

AVVISI PUBBLICI REGIONALI DI ATTUAZIONE PER L'ANNO 2015 DEL TIPO DI OPERAZIONE 16.1.01 "GRUPPI OPERATIVI DEL PEI PER LA PRODUTTIVITÀ E LA SOSTENIBILITÀ DELL'AGRICOLTURA"

FOCUS AREA 2A, 4B, 4C, 5A E 5E DGR N. 2268 DEL 28 DICEMBRE 2015

RELAZIONE TECNICA FINALE

DOMANDA DI SOSTEGNO: 5004874

DOMANDA DI PAGAMENTO: 5148520

FOCUS AREA: 2A

Titolo Piano	Micotossine dei cereali: strategie di controllo e integrazione di filiera per uso energetico
Ragione sociale del proponente (soggetto mandatario)	C.R.P.V. - Centro Ricerche Produzioni Vegetali - società cooperativa Via dell'Arrigoni 120 – 47023 Cesena (FC)
Elenco partner del Gruppo Operativo	Università Cattolica Sacro Cuore di Piacenza (di seguito UCSC-PC) Centro Ricerche Produzioni Animali - C.R.P.A. S.P.A. Grandi Colture Italiane società cooperativa agricola (di seguito G.C.I.) Azienda Agraria Sperimentale Stuard s.c.r.l.

Durata originariamente prevista del progetto (in mesi)	36
Data inizio attività	01/07/2016
Data termine attività (includere eventuali proroghe già concesse)	15/07/2019

Relazione relativa al periodo di attività dal	01/06/2017	Al 15/07/2019
Data rilascio relazione	30/08/19	

Autore della relazione	Renato Canestrone		
telefono		email	rcanestrone@crpv.it

1 Descrizione del quadro di insieme relativo alla realizzazione del piano

Lo sviluppo delle attività del Piano è iniziato come previsto nel Luglio 2016 e terminato nel Luglio 2019. In sintesi, le attività complessivamente svolte nel corso del progetto sono state le seguenti:

- l'azione 1 - Cooperazione è stata realizzata come previsto seguendo i percorsi e utilizzando i diversi strumenti indicati nel piano.

- L'azione 3.1 (Impiego di bio-competitori su mais) ha previsto l'approntamento di una serie di campi dimostrativi di mais, a semina 2017 e 2018, per verificare l'efficacia di un preparato biologico per il controllo della contaminazione da aflatossine.

GCI, nel corso dei 2 anni, ha proceduto all'individuazione di 4 siti a granturco (uno in più di quanto previsto nel Piano), secondo le indicazioni fornite dall'UCSC-PC, nei quali è stato distribuito il formulato biologico AF-X1, a base di un ceppo non tossigeno di *Aspergillus flavus*, nella fase di pre-sarchiatura (circa alle 10-15 foglie). Successivamente sono stati raccolti dei campioni di granella sottoposti ad analisi delle aflatossine presso l'UCSC-PC per la verifica del grado di efficacia del preparato.

- L'azione 3.2 (Sviluppo e validazione di un modello multitossina per la previsione della contaminazione in mais) ha visto una prima fase focalizzata al miglioramento di una funzione del modello AFLA-maize, per la previsione del livello di contaminazione da AFB₁ alla raccolta.

Nel corso del triennio sono stati raccolti 150 campioni di mais, completi ciascuno dei dati colturali; i campioni raccolti sono stati conferiti alla UCSC per le analisi del contenuto di aflatossine e fumonisine (queste ultime non previste nel Piano). Questi campioni sono stati utilizzati per la prima definizione del modello congiunto TOX-maize, che considera l'interazione tra i due principali funghi micotossigeni del mais (*A. flavus* e *F. verticillioides*).

Durante l'estate 2016, 2017 e 2018, sono state effettuate, da parte dell'UCSC-PC, le previsioni di contaminazione da aflatossine e fumonisine (queste ultime attività aggiuntiva) con i modelli AFLA-maize e FER-maize; le simulazioni sono state diffuse da CRPV ad una mailing-list comprendente diverse strutture di stoccaggio, di assistenza tecnica e istituzionali.

- L'azione 3.3 (Impiego di metodiche analitiche rapide basate sull'utilizzo di biosensori) ha riguardato la taratura di un naso elettronico a fini analitici e a tal fine sono stati impiegati gli stessi campioni di mais raccolti nell'azione 3.2, oltre a un centinaio di campioni di frumento tenero e duro appositamente raccolti.

Il naso elettronico utilizzato per questa azione è uno strumento portatile modello "AIR PEN 3" a disposizione presso l'Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione (ISAN) dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza.

- L'azione 3.4 (Influenza della tecnica di irrigazione sulla sensibilità alle micotossine del mais) ha previsto l'allestimento, nel 2017 e 2018, di una prova sperimentale presso l'Az. Agraria Sperimentale Stuard a Parma contraddistinta dalle seguenti tesi a confronto: 2 modalità di irrigazione (manichetta e aspersione) e 3 restituzioni idriche (test non irriguo, 75 e 100% dell'evapotraspirato).
- L'azione 3.5 (Integrazione filiera cerealicola e filiera biogas: micotossine e prodotti conformi per biodigestori) ha provveduto a verificare eventuali effetti inibenti delle aflatossine sulla corretta funzionalità del processo di digestione anaerobica. La definizione dello studio delle caratteristiche merceologiche e qualitative del prodotto è stata determinata tramite campionamenti effettuati al conferimento della granella ancora verde proveniente da ibridi precoci, medi e tardivi, anziché da 3 diversi centri di stoccaggio, senza alcuna differenziazione di precocità del ciclo, come previsto nel Piano (comunicazione CRPV via PEC del 31/10/17 prot. n. 504/17). In raccordo con il C.I.C.A di Bologna è stato condotto lo studio sul percorso formale da applicare ai lotti di granelle di cereali ad "uso energetico"; si è analizzata e sintetizzata la normativa sul digestato a livello nazionale e regionale ed i protocolli di intesa regionali degli ultimi anni, sulla gestione del rischio di contaminazione da aflatossine. E' continuata la partecipazione di CRPA alle attività e agli incontri del gruppo di lavoro regionale sul tema micotossine cereali.
- L'azione 4 (Divulgazione) ha previsto l'organizzazione di complessivi 10 incontri divulgativi: 2 Convegni presso l'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, 6 incontri tecnici realizzati in occasione di visite guidate in campo, presentazione dei risultati dell'azione 3.5 al Convegno Nazionale Micotossine (2019) e 1 incontro tecnico conclusivo, realizzato presso la Regione Emilia-Romagna, dedicato ai risultati del progetto. Sono state inoltre realizzate 6 visite guidate presso i campi dimostrativi; per quanto riguarda le pubblicazioni sono stati prodotti 2 articoli (Agricoltura e Ecoscienza) e 2 poster, inoltre, relativamente all'azione 3.5, verranno pubblicati i risultati sugli Atti del Convegno Nazionale Micotossine. Sono stati realizzati 2 audiovisivi, uno di presentazione del progetto e uno sui risultati, realizzato nell'ambito dell'incontro tecnico conclusivo, pubblicati sul canale Youtube di CRPV. E' stato organizzato un campus cloud, ovvero un focus partecipativo, gestito da CRPV, volto a favorire l'interscambio di conoscenze tra esperti e imprese agricole. Per concludere, CRPV ha dedicato al progetto una pagina web sul proprio sito, raggiungibile anche attraverso l'app CRPV PEI, sulla quale sono disponibili le pubblicazioni, i video e le presentazioni dell'incontro tecnico conclusivo.
- L'azione 5 sulla formazione ha previsto lo svolgimento di un seminario sulla problematica delle micotossine, per complessive 8 ore, indirizzato alle aziende agricole del GO (Grandi Colture Italiane e Az. Agr. Sperim. Stuard).

1.1 Stato di avanzamento delle azioni previste nel Piano

Azione	Unità aziendale responsabile	Tipologia attività	Mese inizio attività previsto	Mese inizio attività reale	Mese termine attività previsto	Mese termine attività reale
1 - Cooperazione	CRPV	Esercizio della cooperazione	1	1	36	36
3.1 - Impiego di bio-competitori su mais per limitare l'infezione dei funghi aflatossigeni	UCSC-PC GCI	Azioni dirette Alla realizzazione del piano	10	10	27	27
3.2 - Sviluppo e validazione di un modello multitossina per la previsione della contaminazione in mais	UCSC-PC GCI	Azioni dirette Alla realizzazione del piano	1	1	36	36
3.3 - Impiego di metodiche analitiche rapide basate sull'utilizzo di biosensori (naso elettronico)	UCSC-PC GCI	Azioni dirette Alla realizzazione del piano	1	1	36	36
3.4 - Influenza della tecnica di irrigazione sulla sensibilità alle micotossine del mais	Az. Agr. Sperim. Stuard	Azioni dirette Alla realizzazione del piano	10	10	27	27
3.5 - Integrazione filiera cerealicola e filiera biogas: micotossine e prodotti conformi per biodigestori	C.R.P.A. GCI	Azioni dirette Alla realizzazione del piano	1	1	36	36
4 - Divulgazione	CRPV	Divulgazione	10	6	36	36
5 - Formazione	CRPV	Seminari	4	36	36	36

2 Descrizione per singola azione

AZIONE 1 – ESERCIZIO DELLA COOPERAZIONE

1.1 Attività e risultati

Unità aziendale responsabile (Uar): CRPV

Descrizione attività

CRPV, nel suo ruolo di capo-mandatario ha svolto funzione di coordinatore dell'attività di funzionamento e gestione del Gruppo Operativo (GO) in accordo con gli altri Partner.

Tramite proprio personale (fra cui Renato Canestrone come Responsabile Organizzativo del Piano, RP), ha seguito regolarmente e gestito con le necessarie e opportune documentazioni, tutte le fasi di sviluppo, dall'attivazione anche formale del 2016, alla rendicontazione finale del 2019, del GO e del relativo Piano per assicurarne il corretto funzionamento e svolgimento.

In particolare, sono di seguito descritte in sintesi le diverse attività svolte dal CRPV nel periodo Giugno 2017 – Luglio 2019.

In data 28 marzo 2018 si è tenuto un incontro con tutto il GO per fare il punto sullo stato di avanzamento dei lavori e sullo sviluppo delle diverse attività previste per il 2018. In occasione dell'incontro sono stati anche presentati i primi risultati dalla Responsabile scientifica Prof.ssa Paola Battilani, per quanto riguarda le attività di pertinenza dell'UCSC di Piacenza, da CRPA e dall'Az. Agr. Sprim. Stuard.

Il RP si è quindi occupato di coordinare nel complesso tutte le attività, animando il GO, seguendone il percorso e verificandone la coerenza e buon sviluppo (attraverso contatti telefonici ed e-mail). Il RP, coadiuvato da Claudio Selmi, collaboratore CRPV, ha inoltre partecipato attivamente alla raccolta di campioni di granella per le Azioni 3.2 e 3.3. e favorito lo scambio di informazioni e il necessario supporto sia informativo che logistico per il buon sviluppo delle sinergie e attività previste dal piano.

Durante il costante monitoraggio dei lavori ed i risultati via via raggiunti, in caso di scostamenti, sono state valutate le necessarie azioni correttive, che peraltro, nel secondo stralcio del progetto, non si sono rese necessarie.

Al termine del progetto, il RP e il RS, insieme a tutti i partner coinvolti, hanno completato l'analisi dei risultati ottenuti, ai fini anche della presentazione nell'incontro tecnico conclusivo tenutosi nel giugno 2019 e predisposto la relazione tecnica oltre alle altre documentazioni necessarie per la rendicontazione amministrativo-economica. Il CRPV si è occupato della gestione e predisposizione della documentazione e format e ha opportunamente informato e supportato i partner nella fase di rendicontazione tecnica ed economica.

Autocontrollo e Qualità

Attraverso le Procedure e le Istruzioni operative approntate nell'ambito del proprio Sistema Gestione Qualità, il CRPV ha lavorato al fine di garantire efficienza ed efficacia al progetto, come segue:

- Requisiti, specificati nei protocolli tecnici, rispettati nei tempi e nelle modalità definite;
- Rispettati gli standard di riferimento individuati per il progetto;
- Garantita la soddisfazione del cliente tramite confronti diretti e comunicazioni scritte;
- Rispettate modalità e tempi di verifica in corso d'opera definiti per il progetto;

- Individuati i fornitori ritenuti più consoni per il perseguimento degli obiettivi.

La definizione delle procedure, attraverso le quali il Responsabile di Progetto ha effettuato il coordinamento e applicato le politiche di controllo di qualità, sono la logica conseguenza della struttura organizzativa del CRPV. In particolare sono state espletate le attività di seguito riassunte.

Attività di coordinamento

Le procedure attraverso le quali si è concretizzato il coordinamento dell'intero progetto si sono sviluppate attraverso riunioni e colloqui periodici con il Responsabile Scientifico e con quelli delle Unità Operative coinvolte.

Attività di controllo

La verifica periodica dell'attuazione progettuale si è realizzata secondo cadenze temporali come erano state individuate nella scheda progetto. Più in particolare è stata esercitata sia sul funzionamento operativo che sulla qualità dei risultati raggiunti; in particolare è stata condotta nell'ambito dei momenti sotto descritti.

- Verifiche dell'applicazione dei protocolli operativi in relazione a quanto riportato nella scheda progetto;

- Visite ai campi sperimentali e ai laboratori coinvolti nella conduzione delle specifiche attività.

Riscontro di non conformità e/o gestione di modifiche e varianti

Non si sono verificate situazioni difformi a quanto previsto dalla scheda progetto tali da inficiare il raggiungimento degli obiettivi del Piano.

Tutte le attività svolte come previsto nella procedura specifica di processo sono registrate e archiviate nel fascicolo di progetto e certificate attraverso visite ispettive svolte dal Responsabile Gestione Qualità del CRPV.

Il Sistema Qualità CRPV, ovvero l'insieme di procedure, di misurazione e registrazione, di analisi e miglioramento e di gestione delle risorse, è monitorato mediante visite ispettive interne e verificato ogni 12 mesi da Ente Certificatore accreditato (DNV-GL).

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate

Gli obiettivi del piano sono stati raggiunti durante questo periodo di rendicontazione e non sono state rilevate criticità nella fase di cooperazione del GO.

1.2 Personale

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo
	impiegato	Tecnico di progetto	39	812,22
	impiegato	Tecnico di progetto	32	591,36
	impiegato	Responsabile Progetto	78	2.167,62
	dirigente	Direzione CRPV	44	2.383,92
	impiegato	Amministrazione	125,5	2.788,20
	impiegato	Amministrazione	80	2.976,80
			Totale:	11.720,12

AZIONE 3.1 – Impiego di bio-competitori su mais per limitare l'infezione dei funghi aflatossigeni

3.1.1 Attività e risultati

Unità aziendali responsabili (Uar): UCSC-PC

Partecipano alle attività: GCI

Descrizione attività

La contaminazione da aflatossine in mais, problema ben noto nelle zone tropicali e subtropicali, rappresenta un problema significativo anche in Italia dal 2003 quando per la prima volta sono state segnalate consistenti contaminazioni della granella con pesanti ripercussioni nella filiera latte. Nel 2012 in particolare, sia l'entità della contaminazione che la percentuale di prodotto contaminato hanno raggiunto livelli assai elevati con conseguenti difficoltà della filiera. Il problema si è riproposto in misura più o meno grave negli anni seguenti. L'ottimizzazione delle tecniche colturali, perseguita negli anni e definita in apposite linee guida regionali, non è sufficiente, nelle annate ad alto rischio, per ottenere una produzione in linea con la legislazione vigente. Infatti, sono previsti limiti massimi di presenza delle aflatossine sia nei prodotti destinati all'uso umano che ad uso zootecnico. Negli USA e in Africa, dove il problema è assai più grave che in Italia, sono attualmente in uso ceppi atossigeni impiegati come agenti di biocontrollo. In Italia non ci sono fitofarmaci registrati per il contenimento delle aflatossine, ma dal 2013 sono in corso gli studi per la registrazione del fitofarmaco AF-X1 a base del ceppo atossigeno di *A. flavus* MUCL54911, isolato e selezionato dall' UCSC di Piacenza. Le prove condotte nel nord Italia hanno mostrato un'efficacia molto buona, con riduzioni delle contaminazioni comunemente comprese tra 80 e 100%.

L'obiettivo di questa azione è stato quello di approntare, nel 2017 e 2018, dei campi dimostrativi, che ponessero a diretto confronto le aree difese con AF-X1 con analoghe superfici non trattate, nell'areale di riferimento di Grandi Colture Italiane (di seguito GCI).

Materiali e metodi

Scelta dei campi e allestimento delle prove

Nell'anno 2017 sono state individuate 4 aziende agricole (anziché 3 come previsto dal progetto), situate nella provincia di Ferrara, il più importante comprensorio regionale per ettari investiti annualmente a mais. In queste aziende sono stati poi allestiti i campi prova nei 2 anni di studio (2017 e 2018). I campi sono stati individuati e successivamente gestiti da O.P. Grandi Colture Italiane; da segnalare che in tutte le aziende oggetto di sperimentazione sono state adottate tecniche agronomiche ad elevato rischio contaminazione aflatossine quali assenza di interventi irrigui e del trattamento di difesa dalla piralide, ciò al fine di massimizzare la contaminazione delle aflatossine. Nel 2018 si è operato su appezzamenti diversi da quelli del precedente anno.

I campi prova avevano un'estensione di circa 2 ettari, 1 ha utilizzato come testimone non trattato, mentre sull'altro è stato distribuito AF-X1. All'interno di ciascuna tesi (trattato e testimone) sono state poi ricavate 4 repliche (aree di saggio), campionate separatamente e successivamente analizzate per la presenza dei funghi e la contaminazione da aflatossine da parte di UCSC.

Campionamento e analisi sulla granella

Alla maturazione commerciale è stato raccolto un campione di granella dallo scarico della trebbia. La granella sé stata essiccata per ottenere un'umidità massima del 14% e macinata. Sulla farina ottenuta è stata eseguita la conta delle unità fungine formanti colonia (UFC/g) e l'analisi delle aflatossine al fine di valutare il livello di contaminazione nella tesi trattata e nel testimone.

Sono stati raccolti in tutto 32 campioni elementari di granella dal peso di almeno 5 kg ognuno per ogni anno di prova (32 campioni: 4 campi prova x 2 tesi (AF-X1 e Testimone) x 4 sub-campioni/tesi).

In attesa di essere consegnati ad UCSC-PC per le analisi previste, tutti i campioni sono stati congelati in quanto la granella era verde. Successivamente si è poi proceduto al trasferimento dei medesimi al laboratorio.

Analisi delle micotossine

Le micotossine sono state estratte aggiungendo al campione 40 ml di CH₃CN. In particolare, le aflatossine, sono state diluite opportunamente (10, 100 o 1000 volte) per essere successivamente quantificate usando HPLC-FLD, previa derivatizzazione.

Analisi dei dati

I dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi statistica con il software IBM SPSS Statistics 25 (Chicago, SPSS Inc.) al fine di valutare l'effetto del trattamento sui funghi associati alla granella e sulla contaminazione da aflatossine.

Tutti i dati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi univariata della varianza (ANOVA), utilizzando la procedura del modello lineare generalizzato (GLM); le differenze significative tra le medie sono state determinate utilizzando il test di Tukey.

Risultati

La contaminazione da aflatossine in mais negli anni 2017 e 2018 non è stata particolarmente elevata. In particolare, nell'anno 2018 è stata significativamente inferiore rispetto al 2017 (**Tabella 1.1**).

L'ANOVA ha però evidenziato differenze significative tra le 4 aziende considerate nello studio, con l'azienda 2 significativamente più contaminata dell'azienda 4; l'azienda 1 e 3 hanno mostrato livelli di contaminazione intermedi, 30-50% rispetto al mais più contaminato dell'azienda 2. Il livello medio di contaminazione delle aziende è stato comunque sempre superiore a 5 µg/kg, limite di legge fissato per l'impiego umano o per animali da latte. Considerando invece l'oggetto dello studio, ovvero l'effetto del trattamento con AF-X1, questo è stato significativo e ha permesso di ridurre il livello medio di contaminazione da 15.3 a 3.2 µg/kg, quindi rendendo il mais conforme ai limiti più restrittivi di contaminazione ammessa per l'uso alimentare (**Tabella 1.1**).

Relativamente alle UFC dei funghi tossigeni, ovvero i generi *Aspergillus* e *Fusarium*, il trattamento con AF-X1 non ha mai causato variazioni significative. In generale, per *A. flavus* non sono mai state rilevate differenze significative, né tra gli anni né tra le aziende. Al contrario, il genere *Fusarium* è risultato più presente nel 2017 e nell'azienda 2 rispetto alle aziende 1 e 3 (**Tabella 1.1**).

Tabella 1.1. Risultati dell'ANOVA eseguita sui dati di contaminazione da aflatossine e conta delle unità formanti colonia (UFC/g) nella granella raccolta nella prova eseguita con AF-X1.

ANNO	Aflatossine µg/kg		Aspergillus UFC/g		Fusarium UFC/g	
2017	13.3	a	8.63*10 ⁵	ns	5.50*10 ⁵	a
2018	1.9	b	9.18*10 ⁵	ns	1.63*10 ⁵	b
AZIENDA						
1	7.97	ab	1.13*10 ⁶	ns	1.75*10 ⁵	b
2	14.28	a	5.63*10 ⁵	ns	8.41*10 ⁵	a
3	5.27	ab	1.32*10 ⁶	ns	1.22*10 ⁵	b
4	2.96	b	5.50*10 ⁵	ns	2.86*10 ⁵	ab
TESI						
Testimone	15.3	a	6.26*10 ⁵	ns	4.22*10 ⁵	ns
AF-X1	3.2	b	1.16*10 ⁶	ns	2.91*10 ⁵	ns

Lettere differenti indicano differenze significative al Test di Tukey

ns= differenze non significative

Considerando le interazioni tra i fattori inclusi nello studio, in particolare tesi x azienda x anno (**Figura 1.1**), si può notare una differenza di efficacia tra le aziende e nei 2 anni. In generale l'anno 2018, come detto, ha mostrato contaminazioni basse, che non consentono particolari considerazioni riguardo all'efficacia del prodotto, mentre nell'anno 2017 si è vista un'ottima efficacia del prodotto, ad esclusione dell'azienda 4 in cui testimone e trattato AF-X1 mostravano il medesimo livello di contaminazione.

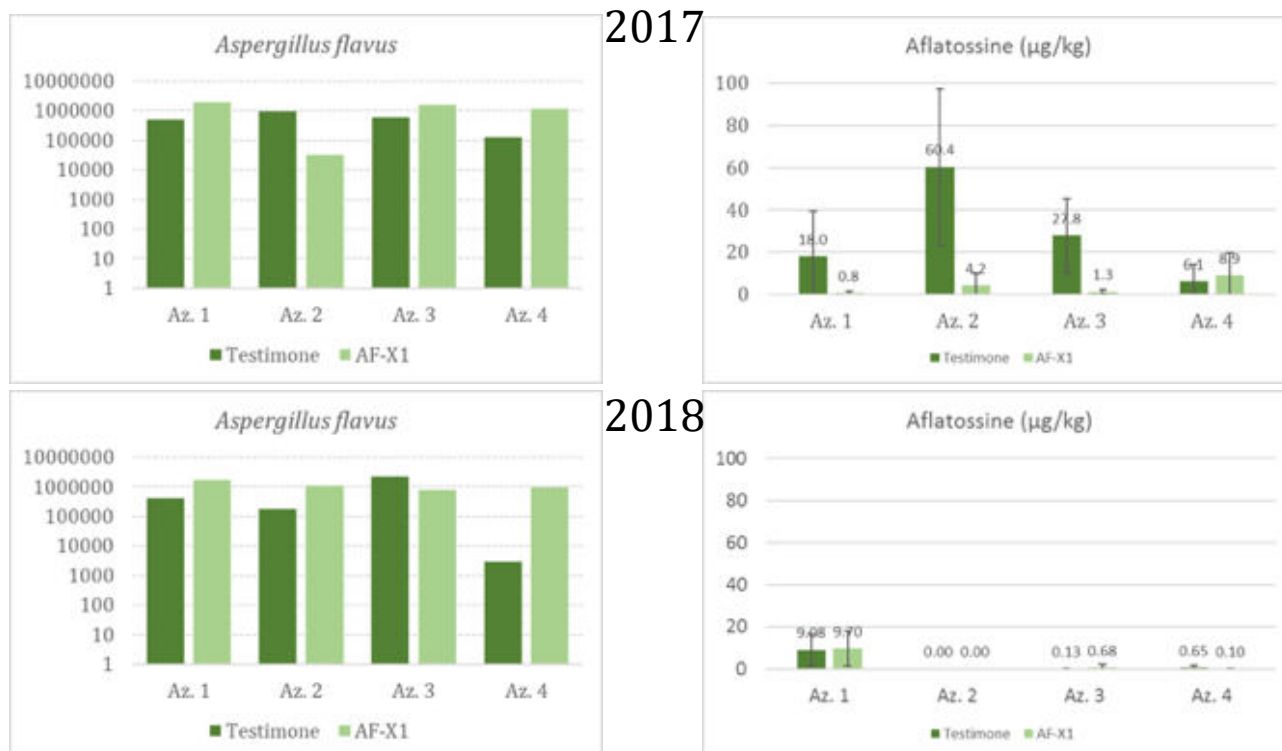


Figura 1.1. Conta delle unità formanti colonia (UFC/g) e contaminazione da aflatoxine (µg/kg) nelle 4 aziende scelte per lo studio negli anni 2017 e 2018.

Conclusioni

Le prove dimostrative eseguite nel corso di questo progetto hanno confermato la facilità di impiego del prodotto e l'efficacia di AF-X1 nel ridurre la contaminazione da aflatoxine nella granella di mais, seppure con qualche eccezione. In particolare, in entrambi gli anni in una azienda non sono state riscontrate differenze di contaminazione da aflatoxina significative tra la granella trattata con AF-X1 e quella non trattata. Questo può essere dovuto alla naturale variabilità e alla distribuzione a spot delle parti contaminate. Va comunque sottolineato che le contaminazioni non erano in media elevate, nei 2 anni considerati, mentre il biocontrollo ha un'efficacia massima nelle annate a maggiore rischio di contaminazione. Inoltre, è stato confermato che il trattamento con AF-X1 non comporta differenze significative nell'incidenza dei funghi tossigeni, né nel genere *Aspergillus* né *Fusarium*, oggetto di preoccupazione da parte degli agricoltori.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate

Il grado di raggiungimento degli obiettivi è completo. Non si segnalano scostamenti, se non migliorativi rispetto a quanto previsto, o particolari criticità.

AZIONE 3.2 – Sviluppo e validazione di un modello multitossina (aflatossine, fumonisine e DON) per la previsione della contaminazione in mais durante la stagione colturale e alla raccolta

3.2.1 Attività e risultati

Unità aziendale responsabile (Uar): UCSC-PC

Partecipano alle attività: GCI

Descrizione attività

Fase 1. Miglioramento del modello AFLA-*maize*

Nel primo anno di progetto, 2016, l'attenzione è stata focalizzata al miglioramento del modello AFLA-*maize* (Battilani et al., 2013), da qualche anno in uso a livello regionale come supporto agli agricoltori nella gestione della coltura. Nello specifico è stata migliorata la funzione che descrive il tasso di produzione di AFB₁ in funzione dell'attività dell'acqua (a_w) della granella. I risultati di tale attività sono stati descritti nella relazione parziale, comprendente l'attività da 1 Luglio 2016 a 31 Maggio 2017. Si richiama tale relazione per un maggiore dettaglio.

Premessa

Negli ultimi anni, gli sforzi dedicati a migliorare le conoscenze riguardanti le micotossine sono stati fondamentali e totalmente giustificati da più aspetti: i) la notevole presenza globale di micotossine (il 72% dei campioni analizzati in tutto il mondo è risultato contaminato, Schatzmayr e Streit, 2013), ii) il ruolo ricoperto dalle micotossine come più importante rischio alimentare per la salute umana (Kuiper-Goodman, 2004), iii) la crescente attenzione prestata alla sicurezza di alimenti e mangimi nel 21 ° secolo.

L'impatto delle micotossine sull'agricoltura e sul mercato agroalimentare è aumentato quando sono state normate le quantità massime tali contaminanti ammesse nei prodotti agricoli tal quali e trasformati.

Le condizioni meteorologiche sono le variabili fondamentali per la presenza della contaminazione da micotossine in tutte le colture e determinano se i funghi possono crescere e produrre micotossine. La variabilità delle condizioni meteorologiche durante la stagione colturale, con condizioni più o meno favorevoli per la crescita di diversi funghi produttori di micotossine, è la situazione che più di tutte condiziona il comportamento di questi microrganismi. Questo ha suggerito di focalizzare le ricerche sulle modificazioni che queste variazioni climatiche generano sulla dinamica della popolazione dei funghi tossigeni e sulla produzione di micotossine. L'impatto dei cambiamenti climatici sulla contaminazione da micotossine è difficile da prevedere, ma in generale ci si attende un aumento delle problematiche relative a questi composti tossici (Huber, 2011; IPCC, 2012; Miraglia et al., 2009).

In questo contesto, i modelli previsionali di tipo meccanicistico sono i più adatti nel supportare la gestione delle micotossine, dal momento che le condizioni climatiche mostrano estrema variabilità tra, e all'interno, delle stagioni colturali, nelle diverse aree geografiche, anche molto vicine tra loro (Dall'Asta and Battilani, 2016).

La co-esistenza sulle sete di mais di varie specie fungine micotossigene è diventata sempre più frequente negli ultimi anni, a causa di eventi climatici altalenanti durante la stagione colturale, ed è stata osservata la co-presenza di micotossine, così come alta contaminazione da tossine inattese.

Pertanto, lo scopo di questa azione è stata quella di acquisire conoscenze sull'interazione di diversi funghi produttori di micotossine co-presenti in mais e quantificare la produzione di micotossine in diverse condizioni ecologiche. Gli esperimenti gestiti *in vitro* sono stati effettuati per raccogliere dati sulle infezioni da *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* al fine di ottenere dati utili per migliorare e integrare, AFLA_maize e FER_maize, i due modelli predittivi meccanicisti precedentemente sviluppati (Battilani et al., 2003, 2013, 2016).

Studio *in-vitro*

L'interazione tra *A. flavus* e *F. verticillioides* è stata studiata *in-vitro*, per quantificare l'impatto delle condizioni ecologiche sulla produzione di micotossine confrontando il comportamento dei due microrganismi in singole colonie ed in colonie in cui vi era la presenza di entrambe le specie.

