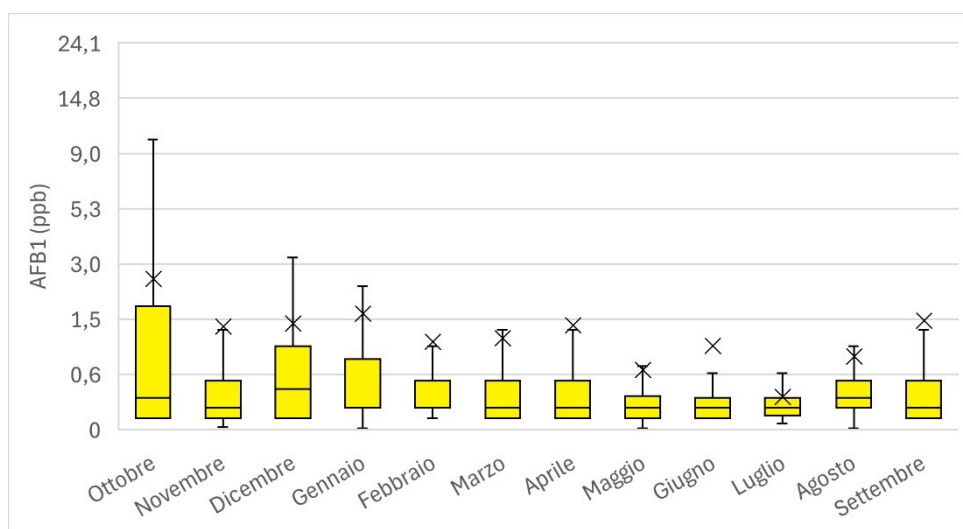


Fig. 17 – Andamento annuale dei valori di AFB₁ su base mensile. L'asse y è in scala logaritmica. La × rappresenta la media aritmetica dei valori per ciascun periodo. Dati relativi all'annata 2022-2023.

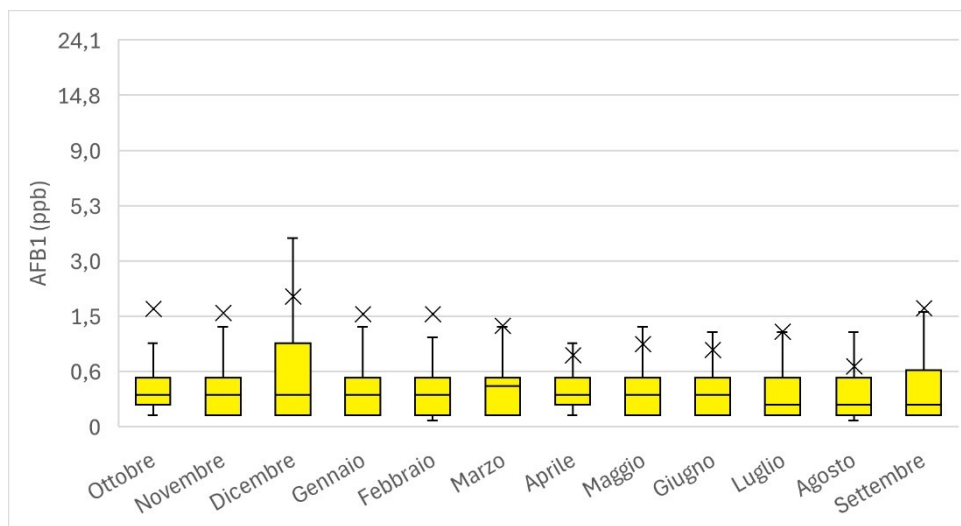


Fig. 18 – Andamento annuale dei valori di AFB₁ su base mensile. L'asse y è in scala logaritmica. La x rappresenta la media aritmetica dei valori per ciascun periodo. Dati relativi all'annata 2023-2024.

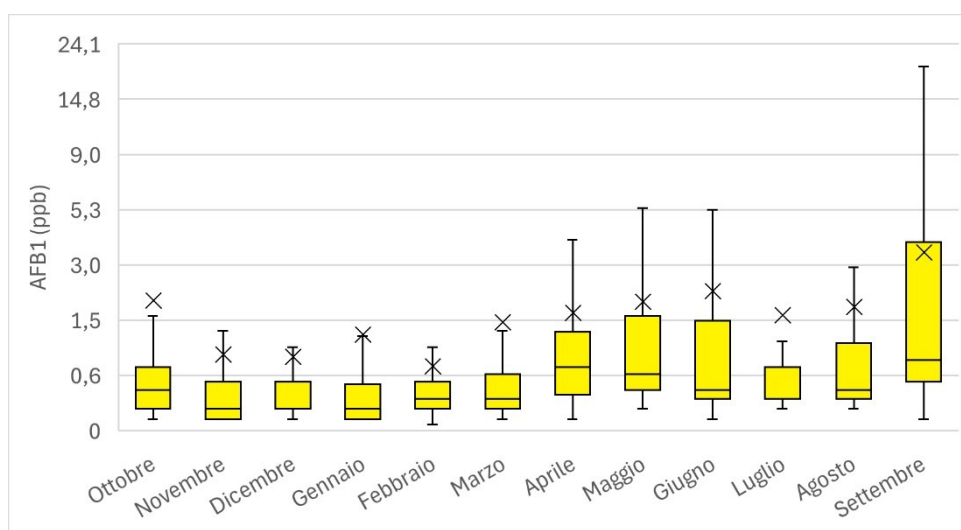


Fig. 19 – Andamento annuale dei valori di AFB₁ su base mensile. L'asse y è in scala logaritmica. La x rappresenta la media aritmetica dei valori per ciascun periodo. Dati relativi all'annata 2024-2025.

Il *box plot* stagionale presenta una scala dell'asse y diversa da quella dei grafici mensili. In particolare, nel grafico stagionale l'asse arriva a 9 ppb, mentre negli altri raggiunge 24,1 ppb. Questa differenza dipende dal metodo con cui vengono calcolati i baffi del *box plot*. Nei grafici mensili, un mese con molte analisi ad alta concentrazione può avere un terzo quartile (Q3) elevato e un intervallo interquartile (IQR) ampio. Ciò permette al baffo superiore di estendersi fino a valori vicini a 20 ppb. Nel grafico stagionale, invece, l'aggregazione di mesi con livelli di contaminazione diversi tende a comprimere la distribuzione verso il basso. Questo riduce Q3 e IQR e, di conseguenza, molti valori elevati vengono classificati come *outlier* (che non vengono mostrati nel grafico). Forzare la scala del grafico stagionale fino a 24,1 ppb avrebbe creato molto spazio vuoto, e avrebbe reso meno leggibili le differenze tra le stagioni senza aggiungere alcuna informazione. Pertanto, è stata utilizzata una scala più adatta alla distribuzione dei dati, e si rimanda alla *Tabella 12* per la verifica dei valori massimi effettivi registrati in ciascun periodo. L'elevata presenza di *outlier* spiega anche come mai in alcuni mesi/stagioni (autunno 2023 in particolare) si osservi una compressione verso il basso della scatola e del baffo superiore, accompagnata da una $\times$ della media decisamente spostata verso l'alto. Infatti, gli *outlier* non vengono considerati nella costruzione dei *box plot*, mentre entrano a far parte della media.

In tutti i *box plot* la mediana è nettamente più bassa rispetto alla media ($\times$), inoltre le scatole si concentrano nella parte inferiore dell'asse. Questo conferma visivamente la forte asimmetria già evidenziata dall'analisi numerica: i valori più elevati sono da attribuire a poche partite fortemente contaminate, piuttosto che ad una contaminazione diffusa. A riprova di ciò, si può notare come sia nel grafico relativo al triennio (estate 2023), sia in quelli relativi alle singole annate (gennaio 2023, febbraio 2023, dicembre 2024 e luglio 2025) vi siano scatole apparentemente prive della linea della mediana. In realtà questa è presente, ma non è visibile perché coincide con il limite inferiore della stessa, cioè con il primo quartile (Q1). Dal punto di vista statistico, questa sovrapposizione indica che almeno il 50% delle osservazioni registrate nel periodo presenta valori di AFB₁ molto bassi, quasi nulli.

Nel grafico relativo all'annata 2022-2023, ottobre risulta il mese più critico: il box è ampio, il baffo superiore supera i 9 ppb e la media ($\times$) è la più alta dell'annata. Il 2023-2024 è invece l'annata più uniforme, infatti i box sono tutti molto compressi e non appaiono grandi differenze tra i mesi, ad eccezione di una lieve elevazione in dicembre. Nell'annata 2024-2025, spicca il mese di settembre, che presenta un box ampio, posizionato nella parte alta dell'asse, con il baffo superiore che arriva quasi a 20 ppb. La media ($\times$) di settembre si

conferma la più elevata del triennio. Anche maggio e giugno 2025 presentano box leggermente più alti rispetto agli stessi mesi degli anni precedenti.

Nel grafico stagionale, le stagioni delle prime due annate mostrano box perlopiù compressi nella parte bassa dell'asse, eccetto l'autunno 2022. L'estate 2025 si distingue dal resto del triennio per il box ampio e spostato verso l'alto, con il baffo superiore che arriva intorno a 7 ppb. Anche la primavera 2025 mostra un aumento rispetto alle primavere precedenti.

4.3.2 t-test

Come anticipato nel paragrafo 4.2, prima di procedere con i test statistici i dati di AFB₁ sono stati log-trasformati tramite la formula $\log_{10}(x+1)$. Dunque tutte le seguenti elaborazioni sono state eseguite sui valori trasformati.

Il primo test utilizzato è stato il t di Student a due code, volto a verificare se la media di ciascun mese differisse in modo statisticamente significativo dalla media complessiva della relativa annata. La statistica t è stata ottenuta mediante la formula del t-test a un campione, che confronta la media di un singolo campione ($\bar{x}$) con la media della popolazione di riferimento (μ):

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s / \sqrt{n}}$$

Dove:

- $\bar{x}$ = media del campione
- μ = media della popolazione di riferimento
- s = deviazione standard del campione
- n = numerosità del campione

I gradi di libertà (df), pari a $n - 1$, permettono di ricavare il valore critico (t_{crit}) e il *p-value*.

Il valore assoluto del parametro t così calcolato viene confrontato con il valore critico t_{crit} per un test a due code, con livello di significatività $\alpha = 0,05$. Se $|t| > t_{crit}$ l'ipotesi nulla viene rifiutata: la differenza tra i valori confrontati risulta dunque statisticamente significativa e non imputabile al solo errore casuale.

Il segno del valore t indica la direzione della differenza tra la media del campione ($\bar{x}$) e la media della popolazione di riferimento (μ).

Se $t > 0$, allora $\bar{x} > \mu$.

Se $t < 0$, allora $\bar{x} < \mu$.

t è uguale a 0 solo se $\bar{x} = \mu$.

In un t-test singolo, con $\alpha = 0,05$, si accetta un 5% di probabilità di dichiarare significativa una differenza che in realtà non esiste. Tuttavia, poiché ogni annata comprende 12 confronti indipendenti, la probabilità complessiva di avere almeno un falso positivo cresce secondo la formula:

$$P = 1 - (1 - \alpha)^m$$

dove m è il numero di confronti indipendenti.

È stata dunque applicata la correzione di Bonferroni, per garantire che il rischio totale resti al di sotto di α . Per fare ciò, il livello di significatività deve essere diviso per il numero di confronti indipendenti: in questo caso $\alpha = 0,05/12 \simeq 0,0041$. Riducendo α , il valore critico (t_{crit}) aumenta; di conseguenza, il criterio di rifiuto dell'ipotesi nulla diventa più restrittivo.

In parallelo è stata applicata anche la correzione FDR di Benjamini-Hochberg, meno conservativa rispetto a Bonferroni. Il procedimento prevede il calcolo dei *p-value* per ogni confronto indipendente, i quali vengono poi ordinati in senso crescente. A ciascun *p-value* viene quindi assegnato un rango (k): $k = 1$ al valore più piccolo, $k = 2$ al secondo e così via. Infine, per ogni test viene determinata una soglia FDR tramite la formula:

$$\text{Soglia} = \frac{k}{m} \times \alpha$$

dove m è il numero di confronti indipendenti (in questo caso 12) e $\alpha = 0,05$.

La differenza tra i valori confrontati risulta statisticamente significativa quando il *p-value* risulta inferiore alla soglia associata al rango corrispondente.

La presenza di due soglie consente una lettura su due livelli. I mesi che superano Bonferroni possono essere considerati robustamente significativi, mentre quelli significativi solo con FDR rappresentano segnali più deboli ma comunque significativi. I risultati sono riportati in *Tabella 13*.

Tab. 13 – Risultati t-test mesi vs anno con correzioni per confronti multipli (Bonferroni/FDR)

Periodo	t	t_{crit} (α = 0,05)	t_{crit} Bonferroni (α = 0,0041)	p-value	Soglia FDR
ott-22	4,432	1,968	2,893	$1,32 \times 10^{-5}$	0,013
nov-22	0,338	1,967	2,890	0,736	0,050
dic-22	1,642	1,971	2,901	0,102	0,029
gen-23	2,563	1,966	2,888	0,011	0,021
feb-23	-0,537	1,969	2,895	0,592	0,042
mar-23	-0,539	1,970	2,898	0,590	0,038
apr-23	0,387	1,969	2,897	0,699	0,046
mag-23	-6,329	1,968	2,894	$9,54 \times 10^{-10}$	0,008
giu-23	-2,527	1,971	2,902	0,012	0,025
lug-23	-10,825	1,978	2,920	$4,79 \times 10^{-20}$	0,004
ago-23	-2,655	1,969	2,897	0,008	0,017
set-23	0,631	1,973	2,908	0,529	0,033
ott-23	1,497	1,971	2,900	0,136	0,025
nov-23	0,677	1,970	2,899	0,499	0,038
dic-23	2,436	1,972	2,904	0,016	0,017
gen-24	1,305	1,968	2,892	0,193	0,029
feb-24	0,664	1,971	2,900	0,507	0,042
mar-24	0,570	1,969	2,894	0,569	0,050
apr-24	-2,088	1,974	2,909	0,038	0,021
mag-24	-2,599	1,967	2,890	0,010	0,008
giu-24	-2,434	1,970	2,900	0,016	0,013
lug-24	-0,663	1,973	2,908	0,508	0,046
ago-24	-4,379	1,972	2,905	$1,95 \times 10^{-5}$	0,004
set-24	1,108	1,977	2,919	0,270	0,033
ott-24	0,261	1,969	2,897	0,795	0,050
nov-24	-6,349	1,970	2,899	$1,09 \times 10^{-9}$	0,017
dic-24	-6,711	1,971	2,901	$1,65 \times 10^{-10}$	0,013
gen-25	-4,612	1,968	2,893	$5,95 \times 10^{-6}$	0,021
feb-25	-9,481	1,967	2,890	$4,11 \times 10^{-19}$	0,004
mar-25	-1,947	1,970	2,898	0,053	0,038
apr-25	2,679	1,969	2,896	0,008	0,029
mag-25	3,823	1,970	2,897	$1,67 \times 10^{-4}$	0,025
giu-25	2,439	1,969	2,894	0,015	0,033
lug-25	0,266	1,969	2,897	0,791	0,046
ago-25	1,391	1,971	2,901	0,166	0,042
set-25	8,318	1,968	2,892	$2,98 \times 10^{-15}$	0,008

Nell'annata 2022-2023 ottobre è l'unico mese che si discosta positivamente dalla media annuale in modo robusto. Il suo valore t raggiunge 4,43, superando così la soglia Bonferroni e la soglia FDR. Anche gennaio si discosta positivamente ($t=2,56$), ma risulta significativo soltanto con FDR. Al contrario, luglio e maggio sono i mesi più nettamente al di sotto della media annuale. Luglio presenta $t=-10,83$ e maggio $t=-6,33$, entrambi superano la soglia Bonferroni con ampio margine. Giugno ($t=-2,53$) e agosto ($t=-2,66$) risultano significativi solo con FDR.

L'annata 2023-2024 è più uniforme, come già osservato nei *box plot*. L'unico mese che supera la correzione di Bonferroni è agosto ($t=-4,38$), che conferma la tendenza negativa dell'annata precedente. Dicembre è l'unico mese positivamente significativo, ma solo con FDR ($t=2,44$). Aprile ($t=-2,09$), maggio ($t=-2,60$) e giugno ($t=-2,43$) superano il t critico non corretto, ma non raggiungono né la soglia Bonferroni né quella FDR.

L'annata 2024-2025 è quella con il maggior numero di mesi statisticamente significativi. Tra i valori negativi vi è febbraio ($t=-9,48$), seguito da dicembre ($t=-6,71$), novembre ($t=-6,35$) e gennaio ($t=-4,61$). Tutti e quattro superano la soglia Bonferroni. In questa annata, dunque, i mesi autunno-invernali si collocano sotto la media annuale. Settembre invece presenta il valore t positivo più elevato ($t=8,32$), e supera abbondantemente Bonferroni. Anche maggio ($t=3,82$) risulta significativamente sopra la media con entrambe le soglie. Aprile ($t=2,68$) e giugno ($t=2,44$) sono significativi solo con FDR. Ottobre e luglio, non raggiungono la significatività.

Se si confrontano i tre anni si può notare come agosto presenti valori t negativi in tutte le annate, anche se risulta significativo solo nel 2022-2023 (con FDR) e nel 2023-2024 (anche con Bonferroni). Anche luglio ha sempre segno negativo, che però è significativo solo nel 2022-2023. Settembre non si discosta significativamente dalla media annuale nelle prime due annate; tuttavia, nel 2024-2025 raggiunge il valore t positivo più elevato del triennio ($t=8,32$). Dunque in questo caso si osserva un comportamento diverso rispetto agli anni precedenti.

Lo stesso t -test a due code è stato ripetuto per confrontare la media di ciascuna stagione con la media annuale. In questo caso la correzione di Bonferroni è meno severa dato che i confronti indipendenti sono solo 4, dunque $\alpha = 0,05/4 \simeq 0,0125$. Allo stesso modo, anche la soglia FDR è stata ricalcolata con $m = 4$, ossia: Soglia = $(k/4) \times 0,05$. I risultati sono riportati in *Tabella 14*.

Tab. 14 – Risultati t-test stagioni vs anno con correzioni per confronti multipli

Periodo	t	t _{crit} (α = 0,05)	t _{crit} Bonferroni (α = 0,0125)	p-value	Soglia FDR
Autunno 22	3,944	1,963	2,503	$8,66 \times 10^{-5}$	0,025
Inverno 23	1,290	1,963	2,503	0,197	0,050
Primavera 23	-4,129	1,963	2,504	$4,05 \times 10^{-5}$	0,013
Estate 23	-3,672	1,964	2,506	$2,64 \times 10^{-4}$	0,038
Autunno 23	2,664	1,964	2,505	0,008	0,025
Inverno 24	1,510	1,963	2,503	0,131	0,050
Primavera 24	-4,112	1,963	2,504	$4,36 \times 10^{-5}$	0,013
Estate 24	-1,621	1,965	2,507	0,106	0,038
Autunno 24	-5,851	1,963	2,504	$7,47 \times 10^{-9}$	0,038
Inverno 25	-8,497	1,963	2,503	$8,13 \times 10^{-17}$	0,013
Primavera 25	5,070	1,963	2,503	$4,96 \times 10^{-7}$	0,050
Estate 25	6,594	1,963	2,504	$7,88 \times 10^{-11}$	0,025

Nel 2022-2023 l'autunno si trova sopra la media annuale ($t=3,94$), mentre primavera ($t=-4,13$) ed estate ($t=-3,67$) sono significativamente inferiori alla media. Tutte e quattro superano entrambe le soglie. L'inverno non raggiunge la significatività ($t=1,29$).

Nel 2023-2024 la primavera si discosta negativamente dalla media annuale ed è l'unica stagione a superare Bonferroni ($t=-4,11$). L'autunno risulta significativo soltanto con FDR ($t=2,66$), mentre inverno ($t=1,51$) ed estate ($t=-1,62$) non raggiungono la significatività.

Nell'annata 2024-2025 l'autunno ($t=-5,85$) e l'inverno ($t=-8,50$) risultano significativamente inferiori alla media annuale, mentre primavera ($t=5,07$) ed estate ($t=6,59$) significativamente superiori. Tutte e quattro superano entrambe le soglie. Il valore t dell'inverno è il più basso del triennio, mentre quello dell'estate è il più elevato.

Anche in questo caso, confrontando le annate salta all'occhio il cambio di segno della primavera, che passa da valori significativamente negativi nelle prime due annate ad un valore significativamente positivo nella terza. Anche l'estate segue un pattern simile: nel 2022-2023 è significativamente negativa, nel 2023-2024 non raggiunge la significatività e nel 2024-2025 diventa significativamente positiva. L'inverno si mantiene su valori neutri nelle prime due annate, ma nel 2024-2025 cala ad un valore molto negativo. Inoltre, mentre nelle prime due annate è l'autunno la stagione maggiormente sopra la media annuale, nel 2024-2025 il picco massimo si osserva in estate.

Per approfondire meglio la variabilità stagionale, sono stati eseguiti dei t-test a due code volti a confrontare direttamente le medie delle stagioni tra di loro. Sono state comparate tutte le coppie possibili di stagioni all'interno di ciascuna annata, per un totale di sei combinazioni, ripetendo il processo per tutti e tre gli anni. Diversamente dai t-test precedenti, non è più presente un singolo campione confrontato con un valore di riferimento, ma una coppia di stagioni, ossia due campioni indipendenti con varianze potenzialmente differenti. Per questo motivo, è stata scelta la formula di Welch, che si utilizza quando si vuole confrontare le medie di due gruppi, ma non si può assumere che le due varianze siano uguali. In questo caso, la formula per il calcolo di t diventa:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Dove:

- $\bar{x}_1, \bar{x}_2$: medie campionarie.
- s_1^2, s_2^2 : varianze campionarie.
- n_1, n_2 : dimensioni dei campioni.

La principale differenza rispetto al t-test standard sta nel calcolo dei gradi di libertà (df), che vengono corretti tramite l'equazione di Welch-Satterthwaite. Infatti, poiché non assumiamo che le varianze siano uguali, non possiamo semplicemente sommare i gradi di libertà ($n_1 + n_2 - 2$); dobbiamo invece ponderarli in base alle varianze e alle dimensioni dei due campioni:

$$df = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2 \cdot (n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2 \cdot (n_2 - 1)}\right)}$$

Il segno del valore t dipende esclusivamente da quale gruppo viene sottratto all'altro. Se t è positivo, la media del primo gruppo è maggiore della seconda; se è negativo, è minore. Il segno non altera la significatività statistica perché, anche in questo caso, il test è a due code, dunque si confronta il valore assoluto di t con il corrispondente valore di t_{crit} .

Il livello di significatività scelto è sempre $\alpha = 0,05$; poi corretto tramite Bonferroni, stavolta di un fattore 6: $\alpha = 0,05/6 \approx 0,0083$. La soglia FDR è stata ricalcolata come: $(k/6) \times 0,05$. I risultati dei test a coppie sono riportati in *Tabella 15*.

Tab. 15 – Risultati t-test stagioni a coppie con correzioni per confronti multipli

Gruppo 1	Gruppo 2	t	df	t_{crit} ($\alpha = 0,05$)	t_{crit} Bonferroni ($\alpha = 0,0083$)	p-value	Soglia FDR
Autunno 2022	Inverno 2023	2,158	1698,615	1,961	2,643	0,031	0,042
Autunno 2022	Primavera 2023	5,667	1582,686	1,961	2,643	$1,73 \times 10^{-8}$	0,008
Autunno 2022	Estate 2023	5,387	1418,444	1,962	2,643	$8,40 \times 10^{-8}$	0,017
Inverno 2023	Estate 2023	3,531	1369,474	1,962	2,643	$4,27 \times 10^{-4}$	0,033
Inverno 2023	Primavera 2023	3,784	1639,715	1,961	2,643	$1,60 \times 10^{-4}$	0,025
Primavera 2023	Estate 2023	-0,119	1261,488	1,962	2,644	0,905	0,050
Autunno 2023	Inverno 2024	1,093	1359,668	1,962	2,643	0,275	0,042
Autunno 2023	Primavera 2024	4,496	1169,989	1,962	2,644	$7,61 \times 10^{-6}$	0,008
Autunno 2023	Estate 2024	3,057	1173,695	1,962	2,644	0,002	0,025
Inverno 2024	Estate 2024	2,215	1190,167	1,962	2,644	0,027	0,033
Inverno 2024	Primavera 2024	3,757	1517,445	1,962	2,643	$1,79 \times 10^{-4}$	0,017
Primavera 2024	Estate 2024	-1,091	1000,588	1,962	2,645	0,276	0,050
Autunno 2024	Inverno 2025	0,850	1458,777	1,962	2,643	0,396	0,050
Autunno 2024	Primavera 2025	-7,708	1503,816	1,962	2,643	$2,31 \times 10^{-14}$	0,033
Autunno 2024	Estate 2025	-8,812	1462,897	1,962	2,643	$3,43 \times 10^{-18}$	0,025
Inverno 2025	Estate 2025	-10,237	1405,516	1,962	2,643	$9,01 \times 10^{-24}$	0,008
Inverno 2025	Primavera 2025	-9,230	1545,727	1,962	2,643	$8,64 \times 10^{-20}$	0,017
Primavera 2025	Estate 2025	-1,638	1538,394	1,962	2,643	0,102	0,042

Nell'annata 2022-2023, il confronto Autunno vs Primavera restituisce $t=5,67$, mentre Autunno vs Estate $t=5,39$. Entrambi i valori superano la soglia di Bonferroni. Sono significativi con entrambe le soglie anche i confronti Inverno vs Primavera ($t=3,78$) e Inverno vs Estate ($t=3,53$). Il confronto Autunno vs Inverno produce $t=2,16$, che risulta significativo con FDR ($p\text{-value}=0,031$, soglia al rango $k=5$ pari a $0,042$), ma non con Bonferroni. Tra Primavera ed Estate, invece, non si osservano differenze statisticamente significative ($t=-0,12$, $p\text{-value}=0,905$). Grazie a questi confronti multipli, è possibile classificare le stagioni in base al livello di contaminazione. Nello specifico, questa annata vede al primo posto l'Autunno come la stagione più contaminata, seguito dall'Inverno, infine Primavera ed Estate al terzo posto a pari merito.

Nel 2023-2024 Autunno e Inverno ($t=1,09$, $p\text{-value}=0,275$), così come Primavera ed Estate ($t=-1,09$, $p\text{-value}=0,276$) risultano non significativi con entrambe le soglie. Al contrario, Autunno vs Primavera ($t=4,50$), Inverno vs Primavera ($t=3,76$) e Autunno vs Estate ($t=3,06$) sono tutti significativi e superano la soglia di Bonferroni. Inverno vs Estate ($t=2,22$) è significativo con FDR ($p\text{-value}=0,027$, soglia al rango $k=4$ pari a $0,033$), ma non con Bonferroni. La classifica per questa annata è dunque: 1° Autunno e Inverno a pari merito, 2° Primavera ed Estate a pari merito. In questo caso la struttura a due blocchi è più netta rispetto all'anno precedente: le stagioni fredde si confermano più critiche di quelle calde.

Nel 2024-2025 la struttura a due blocchi si ripresenta, ma con posizioni invertite. Autunno e Inverno sono statisticamente indistinguibili ($t=0,85$, $p\text{-value}=0,396$), così come Primavera ed Estate ($t=-1,64$, $p\text{-value}=0,102$). Tutti i confronti tra i due blocchi risultano invece significativi e superano ampiamente la soglia di Bonferroni. I valori di t sono i più elevati di tutta l'analisi stagionale: Inverno vs Estate produce $t=-10,24$, Inverno vs Primavera $t=-9,23$, Autunno vs Estate $t=-8,81$, Autunno vs Primavera $t=-7,71$. La classifica è dunque: 1° Estate e Primavera, 2° Autunno e Inverno. L'andamento è opposto rispetto alle prime due annate.

Osservando i tre anni nel complesso, si nota che la coppia Primavera-Estate non raggiunge mai la significatività statistica, in nessuna annata. Anche la coppia Autunno-Inverno, non è significativa nel 2023-2024 e nel 2024-2025. Nel 2022-2023 raggiunge la significatività, ma soltanto con FDR. Si può inoltre notare, come già anticipato, la presenza di una struttura a due blocchi: da una parte le stagioni calde (primavera ed estate) dall'altra quelle fredde (autunno e inverno). I due gruppi sono sempre separati tra loro, ma al loro interno sono

omogenei. Ciò che cambia è quale dei due blocchi presenta il livello di contaminazione più elevato: nei primi due anni le stagioni fredde, nel terzo le stagioni calde.

Successivamente è stato applicato un ultimo t-test di Welch a due code, con l'obiettivo di confrontare le medie complessive delle tre annate nelle tre combinazioni possibili. In questo caso la correzione di Bonferroni ha ridotto il livello di significatività a 0,0166 (0,05/3). Invece, la soglia FDR è stata ricalcolata come: $Soglia = (k/3) \times 0,05$. I risultati sono riportati in *Tabella 16*.

Tab. 16 – Risultati t-test annate a coppie con correzioni per confronti multipli

Gruppo 1	Gruppo 2	t	df	t_{crit} ($\alpha = 0,05$)	t_{crit} Bonferroni ($\alpha = 0,0166$)	p-value	Soglia FDR
2022-2023	2023-2024	-0,205	5725,988	1,960	2,396	0,838	0,050
2022-2023	2024-2025	-7,474	6246,575	1,960	2,396	$8,87 \times 10^{-14}$	0,017
2023-2024	2024-2025	-7,049	5838,294	1,960	2,396	$2,00 \times 10^{-12}$	0,033

Il confronto tra l'Anno 2022-2023 e l'Anno 2023-2024 restituisce $t=-0,205$ con $p-value=0,838$, pertanto le due annate sono statisticamente sovrapponibili. Il confronto tra l'Anno 2022-2023 e l'Anno 2024-2025 produce invece $t=-7,47$, valore che supera la soglia di Bonferroni, con $p-value=8,87 \times 10^{-14}$. Anche il confronto tra Anno 2023-2024 e Anno 2024-2025 produce un risultato simile: $t=-7,05$, oltre Bonferroni, con $p-value=2,00 \times 10^{-12}$.

A questo punto è possibile classificare le annate in base al livello di contaminazione: 1° Anno 2024-2025, 2° Anni 2022-2023 e 2023-2024 a pari merito. Da quest'ultima analisi si conferma a livello statistico quanto già osservato nell'analisi esplorativa, nella quale le medie annuali in ppb risultavano pari rispettivamente a 1,301, 1,317 e 1,643.

4.3.3 ANOVA

I t-test multipli hanno mostrato che il pattern stagionale cambia nei tre anni, tuttavia questa è solo un'osservazione descrittiva. Per confermarla formalmente era necessario un test statistico in grado di verificare l'effetto dell'interazione Stagione $\times$ Anno. Pertanto, è stata condotta un'analisi della varianza a due vie ("two-way ANOVA"), che valuta l'effetto della stagione, dell'annata e della loro interazione (cioè il possibile effetto combinato)

nell'influenzare i valori di AFB_1 . L'interazione indica se l'effetto di un fattore cambia al variare dell'altro. A differenza dei t-test precedenti, l'ANOVA valuta gli effetti considerando simultaneamente tutte le osservazioni del triennio.

Dal punto di vista matematico, l'analisi della varianza si basa sulla scomposizione della variabilità osservata nei dati. Ogni valore di AFB_1 può essere visto come la somma della media generale, dell'effetto del fattore Stagione, dell'effetto del fattore Anno, dell'effetto della loro interazione e di una componente residua, cioè della variabilità che non può essere spiegata dal modello.

Il modello può essere scritto così:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

dove:

- Y_{ijk} = valore osservato
- μ = media generale
- A_i = effetto del primo fattore
- B_j = effetto del secondo fattore
- $(AB)_{ij}$ = interazione tra i due fattori
- ε_{ijk} = errore/residuo

Il test cerca di capire quanta parte delle differenze osservate tra i dati dipenda realmente dai fattori studiati e quanta invece sia dovuta alla variabilità casuale.

La variabilità dei dati viene quantificata tramite la devianza (SS), che rappresenta la somma degli scarti al quadrato tra i valori osservati e un valore medio di riferimento. Se si indica con y un singolo valore osservato, con $\bar{y}$ la media di riferimento e con $(y - \bar{y})$ lo scarto, la somma dei quadrati si ottiene sommando tutti gli scarti elevati al quadrato.

Nell'ANOVA a due vie, la devianza totale viene scomposta in quattro componenti: la parte dovuta alla Stagione, la parte dovuta all'Anno, la parte dovuta alla loro interazione e la parte residua o di errore. La relazione è questa:

$$SS_{tot} = SS_{stagione} + SS_{anno} + SS_{stagione \times anno} + SS_{errore}$$

Il valore medio di riferimento utilizzato per il calcolo degli scarti può essere, a seconda della componente che si sta calcolando, la media generale, la media di un fattore (stagione o anno), oppure la media di una combinazione specifica Stagione × Anno. Più i dati sono lontani dalla media, più il valore di SS è grande.

Successivamente, ogni componente di devianza viene divisa per i relativi gradi di libertà per ottenere la corrispondente varianza (MS):

$$MS = \frac{SS}{df}$$

Poi, per ciascun fattore (Stagione, Anno e Stagione × Anno) viene calcolato il valore di F , ossia il rapporto tra la varianza del fattore e la varianza dell'errore (ossia quella dovuta al caso). Ad esempio:

$$F = \frac{MS_{stagione}}{MS_{errore}}$$

Se il valore di F è elevato significa che la variabilità dei dati spiegata dal fattore è maggiore rispetto alla variabilità dovuta al caso. Per verificare se questo effetto è statisticamente significativo, si determina il p -value a partire dal valore F e dai relativi gradi di libertà. Il p -value rappresenta la probabilità di osservare un valore di F almeno così grande se l'ipotesi nulla fosse vera. Un effetto è considerato significativo quando $p < 0,05$.

In questo caso, per ogni valore di F vi sono due diversi gradi di libertà (entrambi utilizzati per il calcolo di p): il primo associato all'effetto del fattore (cioè al numeratore) e il secondo associato alla variabilità dell'errore (cioè al denominatore). Il valore di F viene dunque riportato con la notazione: $F(df_1, df_2)$; dove df_1 sono i gradi di libertà del numeratore e df_2 sono i gradi di libertà del denominatore.

Per avere anche una misura dell'entità dell'effetto, viene infine calcolato il parametro ω^2 , che indica il contributo di ogni fattore alla variabilità complessiva dei dati. Questo parametro è importante perché un effetto può risultare statisticamente significativo anche se, in realtà, spiega solo una piccola parte della variabilità osservata.

Come anticipato nel paragrafo 4.2, l'ANOVA a due vie è stata svolta con il software JASP. Il modello prevedeva come fattori fissi la stagione (quattro livelli: autunno, inverno, primavera, estate), e l'anno (tre livelli: 2022-2023, 2023-2024, 2024-2025), e come variabile dipendente il valore log-trasformato di AFB₁. A differenza dei t-test di Welch applicati in precedenza, che

confrontavano le stagioni a coppie all'interno della stessa annata, l'ANOVA aggrega e confronta tutte le stagioni omonime dei tre anni. I risultati sono riportati in *Tabella 17*.

Tab. 17 – Risultati ANOVA a due vie

Fattore	Devianza (SS)	df	Varianza (MS)	F	p	ω^2
Stagione	0,755	3	0,252	3,100	0,026	$6,780 \times 10^{-4}$
Anno	6,820	2	3,410	42,000	< 0,001	0,009
Stagione $\times$ Anno	18,450	6	3,075	37,880	< 0,001	0,024
Residuo	728,400	8972	0,081	-	-	-

Nota. Devianza di tipo III.

L'effetto principale della stagione risulta statisticamente significativo ($F(3, 8972) = 3,100$, $p = 0,026$), ma con una dimensione dell'effetto molto piccola ($\omega^2 = 6,780 \times 10^{-4}$), ossia lo 0,0678% della varianza totale. Anche l'effetto principale dell'anno è significativo, con una dimensione dell'effetto maggiore ($F(2, 8972) = 42,00$, $p < 0,001$, $\omega^2 = 0,009$). Questo conferma i risultati dei t-test tra annate. Infine, l'effetto dell'interazione tra stagione e anno è significativo ($F(6, 8972) = 37,880$, $p < 0,001$), con $\omega^2 = 0,024$.

La proporzione di varianza totale spiegata dal modello è stata calcolata utilizzando i valori di devianza attraverso la formula:

$$R^2 = \frac{SS_{modello}}{SS_{totale}} = \frac{0,755 + 6,820 + 18,45}{0,755 + 6,820 + 18,45 + 728,4} \approx 0,034$$

Questo risultato indica che il modello nel suo insieme spiega solo circa il 3,4% di tutta la variabilità presente nei dati; mentre il restante 96,6% è la variabilità residua, ossia la porzione di variabilità che il modello non riesce a giustificare (ossia che non dipende né dalla Stagione, né dall'Anno, né dalla loro interazione). Una percentuale così elevata è comunque tipica nei dati relativi alle micotossine, caratterizzati da una forte variabilità tra lotti. All'interno della parte spiegata dal modello, l'interazione pesa circa 3 volte più dell'effetto principale dell'anno e oltre 35 volte più di quello della stagione. Ciò significa che l'andamento dei dati dipende dalla combinazione degli effetti stagionali e annuali, e non dai singoli fattori presi

separatamente. Di conseguenza, il livello di contaminazione di una stagione varia in modo significativo a seconda dell'anno considerato.

4.3.4 Tukey HSD

Per capire quali gruppi mostrassero differenze significative, è stato applicato (sempre tramite JASP) il test post-hoc di Tukey HSD, che confronta tutte le possibili combinazioni Stagione × Anno. Questo test, a differenza del t-test, controlla meglio l'aumento del rischio di errore di tipo I associato ai confronti multipli.

In questo caso, il valore di t viene calcolato con la formula:

$$t = \frac{MD}{SE}$$

Dove MD (*Mean Difference*) rappresenta la differenza tra le medie dei gruppi confrontati, mentre SE è l'errore standard associato a MD.

A partire da t si ottiene il valore p_{Tukey} , ossia il valore di significatività corretto per confronti multipli secondo il metodo di Tukey. Anche qui la significatività viene raggiunta se $p_{\text{Tukey}} < 0,05$.

