



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in Scienze Agrarie, Alimentari, Forestali e Ambientali (D028)
Curriculum: Tutela del Territorio e Valorizzazione delle Produzioni Agroalimentari
Dipartimento Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali (SAAF)
Patologia Vegetale (AGR/12)

**ASPERGILLI CONTAMINANTI DERRATE AD USO UMANO
E ZOOTECNICO: attività enzimatica, tecniche diagnostiche
innovative e possibili strategie di difesa biologica.**

IL DOTTORE
GIULIA MIRABILE

IL COORDINATORE
CHIAR.MO PROF. VINCENZO BAGARELLO

IL TUTOR
PROF. SALVATORE DAVINO

CO TUTOR
PROF. LIVIO TORTA

INDICE

PREMESSA.....	5
CAPITOLO 1: ANALISI DI DERRATE ALIMENTARI E ALLESTIMENTO DELLA COLLEZIONE DI ASPERGILLUS SPP.	7
1.1. CONTAMINAZIONE DEGLI ALIMENTI	7
1.2 FUNGHI MICOTOSSINOGENI E MICOTOSSINE	9
1.3. CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE: PRINCIPALI REGOLAMENTI	12
1.3.1. Regolamento CE n.1881/2006, sui “tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari”.....	12
1.3.2. Il Reg. (CE) N. 401/2006 sui “metodi di campionamento e di analisi”	12
1.4. IL GENERE ASPERGILLUS	14
1.5. SCOPO DEL LAVORO.....	18
1.6. MATERIALI E METODI	19
1.6.1 Campionamento	19
1.6.2 Allestimento substrati agarizzati	22
1.6.3. Preparazione campioni	23
1.6.4. Diluizioni seriali.....	23
1.6.5. Semina in piastra.....	23
1.6.6. Conta, isolamento e mantenimento in purezza delle colonie fungine.....	23
1.6.7. Identificazione morfologica	24
1.6.8 Identificazione molecolare	25
1.6.9. Rilevazione della produzione di micotossine su substrato agarizzato.....	26
1.7. RISULTATI	28
1.7.1 Contaminazione alimenti ad uso zootecnico.....	28
1.7.2. Contaminazione materie prime	28
1.7.3 Identificazione e allestimento della collezione	29
1.7.4. Rilevazione della produzione di aflatossine su substrato agarizzato.....	32
1.8. DISCUSSIONI.....	33
CAPITOLO 2: DETERMINAZIONE DELL’ATTIVITÀ LIGNOCELLULOSOLITICA DI CEPPI DI ASPERGILLUS	35
2.1. FUNGHI COINVOLTI NELLA DEGRADAZIONE DELLA PARETE CELLULARE	35
2.2. ENZIMI PRODOTTI DAL GENERE ASPERGILLUS.....	35
2.3. SCOPO DEL LAVORO	38
2.4. MATERIALI E METODI	39
2.4.1. Analisi qualitativa dell’attività cellulolitica degli aspergilli isolati.....	39
2.4.2. Analisi quantitativa dell’attività cellulolitica.....	39

2.4.3	Analisi qualitativa dell'attività ligninolitica.....	42
2.4.4.	Determinazione concentrazione di proteine.....	43
2.4.5.	Valutazione della degradazione della componente cellulosa	43
2.5.	RISULTATI	44
2.5.1.	Analisi qualitativa dell'attività cellulolitica degli aspergilli isolati.....	44
2.5.2	Attività quantitativa di endo- ed eso- β -1,4-gluconasi	46
2.6.	DISCUSSIONI.....	50
CAPITOLO 3: MESSA A PUNTO DI SAGGI LAMP (LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION) PER IL RAPIDO RILEVAMENTO DI ASPERGILLI IN DERRATE CONTAMINATE.....		52
3.1.	METODI MOLECOLARI PER IL RILEVAMENTO DI ASPERGILLI POTENZIALMENTE MICOTOSSINOGENI	52
3.2.	NUOVE STRATEGIE DIAGNOSTICHE: LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP)	53
3.2.1.	Schema di reazione LAMP	54
3.3.	SCOPO DEL LAVORO	58
3.4.	MATERIALI E METODI	59
3.4.1.	Scelta delle regioni target da amplificare	59
3.4.2.	Amplificazione PCR con primer specifici	59
3.4.3.	Purificazione del prodotto PCR e ottenimento della sequenza target ITS	60
3.4.4.	Disegno dei primer LAMP e messa a punto della reazione	60
3.4.5.	Specificità e sensibilità dei saggi LAMP	61
3.4.6.	Applicazione del saggio LAMP su campioni artificialmente contaminati e commerciali	62
3.4.7.	PCR.....	63
3.4.8.	Saggio ELISA su campioni commerciali	63
3.5.	RISULTATI	63
3.5.1.	Disegno dei primers	63
3.5.2.	Specificità della reazione LAMP	64
3.5.3.	Sensibilità del saggio LAMP e applicazione in derrate commerciali.....	64
3.5.4.	Confronto tra saggio LAMP e PCR tradizionale	68
3.5.5.	Saggio ELISA su campioni commerciali	69
3.6.	DISCUSSIONI.....	70
CAPITOLO 4: CONTROLLO BIOLOGICO DI ASPERGILLUS SPP.		73
4.1.	DIFESA BIOLOGICA	73
4.2.	SCOPO DEL LAVORO	75
4.3.	MATERIALI E METODI	76
4.3.1.	Selezione di aspergilli e microrganismi antagonisti da testare.....	76

4.3.2. Coltura duale	76
4.3.3. Substrato avvelenato con <i>T. harzianum</i> T22	77
4.3.4. Prove <i>in vivo</i> con <i>T. atroviride</i> P1.....	77
4.3.5. Prove in Bioscreen con <i>B. amyloliquefaciens</i> AG1	78
4.4. RISULTATI	79
4.4.1. Coltura duale	79
4.4.2. Substrato avvelenato con <i>T. harzianum</i> T22.....	83
4.4.3. Prove <i>in vivo</i> con <i>T. atroviride</i> P1.....	83
4.4.4. Saggi di antagonismo con <i>B. amyloliquefaciens</i> AG1 in Bioscreen	85
4.5. DISCUSSIONI.....	87
CAPITOLO 5: CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	89
BIBLIOGRAFIA	91
ALLEGATO 1. LISTA PUBBLICAZIONI	104
RINGRAZIAMENTI.....	106

PREMESSA

La contaminazione da parte di funghi filamentosi, comunemente conosciuti come “muffe”, è considerata, ad oggi, la principale causa di deterioramento degli alimenti all’interno della filiera agroalimentare. Si tratta di organismi chemioeterotrofi in grado di adattarsi facilmente a diverse condizioni ambientali e accrescersi su una grande varietà di substrati, compresa materia organica non vivente (Snyder et al., 2019). La presenza di microrganismi fungini negli alimenti, oltre che ad essere causa del decadimento qualitativo della derrata contaminata, può risultare, a volte, estremamente pericolosa per la salute dei consumatori. Ad alcuni generi fungini, infatti, vengono sempre più frequentemente associati casi di intossicazioni, più o meno gravi, sia nell’uomo che negli animali. Tali fenomeni, conosciuti come micotossicosi, sono dovuti alla presenza, nel substrato contaminato, di micotossine, metaboliti tossici secondari prodotti principalmente dai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Sebbene vengano sintetizzate, nella maggior parte dei casi, durante la fine della fase di crescita esponenziale del fungo, ad oggi la loro produzione non risulta collegata a nessun fenomeno biologico coinvolto nello sviluppo e nella crescita dei funghi (Kabak et al., 2006).

Oltre che a danni diretti per la salute del consumatore, le perdite economiche dovute a questo tipo di contaminazione rappresentano un problema di interesse globale. La FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations) ha infatti stimato che il 25% delle colture nel mondo risultano contaminate da micotossine e che le perdite di cibo ammontano a circa un bilione di tonnellate per anno (FAO, 2001). Se fino ad oggi maggiore attenzione è sempre stata posta nei confronti delle micotossine presenti nelle derrate, relativamente poco si conosce sui funghi che le producono e sui danni che essi provocano una volta che si sviluppano nei substrati colonizzati. Come riportato da alcuni Autori, si ritiene opportuno effettuare controlli sulle contaminazioni fungine lungo tutte le fasi delle filiere produttive, già a partire dalle materie prime, evitando, così, che le micotossine entrino nella catena alimentare (De Saeger, 2011).

Sulla base di queste premesse, nell’ambito del triennio di Dottorato è stata condotta una ricerca inerente alle tematiche della contaminazione fungina in alimenti ad uso umano e zootecnico, focalizzando, in dettaglio, il genere *Aspergillus*. A questo genere, infatti, appartengono alcune delle specie potenzialmente micotossinogene più indagate in ambito agroalimentare, fortemente ubiquitarie e attive nella produzione di enzimi litici che degradano i substrati colonizzati. I risultati dell’indagine sono riportati nel presente elaborato, che si articola nei seguenti 4 capitoli.

Nel primo capitolo sono trattate le analisi preliminari condotte su derrate alimentari ad uso umano e zootecnico per la valutazione del loro stato igienico-sanitario, inteso come contaminazione totale da muffe e, in particolare, da *Aspergillus*. Tale indagine preliminare ha previsto la caratterizzazione delle specie più frequentemente isolate tramite saggi di identificazione morfologica e molecolare e l'allestimento di una collezione di aspergilli utilizzati per le successive prove.

Considerata l'elevata capacità dei funghi del genere *Aspergillus* di degradare in maniera irreversibile i substrati colonizzati, nel secondo capitolo sono state riportate le analisi condotte per rilevare l'attività enzimatica dei ceppi in collezione mediante saggi di tipo qualitativo e quantitativo, indagando in maniera più approfondita l'attività dei complessi cellulolitici di endo- ed eso-glucanasi.

Il terzo capitolo riguarda la messa a punto di saggi di rapido rilevamento di aspergilli potenzialmente micotossinogeni in derrate contaminate. In particolare, l'obiettivo è stato quello di sviluppare un saggio LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) utilizzando come microrganismo target *A. flavus*, specie fungina nota in letteratura per la produzione di pericolose tossine e frequentemente isolata da derrate sia ad uso umano che zootecnico. Questo saggio, infatti, può ridurre notevolmente i tempi di analisi e semplificare il monitoraggio di questo fungo nella filiera agroalimentare.

Infine, nel quarto capitolo, sono descritte alcune prove preliminari di biocontrollo tramite l'impiego di microrganismi antagonisti contro isolati di *Aspergillus* in collezione, tra quelli potenzialmente micotossinogeni e più attivi nella produzione di enzimi.

CAPITOLO 1: ANALISI DI DERRATE ALIMENTARI E ALLESTIMENTO DELLA COLLEZIONE DI *ASPERGILLUS* SPP.

1.1. CONTAMINAZIONE DEGLI ALIMENTI

La sicurezza alimentare rappresenta, oggi, uno dei principali fondamenti per il mantenimento di elevati livelli di benessere, sia per l'uomo che per gli animali. A tal proposito, a livello internazionale, un'attenzione sempre crescente è posta nei riguardi di eventuali agenti di contaminazione, ossia: "qualsiasi sostanza aggiunta non intenzionalmente nell'alimento, ma che sia presente in esso come risultato del processo produttivo (comprese le operazioni effettuate in agricoltura, in allevamento e nella medicina veterinaria) e dei processi di fabbricazione, trasformazione, preparazione, trattamento, imballaggio, trasporto o conservazione di tale alimento, o in seguito alla contaminazione ambientale (Codex Alimentarius)". Tali contaminanti, di natura abiotica o biotica, possono essere, i primi, chimici o fisici, quali antibiotici, pesticidi, metalli pesanti, ecc., i secondi, virus, batteri, funghi, protozoi, ecc. In particolare, i microrganismi contaminanti dannosi per il "consumatore" (uomo o animale) presentano un alto grado di adattabilità a diverse condizioni ambientali e le caratteristiche proprie degli alimenti ne favoriscono la colonizzazione e lo sviluppo. La contaminazione da microrganismi può avvenire in maniera diretta, per contatto, o indiretta nel caso in cui siano veicolati da aria, acqua, suolo e altri vettori come insetti e animali, uomo incluso. Da non sottovalutare è anche la contaminazione crociata che si verifica tramite il passaggio di microrganismi da alimenti contaminati ad altri non infetti (per via umana, attraverso utensili e macchinari, ecc.) (Fleetwood et al., 2019). La contaminazione può avvenire, dunque, in campo o durante il trasporto, la conservazione, la manipolazione e la trasformazione, soprattutto qualora vengano applicate in campo non razionali tecniche di coltivazione e sussistano scarse condizioni igieniche del personale, delle attrezzature e dei locali nel post raccolta (Valero et al., 2017).

Recentemente, particolare attenzione è posta alla contaminazione da muffe in derrate alimentari ad uso umano e zootecnico, che rappresenta un problema di vastissime proporzioni sia per le produzioni agricole primarie, sia per le industrie trasformiere, sia per aziende zootecniche (Dagnas e Membré, 2013). Grazie alla produzione di ingenti masse di propaguli asessuali facilmente veicolati dall'aria, questi microrganismi, sono in grado di raggiungere qualsiasi substrato. Le derrate alimentari, in particolare quelle costituite prevalentemente da cereali (mais, frumento, orzo, avena, ecc.), rappresentano i substrati

ideali per la crescita di tali microrganismi, che utilizzano come fonte trofica i vari composti organici in essi presenti (Viegas et al., 2016). Sono diversi i fattori che favoriscono l'instaurarsi delle muffe e la successiva colonizzazione delle derrate alimentari. Oltre ai fattori intrinseci, legati cioè alle caratteristiche del ceppo fungino, i parametri ambientali chimico-fisici, sono quelli che maggiormente ne influenzano lo sviluppo. Tra questi si annoverano: l'umidità, l'attività dell'acqua e la temperatura. I funghi prediligono per il loro sviluppo, in genere, condizioni di umidità elevata, inoltre, l'acqua è spesso un elemento indispensabile per la diffusione di propaguli infettivi (Belli et al., 2016). Un altro aspetto fondamentale è la cosiddetta attività dell'acqua (a_w), ossia il rapporto tra la pressione di vapore di un dato substrato e la pressione di vapore dell'acqua allo stato puro. A questo parametro viene quindi spesso associato il concetto di acqua libera, intesa come quantità di acqua presente in un substrato che non risulta coinvolta in legami chimici e che quindi è facilmente utilizzabile dai microrganismi per espletare le loro attività biologiche. Solitamente la maggior parte dei miceti è in grado di svilupparsi con $a_w=1$, solo i cosiddetti funghi xerofili (adattati ad ambienti ad elevata pressione osmotica), invece, riescono a colonizzare il substrato con valori al di sotto di 0.80 (Assante e Vercesi, 2016). Per quel che riguarda la temperatura, le esigenze termiche variano a seconda delle specie. Troviamo infatti funghi psicrofili con optimum di crescita a circa 10 °C, funghi mesofili che crescono a temperature ottimali comprese tra 18 e 28 °C e minimi termici di 8 °C ed infine funghi termofili che si sviluppano a temperature superiori di 30 °C con optimum che oscilla tra 55 e 65 °C (Belli, 2016). Il verificarsi di queste particolari condizioni ambientali favorisce quindi l'instaurarsi delle muffe nelle derrate, che subiscono alterazioni organolettiche, decadimento qualitativo e perdita di "shelf life". La presenza di contaminanti micotici è infatti associata ad una decomposizione delle componenti chimiche degli alimenti come l'idrolisi ad attività enzimatica delle proteine e degli amminoacidi (Castor e Frederiksen 1981), la diminuzione del contenuto di grassi a causa di lipasi fungine (Bartov et al., 1982; Mannion et al., 1987) e idrolisi dell'amido. Oltre ad un decadimento delle componenti chimiche, gli alimenti contaminati subiscono danni di tipo organolettico come variazione di colore, marciumi, imbrunimenti e comparsa di cattivi odori e sapori (La Guerche et al., 2006).

Tra le numerosissime specie fungine contaminanti le derrate alimentari, studiate sia per la loro attività degradativa, che per la loro produzione di micotossine quelle più ricorrentemente riportate in letteratura afferiscono ai generi *Alternaria*, *Aspergillus*,

Penicillium, Claviceps, Fusarium, Cladosporium, Botrytis, Rhizopus, Trichoderma, Verticillium.