Materiali e metodi

Preparazione dell'inoculo fungino

Per la preparazione degli inoculi sono stati utilizzati un ceppo di *A. flavus* (AF; ITEM 8069) e un ceppo di *F. verticillioides* (FV; ITEM 10027), in grado di produrre rispettivamente, aflatossine (AFB) e fumonisine (FB). Tali ceppi sono conservati nella collezione di funghi del Dipartimento di Produzione delle colture sostenibili (Di.Pro.Ve.S.) dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza. Gli isolati fungini sono stati inoculati su piastre Petri (Ø 90 mm) contenenti Potato Dextrose Agar (PDA, Biolife, Milano, Italia) ed incubati a 25 °C per 7 giorni (sottoposti a 12 ore a luce e mantenuti 12 ore al buio). Al termine dell'incubazione le colonie fungine sviluppatesi sono state utilizzate per l'inoculo di terreni artificiali.

Preparazione del terreno artificiale di mais

È stata utilizzata farina di mais sulla quale è stata verificata l'assenza di micotossine. La preparazione del terreno di mais artificiale è avvenuta tramite l'aggiunta di acqua sterile a questa farina (farina di mais:acqua 1: 2.5) la quale è stata poi tindalizzata mediante riscaldamento per 30 minuti a 80 °C per un totale di tre cicli. Il composto di farina di mais (CMM) ottenuto è stato poi versato in piastre di Petri Ø 90 mm e raffreddato.

Lo stesso numero di piastre di Petri (90 mm Ø) è stato preparato con terreno di Potato Destrosio Agar (PDA, Biolife, Milano, Italia).

Inoculazione e incubazione

Gli isolati fungini sono stati trasferiti su entrambe le piastre Petri preparate, sia in quelle con terreno di mais tindalizzato (CMM) che in quelle con terreno di coltura PDA. Per entrambe le tipologie di terreno sono state fatte inoculazioni con singolo ceppo e con entrambi i ceppi.

I funghi inoculati singolarmente sono stati posizionati al centro della piastra, mentre per studiare la co-presenza i due funghi sono stati inoculati sulla stessa piastra, posti a distanza prefissata.

Le piastre di Petri inoculate sono state incubate a diverse temperature (T), da 5°C a 40°C (con un fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio) e la crescita dei funghi è stata misurata a distanza di 3, 7, 10, 14 e 21 giorni dal momento dell'inoculazione.

Con l'obiettivo di quantificare la crescita fungina, sono stati misurati due diametri perpendicolari della colonia fungina. Al termine del periodo di incubazione di 21 giorni, sono stati analizzati i quantitativi di AFB e FB1 + FB2 prodotti nelle piastre.

Analisi delle micotossine

Le micotossine sono state estratte aggiungendo al campione 40 ml di CH₃CN. In particolare, le aflatossine, sono state diluite opportunamente (10, 100 o 1000 volte) per essere successivamente

quantificate usando HPLC-FLD, previa derivatizzazione. Le fumonisine, dopo diluizione (10 volte) sono state rilevate da LC-MS / MS (triplo quadrupolo).

Analisi dei dati

Il software IBM SPSS Statistics 24 è stato utilizzato per l'analisi dei dati (Chicago, SPSS Inc.).

Tutti i dati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi univariata della varianza (ANOVA), utilizzando la procedura del modello lineare generalizzato (GLM); le differenze significative tra le medie sono state determinate utilizzando il test di Tukey.

I dati ottenuti sono stati espressi come tasso di crescita fungina e come tasso di produzione di micotossina a differenti T. I dati ottenuti sono stati standardizzati, ovvero valutati in relazione ad un valore massimo osservato. A tal fine è stata impiegata una scala "0-1" in cui lo 0 rappresenta l'assenza di crescita, e quindi anche l'assenza di micotossine, e il valore 1 rappresenta il massimo rapporto tra la crescita e la produzione di tossine.

Risultati

Crescita Fungina: inoculi singoli

La crescita di entrambe le specie fungine, trattate singolarmente su terreno PDA e CMM, è stata influenzata dalla T di incubazione. La **figura 2.1** mostra le differenze di crescita alle diverse T. La T più alta a cui è stato possibile osservare crescita è stata 40°C per FV, mentre la T ottimale per la crescita è risultata essere 20 °C per FV e 30 °C per AF. Il tempo di incubazione ha influenzato in modo significativo ($p < 0,01$) la crescita di entrambi i funghi (**Figura 2.2**). Inoltre si è notato che FV è cresciuto più lentamente rispetto ad AF.

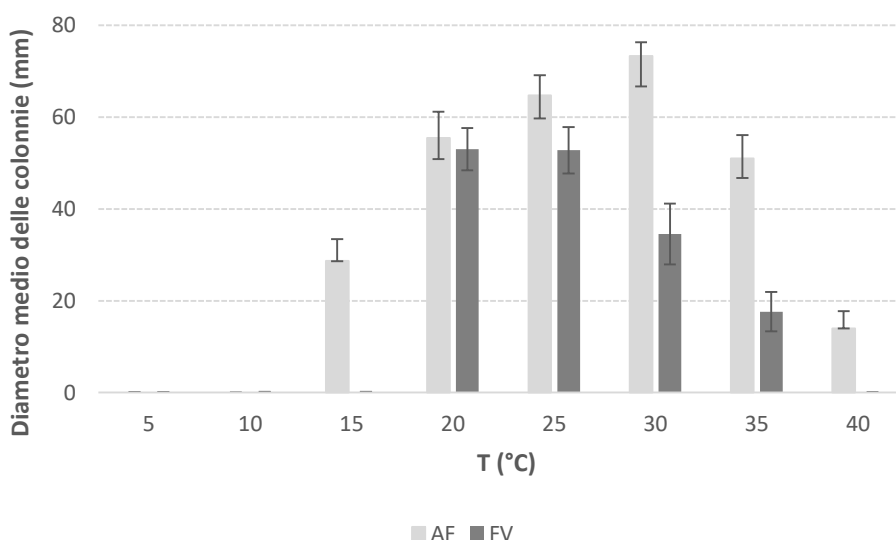


Figura 2.1. Diametro medio delle colonie (mm) dell'inoculo singolo di *Aspergillus flavus* (AF) e *Fusarium verticillioides* (FV) a diverse temperature di incubazione (T = 5-40 ° C, variazione di 5 ° C); i baffi indicano l'errore standard medio.

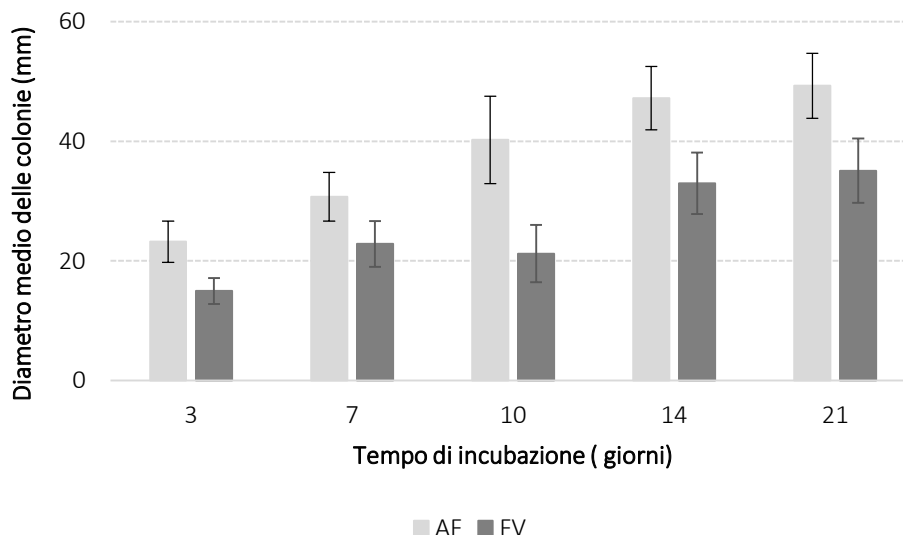


Figura 2.2. Diametro medio delle colonie (mm) dell'inoculo singolo di *Aspergillus flavus* (AF) e *Fusarium verticillioides* (FV) le cui colonie sono state quantificate a tempi diversi di incubazione (3, 7, 10, 14 e 21 giorni). Le barre indicano l'errore standard della media.

Modellizzazione del ruolo della temperatura sulla crescita fungina

L'analisi di regressione non lineare ha consentito di descrivere la relazione tra crescita fungina e T. Sia per AF che per FV. Il miglior fitting di crescita (GRWT) è stata ottenuto utilizzando il seguente modello di regressione (Analytis et al., 1980):

$$GRW_T = \left(a * (Teq)^b * (1 - Teq) \right)^c$$

$$Teq = \left(\frac{T - T_{min}}{T_{max} - T_{min}} \right)$$

[Equazione 1]

In cui, Teq è la T equivalente, Tmin è la T minima, Tmax è la T massima, a, b e c sono i parametri dell'equazione. L'R² corretto ottenuto è risultato 0.87 per AF e 0.81 per FV (**Tabella 2.1**).

Gli errori standard dei parametri stimati sono risultati essere più bassi dei parametri stessi, confermando quindi la bontà di adattamento dell'equazione applicata.

Tabella 2.1. Parametri stimati e statistiche riassuntive dell'analisi di regressione non lineare (Equazione 1) sviluppata per calcolare GRWT di singoli funghi inoculati (gli errori standard dei parametri sono riportati tra parentesi).

	Teq	Parametri			R ²
		a	b	c	
AF sing	5-48	4.19	1.08	2.68	0.87
		(0.272)	(0.088)	(0.586)	
FB sing	5-40	4.06	1.05	2.33	0.81
		(0.369)	(0.127)	(0.688)	

Nella **figura 2.3** è rappresentato l'andamento della GRWT a differenti valori di T. Sia AV, sia FV hanno presentato dinamiche di crescita simili, mostrando però differenti temperature ottimali. Infatti la T ottimale per AF (**Figura 2.3a**) e FV (**Figura 2.3b**) erano rispettivamente di 25-30°C e 20-25°C.

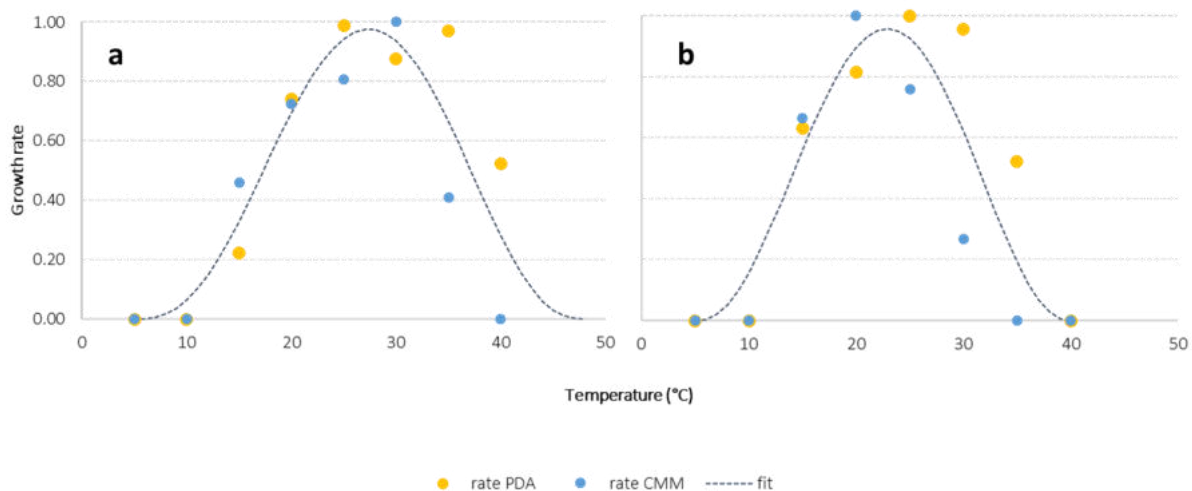


Figura 2.3. Andamento della GRWT di *Aspergillus flavus* (AF) (a) e *Fusarium verticillioides* (FV) (b) inoculati singolarmente, a differenti temperature (5-45°C).

Crescita fungina: co-inoculo

Nella **figura 2.4** è rappresentata la crescita media di entrambe le specie fungine considerate quando inoculate contemporaneamente. Fino alla T di 10 °C non è stata osservata alcuna crescita di funghi. Alla T di 15 °C la crescita di FV risulta invece più veloce rispetto alla crescita di AV. A questa stessa T, come si evince dal grafico, la crescita di FV raggiunge il suo massimo. Al contrario, a partire da 20°C, AV cresce più velocemente, così come ad ogni altra T superiore a 20°C. La T limite per FV è risultata essere 40°C, T alla quale invece è stata riscontrata la crescita di AV. La crescita dei funghi era significativamente diversa a ogni T di incubazione ($p < 0.01$).

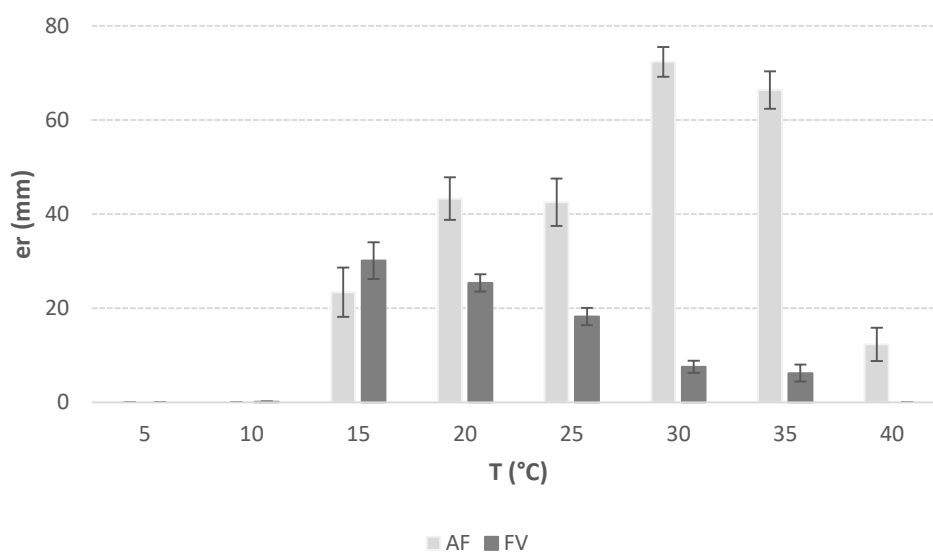


Figura 2.4. Diametro medio delle colonie (mm) di *Aspergillus flavus* (AF) e *Fusarium verticillioides* (FV) co-inoculati, a diverse T di incubazione (5-40°C, variazioni di 5 °C), le barre indicano l'errore standard della media.

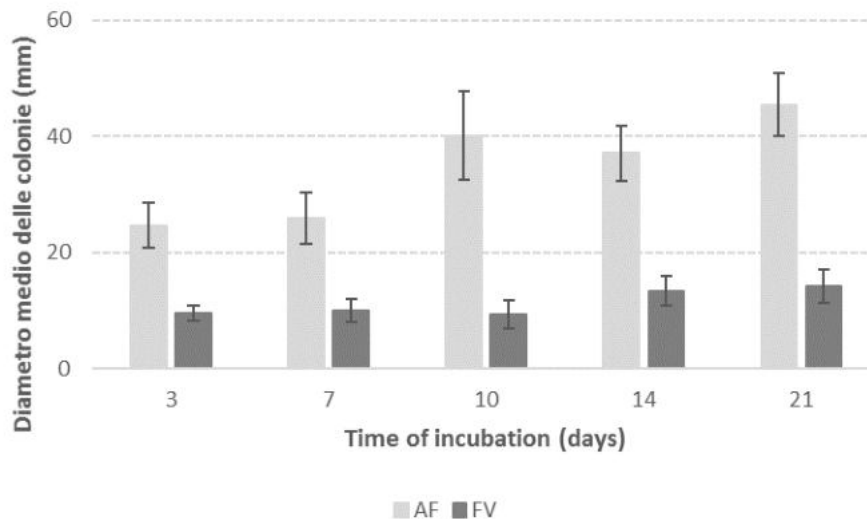


Figura 2.5. Diametro medio delle colonie (mm) di *Aspergillus flavus* (AF) e *Fusarium verticillioides* (FV) co-inoculati osservabili a differenti giorni di incubazione (3, 7, 10, 14 e 21 giorni), le barre indicano l'errore standard della media.

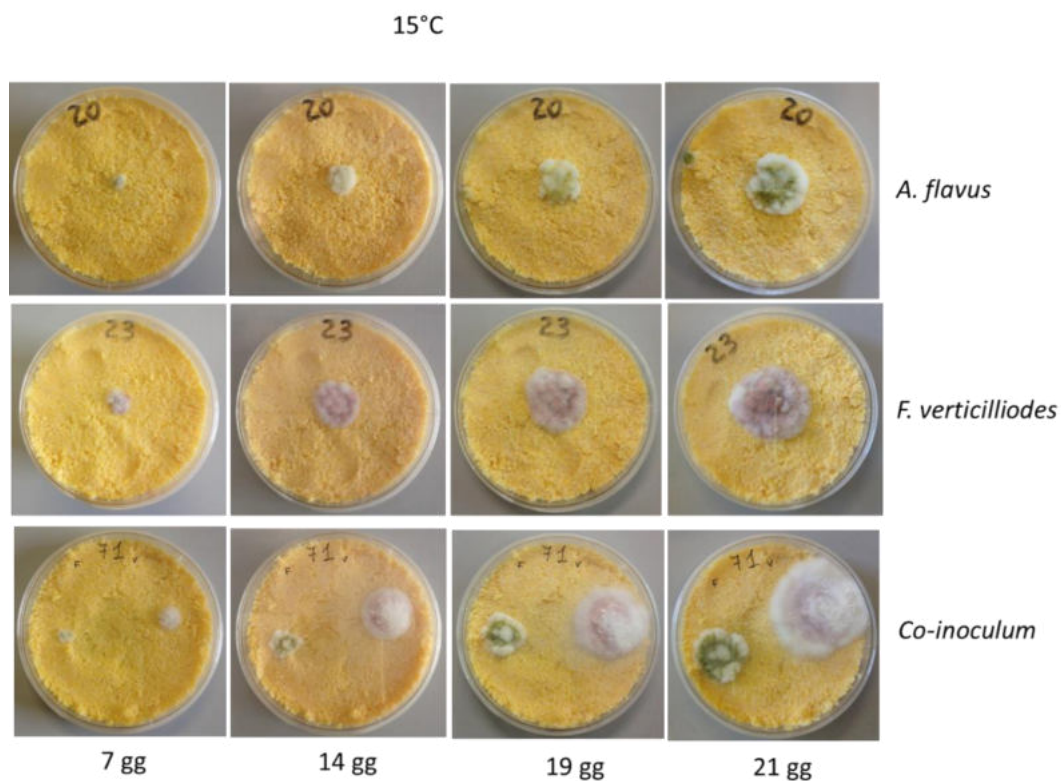


Figura 2.6. Esempio di inoculo singolo e co-inoculo di *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* su piastre contenenti terreno CCM incubate a 15 ° C.

Modellizzazione dell'influenza della temperatura sulla crescita dei funghi *A. flavus* e *F. verticillioides* inoculati contemporaneamente.

La dinamica della co-presenza dei due funghi è riportata in **Figura 2.7**. I punti rossi e grigi rappresentano il tasso di crescita ottenuto dai dati osservati; il colore rosso è riferito al terreno PDA mentre il colore grigio è riferito al terreno CMM. Le linee tratteggiate rappresentano le curve di crescita di AF (**Figure 2.7a**) e FV (**Figure 2.7b**); l'effetto di FV su AF è stato limitato; al contrario è stato osservato un forte effetto di AF su FV. Infatti, il tasso massimo di crescita di FV, durante la

coesistenza con AF, era <0.40 (osservato a 25°C), nettamente inferiore rispetto allo sviluppo dello stesso fungo inoculato singolarmente, condizione in cui era stato calcolato un tasso di crescita di 0.98. Inoltre, il comportamento fungino di interazione delle due specie è stato influenzato dal terreno di crescita. Per quanto riguarda AF, la crescita è stata leggermente ridotta dal co-inoculo di FV, registrando un tasso massimo di 0.80 (osservato a 30°C).

Tabella 2.2. Parametri stimati e statistiche riassuntive dell'analisi di regressione non lineare (equazione 1), condotta per il calcolo della GRWT di *Aspergillus flavus* (AF) e *Fusarium verticillioides* (FV) co-inoculati, in funzione della temperatura (gli errori standard dei parametri sono riportati tra parentesi).

	Teq	Parametri			R ²
		a	b	c	
AF+FV	5-48	4.30 (0.347)	1.26 (0.117)	2.31 (0.575)	0.85
FV+AF	5-40	1.46 (1.181)	1.23 (0.381)	0.93 (0.602)	0.58

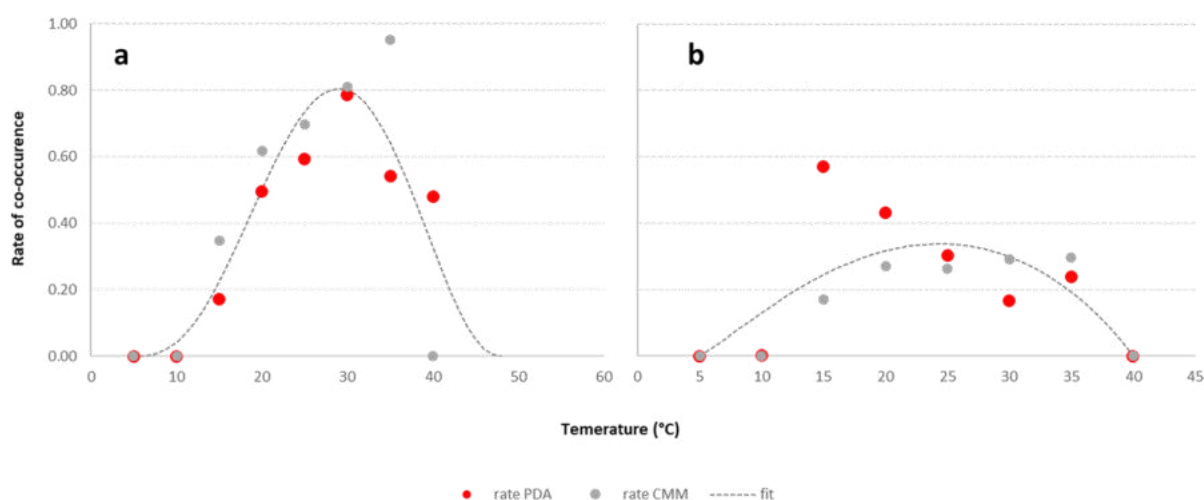


Figura 2.7. Dinamica della GRWT di *Aspergillus flavus* (AF; a) e *Fusarium verticillioides* (FV; b) nella situazione di copresenza ed esaminati a diversi regimi di temperatura (5-45°C). I dati sono stati modellizzati tramite la funzione non lineare (Equazione1, Tabella 2.2 per i parametri di equazione).

Sovrapponendo le curve della **Figura 2.3** e **Figura 2.7**, nella **figura 2.8** è possibile comparare le crescite di AF e FV, singolarmente e quando co-inoculati. L'effetto della copresenza è chiaramente diverso a seconda della coppia di funghi considerati, AF+ FV oppure FV+AF .

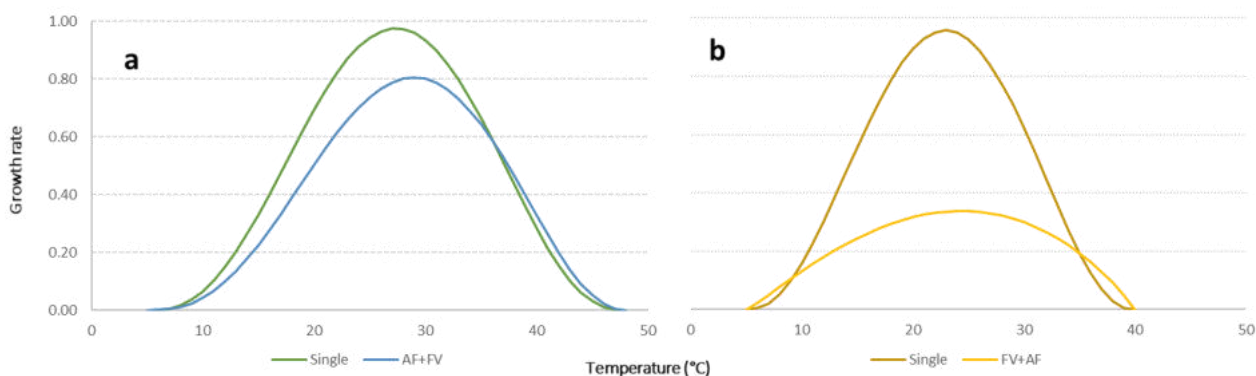


Figura 2.8. Tasso di crescita per *Aspergillus flavus* (AF) e *Fusarium verticillioides* (FV), sia singolarmente sia co-inoculati, a diverse temperature (5-45°C).

Modellizzazione dell'influenza della temperatura sulla produzione di micotossine

Lo stesso approccio utilizzato per la crescita dei funghi, è stato applicato per poter creare un modello che sia in grado di spiegare la relazione esistente fra il tasso di produzione di micotossine e la T (fra 5-40°C). Le micotossine considerate in questo studio sono state l'aflatossina B1 (AFB1) prodotta da AF e le fumonisine B1+B2 (FB) prodotte da FV. Esse sono state esaminate sia quando presenti nella stessa piastra che singolarmente.

I tassi di produzione delle micotossine sono stati calcolati usando l'equazione 1; i parametri sono riportati nella **Tabella 2.3**. Durante la crescita di AF, la maggiore produzione di AFB1 è avvenuta alla T di 25°C ed è stata prodotta per un intervallo compreso fra 15 e 30°C (**Figura 2.8a**, linea continua, $R^2 = 0.99$). Per quanto riguarda FV, la T ottimale per la produzione di FBs è stata di 20°C (**Figura 2.8b**, linea continua, $R^2 = 0.96$).

Tabella 2.3. Parametri stimati e statistiche riassuntive dell'analisi di regressione non lineare (Equazione 1), sviluppata per calcolare il tasso di produzione di micotossine derivanti sia dal singolo fungo, sia durante la co-presenza (gli errori standard dei parametri riportati tra parentesi).

	Teq	Parametri			R ²
		a	b	c	
AF sing	5-45	4.47 (0.090)	1.17 (0.031)	6.71 (0.698)	0.99
AF+Fv		3.11 (0.053)	0.74 (0.018)	7.26 (0.642)	0.99
FB sing	5-45	3.79 (0.132)	0.93 (0.044)	9.16 (1.446)	0.96
FV+AF		3.69 (0.120)	0.96 (0.040)	8.37 (0.897)	0.98

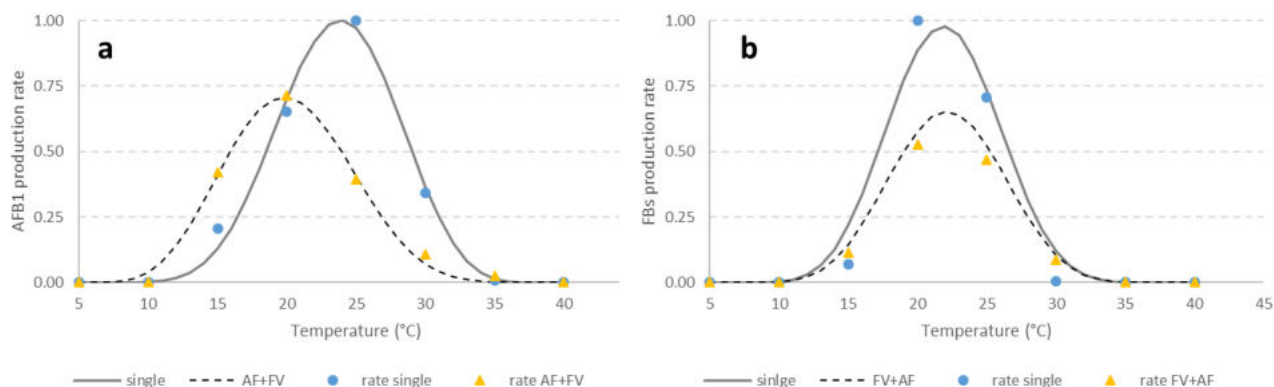


Figura 2.8. Andamento del tasso di produzione di AFB1 (a) e FBs (b) da parte di *Aspergillus flavus* (AF) e *Fusarium verticillioides* (FV) quando inoculati singolarmente (linea continua), comparato all'andamento del tasso di produzione di AFB1 (a) e FBs (b) quando co-inoculati (linea tratteggiata), a diversi valori di temperatura (compresi tra 5 e 45°C).

Il tasso di produzione di AFB1, generati da AV, è stato influenzato dalla presenza di FV (Figura 2.8a, linea tratteggiata); il tasso era inferiore durante la coesistenza e l'optimum ha mostrato uno spostamento da 25°C a 20°C. Per quanto riguarda le FBs, quando FV è stato co-inoculato con AF, il tasso di produzione è diminuito. L'optimum è stato invece confermato a 20°C.

Modello congiunto: TOX-maize

La versione aggiornata dei modelli predittivi, riuniti in un modello che tiene conto del rapporto fra *A. flavus* e *F. verticillioides*, denominata Tox_maize, è stata sviluppata e validata utilizzando alcuni campi selezionati.

Materiali e metodi

Raccolta dati di campo

Campioni di mais. Nel 2016 e nel 2017 sono stati utilizzati 25 e 46 campioni di mais; su tali campioni è stata quindi misurata la quantità di micotossine.

Dati meteorologici. I dati meteorologici orari (temperatura dell'aria, umidità relativa e pioggia) sono stati raccolti dal servizio meteorologico regionale, individuando i quadrati più vicini ai campi di mais campionati, con distanza inferiore a 20 km. I dati meteorologici sono stati considerati dal periodo di emissione delle sete alla data di raccolta e sono stati usati come input per i modelli predittivi (AFLA_maize, FER_maize e Tox_maize).

Previsione integrata per AFLA_maize e FER_maize

Le equazioni descritte e sviluppate nel presente documento sono state elaborate per quantificare l'entità dell'interazione tra AF e FV, e successivamente sono state correttamente integrate nei modelli previsionali esistenti AFLA_maize e FER_maize, ed incorporati a loro volta nel modello finale TOX_maize.

L'output del nuovo modello sviluppato TOX_mais è stato separatamente confrontato con l'output della versione precedente, AFLA_mais e FER_maize.

Risultati

La contaminazione da AFB e FB nei campi di mais selezionati nel 2016 e nel 2017 sono state riassunte nella figura 2.9 e nella tabella 2.4.