È inoltre riportata la dimensione dell'effetto tramite l'indice di Cohen (Cohen's d).

I risultati sono presentati nelle *Tabelle 18* (Stagione), *19* (Anno) e *20* (Stagione × Anno).

Tab. 18 – Risultati dei confronti Post Hoc (Tukey HSD) - Stagione

Gruppo 1	Gruppo 2	MD	SE	df	t	Cohen's d	p_{Tukey}
Autunno	Estate	-0,002	0,009	8972	-0,208	-0,007	0,997
Autunno	Inverno	0,020	0,008	8972	2,462	0,071	0,066
Autunno	Primavera	0,013	0,009	8972	1,489	0,044	0,444
Estate	Inverno	0,022	0,009	8972	2,542	0,078	0,054
Estate	Primavera	0,015	0,009	8972	1,621	0,051	0,367
Inverno	Primavera	-0,008	0,008	8972	-0,934	-0,027	0,786

Nota. p-value corretti per confronti multipli tra 4 medie. I risultati sono mediati sui livelli del fattore Anno.

Tab. 19 – Risultati dei confronti Post Hoc (Tukey HSD) - Anno

Gruppo 1	Gruppo 2	MD	SE	df	t	Cohen's d	p _{Tukey}
2022-2023	2023-2024	-0,005	0,008	8972	-0,638	-0,017	0,799
2022-2023	2024-2025	-0,060	0,007	8972	-8,273	-0,211	< 0,001
2023-2024	2024-2025	-0,055	0,008	8972	-7,378	-0,194	< 0,001

Nota. p-value corretti per confronti multipli tra 3 medie. I risultati sono mediati sui livelli del fattore Stagione.

Per quanto riguarda l'effetto principale della stagione, nessun confronto a coppie raggiunge la significatività dopo la correzione di Tukey. I confronti Autunno vs Inverno ($p = 0,066$) ed Estate vs Inverno ($p = 0,054$) hanno i *p-value* più bassi, ma comunque non sono significativi. I valori di Cohen's d sono tutti trascurabili, con un massimo di $d = 0,078$ per Estate vs Inverno. Questo risultato è coerente con il valore molto basso di ω^2 . Infatti, quando le stagioni dei tre anni vengono aggregate, i pattern opposti presenti nelle diverse annate tendono a compensarsi, e dunque si riducono le differenze medie tra stagioni.

Nel confronto tra le annate, il Tukey HSD conferma i t-test di Welch. Il test tra 2022-2023 e 2023-2024 non è significativo ($t = -0,638$, $p = 0,799$, $d = -0,017$). Invece, entrambe le annate differiscono in modo significativo dal 2024-2025. Nel confronto 2022-2023 vs 2024-2025 si ottiene $t = -8,273$, $p < 0,001$, $d = -0,211$, mentre per 2023-2024 vs 2024-2025 si ottiene $t = -7,378$, $p < 0,001$, $d = -0,194$. I valori di Cohen's d rientrano nella categoria degli effetti piccoli.

Tab. 20 – Risultati dei confronti Post Hoc (Tukey HSD) - Stagione × Anno

Gruppo 1	Gruppo 2	MD	SE	df	t	Cohen's d	p _{Tukey}
Autunno 2022	Estate 2023	0,080	0,015	8972	5,220	0,282	< 0,001
Autunno 2022	Inverno 2023	0,032	0,014	8972	2,336	0,112	0,450
Autunno 2022	Primavera 2023	0,082	0,014	8972	5,765	0,288	< 0,001
Autunno 2022	Autunno 2023	0,009	0,015	8972	0,601	0,031	1,000
Autunno 2022	Estate 2024	0,062	0,016	8972	3,886	0,216	0,006
Autunno 2022	Inverno 2024	0,027	0,014	8972	1,931	0,094	0,740

Gruppo 1	Gruppo 2	MD	SE	df	t	Cohen's d	pTukey
Autunno 2022	Primavera 2024	0,077	0,014	8972	5,411	0,272	< 0,001
Autunno 2022	Autunno 2024	0,048	0,014	8972	3,353	0,170	0,038
Autunno 2022	Estate 2025	-0,090	0,014	8972	-6,416	-0,317	< 0,001
Autunno 2022	Inverno 2025	0,059	0,014	8972	4,368	0,209	< 0,001
Autunno 2022	Primavera 2025	-0,064	0,014	8972	-4,574	-0,225	< 0,001
Estate 2023	Inverno 2023	-0,049	0,015	8972	-3,176	-0,170	0,066
Estate 2023	Primavera 2023	0,002	0,016	8972	0,101	0,006	1,000
Estate 2023	Autunno 2023	-0,072	0,016	8972	-4,391	-0,251	< 0,001
Estate 2023	Estate 2024	-0,019	0,017	8972	-1,081	-0,066	0,995
Estate 2023	Inverno 2024	-0,054	0,016	8972	-3,444	-0,188	0,029
Estate 2023	Primavera 2024	-0,003	0,016	8972	-0,186	-0,010	1,000
Estate 2023	Autunno 2024	-0,032	0,016	8972	-1,995	-0,112	0,697
Estate 2023	Estate 2025	-0,171	0,016	8972	-10,870	-0,599	< 0,001
Estate 2023	Inverno 2025	-0,021	0,015	8972	-1,366	-0,073	0,970
Estate 2023	Primavera 2025	-0,145	0,016	8972	-9,234	-0,507	< 0,001
Inverno 2023	Primavera 2023	0,050	0,014	8972	3,556	0,176	0,019
Inverno 2023	Autunno 2023	-0,023	0,015	8972	-1,571	-0,081	0,920
Inverno 2023	Estate 2024	0,030	0,016	8972	1,893	0,105	0,764
Inverno 2023	Inverno 2024	-0,005	0,014	8972	-0,361	-0,017	1,000
Inverno 2023	Primavera 2024	0,046	0,014	8972	3,212	0,160	0,059
Inverno 2023	Autunno 2024	0,017	0,014	8972	1,158	0,058	0,992
Inverno 2023	Estate 2025	-0,122	0,014	8972	-8,747	-0,429	< 0,001
Inverno 2023	Inverno 2025	0,028	0,013	8972	2,050	0,097	0,659

Gruppo 1	Gruppo 2	MD	SE	df	t	Cohen's d	pTukey
Inverno 2023	Primavera 2025	-0,096	0,014	8972	-6,901	-0,337	< 0,001
Primavera 2023	Autunno 2023	-0,073	0,015	8972	-4,817	-0,257	< 0,001
Primavera 2023	Estate 2024	-0,020	0,016	8972	-1,248	-0,071	0,985
Primavera 2023	Inverno 2024	-0,055	0,014	8972	-3,835	-0,194	0,007
Primavera 2023	Primavera 2024	-0,005	0,015	8972	-0,309	-0,016	1,000
Primavera 2023	Autunno 2024	-0,034	0,015	8972	-2,254	-0,118	0,510
Primavera 2023	Estate 2025	-0,172	0,015	8972	-11,840	-0,605	< 0,001
Primavera 2023	Inverno 2025	-0,022	0,014	8972	-1,594	-0,079	0,912
Primavera 2023	Primavera 2025	-0,146	0,014	8972	-10,080	-0,513	< 0,001
Autunno 2023	Estate 2024	0,053	0,017	8972	3,156	0,185	0,070
Autunno 2023	Inverno 2024	0,018	0,015	8972	1,209	0,063	0,988
Autunno 2023	Primavera 2024	0,069	0,015	8972	4,492	0,241	< 0,001
Autunno 2023	Autunno 2024	0,040	0,015	8972	2,571	0,139	0,296
Autunno 2023	Estate 2025	-0,099	0,015	8972	-6,591	-0,348	< 0,001
Autunno 2023	Inverno 2025	0,051	0,015	8972	3,464	0,178	0,027
Autunno 2023	Primavera 2025	-0,073	0,015	8972	-4,868	-0,256	< 0,001
Estate 2024	Inverno 2024	-0,035	0,016	8972	-2,175	-0,122	0,568
Estate 2024	Primavera 2024	0,016	0,016	8972	0,963	0,055	0,998
Estate 2024	Autunno 2024	-0,013	0,016	8972	-0,804	-0,046	1,000
Estate 2024	Estate 2025	-0,152	0,016	8972	-9,404	-0,534	< 0,001
Estate 2024	Inverno 2025	-0,002	0,016	8972	-0,137	-0,008	1,000
Estate 2024	Primavera 2025	-0,126	0,016	8972	-7,808	-0,442	< 0,001
Inverno 2024	Primavera 2024	0,051	0,014	8972	3,496	0,177	0,024

Gruppo 1	Gruppo 2	MD	SE	df	t	Cohen's d	pTukey
Inverno 2024	Autunno 2024	0,022	0,015	8972	1,478	0,076	0,947
Inverno 2024	Estate 2025	-0,117	0,014	8972	-8,229	-0,412	< 0,001
Inverno 2024	Inverno 2025	0,033	0,014	8972	2,369	0,115	0,428
Inverno 2024	Primavera 2025	-0,091	0,014	8972	-6,416	-0,319	< 0,001
Primavera 2024	Autunno 2024	-0,029	0,015	8972	-1,936	-0,102	0,736
Primavera 2024	Estate 2025	-0,168	0,015	8972	-11,460	-0,589	< 0,001
Primavera 2024	Inverno 2025	-0,018	0,014	8972	-1,262	-0,063	0,984
Primavera 2024	Primavera 2025	-0,142	0,015	8972	-9,709	-0,497	< 0,001
Autunno 2024	Estate 2025	-0,139	0,015	8972	-9,398	-0,487	< 0,001
Autunno 2024	Inverno 2025	0,011	0,014	8972	0,774	0,039	1,000
Autunno 2024	Primavera 2025	-0,113	0,015	8972	-7,653	-0,395	< 0,001
Estate 2025	Inverno 2025	0,150	0,014	8972	10,730	0,526	< 0,001
Estate 2025	Primavera 2025	0,026	0,014	8972	1,829	0,092	0,802
Inverno 2025	Primavera 2025	-0,124	0,014	8972	-8,891	-0,434	< 0,001

Nota. p-value corretti per confronti multipli tra 12 medie.

Poiché le stagioni sono 4 e gli anni 3, esistono 12 combinazioni uniche Stagione × Anno. Per ridurre la probabilità di commettere errore di tipo I, il Tukey HSD relativo all'interazione tra stagione e anno è stato corretto per confronti multipli tra 12 medie marginali stimate. Dato il numero elevato di confronti (66 in totale), i risultati vengono presentati per categoria tematica.

Anche in questo caso i confronti tra stagioni all'interno della stessa annata confermano i risultati dei t-test di Welch a coppie. Tuttavia, poiché il Tukey HSD è più conservativo, alcuni confronti che con la correzione di Bonferroni risultavano significativi non raggiungono la significatività. Nell'annata 2022-2023, l'autunno è significativamente più contaminato della primavera ($t = 5,765$, $p < 0,001$, $d = 0,288$) e dell'estate ($t = 5,220$, $p < 0,001$, $d = 0,282$).

L'inverno supera significativamente la primavera ($t = 3,556$, $p = 0,019$, $d = 0,176$). Invece, il confronto tra autunno e inverno non risulta significativo con Tukey ($t = 2,336$, $p = 0,450$), così come quello tra estate e inverno ($p = 0,066$). Infine, estate e primavera sono praticamente indistinguibili ($t = 0,101$, $p = 1,000$, $d = 0,006$). Nell'annata 2023-2024, l'autunno supera significativamente la primavera ($t = 4,492$, $p < 0,001$, $d = 0,241$). Anche l'inverno supera significativamente la primavera ($t = 3,496$, $p = 0,024$, $d = 0,177$). Il confronto tra autunno ed estate non è significativo ($t = 3,156$, $p = 0,070$). Come nell'annata precedente, estate e primavera sono indistinguibili ($p = 0,998$). Nel 2024-2025 l'estate supera l'inverno con un Cohen's d di media entità ($t = 10,73$, $p < 0,001$, $d = 0,526$); inoltre supera anche l'autunno ($t = 9,398$, $p < 0,001$, $d = 0,487$). La primavera supera significativamente inverno ($t = 8,891$, $p < 0,001$, $d = 0,434$) e autunno ($t = 7,653$, $p < 0,001$, $d = 0,395$). Autunno e inverno risultano indistinguibili ($t = 0,774$, $p = 1,000$), così come estate e primavera ($t = 1,829$, $p = 0,802$).

Nel confronto della stessa stagione tra anni diversi le stagioni fredde (autunno e inverno) mantengono livelli di contaminazione relativamente stabili nelle tre annate. Autunno 2022 e Autunno 2023 risultano quasi identici ($t = 0,601$, $p = 1,000$, $d = 0,031$). Il confronto tra Autunno 2022 e Autunno 2024 è significativo ($t = 3,353$, $p = 0,038$), ma con un effetto molto piccolo ($d = 0,170$). I tre inverni non sono significativamente diversi tra loro. Le stagioni calde (primavera ed estate) sono invece meno omogenee. Primavera 2023 e Primavera 2024 sono praticamente sovrapponibili ($t = -0,309$, $p = 1,000$, $d = -0,016$), così come Estate 2023 ed Estate 2024 ($t = -1,081$, $p = 0,995$, $d = -0,066$). Tuttavia, Primavera 2025 supera significativamente Primavera 2023 ($t = 10,08$, $p < 0,001$, $d = 0,513$) e Primavera 2024 ($t = 9,709$, $p < 0,001$, $d = 0,497$). Anche Estate 2025 supera nettamente Estate 2023 ($t = 10,87$, $p < 0,001$, $d = 0,599$) ed Estate 2024 ($t = 9,404$, $p < 0,001$, $d = 0,534$). I valori di Cohen's d nei confronti che coinvolgono le stagioni calde del terzo anno sono di media entità ($\geq 0,5$), e si distinguono chiaramente da quelli osservati nelle stagioni fredde.

Nei confronti trasversali tra stagioni diverse e anni diversi si osserva il cambiamento del pattern. Infatti l'Estate 2025 è significativamente più contaminata di qualsiasi stagione delle prime due annate, comprese le stagioni autunnali. Il confronto tra Primavera 2023 ed Estate 2025 produce la differenza media più ampia e il Cohen's d più elevato dell'analisi ($t = -11,84$, $p < 0,001$, $d = -0,605$), seguito dal confronto tra Primavera 2024 ed Estate 2025 ($t = -11,46$, $p < 0,001$, $d = -0,589$). Anche Primavera 2025 supera significativamente quasi tutte le

stagioni delle annate precedenti, ad eccezione di Autunno 2022 ($p = 0,510$), Autunno 2023 ($p = 0,296$) e Inverno 2023 ($p = 0,059$).

L'ANOVA e il Tukey HSD mostrano dunque che il ribaltamento del pattern stagionale osservato nel 2024-2025 dipende quasi del tutto dal comportamento anomalo delle stagioni calde. Nelle prime due annate, primavera ed estate restano al di sotto di autunno e inverno, senza differenze significative tra un anno e l'altro. Invece, nel 2024-2025 queste stesse stagioni raggiungono livelli di contaminazione superiori a qualsiasi dato osservato in precedenza. Le stagioni fredde, al contrario, mantengono livelli sostanzialmente costanti nelle tre annate.

4.3.5 Frequenza di positività

Oltre all'analisi statistica delle medie, è stata svolta un'analisi basata sulla frequenza di positività, per quantificare quante analisi, in ciascun periodo, hanno mostrato concentrazioni di AFB₁ superiori a determinate soglie critiche (2, 3, 5 e 10 ppb). Questo approccio è, per certi versi, più interessante a livello operativo. Infatti, sapere che in un determinato mese una certa percentuale di analisi ha superato i 5 ppb è molto più rilevante dal punto di vista della gestione del rischio, poiché permette di individuare criticità che la media mensile tende a mascherare.

I grafici a torta riportati nelle *Figure 20, 21, 22 e 23* mostrano la distribuzione delle analisi per classe di concentrazione, calcolata per le singole annate e per il triennio.

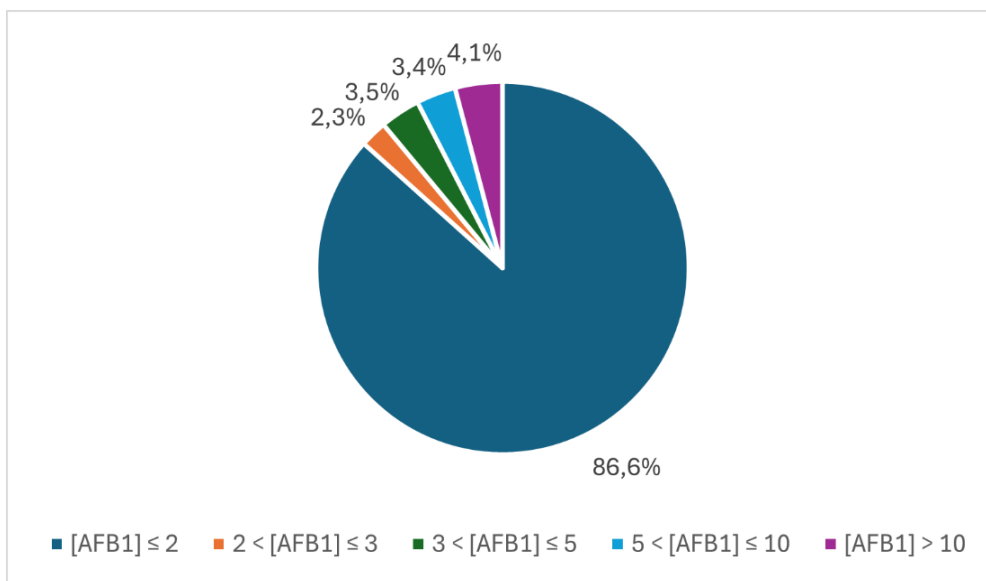


Fig. 20 – Distribuzione dei valori di AFB₁ per classi di concentrazione espresse in ppb. Dati relativi al triennio.

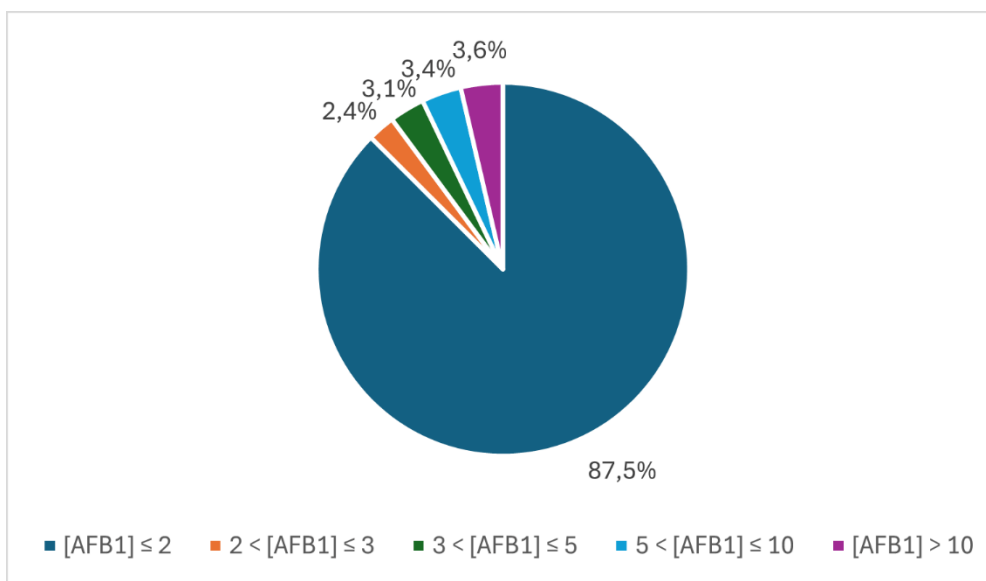


Fig. 21 – Distribuzione dei valori annuali di AFB₁ per classi di concentrazione espresse in ppb. Dati relativi all'annata 2022-2023.

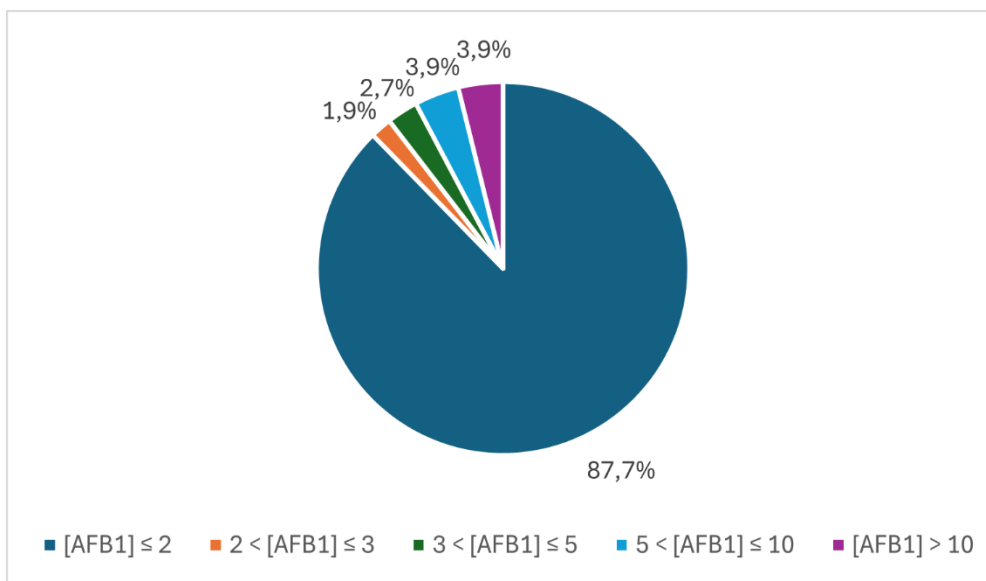


Fig. 22 – Distribuzione dei valori annuali di AFB₁ per classi di concentrazione espresse in ppb. Dati relativi all'annata 2023-2024.

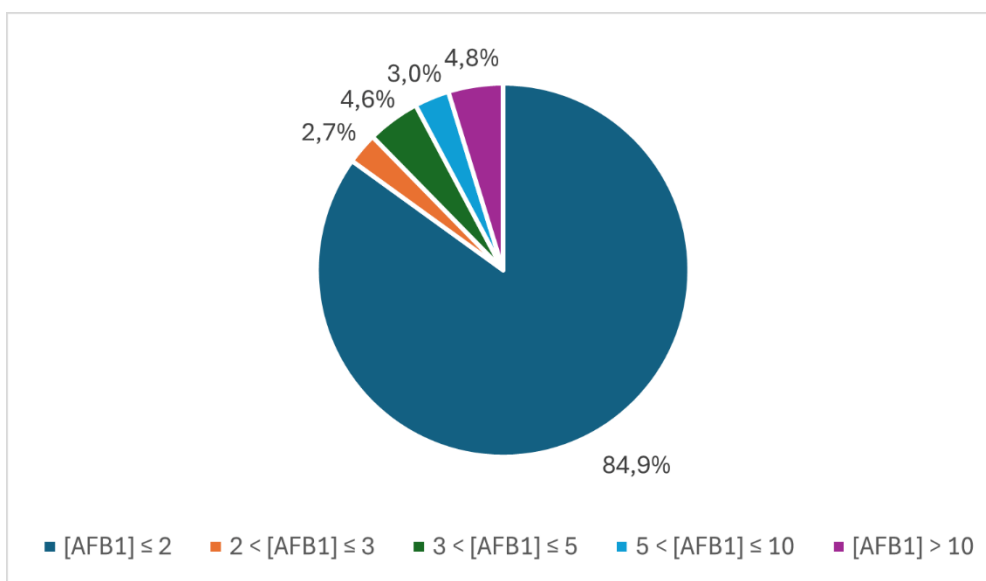


Fig. 23 – Distribuzione dei valori annuali di AFB₁ per classi di concentrazione espresse in ppb. Dati relativi all'annata 2024-2025.

Complessivamente, nelle tre annate, l'86,64% delle partite analizzate presenta valori di AFB₁ inferiori alla soglia interna di 2 ppb. Questo significa che, in generale, il sistema di approvvigionamento seleziona materie prime di buona qualità. Nei primi due anni, la percentuale di analisi ≤2 ppb risulta praticamente identica, pari all'87,47% nel 2022-2023 e all'87,68% nel 2023-2024. Nel 2024-2025 questa quota scende all'84,95%: una riduzione di quasi 3 punti percentuali che, su oltre tremila analisi, corrisponde a un numero rilevante di partite aggiuntive contaminate.

La classe >10 ppb segue un andamento di crescita, passando dal 3,64% nel 2022-2023 al 3,88% nel 2023-2024 fino al 4,75% nel 2024-2025. La classe 3-5 ppb passa dal 3,06% nel primo anno al 2,71% nel secondo e al 4,57% nel terzo. Invece la classe 5-10 ppb cresce dal 3,45% al 3,88% tra le prime due annate, per poi ridursi al 3,02% nel 2024-2025, nonostante quest'ultima sia l'annata complessivamente più critica. Considerando l'intero triennio, la quota di analisi >10 ppb è del 4,11%.

I grafici a barre impilate riportati nelle *Figure 24, 25, 26 e 27* mostrano la percentuale mensile e stagionale delle analisi superiori a 2 ppb sul totale delle analisi del periodo, suddivise nei quattro intervalli di concentrazione (tra 2 e 3 ppb, tra 3 e 5 ppb, tra 5 e 10 ppb e oltre 10 ppb). Nelle *Tabelle 21 e 22* sono riportati i valori percentuali esatti (mensili e stagionali, rispettivamente).

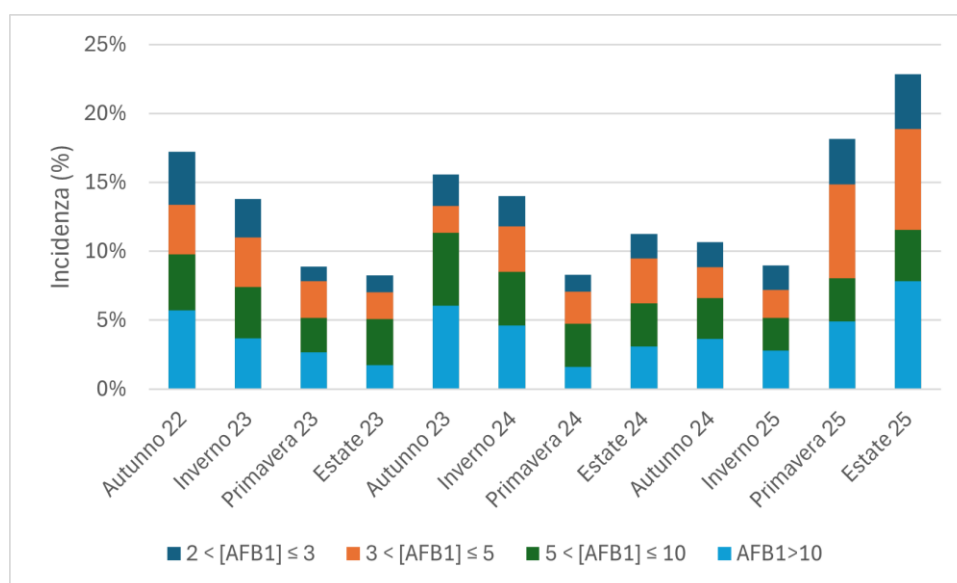


Fig. 24 – Percentuale stagionale delle analisi > 2 ppb sul totale delle analisi del periodo, suddivise in quattro intervalli di concentrazione (espressi in ppb). Dati relativi al triennio.

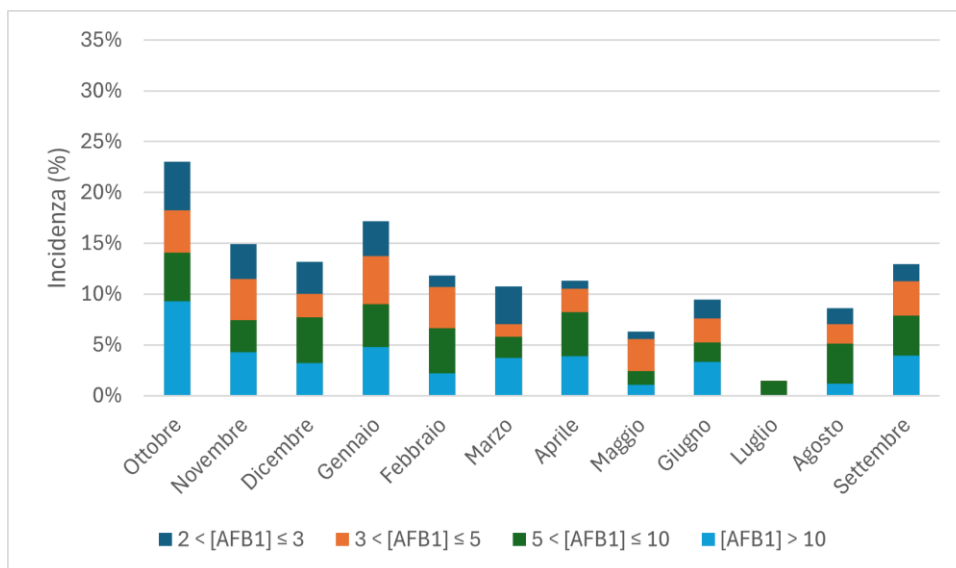


Fig. 25 – Percentuale mensile delle analisi > 2 ppb sul totale delle analisi del periodo, suddivise in quattro intervalli di concentrazione (espressi in ppb). Dati relativi all'annata 2022-2023.

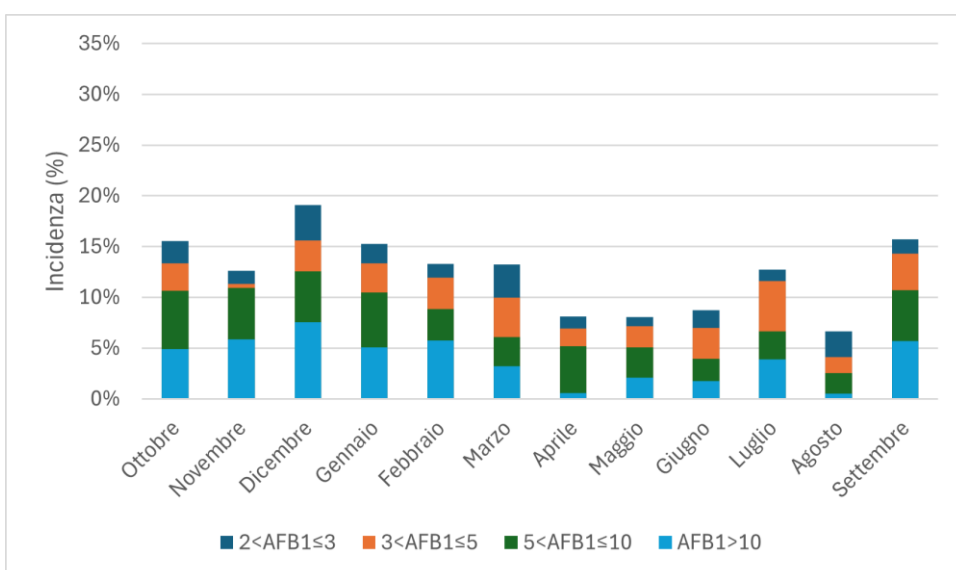


Fig. 26 – Percentuale mensile delle analisi > 2 ppb sul totale delle analisi del periodo, suddivise in quattro intervalli di concentrazione (espressi in ppb). Dati relativi all'annata 2023-2024.

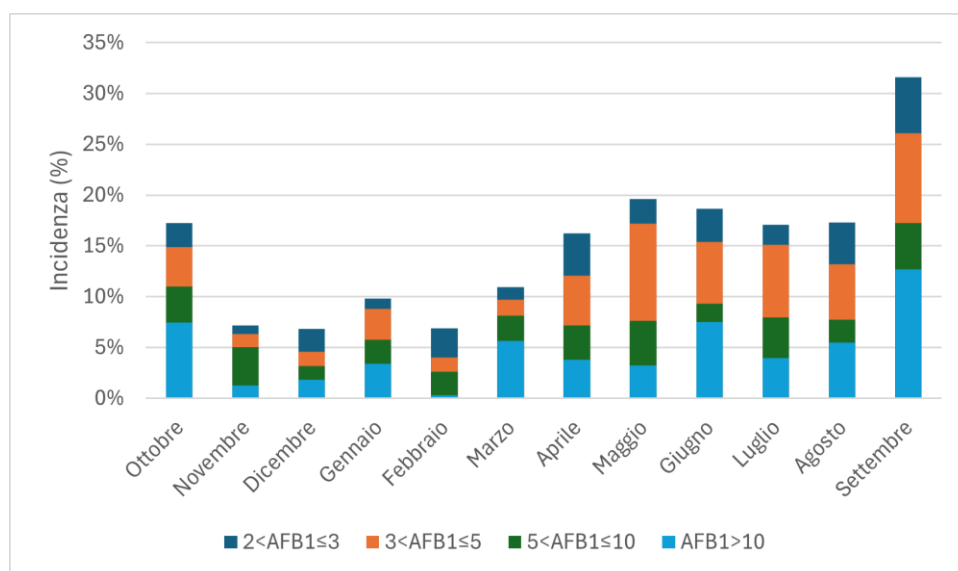


Fig. 27 – Percentuale mensile delle analisi > 2 ppb sul totale delle analisi del periodo, suddivise in quattro intervalli di concentrazione (espressi in ppb).
Dati relativi all'annata 2024-2025.

Tab. 21 – Distribuzione mensile dei valori di AFB₁ per intervalli di concentrazione (in ppb)

Periodo	2 < [AFB ₁] ≤ 3	3 < [AFB ₁] ≤ 5	5 < [AFB ₁] ≤ 10	[AFB ₁] > 10	[AFB ₁] > 2
ott-22	4,81%	4,12%	4,81%	9,28%	23,02%
nov-22	3,44%	4,01%	3,15%	4,30%	14,90%
dic-22	3,18%	2,27%	4,55%	3,18%	13,18%
gen-23	3,44%	4,76%	4,23%	4,76%	17,20%
feb-23	1,11%	4,06%	4,44%	2,21%	11,81%
mar-23	3,72%	1,24%	2,07%	3,72%	10,74%
apr-23	0,78%	2,34%	4,30%	3,91%	11,33%
mag-23	0,70%	3,15%	1,40%	1,05%	6,29%
giu-23	1,90%	2,37%	1,90%	3,32%	9,48%
lug-23	0,00%	0,00%	1,47%	0,00%	1,47%
ago-23	1,57%	1,96%	3,92%	1,18%	8,63%
set-23	1,69%	3,37%	3,93%	3,93%	12,92%
ott-23	2,22%	2,67%	5,78%	4,89%	15,56%
nov-23	1,26%	0,42%	5,04%	5,88%	12,61%
dic-23	3,52%	3,02%	5,03%	7,54%	19,10%
gen-24	1,90%	2,86%	5,40%	5,08%	15,24%
feb-24	1,33%	3,10%	3,10%	5,75%	13,27%
mar-24	3,21%	3,93%	2,86%	3,21%	13,21%

Periodo	2 < [AFB ₁] ≤ 3	3 < [AFB ₁] ≤ 5	5 < [AFB ₁] ≤ 10	[AFB ₁] > 10	[AFB ₁] > 2
apr-24	1,16%	1,73%	4,62%	0,58%	8,09%
mag-24	0,90%	2,10%	2,99%	2,10%	8,08%
giu-24	1,75%	3,06%	2,18%	1,75%	8,73%
lug-24	1,10%	4,97%	2,76%	3,87%	12,71%
ago-24	2,56%	1,54%	2,05%	0,51%	6,67%
set-24	1,43%	3,57%	5,00%	5,71%	15,71%
ott-24	2,35%	3,92%	3,53%	7,45%	17,25%
nov-24	0,84%	1,26%	3,78%	1,26%	7,14%
dic-24	2,28%	1,37%	1,37%	1,83%	6,85%
gen-25	1,01%	3,04%	2,36%	3,38%	9,80%
feb-25	2,87%	1,44%	2,30%	0,29%	6,90%
mar-25	1,21%	1,62%	2,43%	5,67%	10,93%
apr-25	4,15%	4,91%	3,40%	3,77%	16,23%
mag-25	2,40%	9,60%	4,40%	3,20%	19,60%
giu-25	3,23%	6,09%	1,79%	7,53%	18,64%
lug-25	1,98%	7,14%	3,97%	3,97%	17,06%
ago-25	4,09%	5,45%	2,27%	5,45%	17,27%
set-25	5,54%	8,79%	4,56%	12,70%	31,60%

Tab. 22 – Distribuzione stagionale dei valori di AFB₁ per intervalli di concentrazione (in ppb)

Periodo	2 < [AFB ₁] ≤ 3	3 < [AFB ₁] ≤ 5	5 < [AFB ₁] ≤ 10	[AFB ₁] > 10	[AFB ₁] > 2
Autunno 22	3,84%	3,60%	4,07%	5,70%	17,21%
Inverno 23	2,81%	3,59%	3,70%	3,70%	13,80%
Primavera 23	1,06%	2,66%	2,52%	2,66%	8,90%
Estate 23	1,23%	1,93%	3,34%	1,76%	8,26%
Autunno 23	2,27%	1,96%	5,29%	6,04%	15,56%
Inverno 24	2,19%	3,29%	3,90%	4,63%	14,01%
Primavera 24	1,22%	2,31%	3,13%	1,63%	8,29%
Estate 24	1,74%	3,29%	3,10%	3,10%	11,24%
Autunno 24	1,83%	2,25%	2,95%	3,65%	10,67%
Inverno 25	1,80%	2,02%	2,36%	2,81%	8,98%
Primavera 25	3,27%	6,80%	3,15%	4,91%	18,14%
Estate 25	3,98%	7,32%	3,72%	7,83%	22,85%

Il grafico relativo al triennio conferma che nelle prime due annate la stagione più critica è l'Autunno, con il 17,21% di analisi >2 ppb nell'Autunno 2022 e il 15,56% nell'Autunno 2023; invece Primavera ed Estate rimangono sempre sotto al 12%. Nella terza annata L'Autunno 2024 scende al 10,67%, mentre l'Estate 2025 raggiunge il 22,85% e la Primavera 2025 il 18,14%.