1.2 FUNGHI MICOTOSSINOGENI E MICOTOSSINE

Ai generi fungini che ricorrentemente contaminano e degradano gli alimenti, appartengono alcune specie che, in determinate condizioni di temperatura e umidità, sono in grado di produrre metaboliti secondari noti come micotossine, pericolose molecole agenti di danni anche gravi alla salute di chi le consuma. Il termine micotossine è stato coniato nel 1962 a seguito di una inusuale crisi veterinaria, verificatasi nei pressi di Londra, che portò alla morte di più di 100 000 tacchini. Questo fenomeno fu inizialmente denominato “*Turkey X disease*” e solo successivamente fu collegato alla contaminazione di farina di arachidi da parte di metaboliti tossici secondari prodotti da *Aspergillus flavus* (Zain, 2011). Ad oggi si conoscono più di 300 tipi di micotossine. Sono molecole che non hanno importanza biochimica per la crescita e lo sviluppo dei funghi che le producono ma, tuttavia, appartengono ad una grande varietà di sostanze chimiche (Dinis et al., 2007). Hanno peso molecolare compreso tra 200 e 500 u.m.a (unità di massa atomica), sono facilmente diffusibili e resistenti al calore (Whitlow et al., 2010). Le micotossine che hanno sicuramente un impatto maggiore sulla salute di uomo e animali e sul sistema agro-economico includono le aflatossine (AF), le ocratossine (OT), i tricoteceni, lo zearalenone (ZEN) e le fumonisine (F). L’elevata concentrazione negli alimenti di tali molecole può provocare effetti acuti come rash cutanei, allucinazioni, problemi all’apparato digerente, emorragie, ecc., mentre l’assunzione di piccole dosi prolungata nel tempo può avere effetti sulla salute nel lungo periodo. Alcune di esse sono infatti note per la loro attività cancerogena, teratogena e mutagena, oltre che per i danni che provocano a reni, fegato e al sistema immunitario (Sforza et al., 2006). Così come i funghi contaminanti, anche le loro micotossine possono riscontrarsi nelle derrate alimentari durante tutte le fasi della filiera. I principali generi fungini produttori di micotossine sono *Aspergillus, Alternaria, Claviceps, Fusarium, Penicillium* e *Stachybotrys* (Bennett e Klich, 2003). Sulla base della loro cancerogenicità per l’uomo e per gli animali, l’International Agency for Research on Cancer (IARC) ha classificato le micotossine in 3 gruppi (IARC, 1993a-b):

- gruppo 1 → aflatossine B1, B2, G1 e G2. Sono tossine con accertato effetto cancerogeno sull’uomo e sono prodotte da funghi del genere *Aspergillus*;
- gruppo 2B → aflatossine M1, M2, ocratossina A (OTA), fumonisine B1 e B2. Sono accertate come cancerogene per gli animali e possibili cancerogene per l’uomo e

sono prodotte da alcune specie di *Aspergillus* (aflatossine e ocratossine), *Penicillium* (OTA) e *Fusarium* (fumonisine);

- gruppo 3 → zearalenone e tricoteceni, micotossine non classificabili per la cancerogenicità sull'uomo prodotte da funghi appartenenti al genere *Fusarium*.

Va comunque sottolineato che non tutte le specie appartenenti ai generi sopra citati e non tutti i ceppi della stessa specie, sono in grado di produrre questo tipo di metaboliti e quindi la presenza di muffe su derrate alimentari non è sempre indice di contaminazione da micotossine (Bottalico et al., 2002) (Tabella 1); al contrario, invece, è possibile che alimenti trasformati e non, possano non contenere strutture fungine ma essere contaminati da micotossine, dando luogo a quello che viene definito “effetto *carry over*”, un fenomeno di contaminazione indiretta che consiste nel passaggio di residui di micotossine, o loro metaboliti, nei prodotti che derivano da animali alimentati con mangimi contaminati (Henry et al., 2001).

Tabella 1 – Percentuale media di ceppi produttori di micotossine nell'ambito di specie fungine tossigene (Bottalico et al., 2002).

Specie	Micotossina prodotta	% media di ceppi produttori
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatossina B1 e B2	45
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatossine B e G	92
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratossina A	17
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ocratossina A	62
<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenone	93
<i>Fusarium culmorum</i>	Deossinivalenolo (DON)	63
<i>Fusarium verticilloides</i>	Fumonisina	100
<i>Fusarium proliferatum</i>	Fumonisina	100

La quasi totalità di derrate alimentari può essere contaminata da funghi micotossinogeni e dalle loro micotossine. Le aflatossine, per esempio sono spesso riscontrate in mais e frutta secca, mentre le ocratossine, e in particolare l'OTA, in cereali, vino, spezie. Altri alimenti di interesse sono anche fagioli, caffè, cacao, birra, pane e prodotti da forno, succhi di frutta, carne e latte (Milicevic et al., 2010). Qualora le derrate siano contaminate da muffe micotossinogene, anche in seguito a trattamenti tecnologici in grado di disattivarle la presenza delle loro micotossine può essere rilevata all'interno dell'alimento. E' importante sottolineare, infatti, che molti procedimenti normalmente impiegati durante la lavorazione

degli alimenti, come ad esempio pastorizzazione e sterilizzazione o cotture domestiche, non sono in grado, salvo pochissime eccezioni, di eliminare del tutto le tossine presenti nelle derrate (Ryu et al., 2008)

Inoltre, ciò che rende particolarmente difficoltoso ridurre il rischio da contaminazione di micotossine è la molteplicità di fattori che influiscono sulla produzione o sulla presenza di esse in alimenti e mangimi. Questi fattori sono di natura fisica, chimica e biologica e agiscono in maniera interdipendente influenzando sia la colonizzazione fungina che la produzione di metaboliti tossici (D'Mello e MacDonald, 1997). I fattori fisici includono tutte le condizioni ambientali come temperatura, umidità relativa, attività dell'acqua e presenza di insetti che veicolano muffe contaminanti. Stress come la siccità, aumento di temperatura e di umidità relativa possono alterare in maniera selettiva la colonizzazione e il metabolismo di funghi micotossinogeni e quindi alterare la produzione di micotossine (Russel et al., 1991). I fattori chimici includono l'uso di fungicidi e/o fertilizzanti, mentre i fattori biologici si basano sull'interazione tra i funghi micotossinogeni e il substrato colonizzato. Tra i fattori biologici vengono inclusi anche fattori intrinseci quali la specie fungina, la specificità del ceppo, la variazione del ceppo e l'instabilità delle proprietà tossigene, che possono variare nel tempo (Zain et al., 2011).

1.3. CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE: PRINCIPALI REGOLAMENTI

A partire dagli inizi degli anni duemila, diverse norme e regolamenti sono stati varati dall'Unione Europea. Sebbene molte tossine prodotte da funghi non rientrino ancora in questi regolamenti, per quelle principalmente studiate e di cui sono stati provati con certezza gli effetti negativi, sia su uomo che su animali, sono stati stabiliti dei limiti di assunzione ai fini di tutelare la salute dei consumatori.

1.3.1. Regolamento CE n.1881/2006, sui “tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari”

Nel dicembre del 2006 viene emanato il Reg. CE N. 1881/2006 “che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari”. Questo regolamento è ad oggi ancora in vigore e nel corso degli ultimi anni ha subito numerose modifiche ed integrazioni. Tuttavia per quei contaminanti “considerati agenti cancerogeni genotossici o qualora l'esposizione della popolazione o di gruppi vulnerabili di essa sia prossima o superiore alla dose tollerabile”, il regolamento stabilisce che i tenori massimi di tali sostanze siano fissati “al livello più basso ragionevolmente ottenibile” (ALARA) ai fini di tutelare la salute pubblica.

Il regolamento stabilisce all'art. 1 che i prodotti alimentari elencati nell'allegato al regolamento stesso, non possono essere commercializzati se contengono uno dei contaminanti normati a livelli superiori del tenore massimo indicato per quel contaminante in quel preciso prodotto. Tra i contaminanti presenti in elenco nell'allegato per i quali è stato definito il tenore massimo si trovano le aflatossine (intese come somma di B1, B2, G1, G2) e le singole aflatossine B1 e M1. Tenori massimi sono stabiliti anche per l'OTA, diversi altri contaminanti (tra cui le micotossine tipiche del genere *Fusarium*), e metalli pesanti. Infine all'art. 8 del Reg. CE N. 1881/2006 è riportato l'elenco dei regolamenti e le direttive della Commissione per quanto riguarda il campionamento e l'analisi per il controllo ufficiale dei tenori massimi.

1.3.2. Il Reg. (CE) N. 401/2006 sui “metodi di campionamento e di analisi”

Tra i regolamenti di cui si fa menzione all'art. 8 del Reg. (CE) N. 1881/2006, viene riportato il Reg. (CE) N. 401/2006 “relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari”. Il campionamento destinato al controllo ufficiale viene effettuato con le modalità indicate nell'allegato I (art. 1) mentre la preparazione dei campioni e i metodi di analisi (art. 2) devono rispettare i criteri indicati

nell'allegato II. All'allegato I vengono stabilite e applicate le definizioni per i termini: "partita", "sottopartita", "campione elementare", "campione globale" e "campione di laboratorio". Vengono riportate disposizioni generali e tra queste si ricorda la necessità di adottare precauzioni per evitare che nel corso del prelievo e preparazione dei campioni possano verificarsi alterazioni che possano modificare il tenore di micotossine, compromettere le analisi, la sicurezza alimentare delle partite da campionare, del personale o la rappresentatività del campione globale.

1.4. IL GENERE ASPERGILLUS

Tra i funghi contaminanti gli alimenti maggiormente indagati troviamo alcuni ascomiceti del genere *Aspergillus* P. Micheli ex Haller, 1768, diffuso in tutto il mondo, appartenente alla famiglia delle *Aspergillaceae*, che include più di 400 specie (Haubracken et al., 2020). La prima registrazione del genere *Aspergillus* è stata rinvenuta nel *Nova Plantarum Genera* (1729) di Micheli. Egli, osservando la struttura del conidioforo al microscopio, notò una certa somiglianza con l'aspersorio utilizzato generalmente durante i riti cattolici (Ainsworth, 1976). Durante la differenziazione del micelio, infatti, alcune ife si ingrandiscono, sviluppano una spessa parete cellulare e formano una "cellula del piede" a forma di "T" o "L", dalla quale parte, perpendicolarmente al suo asse, il ramo conidioforo. Il ramo conidioforo termina a sua volta con un rigonfiamento chiamato vescicola o columella, di forma ovale, oblunga o ellittica. La parte fertile della vescicola dà origine ad uno strato di cellule chiamato fialidi che producono lunghe catene di spore chiamate conidi o conidiospore (conidioforo monoseriato). In alcune specie, tra la vescicola e le fialidi può essere presente un ulteriore strato di cellule chiamate metule. Nel caso in cui queste siano presenti allora il conidioforo viene definito biseriato. La misura e la forma di conidi, fialidi, vescicole e rami conidiofori, la presenza o assenza di metule, sono parametri fondamentali utilizzati per l'identificazione del genere (Samson et al., 2014, Houbraken et al., 2020) (Figura 1). Oltre a queste, altre strutture possono essere utili per l'identificazione, tra le quali i cleistoteci, le cellule di Hülle e gli sclerozi. Cellule di Hülle e cleistoteci sono strutture prodotte durante la fase sessuata. In particolare, le prime, con parete cellulare molto spessa e forma globosa rivestono i cleistoteci che a loro volta contengono aschi e ascospore. Gli sclerozi, invece, sono strutture di resistenza formate da masse arrotondate di micelio con una parete esterna melanizzata che macroscopicamente ricordano i cleistoteci ma, a differenza loro, non contengono spore sessuate (Bennet, 2010).

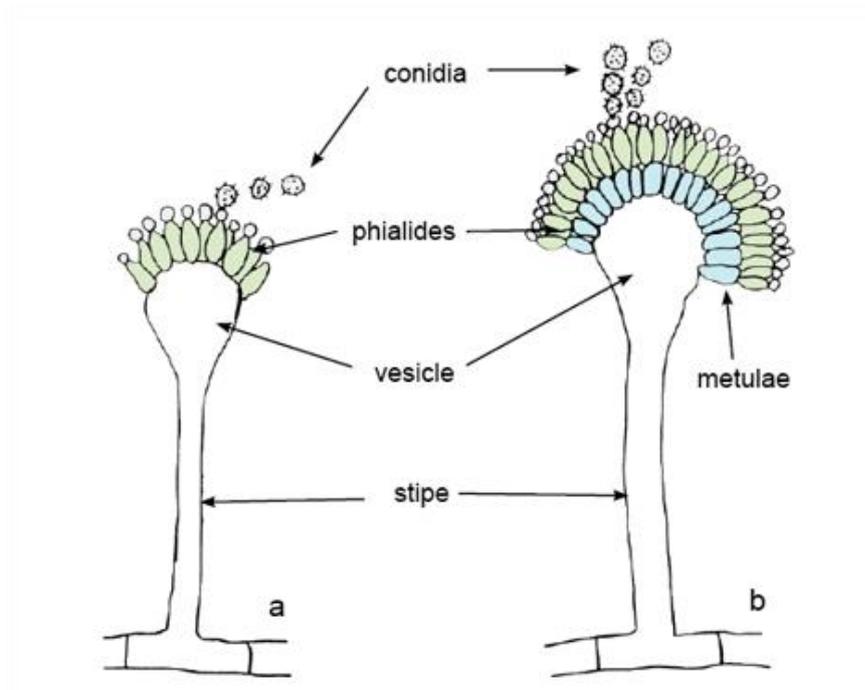


Figura 1 - Struttura di *Aspergillus* spp. a) conidioforo monoseriato; b) conidioforo biseriato

Macroscopicamente, invece, le colonie si presentano di consistenza granulosa e, a maturità, possono assumere diverse colorazioni (giallo, verde, azzurro, nero, marrone) di rilievo per la distinzione dei diversi gruppi tassonomici (Figura 2). I pochi teleomorfi (Ascomycota) noti in passato come generi separati, vengono oggi indicati come morfotipi: eurotium, neosartoria, emericella, petromyces, chaetosartorya, fennellia e neopteromyces (Houbraken et al., 2020).

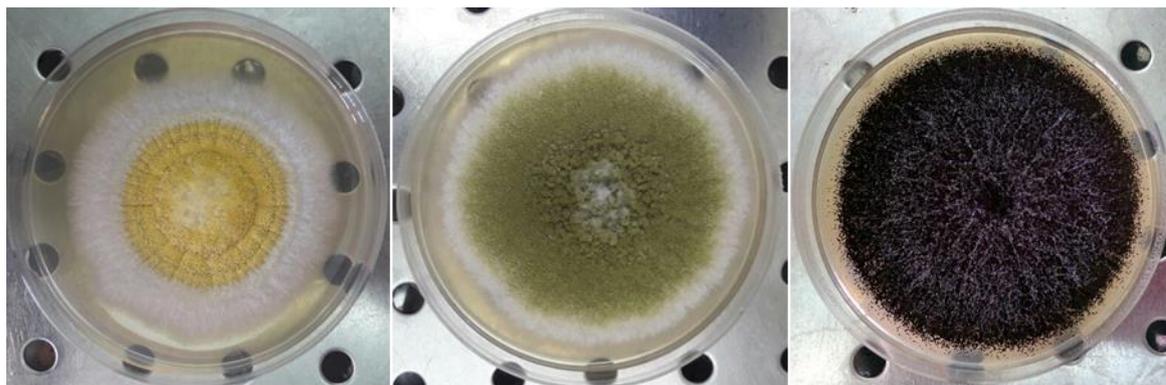


Figura 2 - Differenti colorazioni di colonie di *Aspergillus* spp.

Ecologicamente, le specie appartenenti al genere *Aspergillus* sono termofile, possono accrescersi a temperature comprese tra 7 a 42°C, prediligendo climi caldo umidi. Le spore si diffondono facilmente nell'ambiente, entrando a contatto con substrati solidi o liquidi e quando trovano ideali condizioni di umidità e temperatura germinano e danno inizio alla colonizzazione (Kanaani et al., 2008). L'abilità di disperdere facilmente le spore per via

aerea e di crescere praticamente su qualsiasi materiale organico rende questi funghi fortemente ubiquitari. I cibi destinati all'uomo o agli animali rappresentano i substrati ideali per la loro crescita. Le derrate possono essere contaminate in campo prima della raccolta, durante le fasi di stoccaggio, dopo la loro lavorazione o persino in casa durante le fasi preparazione e cottura (Bennet, 2010). In esse si comportano da saprofiti, traendo fonti trofiche necessarie per il loro sviluppo e producendo enzimi che degradano differenti componenti della parete cellulare, alterando i tessuti del materiale colonizzato (McNeil et al., 1984). Sebbene alcuni cibi con pH acido o essiccati, oppure alimenti con elevate concentrazioni di zucchero non supportino, normalmente, la crescita di microrganismi, alcuni funghi del genere *Aspergillus* sono in grado di crescere anche con bassissima attività dell'acqua. Allo stesso modo, granelle, noci e spezie, tutti alimenti con relativamente bassa presenza d'acqua, vengono regolarmente attaccati dalle specie di *Aspergillus* più xerofile (Lacey, 1994).