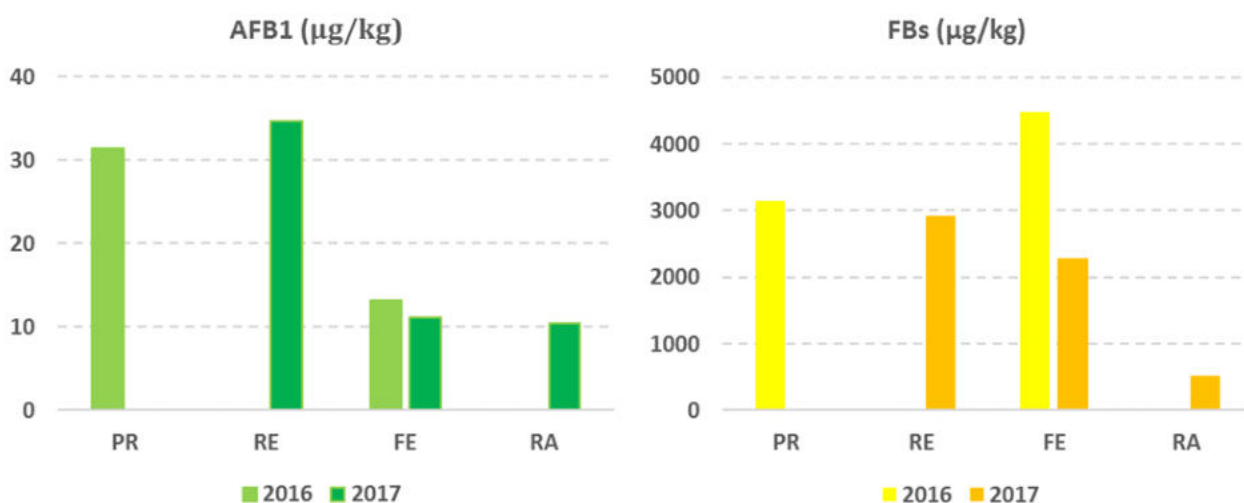


Figura 2.9. Contaminazione di aflatossina B1 (AFB1) e fumonina B1 + B2 (FB) nei campi di mais analizzati nel 2016 e 2017, raggruppati sulla base della provincia di coltivazione.

Dal modello corrente sono quindi stati estrapolati due output principali ovvero l'indice di rischio per AFB1 e per FBs, e la probabilità di avere mais contaminato al di sopra del limite legale fissato per il consumo umano e per animali da latte o unicamente per il consumo umano, rispettivamente per le 2 tossine.

Tabella 2.4. Contaminazione da AFB1 (µg/Kg) e output dei modelli previsionali usando AFLA_maize e TOX_maize (indice del modello = indice AF, probabilità = probabilità di avere mais contaminato al di sopra del limite legale). E' inoltre riportato il numero di campioni associati a ciascuna stazione meteorologica, per il 2016 e il 2017.

Anno	N. campioni	Provincia	ID_stazioni meteo	AFB1 (µg/Kg)	Indice-AF (AFLA-maize)	Probabilità	Indice-AF (TOX-maize)	Probabilità
2016	5	PR	811	61	3430	0.67	2189	0.37
	1	PR	853	2	2401	0.42	1483	0.22
	13	FE	1732	26	7487	0.99	4693	0.88
	2	FE	1894	1	8827	1.00	5397	0.94
2017	13	PR	811	12	2199	0.38	1224	0.19
	2	PR	853	27	1804	0.30	992	0.16
	5	RE	1011	35	949	0.14	498	0.10
	1	FE	1691	0	5348	0.93	3146	0.60
	17	FE	1732	22	5785	0.95	3415	0.66
	6	RA	1783	18	2464	0.43	1385	0.21
	1	RA	1822	3	2949	0.56	1685	0.26

L'output del modello predittivo AFLA_maize è stato influenzato dalla nuova funzione: l'indice di contaminazione da AFB, generato dal modello TOX_maize, è risultato essere inferiore rispetto a quello ottenuto mediante lo stesso AFLA_maize (**Tabella 2.4**). Per questo motivo, la probabilità di

avere mais contaminato al di sopra del limite legale è diminuita con il modello integrato, confermando le attese. La riduzione media è stata di circa il 20% (range 4-33%).

Per quanto riguarda FBs, è stato osservato un più forte impatto (**Tabella 2.5**), mostrando una diminuzione media del 45% (intervallo 3-83%).

Tabella 2.5. Contaminazione da fumonina B1+B2 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) e output dei modelli previsionali usando FER_maize e TOX_maize (indice modello=indice FB, probabilità=probabilità di avere mais contaminato oltre il limite legale). E' inoltre riportato numero di campioni associati a ciascuna stazione meteorologica, per il 2016 e il 2017.

Anno	N. campioni	Provincia	ID_stazioni meteo	FBs ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	FB-Index (FER_maize)	Probabilità	FB-Index (TOX_maize)	Probabilità
2016	5	PR	811	5027	63726	0.77	14706	0.09
	1	PR	853	1264	31662	0.25	7028	0.05
	13	FE	1732	2974	104542	0.99	23894	0.16
	2	FE	1894	5976	116692	0.99	26632	0.19
2017	13	PR	811	2900	36081	0.34	7539	0.05
	2	PR	853	330	26231	0.21	5485	0.05
	5	RE	1011	2926	10223	0.07	2102	0.04
	1	FE	1691	942	75685	0.89	16406	0.1
	17	FE	1732	3622	85913	0.94	18668	0.11
	6	RA	1783	232	29378	0.22	6008	0.05
	1	RA	1822	817	36624	0.32	7654	0.05

Tramite il confronto delle previsioni del modello con i dati di contaminazione del campo, è stata eseguita la validazione, riassunta in **Tabella 2.6**. A causa del numero limitato di stazioni meteorologiche e campioni raccolti, questa validazione è da considerarsi preliminare. Il modello previsionale congiunto TOX_maize ha funzionato bene per FV, aumentando così la capacità predittiva in modo significativo. Per quanto riguarda AF, i risultati non sono del tutto soddisfacenti perché è stata rilevata una diminuzione della previsione corretta.

Tabella 2.6. Risultato della validazione dei modelli, espressa come percentuale della previsione sottostimata, sovrastima o corretta.

Previsioni	AFLA-maize	TOX-maize
Sotto stime	39	47
Sovra stime	6	5
Stime corrette	55	48
	FER-maize	TOX-maize
Sotto stime	8	11
Sovra stime	30	0
Stime corrette	62	89

Utilizzando i dati colturali raccolti per tutti i campi di mais campionati, ed in base alla stima del loro effetto ottenuta in precedenti lavori (Camardo Leggieri et al., 2015), sono state integrate le previsioni di rischio. Come si può vedere in **figura 2.10**, questo ha consentito un significativo miglioramento delle previsioni, portando per entrambi i modelli all'80% le previsioni corrette.

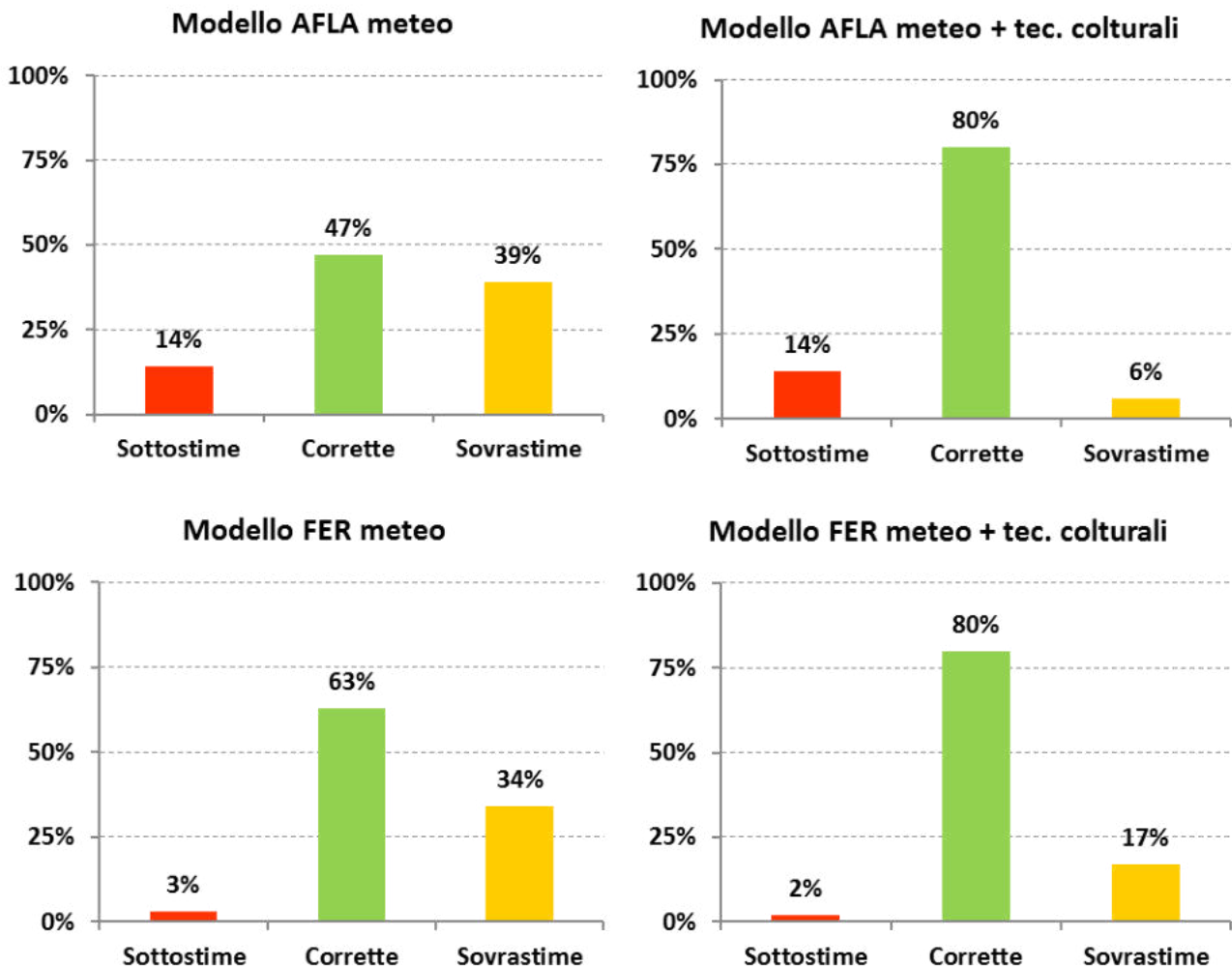


Figura 2.10. Risultato della validazione dei modelli, espressa come percentuale della previsione sottostimata, sovrastima o corretta, mettendo a confronto i modelli basati solo sui dati meteorologici (AFLA meteo e FER meteo, grafici a sinistra) e i modelli integrati con le informazioni relative alle tecniche colturali (grafici a destra).

Calibrazione del modello TOX_maize sulla stagione maidicola 2018

Con i risultati provenienti dai dati 2016-2017 è stato possibile calibrare una funzione di probabilità di tipo logistica binaria da validare sui dati raccolti nella stagione maidicola 2018.

La regressione logistica binaria è stata sviluppata servendosi degli indici calcolati utilizzando gli indici dei modelli AFLA & FER_maize, del biennio 2016-2017, come variabili indipendenti, e la contaminazione di AFB1 e FB1 + FB2 alla raccolta, suddivisa nei due gruppi di campioni contaminati al di sotto e al di sopra del limite legale ($0 = \leq 5$ o $1 = \Rightarrow 5 \mu\text{g} / \text{kg}$ per AFB1 o $0 = \leq 4000$ o $1 = \Rightarrow 4000 \mu\text{g} / \text{kg}$ per FB1 + FB2), come variabile dipendente.

La regressione logistica binaria è una tecnica multivariata adatta all'analisi di dati binari, ovvero con risposta si/no o positivo/negativo, non distribuiti normalmente. Consente di stimare la probabilità che si verifichi un evento (variabile dipendente) in base a una serie di variabili indipendenti (identificate in un solo fattore oppure in una serie di più fattori). La regressione logistica binaria può essere scritta come segue:

$$P = 1 / (1 + \exp(-C + B_1 * X_1 + B_2 * X_2 + \dots + B_p * X_p)) \quad [2]$$

dove C, B1, B2, ..., Bp sono i parametri stimati e X1, X2, ..., Xp, sono le variabili indipendenti. I valori di probabilità vanno da 0 a 1; per i valori di $P \geq 0,5$, l'evento è considerato ad alta probabilità; al contrario, per valori di $P \leq 0,5$, l'evento è ritenuto a bassa probabilità, quindi si ritiene che non si verifichi. Questo approccio è stato utilizzato anche in passato per tradurre l'indice di rischio prodotto dal modello in una probabilità di avere campioni di mais al di sopra dei limiti di legge fissati dalla legislazione comunitaria.

Per stimare i parametri dell'equazione logistica binaria, è stato utilizzato il modello di regressione logistica di SPSS (versione 25, IBM). Tali parametri sono riportati nella **tabella 2.7**.

Tabella 2.7. Parametro B e statistiche di regressione logistica binaria (equazione [2]) applicati per prevedere la probabilità di avere campioni di mais contaminati sopra 5 o 4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ rispettivamente per AFB1 e FB1 + FB2, in funzione degli output del modello predittivo (AF o FV).

	B	S.E.	Wald*	df	Probability**	Exp(b)***
AF	1.88E-04	0.000	4.786	1	0.029	1.000
AF Constant	-1.426	0.283	25.480	1	0.000	0.240
FV	4.04E-05	0.000	29.954	1	0.000	1.000
FV Constant	-1.929	0.299	41.688	1	0.000	0.145

*La statistica di Wald viene calcolata per le variabili del modello al fine di determinare se la variabile deve essere rimossa.

**Livello di probabilità del parametro

***Exp (b) è il fattore di aumento della probabilità dell'evento nel momento in cui la variabile indipendente cambia di un'unità.

Le equazioni logistiche binarie sviluppate (**Tabella 2.7; Figura 2.11**) sono state impiegate per elaborare i dati di copresenza per la validazione sul dataset 2018.

Validazione modello TOX_maize

I risultati della validazione del modello TOX_maize applicati nel 2018 sono stati abbastanza soddisfacenti. La validazione interna della funzione di probabilità, eseguita sui dati 2016-2017, per le previsioni riguardanti AF ha fornito il 71% di previsioni corrette contro il 68% ottenuto con il modello singolo AFLA-maize. Anche per FV è stato osservato un miglioramento delle stime; infatti, la stima del rischio è risultata corretta nel 68% dei casi, con il modello TOX-maize, contro il 63% del modello FER-maize sul dataset del 2018. I risultati sono da ritenersi molto soddisfacenti, trattandosi di un solo anno di applicazione del modello e considerando la possibilità di ulteriore calibrazione del modello con i dati di future stagioni maidicole.

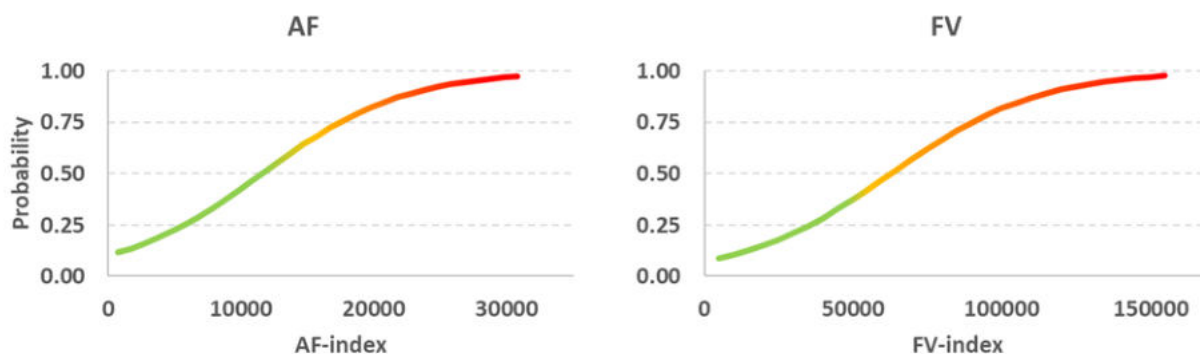


Figura 2.11. Rappresentazione delle equazioni logistiche binarie sviluppate per stimare la probabilità che i campi di mais siano contaminati con aflatossine e fumonisine al di sopra del limite legale, tenendo conto dell'interazione tra AF e FV.

La validazione esterna, eseguita con i dati dell'anno 2018, hanno confermato il miglioramento osservato durante la fase di validazione interna del modello.

Nella **Figura 2.12** è illustrato il confronto dell'output del modello TOX_maize con l'output dei modelli singoli, sia per AF che per FV.

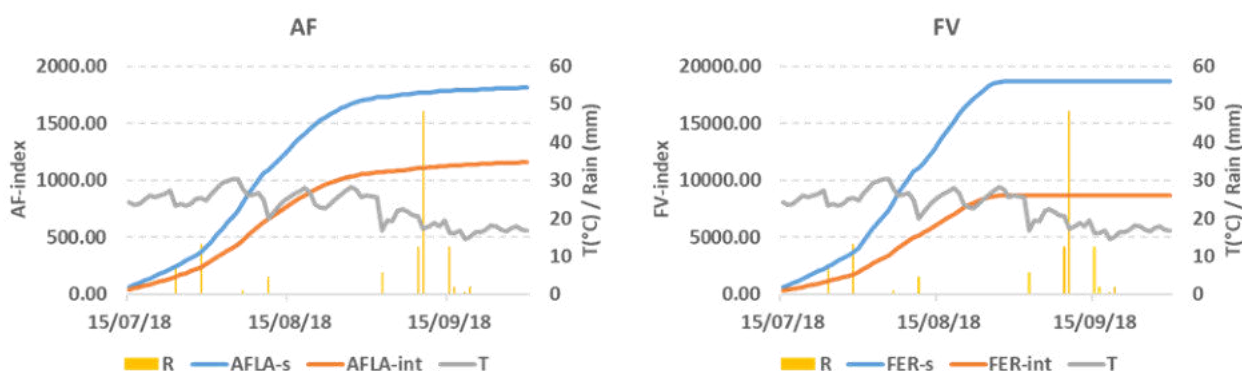


Figura 2.12. Esempio di confronto degli output dei modelli AFLA_maize e FER_maize (linea blu), rispettivamente per aflatossina (AF) e fumonisina (FV), con il modello di interazione (TOX_Maize, rispettivamente AFLA-int e FER-int per AF e FV, linea arancione). I modelli sono stati elaborati sulla base dei dati meteorologici raccolti dalla stazione meteorologica di Cadeo, durante la stagione colturale 2018 (dall'emissione delle sete fino alla data di raccolta). Sono inoltre raffigurati gli andamenti della temperatura media giornaliera (°C, linea grigia) e gli istogrammi giornalieri della pioggia (mm, barre gialle).

I risultati del modello TOX_maize, in termini di rischio di contaminazione di AF e FB al di sopra dei limiti legali, sono stati diffusi con cadenza settimanale, agli agricoltori e ai tecnici della regione Emilia Romagna.

Conclusioni

I risultati della ricerca, riportati in questa relazione sono molto importanti, dal momento che rappresentano il primo tentativo di spiegare l'interazione tra i diversi funghi che producono micotossine nel mais in condizioni ambientali mutevoli. La co-presenza di diversi funghi tossigeni ha un effetto cruciale sulla produzione di micotossine oltre che sulla crescita dei funghi stessi. Questo aspetto ha acquisito importanza nell'attuale contesto di cambiamento climatico; infatti, recentemente è stato sottolineato come l'ampia variazione delle condizioni meteorologiche, tra e

durante diversi anni, renda più frequente la copresenza di funghi micotossigeni e delle relative micotossine.

Come riportato, i risultati non sono ancora completamente soddisfacenti, soprattutto per quanto riguarda le aflatoxine. La creazione di un modello congiunto TOX-maize, ha richiesto un notevole sforzo di interpretazione delle interazioni che evidentemente necessita di ulteriori aggiornamenti. Avendo acquisito tutti i dati grezzi necessari, si ritiene comunque di poter raggiungere in tempi ragionevolmente brevi un risultato completamente soddisfacente che sarà oggetto di una pubblicazione scientifica in preparazione. Inoltre, l'integrazione dei dati colturali è garanzia di significativo incremento dell'affidabilità delle previsioni.

Inoltre è necessario prevedere nel prossimo futuro un output intuitivo e semplice per la disseminazione delle informazioni relative alle previsioni: l'efficienza della distribuzione delle informazioni è un aspetto su cui i ricercatori si stanno focalizzando. In futuro, un'infrastruttura informatica, a supporto dei modelli previsionali, dovrebbe facilitare la condivisione dei dati e l'accesso al pubblico, meglio ancora se accessibile tramite il sistema di app per smartphone.

Fase 2. Raccolta campioni e dati meteorologici

Raccolta campioni

Durante il triennio 2016-2018 sono stati individuati in totale 150 campi di mais rappresentativi delle aree di coltivazione regionali, nelle provincie di Piacenza, Parma, Reggio Emilia, Modena, Bologna, Ferrara e Ravenna. In collaborazione con le strutture cerealicole del territorio, sono stati raccolti i dati colturali per ciascun campo campionato utilizzando un'apposita scheda agronomica; i dati raccolti sono stati inseriti in un data-base per le opportune elaborazioni.

Alla raccolta, le diverse aziende coinvolte hanno prelevato un campione rappresentativo direttamente dal carro di trasporto o dallo scarico della trebbia; i campioni raccolti da GCI e CRPV sono stati conferiti all'UCSC per le analisi del contenuto di aflatoxine e fumonisine (quest'ultima attività è da considerarsi supplementare).

Raccolta dati meteorologici

I dati meteorologici orari sono l'input del modello previsionale AFLA-maize, per ottenere l'indice di rischio di contaminazione da AFB₁ in mais durante la stagione colturale. I dati orari di temperatura (T), umidità relativa (RH) e pioggia (R), sono stati ottenuti da 15 quadranti del servizio meteorologico regionale (**Tabella 2.7**) nelle vicinanze dei campi oggetto di campionamento, associati grazie ai dati delle schede agronomiche, cercando di avere per ogni campione una stazione meteo associata ad una distanza inferiore a 20 km. I dati raccolti sono stati gestiti in data-base dedicati e decorrono dal primo gennaio dell'anno di riferimento fino al momento della raccolta.

Tabella 2.7. Elenco delle stazioni meteorologiche utilizzate con i rispettivi quadranti di riferimento.

Località	Prov.	Quadr. n°
Medicina	BO	1622
S. Giovanni in Persiceto	BO	1338
Villafranca di Forlì	FC	1865
Codigoro	FE	1894
Copparo	FE	1732

Guarda Ferrarese, Ro	FE	1691
Mirandola	MO	1252
Castelfranco Emilia	MO	1219
Cadeo	PC	450
Colorno	PR	811
Sorbolo	PR	853
Lugo	RA	1783
Maiano Monti	RA	1822
Cadelbosco di Sopra	RE	935
Luzzara	RE	1011

Fase 3. Previsioni con AFLA-maize

Il modello AFLA-*maize* permette di stimare giornalmente il rischio di avere infezioni da parte di *A. flavus* e di conseguenza accumulo di AFB₁ nelle cariossidi di mais. Il modello calcola, sulla base di una serie di tassi che regolano il passaggio da uno stadio del ciclo di infezione del fungo al successivo, un indice che tiene conto dello sviluppo del fungo e della sintesi di tossine. Questo indice, tramite una equazione binomiale, viene tradotto in un indice di probabilità di contaminazione della granella da AFB₁ al di sopra della soglia di 5 µg/Kg.

Le previsioni sono state effettuate con il modello AFLA-*maize* utilizzando come input i dati meteorologici ottenuti per le varie stazioni, come indicato in **tabella 2.7**. Per l'anno 2016 le simulazioni sono iniziate in data 11 luglio e sono proseguite fino al 5 settembre, per un totale di 7 simulazioni, nel 2017 sono state eseguite 5 simulazioni dal 18 luglio al 22 settembre e infine, nel 2018 dal 12 luglio al 3 settembre per un totale di 8 simulazioni. Inoltre, le simulazioni sono state effettuate fornendo l'output sulla base di due ipotetici periodi di emergenza della plantula di mais: metà aprile o fine aprile, per tutto il triennio. L'output del modello viene tradotto in una scala di rischio nominale, indicando 4 livelli di rischio di superamento della soglia di 5µg di AFB₁ per Kg di granella: assente, basso, medio e alto. Per l'anno 2016, il rischio medio fornito dal modello alla fine della stagione colturale è stato medio-basso, nel 2017 medio-basso e medio-alto nel 2018.

Attività addizionali

– Previsioni con il modello FER-maize

Nel triennio è stata valutata un'attività aggiuntiva di studio per il miglioramento delle performance predittive del modello FER-*maize* e di analisi delle Fumonisine (FBs), non supportata economicamente dal progetto, ma della quale si riferisce in questa relazione.

Il modello FER-*maize* permette di stimare giornalmente il rischio di causare infezione e di accumulo di FBs nelle cariossidi da parte di *F. verticillioides*. Questo modello, analogamente ad AFLA-*maize*, fornisce un indice di probabilità di contaminazione della granella alla raccolta al di sopra della soglia di 4000 µg/Kg. Il calendario delle simulazioni effettuate con il modello FER-*maize* è stato analogo a quello sopra descritto per il modello AFLA-*maize*. Per l'anno 2016, il rischio medio fornito dal modello alla fine della stagione colturale è stato medio- basso, confermato medio- basso nel 2017 e medio-alto nel 2018.

– Previsioni con il modello FHB-wheat

Il modello per la fusariosi della spiga FHB-wheat permette di stimare giornalmente il rischio infettivo e di accumulo di deossinivalenolo (DON) nelle cariossidi di frumento. Il modello è stato sviluppato con il medesimo approccio seguito per i 2 modelli precedentemente descritti ed è in uso in regione Emilia Romagna da diversi anni. Il modello considera le principali specie fungine responsabili della Fusariosi (*Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* e *Microdochium nivale*) ed un indice di potenziale contenuto di DON in conseguenza alle epidemie causate da *F. graminearum* e *F. culmorum*.

Le previsioni sono state effettuate con il modello FHB-wheat utilizzando come input i dati meteorologici ottenuti dalle stazioni riportate in **tabella 2.8**.

Tabella 2.8 Elenco delle stazioni meteorologiche utilizzate con i rispettivi quadranti di riferimento, utilizzate nelle simulazioni con il modello FHB-wheat.

Località	Prov.	Quadr. n°
Castel S.Pietro Terme	BO	1583
Medicina	BO	1622
Molinella	BO	1618
Sala	BO	2109
Codigoro	FE	1894
Copparo	FE	1732
Filo di Argenta	FE	1779
Ostellato	FE	1776
Castelfranco Emilia	MO	1219
Finale Emilia	MO	1374
Mirandola	MO	1252
Gossolengo	PC	330
Pannocchia	PR	777
Alfonsine	RA	1861
Lugo	RA	1783
Guastalla	RE	972
Reggio Emilia	RE	977

Nel triennio le simulazioni sono iniziate in data 9 maggio e sono proseguite fino al 14 giugno, per un totale di 5 simulazioni. Inoltre, le simulazioni sono state effettuate fornendo l'output sulla base di 3 ipotetiche settimane di spigatura del frumento: 25 aprile – 1 maggio, 2 maggio – 8 maggio e 9 maggio – 15 maggio. L'output del modello viene fornito su scala ordinale, indicando 5 livelli di rischio di superamento della soglia di 1250µg di DON per Kg di frumento tenero e di 1750µg di DON per Kg di frumento duro. I livelli 1 e 2 indicano rischio basso, il livello 3 rischio medio, infine i livelli 4 e 5 rischio alto. Per l'anno 2016, il rischio medio fornito dal modello alla fine della stagione

colturale, per l'ultima settimana di spigatura è stato compreso nei livelli 3-5, nel 2017 2-3 e 5 nel 2018.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate

Il grado di raggiungimento degli obiettivi è completo. Non si segnalano scostamenti o particolari criticità.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Battilani P., Camardo Leggieri M., V. Rossi, Giorni P. AFLA-maize, a predictive model for *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin B1 contamination in maize. *Computers and Electronics in Agriculture*, 2013, 94: 38-46

Giorni P., Bertuzzi T., Battilani P. Aflatoxin in maize, a multifaceted answer of *Aspergillus flavus* governed by weather, host-plant and competitor fungi. *Journal of Cereal Science*, 2016, 70: 256-262

AZIONE 3.3 – Impiego di metodiche analitiche rapide basate sull'utilizzo di biosensori (naso elettronico)

3.3.1 Attività e risultati

Unità aziendale responsabile (Uar): UCSC-PC

Partecipano alle attività: GCI

Descrizione attività

L'obiettivo di quest'azione era quello di sviluppare un protocollo per l'impiego di strumenti rapidi (naso elettronico) per la determinazione analitica, con approccio non distruttivo, della contaminazione da micotossine su frumento e mais.

Fase 1. Preparazione campioni

Raccolta campioni frumento

Nel 2017 e 2018, GCI e CRPV hanno organizzato, con le Cooperative socie dell'O.P., la raccolta sotto-trebbia dei campioni di frumento tenero e duro necessari per la taratura del naso elettronico. Gli areali di provenienza dei campioni sono stati: areale est della provincia di Bologna, provincia di Ferrara, areale ovest della provincia di Ravenna. Si è cercato di operare in diverse condizioni climatiche e agronomiche, tra qui anche la conduzione biologica, al fine di ottenere campioni di frumento con livelli di contaminazione da DON variabili, presupposto indispensabile per validare una affidabile "taratura" del naso elettronico.

Complessivamente, nel biennio, sono stati raccolti 106 campioni di granella tra frumento tenero e duro.

Raccolta campioni mais

La raccolta dei campioni utilizzati in questo studio relativi al mais è stata descritta nell'apposito paragrafo riportato nell'azione 3.2 - fase 2, infatti i campioni utilizzati sono gli stessi.

Fase 2. Sviluppo della metodica per l'analisi dei campioni utilizzando gli strumenti rapidi

Il naso elettronico utilizzato per questa azione è uno strumento portatile modello "AIR PEN 3" a disposizione presso l'Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione (ISAN) dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza. Lo strumento utilizzato è dotato di 10 sensori MOS (metal oxide sensors) per altrettante categorie di sostanze volatili rilevabili. La descrizione dei sensori è riportata in **tabella 3.1**.

Tabella 3.1. Elenco dei sensori e dei descrittori generici del naso elettronico usato nello studio “AIR PEN 3”.

Sensore	Descrittore
W1C	aromatic
W5S	broad range
W3C	aromatic
W6S	hydrogen aromatic-
W5C	aliphatic
W1S	broad range
W1W	sulphur organic
W2S	broad alcohol
W2W	sulphur-chlorine methane-
W3S	aliphatic

L’analisi è stata effettuata su campioni di granella (mais o frumento) del peso indicativo di 50g posti in palloni sigillati da 100mL e tenuti per un’ora a 25°C. La permanenza in palloni dei campioni prima dell’analisi ha lo scopo di consentire la liberazione della componente volatile nello spazio di testa del pallone, ovvero nella parte non occupata dalla granella. Il sistema di campionamento del naso elettronico è stato collegato direttamente al pallone contenente il campione; l’aria presente nello spazio di testa è stata aspirata dallo strumento con un flusso di 400mL/min fino alla stabilizzazione delle curve originate dai sensori, nel caso specifico per 60 secondi. Durante l’analisi il segnale elettrico è stato registrato per ciascuno dei dieci sensori ogni secondo. Dopo l’analisi di un campione, lo strumento effettua un auto-lavaggio dei sensori per 5 minuti con aria ambiente filtrata in filtro a carbone attivo per riportare i sensori alla condizione di zero gas prima di una nuova analisi.