Nell'annata 2022-2023, ottobre raggiunge il valore più elevato, con il 23,02% di analisi >2 ppb; inoltre la sola classe >10 ppb contribuisce per il 9,28%. Gennaio è al secondo posto con il 17,20%. Al contrario, luglio 2023 raggiunge il minimo del triennio con l'1,47% di analisi >2 ppb, composto esclusivamente da campioni nella fascia 5-10 ppb.

Nell'annata 2023-2024 la percentuale maggiore si osserva a dicembre (19,10%), con il 7,54% di analisi appartenenti alla classe >10 ppb. Seguono settembre (15,71%) e ottobre (15,56%). Agosto è il mese meno critico (6,67%). Luglio invece raggiunge il 12,71%, un livello insolito per un mese estivo, nettamente superiore a quello registrato nel luglio 2023. In questo caso la componente che contribuisce maggiormente è la classe 3-5 ppb (4,97%).

Nell'annata 2024-2025 settembre raggiunge il 31,60% di analisi >2 ppb, con la classe >10 ppb che contribuisce per il 12,70%, e la classe 3-5 ppb per l'8,79%. Ciò significa che erano presenti contemporaneamente partite fortemente contaminate e partite dalla contaminazione moderata. Dalla primavera in poi si osserva una crescita quasi continua dei valori, con il 16,23% ad aprile, il 19,60% a maggio, il 18,64% a giugno, il 17,06% a luglio, il 17,27% ad agosto e il 31,60% a settembre. Anche se maggio 2025 raggiunge il 19,60%, il contributo maggiore deriva dalla classe 3-5 ppb (9,60%), mentre la fascia >10 ppb contribuisce solo per il 3,20%. Questo implica una contaminazione diffusa ma non estrema, a differenza di quanto osservato a settembre. Anche ottobre presenta una percentuale rilevante (17,25%). Novembre e dicembre 2024 sono invece i mesi meno critici, con valori rispettivamente pari al 7,14% e al 6,85%.

Per approfondire la distribuzione temporale, è stato realizzato un grafico a linee che rappresenta l'andamento mensile della percentuale di analisi superiori a 5 ppb durante il triennio. È stata scelta la soglia dei 5 ppb in quanto già indicativa di una contaminazione rilevante, oltre ad essere il limite legale per l'AFB₁ nei mangimi per bovine da latte. In questo caso le percentuali includono le analisi della classe 5-10 ppb e quelle della classe >10 ppb. È stato inoltre realizzato un secondo grafico analogo su base stagionale.

L'andamento mensile è riportato in *Figura 28*.

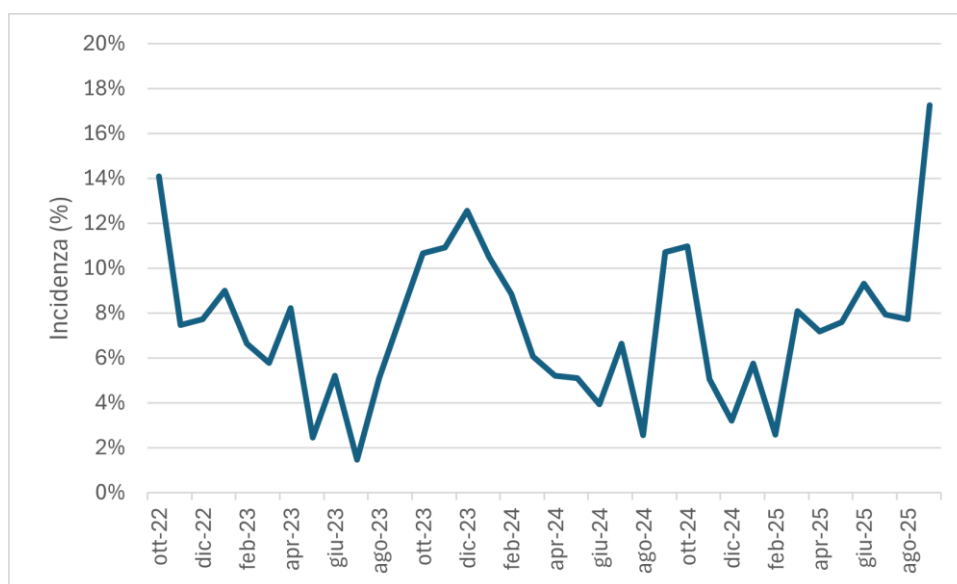


Fig. 28 – Percentuale mensile delle analisi > 5 ppb sul totale delle analisi del periodo. Dati relativi al triennio.

Il picco più elevato del primo anno è ottobre 2022 (14,09%). Poi si osservano quattro mesi consecutivi dai valori piuttosto elevati: ottobre 2023 (10,67%), novembre 2023 (10,92%), dicembre 2023 (12,57%) e gennaio 2024 (10,48%). Degno di nota è anche il breve picco che riguarda i mesi di settembre 2024 (10,71%) e ottobre 2024 (10,98%). Infine, ancora una volta, settembre 2025 domina con il 17,26%. I mesi estivi che precedono settembre presentano livelli elevati ma non estremi (giugno 9,32%, luglio 7,94%, agosto 7,72%). Anche in questo caso luglio 2023 raggiunge il valore minimo (1,47%). Nel terzo anno i valori più bassi si concentrano nel periodo invernale (dicembre 2024 con il 3,20% e febbraio 2025 con il 2,59%), mentre dalla primavera in poi la percentuale cresce fino ad arrivare al picco di settembre.

L'andamento stagionale è riportato in *Figura 29*.

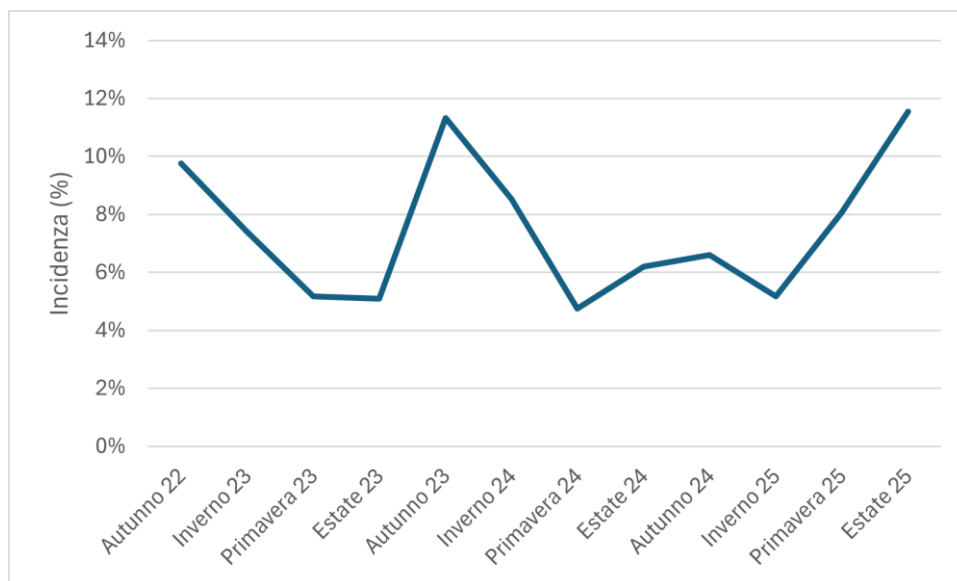


Fig. 29 – Percentuale stagionale delle analisi > 5 ppb sul totale delle analisi del periodo. Dati relativi al triennio.

In questo caso le stagioni più contaminate risultano essere l'Estate 2025 (11,55%), l'Autunno 2023 (11,33%) e l'Autunno 2022 (9,77%). Nelle prime due annate si osserva una progressiva diminuzione dall'autunno verso l'estate: le stagioni calde si collocano al di sotto del 6-7% (5,18% nella Primavera 2023, 5,10% nell'Estate 2023, 4,76% nella Primavera 2024 e 6,20% nell'Estate 2024). Anche qui il livello più basso del terzo anno viene raggiunto dall'Inverno 2025 (5,17%). Pure l'Autunno 2024 ha una percentuale relativamente bassa (6,60%), soprattutto se la si paragona a quella degli autunni precedenti. Infine, come già visto, durante la Primavera 2025 (8,06%) e l'Estate 2025 (11,55%) si verifica una crescita del livello di contaminazione.

4.3.6 P-chart

Questi ultimi due grafici hanno permesso di individuare visivamente i periodi con le percentuali di analisi >5 ppb più elevate rispetto all'andamento generale. Per verificare se tali picchi fossero associati a variazioni statisticamente anomale, e non a fluttuazioni casuali, è stata applicata (tramite Excel) la carta di controllo P (P-chart) su base mensile e stagionale.

Innanzitutto è stata calcolata la proporzione media storica di riferimento ($\bar{p}$) relativa al triennio, dividendo il numero totale di analisi >5 ppb per il numero totale di campioni esaminati:

$$\bar{p} = \frac{\sum x_i}{\sum n_i} = \frac{677}{8984} \approx 0,07535$$

Quindi $\bar{p} = 7,535\%$. Dopodiché per ogni mese e per ogni stagione, è stato calcolato il limite superiore di controllo (UCL) tramite la formula:

$$UCL = \bar{p} + k \sqrt{\frac{\bar{p}(1 - \bar{p})}{n}}$$

dove n è il numero di analisi del periodo e k assume valore 3 (livello di fiducia del 99,73%) oppure 2 (livello di fiducia del 95,45%). Per avere una lettura su due livelli, l'UCL è stato calcolato sia con k = 3 (3 sigma) sia con k = 2 (2 sigma).

Il limite superiore di controllo rappresenta la percentuale massima di campioni >5 ppb attendibile per effetto del caso. Se la percentuale di analisi >5 ppb di un mese o di una stagione supera il relativo UCL, il picco di contaminazione è da considerarsi anomalo. Poiché n cambia da un periodo all'altro, anche l'UCL varia in funzione della numerosità campionaria. Quindi i mesi o le stagioni con un numero inferiore di analisi avranno un UCL più elevato, ossia una soglia di significatività più conservativa. I risultati della P-chart mensile e stagionale sono riportati rispettivamente in *Tabella 23* e *Tabella 24*.

Tab. 23 – Risultati P-chart mensile

Periodo	[AFB ₁] > 5 ppb	UCL 3σ	UCL 2σ	Scarto 3σ	Scarto 2σ
ott-22	14,09%	12,18%	10,63%	1,91%	3,46%
nov-22	7,45%	11,77%	10,36%	-4,32%	-2,91%
dic-22	7,73%	12,87%	11,09%	-5,15%	-3,37%
gen-23	8,99%	11,61%	10,25%	-2,61%	-1,26%
feb-23	6,64%	12,35%	10,74%	-5,70%	-4,10%
mar-23	5,79%	12,63%	10,93%	-6,84%	-5,14%
apr-23	8,20%	12,48%	10,84%	-4,28%	-2,63%
mag-23	2,45%	12,22%	10,66%	-9,77%	-8,21%
giu-23	5,21%	12,99%	11,17%	-7,77%	-5,96%
lug-23	1,47%	14,33%	12,06%	-12,86%	-10,59%

Periodo	[AFB ₁] > 5 ppb	UCL 3σ	UCL 2σ	Scarto 3σ	Scarto 2σ
ago-23	5,10%	12,49%	10,84%	-7,40%	-5,74%
set-23	7,87%	13,47%	11,49%	-5,61%	-3,63%
ott-23	10,67%	12,81%	11,06%	-2,15%	-0,39%
nov-23	10,92%	12,67%	10,96%	-1,74%	-0,03%
dic-23	12,56%	13,15%	11,28%	-0,59%	1,28%
gen-24	10,48%	12,00%	10,51%	-1,52%	-0,03%
feb-24	8,85%	12,80%	11,05%	-3,95%	-2,20%
mar-24	6,07%	12,27%	10,69%	-6,20%	-4,62%
apr-24	5,20%	13,56%	11,55%	-8,35%	-6,35%
mag-24	5,09%	11,87%	10,42%	-6,78%	-5,33%
giu-24	3,93%	12,77%	11,02%	-8,84%	-7,09%
lug-24	6,63%	13,42%	11,46%	-6,79%	-4,83%
ago-24	2,56%	13,21%	11,32%	-10,64%	-8,75%
set-24	10,71%	14,23%	12,00%	-3,51%	-1,28%
ott-24	10,98%	12,49%	10,84%	-1,51%	0,14%
nov-24	5,04%	12,67%	10,96%	-7,63%	-5,92%
dic-24	3,20%	12,89%	11,10%	-9,69%	-7,91%
gen-25	5,74%	12,14%	10,60%	-6,40%	-4,86%
feb-25	2,59%	11,78%	10,37%	-9,19%	-7,78%
mar-25	8,10%	12,57%	10,89%	-4,48%	-2,80%
apr-25	7,17%	12,40%	10,78%	-5,23%	-3,61%
mag-25	7,60%	12,54%	10,87%	-4,94%	-3,27%
giu-25	9,32%	12,28%	10,70%	-2,96%	-1,38%
lug-25	7,94%	12,52%	10,86%	-4,59%	-2,92%
ago-25	7,73%	12,87%	11,09%	-5,15%	-3,37%
set-25	17,26%	12,06%	10,55%	5,21%	6,72%

Nell'analisi mensile, solo 2 mesi su 36 superano il limite di controllo a 3 sigma. Il primo è ottobre 2022, con una percentuale di analisi >5 ppb del 14,09% rispetto a un UCL3 del 12,18%: una differenza di +1,91 punti percentuali. Il secondo è settembre 2025, con una percentuale del 17,26% rispetto a un UCL3 del 12,06%. In questo caso lo scarto è notevole: +5,21 punti percentuali. Ci sono poi altri due mesi che superano il limite a 2 sigma, ma non quello a 3 sigma. Dicembre 2023 con una percentuale del 12,56% rispetto a un UCL2 dell'11,28% (+1,28 punti percentuali) e a un UCL3 del 13,15%. Ottobre 2024 supera l'UCL2 di soli +0,14 punti percentuali: un risultato statisticamente significativo ma di entità limitata.

Alcuni mesi si collocano immediatamente al di sotto della soglia a 2 sigma, ma non la superano. Novembre 2023 e gennaio 2024 presentano percentuali rispettivamente del 10,92% e del 10,48%, a fronte di un UCL2 del 10,96% e del 10,51%. In entrambi i casi la differenza negativa è di appena -0,03 punti percentuali. Questo risultato è coerente con quanto visto in precedenza: infatti i mesi di ottobre 2023 (10,67%), novembre 2023 (10,92%), dicembre 2023 (12,56%) e gennaio 2024 (10,48%) formano una sequenza di quattro mesi consecutivi con percentuali elevate. Tra questi, solo dicembre raggiunge la significatività statistica formale, ma l'andamento indica che il rischio è persistente. I periodi estivi delle prime due annate, con luglio 2023 all'1,47% e agosto 2024 al 2,56%, si trovano invece nettamente al di sotto della soglia a 2 sigma.

Tab. 24 – Risultati P-chart stagionale

Periodo	[AFB ₁] > 5 ppb	UCL 3 σ	UCL 2 σ	Scarto 3 σ	Scarto 2 σ
Autunno 22	9,77%	10,24%	9,34%	-0,47%	0,43%
Inverno 23	7,41%	10,19%	9,30%	-2,78%	-1,90%
Primavera 23	5,18%	10,42%	9,46%	-5,24%	-4,28%
Estate 23	5,10%	10,86%	9,75%	-5,76%	-4,65%
Autunno 23	11,33%	10,61%	9,59%	0,72%	1,74%
Inverno 24	8,53%	10,30%	9,38%	-1,77%	-0,85%
Primavera 24	4,76%	10,45%	9,48%	-5,70%	-4,73%
Estate 24	6,20%	11,02%	9,86%	-4,82%	-3,66%
Autunno 24	6,60%	10,50%	9,51%	-3,90%	-2,91%
Inverno 25	5,16%	10,19%	9,30%	-5,03%	-4,14%
Primavera 25	8,06%	10,35%	9,41%	-2,29%	-1,35%
Estate 25	11,55%	10,37%	9,43%	1,18%	2,13%

Nell'analisi stagionale la proporzione media storica di riferimento rimane $\bar{p} = 7,535\%$, perché viene calcolata sullo stesso dataset. In questo caso 2 stagioni su 12 superano il limite a 3 sigma. La prima è Autunno 2023 con l'11,33% rispetto a un UCL3 del 10,61% (+0,72 punti percentuali). La seconda è Estate 2025, con l'11,55% e un UCL3 del 10,37% (+1,18 punti percentuali). Nonostante le due percentuali siano molto simili, Estate 2025 supera la soglia con più margine anche perché il relativo UCL3 è leggermente più basso (grazie ad un

maggior numero di campioni). Autunno 2022 (9,77%) supera invece solo l'UCL2 (9,34%), con una differenza di +0,43 punti percentuali (segnale debole).

Anche se Primavera 2025 è la primavera più critica del triennio (8,06%), non supera l'UCL2 del 9,41%. In questo caso l'aumento rispetto alle primavere precedenti, che era significativo nei t-test e nell'ANOVA, non rappresenta un'anomalia secondo i criteri della carta di controllo. Infine, Autunno 2024 (6,60%) si trova al di sotto di entrambe le soglie e lo stesso vale per primavera ed estate delle prime due annate.

Dunque i picchi statisticamente più robusti, cioè quelli che superano il limite a 3 sigma, sono ottobre 2022 e settembre 2025 (a livello mensile), Autunno 2023 ed Estate 2025 (a livello stagionale). Ottobre 2022 è il mese che contribuisce maggiormente al picco autunnale del 2022-2023, che però, considerato come stagione, supera solo la soglia a 2 sigma. Invece Autunno 2023, anche se ha un picco inferiore, risulta significativo a 3 sigma perché presenta più valori elevati distribuiti su più mesi. Invece il picco di settembre 2025 è così marcato da determinare da solo la significatività statistica della stagione estiva.

4.4 Risultati dell'analisi statistica

L'analisi statistica ha permesso di rispondere alla domanda principale dello studio, cioè se esista un andamento stagionale nella contaminazione da AFB₁ del mais in accettazione.

4.4.1 L'omogeneità delle prime due annate

La prima evidenza riguarda il livello di contaminazione complessivo che, nelle annate 2022-2023 e 2023-2024 risulta statisticamente indistinguibile ($t = -0,205$, $p = 0,838$ al t-test di Welch, confermato dal Tukey HSD con $p = 0,799$, $d = -0,017$). Al contrario, il 2024-2025 risulta significativamente più contaminato rispetto a entrambe ($t = -7,47$ e $t = -7,05$, entrambi $p < 0,001$, con $d = -0,211$ e $d = -0,194$). Inoltre, la quota di analisi con $[AFB_1] \leq 2$ ppb è quasi identica nelle prime due annate (87,47% e 87,68%), mentre nel 2024-2025 scende all'84,95%. La classe >10 ppb aumenta dal 3,64-3,88% nei primi due anni al 4,75% nel terzo, mentre la classe 3-5 ppb passa dal 3,06-2,71% al 4,57%.

Oltre a ciò, le annate 2022-2023 e 2023-2024 presentano un pattern stagionale coerente, nel quale autunno e inverno risultano più contaminati rispetto a primavera ed estate.

I risultati del t-test che confronta la media di ciascun mese con la media annuale mostrano che, nell'annata 2022-2023, i mesi statisticamente significativi sono:

- Ottobre ($t = 4,43$), significatività positiva con entrambe le correzioni per confronti multipli (Bonferroni e FDR);
- Gennaio ($t = 2,56$), significatività positiva con FDR ma non con Bonferroni;
- Luglio ($t = -10,83$), significatività negativa con entrambe le correzioni;
- Maggio ($t = -6,33$), significatività negativa con entrambe le correzioni;
- Giugno ($t = -2,53$), significatività negativa con FDR ma non con Bonferroni;
- Agosto ($t = -2,66$), significatività negativa con FDR ma non con Bonferroni.

Nell'annata 2023-2024 i mesi statisticamente significativi sono:

- Agosto ($t = -4,38$), significatività negativa con entrambe le correzioni;
- Dicembre ($t = 2,44$), significatività positiva solo con FDR.

Aprile, maggio e giugno mantengono valori di t negativi (come atteso dall'annata precedente) ma nessuno di questi raggiunge la significatività dopo la correzione.

I risultati del t-test che confronta la media delle stagioni con la media annuale mostrano che, nell'annata 2022-2023, le stagioni statisticamente significative sono:

- Autunno ($t = 3,94$), significatività positiva con entrambe le correzioni;
- Primavera ($t = -4,13$), significatività negativa con entrambe le correzioni;
- Estate ($t = -3,67$), significatività negativa con entrambe le correzioni;

L'inverno non raggiunge la significatività con nessuna delle due soglie ($t = 1,29$), anche se mantiene segno positivo.

Nell'annata 2023-2024 le stagioni statisticamente significative sono:

- Primavera ($t = -4,11$), significatività negativa con entrambe le correzioni;
- Autunno ($t = 2,66$) significatività positiva solo con FDR.

Inverno ed estate non raggiungono la significatività.

I t-test di Welch a coppie tra stagioni consentono classificare queste ultime sulla base del livello di contaminazione all'interno di ciascuna annata. Nel 2022-2023 l'ordine è il seguente:

- 1° Autunno (la più contaminata);
- 2° Inverno;
- 3° Primavera ed Estate a pari merito.

Il confronto tra primavera ed estate non è significativo ($t = -0,12$, $p = 0,905$) pertanto il terzo posto è condiviso. Il confronto tra autunno e inverno è significativo solo con FDR ($t = 2,16$, $p = 0,031$), ma non con Bonferroni, per cui le due stagioni fredde non presentano una separazione netta.

Nel 2023-2024 la classifica è la seguente:

- 1° Autunno e Inverno a pari merito;
- 2° Primavera ed Estate a pari merito.

In questo caso si osserva una suddivisione in due blocchi: stagioni calde e stagioni fredde.

Il Tukey HSD relativo all'interazione Stagione $\times$ Anno per l'annata 2022-2023 conferma i risultati dei t-test: l'autunno supera la primavera ($d = 0,288$), l'autunno supera l'estate ($d = 0,282$), l'inverno supera la primavera con $d = 0,176$.

Nel 2023-2024 l'autunno supera la primavera ($d = 0,241$) e l'inverno supera la primavera ($d = 0,177$). Tuttavia, a differenza del t-test, il Tukey non raggiunge la significatività nel confronto autunno-estate ($p = 0,070$).

Inoltre, non risultano esserci differenze statisticamente significative nel confronto della stessa stagione nelle due annate (2022-2023 e 2023-2024). Il Tukey HSD restituisce $p = 1,000$ e $d = 0,031$ per l'autunno, $p = 1,000$ e $d = -0,017$ per l'inverno, $p = 1,000$ e $d = -0,016$ per la primavera, $p = 0,995$ e $d = -0,066$ per l'estate. Questa uniformità indica che le due annate condividono lo stesso pattern stagionale e presentano anche livelli assoluti di contaminazione praticamente identici in ogni stagione.

La percentuale di analisi con $[AFB_1] > 2$ ppb nelle stagioni delle prime due annate è pari a:

- Autunno 2022 17,21%, Autunno 2023 15,56%;
- Inverno 2023 13,80%, Inverno 2024 14,01%;
- Primavera 2023 8,90%, Primavera 2024 8,29%;
- Estate 2023 8,26%, Estate 2024 all'11,24%.

A livello mensile, le percentuali più alte si registrano in:

- Ottobre 2022 (23,02%), con la classe > 10 ppb che contribuisce per il 9,28%;
- Dicembre 2023 (19,10%), con la classe > 10 ppb che contribuisce per il 7,54%.

La percentuale più bassa si osserva a luglio 2023 (1,47%), valore confermato anche dalla media mensile (0,350 ppb), che è la più bassa del dataset.

La P-chart ha confermato statisticamente la presenza di picchi anomali nel corso delle prime due annate:

- Ottobre 2022 supera il limite a 3 sigma (12,18%), con una percentuale di analisi > 5 ppb del 14,09%;
- Dicembre 2023 supera solo il limite a 2 sigma (11,28%), con una percentuale di analisi > 5 ppb del 12,56%;

Ottobre 2023 (10,67%), novembre 2023 (10,92%) e gennaio 2024 (10,48%) arrivano molto vicino all'UCL2, ma non lo superano per uno scarto di pochi punti percentuali.

A livello stagionale:

- Autunno 2023 supera il limite a 3 sigma (percentuale 11,33%, UCL3 = 10,61%);
- Autunno 2022 supera solo il limite a 2 sigma (percentuale 9,77%, UCL2 = 9,34%).

Quindi, complessivamente le prime due annate presentano un pattern stagionale coerente a livello statistico. Il blocco freddo (autunno e inverno), risulta più critico rispetto al blocco caldo (primavera e estate).

4.4.2 La divergenza della terza annata

L'annata 2024-2025 presenta invece un andamento stagionale opposto alle due precedenti. Le stagioni calde, che nelle prime due annate erano le meno problematiche, nella terza diventano le più critiche.

I risultati del t-test che confronta la media di ciascun mese con la media annuale mostrano che, nell'annata 2024-2025, i mesi statisticamente significativi sono:

- Settembre ($t = 8,32$), significatività positiva con entrambe le correzioni per confronti multipli;
- Maggio ($t = 3,82$), significatività positiva con entrambe le correzioni;
- Aprile ($t = 2,68$), significatività positiva con FDR ma non con Bonferroni;
- Giugno ($t = 2,44$), significatività positiva con FDR ma non con Bonferroni;
- Febbraio ($t = -9,48$), significatività negativa con entrambe le correzioni;
- Dicembre ($t = -6,71$), significatività negativa con entrambe le correzioni;
- Novembre ($t = -6,35$), significatività negativa con entrambe le correzioni;
- Gennaio ($t = -4,61$), significatività negativa con entrambe le correzioni.

Ottobre, luglio e agosto non raggiungono la significatività.

A livello stagionale:

- Autunno ($t = -5,85$), significatività negativa con entrambe le correzioni;
- Inverno ($t = -8,50$), significatività negativa con entrambe le correzioni;
- Primavera ($t = 5,07$), significatività positiva con entrambe le correzioni;

- Estate ($t = 6,59$), significatività positiva con entrambe le correzioni.

Il valore di t dell'inverno ($-8,50$) è il più basso in assoluto tra tutte le stagioni dei tre anni, mentre quello dell'estate ($6,59$) è il più alto.

Nel 2024-2025 la classifica stagionale è la seguente:

- 1° Estate e Primavera a pari merito;
- 2° Autunno e Inverno a pari merito.

Autunno e Inverno sono indistinguibili tra loro ($t = 0,85$, $p = 0,396$), così come Estate e Primavera ($t = -1,64$, $p = 0,102$). Si ripresenta la struttura a due blocchi, ma in questo caso le posizioni sono invertite.

L'analisi Tukey HSD dell'interazione Stagione $\times$ Anno mostra che, all'interno del 2024-2025, l'estate supera l'inverno ($d = 0,526$) e l'autunno ($d = 0,487$). Anche la primavera supera l'inverno ($d = 0,434$) e l'autunno ($d = 0,395$). I valori di Cohen's d rientrano negli effetti medi o vicini alla soglia degli effetti medi; questo indica una netta separazione tra i due blocchi.

Come detto, non risultano esserci differenze statisticamente significative nel confronto della stessa stagione nelle annate 2022-2023 e 2023-2024. In alcune stagioni, anche l'annata 2024-2025 mantiene livelli di contaminazione simili alle prime due. In particolare, i tre inverni risultano indistinguibili tra loro (Inverno 2022-2023 vs Inverno 2024-2025, $p = 0,659$; Inverno 2023-2024 vs Inverno 2024-2025, $p = 0,428$). Anche gli autunni presentano variazioni limitate, sebbene Autunno 2022-2023 risulti leggermente superiore ad Autunno 2024-2025 ($p = 0,038$, $d = 0,170$, effetto piccolo). Invece, nelle stagioni calde si osserva un cambiamento marcato nella terza annata. Primavera 2024-2025 supera le primavere precedenti con $d = -0,513$ rispetto al 2022-2023 e $d = -0,497$ rispetto al 2023-2024. Estate 2024-2025 supera le estati precedenti con $d = -0,599$ rispetto al 2022-2023 e $d = -0,534$ rispetto al 2023-2024. Anche in questo caso, i valori di Cohen's d indicano effetti di media entità. Dunque non è il blocco freddo a diminuire: il cambiamento del pattern dipende quasi esclusivamente dal comportamento anomalo delle stagioni calde.

Anche i confronti trasversali tra stagioni e anni diversi confermano questo cambiamento. Estate 2024-2025 risulta significativamente più contaminata di qualsiasi stagione delle prime due annate. Il confronto con Autunno 2022-2023 produce $d = -0,317$ ($p < 0,001$), mentre quello con Autunno 2023-2024 produce $d = -0,348$ ($p < 0,001$). Il confronto con

Primavera 2022-2023 (la stagione meno critica del primo anno) produce $d = -0,605$ ($p < 0,001$), mentre quello con Primavera 2023-2024 produce $d = -0,589$ ($p < 0,001$). Anche Primavera 2024-2025 supera significativamente tutte le stagioni degli anni precedenti.

La percentuale di analisi con $[AFB_1] > 2$ ppb nelle stagioni dell'annata 2024-2025 è pari a:

- Estate 2025 22,85%;
- Primavera 2025 18,14%;
- Autunno 2024 10,67%;
- Inverno 2025 8,98%.

A livello mensile, l'aumento nella seconda parte dell'annata è quasi continuo:

- Aprile 2025 16,23%;
- Maggio 2025 19,60%;
- Giugno 2025 18,64%;
- Luglio 2025 17,06%;
- Agosto 2025 17,27%;
- Settembre 2025 31,60%.

Mentre a settembre prevale la classe >10 ppb (che contribuisce per il 12,70%) rispetto alla classe 3-5 ppb (8,79%); a maggio, sul totale del 19,60%, prevale la classe 3-5 ppb (9,60%), con la quota >10 ppb che si ferma al 3,20%. Ciò significa che a settembre è presente sia una contaminazione di livello elevato sia una contaminazione di livello intermedio. Invece a maggio la contaminazione è diffusa ma meno estrema.

I mesi meno critici sono novembre (7,14%) e dicembre 2024 (6,85%). Quindi, nella terza annata, il minimo di contaminazione si verifica in inverno.

La P-chart ha confermato statisticamente i seguenti picchi:

- Settembre 2025 supera il limite a 3 sigma (12,06%), con una percentuale di analisi >5 ppb del 17,26%;
- Ottobre 2024 supera il limite a 2 sigma (10,84%), con una percentuale di analisi >5 ppb del 10,98%. In questo caso lo scarto è di soli +0,14 punti percentuali, ciò significa che il picco è statisticamente significativo ma piuttosto debole.

A livello stagionale:

- Estate 2025 supera il limite a 3 sigma (10,37%), con una percentuale dell'11,55%;

Primavera 2025 (8,06%), anche se è la primavera più critica del triennio, non raggiunge l'UCL2 (9,41%), e quindi non rappresenta un'anomalia rispetto alla media storica complessiva (a differenza di quanto osservato nel t-test stagione vs media annuale). L'Autunno 2024 (6,60%), resta anch'esso al di sotto di entrambe le soglie.

4.4.3 Considerazioni conclusive sulla stagionalità

Nel complesso la stagionalità esiste, ma si manifesta molto diversamente a seconda dell'annata. L'ANOVA a due vie ha infatti evidenziato un effetto principale della stagione statisticamente significativo ($F(3, 8972) = 3,100$, $p = 0,026$). Ciò significa che, considerando insieme i tre anni, le stagioni presentano livelli di contaminazione diversi. Tuttavia, la dimensione dell'effetto è molto piccola: $\omega^2 = 6,780 \times 10^{-4}$, cioè meno dello 0,1% della varianza totale. Questo risultato è confermato dai test post-hoc di Tukey HSD che, confrontando le medie stagionali aggregate del triennio, non sono riusciti ad identificare alcuna coppia di stagioni significativamente diversa. Il *p-value* più basso tra i sei confronti riguarda estate e inverno ($p = 0,054$), che però è comunque superiore alla soglia di significatività. Inoltre tutti i Cohen's d sono di entità trascurabile, con un massimo di 0,078.

Osservando l'interazione Stagione $\times$ Anno ($F(6, 8972) = 37,880$, $p < 0,001$, $\omega^2 = 0,024$), si nota come la sua dimensione dell'effetto sia circa 35 volte superiore a quella dell'effetto principale della stagione e quasi 3 volte superiore a quella dell'anno ($\omega^2 = 0,009$). Questo significa che il livello di contaminazione di una stagione varia a seconda dell'anno considerato. Non c'è un *pattern* stagionale che si ripeta stabilmente nel triennio. Quando i *pattern* delle diverse annate vengono analizzati insieme, le loro strutture opposte tendono a compensarsi, riducendo la dimensione dell'effetto principale della stagione (per quanto formalmente significativo).

Va precisato che, nonostante questi *pattern*, il livello complessivo di contaminazione rimane sempre sotto controllo. Nel triennio, l'86,64% delle analisi presenta valori di AFB₁ inferiori alla soglia interna di 2 ppb, con una media complessiva di 1,427 ppb e una mediana di 0,3 ppb. Anche nei periodi più critici, come Autunno 2023 ed Estate 2025, la maggior parte delle partite risulta conforme.

4.5 Discussione dei risultati

Per provare ad interpretare i *pattern* osservati è necessario conoscere la biologia del mais e il suo ciclo produttivo nelle aree di provenienza che Progeo utilizza maggiormente per l'approvvigionamento delle materie prime, ossia l'Est Europa (es. Romania e Ungheria). In quest'area, la semina del mais avviene in primavera, tra aprile e maggio. La fase di granigione, che è il momento più suscettibile all'infezione da *Aspergillus flavus*, si verifica tra luglio e agosto. Infine, la raccolta si effettua generalmente tra settembre e ottobre (a seconda della *cultivar* e dell'andamento stagionale). Dopo la raccolta, la granella viene essiccata fino a raggiungere il contenuto di umidità adatto alla conservazione ($\leq 13-14\%$). Solo successivamente può essere stoccato e immesso nel circuito commerciale.

Il mais di nuova raccolta, indicativo delle condizioni colturali dell'annata in corso, entra nel mercato a partire da ottobre-novembre e dunque rappresenta la quota principale delle forniture ricevute da Progeo nei mesi autunnali. In questo periodo, le partite analizzate in accettazione riflettono la distribuzione "grezza" della contaminazione dell'annata, comprensiva sia di lotti poco o per nulla contaminati sia di lotti dalla contaminazione più elevata, prima che eventuali processi di selezione abbiano avuto il tempo di agire. Subito dopo la raccolta, infatti, la variabilità qualitativa delle forniture è massima, e in ingresso può arrivare una percentuale maggiore di lotti *borderline*.

Il mais consegnato nei mesi successivi proviene invece da scorte già selezionate e sottoposte a stoccaggio. I lotti più contaminati sono stati esclusi o indirizzati verso altri canali. Ciò significa che il mais è più filtrato, e quindi il livello medio di contaminazione tende a ridursi.

Questo meccanismo potrebbe spiegare, almeno in parte, il *pattern* stagionale osservato nelle prime due annate, dove autunno e inverno risultano più contaminati rispetto a primavera ed estate.

Per quanto riguarda invece le variazioni nel livello assoluto di contaminazione tra un'annata e l'altra, queste dipendono principalmente dalle condizioni climatiche della stagione colturale precedente. Come già descritto nel paragrafo 2.8, in questo caso il fattore climatico più importante per la produzione di AFB₁ da parte di *A. flavus* è la combinazione tra stress idrico e temperature elevate.

Anche se è vero che il mais consegnato nella seconda parte dell'anno dovrebbe presentare mediamente una qualità migliore grazie ad una maggiore selezione, quest'ultima non implica necessariamente che il prodotto rimasto in stoccaggio mantenga la stessa qualità nel tempo. Come discusso nel paragrafo 2.9, un mais conservato per mesi e consegnato in estate può presentare un livello di contaminazione diverso da quello iniziale, soprattutto se le condizioni di conservazione non sono state ottimali. Quindi, mentre da un lato, grazie alla selezione, vengono eliminati i lotti peggiori, dall'altro può verificarsi un deterioramento del cereale durante lo stoccaggio. In particolare, questo secondo meccanismo spiegherebbe l'anomalia osservata nell'annata 2024-2025, nella quale il picco di contaminazione si verifica in estate.

Con l'aumento delle temperature primaverili ed estive, le condizioni all'interno dei sistemi di stoccaggio diventano sempre più favorevoli alla crescita fungina, soprattutto se i lotti sono già in parte contaminati. Il picco dell'annata 2024-2025 si verifica a settembre, proprio quando il mais raccolto nel 2024 raggiunge la massima età commerciale (11-12 mesi di stoccaggio). Nello stesso periodo i fornitori tendono anche a smaltire le ultime scorte dell'annata precedente in vista del nuovo raccolto. È quindi probabile che i lotti consegnati in questa fase siano le rimanenze finali dei magazzini dei conferenti. Spesso si tratta di partite rimaste invendute o rinviate (perché potenzialmente già vicine ai limiti di accettabilità) che vengono immesse sul mercato prima dell'arrivo della nuova produzione.

Comunque, è necessario precisare che queste interpretazioni sono solo ipotetiche, in quanto non possono essere verificate con i soli dati di accettazione disponibili. Per rispondere con certezza, sarebbe necessario includere nell'analisi anche le informazioni sull'origine geografica dei lotti, sulle condizioni di stoccaggio presso i fornitori, sulle modalità di essiccazione e sui parametri climatici delle aree di produzione. Questi risultati rappresentano quindi un punto di partenza per eventuali approfondimenti futuri.

4.6 Implicazioni pratiche per la gestione degli approvvigionamenti

L'analisi del triennio evidenzia come l'effetto dell'interazione Stagione × Anno sia nettamente prevalente rispetto alla componente stagionale. Sebbene questo risultato fornisca un'indicazione gestionale importante, deve essere interpretato con cautela. Un periodo di tre anni, anche se basato su un numero elevato di determinazioni analitiche di AFB₁ (in questo caso 8.984), è infatti ancora troppo breve per confermare *trend* stagionali strutturali. Inoltre, i dati analizzati nel presente studio non sono stati stratificati per origine geografica o fornitore; ciò ha impedito di isolare l'eventuale effetto di tali variabili dall'andamento generale. I risultati indicano tuttavia con sufficiente chiarezza che un piano di controllo rigido, basato sull'idea che autunno e inverno siano le uniche stagioni a rischio, risulterebbe inefficace. Un approccio di questo tipo avrebbe infatti funzionato nelle prime due annate, ma avrebbe fallito nella terza, quando il rischio si è spostato verso la primavera e l'estate. La sorveglianza in accettazione dovrebbe quindi seguire un modello dinamico, capace di individuare tempestivamente eventuali anomalie nel corso dell'annata e di adeguare l'intensità dei controlli di conseguenza.