Oltre a degradare i substrati su cui si accrescono, alcune specie appartenenti al genere *Aspergillus*, in determinate condizioni di temperatura, pH, umidità e acqua libera, sono in grado di produrre micotossine estremamente pericolose quali aflatossine e ocratossine (Bennet e Klich, 2005).

Le aflatossine, in particolare, sono ancora oggi riconosciute come le micotossine più importanti e pericolose esistenti. Queste molecole sono un gruppo di di-furanocumarine prodotte prevalentemente da alcuni ceppi di *A. flavus* e *A. parasiticus*. Ad oggi si sa che anche *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. nomius* e *A. pseudotamari* sono specie produttrici di aflatossine ma, rispetto alle prime due citate, vengono riscontrate meno frequentemente in derrate alimentari (Arapcheska et al., 2015). Esistono 4 gruppi di aflatossine, denominate in base alla fluorescenza, blu o verde, che emettono quando sottoposte a luce UV. Le aflatossine B1 e B2, infatti producono una fluorescenza blu (B=blue), mentre le aflatossine G1 e G2 producono fluorescenza giallo-verde (G=green). Altre aflatossine spesso riscontrate in latte e prodotti derivati di origine animale sono la M1 e la M2. Esse si originano dall'idrossilazione delle aflatossine B1 e B2 e vengono secrete nel latte di animali nutriti con alimenti contaminati (Bennet e Klich, 2003). La produzione di tali tossine avviene in particolari condizioni ambientali come temperature che oscillano tra 25 e 32 °C e a_w tra 0.82 e 0.87 (Mannaa et al., 2017). A causa della loro dimostrata azione cancerogena in uomo e animali e a causa dei loro effetti tossici acuti, le aflatossine sono probabilmente le micotossine più studiate al mondo (De Lucca, 2007). Le derrate alimentari in cui vengono più frequentemente ritrovate sono mais, frumento, orzo, arachidi e altri cereali e colture

oleaginose. Il mais è, tra le “*commodities*”, quella maggiormente interessata da questo tipo di contaminazione e i problemi di aflatossicosi associate al suo consumo sono diffusi in quasi ogni parte del mondo, essendo il mais l’alimento base di moltissimi paesi (Li et al., 2007). Altri metaboliti tossici secondari prodotti da *Aspergillus* spp. e in particolare da *A. niger* e *A. ochraceus*, sono le ocratossine. Di questo gruppo fanno parte l’ocratossina A (OTA), l’ocratossina B (OTA declorata) e l’ocratossina C (OTA etilata). Tra le tre la più studiata per la sua elevata diffusione e la sua importanza tossicologica è sicuramente l’OTA. Questa, oltre ad indurre effetti nefrotossici in uomo e animali, ha infatti anche azione cancerogena (Peraica et al., 2008). I parametri ambientali ottimali per la loro produzione sono temperature che oscillano tra 4 e 31 °C e valori di *aw* tra 0.83 e 0.90 (Mannaa et al., 2017). Come le aflatossine vengono spesso riscontrate in cereali coltivati soprattutto in nord Europa e in Africa, ma la loro presenza è stata spesso segnalata anche in uva e derivati (Shephard et al., 2003; Reddy e Bhoola, 2010).

1.5. SCOPO DEL LAVORO

Precedenti indagini condotte presso i laboratori del Dipartimento Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali (SAAF) dell'Università di Palermo, hanno evidenziato la presenza, in materie prime (mais, orzo, frumento, ecc.) e alimenti composti ad impiego zootecnico, di funghi contaminanti dei generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, noti produttori di micotossine più o meno pericolose. Ulteriori indagini hanno consentito di rilevare la loro presenza anche in altre derrate ad uso umano e/o animale.

Si è ritenuto opportuno, quindi, avviare un'indagine sullo stato di contaminazione da funghi potenzialmente micotossinogeni in alcune derrate ad uso umano e zootecnico, di provenienza sia italiana che estera, con particolare riguardo alla contaminazione da parte di funghi del genere *Aspergillus*. Allo scopo, seguendo le linee guida riportate negli specifici regolamenti comunitari, sono stati prelevati campioni di alimenti ad uso umano e zootecnico e sottoposti alle usuali tecniche di laboratorio per l'isolamento e l'identificazione dei contaminanti fungini, allestendo, quindi, una collezione di isolati di aspergilli. Alcuni di essi sono stati sottoposti ad analisi per la determinazione di eventuali attività enzimatiche, rilevandone le potenzialità degradative sulle componenti trofiche degli alimenti. Inoltre, nell'intento di rilevare precocemente la presenza di *A. flavus* negli alimenti è stata messa a punto una tecnica diagnostica innovativa, ad elevata sensibilità. Sono stati avviati, quindi, primi saggi di biocontrollo di questa e altre specie di aspergilli con spiccata attività enzimatica, impiegando microrganismi fungini e batterici ad attività antagonistica.

Poiché la contaminazione delle derrate da micotossine risulta nella maggior parte dei casi irreversibile e considerata la sempre maggiore diffusione mondiale di funghi micotossinogeni anche a causa dei cambiamenti climatici in corso, risulta più che mai indispensabile monitorare costantemente, già a partire dal campo e dalle materie prime, la contaminazione da parte di questi funghi e prevenire la produzione dei loro metaboliti tossici durante i vari stadi della filiera produttiva.

1.6. MATERIALI E METODI

1.6.1 Campionamento

In totale sono stati analizzati 48 campioni alimentari, dei quali 16 a destinazione zootecnica, prelevati presso un mangimificio in provincia di Palermo e 32 di materie prime (Tabelle 2 e 3). I primi sono stati raccolti seguendo le modalità riportate nel Reg. CE 1441/2007 e nel DM 20/04/1978 in materia di prelevamento dei campioni per il controllo ufficiale degli alimenti per animali. In particolare, aliquote di 600 g sono state prelevate in maniera casuale da tre diversi punti dei sacchi di stoccaggio e/o container di ciascun mangime, sia dalle aree di stoccaggio che da quelle di confezionamento. I restanti campioni invece sono stati direttamente forniti dal personale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", del Consorzio Gianpietro Ballatore e dei Laboratori di Zootecnica del Dipartimento SAAF.

La valutazione del livello di contaminazione fungina e da aspergilli è stata eseguita secondo quanto riportato nel Reg CE n.401 del 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari, e secondo quanto riportato in letteratura (Tealdo, 2006; Maina et al., 2016; Mirabile et al., 2019).

Tabella 2 – Campioni di alimenti ad uso zootecnico analizzati.

ALIMENTI AD USO ZOOTECNICO			
CAMPIONE	CODICE	COMPOSIZIONE	PROVENIENZA
Fava fioccata	1A		Mangimificio Palermo (area confezionamento)
Fava fioccata	2A		Mangimificio Palermo (area stoccaggio prodotto finito)
Mangime composto per ovaiole	3A	Farina di soia, farina di granoturco, mais, cruschetto di frumento duro	Mangimificio Palermo (area confezionamento)
Mangime composto per ovaiole	4A	“	Mangimificio Palermo (area stoccaggio prodotto finito)
Mais fioccato	5A		Mangimificio Palermo (area confezionamento)
Mais fioccato	6A		Mangimificio Palermo (area stoccaggio prodotto finito)
Mangime composto per suini	7A	Mais, cruschetto di frumento, favino, orzo, farina di girasole, carrube, scorza di agrumi	Mangimificio Palermo (area confezionamento)
Mangime completo per equini (W.P.)	8A	Cruschetto di frumento duro, orzo fioccato, mais, carrube, farinaccio, farina di avena, melasso	Mangimificio Palermo (area confezionamento)
Mangime completo per equini (W.P.)	9A	“	Mangimificio Palermo (area stoccaggio prodotto finito)
Mangime completo per equini (S.H.)	10A	Fava fioccata, mais fioccato, orzo fioccato, avena fioccata, granoturco fioccato, farina di girasole	Mangimificio Palermo (area stoccaggio prodotto finito)
Mangime composto per bovini	11A	Mais fioccato, orzo, carruba fioccata, fava fioccata	Mangimificio Palermo (area confezionamento)
Mangime composto per bovini	12A	“	Mangimificio Palermo (area stoccaggio prodotto finito)
Mangime composto per ruminanti	13A	Favino macinato, farina di orzo, mais, cruschetto di frumento duro	Mangimificio Palermo (area stoccaggio prodotto finito)
Pastazzo di ficodindia (S)	14A	Semi ficodindia	Dipartimento Saaf
Pastazzo di ficodindia (B)	15A	Bucce di ficodindia	“
Pastazzo di ficodindia (S+B)	16A	Bucce e semi di ficodindia	“

Tabella 3 – Materie prime analizzate.

MATERIE PRIME		
CAMPIONE	CODICE	PROVENIENZA
Avena	1M	Mangimificio Palermo (area confezionamento)
Avena nera	2M	Azienda locale
Fava cv Dorenza	3M	Azienda Pietranera
Orzo cv Tea	4M	“
Orzo cv Odissey	5M	“
Orzo cv Tipple	6M	“
Orzo cv Alimini	7M	“
Orzo cv Explora	8M	“
Orzo	9M	Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (IZS)
Orzo perlato	10M	Romania (IZS)
Orzo	11M	Kazakistan (IZS)
Orzo	12M	Canada (IZS)
Frumento duro 1	13M	Pietranera
Frumento duro 2	14M	“
Frumento duro 3	15M	“
Frumento cv Simeto	16M	Consorzio G.P. Ballatore (Sicilia)
Frumento cv Russello	17M	“
Frumento cv Pilusedda	18M	“
Frumento di massa	19M	“
Frumento monococco	20M	“
Frumento duro 4	21M	“
Frumento cv Simeto	22M	Dipartimento Saaf
Frumento cv Giustalisa	23M	“
Frumento	24M	Canada (IZS)
Farro	25M	Consorzio G.P. Ballatore (Sicilia)
Cece	26M	IZS
Sulla	27M	Azienda locale
Trifoglio squaroso	28M	“
Miscela sulla, trifoglio squaroso e avena nera	29M	“
Mais	30M	Canada (IZS)
Mais	31M	Argentina (IZS)
Lenticchia	32M	Canada (IZS)

1.6.2 Allestimento substrati agarizzati

I substrati impiegati per le analisi delle diverse matrici sono stati Potato Dextrose Agar (PDA), Czapek Yeast Agar (CYA), e Malt Extract Agar (MEA) (Microbiol s.n.c.) Il primo, noto anche come substrato universale, composto da estratto di patata (5g/L), destrosio (20g/L), agar (15g/L), viene utilizzato per stimolare la sporulazione dei miceli e per l'isolamento e identificazione di funghi e lieviti; il secondo, contenente saccarosio (30g/L), sodio nitrato (3g/l), potassio solfato bibasico (1g/L), magnesio solfato (0.5g/L), potassio cloruro (0.5g/L), ferro solfato (0.01g/L), agar (15g/L), è impiegato per il mantenimento di ceppi di collezione e per studi tassonomici; il MEA è composto invece da estratto di malto (20g/L), peptone (1g/L), glucosio (20g/L) e agar (15g/L) indicato per lieviti e funghi. I substrati sono stati preparati presso il laboratorio di Patologia Vegetale del Dipartimento SAAF utilizzando i seguenti materiali:

- autoclave;
- bilancia di precisione;
- beute da 500 ml;
- substrato PDA in polvere;
- acqua distillata;
- cilindro tarato da 500 ml.

Sono stati pesati attraverso bilancia di precisione 40 g di PDA, 35g di CYA e 50g di MEA in polvere da sospendere in un litro di acqua distillata in beute da 500 ml che successivamente sono state poste in autoclave a sterilizzare per 20 minuti ad una temperatura di 120 °C e 1 atmosfera. Ad avvenuta sterilizzazione, le beute sono state immerse in bagno termostato a 55°C per 30 minuti e il substrato è stato poi versato in piastre Petri sterili monouso del diametro di 10 cm. Le piastre così riempite sono state lasciate a gelificare all'interno della cappa.

In seguito, con il substrato PDA, allo scopo di mantenere in collezione gli isolati, sono stati allestiti tubi da saggio, mediante il versamento del substrato liquido negli stessi. Questi una volta sterilizzati sono stati posti a gelificare su una superficie inclinata per ottenere la solidificazione a “becco di clarino”.

1.6.3. Preparazione campioni

Tutti i campioni sono stati moliti ad una granulometria di 0.25 mm utilizzando un apposito mulino sito presso i laboratori di Zootecnia del Dipartimento SAAF. Da ogni campione molito è stata prelevata un'aliquota di 1 g utilizzata per le successive analisi.

1.6.4. Diluizioni seriali

I campioni sono stati analizzati seguendo il metodo delle diluizioni seriali. In particolare 1 g di ciascun campione è stato sospeso in 9 ml di acqua distillata sterile ottenendo così la sospensione madre; successivamente 1 ml di questa sospensione, prelevato sterilmente sotto cappa con l'ausilio di una pipetta, è stato aggiunto a 9 ml di acqua distillata sterile in un altro tubo (sospensione 10^{-1}), ripetendo l'operazione fino ad ottenere sospensioni di 10^{-4} . Il tutto, per ogni campione, è stato effettuato in triplice copia.

1.6.5. Semina in piastra

Da ogni sospensione, operando sterilmente sotto cappa, sono stati prelevati 100 μ l e seminati in piastre contenenti PDA, replicando tre volte. L'inoculo versato in piastra è stato distribuito omogeneamente su tutta la superficie della stessa tramite la tecnica dello spatolamento. Le piastre così preparate sono state infine poste ad incubare a temperatura di $25\pm 1^\circ\text{C}$, per permettere lo sviluppo delle colonie fungine.

1.6.6. Conta, isolamento e mantenimento in purezza delle colonie fungine

Ogni 3 giorni, per un totale di 9 giorni, al microscopio stereoscopico è stata osservata la crescita delle colonie in piastra, rilevandone la morfologia e determinandone il numero di CFU (Unità Formanti Colonia) totali. È stato annotato, quindi, il numero di CFU dei generi *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, cui afferiscono specie notoriamente micotossinogene e potenzialmente cancerogene (IARC, 1993). I dati, dopo opportuna trasformazione sono stati sottoposti all'analisi della varianza e le medie confrontate con il test di Student-Newman-Kewls ($P\leq 0,05$) mediante il programma Statgraphics PLUS 5.1.

Al fine di accertare il genere di appartenenza, le colonie sono state osservate anche al microscopio ottico. In particolare, sotto cappa e mediante l'utilizzo di un'ansa sterile alla fiamma, da ciascuna colonia sono stati prelevati piccoli frammenti, disposti su vetrini e montati con una goccia di lattofenolo chiaro (25 ml acqua distillata, 25 ml glicerolo, 25 ml acido lattico, 25 g cristalli di fenolo) o contenente blu di metile (0.01% cristalli di blu di

metilene). Infine, per l'ottenimento di colonie pure di *Aspergillus* spp, si è provveduto, sempre operando sotto cappa, al prelievo di piccole porzioni di micelio e/o masse di conidi delle colonie di interesse. Le porzioni prelevate sono state quindi trasferite su nuove piastre Petri con PDA e una volta sviluppatasi le colonie, sono state prelevate alcune teste conidiche mediante la stessa metodologia descritta precedentemente. Le teste conidiche sono state diluite in acqua distillata sterile e aliquote di 100 µl di tale sospensione sono state prelevate e seminate, tramite spatolamento, in nuove piastre Petri contenenti PDA. Dopo 24 ore di incubazione a 25 °C, allo stereo microscopio sono state osservate le singole piastre e successivamente sono state prelevate ife e porzioni di micelio accresciutesi da singoli conidi che, trasferite su PDA, originavano colonie pure di ciascun isolato di aspergillo. Ogni colonia pura è stata replicata tre volte. Infine tutte le colonie pure sono state quindi identificate dal punto di vista sia morfologico che molecolare.

Al fine di mantenere la collezione di ceppi le colonie pure, opportunamente accresciute, sono state trasferite in tubi contenenti PDA solidificato a becco di clarino e conservate in 15% di glicerolo a -80 °C.