Elaborazione dati

I dati provenienti dalle misurazioni effettuate sono stati elaborati utilizzando il programma SPSS 25. Solamente una lettura per sensore/campione è stata considerata per la formazione del database. Nel caso specifico si è considerato il 59° secondo di campionamento e quindi in condizioni di plateau di risposta del sensore. I dati così ottenuti sono stati sottoposti all’analisi discriminante e all’analisi di regressione logistica binaria. Entrambe le analisi sono state settate per ottenere una risposta semi-quantitativa, usando il principio della rilevazione su soglia; il livello soglia è stato settato per AFB1 a 5 µg/Kg e per FBs a 4000 µg/Kg in mais, mentre per il frumento è stata utilizzata la soglia 1250 µg/Kg.

L’analisi del discriminante ha avuto l’obiettivo di individuare i sensori del naso elettronico maggiormente coinvolti nella discriminazione tra campioni sopra/sotto soglia; invece, l’analisi di regressione logistica binaria è stata utilizzata per generare una funzione di probabilità allo scopo, sempre, di discriminare campioni contaminati sopra/sotto soglia, ma con la possibilità di successivo impiego a scopo predittivo.

Ai dati raccolti nel triennio in oggetto sono stati aggiunti i dati raccolti in precedenti annate agrarie, in particolare 2014 e 2015 (Progetto MYCO.PREV, L.R. 28/98), sia per frumento che per mais, con lo scopo di aumentare la sensibilità delle analisi statistiche applicate che necessitano di ampi set di dati per migliorare le performance.

Risultati

Frumento

In **figura 3.1** sono riportati i dati di contaminazione da DON, come media per anno, relativamente ai campioni di frumento duro e tenero disponibili negli anni 2014, 2015, 2017 e 2018, per un totale di 214 campioni disponibili.

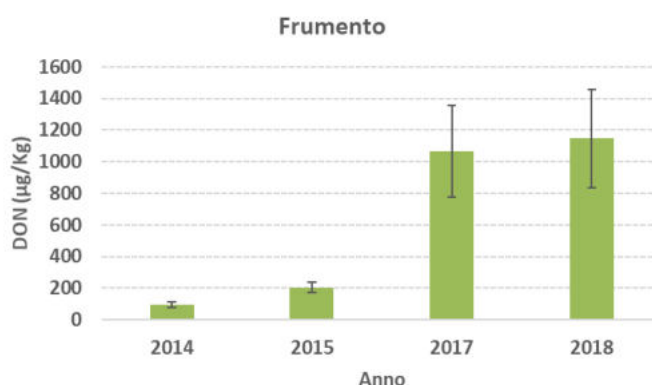


Figura 3.1. Contenuto medio di DON e nei campioni di frumento duro e tenero raccolti nei diversi anni.

La contaminazione da DON è stata limitata, infatti i livelli di DON sono stati molto bassi nel 2014 e 2015 (< 200 µg/Kg), mentre nel 2017 e 2018 si sono osservate contaminazioni più elevate e solo 20 campioni con DON > 1250 µg/Kg.

I risultati dell'analisi del discriminante, effettuata sull'intero dataset, ha fornito una classificazione corretta dei campioni nel 70.6% dei casi, utilizzando tutti i sensori disponibili. In altre parole, tutti i sensori disponibili sono stati ritenuti importanti dall'analisi del discriminante per poter classificare correttamente, nel 70.6 % dei casi, i campioni di frumento sopra o sotto la soglia di 1250 µg/Kg di DON.

Invece, l'analisi di regressione logistica binaria, non ha dato esito positivo con la soglia 1250 µg/Kg, essendoci solo 20 campioni su 214, contaminati oltre soglia.

Mais

In **figura 3.2** sono riportati i dati di contaminazione da AFB1 (**figura 3.2 A**) e FBs (**Figura 3.2 B**); i dati sono stati raccolti nelle annate 2014, 2015 (solo AFB1), 2016, 2017 e 2018. In totale sono stati raccolti 243 campioni utili per l'analisi delle AFB1 e 195 per le FBs.

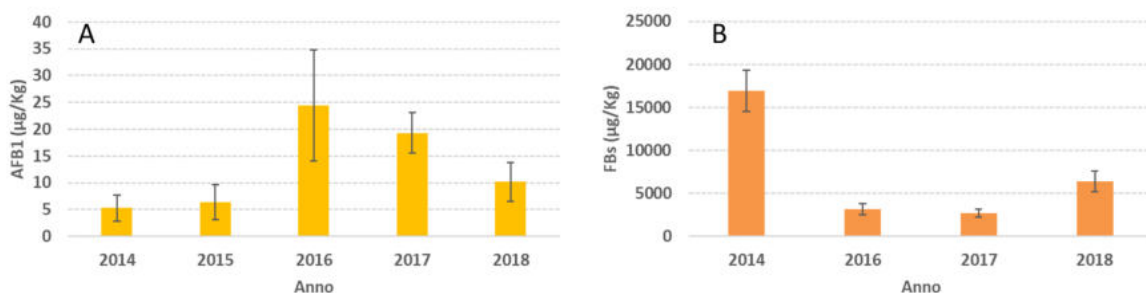


Figura 3.2. Contenuto medio di A) AFB1 e B) FBs nei campioni di mais raccolti nei diversi anni.

Mediamente il contenuto di AFB1 è stato superiore a 5 µg/Kg in tutti gli anni, il biennio 2016 e 2017 con contaminazioni medie di 24 e 19 µg/Kg, rispettivamente. Al contrario, per le FBs, la somma è stata inferiore al limite di legge nelle annate 2016 e 2017, mentre sono risultate con contaminazione media di 16900 e 6379 per le annate 2014 e 2018, rispettivamente.

L'analisi discriminante per AFB1 ha individuato che i sensori W2S, W1W, W3S e W6S sono risultati avere un potere discriminante nel classificare correttamente sopra o sotto soglia nel 62.7% dei campioni. È stata anche generata una funzione logistica binaria, per la classificazione dei campioni di mais in base al contenuto di AFB; i risultati della validazione di questa equazione sono riportati nella **figura 3.3A**, in particolare attraverso questa equazione probabilistica è stato possibile classificare correttamente il 71% dei campioni.

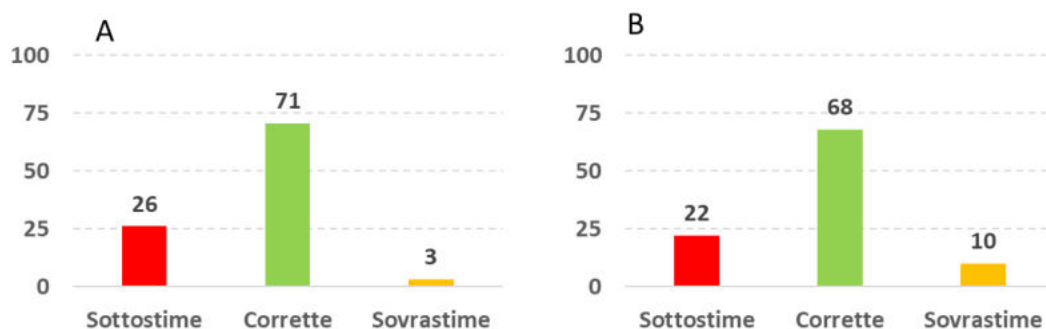


Figura 3.3. Risultati (%) della validazione delle equazioni logistiche per la classificazione di A) AFB1 e B) FBs nei campioni di mais raccolti nei diversi anni.

Invece, per quanto riguarda le FBs (**figura 3.3B**), i sensori riconosciuti dall'analisi discriminante come determinanti per la corretta classificazione dei campioni contaminati sopra o sotto soglia (4000 µg/Kg), sono stati W3S e W6S, fornendo classificazione corretta nel 57.6% dei casi. La percentuale di corretta classificazione dei campioni è migliorata utilizzando l'approccio probabilistico dell'equazione logistica binaria, infatti sono stati classificati correttamente il 68% dei campioni.

Considerazioni conclusive

In questo studio il naso elettronico è stato utilizzato per cercare di rilevare rapidamente la contaminazione da micotossine (DON, AFB₁ e FBs) rispettivamente in frumento e mais.

Da queste esperienze, tale metodo semi-quantitativo risulta promettente, sicuramente per campioni con elevata contaminazione da micotossine, che dovrebbero assicurare un maggiore potere discriminatorio dello strumento. È importante sottolineare la possibilità, ottenuta attraverso le metodologie statistiche adoperate, di avere individuato i sensori del naso elettronico che possono fornire una risposta discriminante per ciascuna tossina oggetto di studio, in particolare per il mais, oltre alla possibilità di utilizzare due equazioni logistiche che sono state sviluppate in questo studio a scopo probabilistico.

Tuttavia, resta una criticità imposta da questo metodo, relativamente al tempo richiesto per il condizionamento, del campione pre-analisi, all'interno del pallone, attualmente fissato ad un'ora. Il tempo di attesa di circa un'ora non è compatibile con l'impiego di questo metodo di analisi alla ricezione di materiale nei centri di raccolta. Infatti, c'è grande richiesta di metodi rapidi e con questo termine si intende fare riferimento a tempi di analisi di qualche minuto. Non dobbiamo dimenticare che il tempo di analisi dello strumento, escludendo il condizionamento, è di un minuto; si tratterebbe quindi di mettere a punto un sistema molto più rapido che comunque garantisca un corretto condizionamento del campione.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate

Il grado di raggiungimento degli obiettivi è completo. Non si segnalano scostamenti o particolari criticità.

AZIONE 3.4 – Influenza della tecnica di irrigazione sulla sensibilità alle micotossine del mais

3.4.1 Attività e risultati

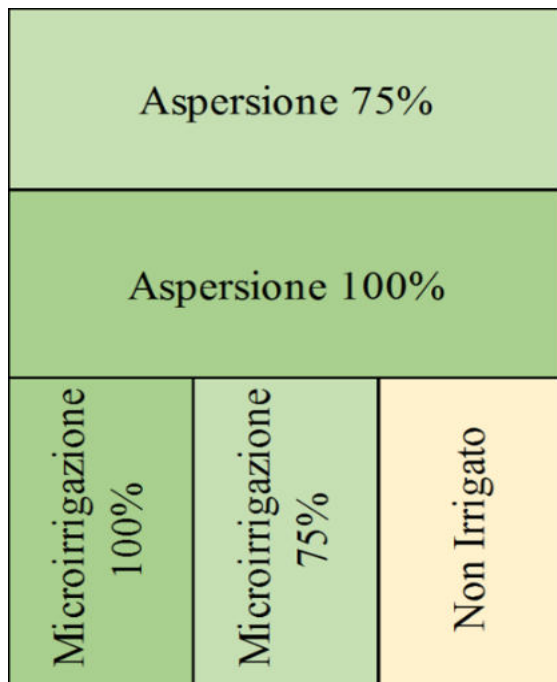
Unità aziendale responsabile (Uar): Azienda Agraria Sperimentale Stuard

Descrizione attività anno 2017

Nel periodo oggetto della seguente rendicontazione (da giugno 2017 al 15 luglio 2019) i tecnici di Stuard hanno portato a termine la prova agronomica del primo anno (2017) e ripetuto la stessa prova agronomica nel 2018. La coltivazione del mais da granella è stata effettuata nel rispetto dei Disciplinari di Produzione Integrata della R.E.R..

La prova nel 2017 era impostata secondo lo schema sperimentale riportato sotto:

Fig. 4.1



In sostanza il campo di mais oggetto della prova era diviso in 2 grandi sezioni, una irrigata a pioggia/aspersione, l'altra irrigata a goccia/micro-irrigazione; all'interno delle sezioni poi si è provveduto a differenziare il volume irriguo, rispettivamente con il 100% della restituzione idrica e con il 75%, secondo il piano del Go. Infine era presente un testimone non irriguo.

La gestione delle irrigazioni è stata effettuata secondo le indicazioni previste dal modello Irriframe (www.irriframe.it), portale dell'irrigazione gestito dall'ANBI (associazione nazionale dei consorzi di bonifica italiani).

Secondo il protocollo di lavoro, nella prima fase della coltivazione, dalla semina allo stadio di 6 foglie vere, l'irrigazione è stata condotta in modo uniforme per tutte le tesi oggetto della prova, in modo tale da consentire uno sviluppo vegetativo adeguato della coltivazione.

Nel 2017 la semina è stata effettuata il 19 aprile e l'irrigazione differenziata è iniziata il 9 giugno, secondo le indicazioni fornite da Irriframe.

Nella tabella sottostante è riportato il dettaglio degli interventi irrigui effettuati e delle precipitazioni verificatesi durante il periodo culturale.

Tabella 4.1

Data	Descrizione	Volume irriguo (mm)					Precipitazioni (mm)	Note
		Pioggia a 100%	Pioggia a 75%	Gocci a 100%	Gocci a 75%	Test non irriguo		
19/04/2017	Semina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
26/04/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,0	
27/04/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	
28/04/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	
01/05/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,6	
03/05/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	
04/05/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	
06/05/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	21,6	
07/05/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	19,2	
08/05/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,0	
09/05/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	
19/05/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	
20/05/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	
23/05/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	
27/05/2017	Irrigazione	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	0,0	irrigazione uguale per tutti
09/06/2017	Irrigazione	65,0	50,0	38,0	29,0	0,0	0,0	inizio irrigazione differenziata
14/06/2017	Irrigazione	0,0	0,0	19,0	14,0	0,0	0,0	
14/06/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	33,0	
20/06/2017	Irrigazione	0,0	0,0	19,0	14,0	0,0	0,0	
26/06/2017	Irrigazione	35,0	25,0	19,0	14,0	0,0	0,0	
26/06/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,2	
27/06/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	
28/06/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	37,6	
29/06/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	
05/07/2017	Irrigazione	0,0	0,0	27,0	20,0	0,0	0,0	
08/07/2017	Irrigazione	0,0	0,0	38,0	29,0	0,0	0,0	
11/07/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	
14/07/2017	Irrigazione/precipitazione	0,0	0,0	24,0	18,0	0,0	2,8	
18/07/2017	Irrigazione	0,0	0,0	29,0	21,0	0,0	0,0	
21/07/2017	Irrigazione/precipitazione	55,0	43,0	0,0	0,0	0,0	1,0	
22/07/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	
24/07/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	
25/07/2017	Irrigazione	0,0	0,0	24,0	18,0	0,0	0,0	
25/07/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	
29/07/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	
02/08/2017	Irrigazione	45,0	34,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
03/08/2017	Irrigazione	0,0	0,0	24,0	18,0	0,0	0,0	
10/08/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	
11/08/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	
31/08/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	
02/09/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,8	
03/09/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	
07/09/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,0	
08/09/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	
09/09/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,4	
10/09/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	56,6	
11/09/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	
15/09/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	26,6	
16/09/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	
18/09/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,6	
19/09/2017	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,4	
22/09/2017	Raccolta parcelle	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Totale		235,0	187,0	296,0	230,0	35,0	287,2	
Totale dopo differenziazione		235,0	187,0	296,0	230,0	35,0	219,4	

Dalla tabella si evince che l'ultimo intervento irriguo è stato effettuato in data 3 agosto 2017. Il mese di agosto e parte del mese di settembre è stato caratterizzato da diversi episodi piovosi. Infine in data 22 settembre 2017 si è proceduto alla raccolta manuale delle spighe nelle diverse aree di saggio.

In accordo con il piano del GO sono stati effettuati i seguenti rilievi:

- N° totale delle piante;
- N° totale delle spighe;
- N° totale delle spighe con carbone;
- N° delle piante inclinate (> 45°);
- N° delle piante spezzate (sotto la spiga);
- Altezza totale della pianta (alla foglia a bandiera) su 3 piante campione;
- Altezza inserzione della spiga su 3 piante campione;

Le spighe raccolte sono state sgranate con una macchina apposita e sulla granella ottenuta si sono effettuati i rilievi quanti-qualitativi previsti:

- Peso totale (Kg); umidità della granella (%); peso Ettolitrico della granella (Kg/hL); peso dei 1000 semi (grammi).

Infine sono stati raccolti dei campioni di granella dalle diverse parcelle sperimentali ed inviati al laboratorio di UCSC di Piacenza per l'analisi di aflatossine e fumonisine.

I risultati delle parcelle sperimentali di mais sono sintetizzati nella tabella sottostante:

Tab. 4.2 - Rilievi morfo-fenologici e quanti-qualitativi - annata 2017

Descrizione tesi	Produzione ton/Ha	Produzione ton/Ha al 15% di umidità	Umidità (%)	Peso ettolitrico (Kg/hL)	Peso 1000 semi (g)	Altezza pianta (cm)	Altezza inserzione e spiga (cm)	N° piante inclinate (> 45°)	N° piante stroncate (sotto spiga)	N° spighe con carbone (n°)
Irrigazione goccia restituzione 100 %	10,7 A	9,4 A	25,5 A	71,2 B	382,7 A	310,0 A	147,8 A	0,0	0,0	3,0
Irrigazione goccia restituzione 75 %	7,8 A	7,3 A	21,1 C	73,6 A	274,3 C	308,3 A	138,4 B	0,3	3,7	1,0
Irrigazione pioggia restituzione 100 %	12,1 A	10,8 A	24,1 A	75,9 A	368,8 A	323,2 A	149,1 A	0,7	2,0	0,0
Irrigazione pioggia restituzione 75 %	9,9 A	9,0 A	22,8 B	74,9 A	317,8 B	317,3 A	139,0 B	0,0	0,0	0,0
Test non irriguo	3,8 B	3,5 B	20,9 C	69,8 B	237,2 D	251,0 B	114,8 C	0,0	0,7	1,3
Media	8,8	8,0	22,9	73,1	316,2	302,0	137,8	0,2	1,3	1,1
CV (%)	15,64	15,74	3,32	1,36	5,83	3,10	2,75	258,20	171,15	99,07
Significanza	**	**	**	**	**	**	**	n.s.	n.s.	*

Risultati produttivi 2017

Il primo anno di prova è risultato scarsamente significativo per la valutazione dell'influenza della tecnica di irrigazione sulla sensibilità alle micotossine del mais, a causa dell'andamento climatico estremamente piovoso (287 mmm di acqua dalla semina alla raccolta del mais). Infatti la stagione produttiva è stata contraddistinta da numerose piogge, distribuite per tutto il periodo della prova e con intensità spesso importanti e con volumi irrigui al pari della portata di una irrigazione. Si segnala che a seguito degli eventi meteorici per il primo mese dalla semina non è stato necessario apportare nessuna irrigazione.

I dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi statistica al fine di valutare le possibili differenze quanti-qualitative legate all'effetto della tecnica irrigua e del grado di restituzione irrigua.

La produzione del mais nonostante la pioggia e le irrigazioni non è stata particolarmente elevata (produzione media 8,8 t/ha).

Le tesi irrigue hanno fornito maggiori rese produttive rispetto al test non irriguo, il quale ha fornito una produzione estremamente bassa (3,5 ton/ha). Mediamente le tesi irrigate a pioggia hanno fornito maggiori rese rispetto alle tesi irrigate a goccia. Nell'ambito della stessa tecnica irrigua, la restituzione 100% è risultata più produttiva rispetto alla restituzione 75%. Nel complesso l'elaborazione statistica ha evidenziato che le rese fornite dalle tesi irrigue sono comprese nel medesimo gruppo statistico (gruppo A), a fronte delle rese fornite dal test non irriguo (gruppo statistico B).

Riguardo le caratteristiche qualitative, si evidenzia che il test non irriguo ha prodotto granella piuttosto secca, con basso peso ettolitrico e peso dei 1000 semi; anche le tesi con restituzione 75% hanno fornito granella più secca, più piccola e con peso ettolitrico inferiore rispetto alle tesi con restituzione 100%.

Infine il volume irriguo ha influito sull'altezza della pianta e sull'altezza di inserzione della spiga. Le tesi irrigue innanzitutto hanno prodotto piante mediamente più alte (gruppo statistico A) rispetto alla tesi non irrigua (gruppo statistico B). Nell'ambito poi delle tesi irrigue, la restituzione 100% ha fornito piante più alte rispetto alla restituzione 75%. Anche l'altezza di inserzione della spiga è risultata più alta nelle tesi 100%, rispetto alle tesi 75%, significativa anche dal punto di vista statistico.

Segnaliamo anche un numero di spighe con carbone statisticamente rilevante nella tesi goccia 100% e 75% e nel test non irriguo; nessuna spiga con carbone nelle tesi irrigate a pioggia.

Descrizione attività anno 2018

Nell'annata 2018 la prova agronomica è stata ripetuta adottando il medesimo protocollo sperimentale.

Si allega schema sperimentale di campo, sostanzialmente molto simile a quello adottato nel 2017:

Fig. 4.2 - Schema di campo realizzato nel 2018

Aspersione 100%		
Aspersione 75%		
Non irrigato		
Non irrigato	Microirrigazione 75%	Microirrigazione 100%

La semina è stata effettuata il 21 maggio 2018 ed ai fini di una migliore comparazione dei risultati tra le due annate è stato scelto il medesimo ibrido (DKC6752 classe FAO 600, medio-tardivo con 121-131 giorni indicativi di maturazione).

Al raggiungimento dello stadio 6° foglia (28 giugno 2018) è iniziata l'irrigazione differenziata secondo le indicazioni fornite dal modello Irriframe.

Nella tabella 4.3 il dettaglio delle irrigazioni effettuate e le precipitazioni verificatesi durante il ciclo colturale dell'annata 2018.

Tab. 4.3 - Precipitazioni ed Interventi irrigui effettuati nel 2018

Data	Descrizione	Volume irriguo (mm)					Precipitazioni (mm)	Note
		Pioggia a 100%	Pioggia a 75%	Gocci a 100%	Gocci a 75%	Test non irriguo		
21/05/2018	Semina/precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,4	
22/05/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	22,6	
23/05/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,6	
28/05/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	16,6	
30/05/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	
31/05/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,7	
04/06/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,8	
06/06/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,1	
07/06/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,7	
08/06/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,9	
12/06/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,7	
13/06/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	
19/06/2018	Irrigazione	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	0,0	
24/06/2018	Irrigazione	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	0,0	
28/06/2018	Irrigazione	27,0	20,0	19,0	14,3	0,0	0,0	inizio irrigazione differenziata
03/07/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,4	
04/07/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	
05/07/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	
05/07/2018	Irrigazione	0,0	0,0	21,4	16,0	0,0	0,0	
10/07/2018	Irrigazione/precipitazione	0,0	0,0	19,0	14,3	0,0	10,8	
11/07/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	
14/07/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	
16/07/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	46,2	
21/07/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1	
23/07/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	
28/07/2018	Irrigazione	33,0	25,0	28,6	21,4	0,0	0,0	
02/08/2018	Irrigazione	25,0	19,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
04/08/2018	Irrigazione	0,0	0,0	23,8	17,9	0,0	0,0	
07/08/2018	Irrigazione	38,0	29,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ultima irrigazione a pioggia
08/08/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	
09/08/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	18,7	
14/08/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
17/08/2018	Irrigazione	0,0	0,0	28,6	21,4	0,0	5,5	ultima irrigazione a goccia
25/08/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,9	
01/09/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	
02/09/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	
03/09/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	
07/09/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	
17/09/2018	Precipitazione	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	
29/09/2018	Raccolta	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Totale		173,0	143,0	190,4	155,3	50,0	234,0	
Totale dopo differenziazione		123,0	93,0	140,4	105,3	0,0	119,5	

Come deciso durante l'incontro di coordinamento tenutosi nel marzo 2018, si è aumentato, rispetto al 2017, il numero di aree di saggio per parcellone (da 3 a 4), per un totale di 24 parcelle elementari, e la superficie di ciascuna area (da 7,5 m² a 9,6 m²).

I tecnici di Stuard, il 26 e 27 settembre 2018, hanno eseguito, in ciascuna area di saggio, gli stessi rilievi pre-raccolta effettuati l'anno precedente e previsti dal piano operativo.

Il 28 settembre 2018 si è effettuata la raccolta manuale delle spighe presenti in ciascuna area di saggio. Successivamente le spighe sono state sgranate e sulla granella ottenuta si sono effettuati i rilievi quanti-qualitativi previsti (come nel 2017).

Anche nel 2018 un campione di granella proveniente da ciascuna area di saggio è stato consegnato all'Università Cattolica di Piacenza dove sono state eseguite le analisi delle micotossine previste dal piano.

I dati rilevati nelle aree di saggio all'interno delle parcelle sperimentali sono stati elaborati e riportati in **tabella 4.4**.

Tab. 4.4 - Rilievi morfo-fisiologici e produttivi quanti-qualitativi - annata 2018

Descrizione tesi	Produzione ton/Ha	Produzione ton/Ha al 15% di umidità	Umidità (%)	Peso ettolitrico (Kg/hL)	Peso 1000 semi (g)	Altezza pianta (cm)	Altezza inserzione spiga (cm)	N° piante inclinate (> 45°)	N° piante stroncate (sotto spiga)	N° spighe con carboni
Irrigazione goccia restituzione 100 %	19,0	16,5	26,8 A	69,7 B	414,8 A	341,0 A	152,5 A	11,8	14,8	2,0
Irrigazione goccia restituzione 75 %	17,0	15,0	25,7 A	71,1 B	404,7 A	336,9 A	147,1 A	3,8	9,3	1,5
Irrigazione pioggia restituzione 100 %	13,9	12,7	23,0 B	73,0 A	367,5 B	331,3 A	157,6 A	4,8	8,5	2,3
Irrigazione pioggia restituzione 75 %	14,9	13,6	23,0 B	72,5 A	335,8 B	331,2 A	153,3 A	10,8	19,5	1,8
Test non irriguo	14,2	12,9	23,5 B	71,1 B	337,3 B	314,8 B	137,1 B	3,3	12,8	1,8
Media	15,8	14,2	24,4	71,5	372,0	331,1	149,5	6,9	13,0	1,9
CV (%)	21,06	20,95	4,04	1,80	5,48	1,76	4,54	93,70	47,44	—
Significanza	n.s.	n.s.	**	*	**	**	**	n.s.	n.s.	—

Risultati produttivi 2018

Anche il secondo anno di prova è risultato essere poco significativo per la valutazione dell'influenza della tecnica di irrigazione sulla sensibilità alle micotossine del mais, a causa dell'andamento climatico estremamente piovoso (234 mm di acqua dalla semina alla raccolta del mais). La stagione produttiva è stata contraddistinta piogge distribuite per tutto il periodo della prova e con volumi irrigui elevati.

I dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi statistica con il programma M-STATC al fine di valutare le possibili differenze quanti-qualitative legate all'effetto della tecnica irrigua e del grado di restituzione irrigua (0 % EVT, 75% EVT, 100% EVT).

Nel 2018 la produzione del mais grazie alla pioggia e alle irrigazioni è stata buona (produzione media 14,16 t/ha); anche la tesi non irrigua ha fornito rese estremamente elevate (12,95 t/ha) molto vicine a quelle fornite dalle tesi irrigate a pioggia e a goccia con aspersione. L'analisi della varianza ha evidenziato complessivamente nessuna differenza statisticamente significativa tra le tesi irrigue a livello di produzione di granella, anche se le più produttive sono risultate quelle irrigate a goccia (100% e 75%).

A livello qualitativo, le tesi irrigate a pioggia hanno prodotto granella più secca e con peso ettolitrico più elevato, rispetto alle tesi a goccia e al test non irriguo. Le tesi a goccia hanno prodotto della granella con pms più elevato e con una maggiore quota di umidità.

L'irrigazione ha influenzato anche lo sviluppo vegetativo della pianta, con piante più alte nelle tesi irrigue rispetto alla tesi non irrigua; stesso risultato per l'altezza di inserzione della spiga, significativamente più elevata nelle tesi irrigate.

Considerazioni sul contenuto di micotossine

La sintesi dei risultati sul tenore di micotossine nella granella è riportata nella **tabella 4.5** ed esposta graficamente in **fig. 4.3**.

In generale la contaminazione da micotossine è risultata differente nelle due annate di studio. Mentre la presenza delle Aflatossine B1 è stata simile nei 2 anni, la contaminazione da Fumonisine è risultata significativamente più bassa nel 2017 (573,9 µg/Kg) rispetto al 2018 (4932,1 µg/Kg).

L'andamento stagionale, come precedentemente descritto a commento delle prove agronomiche, dei due anni non è risultato particolarmente significativo per la valutazione dell'influenza della tecnica di irrigazione sulla sensibilità alle micotossine del mais.

Risulta comunque evidente l'influenza dell'irrigazione sulla presenza dell'aflatossina B1 nella granella. Le piante sottoposte a stress idrico (tesi non irrigata) manifestano una presenza statisticamente più elevata di aflatossina B1 rispetto alle tesi irrigate col metodo ad aspersione o microirrigazione, non differenti fra loro. Relativamente ai volumi di acqua, all'aumentare dei volumi distribuiti, vicino alla % di EVT, diminuisce la contaminazione nella granella, ma non in modo significativo; infatti, solo il testimone non irrigato si differenzia significativamente.

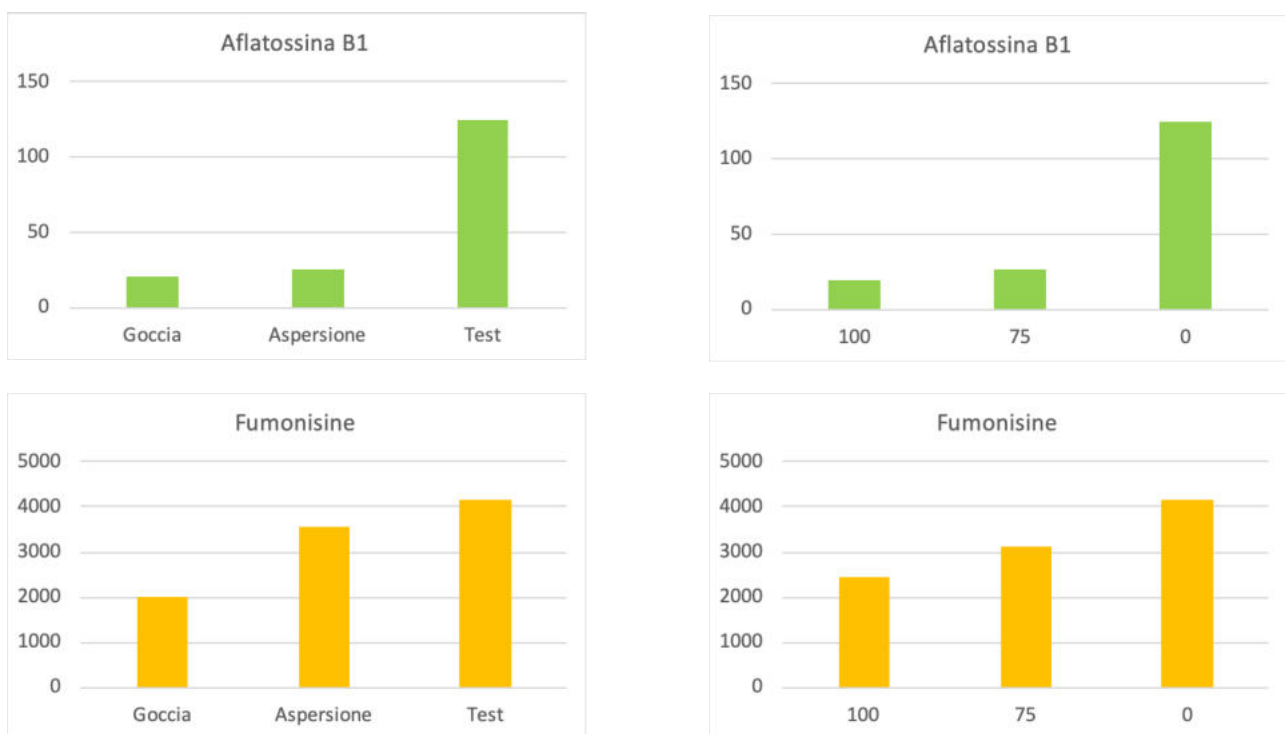
Le differenze significative osservate per l'aflatossina B1 non sono state confermate per le fumonisine. Anche per queste tossine la contaminazione più elevata è stata comunque registrata per il testimone non irrigato. E' risultata invece significativa la differenza tra i 2 anni, con una contaminazione nel 2018 significativamente più elevata rispetto al 2017.