I dati suggeriscono inoltre che i picchi di contaminazione osservati a fine estate potrebbero essere correlati alla prolungata permanenza del prodotto in stoccaggio. Ad esempio, il picco rilevato a settembre 2025 è probabilmente riconducibile a partite di mais raccolte 11-12 mesi prima. Sebbene siano necessarie ulteriori indagini su *dataset* più ampi e stratificati per confermare questa dinamica, è opportuno tenere in considerazione il possibile ruolo del tempo di stoccaggio nella contaminazione da AFB₁. Le partite più vecchie potrebbero presentare un rischio maggiore in quanto esposte per un periodo prolungato a condizioni ambientali non sempre ottimali, soprattutto durante i mesi estivi, quando le temperature elevate possono accelerare lo sviluppo fungino. Un'attenzione particolare dovrebbe inoltre essere riservata alle consegne effettuate nelle settimane immediatamente precedenti il nuovo raccolto, quando aumenta la probabilità di ricevere scorte residue precedentemente accantonate in quanto *borderline*.

Il mais in ingresso nei mesi della raccolta (ottobre e novembre) riflette invece la distribuzione grezza dell'annata, non ancora filtrata dalle selezioni commerciali. In questa fase, l'eterogeneità dei lotti in accettazione è presumibilmente massima. Indipendentemente dalla gravità complessiva dell'annata, è pertanto importante mantenere una frequenza di campionamento elevata per evitare di mancare le partite a rischio.

È tuttavia necessario precisare che, anche nelle annate peggiori, la maggior parte delle partite risulta comunque conforme. Di conseguenza, non sembra necessario procedere a una revisione generale dei criteri di accettazione. È invece più opportuno intensificare i controlli nei segmenti temporali potenzialmente più vulnerabili, mantenendo allo stesso tempo un approccio flessibile. Ogni annata può infatti presentare dinamiche differenti, pertanto la strategia di sorveglianza dovrebbe essere adattata all'andamento osservato nel corso della stagione.

5. Metodologie analitiche impiegate nella sperimentazione

5.1 Determinazione delle aflatossine totali

La determinazione delle aflatossine totali nei campioni analizzati durante le prove sperimentali è stata effettuata con il metodo *lateral flow* su *strip*. Come già detto, questa è la tecnica utilizzata in azienda per le analisi di autocontrollo sul mais in accettazione. Il principio di funzionamento e la procedura analitica sono già stati descritti nel dettaglio nel paragrafo 4.1, al quale si rimanda.

Durante la seconda fase sperimentale, alcuni campioni hanno mostrato livelli di AFB₁ superiori al limite massimo di rilevabilità del metodo *lateral flow* (40 ppb). Per ottenere una quantificazione accurata, si è quindi resa necessaria una procedura di diluizione. Invece che analizzare 40 g di campione (come previsto dal protocollo), è stata utilizzata una quantità inferiore di granella contaminata, integrata con mais non contaminato da aflatossine (precedentemente testato), fino a raggiungere la massa di 40 g richiesta dalla procedura. Questo ha permesso di mantenere l'effetto matrice previsto dalla curva di calibrazione del robot ALFA Nano. Il valore reale di AFB₁ è stato poi calcolato moltiplicando il valore rilevato per il fattore di diluizione (pari al rapporto tra la massa totale analizzata, ossia 40 g, e la massa di campione contaminato utilizzata). Quest'ultimo non era fisso, ma veniva scelto empiricamente in base al livello di contaminazione atteso. Se la prima diluizione risultava insufficiente a rientrare nel range di misura, si effettuavano ulteriori passaggi di diluizione.

È importante specificare che una diluizione eccessiva riduce l'accuratezza del risultato analitico. Innanzitutto perché si verifica una propagazione dell'errore: dal momento che il valore rilevato viene moltiplicato per il fattore di diluizione, anche piccole variazioni o errori casuali (nella pesata o nella lettura dello strumento) vengono amplificati. Inoltre, quando la quantità di granella contaminata viene ridotta eccessivamente rispetto a quella pulita, aumenta il rischio di ottenere un campione poco rappresentativo, soprattutto considerando la disomogeneità con la quale le aflatossine si distribuiscono nella matrice. Per ovviare a questo problema, nei casi in cui era necessario prelevare una quantità molto ridotta di granella contaminata, non si è effettuato il campionamento diretto di tale quota. Si è scelto invece di prelevare una porzione maggiore di campione, successivamente omogeneizzata mediante macinazione fine. Dall'omogenizzato sono stati poi pesati i grammi necessari per

la diluizione. La macinazione permette infatti di distribuire uniformemente la contaminazione su tutta la massa. In questo modo, la frazione prelevata dall'omogenizzato risulta più rappresentativa del livello medio di contaminazione del campione originario.

Nel corso della seconda fase sperimentale è emersa un'ulteriore necessità operativa: ridurre la massa dei sottocampioni analizzati rispetto alla quantità standard prevista dal metodo. A causa della natura distruttiva delle analisi, infatti, in alcuni casi la matrice si stava esaurendo e non era possibile prelevare i 40 g nominali. Per superare questo limite, si è scelto di ridurre proporzionalmente il volume del solvente di estrazione. Come descritto nel paragrafo 4.1, il protocollo ufficiale prevede la miscelazione di 40 g di campione macinato in 200 mL di AQUA PreMix, di norma erogati in automatico dal robot ALFA Nano (SafeFood). Nei casi in cui la quantità di campione era limitante, è stato aggiunto manualmente un volume di solvente proporzionale ai grammi effettivi di sottocampione disponibile, così da mantenere il corretto rapporto matrice/solvente. Questa operazione è stata eseguita manualmente perché non era possibile modificare le impostazioni del robot per fargli erogare volumi diversi da quello standard. Conseguentemente, anche le fasi successive sono state svolte al di fuori del sistema automatizzato. Il campione è stato agitato per circa 2 minuti, poi filtrato e, infine, sono stati prelevati 100 μ L di estratto per l'inoculo sulla *strip*. Allo stesso modo, anche la lettura della *strip* ha richiesto un adattamento della procedura: l'analisi in tempo reale tramite la telecamera del robot è stata sostituita con l'impiego di un lettore ottico portatile. In questo caso, la quantificazione veniva effettuata dopo aver lasciato sviluppare la *strip* per 5 minuti su una superficie piana.

5.2 Determinazione della Carica Batterica Totale (CBT)

La Carica Batterica Totale (CBT) è un indicatore microbiologico che rappresenta il numero Unità Formanti Colonia (UFC) di batteri aerobi mesofili presenti in un campione. A livello normativo, non esiste un limite massimo numerico per la CBT delle derrate ad uso zootecnico. Come descritto nel paragrafo 2.11, il Regolamento europeo sulla sicurezza dei mangimi preferisce concentrarsi sulla ricerca di specifici pericoli biologici o chimici (come patogeni e micotossine) piuttosto che sul conteggio complessivo dei microrganismi.

Tuttavia, va precisato che l'articolo 15 del Regolamento (CE) n. 178/2002 (che stabilisce i requisiti di sicurezza dei mangimi) vieta l'immissione sul mercato di mangimi considerati non

sicuri. Ciò significa che, quando la carica batterica è talmente elevata da rendere il prodotto visibilmente alterato nel colore o nell'odore, tale prodotto è da considerarsi non idoneo al consumo animale.

La CBT è quindi uno dei parametri microbiologici che Progeo utilizza come indicatore di igiene e di corretta conservazione delle materie prime e dei mangimi. In *Tabella 25* sono riportati i valori di riferimento indicativi per la granella di mais.

Tab. 25 – Valori di riferimento per la CBT della granella di mais

Parametro	Stato	Valore indicativo (UFC/g)
Carica Batterica Totale (CBT)	Normale	10^5-10^6
	Elevata	$> 10^7$

Nelle prove sperimentali, la CBT è stata determinata seguendo la procedura adottata dal laboratorio aziendale, che consiste nella conta delle colonie batteriche vitali ottenute seminando su piastra diluizioni seriali del campione.

5.2.1 Materiali e reagenti

- Stomacher;
- Provette 16x160 con radial cup;
- Piastre Petri sterili;
- Pipette sterili;
- Cilindro da 250 mL sterile;
- Flacone da microbiologia.

Per la diluizione del campione si utilizza la Soluzione di Ringer, ottenuta sciogliendo una compressa di Ringer (MERCK 15525) in 500 mL di acqua distillata. La soluzione viene poi sterilizzata a 121 °C per 15 minuti. Il terreno di coltura è lo Standard Plate Count Agar (APHA) OXOID CM463, che viene preparato in flaconi da 500 mL su ancoretta magnetica, seguendo le istruzioni del fornitore. Anch'esso deve essere sterilizzato a 121 °C per 15

minuti; poi va lasciato raffreddare a bagnomaria fino a 45-50 °C per non danneggiare la vitalità batterica (pur evitando la solidificazione).

5.2.2 Procedimento

Sotto cappa si pesano 25 g di campione all'interno del sacchetto da stomacher e si aggiungono 225 mL di Soluzione di Ringer sterile a temperatura ambiente. In questo modo si ottiene la diluizione 1:10, che va omogeneizzata con lo stomacher a velocità normale per 60 secondi. Poi si lascia sedimentare per 10-15 minuti.

A partire dalla diluizione 1:10, le diluizioni decimali successive (1:100, 1:1000, ecc.) si ottengono trasferendo 1 mL di ciascuna diluizione in una provetta contenente 9 mL di Soluzione di Ringer. Il numero di diluizioni seriali da effettuare viene stabilito in base alla presunta carica batterica del campione. In seguito, ogni diluizione viene seminata trasferendo 1 mL su una piastra Petri sterile appositamente contrassegnata. Infine, in ogni piastra vengono aggiunti 15-20 mL di terreno che vanno poi miscelati con movimento a forma di 8.

5.2.3 Condizioni di incubazione

Le piastre vanno incubate a 30 °C per 48 ore in posizione capovolta, per evitare la caduta di gocce di condensa sulle colonie in crescita.

5.2.4 Lettura e calcolo dei risultati

Dopo il periodo di incubazione, si procede al conteggio delle colonie. I risultati più attendibili si ottengono quando la piastra presenta un numero di colonie compreso tra 30 e 300. Il numero minimo considerato accettabile è di 4 colonie per piastra. I risultati, espressi in Unità Formanti Colonia per grammo (UFC/g), si calcolano con la seguente formula:

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

Dove:

- ΣC = somma delle UFC contate su tutte le piastre valide
- n_1 = numero di piastre valide alla prima diluizione considerata
- n_2 = numero di piastre valide alla seconda diluizione
- d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata

5.3 Determinazione della Carica Micotica Totale (CMT)

La Carica Micotica Totale (CMT) indica il numero di Unità Formanti Colonie (UFC) di muffe e lieviti presenti in un campione, ed è un parametro fondamentale per la valutazione della qualità igienico-sanitaria di materie prime e mangimi. Anche in questo caso, non esiste un limite massimo numerico imposto a livello normativo per la CMT delle derrate ad uso zootecnico, pertanto i valori riportati in *Tabella 26* sono da considerarsi indicativi.

Tab. 26 – Valori di riferimento per la CMT della granella di mais

Parametro	Stato di qualità	Valore indicativo (UFC/g)
Carica Micotica Totale (CMT)	Ottimo/Buono	$< 10^4$
	Discreto	10^4-10^5
	Alterato/A rischio	$> 10^5$

Nelle prove sperimentali, la CMT è stata determinata seguendo la procedura adottata dal laboratorio aziendale. In questo caso, strumentazione, vetreria e preparazione del diluente (Soluzione di Ringer, MERCK 15525) sono le medesime descritte nel paragrafo 5.2.

5.3.1 Terreno di coltura

A differenza della CBT, la CMT prevede l'utilizzo del terreno Rose-Bengal Chloramphenicol Agar Base (OXOID CM549). Si tratta di un terreno selettivo specifico per la conta di muffe e lieviti, in grado di inibire la crescita batterica. Il Rose-Bengal limita la diffusione radiale delle muffe a rapido accrescimento in modo tale da facilitare il conteggio delle colonie. La selettività verso i batteri è dovuta principalmente alla presenza di Cloramfenicolo (OXOID SR 078E), un antibiotico ad ampio spettro che va incorporato al terreno prima della

solidificazione (previa solubilizzazione in etanolo). Anche in questo caso il terreno viene preparato su agitatore magnetico all'interno di flaconi da microbiologia e sterilizzato a 121°C per 15 minuti. Viene poi raffreddato a bagnomaria fino a 45-50 °C. In ogni piastra si versano 15-20 mL di terreno.

5.3.2 Procedimento

Le diluizioni decimali vengono preparate con le stesse modalità già descritte per la CBT: pesata di 25 g di campione, aggiunta di 225 mL di diluente (Ringer) sterile a temperatura ambiente, omogeneizzazione tramite stomacher per 60 secondi a velocità normale e sedimentazione per 10-15 minuti. Per ogni diluizione viene seminato 1 mL su una piastra Petri sterile. Infine, si aggiunge il terreno Rose-Bengal, da miscelare con movimento a forma di 8.

5.3.3 Condizioni di incubazione e calcolo dei risultati

La procedura adottata dal laboratorio aziendale prevede l'incubazione delle piastre a 25°C per 5 giorni in posizione capovolta. Tuttavia, per le prove sperimentali è stata utilizzata una temperatura di 28°C. Questa scelta è legata alla potenziale presenza nei campioni di muffe del genere *Aspergillus*, la cui crescita ottimale avviene a temperature più elevate rispetto alla maggior parte dei miceti ambientali.

La lettura e il calcolo dei risultati (espressi in UFC/g) seguono gli stessi criteri della CBT.

5.4 Determinazione del contenuto di umidità

Come discusso nel paragrafo 4.1, la procedura aziendale per la quantificazione del contenuto di umidità del mais in fase di accettazione prevede l'utilizzo del GAC. Questo strumento permette infatti di ottenere un risultato in tempi molto rapidi (una misura richiede pochi secondi), senza distruggere il campione. Tali caratteristiche lo rendono ideale per il controllo delle materie prime in ingresso, dove i tempi di risposta devono essere compatibili con la logistica degli autotreni in attesa. Tuttavia, per una misura più accurata, il laboratorio Progeo dispone anche di una termobilancia, che determina il contenuto di umidità valutando

direttamente la perdita d'acqua del campione durante l'essiccazione. Per le prove sperimentali, si è scelto quindi di adottare quest'ultimo metodo al fine di garantire una maggiore affidabilità dei dati.

Il principio di funzionamento si basa sull'evaporazione dell'acqua libera presente nel tessuto vegetale in seguito al riscaldamento. La conseguente perdita di peso del campione viene registrata in continuo dallo strumento. Il modello impiegato è il THERMO120 della ORMA Scientific Instruments, che sfrutta una lampada alogena per il riscaldamento del campione (*Figura 30*). Per ottimizzare il processo ed evitare un riscaldamento solo superficiale del chicco, la granella deve essere preventivamente macinata. Allo scopo, non è però possibile impiegare un mulino elettrico in quanto l'elevata velocità di rotazione dei martelli riscalderebbe eccessivamente il materiale, portandolo a perdere umidità prima del dovuto. Pertanto, va utilizzato un mulino manuale a manovella.



Fig. 30 – Termobilancia THERMO120 (ORMA Scientific Instruments) con lampada alogena.

Una volta ottenuto lo sfarinato, si procede il prima possibile con il prelievo dell'aliquota da analizzare, per limitare lo scambio di umidità con l'ambiente circostante. Il quantitativo previsto dalla procedura è pari a 5-10 g, da pesare direttamente sul piatto in alluminio dello strumento. In questa fase, è fondamentale distribuire il materiale su tutta la superficie del

piatto, per evitare la formazione di uno strato troppo spesso che potrebbe compromettere l'omogeneità della temperatura.

La temperatura di essiccazione è stata impostata a 150 °C. La misurazione si conclude automaticamente quando il peso del campione si stabilizza, cioè quando non c'è più evaporazione; nello specifico, lo strumento considera l'analisi terminata quando, in un intervallo di 10 secondi, la variazione di massa risulta inferiore a 1 mg.

La percentuale di umidità viene calcolata automaticamente rispetto al peso fresco del campione, secondo la seguente formula:

$$Umidità (\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100$$

Dove:

- m_i = massa iniziale prima del riscaldamento
- m_f = massa finale al termine dell'essiccazione

La termobilancia è più affidabile rispetto al GAC perché misura la perdita d'acqua, però è più lenta: un'analisi può richiedere da alcuni minuti fino a mezz'ora a seconda della matrice e della temperatura scelta. A tal proposito va precisato che, se si sceglie una temperatura troppo alta, oltre all'acqua rischiano di evaporare anche alcune sostanze volatili; inoltre il materiale potrebbe andare incontro a degradazioni termiche. In questo caso, si rischia di calcolare un livello di umidità superiore a quello reale.

5.5 Considerazioni sulla natura distruttiva delle analisi

Un elemento comune a tutte le metodologie descritte nei paragrafi precedenti è la loro natura distruttiva. Ciò significa che ogni analisi comporta il consumo del campione utilizzato, che non potrà essere impiegato per ulteriori verifiche.

Poiché le analisi sono state ripetute a intervalli regolari nel tempo, è stato necessario definire fin dall'inizio una quantità di materiale per replica sufficiente a garantire la disponibilità del campione per tutta la durata della prova.

Inoltre, la natura distruttiva ha reso complicata la gestione dei risultati anomali o incerti. Infatti, in quei casi, ripetere l'analisi per verificarne l'esattezza limitava la disponibilità di materiale per le prove successive. Per questo motivo, si valutava sempre con attenzione se utilizzare o meno il campione residuo per confermare un risultato.

6. Prima fase sperimentale – Stoccaggio del mais a lungo termine

6.1 Caratterizzazione dei campioni

La prima fase sperimentale ha previsto lo stoccaggio a lungo termine della granella di mais in condizioni ambientali critiche. Per la prova sono state utilizzate due diverse tipologie di campioni: mais non trattato, tal quale (che d'ora in poi verrà indicato come NT), e mais trattato con un conservante (indicato come T).

Il campione T è stato trattato con un formulato liquido a base di ammonio propionato e acido propionico, alla dose di 0,5 g/kg, ossia il dosaggio minimo raccomandato dal produttore (0,5 kg/tonnellata). Il trattamento è stato effettuato presso l'impianto di Progeo, prima dell'ingresso della granella nel silo, tramite nebulizzazione del prodotto attraverso un sistema di dosaggio automatico integrato nel circuito di carico. Il campione T è stato quindi raccolto dalla cella di stoccaggio del mais trattato. Anche se è probabile che il trattamento fosse stato effettuato poco tempo prima del campionamento (considerando il rapido turnover delle celle legato ai ritmi produttivi dell'impianto), non è stato possibile determinare l'esatta data di applicazione.

Inoltre, a causa di vincoli operativi, NT e T derivano da partite di mais differenti. Infatti, l'ottenimento di un campione non trattato dallo stesso lotto di origine del campione T (ossia prima che a quest'ultimo venisse applicato il conservante) avrebbe richiesto l'arresto momentaneo del circuito di carico dell'impianto. Anche un trattamento manuale in laboratorio non era praticabile: data la limitata quantità di granella prevista per la prova e la ridotta dose di conservante da applicare, risultava impossibile distribuire uniformemente il prodotto. Il campione NT proviene quindi da una cella diversa, nella quale era stoccato mais non trattato.

Questa condizione implica che eventuali differenze osservate tra NT e T potrebbero dipendere, almeno in parte, da caratteristiche intrinseche delle due partite. Ad esempio, i due campioni potrebbero appartenere a cultivar o ibridi differenti; oppure le condizioni di coltivazione, raccolta e stoccaggio potrebbero non essere state esattamente le medesime. I due campioni presentavano leggere differenze morfologiche, tuttavia non sufficienti a stabilire se fossero dovute a varietà o ibridi diversi oppure alla normale variabilità intra-varietale.

Per ogni tipologia di campione sono state preparate due repliche: NT1 e NT2 per il mais non trattato, T1 e T2 per il mais trattato. La presenza di due repliche è stata utile per distinguere i valori anomali dalla tendenza reale.

Prima dell'inizio dello stoccaggio, i quattro campioni sono stati caratterizzati per i seguenti parametri (gli stessi monitorati ad intervalli regolari durante la prova): contenuto di umidità (%), aflatossine totali (ppb), Carica Batterica Totale (CBT, UFC/g) e Carica Micotica Totale (CMT, UFC/g). I valori rilevati al tempo zero (T0) sono riportati in *Tabella 27*.

Tab. 27 – Caratterizzazione dei campioni al T0

Giorno	Campione	Umidità (%)	AFB ₁ (ppb)	CBT (UFC/g)	CMT (UFC/g)
0	NT1	12,95	0,8	323500	290500
0	NT2	13,41	0,5	157500	135000
0	T1	12,68	0,5	173273	8391
0	T2	12,95	0,5	955000 (*)	17591

(*) Valore medio di più repliche; i singoli risultati sono riportati nel testo.

All'inizio della prova, i 4 campioni presentavano tutti un'umidità comparabile, compresa tra il 12,68% e il 13,41%, un range idoneo per lo stoccaggio del mais a lungo termine. I livelli di AFB₁ erano molto bassi in tutti i campioni, compresi tra 0,5 e 0,8 ppb. Si tratta di valori inferiori al limite di quantificazione (LOQ = 2 ppb). Ciò significa che la contaminazione era talmente bassa da rendere la quantificazione non affidabile con il metodo *lateral flow*. In ogni caso, non erano presenti differenze significative nella concentrazione di tossina tra i campioni.

La CBT era invece molto variabile, sia tra i gruppi sia all'interno dei gruppi. NT1 presentava 323.500 UFC/g, NT2 157.500 UFC/g, T1 173.273 UFC/g e T2 955.000 UFC/g. In particolare, quest'ultimo valore risulta più elevato rispetto agli altri. Questa variabilità è però piuttosto comune quando si analizzano matrici solide eterogenee come la granella di mais. Infatti, il risultato può essere notevolmente alterato dalla presenza di un singolo chicco molto contaminato all'interno del sottocampione analizzato. Per scrupolo, la CBT di T2 è stata ripetuta una seconda volta; in effetti, 955.000 UFC/g è in realtà il valore medio di due diverse misure: 1.220.000 e 690.000 UFC/g. Come discusso nel paragrafo 5.5, la natura distruttiva

delle analisi richiedeva un utilizzo attento del campione disponibile; tuttavia, trattandosi della caratterizzazione iniziale, si è scelto di procedere alla replica, sebbene T2 costituisse già un duplicato di T1. In ogni caso, tutti i valori rientravano all'interno del range di normalità microbiologica per la granella di mais a uso zootecnico, ossia 10^5 – 10^6 UFC/g, entità che corrisponde alla microflora ambientale della matrice al momento del raccolto. Nonostante ciò, l'elevata variabilità non ha consentito di identificare differenze chiare nella CBT tra mais trattato e non trattato al tempo zero.

Per quanto riguarda la CMT, era invece presente una certa differenza tra campioni non trattati (NT1 = 290.500 UFC/g, NT2 = 135.000 UFC/g) e trattati (T1 = 8.391 UFC/g, T2 = 17.591 UFC/g). Questi ultimi mostravano infatti valori più bassi, di circa 1-2 ordini di grandezza. Tale disparità potrebbe indicare la presenza di un effetto antifungino del conservante già al momento del campionamento iniziale. Tuttavia, poiché NT e T derivano da partite differenti, la differenza potrebbe anche essere dovuta ad una diversa carica micotica iniziale delle due partite. Al giorno 0, i campioni non trattati si posizionavano già all'interno del range considerato "a rischio" ($> 10^5$ UFC/g), a differenza dei campioni trattati, che presentavano invece valori inferiori o poco superiori a 10^4 UFC/g.

6.2 Condizioni di stoccaggio

Per mantenere i campioni in condizioni climatiche controllate, è stato utilizzato un incubatore da laboratorio a convezione naturale, nello specifico il Memmert BM 500, dotato di una camera interna in acciaio inossidabile da 108 L ($560 \times 480 \times 400$ mm). La temperatura è stata impostata a 28 °C, per riprodurre le condizioni termiche che possono verificarsi all'interno dei silos nella stagione estiva. Il termostato dell'incubatore ha una precisione di impostazione pari a $\pm 0,5$ °C.

L'incubatore non dispone di un sistema di controllo dell'umidità relativa (UR); pertanto, per raggiungere il livello di UR desiderato (80-85%), è stata posizionata sul fondo della cella una vaschetta in alluminio di circa 40×30 cm. La vaschetta era a contatto con le serpentine riscaldanti, in maniera tale da favorire l'evaporazione dell'acqua. La dimensione scelta garantiva una superficie per l'evaporazione sufficiente a mantenere il livello di UR desiderato. Grazie a rabbocchi periodici (indicativamente una volta alla settimana), il livello dell'acqua rimaneva sempre al di sopra di una linea di riferimento tracciata sulla parete della vaschetta.

Il monitoraggio della temperatura e dell'umidità relativa è stato effettuato tramite un termoigrometro digitale. La temperatura veniva verificata anche attraverso il termometro dell'incubatore. Le condizioni sono rimaste piuttosto stabili durante lo stoccaggio: la temperatura ha avuto oscillazioni molto lievi, l'umidità relativa ha avuto invece variazioni maggiori, ma comunque limitate. Quando l'incubatore veniva aperto per effettuare i campionamenti, la camera perdeva una parte dell'umidità accumulata; il ripristino del valore iniziale richiedeva quindi del tempo. In questo caso, la temperatura veniva ristabilita più velocemente rispetto all'UR. Nonostante ciò, quest'ultima è rimasta quasi sempre all'interno del range desiderato (80-85%), con oscillazioni massime comprese entro il range 75-90%.

I quattro campioni (NT1, NT2, T1 e T2) sono stati alloggiati all'interno di contenitori (taniche) in plastica da 5 L, ognuno dei quali conteneva inizialmente circa 1,5 kg di granella di mais. Il cereale riempiva quindi solo una frazione del volume interno, che era per la maggior parte occupato dall'aria. I tappi delle taniche sono stati volutamente rimossi per consentire lo scambio gassoso, come avviene in un silo non ermetico. I quattro contenitori sono stati poi collocati sul ripiano dell'incubatore (posto al di sopra della vaschetta) in maniera tale da essere centrati in senso orizzontale rispetto al ripiano stesso, come illustrato in *Figura 31*.



Fig. 31 – L'incubatore Memmert BM 500 con all'interno i 4 contenitori nei quali sono stati stoccati i campioni di mais. Sul fondo la vaschetta in alluminio contenente l'acqua per il mantenimento dell'UR; sulla destra il termoigrometro digitale.

6.3 Protocollo di campionamento e analisi dei parametri

Durante il periodo di stoccaggio, della durata di 102 giorni, i campioni sono stati monitorati tramite analisi periodiche. La frequenza prevista era settimanale, anche se ci sono state alcune variazioni. Nello specifico, i campionamenti sono stati eseguiti nei giorni: 0, 7, 19, 24, 31, 38, 45, 52, 59, 81, 87, 94 e 102.

Come si può notare, tra il giorno 59 e il giorno 81 sono trascorse circa tre settimane, un intervallo più lungo rispetto agli altri. Questa differenza è legata all'andamento dei parametri nelle settimane precedenti. Infatti, durante i primi due mesi di stoccaggio, i valori di AFB₁, della carica micotica e della carica batterica non mostravano variazioni significative. L'umidità aumentava, ma molto lentamente. Di conseguenza, con i parametri di contaminazione sostanzialmente stabili, si è deciso di sospendere temporaneamente i campionamenti in attesa di un cambiamento più evidente, che molto probabilmente sarebbe avvenuto solo quando l'umidità avrebbe raggiunto un valore sufficientemente elevato da consentire la crescita microbica. I campionamenti sono quindi ripresi dal giorno 81, in seguito a variazioni più significative nella prova.

Il monitoraggio della CBT e della CMT si è concluso al giorno 94, anziché al giorno 102. Infatti, a quel punto, già dall'osservazione visiva dei campioni era possibile notare un deterioramento avanzato, per cui risultava poco utile la misurazione effettiva.

Prima di effettuare i campionamenti, i contenitori venivano estratti dall'incubatore e a ciascuno di essi veniva applicato il rispettivo tappo. Dopodiché venivano agitati manualmente per distribuire uniformemente gli eventuali contaminanti. A quel punto, il tappo veniva rimosso e si prelevavano i sottocampioni per ciascuna analisi: 40 g di granella per la determinazione dell'AFB₁, 25 g per CBT e CMT e dai 5 ai 10 g per il contenuto di umidità. Le metodologie analitiche sono descritte nel dettaglio nel capitolo 5. Poiché l'incubatore non era dotato di un sistema di ricircolo dell'aria, al fine di ridurre l'effetto di eventuali gradienti di temperatura e/o umidità relativa, una volta terminato il campionamento i contenitori venivano riposizionati sul ripiano cambiandone la posizione reciproca.

Quasi tutte le analisi sono state effettuate nella stessa giornata del campionamento. Quando questo non era possibile, i sottocampioni in attesa venivano conservati in frigorifero a 4 °C, per evitare variazioni dei parametri microbiologici. Poiché la determinazione dei quattro parametri (AFB₁, CBT e CMT e umidità) è indipendente, le diverse analisi non seguivano un ordine fisso.

6.4 Risultati

Durante i 102 giorni di stoccaggio, l'andamento dei parametri nei quattro campioni è suddivisibile in due fasi. Nella prima, durata fino al giorno 59, si è osservato un aumento lento e graduale dell'umidità; il livello di aflatossina così come i parametri microbiologici sono invece rimasti sostanzialmente stabili. Durante la seconda, iniziata intorno al giorno 81, si è verificato un incremento marcato dell'umidità e, conseguentemente, un rapido peggioramento degli altri parametri.

6.4.1 Umidità

La granella di mais, come tutti i cereali, è un materiale igroscopico. Ciò significa che tende a scambiare vapore acqueo con l'ambiente circostante fino a raggiungere una condizione di equilibrio nella quale la propria attività dell'acqua (a_w) coincide con l'umidità relativa dell'aria espressa in frazione decimale. Il contenuto di umidità della granella può quindi variare in funzione delle condizioni termoigrometriche dell'ambiente. Le condizioni ambientali all'interno dell'incubatore (28 °C, 80-85% UR) presupponevano che il mais, per raggiungere l'equilibrio, avrebbe inevitabilmente assorbito progressivamente vapore acqueo. Infatti, come descritto nel paragrafo 6.1, il contenuto di umidità iniziale dei quattro campioni si aggirava intorno al 13%, valore che, a 28 °C, corrisponde ad un'attività dell'acqua di circa 0,69-0,7, a fronte di un valore di equilibrio di 0,8-0,85 (poiché UR=80-85%). La velocità del processo di assorbimento dipende dalla differenza tra l'attività dell'acqua della granella e il valore di equilibrio, dalla temperatura, dalla superficie esposta all'aria e da eventuali fattori in grado di modificare la struttura fisica della granella.

L'andamento dell'umidità dei quattro campioni è riportato in *Tabella 28* e in *Figura 32*.

Tab. 28 – Andamento del contenuto di umidità (%) nei quattro campioni

Giorno	NT1	NT2	T1	T2
0	12,95	13,41	12,68	12,95
7	12,30	12,20	12,10	12,70
19	12,89	12,80	12,76	13,00
24	12,70	13,12	12,91	13,15
31	12,83	12,80	13,03	13,08
38	12,78	13,54	13,69	13,31
45	13,38	13,18	13,89	13,80
52	13,79	13,79	14,30	13,76
59	13,53	14,00	14,55	14,01
81	16,14	16,15	19,81	18,25
87	17,28	17,93	22,57	20,39
94	18,56	18,54	25,18	22,07
102	20,12	21,03	45,18	27,71

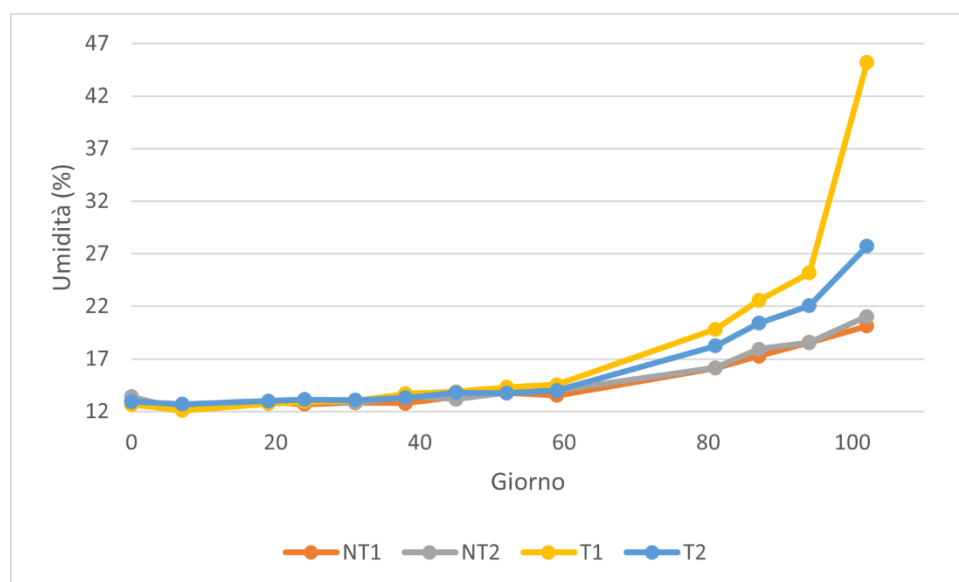


Fig. 32 – Andamento del contenuto di umidità (%) nei quattro campioni durante i 102 giorni di monitoraggio.

Dal grafico si notano chiaramente le due diverse fasi. Tra il giorno 0 e il giorno 59 in tutti i campioni si è verificato un aumento lento e abbastanza regolare del contenuto di umidità. NT1 è passato dal 12,95% iniziale al 13,53% al giorno 59, NT2 dal 13,41% al 14,0%. Nei campioni trattati si è osservata una velocità di assorbimento leggermente maggiore: T1 è passato dal 12,68% al 14,55%, mentre T2 dal 12,95% al 14,01%. In questa fase le differenze tra campioni trattati e non trattati risultavano comunque limitate. Inoltre, tutti i valori rientravano ancora in un intervallo relativamente sicuro per la conservazione della granella.

La seconda fase è iniziata nel periodo compreso tra il giorno 59 e il giorno 81, ossia durante l'interruzione momentanea del campionamento descritta nel paragrafo 6.3. Al giorno 81, quando le analisi sono riprese, si è osservato un notevole aumento nei valori di umidità. NT1 ha raggiunto il 16,14% e NT2 il 16,15%, mentre T1 e T2 il 19,81% e il 18,25% rispettivamente. Ancora una volta quindi l'aumento maggiore si è verificato nei campioni trattati. Al giorno 87 T1 ha raggiunto il 22,57% e T2 il 20,39%, mentre NT1 e NT2 il 17,28% e il 17,93% rispettivamente. Al giorno 94 T1 è arrivato al 25,18% e T2 al 22,07%, mentre NT1 e NT2 al 18,56% e al 18,54% rispettivamente.

All'ultimo campionamento, effettuato al giorno 102, NT1 e NT2 hanno raggiunto rispettivamente il 20,12% e il 21,03%: livelli molto elevati ma ancora inferiori a quelli dei campioni trattati. Infatti, T2 è arrivato al 27,71%, mentre T1 addirittura al 45,18%. Quest'ultimo valore è sintomo di un processo di deterioramento avanzato del cereale che non può derivare dal solo assorbimento di vapore acqueo.

In *Figura 33* sono raffigurati i quattro campioni al termine della prova (giorno 102). Dall'immagine risalta immediatamente il campione T1, che risulta annerito, lucido, quasi gelatinoso, coerentemente con il valore di umidità del 45,18%. Queste caratteristiche lo rendono assolutamente incompatibile con qualsiasi impiego zootecnico. NT1 e NT2 presentano invece una granella ancora riconoscibile, anche se con una patina fungina grigio-verdastra piuttosto diffusa. T2, sebbene meno compromesso rispetto a T1, lo è maggiormente rispetto ai campioni non trattati: le macchie di muffa sono distribuite su gran parte della superficie dei chicchi, i quali appaiono anche parzialmente deformati. In tutti i campioni si osservano inoltre alcuni fori nella granella, attribuibili all'attività del *Sitophilus* sp. Il ruolo di questo insetto nel processo di deterioramento verrà approfondito nel paragrafo 6.5.

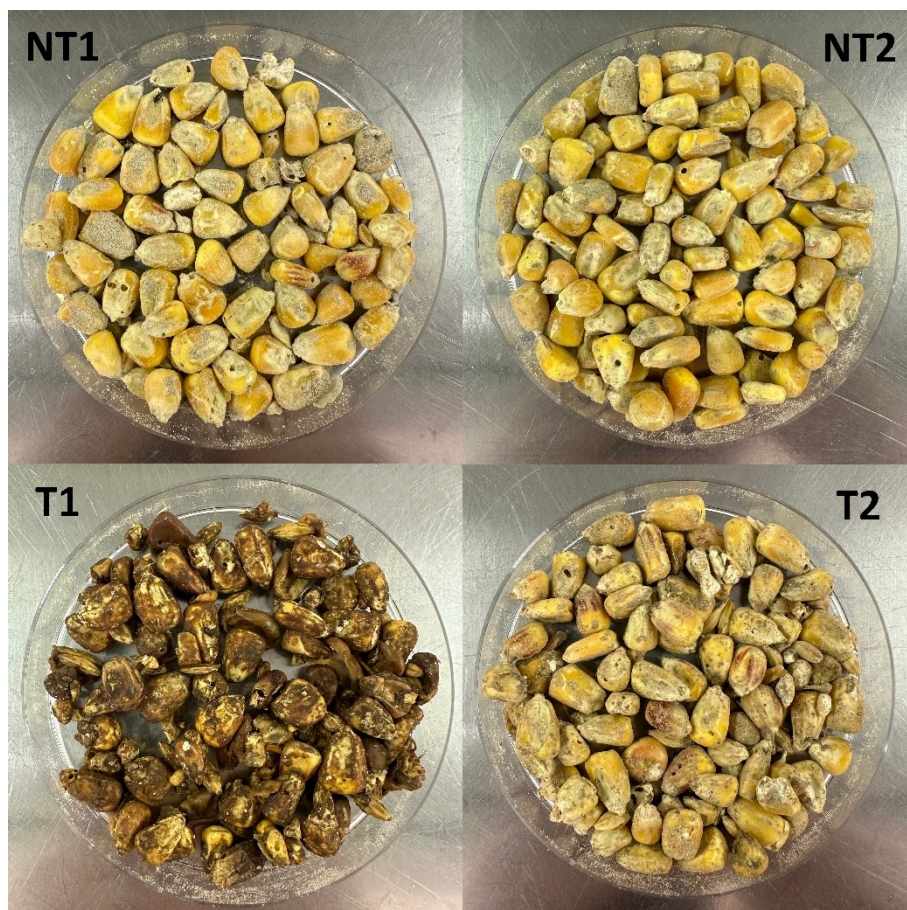


Fig. 33 – Livello di deterioramento dei quattro campioni al termine della prova (giorno 102).