1.6.7. Identificazione morfologica

L'identificazione morfologica degli aspergilli si basa sulla osservazione di caratteri macro e microscopici, nonché sullo sviluppo delle colonie a differenti temperature. A tale scopo si impiegano differenti terreni agarizzati, che possono determinare importanti variazioni nelle caratteristiche morfologiche delle colonie. L'insieme di tali caratteri, riportati in opportune chiavi tassonomiche, possono condurre alla definizione della specie di appartenenza (Bennet, 2010; von Arx, 1981; Cole e Kendrick, 1989; Pitt e Hocking 1999; Klich, 2002). I terreni utilizzati per l'osservazione di tali caratteri sono stati PDA, CYA e MEA. Tra i caratteri macroscopici sono stati rilevati: il tasso di crescita della colonia (a 25°C); la struttura/consistenza; il colore del micelio; il retro della colonia. Le principali strutture microscopiche osservate sono state invece: la forma delle teste conidiche; il numero di punti di ramificazione tra la vescicola (columella) e le fialidi (aspergilli mono- e biseriati); il colore, le dimensioni e la forma dei rami conidiofori; le vescicole; le metule (se presenti); le fialidi; i conidi e cellule di Hülle. Le osservazioni microscopiche sono state effettuate su frammenti di micelio (ife, conidiofori, conidi ecc.) montati su vetrini con lattofenolo chiaro o con blu di metile.

1.6.8 Identificazione molecolare

L'estrazione del DNA dei ceppi isolati è stata effettuata secondo il protocollo che prevede l'uso del CTAB (Doyle e Doyle, 1987). Da ogni piastra contenente la colonia pura, sono stati raschiati con un bisturi frammenti del micelio e questi ultimi sono stati posti in una provetta eppendorf da 1.5 ml. Successivamente sono state aggiunte delle biglie di vetro e 600 µl del buffer di estrazione CTAB (Tris 100 mM; EDTA 25 mM; NaCl 1.4 M; CTBA 2%; pH 8). Al fine di favorire la lisi le eppendorf sono state precedentemente agitate al vortex per circa 5 minuti ed incubate nel bagno termostatico a 65°C per 1 ora durante la quale le eppendorf sono state agitate al vortex ogni 15 minuti. Per la precipitazione delle proteine nelle provette eppendorf sono stati addizionati 300 µl di fenolo e 300 µl di cloroformio; dopo essere state agitate sono state poste in centrifuga per 10 minuti a 10.000 rpm. Dalle eppendorf è stato prelevato, quindi, il surnatante, trasferito in un'altra eppendorf da 1.5 ml con 600 µl di cloroformio e successivamente posto nuovamente in centrifuga per 10 minuti a 10.000 rpm.

Al termine della centrifugazione, il surnatante contenente il DNA è stato trasferito in un'altra eppendorf da 1.5 ml con 600 µl di isopropanolo per determinarne la precipitazione. Le eppendorf sono state poi incubate a -20°C per 20 minuti e successivamente centrifugate per 10 minuti a 14.000 rpm. Il surnatante è stato eliminato, mentre il DNA sul fondo della provetta è stato lavato con etanolo al 70% e poi lasciato ad asciugare sotto cappa per circa 30 minuti. Infine il DNA è stato sospeso in 100 µl di TE 1X e conservato a -20°C. Per l'identificazione a livello di specie si è quindi proceduto con l'amplificazione della regione ITS1-5.8S-ITS2 (Internal Transcribed Spacer) del DNA ribosomiale (rDNA) e il gene della β-tubulina. L'amplificazione è stata eseguita in 25 µl di miscela di reazione contenente: tampone 10X di PCR (Thermo Scientific), dNTP 0,2 mM ognuno, primer 0,3 µM ognuno, Taq DNA polimerasi 0,5 U (Dream Taq, Thermo Scientific). Come DNA bersaglio per la reazione di PCR è stato utilizzato 1µl di DNA.

Nel caso della regione ITS i primer utilizzati sono stati ITS1F (Gardes e Bruns, 1993) e ITS4 (White et al., 1990), nel caso del gene della β-tubulina sono stati utilizzati i primer Bt2a e Bt2b (Glass e Donaldson, 1995).

L'amplificazione è stata eseguita in un termociclatore MultiGene OptiMax (Labnet International Inc.) con il seguente programma: un ciclo di 2 min a 95°C, seguito da 35 cicli di 60s a 95°C, 60s a 55°C e 60s a 72°C, seguiti da una estensione finale di 5 min a 72°C. Il prodotto di amplificazione è stato separato in gel di agarosio all'1%. L'amplicone è stato visualizzato al transilluminatore UV.

Presso i laboratori Agrivet del Dipartimento SAAF si è quindi proceduto alla purificazione dei frammenti ottenuti e successivamente al loro sequenziamento. I prodotti PCR sono stati purificati utilizzando il protocollo Exo I-SAP secondo le istruzioni della casa produttrice (Applied Biosystems, Foster City, CA). I primer ITS1F e Bt2a sono stati utilizzati nella reazione di sequenziamento eseguita con il kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA), seguita dalla precipitazione con Etanolo/EDTA/Sodio Acetato (secondo le istruzioni della casa produttrice). Infine, l'elettroforesi capillare è stata eseguita in un 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) e le sequenze ottenute sono state allineate con quelle depositate in GenBank utilizzando BLASTn.

1.6.9. Rilevazione della produzione di micotossine su substrato agarizzato

Per caratterizzare ulteriormente i ceppi isolati si è ritenuto opportuno condurre delle analisi di screening per rilevare la produzione di micotossine ed in particolare di aflatossine. I saggi sono stati effettuati su tre differenti substrati agarizzati, in grado di evidenziare l'attività aflatossinogena degli aspergilli, mediante fluorescenza, sotto lampada UV a lunghezza d'onda di 365 nm. In particolare sono stati utilizzati:

- PDA + β -ciclodestrina metilata;
- Cocco essiccato + Neutral Red (Dessicated Coconut Agar – DCA)
- Crema di cocco (Coconut Cream Agar – CCA).

Il primo metodo è stato proposto da Fente et al., (2011) e prevede l'aggiunta dello 0.3% di β -ciclodestrina metilata ai comuni terreni di coltura utilizzati per la crescita degli aspergilli. Le piastre contenenti il terreno di coltura PDA, addizionato con β -ciclodestrina metilata e i ceppi da analizzare, sono state poste ad incubare a 28°C per 3-4 giorni, al termine dei quali sono state osservate con lampada UV.

Per quanto riguarda la preparazione del DCA è stato seguito il protocollo riportato da Atanda et al., (2011), opportunamente modificato. In particolare 200 g di cocco essiccato sono stati lasciati a macerare in 1 litro di acqua distillata calda per 30 minuti (pH 4.77), successivamente frullati per 5 minuti e filtrati. Infine sono stati aggiunti il 2% di agar e l'1% di neutral red e il tutto è stato posto a sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Il substrato così preparato è stato versato in piastre Petri monouso del diametro di 90 mm, le quali sono state inoculate con le spore degli aspergilli potenzialmente aflatossinogeni isolati

e messe a incubare a 30°C per 96 h. Ogni 48h le piastre sono state osservate sotto lampada UV.

Il CCA è stato preparato invece secondo quanto descritto da Dyer e Mc Cammon (1994), usando 400 g di crema di cocco, 400 ml di acqua distillata e 12 g di agar, sterilizzando il tutto a 121°C per 15 minuti. Le piastre, con le spore fungine, sono state incubate sia a 25 che a 30°C per 10 giorni e monitorate ogni 48h.

Tutte le prove sui differenti substrati sono state effettuate utilizzando come campione controllo il ceppo *A. flavus* MUCL 18903 aflatossinogeno gentilmente fornito dalla Prof.ssa R. La Rosa del Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente dell'Università degli Studi di Catania.

1.7. RISULTATI

1.7.1 Contaminazione alimenti ad uso zootecnico

I risultati delle analisi sul livello di contaminazione micotica sono riportati in Tabella 4. In particolare, 13 campioni, dei 16 analizzati, hanno mostrato dei valori di contaminazione da muffe piuttosto elevati che vanno da 1.12×10^6 nel mangime composto per bovini (campione 12A), a 1.03×10^8 CFU/g nel mangime composto per equini (campione 8A). Nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra i campioni.

I campioni di pastazzo di ficodindia (14A, 15A e 16A), sono risultati scarsamente contaminati, con livelli di concentrazione fungina praticamente trascurabili. Inoltre, mentre in tutti i campioni il genere più frequentemente rilevato è stato *Penicillium*, in quasi la metà dei campioni analizzati (4A, 5A, 6A, 7A, 10A, 11A e 14A), le popolazioni di *Aspergillus* spp. variavano dal 12 al 35% delle totalità dei contaminanti (Tabella 4). Praticamente assente è risultata, infine, la contaminazione da funghi del genere *Fusarium* fatta eccezione per tre campioni (4A, 7A, 2A).

Tabella 4 – Livelli di contaminazione (CFU/g) e % di aspergilli rilevati nei campioni di mangimi.

CAMPIONE	CODICE	CFU/g	%ASPERGILLI
Fava fioccata	1A	2.33×10^6	0
Fava fioccata	2A	1.11×10^7	0
Mangime composto per ovaiole	3A	7.4×10^7	0
Mangime composto per ovaiole	4A	7.1×10^7	12
Mais fioccato	5A	2.3×10^7	35
Mais fioccato	6A	1.4×10^7	22
Mangime composto per suini	7A	2.8×10^7	30
Mangime completo per equini (W.P.)	8A	1.03×10^8	0
Mangime completo per equini (W.P.)	9A	2.2×10^7	0
Mangime completo per equini (S.H.)	10A	4.5×10^7	20
Mangime composto per bovini	11A	8.1×10^7	17
Mangime composto per bovini	12A	1.1×10^6	0
Mangime composto per ruminanti	13A	2.2×10^7	0

1.7.2. Contaminazione materie prime

I livelli di contaminazione fungina totale, riscontrati nelle materie prime analizzate, sono riportati in Tabella 5. Indipendentemente dalla specie, tutti i campioni sono risultati contaminati, con valori compresi tra 10^2 (campione 5M, Orzo cv Odissey) e 7×10^6 (campione 1M, Avena), mentre il campione 16M ha mostrato una crescita fungina talmente elevata da non poter essere quantificata. In generale, i valori di contaminazione dei campioni provenienti da Pietranera (3M, 4M, 5M, 6M, 7M, 8M, 14M, 15M) e dal Consorzio G.P. Ballatore (16M, 17M, 18M, 19M, 20M, 21M, 25M), sono risultati statisticamente inferiori.

Nel complesso i campioni sono risultati contaminati prevalentemente da funghi del genere *Penicillium* e muffe secondarie (*Mucoraceae*), mentre non sono stati rilevati funghi del genere *Fusarium*. Per quanto riguarda, invece, la presenza da aspergilli, circa il 40% dei campioni è risultato essere contaminato, con percentuali sul totale delle popolazioni fungine variabili dallo 0.5 al 95% (Tabella 5).

Tabella 5 – Livelli di contaminazione (CFU/g) e % di aspergilli rilevati nei campioni di materie prime.

CAMPIONE	CODICE	CFU/g	%ASPERGILLI
Avena	1M	7x10 ⁶ d	25
Avena nera	2M	1.01x10 ⁴ b	0.5
Fava cv Dorenza	3M	1.5x10 ³ a	89
Orzo cv Tea	4M	1x10 ² a	1.3
Orzo cv Odissey	5M	1.5x10 ² a	0
Orzo cv Tipple	6M	3x10 ³ a	0
Orzo cv Alimini	7M	6x10 ² a	0
Orzo cv Explora	8M	4.5x10 ² a	50
Orzo	9M	5.7x10 ³ ab	90
Orzo perlato	10M	3.5x10 ³ a	0
Orzo	11M	1x10 ⁴ b	0
Orzo	12M	6.5x10 ⁴ c	0
Fruento duro 1	13M	5.6x10 ³ ab	60
Fruento duro 2	14M	3.55x10 ³ a	23
Fruento duro 3	15M	2.1x10 ³ a	95
Fruento cv Russello	17M	5.5x10 ² a	0
Fruento cv Pilusedda	18M	3.5x10 ³ a	0
Fruento di massa	19M	1.05x10 ³ a	0
Fruento monococco	20M	1.3x10 ³ a	0
Fruento duro 4	21M	1x10 ⁴ b	19
Fruento cv Simeto	22M	1.5x10 ³ a	0
Fruento cv Giustalisa	23M	4.5x10 ² a	0
Fruento	24M	4.5x10 ² a	0
Farro	25M	1.5x10 ² a	7.4
Cece	26M	9x10 ³ b	88.5
Sulla	27M	1.04x10 ⁴ b	0.3
Trifoglio squaroso	28M	1.03x10 ⁴ b	0
Miscela sulla, trifoglio squaroso e avena nera	29M	1.04x10 ⁴ b	0
Mais	30M	1.5x10 ³ a	0
Mais	31M	6.5x10 ² a	0
Lenticchia	32M	1.3x10 ³ a	75.6

Lettere uguali non differiscono statisticamente con il test di Student-Newman-Kewls (P=0,05).

1.7.3 Identificazione e allestimento della collezione

Gli aspergilli isolati dai campioni di alimenti sono stati inizialmente distinti per sezione a seconda dei caratteri macroscopici (colore e consistenza della colonia). Sono state individuate quindi sei sezioni e, tra queste, colonie rappresentative sono state selezionate e osservate al microscopio per definirne i parametri microscopici utili all'identificazione

(Tabella 6). Per l'identificazione molecolare sono state amplificate due differenti regioni genomiche: la regione ITS dell'rDNA e una porzione del gene della β -tubulina. Da tutti gli isolati sono stati ottenuti ampliconi della dimensione attesa. L'amplificazione della regione ITS ha prodotto frammenti di circa 500 bp, mentre quella della β -tubulina frammenti di circa 300 pb. Le sequenze delle due regioni sono state confrontate con quelle depositate in GenBank mediante il programma BLASTn e hanno mostrato una similarità del 99-100% con quelle dei ceppi di riferimento, confermando l'identificazione su base morfologica. Tali analisi hanno quindi consentito di allestire una collezione di 47 isolati di *Aspergillus* spp. riportati in Tabella 7.

Tabella 6 – Principali caratteri micro e macroscopici rilevati per l'analisi morfologica

Colore colonia	Diametro colonia mm ¹			Forme	Conidioforo	Conidi	Diametro conidi (µm) ²	Diametro vescicola (µm) ²	Cellule di Hülle	Specie	Sezione
	PDA	MEA	CYA								
Giallo	25x25	25x25	30x30	Gamica	Uniseriato	Rugosi	4.3-6.5	20-25	Presenti	<i>A. amstelodami</i>	<i>Aspergillus</i>
Nero	70x70	85x85	85x85	Agamica	Biseriato	Lisci	3.5-6	40-50	Assenti	<i>A. awamori</i>	<i>Nigri</i>
Verde	67x70	75x75	83x83	Agamica	Biseriato	Lisci-finemente rugosi	3.2-5.8	18-36	Assenti	<i>A. flavus</i>	<i>Flavi</i>
Nero-marrone scuro	35x36	32x33	45-47	Agamica	Biseriato	Lisci	3.5-4.1	20-40	Assenti	<i>A. tubingensis</i>	<i>Nigri</i>
Nera	79x81	80x82	83x84	Agamica	Biseriato	Rugosi	4.6-5.8	25-55	Assenti	<i>A. niger</i>	<i>Nigri</i>
Giallo-verde	75x75	80x80	75x75	Agamica	Biseriato	Lisci	5.3-7.2	25-40	Assenti	<i>A. oryzae</i>	<i>Flavi</i>
Azzurro-grigio	83x83	70x72	75x77	Agamica	Uniseriato	Echinulati	2.5-3.5	30-55	Assenti	<i>A. fumigatus</i>	<i>Fumigati</i>
Bianco-giallo chiaro	24x25	20x20	22x24	Agamica	Uniseriato	Tuberculati	6-13.5	7-15	Assenti	<i>A. niveoglaucus</i>	<i>Aspergillus</i>
Verde scuro-marrone	60x65	50x52	70x71	Agamica	Biseriato	Finemente rugosi	2-3.5	11-14	Assenti	<i>A. versicolor</i>	<i>Versicolor</i>
Giallo ocra	24x25	27x28	28x28	Agamica	Uniseriato	Rugosi	7-8.5	25-34	Assenti	<i>A. pseudoglaucus</i>	<i>Aspergillus</i>
Marrone-cannella	27x28	29x28	26x27	Gamica	Biseriato	Lisci	2-4	7-15	Presenti	<i>A. sydowii</i>	<i>Versicolor</i>
Giallo chiaro	30x30	32x33	27x27	Gamica	Uniseriato	Rugosi	3.2-4.5	15-23	Assenti	Morfotipo eurotium	-
Grigio scuro-marrone	60x61	47x49	29x32	Agamica	Biseriato	Rugosi	2.7-3.5	7-20	Assenti	<i>A. calidouustus</i>	<i>Usti</i>

¹ Media di tre repliche dopo 9 giorni di incubazione; ² Media di 50 misurazioni.

Tabella 7 – Collezione degli aspergilli isolati.