Tab. 4.5 - Contaminazione da aflatossina B1 e fumonisine B1+B2 nei campioni di granella di mais raccolti nelle prove di irrigazione.

	Aflatossina B1		Fumonisine totali	
TIPO				
Goccia	20.69	b	2021.6	
Aspersione	25.19	b	3552.2	
Test	125.21	a	4173.8	
DOSE				
100	19.28	b	2433.8	
75	26.59	b	3140.1	

0	125.21	a	4173.7	
Anno				
2017	36.7		573.9	b
2018	48.4		4932.1	a

Fig. 4.3 - Contaminazione da aflatossina B1 e fumonisine B1+B2 nei campioni di granella di mais raccolti nelle prove di irrigazione.



Alla luce dei risultati emersi da questa sperimentazione, risulta importante sottolineare la fondamentale criticità della durata della ricerca, risultata troppo breve o per lo meno non sufficientemente lunga. Infatti tali valutazioni dovrebbero essere effettuate con prove della durata di più anni ed in più località in modo da ottenere una maggiore variabilità delle condizioni naturali di disponibilità idrica.

Ciononostante, per la riduzione della contaminazione da aflatossine si è confermata determinante l'influenza dell'irrigazione, al fine di non porre le piante in condizioni di stress vegetativo, anche in un'annata come il 2018, con una piovosità abbastanza ben distribuita durante il periodo culturale.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità Evidenziate

Il grado di raggiungimento degli obiettivi è completo. Non si segnalano scostamenti o particolari criticità.

AZIONE 3.5 – Integrazione filiera cerealicola e filiera biogas: micotossine e prodotti conformi per biodigestori

3.5.1 Attività e risultati

Unità aziendale responsabile (Uar): C.R.P.A. e GCI

Descrizione attività

FASE 1 – Definizione delle caratteristiche merceologiche e qualitative del “prodotto ad uso energetico”.

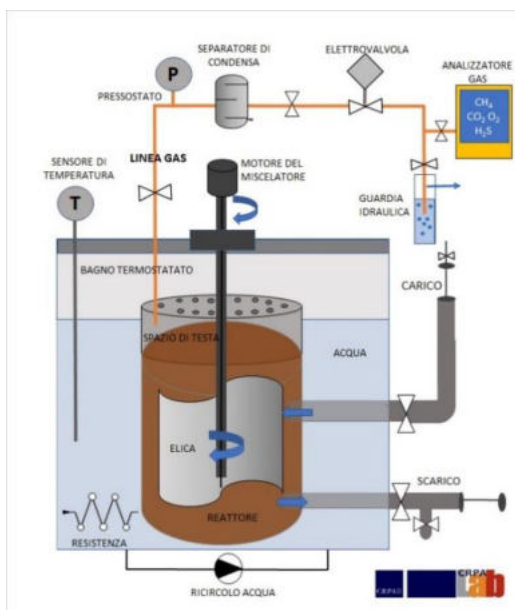
Linea 1. La sperimentazione ha avuto come **obiettivo** quello di verificare eventuali effetti inibenti delle aflatossine sulla corretta funzionalità del processo di digestione anaerobica, le conseguenze sul processo biologico e sulla loro eventuale degradazione/inattivazione, verificandone il livello di abbattimento rispetto alla concentrazione iniziale.

GCI ha supportato C.R.P.A. nell’individuazione del Centro di stoccaggio ove campionare i lotti di granturco al verde in entrata e a predisporre il protocollo operativo per la raccolta di campioni con elevate contaminazione da aflatossine da avviare alla digestione anaerobica.

Nel 2017, a partire dal mese di agosto, sono stati campionati a cadenza giornaliera partite di granturco al verde che presentavano elevata fluorescenza alla lampada UV in modo da individuare partite fortemente contaminate da aflatossine. Sono stati ottenuti 30 campioni di granturco, individuati tra ibridi a maturazione precoce, media e tardiva. Tali campioni sono poi stati ritirati dal C.R.P.A. per le determinazioni previste dal protocollo operativo.

Lo studio del comportamento delle aflatossine durante il processo di digestione anaerobica e il loro eventuale accumulo nel digestato è stato condotto mediante lo svolgimento di una sperimentazione con l'impianto pilota realizzato da CRPA Lab con alimentazione in continuo, CSTR, costituito da minidigestori in acciaio di 23 dm³ di volume, miscelati e riscaldati, che simula un impianto di biogas in scala reale.

Figura 5.1- Schema del reattore pilota per i test di digestione anaerobica



In questa attività è stata utilizzata granella di mais “non conforme” all’alimentazione umana e animale, con concentrazione di aflatossina **AFB₁** pari a **942 µg/kg**. Oltre alla farina (10%), la miscela di carico era costituita da liquame bovino (45%) e silomais (45%), replicata tre volte e utilizzata per alimentare 3 reattori anaerobici; in parallelo è stato allestito un quarto reattore con funzione di controllo, alimentato con la stessa miscela, ma utilizzando una farina con contenuto trascurabile di aflatossina, **AFB₁**= 21 µg/kg. Il test ha avuto una durata di 11 settimane. Il digestato estratto da ciascuna tesi è stato raccolto settimanalmente ed un campione medio è stato analizzato per i parametri di solidi totali e solidi volatili per effettuare anche i bilanci di massa. Nelle ultime quattro settimane di prova la concentrazione di aflatossina (**AFB₁** e **AFB₂**, **AFG₁** e **AFG₂**) è stata misurata nel digestato. Al fine di controllare l’andamento del processo biologico, sono stati analizzati periodicamente i parametri di monitoraggio del processo biologico su campioni di digestato giornalieri (acidità, alcalinità, pH).

Sulla base di tutti i dati raccolti durante il monitoraggio si è proceduto al calcolo delle rese specifiche in biogas/metano della miscela caricata per ciascuna tesi. I risultati riportati in

Tabella 5.1 sono le medie delle produzioni specifiche calcolate, escludendo il periodo di avviamento, dal giorno 20 al giorno 74.

Tabella 5.1 - Rese specifiche in biogas e metano di ciascuna tesi (miscela) escluso la fase di avvio nel periodo di sperimentazione.

	Rese in biogas	Rese in metano	Metano
	[Nm ³ /t SV]	[Nm ³ /t SV]	[%]
Tesi contaminata – Replica 1	677,9	360,6	53,2

Tesi contaminata – Replica 2	613,3	326,8	53,3
Tesi contaminata – Replica 3	671,1	357,7	53,3
Media	652,4	349,4	53,6
Dev.st	14,1	0,6	22,7
Tesi controllo	625,7	340,4	54,4

La concentrazione di aflatoossina B₁ trovata nei digestati è riportata in **figura 5.2**, dove la quantità misurata della tossina nei campionamenti delle ultime 4 settimane (ovvero 43 giorni dall'inizio della sperimentazione, pari a un tempo di ritenzione idraulica) è stata confrontata con quella attesa, risultante dalla somma del contenuto di tossina alimentata con i substrati.

Il livello atteso di AFB₁ nel digestato nell'ultima fase del processo, in media per le tre repliche con alta contaminazione è nettamente superiore a quello misurato (475-627 µg/kg vs 31-51 µg/kg).

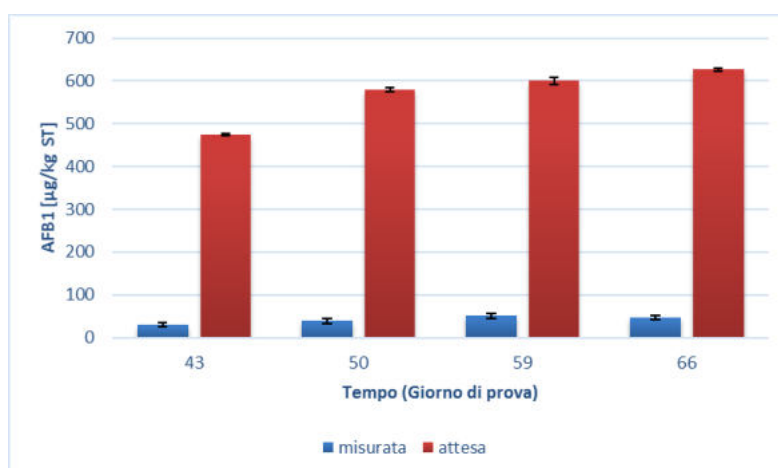


Figura 5.2 - Confronto tra concentrazione media attesa e concentrazione media misurata di AFB₁ nei digestati (i valori sono riferiti ai solidi totali del digestato).

Dal bilancio di massa complessivo (aflatoossina IN e OUT dal reattore) si è calcolata la riduzione percentuale della tossina per ciascuna tesi, riportata in **tabella 5.2** i risultati mostrano una chiara riduzione della AFB₁ in tutte le tesi, con valori medi del 90% del peso totale di AFB₁ avviata a digestione anaerobica.

Tabella 5.2- Riduzione percentuale della AFB₁ ottenuto dal bilancio delle tossine in entrata e uscita dai digestori

	Tesi - Farina contaminata				Tesi controllo
	R1	R2	R3	Media	-
Riduzione AFB₁	89,1%	90,9%	91,1%	90,3 ± 1,1%	89,9%

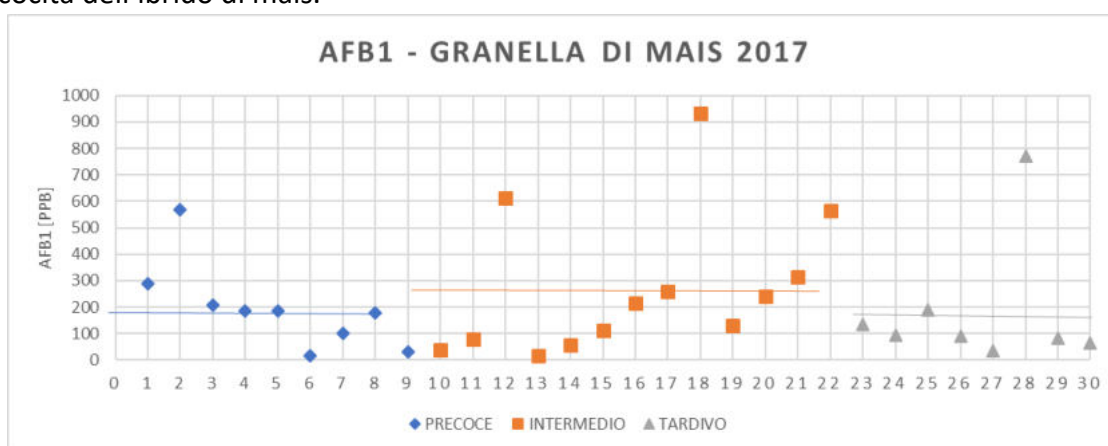
I risultati di tale attività sono riportati negli abstract del VI CONGRESSO NAZIONALE MICOTOSSINE E TOSSINE VEGETALI, organizzato dall'ISS, svolto a Roma in giugno e che saranno pubblicati a ottobre 2019 nei Rapporti ISTISAN 2019.

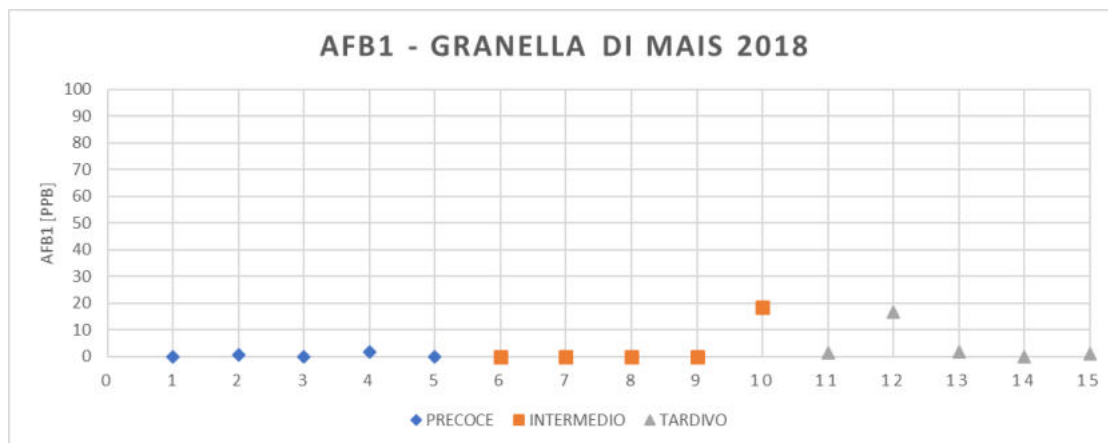
Linea 2. La definizione dello studio delle caratteristiche merceologiche e qualitative del prodotto, attraverso il campionamento di partite in entrata presso il Centro di stoccaggio, è stata determinata tramite campionamenti effettuati, per ciascuna delle due annate agrarie, al conferimento della granella ancora verde solo sulle partite, provenienti da ibridi precoci, medi e tardivi, che evidenziavano elevata fluorescenza alla lampada UV e quindi, caratterizzati potenzialmente da alte contaminazione da aflatoSSine.

La GCI ha effettuato la raccolta di n. 15 campioni di granturco verde in entrata presso il Centro di stoccaggio di C.A.P.A. Cologna suddivisi per epoca di raccolta: precoce, media e tardiva. I campioni sono poi stati ritirati dal C.R.P.A. per le determinazioni previste dal protocollo operativo.

La GCI ha supportato il CRPA nell'individuazione del Centro di stoccaggio ove campionare i lotti di granturco verde in entrata e a predisporre il protocollo operativo per la raccolta di campioni. Dai risultati delle analisi dei campioni recuperati nella prima annualità (**figura 5.3**) è emersa la presenza di alte concentrazioni di AFB₁ in diverse granelle, con valori massimi anche superiori a 900 ppb. La contaminazione era presente in tutti i 30 campioni analizzati con un valore medio di AFB₁ di 217 ppb. Nella seconda annualità invece la contaminazione è stata pressoché nulla (<0,05 ppb) in quasi tutti i campioni. Il valore più alto riscontrato di AFB₁ è stato di 18 ppb. Nella prima annualità la raccolta intermedia ha riscontrato la contaminazione più alta, con un valore medio di AFB₁ di 275 ppb, maggiore del 40% rispetto alla contaminazione media dei campioni raccolti nella fase precoce e del 50% rispetto alla fase tardiva.

Figura 5.3 – Valori di aflatoSSina dei campioni ad alto rischi di contaminazione suddivisi per classe di precocità dell'ibrido di mais.





FASE 2 – Definizione del percorso formale da applicare ai “lotti ad uso energetico”.

Linea 3. E' continuata la partecipazione alle attività e agli incontri del gruppo di lavoro regionale sul tema micotossine per la definizione della Circolare dei Direttori Generali Agricoltura, Ambiente, Sanità “Chiarimenti in merito all’utilizzo ad uso energetico del mais contaminato da aflatossine nella digestione anaerobica” e del Protocollo di intesa “Linee guida per un piano di autocontrollo aziendale dalla fase di raccolta alla vendita post stoccaggio del granturco ad uso alimentare (feed e food) finalizzato alla gestione del rischio contaminazione da aflatossine e alla corretta gestione del prodotto non conforme” per la campagna 2018 e 2019, relativa in particolare al percorso dei lotti oltre i limiti di legge per l’uso alimentare e il loro percorso successivo ai biodigestori. Nello svolgimento di tale attività ci si è ricordati e confrontati anche con gli organismi e associazioni nazionali, in particolare Istituto Superiore di Sanità (ISS), Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e Consorzio Italiano Biogas (CIB) con cui si era già attivato un confronto in occasione del progetto di ricerca regionale LR 28/98 2013 “Biogas_micotossine_clostridi”. A tal fine si è anche partecipato, presentando un poster con i risultati del GOI MICOntrollo, al convegno organizzato a Roma dallo stesso ISS “VI CONGRESSO NAZIONALE MICOTOSSINE E TOSSINE VEGETALI” nel mese di Giugno 2019 e al seminario "Mais: la cooperazione incontra la ricerca. Una giornata di approfondimento e confronto", Confcooperative Emilia Romagna, Bologna 15 Marzo 2017.

Linea 4. In raccordo con il C.I.C.A di Bologna è stato condotto lo studio sul percorso formale da applicare ai lotti di granelle di cereali ad “uso energetico”; si è analizzata e sintetizzata la normativa sul digestato a livello nazionale e regionale ed i protocolli di intesa regionali degli ultimi anni, sulla gestione del rischio di contaminazione da aflatossine. Sono stati prodotti due documenti, uno “Definizione del percorso formale da applicare ai lotti ad uso energetico” (**Allegato 1 - CRPA_CICA_Azione 3.5**), datato Ottobre 2017 e un altro “Documento integrativo a supporto del quadro normativo che regola l’utilizzo agronomico del digestato a livello regionale” (**Allegato 2 - CRPA_CICA_Azione 3.5**), datato Aprile 2019.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità Evidenziate

Le attività sono procedute come da programma. CRPA, insieme a Grandi Colture Italiane (GCI) e agli stoccatore ha valutato la difficoltà organizzativa nel procedere, come previsto nel programma, nell'analisi delle modalità gestionali ed organizzative di tre aziende agricole che conferiscono mais e nell'ottenere per ciascuna di esse, campioni di granella fortemente contaminati da aflatossine valutati tramite kit-immunoenzimatici in fase di ricezione. Quindi, in accordo con gli altri partner, si è proceduto alla definizione dello studio delle caratteristiche merceologiche e qualitative del prodotto attraverso il campionamento di partite in entrata presso il Centro di stoccaggio. In particolare i campionamenti sono stati effettuati, per ciascuna annata agraria, al conferimento della granella ancora verde su partite provenienti da ibridi precoci, medi e tardivi valutati in fase di ricezione ad alto rischio di contaminazione tramite lampada UV.

La procedura di raccolta e campionamento delle granelle è rimasta invariata rispetto a quanto previsto nel progetto e non si sono riscontrate variazioni nel numero di campioni e di analisi e quindi nei costi previsti nell'azione 5. I campionamenti di granella che non si sono potuti effettuare nell'annata agraria 2016 sono stati recuperati nell'annata agraria 2017 (30 campioni); nell'annata 2018 sono stati effettuati 15 campioni.

3.6.1 Personale

Cognome e nome	Unità aziendale	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo
	UCSC-PC	Professore associato	Responsabile scientifico	818	39.466,76
	UCSC-PC	Professore associato	Responsabile analisi di laboratorio	531	30.500,64
	UCSC-PC	Ricercatore	Partecipa alla sperimentazione	367	10.815,49
	UCSC-PC	Assegnista	Partecipa alla sperimentazione	1.537	21.726,01
	UCSC-PC	Assegnista	Partecipa alla sperimentazione	2.233	28.039,30
	UCSC-PC	Assegnista	Partecipa alla sperimentazione	1.722	23.789,64
Totale UCSC-PC					154.337,84
Cognome e nome	Unità aziendale	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo (€)
	CRPA	Tecnico	Input ed elaborazione dati	240	5.720,00
	CRPA	Tecnico	Prelievo campioni e rilievo dati	251	6.879,57
	CRPA	Tecnico	Analisi di laboratorio	255	6.378,34
	CRPA	Ricercatore	Coordinamento e supervisione attività	206	9.257,96
	CRPA	Ricercatore	Gestione aspetti formali e normativi uso energetico cereali	120	4.755,12
	CRPA	Ricercatore	Gestione test digestione anaerobica	421	11.090,69
Totale CRPA					44.081,68
	GCI	Quadro	Partecipa alle sperimentazioni	485	23.637,92
Totale GCI					23.637,92
	Az.Agr.Stuard	Tecnico sperimentatore	Imposta ed esegue rilievi	308	9.105,52
	Az.Agr.Stuard	Operaio	Esegue le prove	398	6.192,18
	Az.Agr.Stuard	Operaio	Esegue le prove	86	1.188,52
	Az.Agr.Stuard	Tecnico sperimentatore	Esegue i rilievi	232	4.011,28
Totale Az.Agr.Sperim. Stuard					20.497,50
Totale:					242.554,94

3.6.2 Trasferte

Cognome e nome	Descrizione	Costo (€)
	n. 34 missioni (2017) e n. 43 (2018) per coordinamento e attività nelle azioni 3.1, 3.2 e 3.3	2.244,39

		Totale GCI	2.244,39
	30.06.19: Partecipazione a incontro della Consulta Agricola Regionale		59,00
	12.07.17: Partecipazione all'incontro del Gruppo di lavoro regionale sulle micotossine		60,20
	2.08.17: Incontro tecnico		79,70
	29.11.17: Riunione progetto e trasporto campioni		67,82
	13.12.17: Trasporto campioni al laboratorio per analisi		65,83
	9.05.18: Collaudo primo stato avanzamento progetto		62,55
	8.03.19: Partecipazione a workshop		73,86
	6.06.19: Partecipazione incontro finale di progetto		20,30
	6.06.19: Partecipazione e relazione all'incontro tecnico finale di Micontrollo		24,80
	11-12.06.19: Partecipazione VI Congresso Nazionale sulle micotossine e tossine vegetali		155,30
	11-12.06.19: Quota di anticipo Iscrizione VI Congresso Nazionale sulle micotossine e tossine vegetali		250,00
	11-12.06.19: Quota a saldo Iscrizione VI Congresso Nazionale sulle micotossine e tossine vegetali		120,00
	11-12.06.19: Biglietti treno Partecipazione VI Congresso Nazionale sulle micotossine e tossine vegetali		102,90
		Totale CRPA	1.142,26
		Totale:	3.386,65

3.6.3 Collaborazioni, consulenze, altri servizi

CONSULENZE – SOCIETÀ

Azione 3.5 - CRPA

Ragione sociale della società di consulenza	Importo contratto	Attività realizzate / ruolo nel progetto	Costo
Instruments Lab Control	1.504,01	Materiale per laboratorio analisi chimiche	€1.504,01
Instruments Lab Control	690,30	Materiale per laboratorio analisi chimiche	€690,30
C.I.C.A. Bologna	8.000,00	Collaborazione nella definizione del percorso formale da applicare ai lotti di granelle di cereali "ad uso energetico" - 1 rata	€4.000,00
C.I.C.A. Bologna	8.000,00	Collaborazione nella definizione del percorso formale da applicare ai lotti di granelle di cereali "ad uso energetico" - 2 rata	€4.000,00
Totale:			10.194,31

AZIONE 4 – Piano divulgazione di trasferimento dei risultati e implementazione della rete PEI

4.1 Attività e risultati

Unità aziendale responsabile (Uar): CRPV

Descrizione attività

In accordo con i partner del GO, il personale CRPV ha organizzato e gestito le iniziative e azioni di diffusione che sono descritte di seguito (in grigio sono riportate le iniziative già rendicontate nel primo stralcio).

Pubblicazioni

1. Il biocontrollo di *Aspergillus flavus* (poster convegno del 9/2/17 – “Biocontrollo di *Aspergillus flavus* e gestione della filiera, un futuro per maiscoltura e latte italiano di qualità”. Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza).
2. C. Selmi, R. Canestrone. Innovazione in campo contro le micotossine (Agricoltura n. 5-6/17).
3. Poster di presentazione del progetto: Workshop organizzato da Rete Rurale Nazionale-MIPAF, 22 maggio 2018, Mestre (VE).
4. P. Battilani, C. Selmi. Cerealcoltura, strategie contro il rischio micotossine. *Ecoscienza*, rivista di Arpa, 5/18.
5. Soldano M., Piccinini S., Gallucci F., Fabbri C., 2019. Studio del comportamento del mais contaminato da aflatossine in digestione anaerobica. Atti del VI Congresso Nazionale Micotossine e Tossine Vegetali nella filiera agro-alimentare. ISS, Roma, 10-12 giugno 2019.

Visite guidate

1. 24/5/18 – Visita ai campi dimostrativi di grano tenero e duro. Via Cà Nova 5, Località Albersano di Serravalle (FE).
2. 11/7/18 – Visita al campo di impiego di bio-competitori per la riduzione delle aflatossine su mais. Azienda Agricola Linea Verde, via Piumana, Ambrogio di Copparo (FE).
3. 17/7/18 – Visita al campo di impiego di bio-competitori per la riduzione delle aflatossine su mais. Azienda Agricola Agro, via Vallalbana, Corlo di Ferrara (FE).
4. 26/7/18 – Visita al campo di impiego di bio-competitori per la riduzione delle aflatossine su mais. Azienda Agricola Linea Verde, via Piumana, Ambrogio di Copparo (FE).
5. 2/8/18 – Visita al campo di impiego di bio-competitori per la riduzione delle aflatossine su mais. Azienda Agricola Mantovani, via Cà Matte, Saletta di Copparo (FE).
6. 29/8/18 - Visita al campo di influenza della tecnica di irrigazione sulla sensibilità del mais alle micotossine. Azienda Agraria Sperimentale Stuard, S.Pancrazio di Parma.

Incontri tecnici/convegni

1. 9/2/17 – Convegno “Biocontrollo di *Aspergillus flavus* e gestione della filiera, un futuro per maiscoltura e latte italiano di qualità”. Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza.
2. 24/5/18 – Presentazione del Progetto "Micotossine dei cereali: strategie di controllo e integrazione di filiera per uso energetico". Giornata presso campo dimostrativo di grano tenero e duro. Via Cà Nova 5, Località Albersano di Serravalle (FE).
3. 11/7/18 – Presentazione primi risultati del Progetto "Micotossine dei cereali: strategie di controllo e integrazione di filiera per uso energetico". Azienda Agricola Linea Verde, via Piumana, Ambrogio di Copparo (FE).
4. 17/7/18 – Presentazione primi risultati del Progetto "Micotossine dei cereali: strategie di controllo e integrazione di filiera per uso energetico". Azienda Agricola Agro, via Vallalbana, Corlo di Ferrara (FE).
5. 26/7/18 – Presentazione primi risultati del Progetto "Micotossine dei cereali: strategie di controllo e integrazione di filiera per uso energetico". Azienda Agricola Linea Verde, via Piumana, Ambrogio di Copparo (FE).
6. 2/8/18 – Presentazione primi risultati del Progetto "Micotossine dei cereali: strategie di controllo e integrazione di filiera per uso energetico". Azienda Agricola Mantovani, via Cà Matte, Saletta di Copparo (FE).
7. 29/8/18 - Presentazione primi risultati del Progetto "Micotossine dei cereali: strategie di controllo e integrazione di filiera per uso energetico". Azienda Agraria Sperimentale Stuard, S. Pancrazio di Parma.
8. 8/3/19 – Convegno “Il contributo della ricerca per la gestione delle micotossine nella filiera mais”. Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza.
9. 6/6/19 – Il Gruppo Operativo MICOntrollo (Micotossine dei cereali): i risultati conclusivi. Bologna, viale della Fiera 8 presso Regione Emilia-Romagna.
10. 10-12/6/19 - Presentazione poster sui risultati del comportamento del mais contaminato da aflatossine in digestione anaerobica al VI Congresso Nazionale Micotossine e Tossine Vegetali nella filiera agro-alimentare. ISS, Roma, 10-12 giugno 2019.

Audiovisivi

1. [Presentazione Progetto](#)
2. [Interviste sui risultati conclusivi del GOI](#)

Tutta la documentazione relativa alle locandine prodotte e diffuse ed i fogli firma registrati in occasione delle diverse iniziative sopra riportate, nonché copia degli articoli sono disponibili presso il CRPV e verranno allegati alla rendicontazione di fine progetto.

Il CRPV ha messo a disposizione del Gruppo Operativo il proprio Portale Internet, affinché le attività ed i risultati conseguiti nel presente Piano siano facilmente identificabili e fruibili dall'utenza. All'interno del portale CRPV è stata individuata una pagina dedicata al Piano, composta da una testata e da un dettaglio dove sono stati caricati tutti i dati essenziali del progetto. Inoltre attraverso un contatto continuo con il Responsabile di Progetto, un referente CRPV ha proceduto all'aggiornamento della pagina con il materiale divulgativo ottenuto

nell'ambito del Piano. Tale materiale divulgativo è visionabile anche attraverso l'app android CRPV PEI regolarmente scaricabile dal Play Store.

L'audiovisivo realizzato nel corso dell'incontro tecnico conclusivo è stato realizzato con interviste e immagini originali e ha riguardato i principali risultati emersi nel corso dell'iniziativa. Grazie ad un rapporto consolidato di CRPV con una serie di emittenti che producono trasmissioni televisive a carattere agroalimentare, i servizi vanno in onda sull'intero territorio regionale. L'audiovisivo è stato inoltre pubblicato sul portale CRPV, nonché su un canale dedicato della piattaforma Youtube dove potranno anche essere condivisi da altri utenti moltiplicando le possibilità di visualizzazione. Al termine dell'incontro tecnico conclusivo, tenutosi il 6/6/19 a Bologna presso la Regione Emilia-Romagna, si è tenuto, alla presenza dei rappresentanti dei partner del GOI e del mondo produttivo, un campus cloud, al fine di favorire l'interscambio di conoscenze tra esperti e settore agricolo.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità Evidenziate

Il grado di raggiungimento degli obiettivi è completo. Non si segnalano scostamenti, se non migliorativi rispetto a quanto previsto, o particolari criticità.