6.4.2 Carica Batterica Totale (CBT)

L'andamento della CBT è riportato in *Tabella 29* e in *Figura 34*.

Tab. 29 – Andamento della CBT (UFC/g) nei quattro campioni

Giorno	NT1	NT2	T1	T2
0	323500	157500	173273	955000
7	55000	14000	3000	27000
19	1000	307091	2000	6000
24	4000	1000	2000	2000
31	1000	2000	<1000	5000
38	3000	2000	3000	37000
45	<1000	27000	2000	<1000
52	4000	1000	2000	280000
59	1000	12000	1000	<1000
81	4210000	1800000	127700000	53600000
87	48000000	34800000	597000000	236000000
94	146363636	250000000	1210000000	597000000

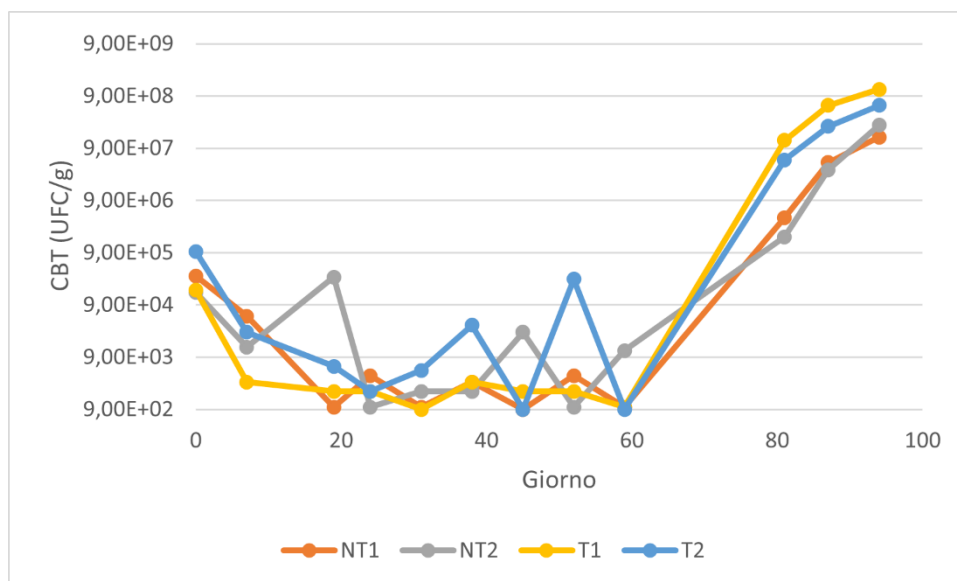


Fig. 34 – Andamento della CBT (UFC/g) nei quattro campioni durante i 94 giorni di monitoraggio. L'asse y è in scala logaritmica.

Innanzitutto, si può notare un primo cambiamento della CBT tra il giorno 0 e il giorno 7. Infatti, dopo una settimana di incubazione, in tutti e quattro i campioni (quindi a prescindere dal trattamento) si è verificata una riduzione dei valori: NT1 è passato da 323.500 UFC/g a 55.000 UFC/g, NT2 da 157.500 a 14.000 UFC/g, T1 da 173.273 a 3.000 UFC/g e T2 da 955.000 a 27.000 UFC/g. Questo calo è probabilmente dovuto al contenuto di umidità della granella nella fase iniziale della prova che, come detto, era pari a circa il 13% in tutti i campioni. A questo valore, l'attività dell'acqua del mais si trovava al di sotto della soglia minima richiesta per la crescita batterica (generalmente $a_w > 0,90$), nonostante l'umidità relativa dell'aria nell'incubatore fosse elevata. La popolazione batterica misurata al giorno 0 non riusciva quindi a mantenersi nel tempo una volta posta nelle nuove condizioni. In questa fase, alla diminuzione potrebbe aver contribuito un processo di selezione che ha favorito le specie batteriche più xerotolleranti, ossia in grado di sopravvivere a valori di a_w relativamente bassi.

Tra il giorno 7 e il giorno 59, la CBT è rimasta su valori piuttosto contenuti in tutti i campioni, cioè nell'ordine delle migliaia o, al massimo, delle decine di migliaia di UFC/g. Non si osservano dunque differenze significative tra campioni trattati e non trattati. Inoltre, i valori non mostrano una tendenza di crescita. Le oscillazioni sono da attribuire alla variabilità della matrice che, essendo solida, può risultare molto eterogenea. In questa fase, l'umidità relativa dell'aria non aveva ancora incrementato il contenuto di umidità della granella ad un livello tale da consentire la crescita batterica.

Al giorno 81, la CBT è invece aumentata di diversi ordini di grandezza rispetto ai valori delle settimane precedenti. NT1 ha raggiunto 4.210.000 UFC/g e NT2 1.800.000 UFC/g, numeri elevati ma ancora al di sotto del valore massimo di riferimento per la CBT, pari a 10^7 UFC/g. I campioni trattati hanno invece superato tale limite: T1 127.700.000 UFC/g e T2 53.600.000 UFC/g. L'aumento è proseguito rapidamente anche nei campionamenti successivi: al giorno 87, NT1 ha raggiunto 48.000.000 UFC/g e NT2 34.800.000 UFC/g (entrambi $>10^7$ UFC/g), mentre T1 597.000.000 UFC/g e T2 236.000.000 UFC/g. Al giorno 94, NT1 e NT2 sono arrivati rispettivamente a 146.363.636 e 250.000.000 UFC/g, mentre T1 a 1.210.000.000 UFC/g e T2 a 597.000.000 UFC/g.

Anche la CBT ha mostrato dunque valori superiori nei campioni trattati rispetto ai non trattati. All'ultimo giorno di monitoraggio la differenza era di circa un ordine di grandezza.

Naturalmente, cariche batteriche nell'ordine delle centinaia di milioni o dei miliardi di UFC/g rendono il mais "non sicuro" ai sensi del Regolamento (CE) n. 178/2002, e quindi inidoneo all'utilizzo zootecnico.

Come anticipato nel paragrafo 6.3, il monitoraggio della CBT (e della CMT) è stato interrotto 8 giorni prima del previsto in quanto, sia visivamente sia all'olfatto, i campioni apparivano in uno stato di deterioramento avanzato. A partire dal giorno 81, tutti i campioni erano infatti caratterizzati da un forte odore attribuibile alla proliferazione batterica; l'odore di muffa era invece marginale. Quest'ultimo però è diventato più evidente in tutti i campioni a partire dal giorno 94, sovrapponendosi all'odore di origine batterica ancora presente.

6.4.3 Carica Micotica Totale (CMT)

L'andamento della CMT è riportato in *Tabella 30* e in *Figura 35*.

Tab. 30 – Andamento della CMT (UFC/g) nei quattro campioni

Giorno	NT1	NT2	T1	T2
0	290500	135000	8391	17591
7	252727	96364	602727	4000
19	500000	2500	3700	3727
24	<1000	11000	221000	1100
31	560000	890000	3050000	2800
38	57000	18000	1200	319000
45	1000	390000	1700	31273
52	6000	38000	<1000	1000
59	558182	35000	<1000	1300
81	1390000	1760000	16200000	1581818
87	4900000	8700000	66000000	34000000
94	7100000	11200000	220000000	34000000

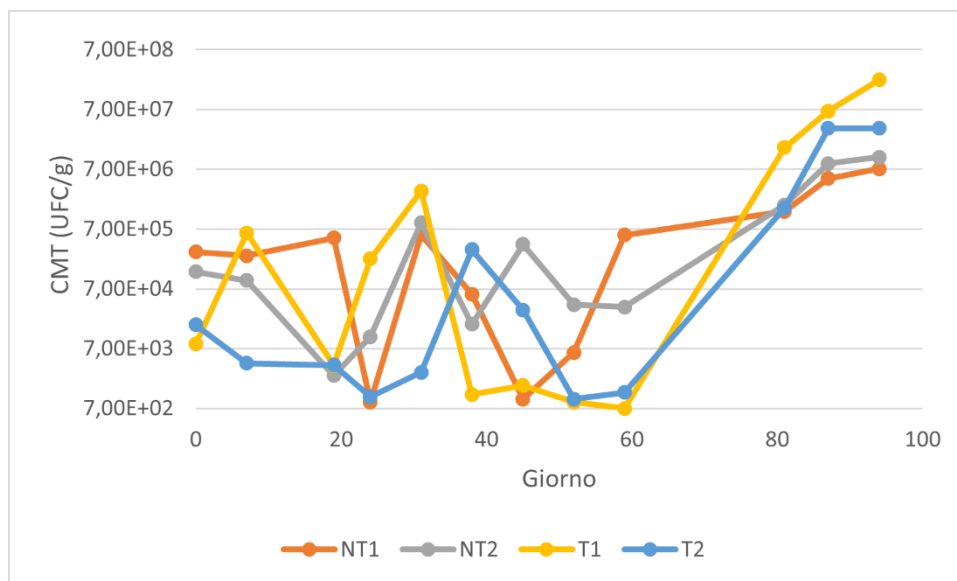


Fig. 35 – Andamento della CMT (UFC/g) nei quattro campioni durante i 94 giorni di monitoraggio. L'asse y è in scala logaritmica.

Rispetto alla CBT, la carica micotica ha avuto, nella prima fase, oscillazioni ampie e irregolari che non hanno consentito di individuare una tendenza chiara nei primi 59 giorni.

Tra il giorno 0 e il giorno 7, NT1 è passato da 290.500 a 252.727 UFC/g e NT2 da 135.000 a 96.364 UFC/g. T1 invece è aumentato da 8.391 a 602.727 UFC/g, mentre T2 si è ridotto da 17.591 a 4.000 UFC/g. Anche in questo caso, i risultati vanno interpretati con cautela in quanto l'eterogeneità della matrice è un fattore determinante per la distribuzione delle spore fungine nei sottocampioni. Infatti, T1, che al secondo campionamento ha mostrato una CMT sensibilmente cresciuta, al giorno 19 è ritornato a valori molto bassi (3.700 UFC/g). Questo rende improbabile ipotizzare che vi fosse già al giorno 7 una crescita fungina in atto.

Durante la prima fase della prova (giorni 7-59), NT1 ha alternato valori molto bassi (<1.000 UFC/g al giorno 24 e 1.000 UFC/g al giorno 45), a picchi relativamente elevati (500.000 UFC/g al giorno 19, 560.000 UFC/g al giorno 31 e 558.182 UFC/g al giorno 59). Anche NT2 ha avuto un andamento altalenante: al giorno 31 ha raggiunto 890.000 UFC/g, tuttavia i campionamenti vicini hanno restituito valori molto più bassi. I campioni trattati hanno mantenuto invece una CMT generalmente più contenuta e stabile, ad eccezione per i picchi di T1 al giorno 7 (602.727 UFC/g) e al giorno 31 (3.050.000 UFC/g) e di T2 al giorno 38 (319.000 UFC/g).

Come anticipato, queste ampie oscillazioni segnalano una presenza fungina latente nella granella, ma non sono indicative di una reale crescita microbica. Infatti, sebbene diversi picchi abbiano superato il valore massimo di riferimento per la CMT, pari a 10^5 UFC/g, manca una progressione costante, a conferma dell'effetto del campionamento. La probabilità che il sottocampione raccolto in un determinato momento contenesse chicchi particolarmente ricchi di spore cambiava da un prelievo all'altro ed era difficile da controllare.

Nella seconda fase della prova, la CMT è aumentata rapidamente in tutti i campioni. Al giorno 81 i valori hanno raggiunto 1.390.000 UFC/g per NT1, 1.760.000 UFC/g per NT2, 16.200.000 UFC/g per T1 e 1.581.818 UFC/g per T2. Al giorno 87 NT1 e NT2 sono arrivati rispettivamente a 4.900.000 e 8.700.000 UFC/g, mentre T1 a 66.000.000 UFC/g e T2 a 34.000.000 UFC/g. Infine, al giorno 94 NT1 è arrivato a 7.100.000 UFC/g, NT2 a 11.200.000 UFC/g, T1 a 220.000.000 UFC/g e T2 a 34.000.000 UFC/g. A partire dal giorno 87 in T1 e dal giorno 94 in NT1, NT2 e T2, era presente muffa visibile sulla superficie della granella. Inutile dire che il superamento del milione di UFC/g, riscontrabile nella comparsa di micelio direttamente sui chicchi, rende il mais inidoneo all'utilizzo zootecnico.

Quindi anche nel caso della CMT, i campioni trattati hanno mostrato nella seconda fase valori superiori rispetto ai non trattati.

Un caso particolare riguarda i lieviti, rilevati in alcuni campionamenti a partire dalla seconda fase della prova. In particolare, al giorno 87 si osservano in T1 34.000.000 UFC/g di lieviti (oltre a 66.000.000 UFC/g di CMT), mentre al giorno 94 110.000.000 UFC/g (oltre a 220.000.000 UFC/g di CMT). In T2 si osservano invece 1.000 UFC/g di lieviti al giorno 52, 145.000 UFC/g al giorno 81 e 13.000.000 UFC/g al giorno 94. Questi valori non sono stati sommati alla CMT, poiché i lieviti non producono aflatossine, pertanto il loro contributo potrebbe distorcere la valutazione dell'effettiva carica fungina responsabile di tale contaminazione. Tuttavia, va precisato che concentrazioni di lieviti nell'ordine dei milioni di UFC/g indicano comunque la presenza di processi fermentativi in atto.

Nel corso della prova, all'interno delle piastre di Rose-Bengal sono stati osservati diversi morfotipi fungini, che comparivano alternativamente nei quattro campioni a seconda della composizione del sottocampione analizzato. Tra le morfologie osservate più spesso vi erano colonie giallo-verdi dall'aspetto granuloso e polveroso, macroscopicamente compatibili con *Aspergillus* sez. Flavi. In *Figura 36* è rappresentata la piastra del campione T2 relativa al campionamento del giorno 31 dopo 7 giorni di incubazione a 28 °C. In *Figura 37* è invece

riportata l'immagine ottenuta allo stereomicroscopio (ingrandimento 34x) di una colonia giallo-verde isolata da tale piastra. Dalla sua osservazione emerge la struttura dei conidiofori, che si presentano con testa conidiale radiata, ossia con le catene di spore che si sviluppano partendo da una vescicola centrale, proiettandosi sfericamente in tutte le direzioni. Inoltre, i conidi mostrano una colorazione giallo-verde. Questa configurazione è tipica del genere *Aspergillus* e, in particolare, di *A. flavus*. A sostegno di questa ipotesi identificativa, è stata effettuata un'analisi del contenuto della piastra per determinare le aflatossine totali (tramite *lateral flow*). La concentrazione di tossina è risultata essere superiore al limite di rilevabilità del metodo, ossia > 40 ppb. Questo esito è coerente con la capacità aflatossigena attesa da *Aspergillus flavus*. Naturalmente, per confermare l'identificazione sarebbe necessario osservare i conidiofori a maggior ingrandimento, così da verificare la struttura delle fialidi (vedi paragrafo 2.3); oppure, in alternativa, impiegare tecniche di biologia molecolare.



Fig. 36 – Piastra del campione T2 relativa al campionamento del giorno 31 dopo 7 giorni di incubazione a 28 °C.

Sulla stessa piastra si osservano anche altre morfologie fungine. Le colonie compatte di colore blu-verde risultano compatibili con *Penicillium* spp. La colonia di grandi dimensioni, con pigmentazione verde scuro quasi nera, è invece anch'essa riconducibile ad un *Aspergillus* spp. Vi sono poi un paio di colonie bianche di piccole dimensioni non ben identificate.



Fig. 37 – Ingrandimento allo stereomicroscopio (34x) di una colonia giallo-verde isolata dalla piastra del campione T2 dopo 7 giorni di crescita a 28 °C.

Per mostrare la diversità dei morfotipi fungini osservata nei campioni, in *Figura 38* è rappresentata la piastra del campione NT2, anch'essa relativa al campionamento del giorno 31 dopo 7 giorni di incubazione. Rispetto a T2, qui la composizione è più eterogenea. Le colonie di grandi dimensioni di colore nero o bruno scuro sono state osservate allo stereomicroscopio (ingrandimento 34x) (*Figura 39*): la struttura dei conidiofori si presenta di tipo aspergilliforme e con pigmentazione scura, compatibile con *Aspergillus* sez. Nigri. Sulla stessa piastra si osservano anche colonie giallo-verdi (ascrivibili ad *Aspergillus flavus*), blu-verdi (*Penicillium* spp.) e bianche.

Sebbene nelle due piastre analizzate (T2 e NT2) si osservi una comunità fungina non perfettamente sovrapponibile, il dato va interpretato in chiave puramente descrittiva: non è possibile, cioè, trarre conclusioni in merito a un'eventuale diversa suscettibilità dei due campioni alla colonizzazione da parte di *Aspergillus flavus*. Infatti, il tipo di specie fungina rilevata sulla piastra dipende principalmente dalla distribuzione casuale delle spore nel

sottocampione analizzato. Inoltre, non va dimenticata la diversa provenienza delle due partite di mais.

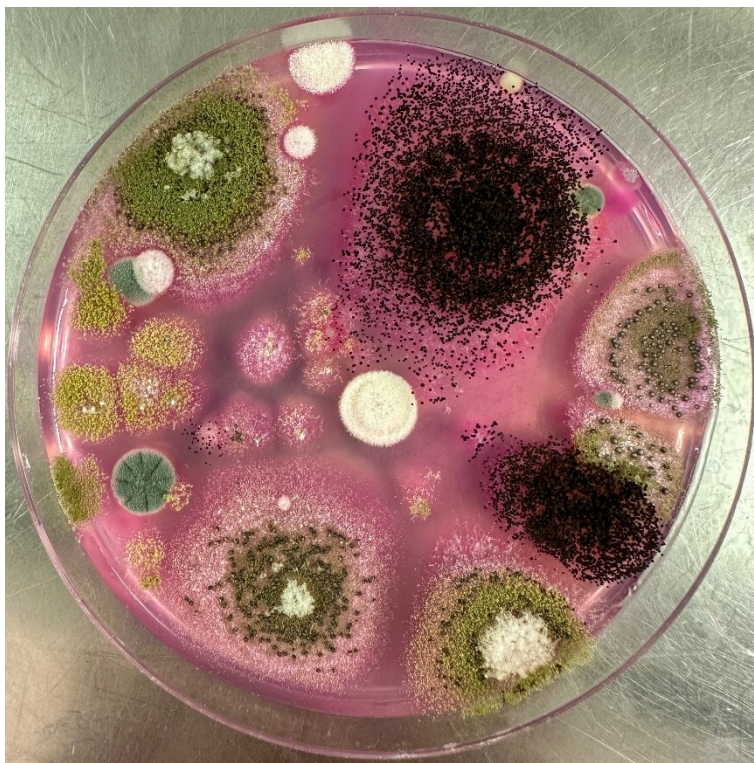


Fig. 38 – Piastra del campione NT2 relativa al campionamento del giorno 31 dopo 7 giorni di incubazione a 28 °C.

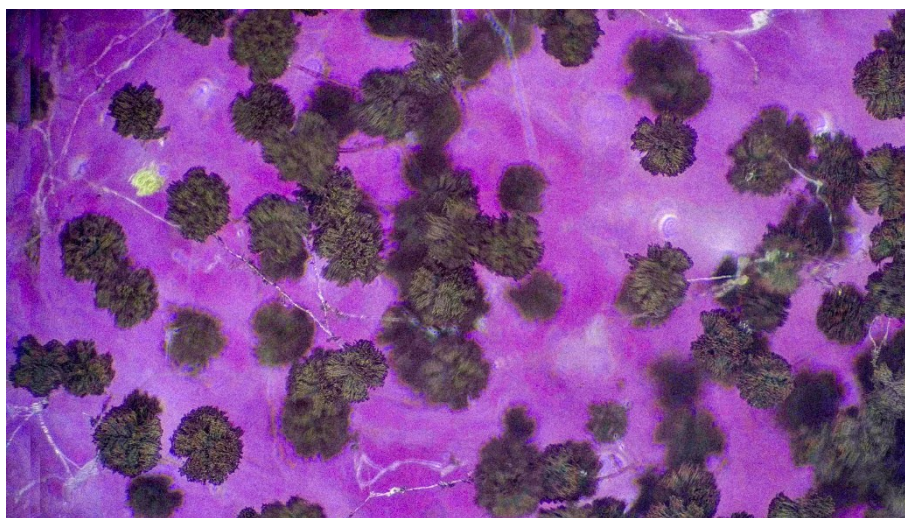


Fig. 39 – Ingrandimento allo stereomicroscopio (34x) di una colonia bruno-nerastra isolata dalla piastra del campione NT2 dopo 7 giorni di crescita a 28 °C.

6.4.4 Aflatossine totali

L'andamento dell'AFB₁ è riportato in *Tabella 31* e in *Figura 40*.

Tab. 31 – Andamento dell'AFB₁ (ppb) nei quattro campioni

Giorno	NT1	NT2	T1	T2
0	0,8	0,5	0,5	0,5
7	0,3	0,4	0,3	0,5
19	0,4	0,3	0,3	0,3
24	0,3	0,9	0,4	0,3
31	0,3	0,3	0,3	0,3
38	0,6	1,15 (*)	2,4 (*)	0,3
45	0,3	0,3	0,3	0,3
52	0,3	0,3	0,3	0,3
59	0,3	0,3	0,3	0,3
81	0,3	0,3	0,3	0,3
87	0,3	0,3	17,15 (*)	0,3
94	0,3	0,4	2,7 (*)	8,55 (*)
102	4,83 (*)	8,66 (*)	18,46 (*)	2,26 (*)

(*) Valore medio di più repliche; i singoli risultati sono riportati nel testo.

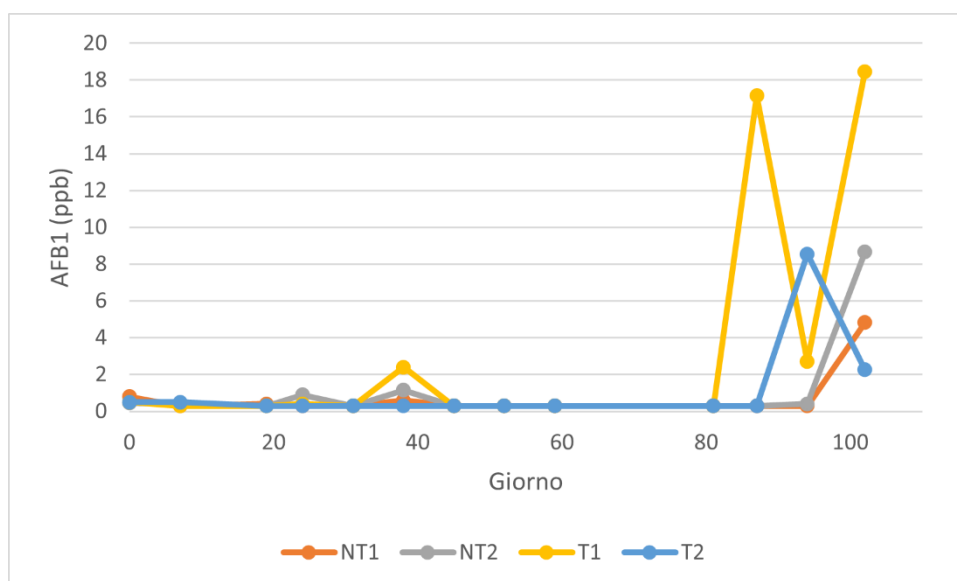


Fig. 40 – Andamento dell'AFB₁ (ppb) nei quattro campioni durante i 102 giorni di monitoraggio.

Tra i giorni 7 e 59, si osservano valori di AFB₁ molto bassi in tutti i campioni. Si registrano però due eccezioni: NT2 al giorno 38, con 1,15 ppb (media di due repliche indipendenti pari a 1,7 e 0,6 ppb) e T1 al giorno 38, con 2,4 ppb (media di due repliche pari a 4,5 e 0,3 ppb). In T1, si nota una certa differenza tra le due repliche. Il valore di 4,5 ppb è però probabilmente legato alla presenza di uno o qualche chicco fortemente contaminato all'interno di un sottocampione altrimenti indenne. Infatti la seconda replica, così come il campionamento della settimana successiva, hanno restituito un valore praticamente nullo di tossina. Inoltre, sia visivamente sia all'olfatto, i campioni non mostravano ancora segni di deterioramento. È dunque verosimile che quel chicco fosse già contaminato prima dell'inizio della prova: ad esempio, la tossina potrebbe essersi accumulata in seguito ad un'infezione fungina sviluppatasi in campo. Tuttavia, non è da escludere che l'anomalia possa dipendere da un fallimento del metodo di analisi o, in alternativa, dalla presenza di micro-focolai di recente formazione estremamente localizzati. Invece, per quanto riguarda NT2 al giorno 38, è importante sottolineare che entrambe le repliche (1,7 e 0,6 ppb) risultano inferiori al limite di quantificazione (LOQ = 2 ppb). Di conseguenza, il valore di 1,15 ppb deve essere interpretato con cautela, in quanto si colloca al di sotto della soglia di affidabilità del metodo analitico. A tal proposito, va ricordato che tutti i valori inferiori al LOD del metodo (1 ppb) derivano dall'estrapolazione matematica che il software del robot ALFA Nano esegue sulla base della curva di calibrazione, e vanno dunque considerati come stime puramente indicative.

Al giorno 81, nonostante l'umidità fosse già aumentata sensibilmente e le cariche micotiche fossero in crescita, i quattro campioni presentavano ancora valori di AFB₁ molto bassi. Questo risultato non deve stupire, infatti, come discusso nel paragrafo 2.8, alla crescita fungina non necessariamente corrisponde la produzione di aflatossine. Evidentemente, il processo di sintesi di AFB₁ non era cominciato o era ancora nella fase iniziale.

Il primo accumulo significativo di AFB₁ è stato osservato al giorno 87 nel campione T1, con 17,15 ppb (media di 17,1 e 17,2 ppb). Il dato risulta anche ripetibile tra le due repliche, un evento piuttosto raro nel contesto di questa prova. Tale valore si colloca poco al di sotto del limite di legge previsto per le materie prime (20 ppb).

Al giorno 94, è stato rilevato in T1 un valore di 2,7 ppb (media di 3,0 e 2,4 ppb). In questo caso, l'aflatossina sembrava diminuire rispetto a quanto osservato al giorno 87, nonostante nel frattempo la granella si fosse ulteriormente deteriorata. In realtà, di nuovo, il risultato è riconducibile all'eterogeneità della distribuzione del contaminante che, in un campione ormai marcescente, risulta ancora più irregolare. Infine, al giorno 102 T1 ha restituito un valore di 18,46 ppb (media di tre repliche pari a 15,6, 10,3 e 29,5 ppb).

T2 ha accumulato AFB₁ con circa una settimana di ritardo rispetto a T1: al giorno 87 è stato rilevato un valore ancora pari a 0,3 ppb, al giorno 94 un valore di 8,55 ppb (media di 10,0 e 7,1 ppb) e al giorno 102 un valore inferiore, pari a 2,26 ppb (media di 4,9, 0,9 e 1,0 ppb). L'apparente diminuzione è attribuibile anche questa volta all'eterogeneità della matrice. Tuttavia, come discusso nel paragrafo 2.9, va comunque considerata la possibilità biologica e chimica di una parziale degradazione o insolubilizzazione della tossina con il passare dei giorni.

Nei campioni non trattati l'accumulo di AFB₁ si è verificato soltanto al giorno 102. In NT1 è stato rilevato un valore di 4,83 ppb (media di 5,8, 6,3 e 2,4 ppb), mentre in NT2 di 8,66 ppb (media di 25,4, 0,3 e 0,3 ppb). In quest'ultimo caso, diversamente dall'anomalia osservata al giorno 38, il valore di 25,4 ppb non può essere considerato un *outlier*. La comparsa, al giorno 102, di muffa visibile sul campione (supportata dai valori di CMT) conferma infatti che la crescita fungina si è verificata, pertanto la sintesi di aflatossina risulta pienamente plausibile. La marcata variabilità tra le repliche (con due campioni su tre risultati privi di contaminazione) è riconducibile alla distribuzione eterogenea dei focolai fungini nel substrato.

L'accumulo di AFB₁ nei campioni è coerente con le osservazioni morfologiche effettuate sulle piastre di CMT, nelle quali sono state individuate probabili colonie di *Aspergillus flavus*. L'aumento della CMT e la produzione di AFB₁ si sono verificati quasi simultaneamente, tra il giorno 81 e il giorno 87.

6.5 Il ruolo dell'infestazione da *Sitophilus* sp.

Come accennato precedentemente, nel corso della prova è emerso un fattore di disturbo non previsto dal protocollo sperimentale, ma molto importante per l'interpretazione dei risultati. Si tratta della comparsa di un'infestazione ad opera di *Sitophilus* sp., un insetto comunemente noto come punteruolo del grano o del mais. La sua presenza è stata osservata per la prima volta al giorno 81, in concomitanza con la ripresa dei campionamenti (*Figura 41*). A quel punto l'infestazione si trovava già in fase avanzata, con una popolazione stimata nell'ordine delle centinaia di individui. Ciò ha impedito di stabilire con precisione l'inizio del fenomeno, che probabilmente è passato inosservato per diverse settimane. Inoltre, poiché gli insetti erano distribuiti uniformemente nei quattro campioni, non è stato possibile capire se la colonizzazione fosse partita da un contenitore specifico o se fosse avvenuta contemporaneamente in tutti e quattro. Anche se i campioni erano risultati integri al controllo visivo effettuato all'inizio della prova, è verosimile che l'infestazione fosse già presente in forma latente (uova, larve o pupe all'interno dei chicchi). Infatti, in seguito all'ovideposizione all'interno della cariosside, le femmine di *Sitophilus* sigillano il foro di ingresso, rendendo la granella apparentemente intatta all'ispezione visiva. L'insetto completa una generazione in circa 4-8 settimane, a seconda di temperatura e umidità. Negli 81 giorni antecedenti la rilevazione si sono dunque potute susseguire una o due generazioni: questo ha permesso alla popolazione di crescere rapidamente. Tuttavia, non si può escludere l'ingresso di insetti adulti dall'ambiente esterno. Questi, trovando i contenitori non sigillati, potrebbero aver raggiunto la granella e deposto le uova, dando così origine all'infestazione.

Quando il punteruolo è stato rilevato per la prima volta nei campioni, si è deciso di non effettuare alcun intervento. La prova voleva infatti simulare quanto può accadere all'interno di un silo in condizioni critiche di conservazione, dove le infestazioni da *Sitophilus* sp. non sempre vengono rilevate e gestite. In questo modo, è stato valutato l'impatto dell'insetto sul deterioramento della granella.



Fig. 41 – Infestazione da Sitophilus sp. rilevata al giorno 81.

Osservando l'andamento parametri monitorati, si nota immediatamente un brusco incremento di umidità, CBT e CMT proprio in concomitanza con la comparsa dell'infestazione. Questa correlazione non è casuale; infatti, come discusso nel paragrafo 2.8, il punteruolo, danneggiando fisicamente la granella, ne favorisce il deterioramento. Inoltre, l'attività metabolica degli insetti produce calore e vapore acqueo i quali, oltre a favorire la crescita microbica, determinano un aumento localizzato dell'umidità relativa dell'aria attorno ai chicchi. I fori scavati nelle cariossidi per la deposizione delle uova e per

l'alimentazione, erano già evidenti al giorno 81 e, con il passare del tempo, sono diventati sempre più numerosi (vedi *Figura 33*). Questi ultimi aumentano la superficie esposta all'ambiente esterno, rendendo il chicco più permeabile all'assorbimento di vapore acqueo.

Dopo una prima fase nella quale l'infestazione era distribuita piuttosto uniformemente nei quattro campioni, gli insetti hanno progressivamente abbandonato T1 (il campione più compromesso) e, in misura minore, T2, preferendo i campioni non trattati, che si trovavano in condizioni di conservazione relativamente migliori. *Sitophilus* necessita infatti che la granella sia integra per completare il proprio ciclo biologico.

La differenza nella velocità di deterioramento tra campioni trattati e non trattati non va però attribuita al punteruolo. Infatti, i campioni trattati mostravano già nelle prime fasi della prova (prima della comparsa dell'infestazione) una velocità di assorbimento idrico superiore rispetto ai campioni non trattati. Il diverso comportamento può essere quindi ricondotto a caratteristiche intrinseche legate alla differente partita e/o cultivar dei campioni. Dunque, il punteruolo ha amplificato e accelerato un processo di deterioramento già avviato.

6.6 La soglia critica di umidità

Analizzando contemporaneamente i dati di umidità, CBT, CMT e AFB₁ è possibile individuare il valore soglia di umidità oltre il quale, nel contesto di questa prova sperimentale, il mais ha subito un deterioramento microbiologico. Questo valore si colloca intorno al 19-20% di umidità.

Al giorno 81, T1 ha raggiunto un'umidità del 19,81%, ossia coincidente con la soglia. Al campionamento successivo (giorno 87) l'umidità è salita al 22,57% e l'AFB₁ ha raggiunto 17,15 ppb, con una CBT di 597.000.000 UFC/g e una CMT di 66.000.000 UFC/g. La progressione è stata talmente rapida da non permettere l'identificazione del preciso momento nella quale ha avuto inizio. Allo stesso modo, T2 al giorno 87 ha mostrato un'umidità del 20,39%, mentre al giorno 94 ha accumulato AFB₁ (8,55 ppb), con una CBT di 597.000.000 UFC/g e una CMT di 34.000.000 UFC/g.

Va precisato che al giorno 87, nonostante T2 avesse già oltrepassato la soglia del 20%, presentava ancora un valore di AFB₁ molto basso. Questo dato non contraddice il superamento della soglia, poiché quest'ultima definisce le condizioni necessarie per la crescita fungina, ma non garantisce una risposta immediata dell'AFB₁. Inoltre, è anche

possibile che nel sottocampione analizzato al giorno 87 non fossero stati inclusi eventuali chicchi già contaminati.

Anche per i campioni non trattati la dinamica è la medesima. Al giorno 102 NT1 e NT2 hanno raggiunto rispettivamente il 20,12% e il 21,03% di umidità. In corrispondenza di questi valori, si è verificato un accumulo di AFB₁ pari a 4,83 ppb per NT1 e 8,66 ppb per NT2 (anche se, in quest'ultimo campione, con repliche fortemente eterogenee). Contemporaneamente, anche CBT e CMT hanno raggiunto valori molto elevati.

La tossina si è quindi accumulata indipendentemente in tutti i campioni in seguito al raggiungimento di un valore di umidità del 19-20%, che quindi rappresenta, nelle condizioni di questa prova, la soglia critica oltre la quale si verifica il deterioramento.

È interessante confrontare questo risultato con quanto riportato nella letteratura scientifica. Come discusso nel paragrafo 2.8.2, *A. flavus* necessita di un'attività dell'acqua di almeno 0,82-0,85 per la sintesi di AFB₁. Nel caso della granella di mais conservata a 28 °C, questo intervallo corrisponde indicativamente ad un'umidità del 17-18,5%. Poiché, in questa prova, la produzione di aflatossine è stata rilevata solo al di sopra del 19-20% ($a_w \approx 0,88-0,90$), la soglia effettiva di rischio è risultata leggermente superiore al valore minimo teorico. Le motivazioni alla base di questa differenza possono essere diverse. Innanzitutto, i valori riportati in letteratura spesso fanno riferimento a granella inoculata artificialmente con ceppi di *A. flavus*, mentre nella presente prova è stata sfruttata la microflora naturalmente presente sul cereale. Inoltre, considerando la frequenza di campionamento relativamente bassa (settimanale) e l'elevata eterogeneità della distribuzione della tossina nella matrice, non è da escludere l'esistenza di *hot spot* contaminati, sfuggiti al rilevamento, già in presenza di valori di umidità del 17-18%.

Va precisato che la soglia del 19-20% è stata individuata nelle condizioni ambientali specifiche di questa prova (temperatura, umidità relativa, microflora naturale, infestazione da *Sitophilus*), con una frequenza di campionamento settimanale e su un numero limitato di campioni; pertanto non possiede valore universale.

6.7 Considerazioni sul trattamento preventivo a basso dosaggio

In base ai dati raccolti durante questa prova, il trattamento con il conservante al dosaggio di 0,5 g/kg non è risultato efficace nelle condizioni di stoccaggio testate. Anziché mostrare una

migliore resistenza al deterioramento, i campioni trattati hanno raggiunto un'umidità più elevata, valori di CBT e CMT superiori e hanno accumulato AFB₁ più precocemente.

Tuttavia, prima di trarre conclusioni, va ricordato che i campioni trattati e quelli non trattati provenivano da partite di mais differenti. Questo limite strutturale impedisce di attribuire con certezza le differenze osservate all'effetto del conservante. Infatti, la diversa provenienza implica che le due partite possano differire per quanto riguarda: cultivar, storia di stoccaggio, microflora presente sulla granella (non solo una diversa carica totale ma anche specie e ceppi differenti), caratteristiche fisiche della cariosside (come struttura del pericarpo e porosità, le quali influenzano la velocità di assorbimento dell'acqua). Nonostante questo limite, non è emerso nemmeno un minimo rallentamento del deterioramento nei campioni T rispetto agli NT.