Codice isolato	Taxa	Matrice	Località
SAAF 1	<i>A. Sez. Nigri</i>	Mais fioccato	Palermo
SAAF 2	<i>A. tubingensis</i>	M.C. suini	“
SAAF 3	<i>A. Sec. Nidulantes</i>	M.C. equini	“
SAAF 4	<i>A. flavus</i>	M.C. bovini	“
SAAF 5	<i>A. awamori</i>	Mais fioccato	“
SAAF 6	<i>A. amstelodami</i>	Avena	“
SAAF 7	<i>A. niger</i>	M.C. suini	“
SAAF 8	<i>A. niveoglaucus</i>	M.C. equini	“
SAAF 9	<i>A. pseudoglaucus</i>	Avena	“
SAAF 10	<i>A. Sec. Nigri</i>	Mais fioccato	“
SAAF 11	<i>A. amstelodami</i>	Avena	“
SAAF 12	<i>A. brasiliensis</i>	M.C. ovaiole	“
SAAF 13	<i>A. amstelodami</i>	M.C. equini	“
SAAF 14	<i>A. tubingensis</i>	M.C. bovini	“
SAAF 15	<i>A. niger</i>	M.C. equini	“
SAAF 17	<i>A. oryzae</i>	Fava fioccata	“
SAAF 27	<i>Eurotium sp</i>	Fava cv Dorenza	Az. Pietranera (AG)
SAAF 28	<i>A. versicolor</i>	Orzo cv Tea	“
SAAF 29	<i>A. flavus</i>	Fruento var Simeto	Consorzio Ballatore (PA)
SAAF 30	<i>A. fumigatus</i>	Fava cv Dorenza	Az. Pietranera (AG)
SAAF 31	<i>A. sydowii</i>	Fava cv Dorenza	Az. Pietranera (AG)
SAAF 32	<i>A. calidostus</i>	Pastazzo semi ficodindia	Palermo
SAAF 33	<i>A. pseudoglaucus</i>	Orzo cv Explora	Az. Pietranera (AG)
SAAF 34	<i>A. fumigatus</i>	Lenticchia	Canada
SAAF 35	<i>A. Sez. Flavi</i>	Lenticchia	“
SAAF 36	<i>A. Sez. Flavi</i>	Lenticchia	“
SAAF 37	<i>A. Sez. Flavi</i>	Farro	Italia
SAAF 38	<i>A. flavus</i>	Farro	“
SAAF 39	<i>A. Sez. Nigri</i>	Cece	“
SAAF 40	<i>A. fumigatus</i>	Fruento	“
SAAF 41	<i>A. Sez. Flavi</i>	Cece	“
SAAF 42	<i>A. Sez. Flavi</i>	Orzo	“
SAAF 43	<i>A. flavus</i>	Fruento	Az. Pietranera (AG)
SAAF 44	<i>A. Sez. Flavi</i>	Orzo	Italia
SAAF 45	<i>A. fumigatus</i>	Cece	“
SAAF 46	<i>A. fumigatus</i>	Fruento	Az. Pietranera (AG)
SAAF 47	<i>A. fumigatus</i>	Fruento	Italia

1.7.4. Rilevazione della produzione di aflatossine su substrato agarizzato

Il ceppo tossinogeno *A. flavus* MUCL 18903 e gli altri aspergilli allevati su PDA addizionato con β -cliclodestrina metilata e su CCA, hanno evidenziato uno sviluppo regolare. Tuttavia, una volta sottoposti a lampada UV a 365 nm, non hanno mostrato un'evidente fluorescenza, dopo il previsto periodo di incubazione. Soltanto su DCA con neutral red, è stata rilevata la presenza di un alone violetto, indice della produzione di aflatossine, sia che nella colonia

controllo, sia attorno a due colonie di *A. flavus* (SAAF 4, SAAF 29), come riportato in Figura 4.

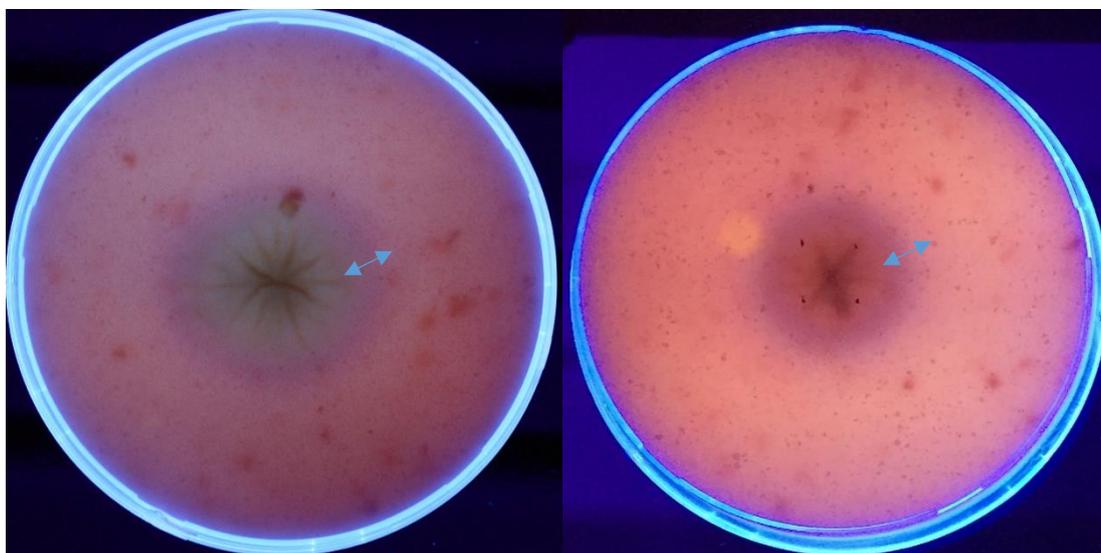


Figura 4 – Alone violetto (freccia azzurra) rilevato attorno alle colonie cresciute su DCA+Neutral Red. A sinistra piastra controllo con *A. flavus* MUCL 18903 (ceppo aflatossigeno); a destra *A. flavus* isolato dal campione 11A (mangime composto per bovini).

1.8. DISCUSSIONI

I risultati ottenuti dalle analisi mostrano in generale un elevato grado di contaminazione delle derrate analizzate, siano esse di provenienza nazionale che estera. Solo poche di queste, infatti, hanno mostrato livelli di contaminazioni trascurabili e i taxa fungini rilevati con maggiore frequenza (*Penicillium*, *Mucoraceae*), prevalentemente tipici del post raccolta, lasciano supporre non idonee condizioni di stoccaggio e/o di lavorazione degli alimenti, evidenziando, quindi, per tali derrate, la necessità di attuare strategie agronomiche più razionali, oltre che idonei metodi di stoccaggio e trasformazione. Funghi del genere *Aspergillus* non sono stati rilevati con grande frequenza, ma alcune delle specie isolate destano comunque preoccupazione. Infatti i saggi di identificazione morfologica e molecolare hanno permesso di indentificare 13 diverse specie di *Aspergillus* alcune delle quali note in letteratura come potenzialmente micotossinogene, quali *A. flavus*, *A. niger* e *A. tubingensis* il primo per la produzione aflatossine, e gli altri di ocratossine. Inoltre, per due ceppi di *A. flavus* in collezione la fluorescenza evidenziata su specifici substrati agarizzati, rivelerebbe la loro produzione di aflatossine. Sebbene le altre specie isolate non siano, ad oggi, associate a casi noti di micotossicosi la loro presenza indica comunque una scarsa qualità delle derrate analizzate. I risultati ottenuti in questo lavoro sono in accordo con

quanto riportato in precedenti studi circa la contaminazione micotica di alimenti ad uso zootecnico e materie prime. In particolare, studi condotti in Spagna e Argentina (Jaimez et al., 2004; Pereyra et al., 2011) presentavano valori di contaminazione totale da muffe compresi tra 1×10^2 e 2×10^5 CFU/g e il genere *Penicillium* risultava in entrambi i casi quello più frequentemente isolato. Altre indagini condotte in Brasile, invece, riportano valori totali di contaminazione da 1.3×10^3 a 1.5×10^5 CFU/g con il genere *Aspergillus* predominante (Campos et al., 2009; Queiroz et al., 2012). In Italia osservazioni analoghe su materie prime, in particolare mais, hanno evidenziato una prevalenza di contaminanti fungini del genere *Fusarium*, soprattutto al nord e al centro della nazione (Covarelli et al., 2011; Gregori et al., 2013). Tali dati mostrano come la problematica della contaminazione da funghi potenzialmente micotossinogeni sia diffusa a livello globale e come alcune derrate, se non gestite in maniera razionale e con tecniche agronomiche e di conservazione adeguate, possano rappresentare un rischio concreto per la salute dell'uomo e degli animali.

CAPITOLO 2: DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ LIGNOCELLULOSOLITICA DI CEPPI DI *ASPERGILLUS*

2.1. FUNGHI COINVOLTI NELLA DEGRADAZIONE DELLA PARETE CELLULARE

Per esplicitare la loro attività trofica i funghi ricorrono alla produzione di una vasta gamma di enzimi in grado di degradare differenti sostanze organiche più o meno complesse. Tale attività si esplica anche nei confronti di cellulosa, emicellulosa e lignina, i maggiori costituenti della parete cellulare vegetale, insieme ad altri costituenti minori quali pectine, composti azotati e residui minerali (Stech et al., 2014).

Tra i microrganismi particolarmente attivi nella degradazione della parete cellulare e nella produzione di enzimi litici troviamo sicuramente i funghi. E' noto, infatti, come l'attività ligno-cellulosolitica sia particolarmente presente in funghi anaerobi dei generi *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Orpinomyces* and *Anaeromyces* e in funghi aerobi tra i basidiomiceti appartenenti ai generi *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Poria*, *Schizophyllum* e gli ascomiceti appartenenti ai generi *Bulgaria*, *Chaetomium*, *Helotium*, *Neurospora*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Lynd et al., 2002; Tian et al., 2009). Molti di questi funghi filamentosi sono naturalmente adattati a crescere su substrati ricchi in cellulosa, traendo i nutrienti necessari per il loro sviluppo tramite: la produzione di enzimi, l'assorbimento di questi nutrienti tramite le pareti cellulari e la crescita apicale delle loro ife (Jones, 1994; Gutiérrez-Correa e Villena, 2003). In particolare, i funghi, possono attuare due tipi di degradazione: intracellulare ed extracellulare. Quest'ultima comprende due tipi di complessi enzimatici: idrolitici, responsabili della degradazione dei polisaccaridi e ossidativi, che degradano la lignina aprendo gli anelli fenilici. In natura sono stati descritti tre gruppi di funghi con diversi effetti e meccanismi di degradazione sulla lignocellulosa: funghi del marciume molle, del marciume bruno e del marciume bianco (Andlar et al., 2018).

2.2. ENZIMI PRODOTTI DAL GENERE *ASPERGILLUS*

Tra i funghi produttori di enzimi ligno-cellulosolitici, alcuni dei più rappresentativi appartengono al genere *Aspergillus*. Se da un lato si sa molto riguardo al loro utilizzo nell'industria alimentare, per la produzione di cibi e bevande fermentate (ad esempio *A. awamori* e *A. oryzae*, impiegati per la produzione di shōchū, sake, miso, salsa di soia e altri altri alimenti giapponesi), ancora poco si conosce sull'azione degradativa che questi funghi

compiono nei confronti delle derrate contaminate. Alcune delle specie afferenti a questo genere, infatti, sono in grado di produrre un'ampia varietà di enzimi in grado di degradare la componente fibrosa e liberare dalle matrici contaminate le sostanze necessarie allo sviluppo nel substrato (Wilson, 2011). Tra gli enzimi litici prodotti dal genere *Aspergillus* ne sono noti alcuni coinvolti nella degradazione degli xilani, dei galatto(gluco)mannani e delle pectine componenti la cellulosa.

In particolare, le endoglucanasi idrolizzano la cellulosa in glucooligosaccaridi; le cellobioidrolasi rilasciano cellobiosio dalla cellulosa cristallina; le β -glucosidasi degradano gli oligosaccaridi in glucosio; le esoglucanasi rilasciano glucosio dalla cellulosa e dagli glucooligosaccaridi. La produzione di enzimi cellulolitici da aspergilli può essere osservata utilizzando le seguenti fonti di carbonio: cellulosa pura, 2-O- β -d-glucopiranosil-d-xilosio, cellobiosio, glucosio e xilosio. Tra le specie di *Aspergillus* produttrici di enzimi cellulolitici si annoverano soprattutto *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. aculeatus*, *A. japonicus*, *A. nidulans* e *A. oryzae* (Mojsov, 2016).

Per quanto riguarda la degradazione degli xilani sono coinvolte due classi di enzimi. In particolare, le endoxilanasi attaccano la catena di xilano riducendola in oligosaccaridi più piccoli che possono essere ulteriormente degradati in xilosio grazie all'azione delle β -xilossidasi. Le specie di *Aspergillus* che maggiormente producono questo tipo di enzimi sono *A. aculeatus*, *A. awamori*, *A. flavipes*, *A. foetidus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. sydowii*, *A. tubingensis*. (Fujimoto et al., 1995).

La degradazione dei galatto(gluco)mannani invece dipende dall'azione di β -endomannanasi e β -mannossidasi. I primi, idrolizzano la catena dei galatto(gluco)mannani producendo mannoooligosaccaridi. La loro abilità di attaccare la catena dipende da diversi fattori come il numero e la distribuzione di sostituenti sulla catena e il rapporto tra glucosio e mannosio. Le β -endomannanasi, infatti, risultano più attive sui galatto(gluco)mannani che presentano un basso livello di sostituzione della catena. Esse, attaccando i mannani, rilasciano maggiormente mannobiosio e monnotriosio, confermando la loro natura di endoidrolasi (Ademark et al., 1998). Le β -mannossidasi, invece, sono enzimi esoattivi che rilasciano mannosio dall'estremità non riducente dei mannoooligosaccaridi. Tra gli aspergilli produttori di enzimi mannanasi e mannossidasi troviamo *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. tamarii* e *A. awamori* (Ademark et al., 1999).

Infine, la degradazione delle pectine, avviene ad opera di liasi e poligalatturonasi (endo- ed eso-poligalatturonasi). Le endo-poligalatturonasi agiscono sui legami interni della regione liscia della pectina, mentre le eso-galatturonasi sono attive sulla parte terminale non

riducente della regione. Le liasi, invece attaccano la catena pectinica mediante β -eliminazione, formando un'estremità non riducente $\Delta 4,5$ -insatura. La produzione di enzimi liasi e poligaratturonasi avviene ad opera principalmente di *A. alliaceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* (de Vries e Visser, 2001).

La produzione di tutti questi enzimi è regolata, oltre che da fattori esterni come pH e temperatura, da geni la cui espressione è specifica per ogni ceppo e può essere, inoltre, positivamente o negativamente influenzata da alcuni fattori come, ad esempio, la presenza nel substrato di composti quali malto, amido o zucchero (Ichinose et al., 2014).

2.3. SCOPO DEL LAVORO

L'indagine preliminare condotta sui campioni di alimenti ad uso umano e zootecnico ha consentito di isolare e identificare diversi ceppi di *Aspergillus* noti produttori di enzimi lignocellulosolitici. In seguito alla loro colonizzazione, le derrate contaminate vanno incontro ad un irreversibile decadimento qualitativo con decomposizione delle componenti chimiche e conseguente variazione del contenuto in polisaccaridi e proteine, decremento dei valori nutritivi, variazioni di colori e di odori, marciumi e imbrunimenti. Tutte queste alterazioni comportano un rilevante deprezzamento dell'alimento, cui consegue una sostanziale perdita economica.

Sulla base di tali premesse, si è ritenuto opportuno caratterizzare l'attività enzimatica degli aspergilli in collezione attraverso saggi di tipo quali-quantitativo, individuando gli enzimi responsabili della degradazione e i livelli della loro attività. Poiché molto raramente gli aspergilli producono enzimi ligninolitici (de Vries e Visser, 2001) particolare attenzione è stata posta allo studio dei complessi di β -1,4-eso ed β -1,4-endoglucanasi, enzimi più frequentemente prodotti dalla gran parte delle specie di *Aspergillus* e degradanti la frazione cellulosica delle derrate contaminate.