4.2 Personale

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo
	impiegato	Tecnico di progetto	28	517,44
	impiegato	Responsabile di progetto	548	15.300,42
	impiegato	Tecnico di progetto	91,5	1.935,23
	impiegato	Diffusione	88	2.204,96
	impiegato	Segreteria	179	4.411,17
	impiegato	Diffusione	20	954,92
			Totale:	25.324,14

AZIONE 5 – Attività di formazione

5.1 Attività e risultati

Unità aziendale responsabile (Uar): CRPV

Descrizione attività

E' stato svolto un seminario (ID proposta 5005343) di 8 ore con 5 partecipanti, afferenti a Grandi Colture Italiane e Az. Agr. Sperim. Stuard, per una spesa complessiva di 990,40 euro.

Il seminario ha affrontato la problematica delle micotossine dei cereali con particolare riguardo alle tecniche di prevenzione e controllo in campo e post-raccolta e all'impiego di mais contaminato oltre i limiti di legge per utilizzo zootecnico e alimentare nei biodigestori anaerobici. A tal fine è stata preparata una dispensa didattica oggetto di discussione durante il seminario.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate.

Il grado di raggiungimento degli obiettivi è completo. Non si segnalano scostamenti o particolari criticità.

3 Criticità incontrate durante la realizzazione dell'attività

Criticità tecnico- scientifiche	Non si rilevano criticità significative nello svolgimento del Piano. Le sole complicanze incontrate hanno riguardato una variazione delle attività previste nell'Azione 3.5 a fronte della quale è stata intrapresa un'opportuna azione correttiva al fine di garantire che la variazione tecnica non compromettesse l'organicità e la funzionalità complessiva e non alterasse gli obiettivi del Piano.
Criticità gestionali	Non si segnalano criticità nella gestione del piano.
Criticità finanziarie	Non si segnalano criticità finanziarie.

4 Altre informazioni

Nessuna altra informazione viene integrata.

5 Considerazioni finali

Le attività previste nel Piano sono state condotte regolarmente e non si segnalano particolari scostamenti, se non in via migliorativa, da quanto previsto.

6 - Relazione tecnica

Azione 3.1 – Impiego di bio-competitori su mais per limitare l'infezione dei funghi aflatossigeni

L'obiettivo di questa azione è stato quello di approntare, nel 2017 e 2018, dei campi dimostrativi, che ponessero a diretto confronto le aree difese con il bio-competitore AF-X1 con analoghe superfici non trattate, nell'areale di riferimento di Grandi Colture Italiane (di seguito GCI).

La contaminazione da aflatossine in mais negli anni 2017 e 2018 non è stata particolarmente elevata nelle prove svolte. Il livello medio di contaminazione delle aziende è stato comunque sempre superiore a 5 µg/kg, pertanto ha permesso di evidenziare il significativo effetto del trattamento con AF-X1, rendendo il mais conforme ai limiti più restrittivi di contaminazione ammessa per l'uso alimentare. In particolare nel 2017 si è osservata un'ottima efficacia del

prodotto, ad esclusione di uno dei 4 campi, dove peraltro il livello di contaminazione era molto basso.

Il prodotto AF-X1 ha ottenuto, a partire dal 2015, autorizzazione temporanea di impiego, in attesa dell'autorizzazione definitiva che si auspica sia rilasciata nel 2020 (dossier presentato a marzo 2018). Ciò significa che il prodotto è disponibile per gli agricoltori e può essere distribuito, alla dose di 25 kg/ha, al momento con il limite di impiego ad uso zootecnico delle produzioni (limite che decadrà una volta autorizzato il prodotto in via definitiva).

Negli anni 2016 e 2017 il prodotto AF-X1 è stato distribuito su circa 15.000 ettari di mais nel nord Italia. Al conferimento nei centri di raccolta sono state eseguite analisi rapide, così come sul prodotto non trattato. I risultati sono stati particolarmente interessanti, soprattutto nel 2016, quando sono state analizzate circa 1.4 milioni di tonnellate di granella, di cui circa il 16% trattate con AF-X1. Infatti, nei campi trattati è stata ottenuta una riduzione media del 94% della contaminazione da aflatossine. In particolare, nei campi non trattati il 15% aveva contaminazione sopra 20 µg/kg, il 21% tra 3 e 20 µg/kg, e il 63% sotto 3 µg/kg, mentre in quelli trattati solo in un paio di casi sono state riscontrate contaminazioni superiori a 20 µg/kg, il 5% era tra 3 e 20 µg/kg, e il 95% sotto 3 µg/kg. Quindi, è sostanzialmente scomparso il mais non utilizzabile a scopo mangimistico mentre la quasi totalità della produzione era utilizzabile anche nel rispetto dei limiti più restrittivi. Nel 2017, annata con contaminazioni di minore entità, i risultati sono stati comunque buoni. Sono state analizzate circa 2.500 partite di mais, di cui il 14% trattate con AF-X1, ottenendo una riduzione media delle contaminazioni pari all'86%.

Sulla base delle prove dimostrative incluse in questo progetto e sui risultati ottenuti nell'impiego di pieno campo, si può concludere che in prospettiva AF-X1 sia uno strumento essenziale per avere una garanzia di sanità del mais nazionale, almeno riguardo alla contaminazione più pericolosa e più vincolante, ovvero la contaminazione da aflatossine.

Azione 3.2 – Sviluppo e validazione di un modello multitossina (aflatossine, fumonisine e DON) per la previsione della contaminazione in mais durante la stagione colturale e alla raccolta

Obiettivo di questa azione è stato quello di migliorare il modello attualmente in uso per la previsione del rischio aflatossine (AFLA-maize), costruire un nuovo modello congiunto per la previsione del rischio fumonisine e aflatossine e diffondere i risultati delle simulazioni attraverso dei bollettini di avvertimento, per le aflatossine e le fumonisine del mais e le fusariotossine del frumento (le ultimi due non previste dal piano).

Nel primo anno di progetto l'attenzione è stata focalizzata al miglioramento del modello AFLA-maize, nello specifico è stata migliorata la funzione che descrive il tasso di produzione di AFB₁ in funzione dell'attività dell'acqua (a_w) della granella.

A partire dal secondo anno, considerati i limiti sin qui emersi con l'impiego di modelli separati per fumonisine e aflatossine, l'attenzione si è focalizzata sull'acquisizione delle conoscenze sull'interazione di diversi funghi produttori di micotossine co-presenti in mais, ai fini di quantificare la produzione di micotossine in diverse condizioni ecologiche. Il risultato è stato il modello congiunto TOX-maize, che tiene conto del rapporto fra *A. flavus* e *F. verticillioides*, sviluppato e validato in via preliminare utilizzando alcuni campi selezionati.

I risultati della ricerca rappresentano il primo tentativo di spiegare la presenza di diversi funghi che producono micotossine nel mais in condizioni ambientali mutevoli. La co-presenza di diversi funghi tossigeni ha un effetto cruciale sulla produzione di micotossine oltre che sulla crescita dei funghi stessi. Questo aspetto ha acquisito importanza nell'attuale contesto di cambiamento climatico;

infatti, recentemente, è stato sottolineato come l'ampia variazione delle condizioni meteorologiche, tra e durante diversi anni, renda più frequente la copresenza di funghi micotossigeni e delle relative micotossine.

I risultati non sono ancora del tutto soddisfacenti, soprattutto per quanto riguarda le aflatossine. La creazione di un modello congiunto TOX-maize, ha richiesto un notevole sforzo di interpretazione delle interazioni che evidentemente necessita di ulteriori aggiornamenti. Avendo acquisito tutti i dati grezzi necessari, si ritiene comunque di poter raggiungere in tempi ragionevolmente brevi un risultato completamente soddisfacente.

Un interessante sviluppo per il futuro potrebbe essere la creazione di una piattaforma intuitiva e semplice per la disseminazione delle informazioni relative alle previsioni: l'efficienza della distribuzione delle informazioni è un aspetto su cui i ricercatori si stanno focalizzando. In futuro, un'infrastruttura informatica, a supporto dei modelli previsionali, dovrebbe facilitare la condivisione dei dati e l'accesso al pubblico e potrebbe permettere all'utente di calare le simulazioni sulla propria realtà aziendale.

Azione 3.3 – Impiego di metodiche analitiche rapide basate sull'utilizzo di biosensori (naso elettronico)

L'obiettivo di quest'azione era quello di sviluppare un protocollo per l'impiego di strumenti rapidi (naso elettronico) per la determinazione analitica, con approccio non distruttivo, della contaminazione da micotossine su frumento e mais.

A tal fine, ai dati raccolti nel triennio 2016-17-18 sono stati aggiunti i dati raccolti in precedenti annate agrarie, in particolare 2014 e 2015 (Progetto MYCO.PREV, L.R. 28/98), sia per frumento che per mais, con lo scopo di aumentare la sensibilità delle analisi statistiche applicate che necessitano di ampi set di dati per migliorare le performance.

Sul frumento tutti i sensori disponibili sono stati ritenuti importanti dall'analisi del discriminante per poter classificare correttamente i campioni sopra o sotto la soglia (1250 µg/Kg di DON). Invece, l'analisi di regressione logistica binaria non ha dato esito positivo con la soglia 1250 µg/Kg, essendoci solo 20 campioni su 214 contaminati oltre soglia.

Su mais sono stati raccolti in totale 243 campioni utili per l'analisi delle AFB1 e 195 per le FBs. L'analisi discriminante per AFB1 ha individuato che i sensori W2S, W1W, W3S e W6S sono risultati in grado di classificare correttamente sopra o sotto soglia (5 µg/Kg). È stata anche generata una funzione logistica binaria, per la classificazione dei campioni di mais in base al contenuto di AFB; in particolare attraverso questa equazione probabilistica è stato possibile classificare correttamente il 71% dei campioni. Invece, per quanto riguarda le FBs, i sensori riconosciuti dall'analisi discriminante come determinanti per la corretta classificazione dei campioni contaminati sopra o sotto soglia (4000 µg/Kg), sono stati W3S e W6S. Con l'approccio probabilistico dell'equazione logistica binaria sono stati classificati correttamente il 68% dei campioni.

Da queste esperienze, tale metodo analitico semi-quantitativo risulta promettente, sicuramente per campioni con elevata contaminazione da micotossine, che dovrebbero assicurare un maggiore potere discriminatorio dello strumento. È importante sottolineare la possibilità, ottenuta attraverso le metodologie statistiche adoperate, di avere individuato i sensori del naso elettronico che possono fornire una risposta discriminante per ciascuna tossina oggetto di studio, in

particolare per il mais, oltre alla possibilità di utilizzare due equazioni logistiche che sono state sviluppate in questo studio a scopo probabilistico.

Tuttavia, resta una criticità imposta da questo metodo relativamente al tempo richiesto, per il condizionamento del campione in fase di pre-analisi, all'interno del pallone, attualmente fissato ad un'ora. Il tempo di attesa di circa un'ora non è compatibile con l'impiego di questo metodo di analisi alla ricezione di materiale nei centri di raccolta; si tratterebbe quindi di mettere a punto un sistema molto più rapido che comunque garantisca un corretto condizionamento del campione.

Azione 3.4 – Influenza della tecnica di irrigazione sulla sensibilità alle micotossine del mais

Obiettivo di questa azione è stato quello di porre a confronto due diverse modalità di irrigazione, aspersione e manichetta, e tre volumi di restituzione idrica, ai fini di valutare l'ottimizzazione della tecnica irrigua in un'ottica di sostenibilità e di valutare quanto questa possa incidere sulla contaminazione da micotossine.

A tale scopo, nel 2017 e 2018 sono state allestite due prove di campo dall'Az. Agraria Sperimentale Stuard in provincia di Parma.

Alla luce dei risultati emersi da questa sperimentazione, non è stato possibile ottenere dati significativi sull'influenza di una tecnica irrigua piuttosto che l'altra e sui volumi di restituzione idrica. Risulta importante sottolineare la fondamentale criticità della durata della ricerca, risultata troppo breve o per lo meno non sufficientemente lunga. Infatti tali valutazioni dovrebbero essere effettuate con prove della durata di più anni ed in più località in modo da ottenere una maggiore variabilità delle condizioni naturali di disponibilità idrica.

Ciononostante, per la riduzione della contaminazione da aflatossine, si è confermata determinante l'influenza dell'irrigazione, al fine di non porre le piante in condizioni di stress vegetativo; anche in un'annata come il 2018, con una piovosità abbastanza ben distribuita durante il periodo colturale, si sono infatti rilevate differenze statisticamente significative tra la tesi testimone non irrigata e quelle irrigate.

Azione 3.5 – Integrazione filiera cerealicola e filiera biogas: micotossine e prodotti conformi per biodigestori

La sperimentazione ha avuto come obiettivo quello di verificare eventuali effetti inibenti delle aflatossine sulla corretta funzionalità del processo di digestione anaerobica, le conseguenze sul processo biologico e sulla loro eventuale degradazione/inattivazione, verificandone il livello di abbattimento rispetto alla concentrazione iniziale. L'introduzione di mais contaminato non ha ridotto significativamente la resa in biogas e biometano rispetto alla tesi testimone. Non sono stati osservati effetti di accumulo come conseguenza del carico giornaliero di aflatossine e la concentrazione di AFB₁ misurata nei digestati estratti è risultata inferiore a quella attesa, infatti, dal bilancio di massa complessivo (aflatossina IN e OUT dal reattore), si è calcolata una riduzione percentuale della tossina con valori medi del 90% del peso totale di AFB₁ avviata a digestione anaerobica.

La definizione dello studio delle caratteristiche merceologiche e qualitative del prodotto (mais destinato a biodigestori) è stata determinata tramite campionamenti effettuati al conferimento

della granella ancora verde proveniente da ibridi precoci, medi e tardivi. Dai risultati delle analisi dei campioni contaminati (elevata fluorescenza alla lampada UV) recuperati nella prima annualità è emersa la presenza di alte concentrazioni di AFB₁ in diversi campioni. Nella seconda annualità invece la contaminazione è stata pressoché nulla in quasi tutti i campioni. Nella prima annualità la raccolta intermedia ha riscontrato la contaminazione più alta, con un valore medio di AFB₁ di 275 ppb, maggiore del 40% rispetto alla contaminazione media dei campioni raccolti nella fase precoce e del 50% rispetto alla fase tardiva.

In raccordo con il C.I.C.A di Bologna è stato condotto lo studio sul percorso formale da applicare ai lotti di granelle di cereali ad “uso energetico” (Allegato 1); si è inoltre analizzata e sintetizzata la normativa sul digestato a livello nazionale e regionale ed i protocolli di intesa regionali degli ultimi anni, sulla gestione del rischio di contaminazione da aflatossine (Allegato 2).

Dal confronto con il Consorzio Italiano Biogas (CIB) è emerso che non risulta un utilizzo diffuso, nelle ultime due annualità, del granturco non conforme all’uso alimentare e mangimistico negli impianti di digestione anaerobica. La mancanza di una normativa chiara a livello nazionale (oltre alle linee guida delle Regioni padane) che regola l’utilizzo energetico di queste partite sembra scoraggiare i proprietari degli impianti di biogas e i loro consulenti al ritiro di tali granelle di mais contaminate. Inoltre, la grossa variabilità tra le diverse annate in termini di disponibilità di tali partite di mais contaminato (il 2018, ad es., non è stato un’anno di crisi “aflatossine”) si pone come ostacolo alla programmazione di un regolare impiego.

In ogni caso verifiche fatte tra i soci del Consorzio Italiano Biogas (CIB), alla luce dei risultati positivi e rassicuranti della presente sperimentazione, confermano l’interesse degli impianti di biogas al ritiro e all’utilizzo delle partite di mais contaminate da aflatossine, purché il prezzo sia interessante e le indicazioni di carattere normativo/autorizzativo siano chiare sia a livello delle Regioni padane che nazionali.

Data IL LEGALE RAPPRESENTANTE (firmato digitalmente)

Gruppo Operativo: MICOntrollo

AZIONE 5 - INTEGRAZIONE FILIERA CEREALICOLA E FILIERA BIOGAS: MICOTOSSINE E PRODOTTI CONFORMI PER BIODIGESTORI

*Fase 2 – Definizione del percorso formale da
applicare ai “lotti ad uso energetico”*

<p>Committente</p> 	<p><i>Centro Ricerche Produzioni Animali – C.R.P.A. S.p.A. Viale Timavo, 43/2 – Reggio Emilia 42121 – Italy Tel. +39.0522.436999 – Fax +39.0522.435142</i></p>
<p>Tecnico</p> 	<p><i>Consorzio Interprovinciale Cooperative Agricole -C.I.C.A. Via delle Lame, 118 – Bologna 40122 – Italy Tel. +39.051.520330 - Fax +39.051.520054</i></p>
<p>Bologna, Ottobre 2017</p>	

Indice

1	Premessa	3
2	Indicazioni operative per l'utilizzo ad uso energetico del granoturco non conforme all'uso alimentare e zootecnico.....	5
3	Il Decreto Interministeriale n. 5046 del 25 febbraio 2016 (Decreto Effluenti/Acque Reflue/Digestato)	8
4	Caratteristiche qualitative dei digestati.....	15
5	Caratteristiche microbiologiche dei digestati	17
6	Conclusioni	21
7	Bibliografia.....	24

1 Premessa

Lo scopo principale del progetto è quello di analizzare il contesto normativo di riferimento al fine di definire un percorso comune e condiviso sul territorio della Regione Emilia Romagna, da applicare alla gestione delle partite di cereali (granturco soprattutto) che presentano concentrazioni di aflatoossine superiori ai limiti previsti per l'utilizzo alimentare (umano e animale), nell'ambito della filiera della digestione anaerobica in una ottica di trasparenza e tracciabilità di "prodotto ad uso energetico". Si ritiene, infatti, che la chiarezza e la condivisione delle regole circa l'avvio a codigestione anerobica di tale materiale con altre biomasse nell'ambito della filiera del biogas che assicura una certa remunerazione, possa ridurre il rischio di comportamenti non corretti volti a destinarlo all'uso alimentare, anche qualora non sia conforme a tale uso, con conseguente riduzione dei rischi per la salute dell'uomo e degli animali e per l'ambiente.

L'esigenza prioritaria di tale studio nasce dall'evoluzione produttiva di riferimento del comparto maidicolo nazionale che ha visto a partire dal 2012 una progressiva drastica riduzione delle superfici investite a granturco in Italia in tutte le principali regioni produttrici. Analizzando la media degli ultimi dieci anni rispetto al 2016 risulta una contrazione di circa il 30%, con conseguente perdita di oltre 280.000 ettari, portando la stima della superficie totale nazionale 2016 al minimo storico di 660.727 ettari.

Nella nostra Regione il calo è stato ancora più drammatico raggiungendo circa il 36%, con una conseguente perdita di oltre 35.000 ettari. Questa situazione ha portato in pochi anni il nostro Paese, da una quota di sostanziale autosufficienza ad essere un forte importatore: basti pensare che l'Italia produce ormai meno del 60% del granturco necessario alle filiere alimentari zootecniche e umane, con possibili conseguenze anche sulle produzioni nazionali lattiero casearie, come i formaggi Dop, i cui disciplinari prevedono che la materia prima, il latte, provenga da allevamenti che hanno alimentato i bovini con almeno il 50% di alimenti di origine del territorio.

La crisi del comparto maidicolo nazionale è indubbiamente da un lato legata alle basse quotazioni degli ultimi anni di mercato della granella, ma anche dall'altro lato causato dalle note problematiche igienico-sanitarie (micotossine) che sempre più spesso hanno colpito questa produzione, coinvolgendo anche alcune eccellenze agroalimentari del nostro Paese. In talune campagne la contaminazione da aflatoossine costituisce un problema che deve essere correttamente affrontato e gestito per evitare seri rischi per i consumatori.

Dopo la prima emergenza del 2003 la Regione Emilia-Romagna ha promosso la redazione di linee guida per l'autocontrollo aziendale, dalla raccolta allo stoccaggio e commercializzazione del granturco, per la gestione del rischio aflatoossine. Il suddetto documento aggiornato annualmente,

condiviso e sottoscritto dalle principali organizzazioni agricole e strutture di stoccaggio, dal 2013, a seguito degli eventi sotto descritti, ha previsto la gestione del prodotto anche ai fini energetici.

A fronte della conclamata “emergenza aflatossine” registrata nelle produzioni di granturco del 2012, il Ministero della Salute, d’intesa con il MiPAAF ha indicato nelle circolari del 16/1/2013, 22/1/2013 e del 14/3/2013 delle “procedure operative straordinarie per la prevenzione e la gestione del rischio contaminazione da aflatossine nella filiera lattiero-casearia e nella produzione del granturco destinato all’alimentazione umana e animale, a seguito di condizioni climatiche estreme”. Le succitate procedure sono rivolte alle autorità di controllo, agli operatori del settore mangimistico ed alimentare e a tutte le aziende che raccolgono, stoccano, essiccano il granturco, al fine di permettere la riduzione del livello di aflatossine nel mais, ove possibile, mediante tecniche di pulizia. Tali procedure di gestione della filiera maidicola hanno lo scopo di impedire la possibile immissione nella catena alimentare e mangimistica di prodotto non conforme, nel rispetto della normativa europea.

Il granturco con tenore di aflatossina superiore al limite previsto dalla normativa deve, in base alle indicazioni contenute nelle suddette circolari essere destinato alla distruzione o, in accordo con autorità di controllo, ad **usi alternativi quali ad esempio la produzione di biogas**.

Le tre Regioni maggiormente interessate alla produzione di mais (Emilia-Romagna, Lombardia e Veneto) hanno promosso un accordo di filiera interregionale, valido per l’annata 2013, finalizzato a favorire l’utilizzo del granturco non conforme nel settore della digestione anaerobica. L’obiettivo primario era quello di risolvere un problema che rischiava di avere pesanti ripercussioni per l’agricoltura e la zootecnia del nord Italia e più in generale per la salute dei consumatori.

Lo scopo dell’accordo era quello di favorire l’incontro tra domanda ed offerta del prodotto e indicava le regole da seguire, affinché il prodotto non idoneo all’uso zootecnico potesse essere avviato a digestione anaerobica per produrre energia rinnovabile negli oltre 500 impianti a biogas della pianura padana.

L’accordo, in tal senso, ha favorito la realizzazione e diffusione tra gli operatori coinvolti nella filiera agro energetica (stoccatore/trasformatori di cereali e impianti a biogas) un percorso chiaro, trasparente e sicuro, in linea con le indicazioni allora fornite dal Ministero della Salute.

A titolo prudenziale la Regione Emilia-Romagna, prima di promuovere l’impiego nei biodigestori ha ritenuto, oltre alle indicazioni delle succitate circolari ministeriali, di chiedere ad esperti un parere precauzionale su tale impiego.

In sintesi il gruppo di esperti coinvolti appositamente dal CRPA (Centro Ricerche Produzioni Animali) ha ritenuto ammissibile e sicuro l’utilizzo nei biodigestori ed ha dato alcune indicazioni operative.

L'ampia diffusione dell'utilizzo energetico del mais attraverso la digestione anaerobica ha determinato uno specifico mercato che ha dato luogo ad una specifica voce nel listino prima della Borsa merci di Bologna poi di altre sedi (**granella ad uso energetico**).

2 Indicazioni operative per l'utilizzo ad uso energetico del granturco non conforme all'uso alimentare e zootecnico

Il corretto avvio a digestione anaerobica del granturco con aflatoxine richiede la preventiva qualificazione di tale materiale quale rifiuto o prodotto.

Come è noto, tale attività è resa necessaria dalla normativa che pone in capo al detentore la responsabilità in ordine alla corretta classificazione e gestione del materiale.

A tal proposito la normativa definisce "rifiuto" qualsiasi sostanza od oggetto di cui il detentore si disfi o abbia l'intenzione o l'obbligo di disfarsi (cfr. art. 183 del d.lgs. n. 152 del 2006).

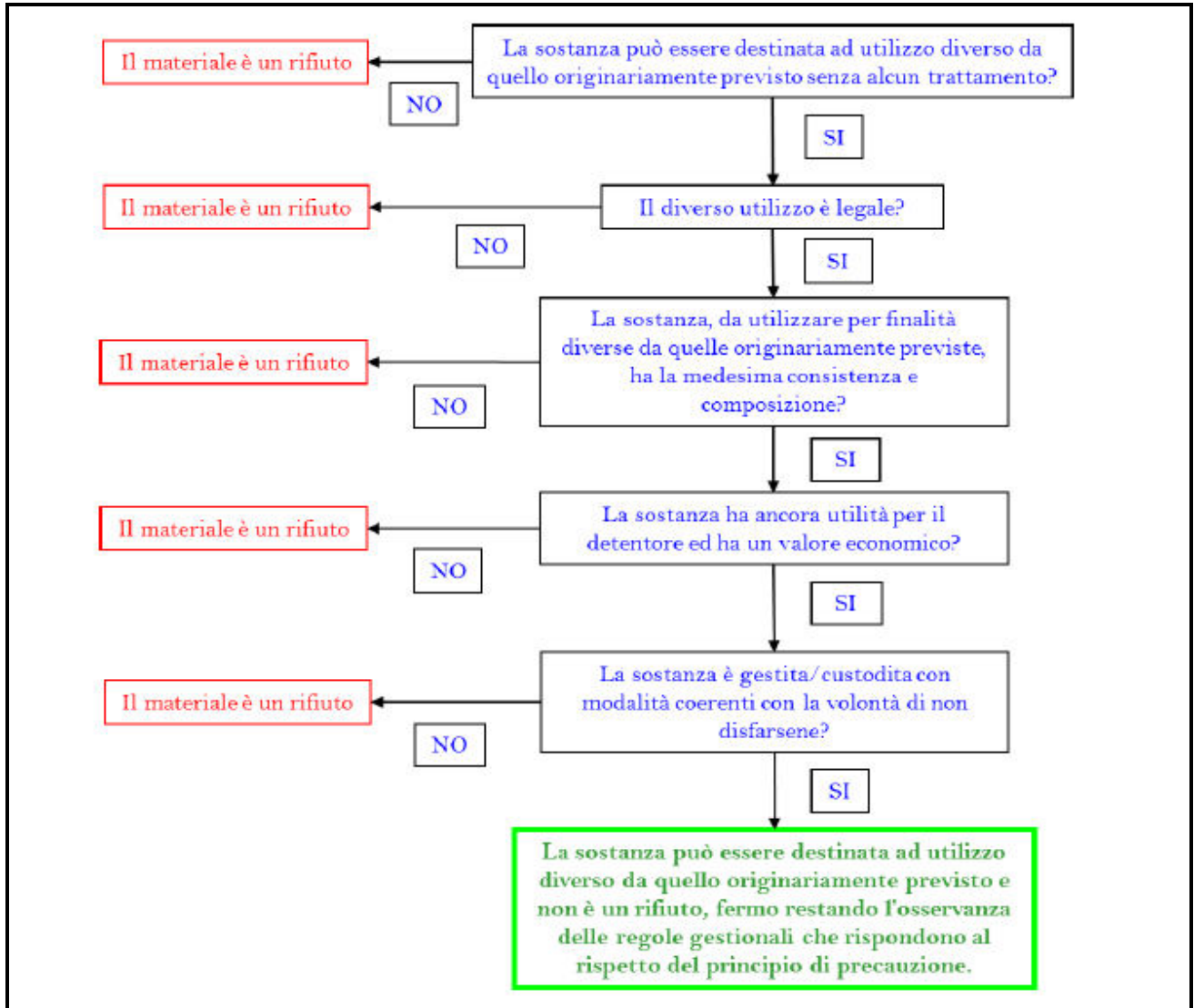
La Regione Emilia Romagna con l'emanazione della **Circolare PG/2017/0557035 del 31/07/2017** "Indicazioni operative in merito all'utilizzo per uso energetico del granturco non conforme all'uso alimentare per la presenza di aflatoxine superiore ai limiti stabiliti dalla norma" ha elaborato lo schema riportato alla figura 1 che indica, in sequenza, i parametri individuati dalla giurisprudenza di cui l'operatore può tenere conto per valutare se il materiale costituisca o meno un rifiuto.

La giurisprudenza comunitaria e nazionale ha messo in evidenza alcuni utili parametri per condurre l'operatore ad effettuare la scelta corretta. In particolare, una condizione fondamentale di cui l'operatore deve tenere conto, al fine di valutare se il materiale costituisca o meno un rifiuto e che questo ultimo sia gestito in modo da non arrecare danno alla salute dell'uomo e degli animali e all'ambiente. In tal senso, ad esempio, con riferimento al passaggio circa la necessità che la sostanza abbia una utilità per il detentore, si evidenzia che tale requisito va valutato alla luce della condotta in concreto tenuta dallo stesso e non del mero valore economico del bene ovvero che lo stesso costituisca oggetto di un contratto.

Inoltre, in merito alla sicurezza d'uso e all'applicazione del principio di precauzione nella gestione del materiale si evidenzia che sono state condotte ricerche dall'Università di Milano e dal Centro Ricerche Produzioni Animale (CRPA) in collaborazione con l'Università Cattolica di Piacenza, finanziate dalla Regione, nelle quali è stato valutato l'effetto dell'impiego di mais con diversi livelli di contaminazione da aflatoxine sul processo di digestione anaerobica, sulle relative rese di biogas e sul digestato; tali ricerche hanno dimostrato una significativa diminuzione della concentrazione delle aflatoxine durante la digestione anaerobica. La successiva fase di stoccaggio contribuisce

ulteriormente al miglioramento della qualità ambientale del digestato e quindi la distribuzione in campo di digestato non provoca l'aumento di funghi produttori di micotossine nel terreno.

Figura 1 – Schema giuridico per valutare il materiale oggetto della Circolare PG/2017/0557035 del 31/07/2017

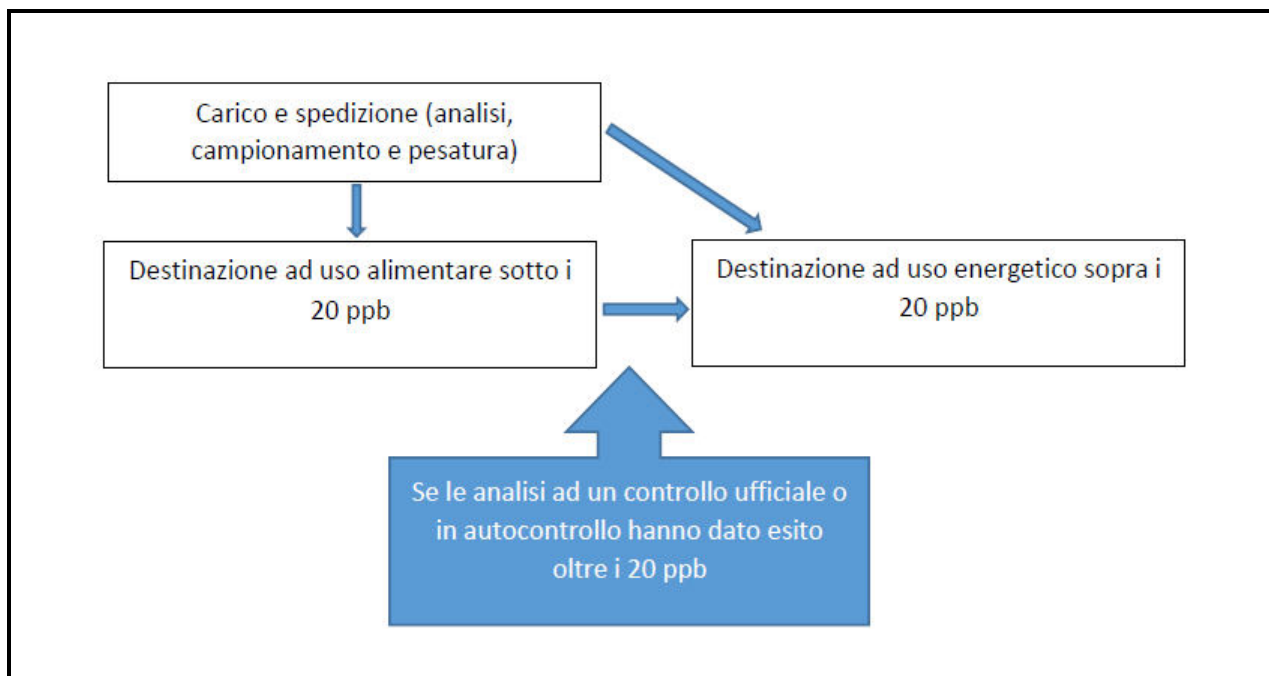


A seguito della qualificazione del materiale quale non rifiuto da parte dell'operatore come risposta positiva a tutte le domande dello schema, il granturco non conforme per uso alimentare per la presenza di aflatossine superiore ai limiti stabiliti dalla norma potrà essere impiegato, quale prodotto, nei biodigestori.