Per la prova è stato utilizzato il dosaggio minimo raccomandato dal produttore, ossia 0,5 g/kg. Questo valore viene riportato nella scheda tecnica del prodotto, senza però specificare le condizioni di stoccaggio necessarie a mantenerne l'efficacia. Comunque, è probabile che tale soglia sia stata pensata per contesti di conservazione relativamente controllati e non per le condizioni critiche riprodotte in questa prova.

Inoltre, come discusso nel paragrafo 6.1, a causa di vincoli operativi non è stato possibile risalire alla data di trattamento dei campioni T, né determinare la quantità di prodotto ancora presente all'inizio della prova. L'acido propionico e l'ammonio propionato sono infatti composti volatili, pertanto la loro concentrazione nella granella tende a diminuire nel tempo, soprattutto in presenza di valori elevati di temperatura e umidità relativa. Quindi, è probabile che, all'inizio del test, la concentrazione effettiva fosse già inferiore al dosaggio nominale di 0,5 g/kg e che, nel corso dei 102 giorni di stoccaggio, si sia ridotta ulteriormente, fino a diventare trascurabile nelle ultime settimane della prova.

7. Seconda fase sperimentale – Stress test al 20% di umidità

7.1 Razionale della prova

I risultati della prima fase sperimentale hanno confermato che la granella mais, posta in condizioni di stoccaggio critico (28°C e 80-85% UR), tende ad assorbire progressivamente vapore acqueo fino a raggiungere e superare la soglia del 19-20% di umidità, che si è rivelata il punto oltre il quale la crescita microbica e la produzione di aflatossine aumentano rapidamente e irreversibilmente. Inoltre, nelle condizioni adottate, il trattamento con il conservante, applicato al dosaggio minimo raccomandato di 0,5 g/kg, non è riuscito né a prevenire né a ritardare il deterioramento dei campioni trattati rispetto a quelli non trattati.

Questi risultati hanno portato a un nuovo interrogativo: qual è il dosaggio di conservante necessario a garantire la protezione dal deterioramento quando il mais si trova già in una condizione di rischio elevato, cioè quando la granella ha raggiunto o superato la soglia critica di umidità? La seconda fase sperimentale vuole rispondere a questa domanda.

A differenza della prima fase, nella quale i campioni partivano da un contenuto di umidità del 13%, in questa fase, prima dell'inizio della prova, i campioni sono stati deliberatamente umidificati (mediante aggiunta di acqua) fino a raggiungere il 20% di umidità, ossia la soglia critica. Per osservare differenze in termini di crescita microbica e accumulo di aflatossina è infatti necessario esporre i campioni a condizioni di rischio microbiologico elevato. Inoltre, l'umidificazione artificiale ha permesso di applicare uniformemente il conservante, sciogliendolo nell'acqua aggiunta alla granella. Nella prima fase sperimentale questo approccio non era fattibile, poiché la granella era secca e mancava dunque un veicolo liquido in grado di distribuire omogeneamente una dose così ridotta di prodotto.

I dosaggi testati, pari a 2 g/kg e 4 g/kg, sono stati definiti in seguito a un test preliminare qualitativo, nel quale sono stati impiegati quattro campioni di granella umidificata al 20%, trattati a diverse concentrazioni di conservante: 0, 1, 2 e 4 g/kg. Il campione non trattato e quello trattato a 1 g/kg hanno sviluppato muffa visibile già dopo pochi giorni. Al contrario, i dosaggi di 2 e 4 g/kg hanno fornito risultati promettenti e sono stati quindi selezionati per le prove sperimentali.

Parallelamente, prima dell'avvio della prova, è stato condotto un altro test preliminare, utilizzando lo stesso mais successivamente impiegato nelle prove definitive. L'obiettivo era

verificare che la granella umidificata al 20%, conservata a 28°C e 80-85% UR in assenza di trattamento, andasse incontro a deterioramento. Il monitoraggio, non solo qualitativo, è stato effettuato nei giorni 0, 3, 10 e 14 per i seguenti parametri: umidità, AFB₁, CBT e CMT. I risultati hanno confermato in modo convincente la tendenza del mais a deteriorarsi in quelle condizioni, e verranno discussi nel dettaglio nel paragrafo 7.5.

Le prove definitive hanno invece previsto il monitoraggio, durante 25 giorni di stoccaggio a 28°C e 80-85% UR, di tre campioni di mais al 20% di umidità: un campione non trattato e i due campioni trattati a 2 e 4 g/kg. Anche qui, per verificare il deterioramento, sono stati analizzati i parametri qualitativi (umidità, AFB₁, CBT e CMT) ad intervalli regolari nel tempo.

In questo caso, è stata scelta una durata di 25 giorni per due motivi: da un lato, un mais al 20% di umidità non può essere stoccato a lungo senza deteriorarsi, nemmeno con l'impiego del conservante ai dosaggi testati. Di conseguenza, un periodo di circa un mese è stato considerato sufficiente per osservare la dinamica di deterioramento e valutare la capacità protettiva del prodotto. D'altra parte, ciascun campione era costituito da un quantitativo limitato di granella (350 g) che, una volta esaurita, avrebbe necessariamente determinato la conclusione della prova.

A differenza della prima fase sperimentale, il trattamento manuale dei campioni in laboratorio ha consentito di impiegare la stessa partita di mais per tutti e tre i gruppi (non trattato, 2 g/kg e 4 g/kg). Questo miglioramento metodologico elimina il fattore di confondimento che aveva reso più difficile l'interpretazione dei risultati nel capitolo 6. Di conseguenza, le eventuali variazioni osservate tra i campioni possono essere attribuite con maggiore attendibilità all'effetto del trattamento, piuttosto che a differenze intrinseche tra partite diverse.

Va però precisato che, a causa di vincoli pratici, non sono state previste repliche per le tre condizioni testate. La quantità di mais della partita selezionata non era infatti sufficiente a preparare un numero maggiore di repliche. Inoltre, lo spazio ancora disponibile all'interno dell'incubatore era ridotto. Questo limite andrà dunque considerato nell'interpretazione dei risultati.

7.2 Procedura di umidificazione e trattamento con conservante

Prima della preparazione dei campioni, la granella di mais è stata pulita con un setaccio a maglia quadrata di 2×2 mm, così da eliminare la farina e i frammenti di cariossidi spezzate. In particolare, la farina avrebbe potuto modificare il comportamento del campione durante l'umidificazione, poiché avrebbe assorbito gran parte dell'acqua, compromettendo l'omogeneità della distribuzione del conservante. Dopo la setacciatura, il mais è stato suddiviso in tre campioni da 350 g. Questi sono poi stati trasferiti all'interno dei contenitori utilizzati per la prova, ossia tre bottiglie in vetro da 1 L. Il quantitativo di granella impiegato (350 g) è stato scelto sulla base della massa necessaria ad eseguire tutte le analisi previste durante i 25 giorni di monitoraggio. Ad ogni campionamento, dovevano infatti essere garantite le aliquote necessarie per la determinazione di tutti i parametri analizzati (AFB₁, umidità, CBT e CMT).

L'umidità iniziale del mais era pari al 12,95% (determinata con termobilancia). A partire da questo valore è stata calcolata la quantità di acqua necessaria per portare ogni campione al 20% di umidità. Con un'umidità del 12,95%, la frazione secca della granella corrisponde a 0,8705, pari a una massa di sostanza secca di 304,675 g ($350 \text{ g} \times 0,8705$). Per raggiungere il 20% di umidità, la frazione secca della massa finale deve corrispondere a 0,80. La massa finale necessaria per contenere 304,675 g di sostanza secca risulta quindi pari a $304,675 / 0,80 = 380,844$ g. Di conseguenza, la quantità di acqua da aggiungere è pari a $380,844 - 350 = 30,844$ g per ciascuna bottiglia. La massa del conservante non è stata considerata nel calcolo, sia per semplificare la procedura sia perché la scheda tecnica non riportava la percentuale di acqua contenuta nel prodotto. In ogni caso, il contributo del conservante alla massa totale era molto limitato e non avrebbe modificato significativamente il valore di umidità finale.

Le dosi di conservante per i campioni da trattare sono state pesate in una provetta Falcon utilizzando una bilancia analitica: 0,7 g per il campione trattato a 2 g/kg ($2 \text{ g/kg} \times 0,350 \text{ kg} = 0,7 \text{ g}$) e 1,4 g per il campione trattato a 4 g/kg. Successivamente nella stessa provetta sono stati aggiunti 30,844 g di acqua, anch'essi pesati con la bilancia analitica. Dopodiché la miscela è stata omogeneizzata tramite vortex per favorire la dissoluzione del prodotto. Grazie alla buona solubilità in acqua del formulato, è stata ottenuta una soluzione uniforme. Naturalmente per il campione non trattato è stata utilizzata esclusivamente acqua, senza

aggiungere il conservante. In questo modo le uniche differenze tra i campioni sono riconducibili al trattamento.

Le tre bottiglie sono state preparate una dopo l'altra, versando la soluzione di acqua e conservante (oppure solo l'acqua nel caso del campione non trattato) sulla granella in un'unica operazione. La bottiglia è stata subito chiusa con il tappo e agitata energicamente a mano per circa 1-2 minuti, così da distribuire uniformemente la soluzione in tutto il campione. L'agitazione è stata ripetuta più volte nelle ore successive. La soluzione è stata assorbita rapidamente, senza determinare alcun ristagno di liquido sul fondo delle bottiglie.

Trascorsa qualche ora dall'aggiunta di acqua, le bottiglie sono state trasferite nell'incubatore con il tappo ancora avvitato. Quest'ultimo è rimasto a sigillarle per le 24 ore successive, onde evitare eventuali perdite di acqua o di conservante prima del completo assorbimento della soluzione da parte della granella. Dopo 24 ore il tappo è stato svitato fino a lasciare uno spazio sufficiente al passaggio dell'aria, ma non è stato rimosso completamente. Questa configurazione è stata mantenuta per tutta la durata della prova come compromesso necessario: se da un lato era indispensabile permettere lo scambio gassoso, dall'altro mantenere i contenitori completamente aperti avrebbe esposto l'ambiente di lavoro a una dispersione incontrollata di spore fungine, data la probabile proliferazione di muffe sulla granella.

L'umidità effettivamente raggiunta dai campioni dopo l'umidificazione è stata verificata con la termobilancia al primo campionamento, effettuato al giorno 1 (cioè 24 ore dopo la preparazione dei campioni), e verrà discussa nel paragrafo 7.4.

7.3 Condizioni di stoccaggio e protocollo di campionamento

In questa fase, sono state adottate condizioni di stoccaggio analoghe a quelle descritte nel paragrafo 6.2: temperatura di 28°C e umidità relativa dell'80-85%. Quest'ultima è stata mantenuta costante mediante la vaschetta di alluminio posizionata sul fondo dell'incubatore Memmert BM 500. In questo caso, però, anziché favorire l'assorbimento di acqua da parte della granella, l'elevata umidità relativa dell'aria serviva a evitare che i campioni, già umidificati, perdessero acqua per evaporazione. Le tre bottiglie di vetro da 1 L sono state collocate al centro del ripiano dell'incubatore e la loro disposizione reciproca veniva

modificata periodicamente per ridurre l'influenza di eventuali differenze di temperatura e umidità all'interno della cella.

I campionamenti sono stati eseguiti nei giorni 0, 1, 7, 14, 21 e 25. La caratterizzazione iniziale al giorno 0 è stata effettuata prima della preparazione delle bottiglie, ossia sul mais setacciato ma non ancora umidificato. I valori misurati al T0 rappresentano quindi la condizione di partenza comune ai tre campioni. Il campionamento del giorno 1, eseguito a 24 ore dalla preparazione delle bottiglie, aveva invece due obiettivi: verificare l'umidità effettivamente raggiunta dalla granella dopo l'umidificazione e valutare se il conservante avesse prodotto un effetto immediato di riduzione delle cariche microbiche. I campionamenti successivi (ai giorni 7, 14, 21 e 25) sono stati effettuati per monitorare l'evoluzione dei parametri nel tempo, con una frequenza pressoché settimanale.

Prima di procedere con il campionamento, il tappo della bottiglia veniva avvitato per consentire la successiva agitazione manuale, eseguita al fine di omogeneizzare la granella. Dopodiché, sotto cappa (onde evitare la dispersione di eventuali spore fungine), si apriva il tappo per prelevare i sottocampioni da analizzare (40 g per la determinazione dell'AFB₁, 25 g per CBT e CMT e 5-10 g per l'umidità). Tutte le analisi sono state effettuate nella stessa giornata del campionamento, pertanto non si è resa necessaria la conservazione dei sottocampioni in frigorifero. Quando il livello di AFB₁ superava il limite massimo di lettura del metodo *lateral flow*, veniva applicata la procedura di diluizione descritta nel paragrafo 5.1.

Occorre specificare che la natura distruttiva delle analisi ha posto dei vincoli nell'utilizzo del campione. La necessità di ripetere la determinazione di alcuni parametri, a causa di risultati anomali o incerti, ha comportato un consumo imprevisto di materiale. Per questo motivo, in alcuni casi è stato indispensabile ridurre la massa dei sottocampioni analizzati al di sotto delle quantità previste dal metodo, secondo le modalità descritte nel paragrafo 5.1. Inoltre, per lo stesso motivo, la durata del monitoraggio non è stata uniforme per tutti i parametri e per tutti i campioni: la carenza di materiale ha reso necessario privilegiare alcuni parametri rispetto ad altri.

In particolare, nei campioni trattati, l'AFB₁ è stata monitorata fino al giorno 25, mentre CBT e CMT solo fino al giorno 21. Nell'ultima settimana la quantità di campione rimasta non era infatti sufficiente ad effettuare tutte le analisi, pertanto si è scelto di privilegiare l'aflatossina. Il monitoraggio del campione non trattato è stato invece interrotto al giorno 14 per tutti i parametri, in questo caso non per mancanza di materiale, bensì poiché la granella si

presentava già in uno stato di deterioramento avanzato e risultava dunque superfluo proseguire con le analisi.

Per il test preliminare sul campione non trattato (i cui risultati verranno discussi nel paragrafo 7.5), è stato adottato lo stesso protocollo operativo delle prove definitive, nonché le medesime procedure analitiche. L'unica differenza risiede nella pianificazione dei campionamenti, che sono stati effettuati ai giorni 0, 3, 10 e 14, come anticipato nel paragrafo 7.1. Anche in questo caso, la durata del monitoraggio non è stata uniforme per tutti i parametri: l' AFB_1 è stata monitorata fino al giorno 14, mentre umidità, CBT e CMT fino al giorno 10. L'interruzione anticipata è dipesa, ancora una volta, dallo stato di deterioramento avanzato del campione.

7.4 Caratterizzazione dei campioni

Come anticipato, i valori misurati al giorno 0 hanno riguardato il mais già setacciato ma non ancora umidificato, e rappresentano dunque la caratterizzazione iniziale dei 3 campioni, nonché del test preliminare sul campione non trattato (che è stato effettuato sullo stesso mais).

I dati rilevati al T0 sono riportati in *Tabella 32*.

Tab. 32 – Caratterizzazione dei campioni al T0

Giorno	Umidità (%)	AFB_1 (ppb)	CBT (UFC/g)	CMT (UFC/g)
0	12,95	0,3	5500 (*)	1369500 (*)

(*) Valore medio di più repliche; i singoli risultati sono riportati nel testo.

Il contenuto di umidità era pari al 12,95%, in linea con quanto previsto per un mais secco. Allo stesso tempo, la granella non mostrava alcuna contaminazione da AFB_1 : il valore rilevato, pari a 0,3 ppb, è inferiore al LOD del metodo (1 ppb), e deriva dall'estrapolazione matematica basata sulla curva di calibrazione. All'inizio della prova, le cariossidi apparivano integre e in buone condizioni.

La CBT misurata al T0 risultava piuttosto bassa, pari a 5.500 UFC/g (valore medio di due repliche pari a 9.000 e 2.000 UFC/g). Una possibile spiegazione potrebbe essere ricondotta alla setacciatura eseguita prima della preparazione dei campioni, che ha rimosso le frazioni più fini (farina e piccoli frammenti), generalmente associate a una carica batterica più elevata. Tuttavia, poiché tale operazione non ha sortito un effetto analogo sulla CMT, l'ipotesi più probabile è che il risultato sia attribuibile alle caratteristiche intrinseche della partita di mais impiegata nella prova, la quale verosimilmente presentava una CBT iniziale naturalmente bassa.

La CMT al T0 era pari a 1.369.500 UFC/g, valore medio di due repliche dalla notevole variabilità, pari a 2.470.000 e 269.000 UFC/g: circa un ordine di grandezza di differenza. Sebbene il dato possa apparire inatteso (considerando il buon aspetto visivo della granella), una situazione di questo tipo non è insolita, ed è legata alla distribuzione eterogenea delle spore fungine nella matrice, come già discusso nel capitolo 6. Trattandosi di un fattore non controllabile, il valore medio è stato assunto come stima della CMT iniziale.

A 24 ore dal trattamento (giorno 1), è stata verificata l'umidità effettivamente raggiunta dai tre campioni: 18,59% per il campione non trattato, 19,18% per il campione trattato a 2 g/kg e 19,34% per il campione trattato a 4 g/kg. Nel test preliminare sul campione non trattato, tale verifica è stata invece effettuata al giorno 3, ottenendo un valore del 19,75%. Questi risultati si collocano leggermente al di sotto del target del 20%, probabilmente a causa di una distribuzione e/o assorbimento dell'acqua non perfettamente omogenei tra i chicchi. A conferma di ciò, al giorno 10 del test preliminare è stato rilevato un contenuto di umidità pari al 20,43%: le due misurazioni tendono quindi a compensarsi attorno al livello target. In ogni caso, i valori erano sufficientemente vicini al 20% da garantire la condizione di rischio elevato che la prova intendeva simulare.

7.5 Risultati del test preliminare

Come anticipato nel paragrafo 7.1, il test preliminare, eseguito su mais non trattato, voleva verificare che la granella umidificata al 20% andasse effettivamente incontro a deterioramento nelle condizioni di stoccaggio adottate. I campionamenti sono stati eseguiti nei giorni 0, 3, 10 e 14. Umidità, CBT e CMT sono state monitorate fino al giorno 10, mentre l'AFB₁ fino al giorno 14. I risultati sono riportati in *Tabella 33*.

Tab. 33 – Risultati del test preliminare su mais non trattato (NT)

Giorno	Campione	Umidità (%)	AFB₁ (ppb)	CBT (UFC/g)	CMT (UFC/g)
0	NT preliminare	12,95	0,3	5500 (*)	1369500 (*)
3	NT preliminare	19,75	0,3	7460000 (*)	5600000 (*)
10	NT preliminare	20,43	3540,1	350000000 (*)	32000000 (*)
14	NT preliminare	-	4818,5 (*)	-	-

(*) Valore medio di più repliche; i singoli risultati sono riportati nel testo.

7.5.1 Umidità

I valori di umidità rilevati (19,75% al giorno 3 e 20,43% al giorno 10) confermano il raggiungimento del livello target del 20%. La lieve oscillazione è attribuibile a una distribuzione dell'acqua non perfettamente omogenea, come già discusso nel paragrafo 7.4. Al giorno 14 l'umidità non è stata misurata poiché la stabilità osservata nei due campionamenti precedenti e il progressivo deterioramento della granella hanno reso opportuno destinare il restante materiale all'analisi dell'AFB₁.

7.5.2 Carica Batterica Totale (CBT)

La CBT è aumentata molto rapidamente, circa di tre ordini di grandezza in 72 ore: al giorno 3 ha infatti raggiunto 7.460.000 UFC/g (valore medio di due repliche pari a 5.660.000 e 9.260.000 UFC/g), a fronte di 5.500 UFC/g al T0. Al giorno 10 ha raggiunto 350.000.000 UFC/g come media di due repliche dall'elevata variabilità (9.000.000 e 691.000.000 UFC/g). Una differenza di questo tipo è legata all'eterogeneità della distribuzione dei microrganismi tra i chicchi: sia perché la colonizzazione può avvenire in modo localizzato, sia perché le condizioni che favoriscono la crescita non sono uniformi in tutta la matrice. Il monitoraggio della CBT si è concluso al giorno 10 a causa del deterioramento avanzato del campione.

7.5.3 Carica Micotica Totale (CMT)

La CMT ha seguito un andamento simile a quello della CBT: al giorno 3 ha raggiunto 5.600.000 UFC/g (valore medio di due repliche pari a 6.200.000 e 5.000.000 UFC/g). Come nella prima fase sperimentale, nel calcolo non sono stati inclusi i lieviti in quanto non rilevanti ai fini della valutazione del rischio tossicologico. Tuttavia, essi erano presenti in quantità elevate in entrambe le repliche (3.400.000 e 5.400.000 UFC/g). Al giorno 10 la CMT ha raggiunto 32.000.000 UFC/g (valore medio di 34.000.000 e 30.000.000 UFC/g), con 2.000.000 UFC/g di lieviti in entrambe le repliche. Il monitoraggio della CMT si è concluso al giorno 10 per le stesse motivazioni riportate per la CBT.

7.5.4 Aflatossine totali

Inizialmente il livello di AFB₁ è rimasto contenuto: al giorno 3 è stato rilevato un valore pari a 0,3 ppb, coerentemente con l'assenza di muffa sulla granella. Successivamente, la concentrazione è cresciuta rapidamente fino a raggiungere valori particolarmente elevati. Al giorno 6 sono comparse le prime tracce di muffa sulla granella, che in breve tempo si sono estese, come documentato in *Figura 42*. L'immagine confronta il mais prima dell'umidificazione con quello al termine del test (giorno 14). Nella maggior parte dei chicchi si osservano ampie macchie grigio-verdi e giallo-verdi di origine fungina, talvolta accompagnate da una patina biancastra.



Fig. 42 – Condizioni macroscopiche della granella al T0 (a sinistra) e al giorno 14 (a destra).

Al giorno 10 la contaminazione da AFB₁ ha raggiunto livelli così elevati da rendere necessaria, ai fini della quantificazione, l'applicazione della procedura di diluizione descritta nel paragrafo 5.1. La misurazione è stata eseguita su un sottocampione di 0,287 g di mais contaminato, con un fattore di diluizione di circa 1:139 (40 g / 0,287 g). Per aumentare la rappresentatività del campionamento, l'aliquota analizzata è stata prelevata da un omogenizzato di 5 g di granella contaminata, preventivamente macinata. Inoltre, per garantire l'effetto matrice, il sottocampione è stato integrato con mais pulito fino al raggiungimento della massa di 40 g prevista dalla procedura. Lo strumento ha restituito un valore di 25,4 ppb, da cui per proporzione si ottiene il valore reale di 3.540,1 ppb.

Al giorno 14, dato il livello di contaminazione atteso, sono state eseguite due repliche. Per ognuna è stato scelto il minimo fattore di diluizione in grado di restituire un valore quantificabile. La prima replica è stata misurata su 2,5 g di mais contaminato (prelevati da 5 g di omogenizzato), con un fattore di diluizione di 1:16 (40 g / 2,5 g). Lo strumento ha letto un valore di 17,7 ppb, pari a 283,2 ppb reali. La seconda replica è stata misurata su 0,13 g di mais contaminato (prelevati da 5 g di omogenizzato), con un fattore di diluizione di 1:308 (40 g / 0,13 g). Il valore letto, pari a 30,4 ppb, corrisponde a un valore reale di 9.353,8 ppb. Il valore medio delle due repliche risulta quindi pari a 4.818,5 ppb. La notevole differenza tra le due repliche, oltre a essere legata all'eterogeneità della distribuzione dell'AFB₁ nella granella, è certamente influenzata anche dai fattori di diluizione impiegati. In particolare, un

fattore di 1:308, amplifica considerevolmente eventuali piccole variazioni o errori casuali. Una differenza di pochi microgrammi nel sottocampione può infatti tradursi in uno scarto di migliaia di ppb nel valore finale.

Va precisato che, a questi livelli di contaminazione, l'accuratezza della quantificazione diventa sostanzialmente irrilevante dal punto di vista pratico: che il valore reale sia di alcune centinaia oppure di alcune migliaia di ppb, si è comunque di fronte a una contaminazione di decine o centinaia di volte superiore al limite normativo relativo al mais destinato all'alimentazione animale (20 ppb). Del resto, in questa fase, l'obiettivo era dimostrare il rapido accumulo di AFB₁, non quantificare la tossina con estrema accuratezza.

Dunque dal test preliminare emerge che, in assenza di trattamento, il mais al 20% di umidità tende a deteriorarsi rapidamente. Questo risultato costituisce la base sperimentale necessaria per valutare se, e in quale misura, i dosaggi di conservante testati nelle prove definitive siano stati capaci di contrastare il deterioramento.

7.6 Risultati delle prove definitive

I campioni analizzati nelle prove definitive verranno definiti come segue:

- NT: mais non trattato (controllo);
- T2: mais trattato a 2 g/kg;
- T4: mais trattato a 4 g/kg.

7.6.1 Umidità

L'andamento dell'umidità è riportato in *Tabella 34* e in *Figura 43*.

Tab. 34 – Andamento del contenuto di umidità (%) nei tre campioni

Giorno	NT	T2	T4
0	12,95	12,95	12,95
1	18,59	19,18	19,34
7	19,94	19,8	19,35
14	22,1	19,6	19,29
21	-	21,35	19,63

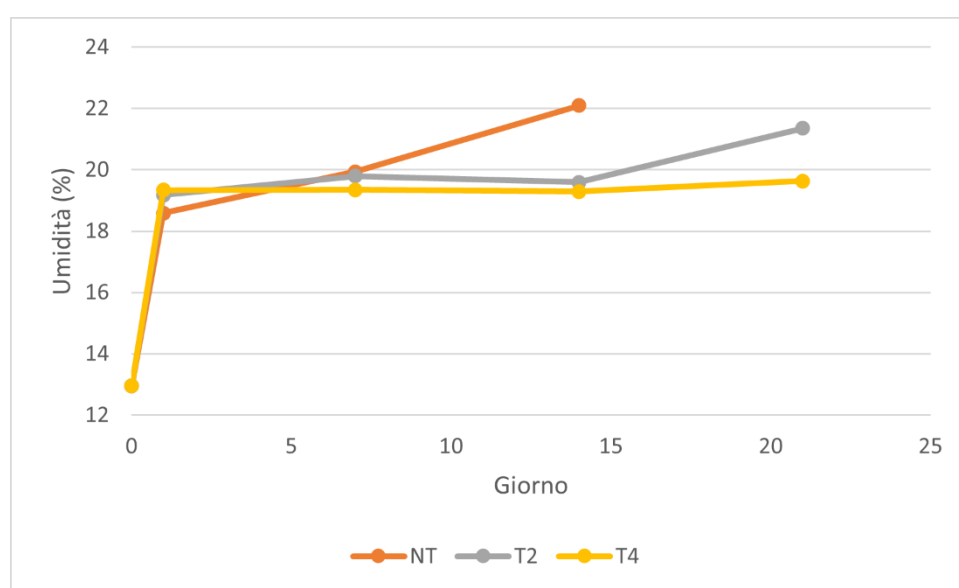


Fig. 43 – Andamento del contenuto di umidità (%) nei tre campioni. Il monitoraggio di NT si è concluso al giorno 14, mentre quello di T2 e T4 al giorno 21.

Come già descritto nel paragrafo 7.4, i valori misurati al giorno 1 erano pari a 18,59% per NT, 19,18% per T2 e 19,34% per T4. Nei campionamenti successivi, il contenuto di umidità è rimasto vicino al 20%. Si sono verificate lievi oscillazioni, ma non tali da determinare un trend di aumento o diminuzione. In T2 sono stati rilevati i seguenti valori: 19,8% al giorno 7, 19,6% al giorno 14 e 21,35% al giorno 21. T4 ha mantenuto un andamento più costante, con variazioni nell'ordine di pochi decimi di punto percentuale: 19,35% al giorno 7, 19,29% al giorno 14 e 19,63% al giorno 21. Per NT, i valori disponibili sono: 19,94% al giorno 7 e 22,1% al giorno 14. Quest'ultimo dato risulta leggermente superiore rispetto agli altri

campionamenti. Molto probabilmente si tratta di una normale oscillazione attorno al valore target, riconducibile ad una distribuzione e/o assorbimento dell'acqua non perfettamente omogenei tra i chicchi. Non si può comunque escludere un contributo secondario dovuto all'intensa attività microbica, che nel campione NT era già osservabile al giorno 14: l'acqua metabolica accumulata come sottoprodotto della respirazione cellulare potrebbe aver contribuito all'aumento del contenuto di umidità.

Complessivamente il contenuto di umidità si è quindi mantenuto costante per tutta la durata della prova, grazie all'elevata umidità relativa presente nell'incubatore. A differenza della prima fase sperimentale, dove l'umidità rappresentava una variabile dinamica, in questo caso si configura come una condizione iniziale stabile.

7.6.2 Carica Batterica Totale (CBT)

L'andamento della CBT è riportato in *Tabella 35* e in *Figura 44*.

Tab. 35 – Andamento della CBT (UFC/g) nei tre campioni

Giorno	NT	T2	T4
0	5500 (*)	5500 (*)	5500 (*)
1	500000	<1000	<1000
7	2000000	222727	140909
14	15000	2000000	1600000
21	-	310000	780000

(*) Valore medio di due repliche: 9000 e 2000 UFC/g.

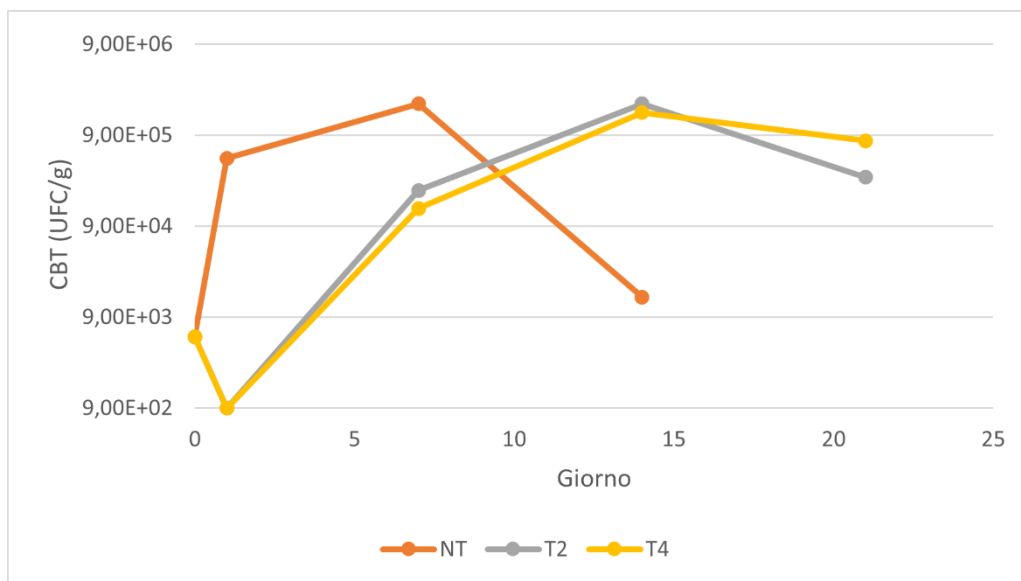


Fig. 44 – Andamento della CBT (UFC/g) nei tre campioni. Il monitoraggio di NT si è concluso al giorno 14, mentre quello di T2 e T4 al giorno 21. L'asse y è in scala logaritmica.

Al giorno 1, dopo sole 24 ore dall'umidificazione, la CBT del campione non trattato ha raggiunto 500.000 UFC/g, a fronte di 5.500 UFC/g al T0: circa due ordini di grandezza di differenza, in linea con quanto osservato nel test preliminare. L'incremento è riconducibile all'improvvisa disponibilità di acqua libera nel substrato, che ha favorito la proliferazione batterica. Al contrario, nei campioni trattati, la CBT è scesa al di sotto del limite di rilevabilità del metodo (<1.000 UFC/g). Alla diluizione minima piastrata (10^{-3}) non è stata infatti contata alcuna colonia. Questo risultato potrebbe indicare un effetto batteriostatico o battericida del conservante.

Al giorno 7 la CBT di NT è ulteriormente aumentata (2.000.000 UFC/g). Anche in T2 e T4 è aumentata rispetto al giorno 1 (222.727 e 140.909 UFC/g rispettivamente), pur rimanendo nettamente inferiore rispetto a NT. Ciò significa che l'effetto inibitorio del conservante non è assoluto: la CBT stava iniziando a crescere anche nei campioni trattati. In questo momento, la differenza tra T2 e T4 è pari a qualche decina di migliaia di UFC/g, pertanto non si osserva una maggiore efficacia di un dosaggio rispetto all'altro.

Al giorno 14 la CBT di NT è scesa a 15.000 UFC/g, un valore molto inferiore rispetto a quello rilevato al giorno 7, nonostante le condizioni del campione fossero peggiorate in tutti gli altri parametri. Questo calo è probabilmente legato ad una variazione degli equilibri tra le popolazioni microbiche, in cui i batteri perdono progressivamente spazio a favore dei funghi.

Infatti, come si vedrà in seguito, la crescita molto rapida della CMT, potrebbe aver limitato la popolazione batterica attraverso la competizione per le risorse o la produzione di metaboliti antimicrobici. Non è comunque da escludere il contributo dell'eterogeneità della matrice, che potrebbe aver determinato una sottostima della CBT reale. In ogni caso, al giorno 14 il monitoraggio del campione NT è stato interrotto per tutti i parametri poiché il deterioramento aveva già raggiunto uno stadio avanzato.

I campioni trattati, al giorno 14, hanno invece mostrato un aumento rispetto al giorno 7. T2 ha raggiunto 2.000.000 UFC/g, mentre T4 1.600.000 UFC/g: un incremento di un ordine di grandezza per entrambi. È interessante notare che, in questo momento della prova, la CBT di T2 e T4 è paragonabile a quella rilevata in NT al giorno 7, quasi come se il conservante avesse ritardato di circa una settimana la proliferazione batterica. Anche in questo caso non si osserva una netta distinzione di efficacia tra i due dosaggi.

Al giorno 21 la CBT è diminuita rispetto al giorno 14 in entrambi i campioni trattati. T2 è sceso a 310.000 UFC/g, mentre T4 a 780.000 UFC/g. Come già discusso per NT al giorno 14, la spiegazione più probabile è l'inibizione della componente batterica da parte di quella fungina, la cui crescita stava diventando predominante. Da notare come il calo più marcato si osservi in T2, dove, come si vedrà in seguito, il conservante ha esercitato un minor controllo sulla popolazione fungina. Ciò ha permesso a quest'ultima di svilupparsi più liberamente e, di conseguenza, ha determinato una maggiore inibizione della componente batterica. Anche in questo caso non si può escludere il contributo dell'eterogeneità della matrice nel determinare una sottostima della CBT reale; tuttavia, poiché il calo si è verificato in tutti i campioni, l'ipotesi della competizione microbica risulta la più plausibile tra le due. Come anticipato nel paragrafo 7.3, il monitoraggio della CBT nei campioni trattati si è interrotto al giorno 21, prima del termine della prova, poiché la quantità di campione rimasta era insufficiente a coprire tutte le determinazioni, e si è quindi scelto di privilegiare l'analisi dell'aflatossina.

Poiché le differenze in termini di CBT tra T2 e T4 non sono risultate particolarmente marcate, si può concludere che l'efficacia dei due dosaggi è sostanzialmente comparabile per questo parametro.

7.6.3 Carica Micotica Totale (CMT)

L'andamento della CMT è riportato in *Tabella 36* e in *Figura 45*.

Tab. 36 – Andamento della CMT (UFC/g) nei tre campioni

Giorno	NT	T2	T4
0	1369500 (*)	1369500 (*)	1369500 (*)
1	60000	36000	40000
7	14800000	54545	1000
14	24500000	26600000	16000
21	-	66500000	1320000

(*) Valore medio di due repliche: 2.470.000 e 269.000 UFC/g.

L'analisi della CMT è risultata particolarmente utile per valutare l'efficacia dei due dosaggi in quanto, rispetto alla CBT, ha mostrato differenze più marcate tra i campioni.

Contrariamente a quanto osservato in alcuni campionamenti del test preliminare, nelle prove definitive non è mai stata rilevata la presenza di lieviti durante l'analisi della CMT.

Al T0 la CMT era già piuttosto elevata, pari a 1.369.500 UFC/g, valore medio di due repliche alquanto eterogenee, come discusso nel paragrafo 7.4. Tuttavia, al giorno 1 si è registrata una notevole diminuzione in tutti i campioni: 60.000 UFC/g per NT, 36.000 per T2 e 40.000 per T4. Mentre la riduzione nei campioni trattati era attesa, in quanto riconducibile all'azione antifungina del conservante, lo stesso non poteva dirsi per il campione non trattato. Una spiegazione plausibile risiede nell'effetto dell'umidificazione: l'aggiunta di acqua e la successiva agitazione della bottiglia potrebbero aver modificato la distribuzione spaziale delle spore. In altre parole, la procedura di umidificazione potrebbe aver attenuato i punti di maggiore contaminazione (*hot spot*), a favore di una distribuzione più omogenea ma a un livello complessivamente inferiore. È pertanto probabile che i campionamenti effettuati al T0 avessero intercettato casualmente uno o più *hot spot*, determinando una sovrastima della CMT. Verosimilmente, il valore rilevato al T0 rappresenta una stima poco rappresentativa della contaminazione iniziale, mentre il dato del giorno 1 è da considerarsi più affidabile. In ogni caso, al giorno 1 non sono presenti differenze significative tra i campioni. Di

conseguenza, non risulta evidente un effetto immediato del conservante, contrariamente a quanto osservato con la CBT.