2.4. MATERIALI E METODI

2.4.1. Analisi qualitativa dell'attività cellulolitica degli aspergilli isolati

L'analisi qualitativa della produzione di enzimi cellulolitici è stata condotta su tutti i ceppi in collezione. Porzioni di micelio di alcuni degli aspergilli collezionati sono state trasferite in tubi da saggio contenenti 10 ml di substrato liquido preparato secondo quanto riportato da Mandels et al., (1976): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.40 g/L), KH_2PO_4 (2.0 g/L), urea (0.3 g/L), CaCl_2 (0.3 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 g/L), peptone (0.75 g/L). All'interno degli stessi tubi è stata posta una striscia di carta Whatman N° 1 delle dimensioni di 1x6 cm, come fonte trofica e i tubi così allestiti sono stati posti ad incubare a 30 °C, temperatura ritenuta ottimale per la produzione di cellulasi per la maggior parte degli aspergilli (Bastawde, 1992; Velkovska et al., 1997; Shahriarinnour et al., 2011; Saithi et al., 2010) e in agitatore, per favorire la colonizzazione del substrato. Per determinare la degradazione della striscia di cellulosa, e quindi la produzione di enzimi, sono state prese in considerazione la crescita del micelio e lo stato di macerazione della carta inteso come variazione nel colore e nella consistenza. La valutazione dell'attività enzimatica è stata quindi effettuata mediante scale di merito in base alla degradazione della carta, dove:

0= degradazione nulla; 1= degradazione bassa/sviluppo del micelio; 2=degradazione media; 3=degradazione alta; 4=degradazione completa. I rilievi sono stati condotti dopo 5, 10, 15 e 20 giorni dall'incubazione (Alberto Vazquez et al., 2019).

2.4.2. Analisi quantitativa dell'attività cellulolitica

Presso i laboratori dell'Instituto de Ciencia Animal di Cuba, sono state approfondite le tecniche di analisi per il rilevamento dell'attività enzimatica dei ceppi di *Aspergillus*. A tal fine sono state selezionate tre colonie da saggiare, tra cui un ceppo di *Aspergillus tubingensis* (SAAF 14), risultato il più attivo dalle analisi qualitative, il ceppo aflatossinogeno *Aspergillus flavus* (MUCL 18903) e il ceppo ocratossinogeno *Aspergillus brasiliensis* (MUCL 29039) gentilmente concesso dal laboratorio Bromatos snc di Palermo.

Poiché la degradazione della cellulosa comporta la formazione di molecole più semplici come mono e disaccaridi, il metodo preso in considerazione per la determinazione dell'attività cellulolitica si è basato sulla determinazione della concentrazione di zuccheri riduttori rilasciati nel substrato di crescita del fungo (Miller, 1959; Ghose, 1987).

Allestimento dell'inoculo

Le colonie pure di *Aspergillus flavus* MUCL18903 (AF), *Aspergillus brasiliensis* MUCL29039 (AB) e *Aspergillus tubingensis* SAAF 14 (S-14) sono state poste in coltura in piastre Petri del diametro di 10 cm, contenenti PDA, incubate a 30°C per 9 giorni.

L'inoculo fungino è stato preparato aggiungendo 10 ml di acqua distillata sterile a ciascuna colonia in piastra e sospendendo in maniera omogenea il micelio e le spore con l'ausilio di una spatola. La concentrazione della sospensione è stata calcolata al microscopio utilizzando la camera di conta Neubauer e per i tre ceppi è stata utilizzata una concentrazione di 10⁸ conidi/ml.

Fermentazione in substrato solido sommerso

Aliquote di 1 ml per ciascuna sospensione conidica sono state distribuite in 43 beute di tipo Erlenmeyer da 50 ml contenenti 1 g di crusca di frumento macinato e 30 ml di buffer fosfato 50 mM a pH 6. Le beute così inoculate sono state incubate a 30°C per 7 giorni (168 h) in un agitatore orbitale a 120 rpm. Tre beute non inoculate, contenenti solo il substrato di fermentazione sono state utilizzate come controllo. Le analisi sono state condotte sulla parte di substrato liquido. In particolare, a distanza di 24 ore, il contenuto di 6 beute (2 per ciascun fungo) è stato prelevato, sottoposto a filtrazione e la parte liquida ottenuta è stata centrifugata a 4°C, 10.000 rpm, per 5 minuti. Il surnatante (estratto enzimatico) è stato trasferito in falcon e conservato a -20°C per le successive analisi. (Lisboa Garcia et al., 2015; Soccol et al., 2017).

Curva standard di glucosio e calibrazione spettrofotometro

Per la preparazione della soluzione madre 10 grammi di glucosio sono stati disciolti in 1 litro di acqua distillata sterile (de Vasconcelos et al., 2013). Successivamente, partendo dalla soluzione madre, sono state preparate soluzioni con concentrazioni da 1.2 g/L a 0.2 g/L come riportato in Tabella 8.

Tabella 8 – Preparazione soluzioni di glucosio a concentrazione nota.

Soluzione di glucosio (ml)	+	Acqua distillata (ml)	=	Concentrazione soluzione finale (g/l)
3		22		1.2
2.5		22.5		1
2		23		0.8
1.5		23.5		0.6
1		24		0.4
0.5		24.5		0.2

Successivamente, 1.5 ml di ogni soluzione così preparata sono stati trasferiti in tubi da saggio posti in acqua bollente per 5 minuti. Infine i tubi sono stati raffreddati in acqua ghiacciata, aggiungendo poi 7 ml di acqua distillata sterile.

Le sei soluzioni così preparate sono state utilizzate per la calibrazione dello spettrofotometro. La lettura dell'assorbanza è stata effettuata a 540 nm utilizzando i 6 valori di concentrazione noti in modo tale da poter ottenere l'equazione della curva standard di glucosio.

Determinazione attività endo- β -1,4-glucanasi (CMCasi)

L'attività enzimatica è stata saggiata secondo il metodo di Miller, 1959 e Ghose, 1987. La mix di reazione è stata preparata in tubi contenenti 0.5 ml di carbossimetilcellulosa (CMC) all'1% sospesa in buffer citrato 0.05 M (pH 4.8) come substrato e 0.5 ml di estratto enzimatico. Il testimone è stato preparato allo stesso modo, ma in assenza di estratto. I tubi sono stati incubati per 30' a 50°C. La reazione è stata ultimata aggiungendo 1.5 ml di acido 3,5 DNS e facendo bollire la mix per 5'. Infine, i tubi sono stati raffreddati in acqua ghiacciata e il volume della reazione è stato portato a 10 ml aggiungendo 7 ml di acqua distillata sterile. L'assorbanza è stata misurata allo spettrofotometro a lunghezza d'onda di 540 nm e la concentrazione di zuccheri riduttori rilasciati è stata calcolata utilizzando la curva standard di glucosio. L'attività enzimatica (UI/ml) è stata quindi calcolata con la seguente formula:

$$\text{CMCasi (UI/ml)} = \frac{(Do*k)*D}{V*t} * 2. \quad (1) \text{ Dove:}$$

(Do x k) = Concentrazione di zuccheri riduttori.

D= fattore di diluizione.

V= volume dell'enzima.

t= tempo di reazione

Determinazione attività eso- β -1,4-glucanasi (PFasi)

L'attività enzimatica è stata determinata secondo il metodo di Ghose, 1987. In tubi da saggio sono stati aggiunti 0.5 ml di estratto enzimatico, 1 ml di buffer citrato 0.075 M (pH 5) e una striscia di carta da filtro Whatman No. 1 (1x6 cm) come substrato. La mix è stata incubata a 50°C per 30'. Successivamente sono stati aggiunti 1.5 ml di acido 3,5 DNS per terminare la reazione e i tubi sono stati posti a bollire per 5'. I tubi sono stati raffreddati in acqua ghiacciata e il volume della reazione è stato portato a 10 ml aggiungendo 7 ml di acqua distillata sterile. Anche in questo caso, l'assorbanza è stata misurata a 540 nm di lunghezza d'onda e la produzione di zuccheri riduttori rilasciati è stata calcolata utilizzando la curva standard di glucosio. L'attività enzimatica è stata quindi calcolata con la seguente formula:

$$\text{PFasi (UI/ml)} = \frac{(Do*k)*D}{V*t} * 2. \quad (2) \text{ Dove:}$$

(Do x k) = Concentrazione di zuccheri riduttori.

D= fattore di diluizione.

V= volume dell'enzima.

t= tempo di reazione

2.4.3 Analisi qualitativa dell'attività ligninolitica

L'attività ligninolitica degli aspergilli AB, AF e S-14 è stata saggiata qualitativamente utilizzando la siringaldazina, azina dell'aldeide siringica (4-idrossi-3,5-dimetossibenzaldeide), di colore giallo chiaro, usualmente impiegata per determinare la presenza di laccasi attraverso una reazione colorimetrica. In presenza dell'enzima, infatti, la siringaldazina vira al rosso-fucsia (per ossidazione al corrispondente chinone), tanto più intensamente, quanto maggiore è la concentrazione di laccasi. All'interno di una eppendorf è stata quindi posta una piccola quantità (100 μ l) di estratto enzimatico dei tre ceppi di aspergilli, ottenuto dalle prove di fermentazione, al quale è stata aggiunta una goccia di siringaldazina (95% in etanolo), per valutarne l'eventuale viraggio e, quindi, determinare la presenza di laccasi (Jarosz-Wilkolazka et al., 2002; Floch et al., 2007).

2.4.4. Determinazione concentrazione di proteine

Allo scopo di indagare sull'attività di degradazione delle componenti trofiche nelle derrate colonizzate dai funghi oggetto di studio, si è ritenuto opportuno, rilevare anche la variazione, nel tempo, della concentrazione di proteine negli stessi estratti enzimatici.

La concentrazione delle proteine per ciascun estratto enzimatico è stata determinata spettrofotometricamente, secondo il metodo proposto da Bradford, 1976 utilizzando la formula seguente:

$$\frac{Abs\ 280\ nm}{\epsilon\ \%} * 10 * d. \text{ Dove:}$$

Abs_{280 nm} = assorbanza misurata allo spettrofotometro a lunghezza d'onda 280 nm

ε% = 6.6 = coefficiente di estinzione molare per una soluzione di BSA (sieroalbumina bovina) all' 1% (10 mg/ml)

10 = parametro di conversione

d= fattore di diluizione

2.4.5. Valutazione della degradazione della componente cellulosa

L'attività cellulolitica dei tre aspergilli testati è stata inoltre valutata analizzando le eventuali variazioni del contenuto in cellulosa del substrato di fermentazione al termine del periodo di incubazione. Aliquote di 1 ml per ciascuna sospensione di spore (10⁸ conidi/ml) sono state distribuite in beute di tipo Erlenmeyer da 300 ml contenenti 3 g di crusca di frumento e 100 ml di buffer fosfato 50 mM a pH 6. Per ogni fungo sono state eseguite tre repliche, mentre i controlli negativi sono stati allestiti aggiungendo al substrato di fermentazione 1 ml di acqua distillata al posto delle sospensioni conidiche. Le beute così inoculate sono state poste ad incubare a 30 °C per 7 giorni. Al termine del periodo di incubazione il contenuto delle beute è stato posto ad essiccare a 60 °C per 48 ore e successivamente molito utilizzando un mulino con griglia da 1 mm. Le analisi sono state effettuate presso i laboratori della sezione di Zootecnia del Dipartimento SAAF impiegando il metodo di "Van Soest" (Van Soest et al., 1991). Per ogni campione sono stati determinati la sostanza secca totale % (s.s. %) e il contenuto di cellulosa.

In particolare, i campioni sono stati prima trattati con una soluzione a pH neutro e successivamente con una soluzione a pH acido. La prima soluzione ha permesso di solubilizzare il contenuto cellulare solubile (NDS), rappresentato da carboidrati solubili, comprese le pectine, acidi organici, sostanze azotate proteiche e non proteiche, lipidi e sali minerali solubili. Dopo questo trattamento, ciò che è rimasto, quindi, è un residuo costituito

da emicellulosa, cellulosa, lignina, cutina e incrostazioni silicee che in ambiente neutro non vengono solubilizzate. Tali costituenti vengono definiti fibra neutro-detersa (NDF) e, nel caso dei campioni testati, contengono anche il micelio fungino. Portando l'ambiente a pH acido, con valori intorno 0-1, sono state successivamente solubilizzate le emicellulose e il residuo prende il nome di fibra acido detersa (ADF). Questa componente corrisponde quindi all'NDF privata delle emicellulose che vengono calcolate semplicemente sottraendo l'ADF all'NDF. Dall'ADF è inoltre possibile determinare il residuo fibroso costituito da cellulosa, lignina, cutina, eventuali tannini e pectine e sostanze minerali come la silice, insolubili in ambiente acido. Queste determinazioni sono fondamentali per il calcolo della cellulosa presente nel substrato. In un ambiente ancora più acido, infatti, con valori di pH negativi, anche le cellulose vengono solubilizzate, lasciando come residuo la lignina e la silice. Questo residuo è stato bruciato successivamente in muffola ad una temperatura di 550 °C per 3 ore. Per determinare il contenuto di lignina, qui intesa come lignina acido detersa (ADL), si è quindi proceduto calcolando la differenza di peso del residuo prima e dopo l'incenerimento. Ciò che è rimasto al termine del trattamento è la silice (SiO₂), ossia la componente minerale del substrato fibroso. Infine, applicando una semplice differenza aritmetica ADF-ADL- SiO₂ è stato possibile calcolare il contenuto di cellulosa della matrice analizzata.

2.5. RISULTATI

2.5.1. Analisi qualitativa dell'attività cellulolitica degli aspergilli isolati

I risultati dell'analisi qualitativa sull'attività degradatoria degli aspergilli in collezione sono sintetizzati in Tabella 9. La quasi totalità degli isolati ha mostrato una crescita, sia pure limitata, nel substrato liquido impiegato. La colonizzazione del substrato è proceduta in genere fino all'ultimo rilievo (20 giorni), tranne che per gli isolati SAAF 3, SAAF 4, SAAF 5, SAAF 6, SAAF 9, SAAF 11, SAAF 13, SAAF 29, SAAF 33, SAAF 34, SAAF 37, SAAF 44, SAAF 45, per i quali l'accrescimento si è arrestato al 2 rilievo. Per alcuni ceppi, inoltre è stata registrata una variabilità intraspecifica, indice del fatto che la produzione di enzimi è legata all'espressività genica propria di ogni ceppo. Infine, la massima colonizzazione del substrato è stata osservata per i ceppi SAAF 7 e SAAF 14 che hanno macerato completamente la striscia di carta producendo, nel contempo, un'abbondante massa miceliare (Figura 5). In particolare, SAAF 14 rispetto a SAAF 7 già al terzo rilievo (15 giorni) ha mostrato una maggiore attività di degradazione.

Tabella 9- Determinazione qualitativa dell'attività cellulolitica degli aspergilli in collezione. 0= degradazione nulla; 1= degradazione bassa/formazione del micelio; 2=degradazione media; 3=degradazione alta; 4=degradazione completa.