Il granturco all'interno dei centri di stoccaggio potrà, quindi, più precisamente, essere classificato come "prodotto in fase di lavorazione" e di conseguenza potrà essere stabilita la destinazione d'uso anche solo prima della fase finale che precede la commercializzazione. La destinazione ad uso alimentare (umano e animale) riguarderà il prodotto conforme ai rispettivi limiti; il prodotto con concentrazioni superiori a 20 ppb potrà essere destinato ad impianti di digestione anaerobica.

Il prodotto destinato ad uso alimentare (umano e animale) che ad un successivo controllo ufficiale o ad un autocontrollo dovesse evidenziare concentrazioni di aflatossine superiori a 20 ppb, potrà essere impiegato in impianto di digestione anaerobica.

Figura 2 – Schema di flusso previsto nella Circolare PG/2017/0557035 del 31/07/2017 dell’Emilia Romagna



Nei centri di stoccaggio/lavorazione dei cereali la presenza di più impianti di essiccazione (fosse di raccolta, pulitrici, torre di essiccazione) consente di trattare in modo differenziato partite con differente livello di contaminazione; pertanto in queste condizioni operative verranno eseguite prioritariamente l’essiccazione di eventuali partite molto contaminate rispetto a quelle meno rischiose. Nella suddetta gestione dell’essiccatoio, se fosse possibile essiccare le partite contaminate utilizzando un essiccatoio diverso da quello utilizzato per le partite ritenute non contaminate, si favorirebbe ulteriormente il controllo delle micotossine nella granella di mais.

Una volta individuati e separati i lotti di granella con micotossine il centro di essiccazione/lavorazione dei cereali procede alla triturazione della granella in un locale di stoccaggio dedicato al fine di garantire la segregazione di filiera tra prodotto destinato ad uso alimentare o zootecnico (concentrazioni di aflatossine inferiori a 20 ppb) da quello destinato ad uso energetico (concentrazioni di aflatossine superiori a 20 ppb).

La farina così ottenuta verrà conferita agli impianti di biogas sulla scorta di un contratto di fornitura che garantisca la tracciabilità di filiera (quantità, prezzo, modalità di utilizzo, caratteristiche tecniche, lotto di provenienza, luogo di impiego).

Presso l'impianto di biogas è presente e compilato in ogni sua parte, il "registro delle biomasse in ingresso all'impianto" da esibire in caso di controllo da parte degli Enti competenti in materia ambientale ed agronomica. In particolare, i quantitativi annuali delle biomasse alimentate al digestore, con frequenza annuale, devono essere riportati sul succitato registro, come indicato nella DGR n° 1496/2011 punto13 dell'allegato tecnico. Inoltre, sempre la stessa delibera regionale stabilisce che le biomasse alimentate al fermentatore anaerobico dovranno provenire dall'attività svolta dall'azienda agricola titolare/proprietaria dell'impianto di biogas o da terzi, in base a contratti scritti fra le parti di conferimento prodotti o sottoprodotti destinati ad uso energetico.

Sulla base dei dati attualmente disponibili sulla situazione maidicola attuale la Regione Emilia Romagna, con l'emanazione della Circolare PG/2017/0557035 del 31/07/2017, ritiene di confermare l'utilizzo di granturco con concentrazioni di aflatossine, tali da non consentirne l'uso alimentare, in una quota massima del 10% del peso totale delle matrici che costituiscono la razione del biodigestore. Inoltre devono essere soddisfatti i seguenti requisiti:

- tenuta a disposizione della documentazione comprovante la cessione del prodotto per uso energetico: la documentazione deve attestare le quantità oggetto di compravendita, la destinazione d'uso del prodotto, il lotto di provenienza, il luogo d'impiego e il codice identificativo dell'impianto di digestione anaerobica al fine di garantire la rintracciabilità;
- adozione dei possibili interventi per limitare l'emissione e la diffusione di polveri nella movimentazione del prodotto non conforme per uso alimentare;
- utilizzazione di dispositivi di protezione individuale da parte degli operatori.

3 Il Decreto Interministeriale n. 5046 del 25 febbraio 2016 (Decreto Effluenti/Acque Reflue/Digestato)

L'entrata in vigore del Decreto del 25 febbraio 2016 "Criteri e norme tecniche generali per la disciplina regionale dell'utilizzazione agronomica degli effluenti di allevamento e delle acque reflue di cui all'art. 113 del Decreto legislativo 3 aprile 2006 n. 152 nonché per la produzione e l'utilizzazione agronomica del digestato di cui all'art. 52, comma 2-bis del decreto legge 22 giugno 2012, n. 83, convertito in legge 7 agosto 2012 n. 134" afferma che "è considerato sottoprodotto, ai sensi dell'articolo 184-bis del Decreto Legislativo del 3 aprile 2006 n. 152 (Testo unico ambientale), il digestato ottenuto da impianti aziendali o interaziendali dalla digestione anaerobica, eventualmente associata anche ad altri trattamenti di tipo fisico-meccanico, di effluenti zootecnici di allevamento o residui di origine vegetale o residui delle trasformazioni o delle valorizzazioni

delle produzioni vegetali effettuate dall'agroindustria, conferiti come sottoprodotti, anche se miscelati tra loro, e utilizzati a fini agronomici”.

Rimanendo nell'ambito della normativa nitrati, il decreto introduce un Titolo dedicato all'utilizzazione agronomica del digestato di origine agricola sottolineandone la sua importanza. L'Art. 21 comma 2, infatti, riporta come “l'utilizzazione agronomica del digestato debba essere finalizzata al recupero delle sostanze nutritive ed ammendanti contenute nello stesso”, confermando le eccellenti qualità agronomiche del digestato e lasciando sostanzialmente invariato il regime delle comunicazioni, dei divieti e dei limiti all'utilizzo agronomico così come già previsti per gli effluenti zootecnici a cui viene equiparato.

All'articolo 24, viene invece sancito come il digestato sia un sottoprodotto – escludendolo una volta per tutte, dalla normativa rifiuti – quando sono rispettate le seguenti condizioni:

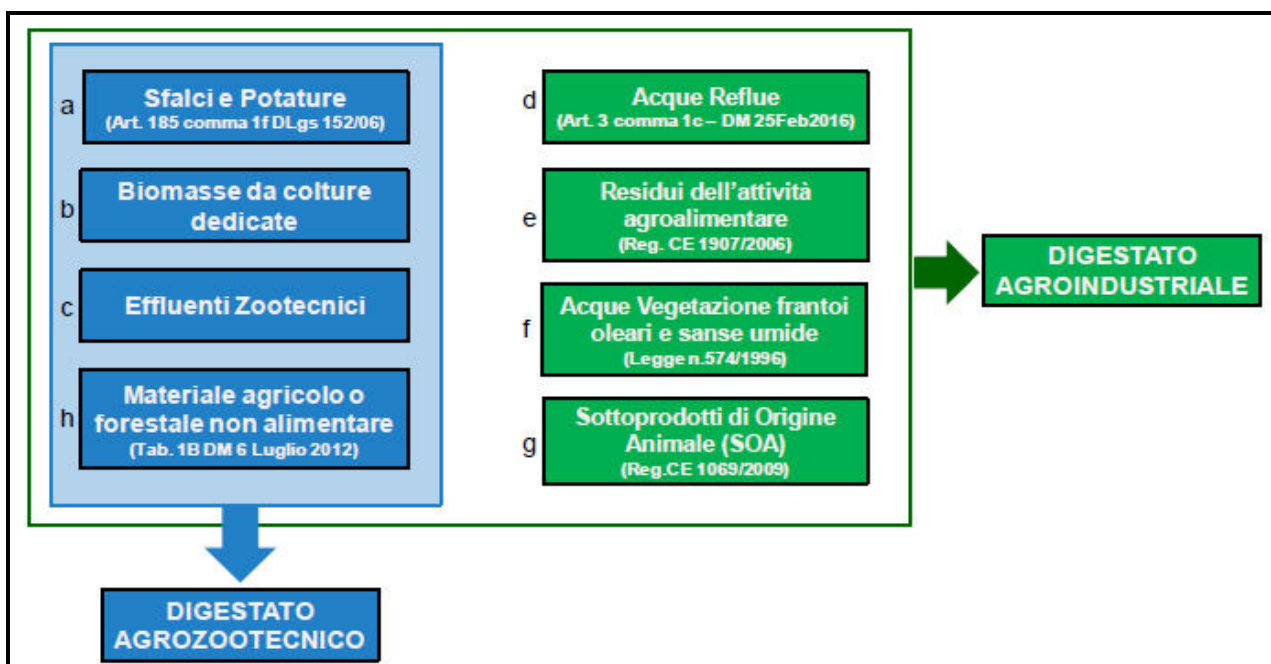
- a) È prodotto in impianti – aziendali e interaziendali - di digestione anaerobica autorizzati ed alimentati con effluenti di allevamento, biomasse vegetali ed una serie di materie tra cui sottoprodotti e residui vegetali ed alcuni sottoprodotti dell'agroindustria;
- b) Vi è certezza di impiego agronomico da parte del produttore o di soggetti terzi con i quali il produttore ha un rapporto contrattuale di cessione (detentore);
- c) Viene utilizzato direttamente senza ulteriori trattamenti diversi dalle normali pratiche industriali. Si annoverano tra queste ultime, e quindi ammesse, la distribuzione, sedimentazione, chiarificazione, centrifugazione ed essiccazione, filtrazione, separazione solido/liquido, strippaggio, nitrificazione, denitrificazione e fitodepurazione;
- d) Soddisfa le caratteristiche di qualità indicate all'Allegato IX, nonché le norme igienico-sanitarie e di tutela ambientale comunque applicabili.

Tra le principali novità normative introdotte dal Decreto Interministeriale n. 5046 del 25 Febbraio 2016, oltre ai succitati articoli 21 e 24, spiccano per importanza i seguenti aspetti:

- è stato sancito che, in assenza di “rifiuti” in ingresso all'impianto, il digestato destinato all'uso agronomico secondo i criteri dettati nel suddetto decreto, è un sottoprodotto ai sensi dell'art. 184 bis del D.Lgs 152/2006 e s.m.i.;
- sono stati individuati gli adempimenti previsti (Comunicazione di spandimento e Piano di Utilizzazione Agronomica – PUA) per il produttore/detentore di digestato;
- la distinzione del digestato in due categorie di sottoprodotto (**agrozootecnico e agroindustriale**) in funzione della tipologia di biomasse in ingresso all'impianto di biogas (figura 2);
- il divieto di utilizzazione agronomica del digestato prodotto da colture che provengano da siti inquinati;

- la possibilità per le Regioni di modificare il periodo obbligatorio di 60 giorni di divieto di spandimento degli effluenti, a seconda delle condizioni climatico-ambientali;
- ai fini dell'utilizzo del digestato sono ammessi, poiché rientranti nelle normali pratiche industriali, i seguenti trattamenti: disidratazione, sedimentazione, chiarificazione, centrifugazione, essiccazione, separazione solido-liquido, strippaggio, nitro-denitro, fitodepurazione e ogni altro trattamento autorizzato dalle autorità competenti, che valorizzi agronomicamente il digestato e/o ne migliori la compatibilità ambientale;
- per quanto concerne l'utilizzo delle colture dedicate nell'impianto di digestione anaerobica si prevede che, per gli impianti autorizzati successivamente alla entrata in vigore del presente decreto, tale materiale non possa superare il 30% in termini di peso complessivo del bilancio di massa;
- la definizione del criterio di impiego del digestato in relazione al suo contenuto di azoto, differenziando quello di origine zootecnica da quello di altra natura (derivante da altre biomasse non riconducibili alla categoria degli effluenti zootecnici di allevamento). Il limite di distribuzione al campo di 170 kg/ha di azoto nelle zone vulnerabili, si riferisce alla sola quota di azoto che proviene dagli effluenti zootecnici di allevamento. Per quanto riguarda, invece, le zone ordinarie, tale limite si innalza ad valore pari a 340 kg/ha;
- il calcolo dell'azoto tramite l'effettivo fabbisogno delle colture;
- per ciascuna delle due tipologie di digestato sono stati stabiliti limiti qualitativi minimi e massimi da rispettare per una serie di parametri chimici (agronomici e ambientali) e un parametro microbiologico (Salmonella) riportate nelle tabelle che seguono.

Figura 2 – Definizione di digestato agro-zootecnico e agroindustriale in base alle matrici in ingresso



Non vi è alcun dubbio che la suddetta norma abbia uniformato il quadro legislativo nazionale sull'utilizzo degli effluenti di allevamento in agricoltura, a cui il digestato è equiparato. È altrettanto fondamentale conoscere da un lato le modalità corrette di campionamento del digestato al fine di evitare alterazioni o contaminazioni dei fattori esterni e dall'altro lato mettere in atto delle buone pratiche agronomiche di distribuzione con lo scopo di favorire le concimazioni su colture in atto (poco prima della semina, copertura, levata, accestimento). A tal proposito sono sempre più numerosi gli imprenditori agricoli che grazie ad un efficiente utilizzo del digestato stanno riuscendo a diminuire l'acquisto e la distribuzione di concimi chimici e al contempo verificare in maniera concreta i benefici che il suolo agrario ottiene dal punto di vista chimico, fisico e biologico.

La funzione fertilizzante del digestato è oggetto di crescente interesse non solo nel nostro Paese ma anche in altre aree mondo dove la conservazione e il recupero della fertilità dei suoli stanno diventando una priorità. Non bisogna dimenticare che se si analizza il digestato da un punto di vista ambientale, esso diventa uno strumento per immagazzinare carbonio nel suolo riducendo la quantità di anidride carbonica in atmosfera e, pertanto, l'impatto ambientale complessivo dell'intero comparto agricolo.

La tabella sottostante riporta il prospetto di sintesi dei principali adempimenti normativi previsti (Comunicazione di spandimento e Piano Utilizzazione Agronomica) dal Decreto Effluenti.

Tabella 1 – Quadro sinottico degli adempimenti previsti dal Decreto Effluenti

AZOTO AL CAMPO	ZONA VULNERABILE NITRATI	ZONA NON VULNERABILE NITRATI
<1.000 kg/anno	Esonero Comunicazione	Esonero Comunicazione
da 1.001 a 3.000 kg/anno	Comunicazione Semplificata (all. IV parte B)	Esonero Comunicazione
da 3.001 a 6.000 kg/anno	Comunicazione Completa (all. IV parte A) + PUA Semplificato (all. V parte B)	Comunicazione Semplificata (all. IV parte B) + PUA Semplificato (all. V parte B)
>6.000 kg/anno	Comunicazione Completa (all. IV parte A) + PUA Completo (all. V parte A)	Comunicazione Completa (all. IV parte A) + PUA Completo (all. V parte A)
Allevamenti intensivi	PUA Completo (all. V parte A) compreso in AIA	PUA Completo (all. V parte A) compreso in AIA
Bovini >500 UBA	Comunicazione Completa (all. IV parte A) + PUA Completo (all. V parte A)	Comunicazione Completa (all. IV parte A) + PUA Completo (all. V parte A)

Con riferimento alla figura 1, il digestato è definito “agrozootecnico”, quando tra le matrici in ingresso non sono presenti sottoprodotti agroindustriali (vegetali e animali); si genera invece digestato “agroindustriale” in presenza di uno o più sottoprodotti, da soli o in aggiunta alle matrici che danno origine a quello agrozootecnico, indipendentemente dalla tipologia e dalla quantità. Il digestato è riconosciuto sottoprodotto agricolo a destinazione agronomica se, oltre a rispettare le condizioni previste dall’art. 184 bis del D.Lgs 152/06, proviene dalle seguenti matrici (articolo 22 del Decreto Effluenti):

- a)** Paglia, sfalci, e potature, nonché altro materiale agricolo o forestale naturale non pericoloso di cui all’articolo 185, comma 1, lettera f) del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152;
- b)** Materiale agricolo derivante da colture agrarie. Fatti salvi gli impianti da realizzarsi ai sensi dell’articolo 2 del decreto legge 10 gennaio 2006 n. 2, convertito, con modificazioni, dalla legge 11 marzo 2006 n. 81, per gli impianti autorizzati successivamente all’entrata in vigore del presente decreto, tale materiale non potrà superare il 30% in termini di peso;
- c)** Effluenti zootecnici di allevamento, come definiti all’articolo 3, comma 1, lettera c) del presente decreto;
- d)** Le acque reflue, come definite all’articolo 3, comma 1, lettera f) del presente decreto;
- e)** Residui dell’attività agroalimentare di cui all’articolo 3, comma 1 lettera i) del presente decreto, a condizione che non contengano sostanze pericolose conformemente al Regolamento (CE) n. 1907/2006;
- f)** Acque di vegetazione dei frantoi oleari e sanse umide anche denocciolate di cui alla legge 11 novembre 1996 n. 574;
- g)** I sottoprodotti di origine animale, utilizzati in conformità con quanto previsto nel Regolamento (CE) 1069/2009 e nel regolamento di implementazione (UE) 142/2011, nonché delle disposizioni approvate nell’accordo tra Governo, Regioni e Province autonome.
- h)** Materiale agricolo e forestale non destinato al consumo alimentare di cui alla tabella 1B del decreto del 6 luglio 2012.

Il digestato agrozootecnico si produce esclusivamente dall’avvio a digestione anaerobica delle biomasse presenti in elenco ai punti a), b), c) e h); mentre il digestato agroindustriale si produce con uno o più materiali presenti in elenco ai punti d), e), f) e g), eventualmente anche in miscela con le matrici previste per il digestato agrozootecnico (figura 2).

Con il termine di residui dell’attività agroalimentare - Articolo 3, comma 1, lettera i) del decreto - si intendono i residui di produzione individuati nell’Allegato IX al decreto, derivanti da trasformazioni o valorizzazioni di prodotti agricoli, effettuate da imprese agricole di cui all’art.

2135 del codice civile o da altre imprese agroindustriali, a condizione che derivino da processi che non rilasciano sostanze chimiche, conformemente al regolamento (CE) n. 1907/2006. Di seguito si riportano i residui dell'agroindustria che possono essere impiegati per la produzione di digestato agroindustriale di cui al decreto:

- *sottoprodotti della trasformazione del pomodoro (bucchette, bacche fuori misura, ecc.);*
- *sottoprodotti della trasformazione delle olive (sanse, acque di vegetazione);*
- *sottoprodotti della trasformazione dell'uva (vinacce, graspi, ecc.);*
- *sottoprodotti della trasformazione della frutta (condizionamento, sbucciatura, detorsolatura, pastazzo di agrumi, spremitura di pere, mele, pesche, noccioli, gusci, ecc.);*
- *sottoprodotti della trasformazione degli ortaggi (condizionamento, sbucciatura, confezionamento, ecc.);*
- *sottoprodotti della trasformazione delle barbabietole da zucchero (borlande, melasso, polpe di bietola esauste essiccate, surpressate fresche, surpressate insilate, ecc.);*
- *sottoprodotti derivati dalla lavorazione/selezione del risone (farinaccio, pula, lolla, ecc.);*
- *sottoprodotti derivati dalla lavorazione dei cereali (farinaccio, farinetta, crusca, tritello, glutine, amido, semi spezzati, amido di riso e proteine di riso in soluzione acquosa da prima lavorazione dei cereali e/o riso, ecc.);*
- *sottoprodotti della trasformazione dei semi oleosi (pannelli di germe di granturco, lino, vinacciolo, ecc.).*

I relativi adempimenti previsti dal Decreto riconducibili alla classificazione del digestato prodotto sono i seguenti:

- in sede di presentazione della “comunicazione”, che deve essere inviata per via telematica attraverso il sistema informativo regionale (ad esempio nel caso della Regione Emilia Romagna si tratta del portale “gestione effluenti zootecnici”), occorre dichiarare la tipologia di digestato in gioco e le biomasse in ingresso all'impianto con riferimento al tipo di alimentazione, dimostrando il rispetto dei parametri di qualità;
- presso l'azienda deve essere tenuto un “registro del consumo di biomasse”, come definito in fase di autorizzazione, da esibire in caso di controlli da parte delle autorità competenti;
- ai fini dell'utilizzazione agronomica, concorre alla quota limite di azoto prevista dalla direttiva nitrati solo il carico azotato derivante dalla frazione di effluenti zootecnici di allevamento della dieta. La quota di azoto proveniente da “altre biomasse” va a bilancio della coltura con una decurtazione del 20% al fine di tenere in considerazione delle emissioni in stoccaggio;

- le tecniche di distribuzione del digestato ammesso all'utilizzo agronomico devono garantire elevata efficienza e uniformità di distribuzione oltre ad evitare lisciviazione, ruscellamenti e perdite di ammonio per volatilizzazione.

Dai concetti sopra elencati, emergerebbe come la classificazione del digestato sia correlata alle biomasse effettivamente impiegate nel bilancio di massa dell'impianto di biogas.

Per quanto riguarda, invece, i parametri da determinare e i relativi limiti qualitativi da garantire che il Decreto impone ai digestati destinati all'uso agronomico le tabelle sottostanti riportano i valori previsti per entrambe le tipologie di digestato (agrozootecnico e agroindustriale).

Tabella 2 – Limiti qualitativi previsti per entrambe le tipologie di digestato (agrozootecnico e agroindustriale)

PARAMETRO	VALORE LIMITE	UNITA' DI MISURA
Sostanza organica	≥ 20	% peso sostanza secca
Fosforo totale	$\geq 0,4$	% peso sostanza secca
Azoto totale	$\geq 1,5$	% peso sostanza secca
Salmonella	Assenza in 25 g di campione tal quale	n=5 c=0 m=0 M=0 (1)

(1) n = numero di campioni da esaminare; c = numero di campioni la cui carica batterica può essere compresa tra m e M. Il campione è ancora considerato accettabile se la carica batterica degli altri campioni è uguale o inferiore a m. M: valore massimo ammesso; il campione non è accettabile se anche solo uno dei campioni ha una carica batterica superiore a M.

Tabella 3 – Limiti qualitativi previsti per il digestato agroindustriale

PARAMETRO	VALORE LIMITE	UNITA' DI MISURA
Piombo totale	≤ 140	mg/kg di sostanza secca
Cadmio totale	$\leq 1,5$	mg/kg di sostanza secca
Nichel totale (*)	≤ 100	mg/kg di sostanza secca
Zinco totale	≤ 600	mg/kg di sostanza secca
Rame totale	≤ 230	mg/kg di sostanza secca
Mercurio totale	$\leq 1,5$	mg/kg di sostanza secca
Cromo VI totale	$\leq 0,5$	mg/kg di sostanza secca

(*) Per particolari esigenze regionali, in caso di valori di fondo dei terreni con elevati tenori di nichel, le regioni possono stabilire un limite più elevato

Relativamente al parametro Salmonella si richiede la verifica dell'assenza di *Salmonella spp.*, come previsto dai metodi ufficiali di analisi dei fertilizzanti e fanghi.

Per quanto concerne il contenuto di “sostanza organica (SO)” si precisa che secondo il D.Lgs 75/2010 e s.m.i., si intende il risultato del seguente calcolo: carbonio organico totale (TOC) x 2.

È invece risaputo che negli impianti di digestione anaerobica il contenuto di sostanza organica è misurato come “solidi volatili (SV)”, determinato come perdita all'incenerimento a 550 °C secondo la relativa metodica ufficiale, ed è uno dei parametri basilari per il monitoraggio dell'intero processo biologico (“Linee guida per l'uso agronomico del digestato” a cura del CIB, 2017).

Il Decreto non entra nel merito di fornire indicazioni specifiche sui seguenti aspetti, di fondamentale importanza per le ricadute operative derivate dalla sua piena applicazione:

- la frequenza di campionamento del digestato;
- la tipologia di digestato da campionare o, meglio, il punto di campionamento lungo la linea della sua produzione (allo scarico dal digestore, dopo separazione solido/liquido e in stoccaggio);
- le modalità di campionamento ai fine della caratterizzazione chimica e microbiologica.

Ai punti di cui sopra cercano di dare risposta le recenti, settembre 2017, “Linee guida per l'uso agronomico del digestato” predisposte dal Consorzio Italiano Biogas – CIB.

4 Caratteristiche qualitative dei digestati

Dal punto di vista tecnico il digestato risulta il sottoprodotto del processo della digestione anaerobica e, rispetto alle biomasse in ingresso previste nel bilancio di massa dell'impianto di biogas, si presenta omogeneo, con un tenore di umidità più elevato perché parte della sostanza secca (solidi totali –ST) è stata degradata biologicamente, cioè demolita dai batteri per la produzione biogas. La sostanza organica che in esso rimane risulta da un alto più stabile e dall'altro lato contiene elementi di fertilità, quali azoto, fosforo e potassio. La distribuzione nei terreni del digestato di fatto rappresenta la destinazione per eccellenza del suddetto sottoprodotto perché consente di sfruttare al meglio il suo grande potere fertilizzante, sia in termine di apporto di sostanza organica.

In termini generali, se si analizza la composizione chimico-fisico dei digestati di varia origine, sia essa animale, vegetale o mista, generalmente si riscontra nei digestati derivanti da effluenti zootecnici di allevamento la quota maggiore dell'azoto risulta in forma ammoniacale, mentre per quelli derivanti dalla codigestione di biomasse di origine vegetale (colture agricole dedicate,

sottoprodotti del comparto agroindustriale) può ancora prevalere l'azoto di tipo organico (pari alla quota dell'azoto totale dato dalla differenza di quello ammoniacale: $N_{tot} - N_{amm}$).

Generalmente da un'attenta analisi delle caratteristiche chimico-fisiche del digestato si riscontra quanto segue:

- la frazione solida o palabile, solitamente ottenuta con l'utilizzo in digestione anaerobica di separatori a compressione elicoidale oppure a rulli contrapposti, costituisce in genere non più del 10-15% circa del peso del digestato tal quale ed è caratterizzata da un contenuto di sostanza secca relativamente alto, di solito pari o superiore al 20% circa. In essa si concentrano la sostanza organica residua, l'azoto organico e il fosforo, seppure con efficienze di separazione variabili in funzione delle condizioni operative di riferimento (tipo di digestato, tipo e modalità di utilizzo del dispositivo utilizzato);
- la frazione liquida o chiarificata, pari ad almeno l'85-90% del volume del digestato tal quale, è caratterizzata da un tenore di sostanza secca mediamente compreso tra il 3-4 e il 6-8%. In essa si concentrano i composti solubili, tra cui l'azoto in forma ammoniacale, che può arrivare anche oltre il 70% dell'azoto totale.

Per quanto riguarda invece il contenuto dei metalli pesanti, sulla base dei dati bibliografici attualmente a disposizione (Banca Dati CRPA – febbraio 2017), mediamente i valori riscontrati nel digestato agrozootecnico e agroindustriale risultano al di sotto dei limiti massimi ammessi, come riportato nel quadro di sintesi contenuto nella tabella sottostante relativo a digestati prodotti da numerosi impianti di biogas distribuiti sul territorio nazionale.

Tabella 4 – Contenuto metalli pesanti in digestati di varia natura provenienti da oltre 60 impianti di biogas

ELEMENTO	SIMBOLO	MEDIA (mg/kg ST)	DEV. STD (mg/kg ST)	DECRETO EFFLUENTI LIMITI DIGESTATO AGROINDUSTRIALE
Rame	Cu	52,0	30,2	≤ 230
Zinco	Zn	262	166	≤ 600
Nichel	Ni	9,2	7,6	≤ 100
Piombo	Pb	1,6	0,95	≤ 140
Mercurio	Hg	< 0,10	-	≤ 1,5
Cadmio	Cd	0,23	0,12	≤ 1,5
Cromo esavalente	Cr VI	< 0,10	-	≤ 0,5

Dall'analisi dei dati inseriti nella tabella 4 emerge chiaramente come non sussistano particolari problemi per le caratteristiche agronomiche ed ambientali dei digestati agroindustriali, che sono tali da rispettare a pieno i limiti qualitativi stabiliti dal Decreto Effluenti per i parametri chimici.

A conclusioni del tutto analoghe è giunta ARPAE Sezione di Bologna nella relazione "Monitoraggio della composizione analitica del digestato prodotto da impianti a biogas. Esiti delle attività di monitoraggio (anno di riferimento 2015)", relativa ai risultati del monitoraggio condotto su 5 impianti di biogas, 4 dei quali produttori di digestato agroindustriale, campionato come frazione palabile nella platea di stoccaggio del materiale solido e frazione chiarificata nella vasca di stoccaggio del materiale liquido.

Nella suddetta indagine, così come in quella condotta sempre da ARPAE nel 2014, sono stati analizzati anche gli inquinanti organici persistenti (AOX, IPA, NPE DEHP, PCB, Diossine/Furani). Le conclusioni dei risultati analitici finali sono stati del tutto tranquillizzanti, in quanto spesso le concentrazioni sono risultate sotto il limite di rilevabilità. Anche il monitoraggio condotto già nel 2013 ("Caratteristiche del digestato da impianti di digestione anaerobica. Campagna di monitoraggio maggio-settembre 2013), da ARPAV Veneto sulla qualità del digestato in 12 diversi impianti di biogas ha fornito conclusioni del tutto simili sia per quanto riguarda il contenuto dei metalli pesanti che di inquinanti organici persistenti.