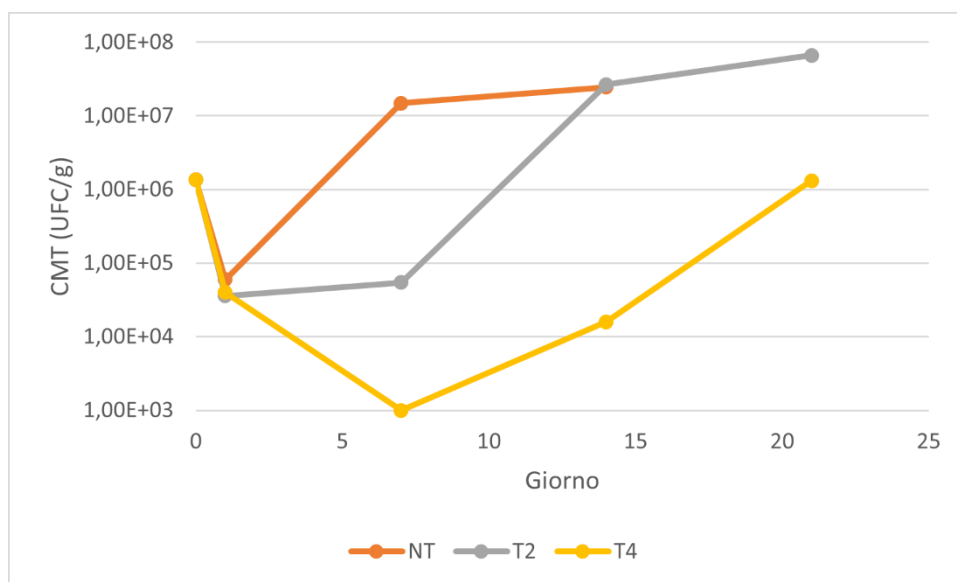


Fig. 45 – Andamento della CMT (UFC/g) nei tre campioni. Il monitoraggio di NT si è concluso al giorno 14, mentre quello di T2 e T4 al giorno 21. L'asse y è in scala logaritmica.

La situazione è cambiata al giorno 3, quando NT ha iniziato a mostrare le prime tracce di muffa visibile sulla granella; queste sono poi diventate diffuse a partire dal 7° giorno circa. Al campionamento del giorno 7 la CMT di NT ha infatti raggiunto 14.800.000 UFC/g, un incremento di circa tre ordini di grandezza rispetto al giorno 1. Al contrario, i campioni trattati hanno mantenuto valori contenuti. In T2 sono state rilevate 54.545 UFC/g, mentre in T4 appena 1.000 UFC/g. Quest'ultimo dato supporta molto bene l'efficacia del dosaggio di 4 g/kg a 7 giorni dall'applicazione, soprattutto considerando l'elevata CMT al T0. Anche il dosaggio di 2 g/kg ha esercitato un'azione inibitoria, ma in misura minore rispetto a T4. In questo momento, la differenza tra T2 e T4 in termini di CMT risulta essere di circa un ordine di grandezza.

Al giorno 14 NT ha raggiunto 24.500.000 UFC/g, con muffa visibile ormai ampiamente diffusa sulla granella. Proprio a causa del marcato deterioramento, questo è stato l'ultimo campionamento relativo al monitoraggio del campione NT. T4 ha mantenuto una CMT ridotta, pari a 16.000 UFC/g, con una granella ancora integra e priva di muffa visibile. T2, al contrario, ha raggiunto 26.600.000 UFC/g, un valore praticamente sovrapponibile a quello

di NT. Questo valore era accompagnato dalla presenza di muffa visibile sulla granella, in particolare sotto forma di micelio bianco-cotonoso. Il cedimento del dosaggio di 2 g/kg si colloca quindi tra il giorno 7 e il giorno 14, periodo nel quale la CMT è passata da 54.545 a 26.600.000 UFC/g. Un incremento di circa tre ordini di grandezza in una settimana indica infatti che il conservante ha esaurito la propria capacità inibitoria.

Al giorno 21 la CMT è aumentata in entrambi i campioni trattati: T2 ha raggiunto 66.500.000 UFC/g, mentre T4 1.320.000 UFC/g. Quest'ultimo valore, pur rimanendo molto inferiore rispetto a quello di T2, risulta in netto aumento. Allo stesso tempo, sulla granella di T4 sono comparse le prime tracce di muffa grigio-verde. Il cedimento del dosaggio di 4 g/kg si colloca quindi tra il giorno 14 e il giorno 21. In questo intervallo la CMT è aumentata da 16.000 a 1.320.000 UFC/g: circa due ordini di grandezza di differenza in una settimana. Rispetto alla dose di 2 g/kg, il dosaggio di 4 g/kg ha dunque esteso la protezione antifungina di circa una settimana.

In *Figura 46* vengono confrontate le condizioni macroscopiche dei tre campioni al termine del rispettivo periodo di monitoraggio delle cariche (giorno 14 per NT, giorno 21 per T2 e T4).

Il campione NT, fotografato al giorno 14, presenta numerosi chicchi con macchie di origine fungina dal colore grigio-verde e giallo-verde. Anche T2, fotografato al giorno 21, appare piuttosto compromesso: la granella risulta in gran parte ricoperta da un micelio bianco-cotonoso, un aspetto visivo coerente con l'elevata CMT (66.500.000 UFC/g) misurata in quella stessa data. T4, anch'esso fotografato al giorno 21, mostra invece una granella ancora perlopiù integra, in cui solo pochi chicchi presentano tracce di muffa grigio-verde. Il confronto tra T2 e T4 al giorno 21 risulta particolarmente eloquente: due diversi dosaggi hanno determinato, nello stesso momento della prova, condizioni macroscopiche differenti.

È interessante osservare le morfologie fungine presenti sulla granella, sebbene la sola analisi macroscopica non consenta di formulare ipotesi tassonomiche certe. In particolare, mentre in NT il micelio mostra un aspetto e una colorazione compatibili con *Aspergillus* sez. Flavi, lo stesso non si può dire per il micelio bianco-cotonoso dominante in T2. Questa differenza morfologica potrebbe indicare una diversa composizione della comunità fungina nei due campioni, un aspetto che verrà ripreso nel paragrafo 7.7 in relazione all'andamento dell'AFB₁.

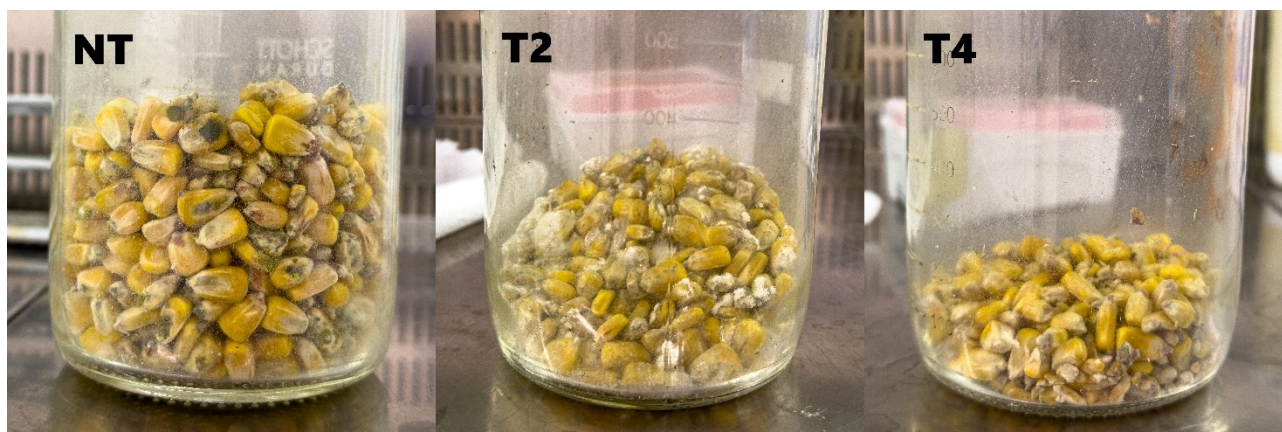


Fig. 46 – Condizioni macroscopiche dei tre campioni al termine del rispettivo periodo di monitoraggio delle cariche (giorno 14 per NT, giorno 21 per T2 e T4).

7.6.4 Aflatossine totali

L'andamento dell'AFB₁ è riportato in *Tabella 37* e in *Figura 47*.

Tab. 37 – Andamento dell'AFB₁ (ppb) nei tre campioni

Giorno	NT	T2	T4
0	0,3	0,3	0,3
1	0,3	0,3	0,3
7	110,4 (*)	0,3	0,3
14	> 40 (**)	0,3	N.D. (***)
21	-	0,4	35,4
25	-	0,4	1

(*) Valore medio di più repliche; i singoli risultati sono riportati nel testo.

(**) Valore superiore al limite analitico.

(***) Non determinato per risultati analitici contraddittori.

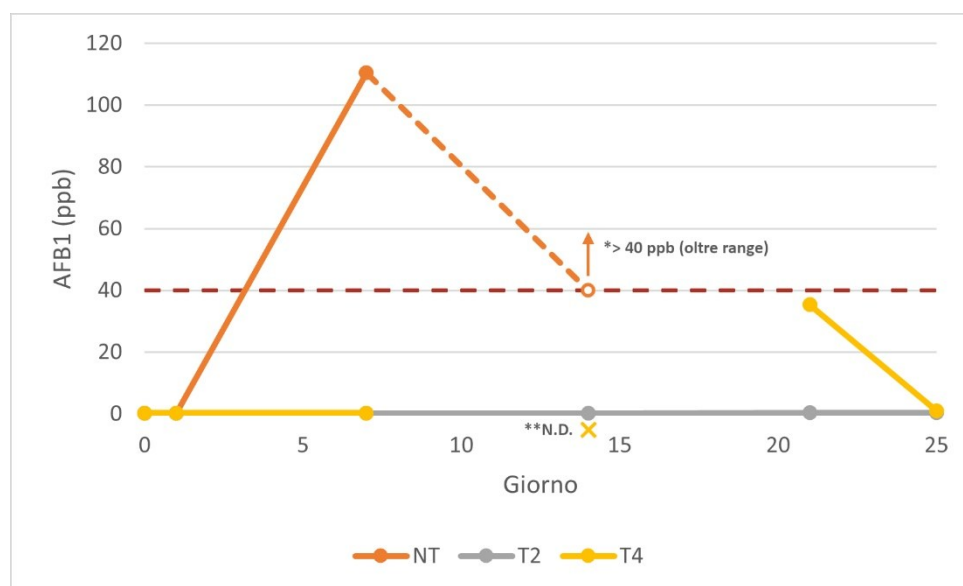


Fig. 47 – Andamento dell'AFB₁ (ppb) nei tre campioni durante i 25 giorni di monitoraggio. Il simbolo vuoto sulla curva NT (giorno 14) indica un valore superiore al limite superiore del range analitico (40 ppb). La x sulla curva T4 (giorno 14) indica un valore non determinato (N.D.) per risultati analitici contraddittori: la linea è volutamente interrotta in quel punto.

Rispetto agli altri parametri, nel caso delle aflatossine si sono osservate differenze più evidenti tra i campioni, pur a fronte di un'interpretazione dei risultati più complessa.

Al T0 e al giorno 1 è stata rilevata in tutti i campioni una concentrazione di AFB₁ pari a 0,3 ppb, valore inferiore al LOD del metodo (1 ppb). Va infatti ricordato che il software del robot ALFA Nano effettua un'estrapolazione matematica basata sulla curva di calibrazione per restituire un valore numerico anche quando questo si trova al di sotto del LOD. Le concentrazioni inferiori a 1 ppb vanno dunque considerate come stime puramente indicative. In ogni caso, poiché a 24 ore dal trattamento la crescita fungina si trovava ancora nelle fasi iniziali in tutti i campioni, come confermano i valori di CMT già discussi, la mancata sintesi di tossina risulta coerente.

Al giorno 7 NT ha raggiunto una concentrazione di 110,4 ppb, calcolata come valore medio di due repliche piuttosto discordanti: 38,9 ppb e 181,9 ppb. Quest'ultimo valore, poiché supererebbe il limite di rilevabilità del metodo (> 40 ppb), è stato ottenuto con la procedura di diluizione descritta nel paragrafo 5.1. Per l'analisi è stato impiegato un sottocampione di 2,55 g di mais contaminato su una massa totale di 40 g, pertanto il fattore di diluizione è di circa 1:16. Lo strumento ha restituito un valore di 11,6 ppb, che corrisponde a una concentrazione reale di 181,9 ppb. Al di là della discrepanza tra le due repliche, ancora una

volta attribuibile all'eterogeneità della matrice, la contaminazione raggiunta supera ampiamente il limite normativo relativo al mais destinato all'alimentazione animale (20 ppb). Nello stesso campionamento, T2 e T4 hanno invece mantenuto entrambi un valore di 0,3 ppb. In quel momento, entrambi i dosaggi riuscivano quindi a inibire la produzione di aflatossina, coerentemente con i valori ancora contenuti di CMT rilevati in T2 e soprattutto in T4.

Al giorno 14, per il campione NT, è stato effettuato un prelievo di 40 g come previsto dalla procedura standard, quindi senza alcuna diluizione. Poiché è stato superato il limite di rilevabilità del metodo, il dato viene riportato come > 40 ppb. Questa scelta è stata intenzionale: anziché ottenere una quantificazione del livello di contaminazione, si è voluto verificare, con un sottocampione rappresentativo e conforme al protocollo standard, che la concentrazione della tossina avesse effettivamente superato la soglia di rilevabilità.

Al giorno 14, T2 ha mantenuto un valore di 0,3 ppb, nonostante nel frattempo la CMT fosse salita a 26.600.000 UFC/g. Nello stesso giorno, come già discusso, NT ha raggiunto una CMT pressoché identica (24.500.000 UFC/g), sebbene accompagnata da un notevole accumulo di AFB₁. In T2 si osserva quindi una dissociazione tra crescita fungina e produzione di tossina, aspetto che verrà approfondito nel paragrafo 7.7.

Nel campione T4, al giorno 14 si osserva un risultato anomalo e contraddittorio. Nella prima misurazione, effettuata su 40 g di campione, è stato superato il limite di rilevabilità del metodo (> 40 ppb); di conseguenza, si è resa necessaria una seconda replica. Quest'ultima, eseguita sempre su 40 g di campione, ha restituito un valore di 0,3 ppb. Le due repliche descrivono quindi due scenari opposti: la prima suggerisce una contaminazione elevata, la seconda l'assenza di tossina rilevabile. Di fronte a una tale incongruenza, il dato relativo al giorno 14 per T4 è da considerarsi indeterminato, poiché l'attribuzione di un valore numerico risulterebbe fuorviante. La spiegazione più plausibile per un tale esito rimane l'eterogeneità della distribuzione della tossina nella matrice che, in questo caso, ha raggiunto un livello quasi paradossale. Tuttavia, resta aperta l'ipotesi di un errore analitico verificatosi in una o in entrambe le repliche. Va inoltre specificato che, per non compromettere il monitoraggio del campione nelle settimane successive, si è deciso di non procedere con un'ulteriore terza replica che avrebbe ridotto eccessivamente la matrice disponibile.

Al giorno 21, NT è stato escluso dal monitoraggio poiché si trovava in condizioni di deterioramento avanzato. In T2, invece, è stata rilevata una concentrazione di 0,4 ppb, un

dato interessante se si considera che, nello stesso momento, la CMT aveva raggiunto 66.500.000 UFC/g. Al contrario, in T4 è stato registrato un valore di 35,4 ppb, ottenuto analizzando 40 g di campione (senza diluizione). Questo picco si è verificato proprio in concomitanza del cedimento del conservante. Infatti, per il dosaggio a 4 g/kg, la stima effettuata sulla base dell'analisi della CMT, ha collocato tale cedimento tra il giorno 14 e il giorno 21. Purtroppo, a causa della ridotta quantità di campione rimasta, non è stato possibile eseguire una seconda replica per verificare la ripetibilità del dato.

Al giorno 25, T2 ha mantenuto una concentrazione di 0,4 ppb, valore ottenuto impiegando gli ultimi 40 g di campione. Per l'analisi di T4, invece, poiché erano rimasti solo 15,8 g di mais a causa del maggior numero di repliche effettuate, si è resa necessaria la procedura analitica modificata descritta nel paragrafo 5.1. In questo caso, il volume di solvente è stato ridotto proporzionalmente alla quantità di campione disponibile (15,8 g): 79 mL di AQUA PreMix anziché 200 mL. La concentrazione rilevata è di 1 ppb, valore esattamente pari al LOD ma inferiore al LOQ (2 ppb). Ciò significa che la tossina è presente, ma la sua quantificazione non è affidabile. In ogni caso, la differenza rispetto al campionamento precedente è notevole e di difficile interpretazione. È altamente improbabile che tale risultato sia riconducibile a una reale diminuzione della concentrazione di AFB₁. Infatti, l'elevata stabilità chimica dell'aflatossina ne impedisce la degradazione, soprattutto in tempi così brevi (appena 4 giorni) e nelle condizioni di conservazione adottate. L'interpretazione più plausibile rimane quindi, ancora una volta, l'eterogeneità della distribuzione della tossina nella granella. A questo aspetto si aggiunge un'ulteriore fonte di variabilità legata alla diversa procedura di analisi impiegata in quest'ultimo campionamento, che ha previsto l'utilizzo di una quantità di campione inferiore allo standard (15,8 g anziché 40 g). L'andamento di T4 risulta dunque complesso: i dati raccolti non consentono di individuare una chiara evoluzione della contaminazione. È tuttavia evidente che un accumulo di AFB₁ si è comunque verificato nella fase finale della prova, in seguito al cedimento del conservante.

7.7 Considerazioni sulla dissociazione tra crescita fungina e produzione di tossina

L'andamento di T2 risulta il più controverso, a causa della dissociazione tra crescita fungina e produzione di tossina. Questo fenomeno richiede un approfondimento, pur con la necessaria cautela.

Il dosaggio di 2 g/kg può essere considerato una concentrazione sub-letale (insufficiente a inibire completamente la crescita fungina), poiché l'effetto inibitorio osservato sulla CMT di T2 è risultato limitato. Infatti, dopo una parziale inibizione iniziale, al giorno 14 T2 ha raggiunto un valore di CMT pressoché sovrapponibile a quello del campione non trattato. Come già discusso nel paragrafo 2.10, alcuni studi riportano che a concentrazioni sub-letali l'acido propionico può paradossalmente stimolare la produzione di aflatossine (Al-Hilli & Smith, 1979). Tuttavia nella presente prova si è verificato il fenomeno opposto: mentre in NT si è osservato un incremento contestuale di CMT e AFB₁, in T2 l'incremento ha riguardato solo la CMT.

Alcuni studi (es. Ghosh & Häggblom, 1985) indicano che, se l'acido propionico viene addizionato prima dell'inoculo di *Aspergillus*, è possibile osservare una riduzione nella produzione di aflatossine anche a dosi sub-letali. Tuttavia, le condizioni sperimentali di laboratorio differiscono significativamente dalla realtà dello stoccaggio agricolo, dove la microflora è già insediata e la concentrazione del conservante tende a diminuire nel tempo a causa di volatilizzazione e degradazione biologica. In tali condizioni, le evidenze scientifiche supportano prevalentemente l'ipotesi di un effetto stimolatorio sulla sintesi di AFB₁ a dosi sub-letali, determinato dallo stress chimico indotto dal prodotto stesso. Appare quindi poco probabile che il conservante abbia inibito selettivamente la biosintesi delle aflatossine pur consentendo la proliferazione di *Aspergillus*.

Una spiegazione più verosimile è che in T2 si sia sviluppata una comunità fungina differente, priva di capacità tossigena. A sostegno di questa ipotesi vi è l'osservazione visiva della granella (*Figura 46*), che al giorno 21 era caratterizzata dalla presenza di un abbondante micelio bianco e cotonoso, morfologicamente incompatibile con la crescita giallo-verde tipica di *Aspergillus* osservata invece nel campione NT. Il conservante potrebbe quindi aver esercitato una pressione selettiva tale da favorire generi fungini non aflatossigeni. Va tuttavia evidenziato che l'interpretazione non è del tutto lineare: nel campione T4 (trattato con una dose superiore) si è infatti verificato un accumulo finale di AFB₁. Ciò suggerisce che la dinamica di selezione microbica potrebbe essere dose-dipendente. Inoltre, la mancata identificazione tassonomica delle specie fungine presenti e la disponibilità di un'unica replica per ciascun trattamento impongono estrema cautela nell'interpretazione.

In conclusione, sebbene non si possa escludere una parziale interferenza del conservante sulla via biosintetica della tossina, la diversificazione nella composizione della microflora

rimane l'ipotesi più ragionevole per spiegare il comportamento di T2. In ogni caso, anche ipotizzando un effettivo blocco della tossinogenesi, il risultato non sarebbe risolutivo dal punto di vista pratico: una partita di mais con una CMT pari a decine di milioni di UFC/g rimane comunque inadatta all'impiego zootecnico.

Un'ultima considerazione riguarda il ruolo del pH. Come discusso nel paragrafo 2.8, la letteratura scientifica indica che la biosintesi delle aflatossine risulta favorita da valori di pH moderatamente acidi, compresi tra 4 e 6. Di conseguenza, la diminuzione del pH indotta dal conservante non contribuisce a limitare direttamente la produzione di aflatossine. Piuttosto, aumenta l'efficacia antimicrobica dell'acido propionico: la sua attività, legata alla concentrazione della forma indissociata della molecola, risulta infatti maggiore a pH più bassi, come descritto nel dettaglio nel paragrafo 2.10.

7.8 Confronto con il test preliminare

I risultati del test preliminare, descritti nel paragrafo 7.5, costituiscono un utile termine di confronto con il campione NT delle prove definitive. Occorre tuttavia precisare che non si tratta di una vera replica sperimentale, in quanto è stato adottato un diverso piano di campionamento (giorni 0, 3, 10, 14 nel test preliminare rispetto a 0, 1, 7, 14 nelle prove definitive).

Al giorno 3 del test preliminare, la CBT ha raggiunto 7.460.000 UFC/g e la CMT 5.600.000 UFC/g, mentre nel campione NT definitivo, al giorno 1, gli stessi parametri si sono attestati rispettivamente a 500.000 e 60.000 UFC/g. Questa differenza è dovuta, almeno in parte, al maggiore tempo di incubazione del test preliminare (72 ore anziché 24).

Per quanto riguarda l'AFB₁, il massimo valore quantificato nel campione NT definitivo è pari a 110,4 ppb (valore medio di 38,9 ppb e 181,9 ppb), registrato al giorno 7. Nel test preliminare, invece, si sono osservati picchi di 3.540,1 ppb al giorno 10 e 4.818,5 ppb al giorno 14 (valore medio di 283,2 ppb e 9.353,8 ppb), nettamente superiori rispetto a quelli rilevati in NT definitivo. Tuttavia, è necessario ricordare che per quest'ultimo, al giorno 14, non è stata effettuata una quantificazione puntuale. Al contrario, il risultato è stato riportato come > range (cioè > 40 ppb), come discusso nel paragrafo 7.6. Di conseguenza, non è possibile stabilire quale fosse l'effettiva concentrazione raggiunta da NT definitivo al giorno 14.

In ogni caso, anche se non rappresenta una replica formale, questo confronto conferma la rapidità del deterioramento e del conseguente accumulo di AFB₁. Valori nell'ordine delle centinaia o migliaia di ppb mostrano quanto possa risultare grave la contaminazione fungina in un mais ad alta umidità privo di protezione.

7.9 Selettività del conservante

Riguardo alla selettività del conservante, l'analisi dei valori di CBT e CMT al giorno 1, sembra indicare un'azione prevalente sulla componente batterica. Nei campioni trattati, infatti, la CBT è scesa sotto il limite di rilevazione (<1.000 UFC/g), mentre la CMT, pur essendosi ridotta, si è mantenuta su valori nell'ordine delle decine di migliaia di UFC/g (36.000 per T2 e 40.000 per T4). Sebbene la CMT partisse da una carica iniziale molto più elevata rispetto alla CBT (1.369.500 UFC/g contro 5500 UFC/g), e quindi la riduzione osservata possa apparire proporzionalmente più accentuata, è necessario considerare anche l'evoluzione del campione non trattato. In quest'ultimo, infatti, nelle prime 24 ore la CBT è aumentata a 500.000 UFC/g, mentre la CMT è diminuita spontaneamente a 60.000 UFC/g, un valore molto simile a quello dei campioni trattati. Ciò significa che, nei campioni trattati, la riduzione della CMT è stata prevalentemente dovuta all'evoluzione naturale del campione. Al contrario, il conservante ha esercitato un effetto aggiuntivo significativo sulla componente batterica.

Al giorno 1, la differenza in termini di CBT tra NT e i campioni trattati è di circa due o più ordini di grandezza (500.000 UFC/g contro <1.000 UFC/g). Invece, i valori di CMT si mantengono tutti nello stesso ordine di grandezza (60.000 UFC/g contro 36.000-40.000 UFC/g).

Se nelle prime 24 ore l'effetto antimicrobico è stato più evidente nei confronti dei batteri, nel medio periodo il conservante ha saputo controllare più efficacemente e in maniera più duratura la componente fungina. Infatti, già al giorno 7 la CBT dei campioni trattati è iniziata ad aumentare e, al giorno 14, ha raggiunto valori nell'ordine delle centinaia di migliaia di UFC/g. La CMT, invece, si è mantenuta a valori contenuti più a lungo, soprattutto nel campione T4, nel quale è iniziata ad aumentare solo a partire dal giorno 21. Il profilo di selettività dipende quindi dall'intervallo temporale considerato.

In seguito al cedimento del conservante (o comunque nel medio-lungo periodo nel campione non trattato), si osserva una prevalenza della componente fungina rispetto a quella batterica. Questa evidenza suggerisce che, durante lo stoccaggio, il rischio microbiologico sia legato soprattutto alla proliferazione fungina piuttosto che a quella batterica.

Occorre precisare che il profilo di selettività osservato potrebbe dipendere anche dalla specifica composizione delle comunità batteriche e fungine presenti nei campioni, poiché le diverse specie possono mostrare una diversa sensibilità alla forma indissociata dell'acido (la forma biologicamente attiva).

7.10 Analisi comparativa dei dosaggi

Oltre a valutare l'efficacia dei due dosaggi, la prova mirava a verificare l'esistenza di una relazione dose-risposta lineare tra la concentrazione di conservante e la capacità protettiva. In alternativa, era infatti possibile che, oltre una certa soglia, un ulteriore incremento del dosaggio non producesse benefici proporzionali. L'analisi comparativa che segue intende indagare proprio questo aspetto.

Prima di procedere è necessario evidenziare un importante limite metodologico: con soli due dosaggi non è possibile definire una reale curva dose-risposta. Per distinguere un andamento lineare da una da una relazione di altro tipo sarebbe infatti necessario almeno un terzo dosaggio. I risultati ottenuti si limitano quindi a fornire un'indicazione preliminare.

Innanzitutto, entrambi i dosaggi hanno garantito una protezione superiore rispetto al controllo non trattato. In quest'ultimo, la CBT ha raggiunto 500.000 UFC/g a sole 24 ore dall'umidificazione, mentre al giorno 7 la CMT è arrivata a quasi 15.000.000 UFC/g e l'AFB₁ ha superato i 100 ppb. Nessuno dei due campioni trattati ha mostrato un deterioramento altrettanto rapido. Ciò conferma che, a differenza di quanto osservato nella prima fase sperimentale con il dosaggio di 0,5 g/kg, i dosaggi di 2 e 4 g/kg riescono a esercitare un'azione protettiva.

Per quanto riguarda la CBT, non si osservano differenze rilevanti tra T2 e T4: entrambi i dosaggi hanno azzerato la carica batterica nelle prime 24 ore e, nelle settimane successive, hanno mostrato un andamento analogo, con valori dello stesso ordine di grandezza. Di conseguenza, per questo parametro non emerge un vantaggio significativo nell'impiego del dosaggio più elevato.

La differenza tra i due dosaggi risulta invece apprezzabile nella CMT. Come descritto nel paragrafo 7.6, il cedimento del conservante si è verificato tra il giorno 7 e il giorno 14 per T2, e tra il giorno 14 e il giorno 21 per T4. Il dosaggio di 4 g/kg ha quindi prolungato la finestra di protezione di circa una settimana rispetto a quello di 2 g/kg. In effetti, al giorno 21 la granella di T2 appariva ricoperta da un abbondante micelio, mentre quella di T4 risultava ancora pressoché integra. Il raddoppio del dosaggio ha quindi determinato un beneficio quantificabile. In questo caso, l'entità del miglioramento osservato non suggerisce il raggiungimento di un plateau; al contrario, lascia ipotizzare che un ulteriore incremento del dosaggio potrebbe prolungare ancora la durata della protezione, sebbene tale ipotesi necessiti di future verifiche.

Per quanto riguarda l'aflatossina, il quadro analitico si presenta complesso. T2, nonostante l'importante crescita fungina, ha mantenuto un livello di contaminazione pressoché nullo (0,3-0,4 ppb). T4, al contrario, ha mostrato un accumulo significativo di AFB₁ a partire dal giorno 21 (35,4 ppb), in corrispondenza del cedimento del conservante. Tuttavia, come discusso nel paragrafo 7.6, l'andamento dell'AFB₁ in T4 rimane di difficile interpretazione, a causa dei dati contrastanti registrati ai giorni 14, 21 e 25. La migliore protezione tossicologica offerta dal dosaggio inferiore rispetto a quello superiore costituisce un risultato inatteso e apparentemente controintuitivo, al quale si è cercato di dare una spiegazione nel paragrafo 7.7. Questa evidenza suggerisce che, almeno nel caso dell'AFB₁, la relazione tra dosaggio ed effetto protettivo non sia riconducibile a una proporzionalità diretta, ma sia verosimilmente influenzata da meccanismi più complessi.

I risultati della prova indicano quindi che non esiste un'unica relazione dose-risposta valida per tutti i parametri monitorati. L'effetto del conservante deve essere valutato separatamente per ciascuna delle tre dimensioni del rischio: batterica, micotica e tossicologica.

Tra i due dosaggi, i dati raccolti indicano un profilo di sicurezza complessivamente migliore per quello da 4 g/kg. Infatti, nonostante l'accumulo finale di AFB₁, nel campione T4 la proliferazione fungina è rimasta inibita più a lungo rispetto a T2. L'assenza di AFB₁ in T2 non è sufficiente a ribaltare la valutazione complessiva, poiché un mais con una carica micotica di decine di milioni di UFC/g risulta comunque inadatto all'alimentazione zootecnica.

Tuttavia, per definire il dosaggio ottimale a livello operativo, sarà necessario condurre un'analisi costi-benefici: occorre infatti verificare che il maggior margine di sicurezza

garantito dalla dose di 4 g/kg giustifichi il costo economico derivante dal maggior consumo di prodotto. Questo aspetto non rientrava negli obiettivi della prova, pertanto richiederà ulteriori approfondimenti, che dovranno essere estesi ad un maggior numero di dosaggi e di repliche.

8. Discussione dei risultati e conclusioni

8.1 Introduzione al capitolo

Il presente capitolo è dedicato alla discussione dei risultati della sperimentazione del progetto di tesi. Per l'analisi statistica dei dati storici aziendali si rimanda al capitolo 4.

I risultati delle due prove sono già stati discussi singolarmente nei capitoli 6 e 7. Il presente capitolo li considera insieme, per mettere in evidenza alcuni aspetti che emergono dal confronto dell'intero percorso sperimentale.

Il collegamento tra le due fasi sperimentali risiede nella soglia del 19-20% di umidità, individuata al termine della prima prova come il punto a partire dal quale la crescita microbica diventa incontrollata e inizia la produzione di aflatossine. È su questo valore che si basa la progettazione della fase successiva: invece di lasciare che la granella raggiungesse gradualmente la soglia critica attraverso l'assorbimento di vapore acqueo, i campioni sono stati portati al 20% di umidità tramite umidificazione artificiale. In questo modo, è stata riprodotta fin da subito una condizione di rischio che nella prima fase era comparsa solo dopo circa 80 giorni di stoccaggio.

L'adozione di questa strategia ha cambiato il ruolo dell'umidità all'interno del disegno sperimentale. Da variabile dinamica da monitorare nel tempo (al fine di identificare la soglia critica), essa è diventata una condizione di partenza da mantenere stabile. In questo caso, l'elevata umidità relativa dell'incubatore serviva a impedire la perdita di acqua per evaporazione, anziché a favorirne l'assorbimento. La domanda sperimentale si era infatti spostata da "quando il mais diventa a rischio?" a "cosa si può fare quando lo è già?".

La procedura di umidificazione artificiale è stata inoltre utilizzata per veicolare il conservante sui campioni di mais. Il prodotto è stato disciolto nell'acqua da aggiungere alla granella, in maniera tale da garantire una distribuzione omogenea delle ridotte dosi da testare. Questa procedura non era praticabile sulla granella secca della prima fase sperimentale; per questo motivo, in quel caso, il campione trattato a 0,5 g/kg era stato prelevato direttamente dall'impianto, e apparteneva quindi a una partita differente rispetto a quella del campione non trattato. Al contrario, i tre campioni della seconda fase (il controllo non trattato e i due trattati a 2 e 4 g/kg) provengono tutti dalla stessa partita di mais.

8.2 Efficacia dose-dipendente del conservante

Il dosaggio di 0,5 g/kg, testato nella prima fase, non ha rallentato il deterioramento della granella rispetto al controllo non trattato. Al contrario, i campioni trattati hanno quasi sempre mostrato condizioni peggiori in tutti i parametri. T1 ha raggiunto 17,15 ppb al giorno 87, mentre nei campioni non trattati la tossina è comparsa al giorno 102 e a livelli più contenuti. Come già discusso nel capitolo 6, gran parte di questo comportamento potrebbe dipendere dalla diversa provenienza delle due partite di mais impiegate per le due tipologie di campioni (trattato e non trattato). Inoltre, poiché i campioni T1 e T2 sono stati prelevati direttamente dall'impianto con il conservante già applicato, non è nota la data effettiva del trattamento. Di conseguenza, a causa della volatilità dell'acido propionico e dell'ammonio propionato, è probabile che la concentrazione realmente presente nella granella all'inizio della prova fosse già inferiore al valore nominale. Oltretutto, nel corso dei 102 giorni di stoccaggio, la concentrazione potrebbe essersi ridotta ulteriormente. In ogni caso, alla dose minima raccomandata dal produttore, il conservante non ha offerto alcun margine di sicurezza aggiuntivo in condizioni di stoccaggio critico.

Prima dell'avvio della seconda fase sperimentale, è stato condotto un test esplorativo su campioni di mais al 20% di umidità per indagare quali dosaggi potessero avere maggior efficacia. Alla dose di 1 g/kg (già doppia rispetto alla dose minima di etichetta) è comunque comparsa muffa visibile nel giro di pochi giorni. Solo i campioni trattati a 2 e 4 g/kg hanno mostrato risultati sufficientemente promettenti da giustificare l'impiego nella sperimentazione vera e propria.

Nelle prove definitive, entrambi i dosaggi testati (2 e 4 g/kg) hanno garantito una protezione superiore rispetto al controllo non trattato. Quest'ultimo, nel giro di una settimana aveva infatti già raggiunto una CBT di 2.000.000 UFC/g, una CMT di 14.800.000 UFC/g e un'aflatossina pari a 110,4 ppb.

Per confrontare l'efficacia dei due dosaggi, è necessario considerare separatamente i singoli parametri. Sulla componente batterica la differenza è minima. A 24 ore dal trattamento, sia 2 sia 4 g/kg hanno portato la CBT sotto al limite di rilevabilità; inoltre, nelle settimane successive le due curve sono rimaste sostanzialmente sovrapponibili. Per questo parametro dunque, raddoppiare la dose non ha prodotto ulteriori vantaggi.

Sulla componente fungina, invece, si osserva una netta differenza tra i due dosaggi. A 2 g/kg la CMT è rimasta contenuta per la prima settimana (54.545 UFC/g al giorno 7); tuttavia,

in seguito, è aumentata rapidamente fino a raggiungere 26.600.000 UFC/g al giorno 14, cioè un valore praticamente sovrapponibile a quello del campione non trattato misurato lo stesso giorno (24.500.000 UFC/g). Questo risultato indica che il conservante aveva ormai perso la propria capacità inibitoria. A 4 g/kg la CMT si è mantenuta a valori ridotti fino al giorno 14 (16.000 UFC/g). In quel momento la granella si presentava ancora visivamente integra. Si è poi verificata una crescita evidente tra il giorno 14 e il giorno 21 (1.320.000 UFC/g). In questo caso, il raddoppio della dose ha quindi allungato di circa una settimana la finestra di protezione. L'aumento della CMT registrato in T4 al giorno 21 non sembra indicare un fenomeno in via di stabilizzazione, quanto piuttosto l'inizio dello stesso tipo di cedimento osservato in T2 la settimana precedente.

L'aflatossina ha mostrato un comportamento differente rispetto a quello che l'andamento della CMT farebbe pensare. T2, nonostante la carica fungina elevata, ha sempre mantenuto valori di AFB₁ pressoché nulli (0,3-0,4 ppb). Al contrario, T4, ha accumulato tossina in concomitanza con la crescita della CMT, anche se con risultati analitici contrastanti (come discusso nel paragrafo 7.6). Il risultato più rilevante si osserva al giorno 21, quando T4 ha mostrato una concentrazione di 35,4 ppb. A prima vista, questo esito pare smentire un'efficacia dose-dipendente del prodotto. Tuttavia, più che alla quantità di conservante, il fenomeno sembra essere legato al tipo di popolazione fungina che si è sviluppata nei due campioni, come discusso nel paragrafo 7.7.

Dosaggi di 2 e 4 g/kg, sensibilmente più alti rispetto alla dose minima raccomandata dal produttore, sono dunque in grado di rallentare sia la crescita batterica sia quella fungina. Si tratta però di una protezione limitata nel tempo, la cui durata dipende dalla quantità di prodotto impiegata (almeno per quanto riguarda la componente fungina).

8.3 Velocità di deterioramento e finestra di intervento

Nella prima fase sperimentale, il superamento della soglia critica di umidità si è verificato solo dopo un periodo prolungato. Nei primi due mesi l'incremento è stato infatti molto lento (da un valore iniziale di poco superiore al 13% a poco più del 14% al giorno 59). Allo stesso tempo, carica batterica, carica fungina e aflatossina si sono mantenute sostanzialmente stabili. Proprio in virtù di questa stabilità, si era scelto di sospendere temporaneamente i campionamenti tra il giorno 59 e il giorno 81. Non è pertanto possibile stabilire se, nelle tre settimane di interruzione, il deterioramento sia stato graduale oppure se si sia concentrato

solo negli ultimi giorni antecedenti alla ripresa dei campionamenti. A complicare l'interpretazione si aggiunge l'infestazione da *Sitophilus* sp., rilevata per la prima volta al giorno 81.