Codice isolato	Taxa	Attività degradatoria			
		5 giorni	10 giorni	15 giorni	20 giorni
SAAF 1	<i>A. Sez. Nigri</i>	1	1	2	2
SAAF 2	<i>A. tubingensis</i>	0	1	1	2
SAAF 3	<i>A. Sez. Nidulantes</i>	0	1	1	1
SAAF 4	<i>A. flavus</i>	1	1	1	1
SAAF 5	<i>A. awamori</i>	1	1	2	3
SAAF 6	<i>A. amstelodami</i>	0	0	1	1
SAAF 7	<i>A. niger</i>	1	2	2	4
SAAF 8	<i>A. niveoglaucus</i>	0	1	1	2
SAAF 9	<i>A. pseudoglaucus</i>	0	1	1	1
SAAF 10	<i>A. Sez. Nigri</i>	1	1	1	2
SAAF 11	<i>A. amstelodami</i>	1	1	1	1
SAAF 12	<i>A. brasiliensis</i>	1	1	2	3
SAAF 13	<i>A. amstelodami</i>	1	1	1	1
SAAF 14	<i>A. tubingensis</i>	1	2	3	4
SAAF 15	<i>A. niger</i>	1	2	2	3
SAAF 17	<i>A. oryzae</i>	1	2	2	2
SAAF 27	Morfotipo eurotium	1	1	1	2
SAAF 28	<i>A. versicolor</i>	1	1	1	2
SAAF 29	<i>A. flavus</i>	1	1	1	1
SAAF 30	<i>A. fumigatus</i>	1	1	2	2
SAAF 31	<i>A. sydowii</i>	1	2	2	3
SAAF 32	<i>A. calidostus</i>	1	1	2	2
SAAF 33	<i>A. pseudoglaucus</i>	0	1	1	1
SAAF 34	<i>A. fumigatus</i>	1	1	1	1
SAAF 35	<i>A. Sez. Flavi</i>	1	1	2	2
SAAF 36	<i>A. Sez. Flavi</i>	1	1	2	2
SAAF 37	<i>A. Sez. Flavi</i>	1	1	1	1
SAAF 38	<i>A. flavus</i>	1	1	2	2
SAAF 39	<i>A. Sez. Nigri</i>	0	1	1	2
SAAF 40	<i>A. fumigatus</i>	1	1	1	2
SAAF 41	<i>A. Sez. Flavi</i>	1	2	2	2
SAAF 42	<i>A. Sez. Flavi</i>	1	2	2	2
SAAF 43	<i>A. flavus</i>	1	1	2	2
SAAF 44	<i>A. Sez. Flavi</i>	1	1	1	1
SAAF 45	<i>A. fumigatus</i>	1	1	1	1
SAAF 46	<i>A. fumigatus</i>	1	2	2	2
SAAF 47	<i>A. fumigatus</i>	1	1	2	2
MUCL 18903	<i>A. flavus</i>	0	1	1	2
MUCL 20039	<i>A. brasiliensis</i>	1	1	1	1

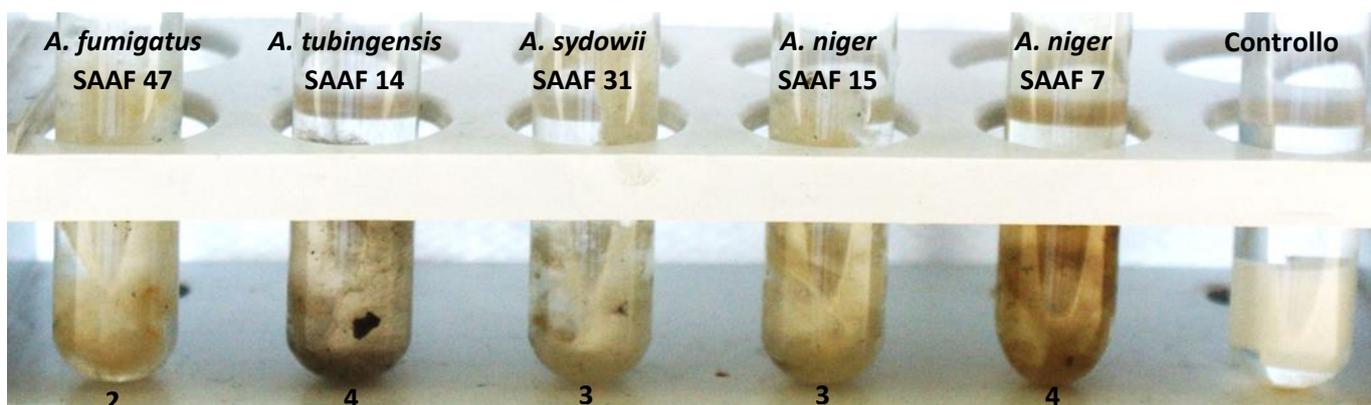


Figura 5 – Differenti livelli di degradazione della striscia di carta da parte di *Aspergillus* spp.

2.5.2 Attività quantitativa di endo- ed eso- β -1,4-gluconasi

Ottenimento della curva di glucosio standard

Allo spettrofotometro (540 nm) è stata misurata l'assorbanza delle soluzioni di glucosio a concentrazione nota (Tabella 10). Riportando i sei punti di lettura in un grafico a dispersione è stato possibile, quindi, interpolare ed ottenere l'equazione della curva standard di glucosio, indispensabile per i successivi calcoli di attività enzimatica (Figura 6). Sostituendo, infatti, alla x dell'equazione i dati relativi all'assorbanza degli estratti enzimatici dei tre campioni (AB, AF e S-14), misurata allo spettrofotometro, è stata ottenuta la concentrazione (y) degli zuccheri riduttori presenti nell'estratto enzimatico. Tali concentrazioni, sostituite alle formule (1) e (2) hanno consentito di ottenere i valori di attività enzimatica.

Tabella 10 – valori di assorbanza delle soluzioni di glucosio a concentrazione nota.

Curva glucosio

Punto	Abs	Conc (g/L)
1	0,3414	1,2
2	0,2914	1
3	0,247	0,8
4	0,173	0,6
5	0,1284	0,4
6	0,0837	0,2

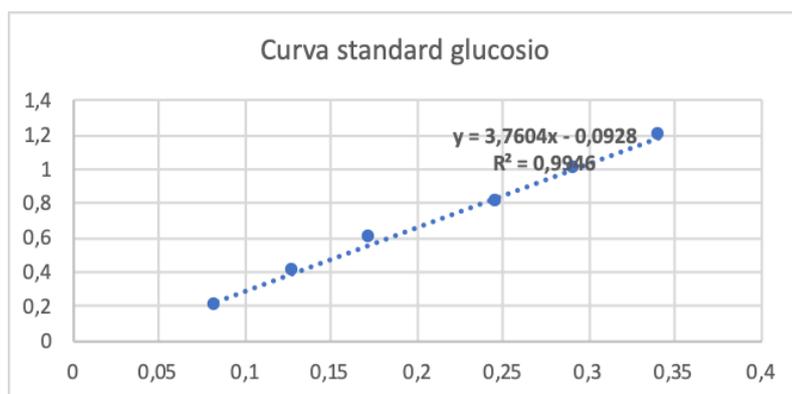


Figura 6 – Interpolazione ed equazione della curva standard di glucosio.

Attività di endo- β 1,4-glucanasi (CMCasi)

Il grafico in Figura 7 riporta l'attività dell'endo-glucanasi dei tre ceppi in esame. Il valore più alto di attività enzimatica, 2.37 UI/ml, è stato osservato per il ceppo AF al primo rilievo (24 ore di incubazione), mentre S-14 al secondo rilievo (48 ore), ha mostrato valori di 2.16 UI/ml. La minore attività è stata evidenziata da AB a 48 ore di incubazione (0.99 UI/ml). L'andamento dell'attività enzimatica di ciascun ceppo fungino ha evidenziato curve differenti. In particolare, in AF, la produzione enzimatica è cessata dopo 48 ore di fermentazione; in AB è stato osservato un andamento sinusoidale decrescente, con valore massimo a 48 ore (0.99 UI/ml), dimezzato a 96 ore (0.6 UI/ml) e minimo a 144 ore (0.05 UI/ml); in S-14, invece, oltre al primo picco rilevato a 48 ore, ne è stato osservato uno più contenuto (0.46 UI/ml) al sesto rilievo (144 ore).

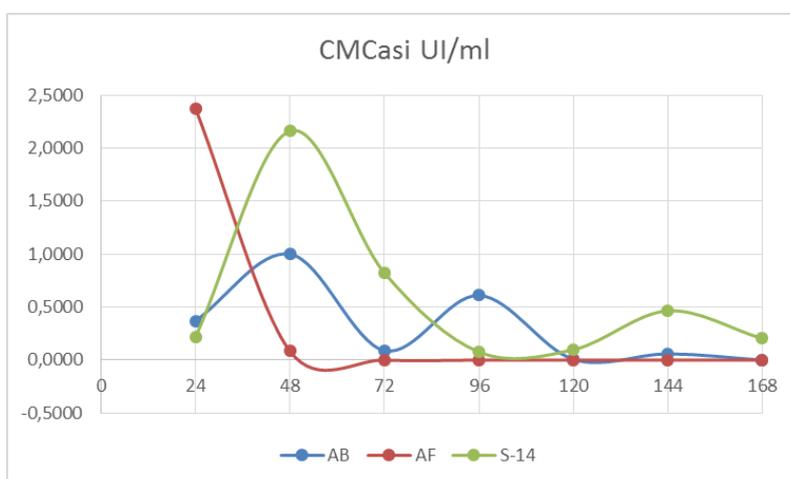


Figura 7 – Andamento dell'attività endo β 1,4-glucanasi (UI/ml) di *A. brasiliensis* MUCL 29039 (AB), *A. flavus* MUCL 18903 (AF) e *A. tubingensis* (S-14).

Attività eso- β 1,4-glucanasi (PFasi)

Il grafico in Figura 8 mostra l'andamento dell'attività dell'esoglucanasi per i 3 ceppi di *Aspergillus* saggiati. I risultati evidenziano che il livello di attività enzimatica maggiore è stato registrato, anche in questo caso, per AF (0.92 UI/ml) al primo rilievo, mentre S-14 a 48 ore di incubazione, ha mostrato valori di 0.65 UI/ml. La minore attività è stata osservata per AB, al secondo rilievo con valori di 0.42 UI/ml.

Anche in questo caso l'attività enzimatica dei tre ceppi ha generato curve con andamenti differenti. In particolare, per AF la produzione enzimatica si è ridotta in maniera piuttosto lineare, con valori di attività di 0.42 UI/ml e 0.21 UI/ml, rispettivamente a 48 e 72 ore. L'attività è risultata nulla a 96 ore, mentre, all'ultimo rilievo (168 ore), ha mostrato un lieve ulteriore incremento (0.19 UI/ml). Per AB, dopo il picco osservato a 48 ore, l'attività è

risultata nulla a 72 ore, mantenendosi tale sino al termine delle analisi. S-14, ha mostrato la massima attività enzimatica a 48 ore, che si è gradualmente ridotta nei rilievi successivi, sino ad annullarsi dopo 120 ore di incubazione (quinto rilievo).

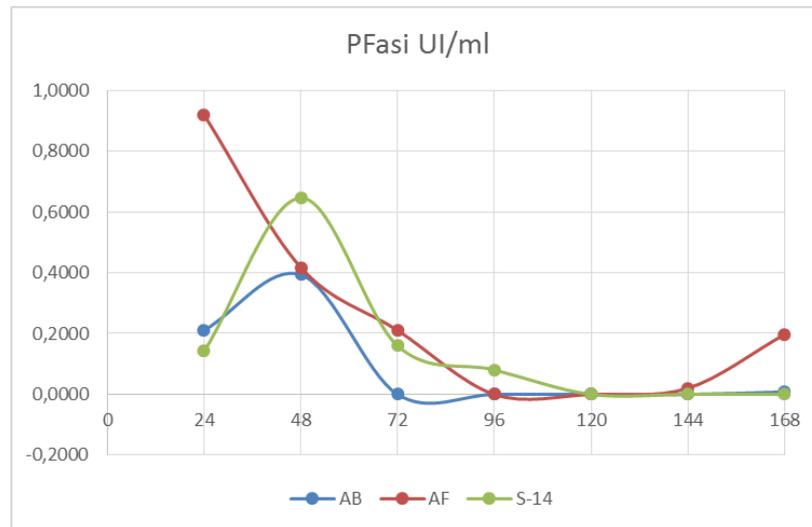


Figura 8 - Andamento dell'attività endo β 1,4-glucanasi (UI/ml) di *A. brasiliensis* MUCL 29039 (AB), *A. flavus* MUCL 18903 (AF) e *A. tubingensis* (S-14).

Analisi qualitativa dell'attività ligninolitica

In un'eppendorf da 1.5 ml, a 100 μ l di estratto enzimatico di AF, AB e S-14 è stata aggiunta una goccia di siringaldazina al 95% in etanolo, allo scopo di evidenziare la presenza di laccasi per reazione colorimetrica (viraggio al rosso fucsia). In nessun caso è stato rilevato il viraggio, confermando la mancata produzione dell'enzima ligninolitico, come noto per i funghi appartenenti al genere *Aspergillus*.

Concentrazione proteine

I valori della concentrazione di proteine negli estratti enzimatici dei tre ceppi sono riportati nel grafico in Figura 9.

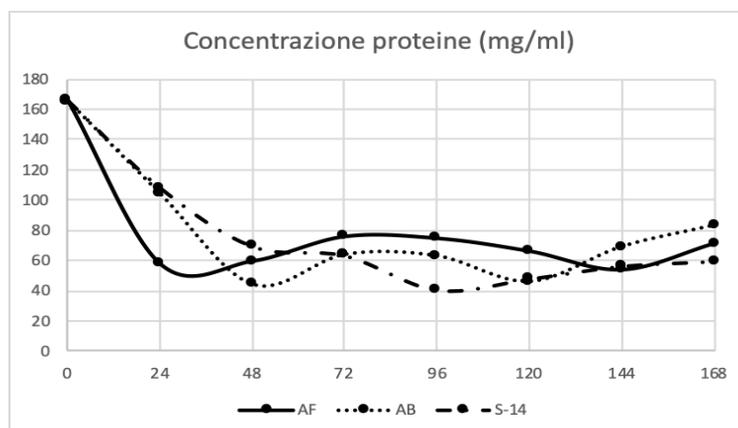


Figura 9 - Andamento della concentrazione di proteine espressa in mg/ml al variare del tempo (ore di fermentazione).

L'analisi della concentrazione proteica ha evidenziato che i ceppi di aspergilli AF, AB e S-14 sono in grado di degradare, nell'arco di 24-48 ore, la gran parte delle sostanze trofiche presenti nel substrato. Tali sostanze hanno evidenziato concentrazioni assai più contenute, ma piuttosto stabili, sino al termine dei saggi. In particolare, il ceppo AF ha ridotto di quasi un terzo il contenuto proteico in sole 24 ore, da 165 a 60 mg/ml; successivamente le sostanze azotate nel substrato sono risultate variare tra 50 e 80 mg/ml. Il ceppo AB ha abbattuto la concentrazione sino a 40 mg/ml in 48 ore, mentre il ceppo S-14 ha raggiunto lo stesso valore in 96 ore, mantenendo la concentrazione tra 40 e 80 mg/ml, il primo e 40 e 60 mg/ml, il secondo.

Valutazione della degradazione della componente cellulosa

Sulla base dei risultati ottenuti nei saggi precedenti si è ritenuto opportuno procedere con le osservazioni sullo stato di degradazione della componente cellulosa della crusca di frumento, utilizzata come substrato di fermentazione per i tre ceppi AF, AB e S-14. I risultati sono riportati in Tabella 11.

Tabella 11 – Contenuto di sostanza secca (ss tot %) e cellulosa (g/100 g di ss) della crusca di frumento inoculata con i tre ceppi di aspergilli.

Campione	s.s. tot %	Cellulosa (g/100 g di s.s.)
AF	2.93	26.29
AB	2.55	25.22
S-14	2.92	27.86
Controllo	2.75	20.95

Ciò che si evince dai risultati è un aumento del contenuto in cellulosa dei campioni inoculati rispetto al controllo. In particolare il valore più elevato è stato registrato per i campioni inoculati con il ceppo S-14. In generale il contenuto di cellulosa non dovrebbe essere maggiore rispetto al controllo, in quanto questo polisaccaride viene utilizzato dai funghi per la loro crescita e il loro metabolismo. Tuttavia, come riportato in studi precedenti (Nayan et al., 2019) questo aumento del contenuto in cellulosa potrebbe essere dovuto a diversi fattori che devono essere presi in considerazione quando il metodo Van Soest viene utilizzato per questo tipo di determinazioni. In particolare:

- l'analisi dei monosaccaridi può includere i carboidrati non strutturali che sono solubili in soluzioni neutre o acide;

- nei campioni non inoculati la cristallinità della cellulosa e l'interazione con altre componenti della parete cellulare potrebbe limitarne la completa idrolisi;
- si verifica un'interferenza tra la biomassa fungina e il contenuto di cellulosa e glucani. Infatti, pur non essendo presente cellulosa nella biomassa fungina, alcuni composti come polisaccaridi (β -(1-3)-D-glucano e α -(1-3)-D-glucano), così come la chitina (poli(N-acetil-1,4- β -D-glucopiranosamina), potrebbero essere inclusi nel calcolo del contenuto totale di cellulosa.

Tenendo conto di tutti questi fattori, il maggiore contenuto di cellulosa registrato per il campione S-14 (crusca di frumento inoculata con *A. tubingensis*) potrebbe quindi essere dovuto non solo ad un'elevata attività enzimatica già confermata durante le prove precedenti, ma anche ad una maggiore biomassa fungina sviluppatasi nel substrato di fermentazione rispetto alle altre due specie.

2.6. DISCUSSIONI

Tali indagini hanno consentito di caratterizzare l'attività enzimatica dei ceppi fungini considerati. Lo screening iniziale condotto mediante analisi qualitativa con degradazione della striscia di carta, ha mostrato che la gran parte degli aspergilli in collezione ha una certa abilità nel degradare la cellulosa. Questa prima analisi ha consentito di selezionare tre ceppi, di cui uno risultato il più attivo nella degradazione del substrato cellulosico (*A. tubingensis*) e altri due noti micotossinogeni (*A. flavus* e *A. brasiliensis*), che comunque hanno mostrato una moderata attività. In particolare, relativamente all'attività degli enzimi endo β 1,4-glucanasi, i ceppi in esame hanno mostrato maggiore attività enzimatica rispetto a quelli saggiati da Manjarrés et al., (2011), Gutiérrez-Ramirez et al., (2012) e El-Nahrawy et al., (2017) che riportano valori massimi di attività enzimatica di ceppi di *Aspergillus* spp rispettivamente di 0.178 UI/ml, 0.00679 UI/ml e 0.063 UI/ml. I risultati ottenuti sono invece paragonabili con lo studio di Devi e Kumar, (2012) che riportano valori massima di attività enzimatica che vanno da 1.20 UI/ml a 3.89 UI/ml. Inoltre, relativamente agli enzimi eso- β 1,4-glucanasi le attività descritte nel presente studio risultano essere maggiori di quelle riportate da Solomon et al., (1997) e Manjarrés et al., (2011) per *Aspergillus* spp. Tuttavia tali differenze potrebbero essere dovute, oltre alla diversa specie considerata, anche al diverso substrato di fermentazione utilizzato (bagassa), nel primo caso e all'interazione con un altro microrganismo (*Trichoderma* sp), nel secondo. I risultati ottenuti sono invece comparabili con quelli riportati da Couri et al., (2000), ottenuti mediante la crescita di *A. niger* su crusca di frumento, stesso substrato utilizzato nel presente studio.