5 Caratteristiche microbiologiche dei digestati

Le numerose evidenze scientifiche hanno ormai dimostrato che la digestione anaerobica, pur condotta in condizioni di mesofilia non peggiora la qualità igienico-sanitaria delle biomasse trattate, ma al contrario la migliora (Olsen, 1987, Sahlstrom, 2003, Horan, 2004, Smith, 2005, Bonetta, 2010). Si tratta di evidenze scientifiche dimostrate su diverse tipologie di digestati ottenuti a partire da substrati fermentescibili più o meno contaminati (anche intenzionalmente a scopo di studio) da microrganismi patogeni. L'entità della riduzione della carica patogena accertata nei vari studi condotti in questi ultimi anni risulta variabile, in quanto correlata a numerosi aspetti di processo analizzati, tra cui lo specifico microrganismo in gioco (alcuni sono più resistenti di altri), le modalità gestionali ed operativi dell'impianto di biogas (tempi di ritenzione, efficienza della digestione anaerobica), il livello di contaminazione iniziale.

Relativamente al regime di temperatura adottato, rispetto alle condizioni di mesofile con la fermentazione anaerobica in condizione termofila (50-55 °C), si raggiunge in tempi più rapidi un livello più elevato di igienizzazione rispetto allo stato iniziale. In condizioni termofile, l'inattivazione della carica patogena è influenzata dalla resistenza intrinseca al calore delle singole

specie, dallo stress ambientale indotto dalla matrice (pH, elettroliti, ecc.) e dalla durata del tempo di ritenzione del processo anaerobico.

In condizioni mesofile, invece, la temperatura non è direttamente responsabile dell'inattivazione dei patogeni; in tali condizioni, i principali fattori responsabili della riduzione della vitalità dei batteri enterici sono la competizione microbica, la concentrazione di ammoniaca e di acidi grassi, i valori di pH e, nel complesso, un'elevata efficienza del processo di digestione (“Linee guida per l'uso agronomico del digestato”, 2017). In pratica, i digestori che operano in regime di temperatura mesofila con miscelazione efficace in grado di coinvolgere tutto il volume utile disponibile per la fermentazione e tempi di ritenzione adeguati possono ottenere risultati più che soddisfacenti da un punto di vista di igienizzazione delle biomasse trattate.

Un ulteriore aspetto da tenere in considerazione, piuttosto importante per l'impianto di biogas è l'effetto del tempo di stoccaggio; sono disponibili studi che evidenziano il positivo effetto che lo stoccaggio prolungato esercita sullo stato di igienico-sanitario del digestato, che risulta ulteriormente migliorato rispetto al digestato “fresco” appena scaricato dai fermentatori (Kearney, 1993, Paavola, 2008).

La suddetta considerazione risulta nota già da tempo con il positivo effetto esercitato dallo stoccaggio sulla carica patogena complessiva degli effluenti zootecnici di allevamento. Non a caso per i reflui zootecnici la permanenza in fase di stoccaggio è stato ed è tuttora ritenuto il sistema migliore per ottenere livelli accettabili di igienizzazione in relazione al loro successivo utilizzo agronomico. Siccome diversi sono i fattori che influiscono sui risultati di (tipo di animale allevato, densità del liquame, pH, temperatura, ecc.) non si possono fornire indicazioni precise in merito alla durata dello stoccaggio e al relativo livello igienico-sanitario raggiungibile di conseguenza, tuttavia si raggiungono esiti accettabili con:

- separazione della frazione palabile/solida con stoccaggio a parte della medesima in una platea dedicata;
- sosta della frazione chiarificata, in assenza di apporti di digestato fresco, per almeno 30 giorni (DGER n. 1495/2011); ciò presuppone la disponibilità di un sistema di stoccaggio diviso in due scomparti.

A tal proposito, si ricorda che lo stesso Decreto Effluenti, in caso di costruzione di nuovi stoccaggi per i liquami zootecnici, allo scopo di “indurre un più alto livello di stabilizzazione”, impone il frazionamento del volume in due scomparti (art. 12, comma 6), con espressa esclusione di quelli destinati al digestato in quanto ritenuto già stabilizzato.

La riduzione della carica patogena totale si ottiene, soprattutto in condizioni mesofile, attraverso un processo efficiente di degradazione biologica della sostanza organica unitamente alla elevata

competitività microbica che si instaura, poiché di fatto viene sottratto cibo ai patogeni; in fase di stoccaggio del digestato l'attività biologica, per quanto modesta, continua ad esercitare un effetto deprimente sulla carica patogena residua contribuendo a favore la situazione igienico-sanitaria complessiva.

In sintesi, pur non potendo affermare che la digestione anaerobica è un processo che assicura la “pastorizzazione” o comunque la scomparsa di tutti i patogeni, è vero che, non si crea o non si moltiplica se già presente la carica batterica patogena delle biomasse in ingresso, ma al contrario si riduce in modo chiaro con conseguente miglioramento dello stato igienico-sanitario complessivo del digestato rispetto alle matrici in ingresso (“Linee guida per l'uso agronomico del digestato”, 2017). Se alla suddetta considerazione si aggiungono anche i seguenti aspetti:

- l'ulteriore miglioramento a seguito della permanenza nella fase di stoccaggio del digestato;
- le diverse prescrizioni e i divieti di spandimento previsti dalle normative di settore (Regolamenti Regionali, Codice di Buona Pratica Agricola, Decreto Effluenti), soprattutto in relazione all'ubicazione dell'appezzamento oggetto distribuzione agronomica del digestato (distanze dai centri abitati, corsi d'acqua, ecc.), alla presenza al momento della loro raccolta di colture in campo (ad esempio: in orticoltura, a coltura presente, a meno che il sistema di distribuzione non consenta di salvaguardare integralmente la parte area delle piante; su colture foraggere nelle tre settimane precedenti lo sfalcio del foraggio o il pascolamento);
- l'adozione di modalità di spandimento del digestato adeguate rispondenti ai criteri di buona pratica agronomica (distribuzione rasoterra, distribuzione con interrimento contemporaneo o comunque immediatamente successivo).

si può concludere che l'uso agronomico del digestato non solo risulta compatibile con la produzione di qualunque coltura foraggera a alimentare, comprese quelle di pregio, ma anche che il rischio igienico-sanitario complessivo direttamente correlato alla operazione di spandimento in pieno campo del digestato risulta mediamente inferiore rispetto a quello connesso all'uso agronomico degli effluenti zootecnici tali e quali.

Dopo aver trattato gli effetti della digestione anaerobica sullo stato igienico-sanitario delle biomasse in ingresso, si ritiene opportuno presentare un quadro generale delle caratteristiche microbiologiche che possono avere i digestati prodotti dagli impianti di biogas, con riferimento specifico al parametro “Salmonella”, si tratta di un agente patogeno universalmente riconosciuto (EFSA and ECDC, 2015) e individuato dal Decreto Effluenti per la qualificazione del digestato dal punto di vista igienico-sanitario.

Al fine di poter inquadrare tale tema di fondamentale importanza previsto dal succitato decreto nazionale, si riportano di seguito, a titolo esemplificativo, i risultati emersi nell'ambito di indagini condotte su campioni di digestati prodotti in impianti di biogas operativi.

Una importante indagine condotta per un periodo prolungato (8 campionamenti mensili su un arco temporale di 10 mesi) in 6 impianti di biogas operativi in Pianura Padana (Rossi L. et al., 2016, 2017) con le caratteristiche riportate in tabella 5 sono stati effettuati 183 campioni in totale tra digestati allo scarico dai fermentatori, le relative frazioni solide e liquide da separazione meccanica e digestati tal quali o chiarificati in stoccaggio.

Tabella 5 – Caratteristiche dei 6 impianti di biogas (CSTR) operativi in Pianura Padana

	Liquame bovino (%)	Liquame e/o separato solido bovino (%)	Insilati vari (%)	Sottoprodotti (%)	Tempo di ritenzione (giorni)	Regime termico
Impianto 1	59	20	21	-	45-50	Mesofilia
Impianto 2	42	6	39	13	65-70	Mesofilia
Impianto 3	77	23	-	-	30-35	Mesofilia
Impianto 4	26	3	64	7	90-100	Mesofilia
Impianto 5	30	20	43	7	65-70	Termofilia
Impianto 6	91	9	-	-	45-50	Mesofilia

Tabella 6 – Campioni positivi sul totale analizzato alla ricerca di salmonella per impianto/matrice analizzata

	Digestato tal quale	Digestato chiarificato	Digestato solido	Digestato in stoccaggio
Impianto 1	0/8	0/8	0/8	0/8
Impianto 2	0/8	0/5	0/5	0/7
Impianto 3	1/8	1/8	1/8	0/8
Impianto 4	0/8	0/8	0/8	0/12
Impianto 5	0/8	0/6	0/6	0/8
Impianto 6	0/8	1/6	0/8	0/8
TOTALE	1/48	2/41	1/43	0/51

Per quanto riguarda la ricerca della *Salmonella spp.*, i risultati complessivi sono riportati nella tabella 6; la presenza di salmonella è stata rilevata in 4 campioni su un totale di 183 campioni analizzati rappresentati da diverse tipologie di digestato; 3 dei 4 campioni positivi sono relativi allo stesso digestato campionato tal quale e in uscita dal separatore, mentre nei digestati in stoccaggio la salmonella è risultata assente in tutti campioni (Rossi L., 2016).

Una situazione tranquillizzante ed analoga da un punto di vista igienico-sanitaria a quella appena descritta si riscontra anche in uno studio condotto su dieci impianti di biogas in scala reale alimentati con matrici diverse (Orzi, 2014), che ha visto la determinazione non solo di salmonella, ma anche di altri microrganismi patogeni e non.

In un'indagine condotta in un impianto di biogas in scala reale, ubicato in Piemonte (Bonetta, 2010), di tipo completamente miscelato e mesofilo sono state indagate le caratteristiche igienico-sanitarie del digestato ottenuto da liquami bovini in codigestione con residui colturali, con campionamento condotto su di un digestato (1 tal quale, 1 chiarificato e 1 palabile) su un totale di 22 campioni; era invece assente nel digestato in stoccaggio.

Complessivamente, pertanto, si può affermare che, pur partendo da biomasse che possono essere contaminate da microrganismi di varia natura (patogeni e non) come gli effluenti zootecnici di allevamento, la digestione anaerobica migliora comunque lo stato igienico sanitario del flusso di matrici in ingresso. Non vi è alcun dubbio che una regolare ed efficiente gestione del processo biologico di digestione anaerobica, insieme all'adozione di efficienti modalità operative di controllo e gestione dell'impianto di biogas, costituiscono le migliori garanzie per la produzione di un digestato da destinare all'utilizzo agronomico senza timori. La suddetta operazione (distribuzione agronomica del digestato nel terreno), se condotta secondo i principi/indicazioni delle buone pratiche agricole (ripresi in toto dal Decreto Effluenti), non comporta rischi igienico-sanitari aggiuntivi per l'ambiente e la salute dell'uomo.

6 Conclusioni

La possibilità di poter utilizzare in digestione anaerobica, garantendo un'adeguata remunerazione, anche partite non conformi di farina di mais per l'uso mangimistico, che rischierebbero di dover rientrare nella categoria dei "rifiuti" con costi di smaltimento insostenibili per i produttori agricoli, rappresenta da un lato un'importante valorizzazione delle partite di farine di qualità inferiore, in quanto destinate ad uso energetico, evitandone il ritorno nelle filiere alimentari, dall'altro lato favorisce il loro uso in impianti di biogas nel pieno rispetto delle norme vigenti.

A tale proposito si pensi alle farine di mais, non conformi per l'uso zootecnico per una presenza di micotossine superiore ai severi limiti di legge, ma comunque ottimali per la produzione di biogas in condizioni di sicurezza. Il recente studio di CRPA (Rossi L, 2015) ha infatti dimostrato che il comportamento in digestione anaerobica di farine di mais contaminate con AFB1 (la micotossina più pericolosa) sino a 10-20 volte il limite ammesso per uso zootecnico, impiegate in dosi pari al 10% in peso della dieta giornaliera, è del tutto analogo a quello delle farine esenti. Non solo, nonostante la graduale alimentazione con farine contaminate, non sono stati misurati effetti di accumulo; al contrario le concentrazioni di AFB1 misurate nei digestati sono chiaramente inferiori a quelle attese. Sulla base del bilancio di massa complessivo è stata verificata una riduzione in peso di AFB1 variabile dal 62 al 98% della quantità totale caricata grazie al processo biologico di degradazione anaerobia.

Dallo studio è emerso che, grazie all'evoluzione in questi ultimi anni del quadro normativo in materia ambientale ed agronomica (Accordo di filiera interregionale del 2013, Decreto Nazionale Effluenti/Digestato del 2016, Circolare PG/2017/0557035 del 31/07/2017 della Regione Emilia Romagna), vi sia stato da parte di Organismi e Autorità competenti la volontà di individuare una procedura definita e trasparente con la quale favorire la tracciabilità della filiera del biogas partendo dalle biomasse in ingresso (prodotto, sottoprodotto, residuo) fino ad arrivare al digestato in uscita.

L'attuale quadro normativo, insieme al recente studio di CRPA ("Biogas, Clostridi, Micotossine") e alle indicazioni tecniche contenute nelle "Linee guida per il controllo delle micotossine nella granella di mais e di frumento" (MIPAAF, 2015), ha favorito sicuramente l'individuazione di regole certe e trasparenti che regolano la filiera del biogas in ogni fase del processo produttivo e che pertanto ci consentono di trarre le seguenti principali conclusioni:

- le ricerche, sino ad ora condotte, hanno dimostrato una significativa diminuzione della concentrazione delle aflatossine durante la digestione anaerobica. Inoltre, la successiva fase di stoccaggio contribuisce ulteriormente al miglioramento della qualità ambientale del digestato e quindi la distribuzione in campo di digestato non dovrebbe provocare l'aumento di funghi produttori di micotossine nel terreno;
- la Circolare PG/2017/0557035 del 31/07/2017 della Regione Emilia Romagna ha facilitato l'individuazione dei parametri stabiliti dalla giurisprudenza di cui l'operatore può tenere conto per valutare se il materiale costituisca o meno un rifiuto. In particolare, la suddetta circolare ha stabilito che il prodotto ("granoturco in fase di lavorazione") con concentrazioni di aflatossine superiori a 20 ppb potrà essere destinato ad impianti di digestione anaerobica;

- l'ampia diffusione, in questi ultimi anni, dell'avvio a digestione anaerobica del mais ha dato luogo ad una specifica voce nel listino prima della Borsa merci di Bologna e poi di altre sedi, contribuendo a definire il mercato della granella ad uso energetico;
- gli adempimenti normativi previsti dal Decreto Effluenti legati alla classificazione del digestato prodotto tra cui spiccano per importanza i seguenti punti: in sede di presentazione della "comunicazione" occorre dichiarare la tipologia di digestato in funzione delle biomasse in ingresso (prodotti e sottoprodotti di origine vegetale e animale) all'impianto, presso la sede operativa dell'impianto di biogas deve essere compilato e tenuto a disposizione degli Enti di controllo il "registro annuale di consumo delle biomasse", le analisi chimico-fisiche e microbiologiche del digestato;
- i risultati di indagini e di campagne di monitoraggio condotte sia da Centri di ricerca che da Organismo di controllo già citati in precedenza nel presente studio, hanno evidenziato che la digestione anaerobica migliora lo stato igienico-sanitario del flusso delle biomasse in ingresso tali da consentire l'utilizzo di granturco con concentrazioni di aflatossine superiori ai limiti di legge per l'uso alimentare, in una quota massima del 10% del peso totale delle matrici che costituiscono la razione della dieta autorizzativa del biodigestore.

Infine si ricorda che il Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 25 febbraio 2016 (Decreto Effluenti) sia già stato recepito con l'emanazione delle recenti normative regionali sia dalla Regione Lombardia (Delibera Giunta regionale 18 luglio 2016 - n. X/5418) che dalla Regione Veneto (DELIBERAZIONE DELLA GIUNTA REGIONALE n. 1835 del 25 novembre 2016), mentre per quanto riguarda la Regione Emilia Romagna il nuovo regolamento attuativo risulta ancora in fase di bozza di aggiornamento, il cui testo definitivo verrà pubblicato probabilmente all'inizio dell'Anno 2018. Tuttavia si precisa che la succitata bozza recepisce in toto i criteri e le norme tecniche generali previste dal Decreto Effluenti, la cui trattazione è stato oggetto di descrizione e di sintesi nei precedenti capitoli dello studio.

7 Bibliografia

- ARPA Emilia-Romagna Sez. Bologna (2014). Monitoraggio conoscitivo della composizione chimico-fisica e microbiologica del digestato prodotto da impianti a biogas.
- ARPA Emilia-Romagna (2016). Monitoraggio della composizione analitica del digestato prodotto da impianti a biogas “Esiti delle attività di monitoraggio. Anno di riferimento 2015”.
- ARPAV Regione Veneto (2013). Caratteristiche del digestato da impianti di digestione anaerobica. Campagna di monitoraggio maggio-settembre 2013.
- Bezzi G., Banzato D. (2016). Il nuovo decreto interministeriale uniforma le regole a livello nazionale: utilizzo agronomico del digestato. *Biogas Informa* N. 16-2016.
- Bonetta S. et al. (2010). Hygienic and physico-chemical characterisation of digested products from anaerobic co-digestion of cattle slurry and agricultural by-products. *Proceeding Venice 2010. Third International Symposium on Energy from Biomass and Waste.*
- EFSA, EDC (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 2015.
- Horan N.H. et al. (2004). Die-off of enteric bacterial pathogens during mesophilic anaerobic digestion. *Water Research* 38.
- Kearney T. et al. (1993). The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. *Journal of Applied Microbiology.*
- Olsen J.E., Larsen H.E. (1987). Bacterial decimation time in anaerobic digestion of animals slurry. *Biological Wastes* 21.
- Orzi V. et al. (2014). La digestione anaerobica riduce patogeni e odori. *Terra e Vita* N. 8-2014.
- Reyneri A. et al. (2015). Linee guida per il controllo delle micotossine nella granella di mais e frumento. Ministero delle politiche agricole, alimentari e forestali - Dip.to delle politiche competitive, della qualità agroalimentare, ippiche e della pesca.
- Rossi L. Mantovi P. (2012). Il digestato, un utile sottoprodotto del biogas. *Opuscolo Conoscere per Competere*, Settembre 2012.
- Rossi L. et al. (2016). Biogas, stato igienico-sanitario dei digestati agrozootecnici. *L'Informatore Agrario* N. 43/2016.
- Rossi L. et al. (2017). Clostridi, convivenza possibile tra biogas e prodotti dop. *L'Informatore Agrario* N. 3/2017.
- Rossi L., Carnevali G. (2016). Digestati agro-zootecnici, nessun rischio per la sicurezza alimentare. *Agricoltura Regione Emilia-Romagna - Supplemento* N. 60/2016.

Rossi L. et al. (2017). Linee guida per l'uso agronomico del digestato: il campionamento e la caratterizzazione qualitativa ai sensi del Decreto 25 Febbraio 2016. Biogas Informa - Supplemento N. 21-2017.

Sahlstrom L. (2003). A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. Bioresources Technologies 87.

Smith S.R. et al (2005). Factors controlling pathogen destruction during anaerobic digestion of biowastes. Waste Management 25.

Gruppo Operativo: MICOntrollo

AZIONE 5 - INTEGRAZIONE FILIERA CEREALICOLA E FILIERA BIOGAS: MICOTOSSINE E PRODOTTI CONFORMI PER BIODIGESTORI

*Documento integrativo a supporto del
quadro normativo che regola l'utilizzo
agronomico del digestato a livello regionale*

<p>Committente</p>  <p>C.R.P.A.</p>	<p><i>Centro Ricerche Produzioni Animali – C.R.P.A. S.p.A. Viale Timavo, 43/2 – Reggio Emilia 42121 – Italy Tel. +39.0522.436999 – Fax +39.0522.435142</i></p>
<p>Tecnico</p> 	<p><i>Consorzio Interprovinciale Cooperative Agricole -C.I.C.A. Via delle Lame, 118 – Bologna 40122 – Italy Tel. +39.051.520330 - Fax +39.051.520054</i></p>
<p>Bologna, Aprile 2019</p>	

Lo scopo principale del documento integrativo è quello di fornire un aggiornamento normativo a livello regionale riguardo l'uso agronomico del digestato a seguito dell'entrata in vigore della Determina n. 19993 del 30/11/2018 (Precisazioni e ulteriori norme tecniche in materia di utilizzazione agronomica degli effluenti d'allevamento, del digestato e delle acque reflue REGOLAMENTO DI GIUNTA REGIONALE 15 DICEMBRE 2017, N.3) e della DET-2018-530 del 21/06/2018 (Approvazione della Circolare interna recante la Linea Guida 33/DT "Modalità di esecuzione del prelievo dei campioni di digestato in base al Decreto interministeriale n. 5046/2016").

La Determina n. 19993 del 30/11/2018 nasce dall'esigenza di mettere a disposizione degli operatori del settore chiarimenti e precisazioni che si sono resi necessari a seguito dei primi mesi di applicazione del Regolamento di Giunta Regionale n. 3 del 15 dicembre 2017, nonché ulteriori norme tecniche in grado di favorire la corretta utilizzazione agronomica di effluenti di allevamento ed altri fertilizzanti azotati, in merito ai seguenti punti:

- periodi di divieto della distribuzione;
- registro delle fertilizzazioni e cessione dei fertilizzanti;
- comunicazione;
- cessione a terzi degli effluenti di allevamento e di digestato e disponibilità dei terreni per l'espletamento delle fasi di utilizzazione agronomica (individuazione di una modulistica ad hoc da impiegare e da inviare agli Enti);
- redazione del P.U.A. (Piano Utilizzo Agronomico).

Tra la principale novità normativa spicca per importanza quella di stabilire che, per le Zone Non Vulnerabili da Nitrati, il periodo di divieto di distribuzione agronomica dei liquami e del digestato non palabile su prati e medicaie dal terzo anno d'impianto sia continuativo dal 1 dicembre al 31 dicembre e nel mese di gennaio sia sospeso sulla base dei bollettini agrometeorologici predisposti dalla Regione, con riferimento ai dati forniti dall'Agenzia regionale per la prevenzione, l'ambiente e l'energia dell'Emilia-Romagna, e pubblicati sul sito internet della stessa Agenzia.

Tale esigenza agronomica deriva dal fatto che, negli ultimi anni l'andamento meteorologico si è spesso discostato dal punto di vista termo-pluviometrico dalle medie pluriennali del recente passato soprattutto in termini di entità, concentrazione e frequenza delle precipitazioni.

In particolare, i bollettini agrometeorologici predisposti da Arpae nel periodo autunno-invernale (da novembre a febbraio) contengono una sezione specifica denominata "Bollettino Nitrati" che fornisce indicazioni sui divieti di distribuzione dei fertilizzanti azotati e sull'ammissibilità delle distribuzioni, che si basano sulla valutazione del contenuto idrico dei suoli e dell'entità delle precipitazioni osservate e previste, per aree omogenee individuate a livello regionale.

Una ulteriore precisazione riguardo la redazione e tenuta del PUA stabilisce che nel suddetto documento normativo si possa utilizzare il titolo di azoto del digestato riportato nella comunicazione preventiva oppure in alternativa quello desunto dall'ultima determinazione analitica effettuata prima della redazione del PUA (entro il 31 marzo di ogni anno solare).

Nel corso dell'anno non è possibile utilizzare una fonte del dato diversa da quella già assunta a riferimento. Inoltre, in caso di modifica della dieta di alimentazione dell'impianto di digestione anaerobica, dovrà essere utilizzato comunque il dato risultante dalla comunicazione aggiornata o quello desunto dalla relativa determinazione analitica.

L'Allegato contenuto nella Determina n. 19993 del 30/11/2018 individua in maniera puntuale il "Quadro sinottico degli adempimenti previsti dal Regolamento regionale" per le ZONE VULNERABILI e le ZONE ORDINARIE al fine di riassumere per ciascuna tipologia aziendale (impianti di biogas, aziende agro-zootecniche, aziende senza allevamento o biogas che utilizzano effluenti/digestato) le seguenti prescrizioni normative:

- la documentazione da trasmettere all'autorità competente (Comunicazione, eventuale contratto fornitura effluenti/ digestato, eventuale contratto disponibilità terreni);
- la documentazione da conservare presso l'azienda (PUA, Registro fertilizzazioni e relativa cartografia, contratti terreni in affitto o disponibilità, eventuale contratto fornitura effluenti/digestato);
- le condizioni operative (limiti di distribuzione dell'azoto di origine zootecnica e MAS della coltura).

Tra i documenti citati nel suddetto Allegato da inserire nella comunicazione, in relazione all'utilizzazione agronomica, sono compresi anche i contratti di disponibilità dei terreni utilizzati per lo spandimento del digestato/effluenti che non siano in conduzione all'impresa agricola. In considerazione della frequenza con cui tali "atti di assenso" sono modificati o aggiornati, la suddetta indicazione garantisce una maggiore tracciabilità dei materiali destinati all'utilizzazione agronomica.

L'Allegato, inoltre, cita tra i documenti e gli elaborati tecnici sull'utilizzazione agronomica da conservarsi presso una sede aziendale, sia per il produttore che per il detentore anche i contratti di cessione degli effluenti/digestato.

La presenza in azienda degli atti di assenso e degli accordi di cessione a terzi di quote di digestato/effluenti costituiscono un adempimento minimo per mantenere la tracciabilità del materiale.

Infine, l'Allegato precisa che l'utilizzazione agronomica del digestato e degli effluenti zootecnici di allevamento debba avvenire in conformità ai fabbisogni quantitativi e temporali delle colture.

Pertanto, viene confermato che per poter effettuare l'utilizzazione agronomica del digestato è necessario sempre considerare e rispettare il fabbisogno e la dinamica di assorbimento dell'azoto da parte delle colture.

Non vi è alcun dubbio che con queste precisazioni e definizioni normative, la Regione Emilia-Romagna fornisca agli operatori di settore una procedura di redazione e gestione dei documenti aziendali in materia ambientale con lo scopo di favorire la corretta applicazione del nuovo Regolamento Regionale n. 3 del 15-12-2017.

La seconda importante normativa (DET-2018-530 del 21/06/2018 - Approvazione della Circolare interna recante la Linea Guida 33/DT "Modalità di esecuzione del prelievo dei campioni di digestato in base al Decreto interministeriale n. 5046/2016") sulla quale ci soffermeremo brevemente riguarda le modalità di esecuzione del prelievo dei campioni di digestato in base al **Decreto interministeriale n. 5046/2016**.

La finalità della Linea Guida è quello di fornire criteri omogenei per l'esecuzione, il trasporto e la consegna di campioni di digestato effettuati per l'analisi chimica e microbiologica da parte degli Operatori di Arpa Emilia-Romagna. L'obiettivo principale dell'operazione di campionamento è quello di prelevare un "campione" in modo tale che sia rappresentativo della massa da analizzare (digestato di origine agro-zootecnico o di origine agro-industriale) in termini di caratteristiche chimiche, fisiche e microbiologiche. Con il termine di modalità di campionamento si intendono l'insieme delle procedure e operazioni che vanno dal momento del prelievo del campione allo svolgimento delle analisi in laboratorio.

Le procedure operative descritte nella Linea Guida 33/DT si articolano nei seguenti punti

- Definizioni: impianto di digestione anaerobica, impianti aziendali, impianti interaziendali, digestato agro-zootecnico, digestato agro-industriale; campione, utilizzazione agronomica;
- Campione di digestato: il campione prelevato è costituito dal digestato tal quale, ovvero non ancora sottoposto alla separazione delle frazioni solide dal mezzo liquido, oppure il campione può essere costituito da entrambe le frazioni (digestato non palabile chiarificato e digestato palabile);
- Punto di campionamento: il campione da prelevare deve essere rappresentativo del materiale oggetto di verifica; ove possibile, è preferibile effettuare il prelievo all'uscita del post digestore;
- Apparecchiature e attrezzature: gli strumenti necessari al campionamento (contenitori, buste, forbici, flambatore, ecc.) devono essere costituiti da materiali che non possano alterare le caratteristiche del campione di digestato prelevato;

- Modalità di prelievo del campione dall'ugello: se possibile, il prelievo del campione viene effettuato direttamente dall'ugello posizionato sul digestore sia per i parametri chimici che microbiologici. Nel caso di digestori posti in serie tra loro, il campione di digestato tal quale deve essere prelevato all'uscita dell'ultimo post-digestore; nel caso di digestori indipendenti, il campione deve essere rappresentativo di ogni digestato (digestori primari posti in parallelo), pertanto si dovrà prelevare un campione per ogni singolo digestore;
- Trasporto e conservazione del campione: il tempo che intercorre tra il prelievo e l'analisi deve essere il più breve possibile. Tutti i campioni devono essere trasportati in idonei contenitori frigoriferi (portatili o carrellati), con temperatura compresa tra +2°C e +8°C;
- Conformità dei risultati: qualora i risultati analitici per i **parametri chimici** dovessero superare le concentrazioni previste nel DM n. 5046/2016, il digestato ricade nell'ambito di applicazione delle disposizioni di cui alla Parte Quarta del D.Lgs. n. 152/06. In base all'Allegato IX del DM n. 5046/2016, tutti e cinque i campioni prelevati per la verifica della presenza di salmonella (**parametri microbiologici**) devono confermare l'assenza. Qualora i risultati del campionamento effettuato dall'ugello per la verifica del parametro microbiologico, dovessero avere esito positivo alla presenza della salmonella, occorre eseguire un ulteriore campionamento di verifica del digestato nella vasca di stoccaggio. Il suddetto campionamento potrà non essere effettuato nel breve periodo, tuttavia in nessun caso il digestato, in attesa della verifica per il rispetto dei parametri microbiologici, può essere distribuito agronomicamente in pieno campo;
- Inserimento attività in SINADOC;
- Indicazioni di sicurezza per gli operatori della Sezione di Arpae.

Le modalità operative di prelievo e gestione del campione del digestato si riassumono nelle seguenti quattro (n. 4) fasi:

1. lasciare defluire il digestato;
2. igienizzare per quanto possibile il punto di prelievo;
3. flussare di nuovo;
4. prelevare il campione con attrezzatura adeguatamente pulita.

Preferibilmente il campionamento del digestato deve essere prelevato durante il periodo di divieto allo spandimento, al fine di ricevere i risultati analitici che ne attestino la conformità, prima del suo impiego agronomico in campo. Deve essere prelevato un campione di digestato almeno ogni 15 minuti per un totale di n. 5 campioni. Una volta confezionato ogni campione, si dovrà procedere con la compilazione del verbale di campionamento (allegato 1 della DET-2018-530 del

21/06/2018) che dovrà essere illustrato al personale dell'impianto presente al momento del campionamento.

In conclusione, possiamo affermare che gli Enti della Regione Emilia-Romagna (DIREZIONE GENERALE CURA DEL TERRITORIO E DELL'AMBIENTE e Arpae) con l'emanazione nell'anno 2018 delle due norme precedentemente descritte abbiano contribuito a favorire l'interpretazione e l'applicazione del Decreto interministeriale n. 5046/2016 (Decreto Effluenti) sia da un punto di vista ambientale che agronomico al fine di consentire agli operatori di settore la corretta produzione (matrici in ingresso consentite), gestione (capacità di stoccaggio e periodi di divieto) e distribuzione (livello di efficienza di spandimento) del digestato.