In ogni caso, al superamento della soglia ha fatto seguito un rapido deterioramento della granella. T1 ha raggiunto l'umidità critica al giorno 81 (19,81%) e, appena sei giorni dopo (giorno 87), l'aflatossina ha raggiunto 17,15 ppb, la carica batterica 597.000.000 UFC/g e quella fungina 66.000.000 UFC/g. T2 ha superato la soglia al giorno 87 (20,39%), e sette giorni più tardi ha mostrato un quadro molto simile. NT1 e NT2 hanno raggiunto il 20% di umidità solo all'ultimo campionamento della prova, momento nel quale si è anche verificato il primo accumulo di aflatossina.

Nella seconda fase sperimentale, poiché i campioni partivano fin dall'inizio da un contenuto di umidità del 20%, è stato possibile osservare la dinamica del deterioramento senza l'interferenza dell'infestazione entomologica. Questo approccio ha inoltre permesso di analizzare la risposta nei primi giorni successivi al superamento della soglia, un aspetto non rilevato nella prima fase a causa dell'interruzione dei campionamenti.

Nel test preliminare della seconda fase, la muffa è diventata visibile sulla granella al giorno 6. Al giorno 10, la contaminazione da aflatossina ha raggiunto 3.540,1 ppb, per poi salire a 4.818,5 ppb al giorno 14. Il campione NT delle prove definitive ha invece mostrato già al giorno 7 una concentrazione di aflatossina di 110,4 ppb e una CMT di 14.800.000 UFC/g.

Come già evidenziato, T2 si è mantenuto in condizioni accettabili per circa una settimana; poi, tra il giorno 7 e il giorno 14 si è verificato il primo cedimento della CMT. In T4 il cedimento si è verificato una settimana dopo, tra il giorno 14 e il giorno 21. In entrambi i casi, il conservante non ha garantito una protezione permanente, bensì un ritardo dose-dipendente del deterioramento.

Osservando i risultati di entrambe le fasi sperimentali, si può dunque concludere che, una volta raggiunta la soglia di umidità critica, sono sufficienti 1-3 settimane (in funzione del trattamento e del dosaggio) per rendere la granella inutilizzabile. Di conseguenza, il tempo disponibile per intervenire su un mais compromesso è estremamente ridotto. Il conservante amplia la finestra di protezione, ma non è in grado di estenderla oltre un certo limite. La prevenzione del superamento della soglia resta pertanto la strategia più solida per la gestione del rischio microbiologico e tossicologico, ben superiore a qualsiasi azione correttiva a deterioramento già avviato.

Per una visione d'insieme delle evidenze emerse, la *Tabella 38* sintetizza i principali risultati ottenuti nelle due fasi sperimentali.

Tab. 38 – Sintesi comparativa dei risultati delle due fasi sperimentali

	Fase 1: Monitoraggio di Lungo Periodo	Fase 2: Stress Test ad Umidità Critica
Obiettivo dello studio	Individuare la soglia critica di umidità e valutare l'efficacia del dosaggio minimo (0,5 g/kg)	Valutare l'efficacia di dosi superiori (2 e 4 g/kg) su mais già alla soglia critica di umidità
Umidità iniziale e stoccaggio	13% iniziale; aumento progressivo fino a >20% in 102 giorni (28° C, 80–85% UR)	20% costante (umidificazione artificiale); 25 giorni di monitoraggio (28° C, 80–85% UR)
Modalità di applicazione	Prodotto applicato puro su granella secca	Prodotto disciolto nell'acqua di umidificazione
Evoluzione del controllo (NT)	Deterioramento e sintesi di AFB ₁ innescati al superamento del 19–20% di umidità (gg 81–102)	Deterioramento microbiologico immediato (esplosione di CBT/CMT a gg 3–7) e AFB ₁ > 110 ppb a gg 7
Controllo Batterico (CBT)	Inefficace (0,5 g/kg): cariche elevate e superiori al controllo al termine della prova	Abbattimento immediato (<1.000 UFC/g a 24 h) per 2 e 4 g/kg; ricrescita contenuta nel medio periodo
Controllo Fungino (CMT)	Inefficace (0,5 g/kg): rapida crescita di muffe una volta raggiunta un'alta a_w	T2 (2 g/kg): cedimento tra gg 7 e 14. T4 (4 g/kg): cedimento tra gg 14 e 21 (+1 settimana di protezione)
Sintesi di Aflatossine (AFB₁)	Accumulo significativo dopo il superamento della soglia critica anche nel campione trattato	T2: assente (0,3–0,4 ppb) per selezione di specie non tossigene. T4: blocco fino a gg 14; accumulo tardivo (35,4 ppb) al cedimento
Esito operativo principale	La dose da 0,5 g/kg è insufficiente; la soglia critica è pari al 19–20% di umidità	La dose da 4 g/kg garantisce la miglior protezione poiché prolunga la protezione di 7 giorni rispetto a 2 g/kg

8.4 Composizione della comunità fungina e rischio tossicologico

La carica micotica totale, per quanto utile, non fornisce informazioni sulle specie fungine presenti nel substrato. Solo attraverso l'attenta osservazione delle piastre è possibile distinguere la composizione della comunità fungina. Nella prima fase sperimentale, la diversità dei morfotipi fungini osservati era piuttosto elevata: colonie giallo-verdi con testa conidiale radiata (morfologicamente compatibili con *Aspergillus flavus*), colonie compatte blu-verdi (riconducibili a *Penicillium*), colonie di grandi dimensioni bruno-nerastre (compatibili con *Aspergillus* sez. Nigri) e piccole colonie bianche (non ben identificate). I

campioni dunque ospitavano una popolazione fungina composta, della quale solo una parte aveva una capacità aflatossigena.

È però necessario ricordare che il confronto morfologico tra le piastre non ha permesso di trarre conclusioni su una possibile diversa predisposizione dei campioni all'accumulo di aflatossina, poiché la composizione osservata dipendeva troppo dalla distribuzione casuale delle spore nel sottocampione.

Come già discusso, durante la seconda fase sperimentale la CMT del campione T2 ha raggiunto livelli sostanzialmente identici a quelli del controllo non trattato. Allo stesso tempo l'AFB₁ è rimasta stabile su valori di 0,3-0,4 ppb. Si è dunque verificata una dissociazione tra crescita fungina e produzione di tossina. Le possibili spiegazioni alla base di questo fenomeno sono state discusse nel dettaglio nel paragrafo 7.7. L'ipotesi più plausibile è che in T2 si sia sviluppata una comunità fungina priva di capacità tossigena, verosimilmente per effetto di un'azione selettiva da parte del conservante. La morfologia del micelio sviluppatosi sulla granella risultava infatti incompatibile con *Aspergillus*. Tuttavia, in assenza di una verifica microscopica, non è possibile confermare questa conclusione.

T4, trattato a un dosaggio doppio rispetto a T2, ha invece mostrato un accumulo di AFB₁ (35,4 ppb al giorno 21), in concomitanza con l'incremento della CMT. È dunque possibile che la selezione a favore di specie non tossigene non segua una risposta lineare rispetto alla concentrazione del conservante. Purtroppo i dati disponibili non permettono di andare oltre questa speculazione.

In ogni caso, risulta evidente come la carica micotica totale, da sola, non sia un indicatore affidabile del rischio da aflatossine. Un mais con una CMT contenuta può nascondere un rischio elevato se la popolazione è dominata da specie tossigene. Al contrario, un mais con una CMT elevata può presentare un rischio tossicologico trascurabile se a proliferare sono specie non tossigene.

Va detto, per chiarezza, che una CMT di decine di milioni di UFC/g risulta comunque incompatibile con l'impiego zootecnico, indipendentemente dal profilo tossigeno delle specie fungine presenti. Di conseguenza, il dosaggio da 2 g/kg resta inadeguato alla gestione del rischio.

8.5 Limiti metodologici complessivi

Nella prima fase sperimentale sono state impiegate due repliche per ciascuno dei due gruppi testati (NT e T). Tuttavia, a causa di vincoli logistici già discussi nel capitolo 6, i campioni NT provenivano da una partita di mais differente rispetto a quella del gruppo T. Ciò ha reso impossibile attribuire con certezza le differenze osservate all'azione del conservante. Nella seconda fase è stato invece utilizzato un unico lotto di mais per tutti i campioni, ma la disponibilità di materiale e di spazio nell'incubatore ha impedito di replicare ciascuna condizione testata. Di conseguenza, la solidità del confronto tra i gruppi risulta compromessa in entrambe le fasi. Manca inoltre una caratterizzazione varietale del mais impiegato. Ciò impedisce di determinare l'eventuale incidenza della suscettibilità genetica alla colonizzazione fungina e batterica. Oltretutto, le conclusioni ottenute sono circoscritte al prodotto testato e non possono essere estese ai conservanti a base di propionati in generale.

Va inoltre evidenziato che le condizioni di laboratorio, sebbene concepite per simulare uno stoccaggio reale, non possono replicare fedelmente le dinamiche di un silo. Per motivi logistici, nelle due fasi i campioni sono stati riposti all'interno di contenitori differenti: taniche di plastica da 5 litri con circa 1,5 kg di granella nella prima fase, e bottiglie di vetro da 1 litro con 350 g di granella nella seconda. In entrambi i casi, il rapporto tra superficie esposta e massa di granella era nettamente superiore rispetto a quello di un silo. Inoltre, l'incubatore impiegato per la prova era a convezione naturale, dunque privo di ricircolo dell'aria. Per mitigare eventuali gradienti di temperatura e umidità, la posizione dei contenitori veniva ruotata periodicamente; si tratta tuttavia di una soluzione che si discosta notevolmente dal sistema di ventilazione forzata tipico di alcune strutture di stoccaggio. Le condizioni ambientali scelte (28°C e 80-85% di UR), sono rimaste costanti per tutta la sperimentazione per riprodurre il regime estivo di un silo non climatizzato, sebbene nella pratica reale sia improbabile riscontrare parametri ambientali stabilmente critici per un periodo così prolungato; inoltre, si tratta comunque di una combinazione tra le tante possibili. Ciò impedisce di stabilire se la soglia critica individuata, o la durata delle finestre di protezione osservate per i due dosaggi, cambierebbero a temperature o umidità differenti. Oltretutto, la procedura di umidificazione artificiale adottata nella seconda fase non costituisce un'operazione neutra se confrontata con l'assorbimento graduale di vapore della prima fase. Lo dimostra il calo della CMT osservato tra T0 e giorno 1 in tutti i campioni che, nel capitolo

7, è stato attribuito ad una probabile redistribuzione delle spore causata proprio dall'aggiunta di acqua.

Per alcuni campioni, in entrambe le fasi, il monitoraggio dei parametri è stato interrotto prima della fine prevista, anche se non sempre per lo stesso motivo. In alcuni casi, proseguire diventava superfluo a causa dell'avanzato stato di deterioramento del cereale; in altri, la quantità di materiale residuo non era sufficiente a completare tutte le analisi. Si ricorda infatti che tutti i parametri considerati richiedevano misurazioni di natura distruttiva; di conseguenza, la granella tendeva ad esaurirsi rapidamente. Ad esempio, nella seconda fase sperimentale, a partire dal giorno 21 si è dovuto rinunciare alla determinazione di CBT e CMT nei campioni trattati, così da riservare la granella rimanente all'analisi dell'aflatossina. Tale limitazione ha comportato la perdita di alcuni dati e, inoltre, ha talvolta impedito di replicare misurazioni dubbie o anomale, la cui ripetizione avrebbe richiesto il consumo preventivo di materiale destinato alle settimane successive.

Dal punto di vista analitico va inoltre segnalato che, in alcune determinazioni dell'aflatossina, il superamento del limite superiore di lettura del metodo ha comportato una riduzione dell'accuratezza nella quantificazione. In tali circostanze, era infatti necessario diluire il sottocampione al fine di ottenere un valore numerico. Questa operazione ha inevitabilmente introdotto un errore analitico, proporzionale al fattore di diluizione impiegato. Le concentrazioni di AFB₁ più elevate, quantificate mediante diluizione, vanno pertanto interpretate prevalentemente come indicazione dell'ordine di grandezza raggiunto, piuttosto che come misure puntuali affidabili. Si ricorda infine che l'identificazione delle colonie osservate, non essendo stata confermata mediante tecniche molecolari, resta a carattere puramente ipotetico.

Considerati i limiti di cui sopra, i risultati vanno interpretati con la dovuta cautela, poiché si riferiscono a condizioni sperimentali particolari, non pienamente rappresentative della realtà operativa di un silo. Nonostante ciò, le conclusioni generali dello studio mantengono la loro validità.

8.6 Implicazioni pratiche per lo stoccaggio del mais

Dal punto di vista operativo, quali azioni intraprendere per minimizzare il rischio di deterioramento di un lotto di mais in un mangimificio?

Nelle condizioni ambientali testate, il mais ha impiegato settimane per avvicinarsi alla soglia critica, ma una volta superata si è deteriorato in pochi giorni. Di conseguenza, l'operazione più efficace per la gestione del silo è il monitoraggio costante dell'umidità della granella durante lo stoccaggio. Oltretutto, questo parametro è anche facilmente misurabile: utilizzando il GAC bastano pochi secondi per completare l'analisi. Risulta fondamentale rimanere ampiamente al di sotto della soglia critica del 19-20%, poiché il suo superamento riduce drasticamente il tempo utile per intervenire.

L'infestazione da *Sitophilus* sp. osservata nella prima fase sperimentale evidenzia la necessità di adottare misure preventive anche sul fronte entomologico. Le femmine del punteruolo rosicchiano le cariossidi praticando un piccolo foro per depositarvi le uova; l'apertura viene poi sigillata con un materiale gelatinoso che rende la granella infestata difficile da individuare al controllo visivo. Il calore e il vapore acqueo prodotti dall'attività metabolica degli insetti, uniti ai danni strutturali, accelerano l'assorbimento dell'umidità e la crescita microbica. È pertanto fondamentale implementare un monitoraggio entomologico mirato a intercettare l'infestazione prima che la popolazione raggiunga dimensioni critiche.

In presenza di mais a rischio superamento soglia, si può valutare l'impiego preventivo di un conservante a base di propionati. La dose di 0,5 g/kg non garantisce tuttavia una protezione affidabile in caso di stoccaggio prolungato, soprattutto in presenza di temperature elevate e ventilazione limitata. Il dosaggio va quindi rivisto al rialzo, intervenendo tempestivamente prima che la granella si avvicini alla soglia critica.

Qualora la soglia sia già stata superata, il trattamento non è da considerarsi risolutivo: può posticipare il deterioramento di un paio di settimane, ma non crea un nuovo punto di equilibrio stabile. Di conseguenza, l'uso di dosi elevate è giustificato solo se accompagnato da un piano per la lavorazione del lotto entro la finestra stimata. Non si tratta di una soluzione per prolungare lo stoccaggio del cereale a tempo indeterminato. Tenendo conto della variabilità tra i lotti (per composizione della microflora, condizioni ambientali locali, genotipo) e dei limiti descritti nel paragrafo 8.5, la finestra protezione di 1-2 settimane individuata in questa prova è da ritenersi un'indicazione di massima, utile per definire un margine di sicurezza.

Come osservato nel campione T2, un lotto di mais può risultare gravemente compromesso dal punto di vista microbiologico e allo stesso tempo privo di aflatossina; viceversa, può essere contaminato nonostante una carica fungina contenuta. Da ciò deriva un'ultima

implicazione operativa: il monitoraggio dell'aflatossina e quello della carica micotica sono entrambi indispensabili e complementari. Infatti, così come un lotto contaminato da AFB₁ deve essere scartato, lo stesso vale per un lotto privo di tossina ma caratterizzato da una CMT elevata.

8.7 Prospettive di ricerca future

Il paragrafo che segue delinea le direzioni di ricerca opportune per consolidare i risultati emersi dal presente studio.

Una sperimentazione finalizzata a definire con maggior solidità la relazione tra dosaggio ed efficacia protettiva richiederebbe, anzitutto, un numero di dosaggi sufficiente a tracciare una curva dose-risposta. Ciò consentirebbe di individuare con precisione la soglia di efficacia, di valutare l'estensione massima della finestra di protezione e di determinare il dosaggio al quale viene raggiunto il *plateau*. Ciascuna condizione dovrebbe inoltre prevedere un numero adeguato di repliche, così da poter analizzare le differenze attraverso test statistici. Infine, il periodo di monitoraggio dovrebbe essere protratto fino al completo esaurimento della protezione anche per il dosaggio più elevato.

Dal punto di vista microbiologico, sarebbe utile progettare una prova volta a caratterizzare tassonomicamente (tramite metodi molecolari) la popolazione fungina prevalente per ciascun dosaggio testato. Questo approccio permetterebbe di verificare se il conservante è davvero in grado di esercitare un'azione selettiva sulla comunità fungina e in che misura tale effetto potrebbe dipendere dal dosaggio.

Sarebbe inoltre opportuno replicare la sperimentazione a differenti temperature e livelli di umidità relativa, al fine di verificare la stabilità della soglia critica di umidità e delle finestre di protezione al variare delle condizioni ambientali. Uno studio su scala più ampia consentirebbe inoltre di validare i risultati in un contesto di stoccaggio realistico, con volumi di granella e rapporti tra superficie esposta e massa analoghi a quelli di un silo. Un ulteriore aspetto meritevole di approfondimento riguarda l'incidenza del genotipo sulla velocità di deterioramento, da valutare mediante il confronto tra diverse cultivar o ibridi sottoposti alle medesime condizioni di stoccaggio, in presenza e in assenza di trattamento.

Sarebbe inoltre interessante quantificare il ruolo di *Sitophilus* sp. nell'accelerare il deterioramento, impiegando popolazioni a densità nota da introdurre in momenti differenti

dello stoccaggio. Il confronto tra campioni infestati e non infestati, mantenuti nelle medesime condizioni termoigrometriche, consentirebbe di distinguere l'effetto dell'infestazione da quello dovuto alle sole condizioni ambientali e di valutare eventuali interazioni tra i due fattori.

Infine, occorre valutare la convenienza economica dell'impiego del conservante, mettendo in relazione il costo associato all'aumento della dose con il corrispondente incremento del livello di sicurezza. Disponendo di una curva dose-risposta per ciascun parametro di rischio, è possibile determinare quale punto della curva rappresenta il miglior compromesso tra protezione e costo. La dose ottimale potrebbe tuttavia variare a seconda del parametro considerato (CBT, CMT, AFB₁).

Nel loro insieme, queste linee di ricerca permetterebbero di trasformare le evidenze preliminari del presente studio in risultati solidi trasferibili alla pratica dello stoccaggio.

Bibliografia

A

- Al-Hilli, A. L., & Smith, J. E. (1979). *Influence of propionic acid on growth and aflatoxin production by Aspergillus flavus*. FEMS Microbiology Letters, 6(6), 367–370.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1979.tb03744.x>
- Alltech. (2025). *Agri-Food Outlook 2025*. Nicholasville (KY): Alltech.
https://www.bisas.org.uk/assets/files/Alltech_Agrifood_Outlook_2025_v6_1.pdf
- Al-Zaban, M. I. (2023). *Impacts of temperature and water activity interactions on growth, aflatoxin B1 production and expression of major biosynthetic genes of AFB1 in Aspergillus flavus isolates*. Microorganisms, 11(5), 1199.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11051199>
- Applebaum, R. S., Brackett, R. E., Wiseman, D. W., & Marth, E. H. (1982). *Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: Feed intake and yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin*. Journal of Dairy Science, 65(8), 1503–1508.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82374-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82374-6)
- Assalzoo. (2024). *Annuario Assalzoo 2024*. Milano: Assalzoo – Associazione Nazionale tra i Produttori di Alimenti Zootechnici.
https://www.assalzoo.it/wp-content/uploads/2025/03/Annuario-2024_Assalzoo_WEB.pdf
- Assalzoo. (2025). *Annuario Assalzoo 2025*. Milano: Assalzoo – Associazione Nazionale tra i Produttori di Alimenti Zootechnici.
https://www.assalzoo.it/wp-content/uploads/2026/01/Annuario-2025_Assalzoo.pdf

B

- Baghdad, H. (2025). *Acido propionico: proprietà, reazioni, produzione e usi*. Chemcess.
<https://chemcess.com/it/acido-propionico-proprieta-reazioni-produzione-e-usi/>
- Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H. J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., & Robinson, T. (2016). *Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change*. Scientific Reports, 6, 24328.
<https://doi.org/10.1038/srep24328>
- Bhat, R.V., & Miller, J.D. (1991). *Mycotoxins and food supply*. Food, Nutrition and Agriculture, 1, 27–31. Roma: FAO.
<https://www.fao.org/4/u3550t/u3550t0e.htm>

C

- Caceres, I., Al Khoury, A., El Khoury, R., Lorber, S., Oswald, I. P., El Khoury, A., Atoui, A., Puel, O., & Bailly, J.-D. (2020). *Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: A review*. Toxins, 12(3), 150.
<https://doi.org/10.3390/toxins12030150>
- Cao, Q.-Q., Lin, L.-X., Xu, T.-T., Lu, Y., Zhang, C.-D., Yue, K., Huang, S.-C., Dong, H.-J., & Jian, F.-C. (2021). *Aflatoxin B1 alters meat quality associated with oxidative stress, inflammation, and gut-microbiota in sheep*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 225, 112754.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112754>
- Choi, H., Garavito-Duarte, Y., Gormley, A. R., & Kim, S. W. (2025). *Aflatoxin B1: Challenges and strategies for the intestinal microbiota and intestinal health of monogastric animals*. Toxins, 17(1), 43.
<https://doi.org/10.3390/toxins17010043>

- Clevström, G., Ljunggren, H., Tegelström, S., & Tideman, K. (1983). *Production of aflatoxin by an Aspergillus flavus isolate cultured under a limited oxygen supply*. Applied and Environmental Microbiology, 46(2), 400–405.
<https://doi.org/10.1128/aem.46.2.400-405.1983>
- Consorzio del Formaggio Parmigiano Reggiano. (n.d.). *Disciplinare di produzione del Parmigiano Reggiano DOP*.
<https://www.parmigianoreggiano.com/it/consorzio-disciplinare-normative>

D

- Delledonne, M. (2006). *Micotossine. Riconoscimento e prevenzione delle micotossicosi di interesse medico*. Edagricole, 139 p. ISBN 978-88-506-5221-1.
- Dijksterhuis, J., Meijer, M., van Doorn, T., Houbraken, J., & Bruinenberg, P. (2019). *The preservative propionic acid differentially affects survival of conidia and germ tubes of feed spoilage fungi*. International Journal of Food Microbiology, 306, 108258.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108258>

F

- FEFAC. (2024). *Feed & Food Statistical Yearbook 2023*. Brussels: European Feed Manufacturers' Federation.
https://fefac.eu/wp-content/uploads/2025/04/FF_2024_FINAL.pdf
- Fouad, A. M., Ruan, D., El-Senousey, H. K., Chen, W., Jiang, S., & Zheng, C. (2019). *Harmful effects and control strategies of aflatoxin B1 produced by Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus strains on poultry: Review*. Toxins, 11(3), 176.
<https://doi.org/10.3390/toxins11030176>
- Fountain, J. C., Scully, B. T., Chen, Z.-Y., Gold, S. E., Glenn, A. E., Abbas, H. K., Lee, R. D., Kemerait, R. C., & Guo, B. (2015). *Effects of hydrogen peroxide on different toxigenic and atoxigenic isolates of Aspergillus flavus*. Toxins, 7(8), 2985–2999.
<https://doi.org/10.3390/toxins7082985>

- Francis, S., Kortei, N. K., Sackey, M., & Richard, S. A. (2024). *Aflatoxin B1 induces infertility, fetal deformities, and potential therapies*. Open Medicine, 19(1), 20240907. <https://doi.org/10.1515/med-2024-0907>

G

- Gallo, A., Solfrizzo, M., Epifani, F., Panzarini, G., & Perrone, G. (2016). *Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in Aspergillus flavus on almond medium*. International Journal of Food Microbiology, 217, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.026>
- Ghosh, J., & Häggblom, P. (1985). *Effect of sublethal concentrations of propionic or butyric acid on growth and aflatoxin production by Aspergillus flavus*. International Journal of Food Microbiology, 2(6), 323–330. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(85\)90022-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(85)90022-4)
- Guo, B., Chen, Z.-Y., Lee, R. D., & Scully, B. T. (2008). *Drought stress and preharvest aflatoxin contamination in agricultural commodity: Genetics, genomics and proteomics*. Journal of Integrative Plant Biology, 50(10), 1281–1291. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00739.x>

H

- Heap, I. (2014). *Global perspective of herbicide-resistant weeds*. Pest Management Science, 70(9), 1306–1315. <https://doi.org/10.1002/ps.3696>
- Hsu, I. C., Metcalf, R. A., Sun, T., Welsh, J. A., Wang, N. J., & Harris, C. C. (1991). *Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas*. Nature, 350(6317), 427–428. <https://doi.org/10.1038/350427a0>

I

- INRA, CIRAD, AFZ. (n.d.). *Maize (corn) – Feed tables*. Feedtables.
<https://feedtables.com/content/maize>
- ISMEA. (2023). *La filiera del mais: struttura, criticità e impatto della PAC 2023-27* [Report]. ISMEA.
<https://www.ismeamercati.it/flex/cm/pages/ServeAttachment.php/L/IT/D/1%252Fa%252F8%252FD.d55b6b8fecf1839f0f37/P/BLOB%3AID%3D12522>

J

- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern Food Microbiology* (7^a ed.). New York: Springer, 790 p. ISBN 0-387-23180-3.
- John, D. W., & Miller, L. L. (1969). *Effect of aflatoxin B1 on net synthesis of albumin, fibrinogen, and α 1-acid glycoprotein by the isolated perfused rat liver*. *Biochemical Pharmacology*, 18(5), 1135–1146.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(69\)90117-8](https://doi.org/10.1016/0006-2952(69)90117-8)

K

- Khan, R., Ghazali, F. M., Mahyudin, N. A., & Samsudin, N. I. P. (2021). *Aflatoxin biosynthesis, genetic regulation, toxicity, and control strategies: A review*. *Journal of Fungi*, 7(8), 606.
<https://doi.org/10.3390/jof7080606>
- Kipkoech, G., Jepkorir, M., Kamau, S., Wanyoko, A., Kibunja, S., Amosi Jeremiah, R., Masese, J., Ntui-Njock, V., Mutai, C., & Mwitari, P. (2025). *Immunomodulatory effects of aflatoxin B1 (AFB1) and the use of natural products to ameliorate its immunotoxic effects: A review*. *Open Research Africa*, 6, 22.
<https://doi.org/10.12688/openresafrica.14406.2>

L

- Lin, L.-X., Cao, Q.-Q., Zhang, C.-D., Xu, T.-T., Yue, K., Li, Q., Liu, F., Wang, X., Dong, H.-J., Huang, S.-C., & Jian, F.-C. (2022). *Aflatoxin B1 causes oxidative stress and apoptosis in sheep testes associated with disrupting rumen microbiota*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 232, 113225.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113225>

M

- Meissonnier, G. M., Pinton, P., Laffitte, J., Cossalter, A. M., Gong, Y. Y., Wild, C. P., Bertin, G., Galtier, P., & Oswald, I. P. (2008). *Immunotoxicity of aflatoxin B1: Impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231(2), 142–149.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.04.004>
- Mencarelli, M., Accinelli, C., & Vicari, A. (2013). *Implications of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, infestation in an *Aspergillus flavus*-biocontrolled corn agroecosystem*. *Pest Management Science*, 69(9), 1085–1091.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23436551/>
- Midorikawa, G. E. O., de Sousa, M. L. M., Freitas Silva, O., Dias, J. S. A., Kanzaki, L. I. B., Hanada, R. E., Mesquita, R. M. L. C., Gonçalves, R. C., Alvares, V. S., Bittencourt, D. M. C., & Miller, R. N. G. (2014). *Characterization of *Aspergillus* species on Brazil nut from the Brazilian Amazonian region and development of a PCR assay for identification at the genus level*. *BMC Microbiology*, 14, 138.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-138>
- Mira, N. P., & Teixeira, M. C. (2013). *Microbial mechanisms of tolerance to weak acid stress*. *Frontiers in Microbiology*, 4, 416.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00416>
- Molina, M., & Giannuzzi, L. (2002). *Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid*

concentrations. Food Research International, 35(9), 813–820.

[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00161-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00161-2)

- Monson, M. S., Coulombe, R. A., & Reed, K. M. (2015). *Aflatoxicosis: Lessons from toxicity and responses to aflatoxin B1 in poultry*. Agriculture, 5(3), 742–777.
<https://doi.org/10.3390/agriculture5030742>

O

- Ohkura, M., Cotty, P. J., & Orbach, M. J. (2018). *Comparative genomics of Aspergillus flavus S and L morphotypes yield insights into niche adaptation*. G3: Genes|Genomes|Genetics, 8(12), 3915–3930.
<https://doi.org/10.1534/g3.118.200553>
- Ouma, F., Luthra, K., Oduola, A., & Atungulu, G.G. (2024). *Investigating safe storage conditions to mitigate aflatoxin contamination in rice*. Food Control, 163, 110529.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110529>

P

- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage (3rd ed.)*. New York: Springer, 519 p. ISBN 978-0-387-92206-5.

R

- Ren, X., Zhang, Q., Zhang, W., Mao, J., & Li, P. (2020). *Control of aflatoxigenic molds by antagonistic microorganisms: Inhibitory behaviors, bioactive compounds, related mechanisms, and influencing factors*. Toxins, 12(1), 24.
<https://doi.org/10.3390/toxins12010024>

S

- Schmidt-Heydt, M., Abdel-Hadi, A., Magan, N., & Geisen, R. (2009). *Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of Aspergillus flavus in relation to various combinations of water activity and temperature*. International Journal of Food Microbiology, 135(3), 231–237.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.026>
- Solà-Oriol, D. (2019). *Scheda tecnica: Mais*. 3tres3 – La pagina del suino.
https://www.3tres3.com/it/articoli/mais_9077/
- Soltani, N., Dille, J.A., Burke, I.C., Everman, W.J., VanGessel, M.J., Davis, V.M., & Sikkema, P.H. (2016). *Potential corn yield losses from weeds in North America*. Weed Technology, 30(4), 979–984.
<https://doi.org/10.1614/WT-D-16-00046.1>

V

- Villers, P. (2014). *Aflatoxins and safe storage*. Frontiers in Microbiology, 5, 158.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00158>

Y

- Yabe, K., & Nakajima, H. (2004). *Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 64(6), 745–755.
<https://doi.org/10.1007/s00253-004-1566-x>
- Yan, S., Liang, Y., Zhang, J., Chen, Z., & Liu, C.-M. (2015). *Autoxidated linolenic acid inhibits aflatoxin biosynthesis in Aspergillus flavus via oxylipin species*. Fungal Genetics and Biology, 81, 229–237.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.11.005>

Riferimenti normativi

- Consiglio delle Comunità Europee (1993). *Regolamento (CEE) n. 315/93 che stabilisce procedure comunitarie relative ai contaminanti nei prodotti alimentari*. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, L 37, 13.2.1993, pp. 1-3.
<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/1993/315/oj/ita>
- Commissione Europea (2001). *Sintesi – Tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti*. EUR-Lex.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/HTML/?uri=LEGISSUM:I21115k>
- Parlamento Europeo e Consiglio (2002). *Regolamento (CE) n. 178/2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare*. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, L 31, 1.2.2002.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02002R0178-20060428>
- Parlamento Europeo e Consiglio (2002). *Direttiva 2002/32/CE relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali*. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, L 140, 30.5.2002, pp. 10–22.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32002L0032>
- Parlamento Europeo e Consiglio (2004). *Regolamento (CE) n. 853/2004 sull'igiene dei prodotti alimentari*. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 139, 30.4.2004, pag. 1.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32004R0852>
- Parlamento Europeo e Consiglio (2005). *Regolamento (CE) n. 1831/2005 che stabilisce requisiti per l'igiene dei mangimi*. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 35, 8.2.2005, pp. 1–22.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32005R0183>

- Commissione Europea (2006). *Regolamento (CE) n. 401/2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari*. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 70, 9.3.2006.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32006R0401>
- Commissione Europea (2006). *Regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari*. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 364, 20.12.2006, pp. 5–24.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32006R1881>
- Commissione Europea (2009). *Regolamento (CE) n. 152/2009 che fissa i metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali*. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 54, 26.2.2009.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02009R0152-20170524>
- Commissione Europea (2011). *Regolamento (UE) n. 574/2011 che modifica l'allegato I della Direttiva 2002/32/CE*. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 159, 7.6.2011, pp. 7–24.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32011R0574>
- Commissione Europea (2013). *Regolamento (UE) n. 691/2013 che modifica il Regolamento (CE) n. 152/2009 per quanto riguarda i metodi di campionamento e di analisi*. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 197, 20.7.2013.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32013R0691>
- Parlamento Europeo e Consiglio (2017). *Regolamento (UE) 2017/625 relativo ai controlli ufficiali*. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 95, 7.4.2017, pag. 1.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32017R0625>
- Commissione Europea (2023). *Regolamento (UE) 2023/915 relativo ai tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti*. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 119, 5.5.2023.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32023R0915>

- Commissione Europea (2024). *Regolamento di esecuzione (UE) 2024/771 recante modifica del Regolamento (CE) n. 152/2009 che fissa i metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali*. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L, 2024/771, 15.3.2024.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/ALL/?uri=CELEX:32024R0771>
- Commissione Europea (2024). *Regolamento (UE) 2024/1756 che modifica il Regolamento (UE) 2023/915*. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L, 2024/1756, 26.6.2024.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32024R1756>
- Ministero della Salute (2025). *Nota DGISAN n. 9487 del 7 marzo 2025 – Linee guida per la gestione del rischio di contaminazione da aflatossine nella filiera lattiero-casearia*.
<https://www.ruminantia.it/aflatossine-le-nuove-linee-guida-del-ministero-della-salute-per-mangimifici-e-filiera-lattiero-casearia/>

Figure

- **Figura 1.** Merriam-Webster Inc. (2006). *Structure of the maize kernel* [Illustrazione]. Riprodotto in ResearchGate.
https://www.researchgate.net/figure/Layers-and-internal-structure-of-the-maize-kernel-Merriam-Webster-Inc-2006_fig2_271964567
- **Figura 2.** ISMEA. (2023). *La filiera del mais: struttura, criticità e impatto della PAC 2023-27* [Report]. ISMEA.
<https://www.ismeamercati.it/flex/cm/pages/ServeAttachment.php/L/IT/D/1%252Fa%252F8%252FD.d55b6b8fecf1839f0f37/P/BLOB%3AID%3D12522>
- **Figura 3.** Sudar, R.A., Saxton, K.E., & Spomer, R.G. (1981). *Un modello predittivo dello stress idrico nel mais e nella soia*. Transactions of ASAE, 24(1), 97–102.
<https://elibrary.asabe.org/abstract.asp?JID=3&AID=34206&CID=t1981&v=24&i=1&T=1>

- **Figura 4.** Thomison, P. (2007). *Key steps in corn pollination*. C.O.R.N. Newsletter, 2007-21 (9–17 luglio 2007).
<https://u.osu.edu/mastercorn/incomplete-kernel-set/>
 - **Figura 5.** Reyneri, A., Bruno, G., Balconi, C., & D'Egidio, M.G. (2016). *Arrivano le Linee guida per il controllo delle micotossine nel mais*. L'Informatore Agrario, 72(11), pp. n.d.
 - **Figura 6–7.** Delledonne, M. (2006). *Micotossine. Riconoscimento e prevenzione delle micotossicosi di interesse medico*. Edagricole, 139 p. ISBN 978-88-506-5221-1.
 - **Figura 8.** Cannon, P.F. (n.d.). [Fotografia di esemplare fungino]. *Fungi of Great Britain and Ireland*.
<https://fungi.myspecies.info/file-colorboxed/937>
- Medmyco. (n.d.). *Aspergillus flavus* [Fotografia]. Wikimedia Commons.
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus flavus.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus_flavus.jpg)
- **Figura 9.** Kushiro, M., Hatabayashi, H., Yabe, K., & Loladze, A. (2018). *Detection of aflatoxigenic and atoxigenic Mexican Aspergillus strains by the dichlorvos–ammonia (DV–AM) method*. Toxins, 10(7), 263.
<https://doi.org/10.3390/toxins10070263>
 - **Figura 10.** Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H.J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., & Robinson, T. (2016). *Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change*. Scientific Reports, 6, 24328.
<https://doi.org/10.1038/srep24328>
 - **Figura 11.** Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Atukwase, A., Lamboni, Y., & Debevere, J.M. (2007). *Sorption isotherms and isosteric heats of sorption of whole yellow dent corn*. Journal of Food Engineering, 79(1), 168–175.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.01.040>

- **Figura 12.** Ouma, F., Luthra, K., Oduola, A., & Atungulu, G.G. (2024). *Investigating safe storage conditions to mitigate aflatoxin contamination in rice*. Food Control, 163, 110529.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110529>
- **Figura 15.** Thenuwara, G., Akhtar, P., Javed, B., Singh, B., Byrne, H.J., & Tian, F. (2025). *Recent advancements in lateral flow assays for food mycotoxin detection: A review of nanoparticle-based methods and innovations*. Toxins, 17(7), 348.
<https://doi.org/10.3390/toxins17070348>

Ringraziamenti

I miei primi ringraziamenti vanno alla mia relatrice, la professoressa Volpelli, per la costante disponibilità, l'interesse dimostrato nei confronti del mio lavoro di tesi e i preziosi consigli elargitimi.

Desidero poi rivolgere un sincero ringraziamento alla Cooperativa Progeo S.c.a. di Reggio Emilia, per avermi dato l'opportunità di svolgere il tirocinio nei suoi laboratori di analisi.

Un ringraziamento particolare va ai miei correlatori, il dottor Gozzi e il dottor Zanetti, per avermi accolto in azienda e per avermi supportato durante la revisione del lavoro.

Ringrazio inoltre il responsabile del laboratorio, dottor Flavio Melli, e tutto il personale con cui ho avuto modo di collaborare. Oltre ad avermi affiancato nel progetto di tesi, hanno contribuito alla mia crescita professionale, insegnandomi a lavorare in autonomia in laboratorio.

Infine, desidero ringraziare tutto il personale docente e amministrativo dell'Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia che ha contribuito alla mia formazione accademica in questi anni.