Particolarmente evidente risulta la degradazione delle proteine da parte dei tre ceppi oggetto di studio, che hanno mostrato di abbattere il contenuto di molecole azotate di circa 2/3 nell'arco di 24-96 ore di incubazione.

Inoltre, seppur il metodo Van Soest, utilizzato per il calcolo della degradazione della cellulosa nel substrato di fermentazione dei tre ceppi fungini testati, non si è rivelato accurato, includendo nel calcolo anche la biomassa fungina, non sono state evidenziate grosse differenze nell'attività degradatoria dei tre funghi.

Per concludere, gli elevati valori di attività enzimatica registrati, insieme ai risultati ottenuti anche dalle prove qualitative, lasciano supporre che gli alimenti contaminati da alcune specie di aspergilli possono andare incontro ad un rilevante depauperamento delle loro caratteristiche organolettiche, chimiche e nutrizionali, con conseguente perdita non solo di qualità ma anche di "*shelf life*".

CAPITOLO 3: MESSA A PUNTO DI SAGGI LAMP (LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION) PER IL RAPIDO RILEVAMENTO DI ASPERGILLI IN DERRATE CONTAMINATE

3.1. METODI MOLECOLARI PER IL RILEVAMENTO DI ASPERGILLI POTENZIALMENTE MICOTOSSINOGENI

La diagnosi di microrganismi fungini in alimenti destinati al consumo umano o animale, rappresenta, per il prossimo futuro, una delle sfide più ardue. Noti i loro effetti deleteri sia sulla qualità nutraceutica delle derrate, che sulla loro sanità, la determinazione precoce del livello di contaminazione e, soprattutto, del rischio da micotossicosi potrebbe garantire importanti vantaggi di tipo igienico ed economico. I tradizionali metodi di identificazione e rilevamento dei funghi contaminanti, attualmente, comprendono la coltura in piastra su diversi substrati, lo studio delle caratteristiche morfologiche e l'analisi molecolare tramite PCR (Reazione a Catena della Polimerasi) con l'utilizzo di primer generici in grado di amplificare porzioni ben conservate del genoma come la regione ITS e il gene della β -tubulina (Henry et al., 2000). Tali metodologie, oltre a richiedere grande esperienza in campo micologico, molte volte, a causa del loro basso grado di specificità e sensibilità e della forte similarità che esiste sia a livello morfologico che molecolare tra queste specie, possono dare risultati inesatti con conseguenze sull'errata distinzione tra ceppi potenzialmente micotossinogeni e non (Frisvad et al., 2019). Per esempio, nel caso specifico di aspergilli potenzialmente aflatossinogeni appartenenti alla sezione dei *Flavi*, l'amplificazione della regione ITS non è in grado di differenziare la specie atossinogena *A. sojae* da quella tossinogena *A. parasiticus*, ma è in grado invece di separare il sottogruppo *A. flavus/A. parasiticus* dal sottogruppo *A. oryzae/A. flavus* (Sudini et al., 2015). Inoltre, le tradizionali metodiche PCR, essendo reazioni enzimatiche, sono solitamente molto sensibili alla presenza di inibitori. Questi possono essere già presenti nel campione o possono essere introdotti durante la sua lavorazione o, ancora, durante l'estrazione del DNA. Infatti, alcuni reagenti (fenolo, etanolo, ecc...) utilizzati per estrarre il DNA possono ritrovarsi, alla fine del processo, assieme al DNA template ed inibire l'attività della polimerasi (Schrader et al., 2012). Ancora, si tratta, in genere, di metodi che richiedono tempi di analisi molto lunghi, elevati costi di esecuzione e personale altamente specializzato (Edwards et al., 2002).

Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi protocolli PCR basati sull'amplificazione di geni coinvolti nella biosintesi di aflatossine (Criseo et al., 2001; Fakruddin et al., 2015; Rahimi et al., 2016; Sadhasivam et al., 2017). Nonostante l'elevata specificità, questi metodi

si basano sull'amplificazione di geni cosiddetti "a singola copia", ossia sequenze uniche del DNA presenti in singole o poche copie nel genoma e quindi risultano essere molto meno sensibili rispetto a protocolli che prevedono l'amplificazione di geni multi-copia, dando origine a volte a dei falsi positivi (Jurado et al., 2006). Ad esempio, set di primer specifici sono stati sviluppati per geni strutturali coinvolti nelle tappe metaboliche della produzione delle aflatossine, come *nor-1*, *ver-1*, *omt-A*, in grado di differenziare *A. flavus* e *A. parasiticus* da altre specie non aflatossinogene, ma non i ceppi non aflatossinogeni nella stessa specie. Ancora, studi sul gene regolatore *AflR* hanno mostrato come questo fosse presente anche in ceppi non produttori di aflatossine (Sudini et al., 2015). Nasce da ciò la necessità di sviluppare nuove tecniche di diagnostica molecolare in grado di garantire il rilevamento di specie fungine rilevanti per il loro rischio igienico in ambito agroalimentare, in maniera rapida, precisa e a minor costo possibile.

Pertanto, come possibile alternativa alle analisi basate sulla PCR, la loop-mediated isothermal amplification (LAMP) è stata descritta da Notomi et al., (2000) come uno strumento di diagnostica rapido, dall'elevata sensibilità e specificità, utile al rilevamento di microrganismi dannosi sia a partire da colture microbiche pure che direttamente da campioni contaminati.

3.2. NUOVE STRATEGIE DIAGNOSTICHE: LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP)

L'amplificazione *in vitro* degli acidi nucleici, attualmente, è una delle metodologie d'analisi più usata per la diagnostica molecolare. Il primo metodo di amplificazione ad essere messo a punto e, tutt'oggi il più utilizzato, è sicuramente la reazione a catena della polimerasi (PCR) (Mullis et al., 1986). Questa tecnica presenta, tuttavia, diversi limiti come: costi elevati dovuti prevalentemente all'utilizzo di macchine costose (termociclatori); rischio elevato di contaminazioni e di inibizione; esecuzione da parte di personale tecnico altamente specializzato. Per questi motivi, nell'ultimo ventennio, altre metodiche di amplificazione sono state sviluppate e, in particolare, tra queste, quella che sta riscontrando maggiori successi è la loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Notomi et al., 2000).

Questa tecnica presenta notevoli vantaggi: in primo luogo la reazione di amplificazione, come si evince dal nome, si svolge a temperatura costante (isothermal), non rendendo necessario l'uso del termociclatore; l'efficienza di amplificazione è molto elevata e avviene senza denaturazione iniziale del DNA; vi è un'elevata tolleranza agli inibitori; la quantità di prodotto amplificato è molto elevata e il risultato dell'amplificazione può essere visualizzato

direttamente in provetta; è una tecnica con elevata sensibilità; può essere utilizzato come metodo diagnostico “*point of care*” (Notomi et al., 2000; Mori et al., 2001; Nagamine et al., 2001; Parida et al., 2008; Francois et al., 2011; Zambon, 2015; Panno et al., 2020). La LAMP è quindi un’amplificazione isoterma di acidi nucleici che si basa sull’attività di una polimerasi termostabile con attività di “*strand displacement*” ricavata da *Bacillus stearothermophilus* (*Bst* polimerasi), e su 6 primer che riconoscono in maniera altamente specifica 8 regioni del DNA target: regioni F3c, F2c e F1c in direzione 3’ e regioni B1, B2 e B3 in direzione 5’ (Notomi et al., 2000)

3.2.1. Schema di reazione LAMP

Lo step iniziale prevede l’attività di due primer cosiddetti “*inner*” e due primer “*outer*”. Gli inner primer vengono chiamati “*forward inner primer*” (FIP) e “*backward inner primer*” (BIP) ed ognuno contiene due distinte sequenze corrispondenti alle sequenze senso e antisenso del DNA target.

In particolare il primer FIP contiene la porzione F1c e la sequenza F2 complementare ad F2c, mentre il primer BIP contiene la sequenza B1c complementare a B1 e la porzione B2. I due primer outer comprendono, invece, B3 ed F3, complementare ad F3c. Le coppie di primer FIP-BIP e F3-B3 sono fondamentali per l’avvio della reazione. Questa comincia con l’aggiunta della *Bst* polimerasi e viene condotta, in genere, a 65°C. A quella temperatura infatti il DNA si trova in una condizione di equilibrio tale per cui una frazione si trova sotto forma di doppio filamento e l’altra frazione sotto forma di singolo filamento.

All’inizio della reazione, la porzione F2 dei primer FIP aderisce alla regione complementare F2c del DNA target e in questo modo comincia la sintesi di un filamento di DNA complementare grazie all’azione della *Bst* polimerasi (Figura 10 a-b).

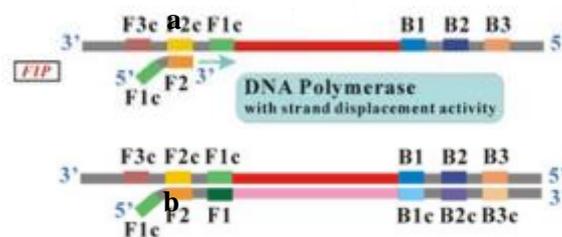


Figura 10 – a) adesione dei primer FIP alla regione complementare; b) sintesi del filamento complementare ad opera della polimerasi.

Il primer F3 aderisce invece alla regione F3c del DNA target e, sempre grazie all'azione di *strand displacement* della *Bst* polimerasi, scalza il filamento prodotto in precedenza (Figura 11a). Una volta terminati questi step si assiste quindi alla formazione di un doppio filamento di DNA complementare al template iniziale (Figura 11b), mentre il filamento prodotto dal legame del primer FIP viene scalzato dalla *Bts* polimerasi, in seguito all'azione del primer F3, sotto forma di singolo filamento (Figura 11c).

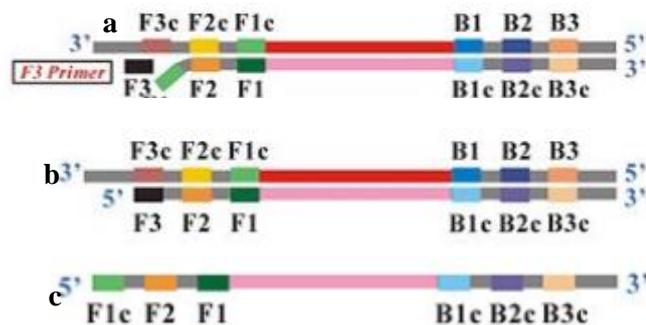


Figura 11 – a) adesione dei primer F3 alla regione complementare F3c, con attività di *strand displacement* della polimerasi che scalza il filamento precedentemente prodotto; b) sintesi del filamento complementare; c) filamento singolo scalzato dalla *Bts* polimerasi.

Questo singolo filamento prodotto, presenta all'estremità 5' due regioni complementari (F1c ed F1), che, riconoscendosi, si uniscono formando una sorta di ansa. Tale filamento serve da template per l'azione dei primer BIP e B3 (Figura 12a). La porzione B2 del primer, infatti, aderisce alla porzione B2c del template e la polimerasi comincia a sintetizzare un filamento complementare fino a quando non incontra l'ansa precedentemente formata all'estremità 5'. A quel punto, la polimerasi, grazie alla sua attività *strand displacement* linearizza l'ansa, il primer B3 si lega alla regione B3c e la polimerasi sintetizza un nuovo filamento in direzione 3'-5', scalzando il filamento prodotto in precedenza e formando un segmento di DNA a doppio filamento identico a quello di partenza (Figura 12b). Il filamento che era stato invece scalzato dalla polimerasi, presenta adesso, alle due estremità, delle regioni complementari vicine, che richiudendosi ad ansa formano una struttura cosiddetta a manubrio (Figura 12c).

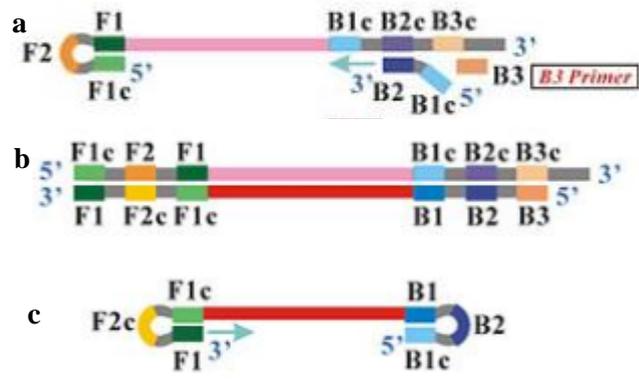


Figura 12 – a) Formazione della struttura ad ansa ed adesione dei primer BIP e B3; b) sintesi del filamento complementare; c) filamento singolo scalzato dalla *Bts* polimerasi con forma a manubrio.

Una volta definita la struttura a manubrio ha inizio la reazione di amplificazione ciclica, a seguito della quale il prodotto finale è rappresentato da diverse strutture a manubrio di varie lunghezze e da strutture a cavolfiore con manubri multipli ottenuti dall'annealing tra ripetizioni alternativamente invertite della regione target nello stesso filamento (Figura 13). In questo modo, la sequenza target viene amplificata tre volte ogni mezzo ciclo (Notomi et al., 2000).

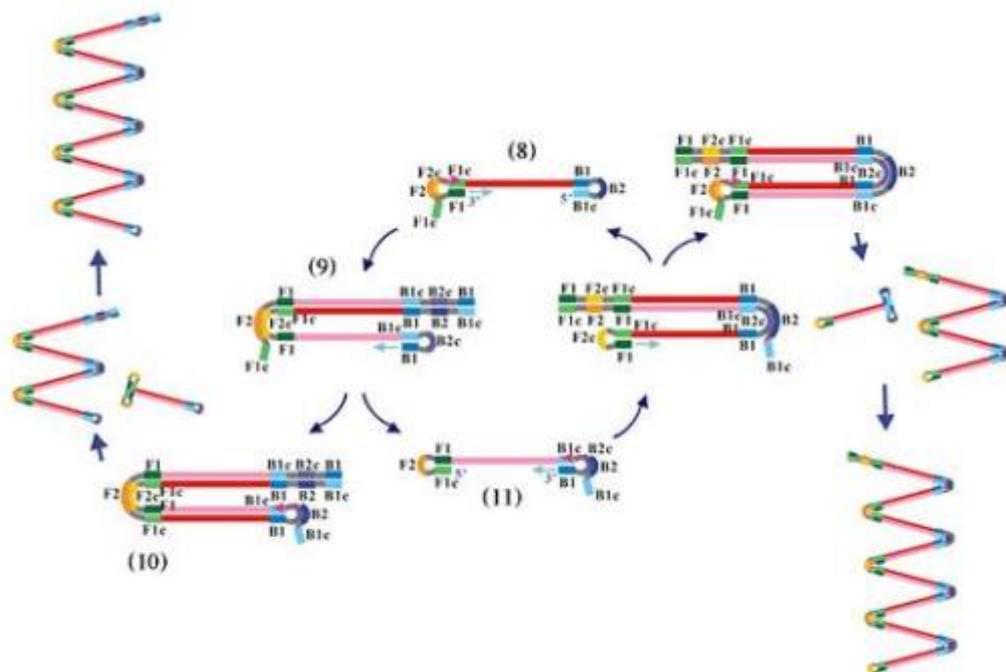


Figura 13 – prodotti finali della reazione LAMP

Al fine di aumentare la velocità di amplificazione è inoltre possibile introdurre nella mix di reazione i cosiddetti primer Loop, LF (*Loop Forward Primer*) ed LB (*Loop Backward Primer*). Il primer LF viene disegnato utilizzando la sequenza complementare della porzione di DNA compresa tra F1 e F2, mentre il primer LB utilizzando la porzione compresa tra B1 e B2. Grazie ai primer Loop, quindi, la polimerasi ha maggiori siti di attacco disponibili, diminuendo il tempo di reazione fino ad un terzo ed aumentandone la sensibilità (Nagamine et al., 2002) (Figura 14).

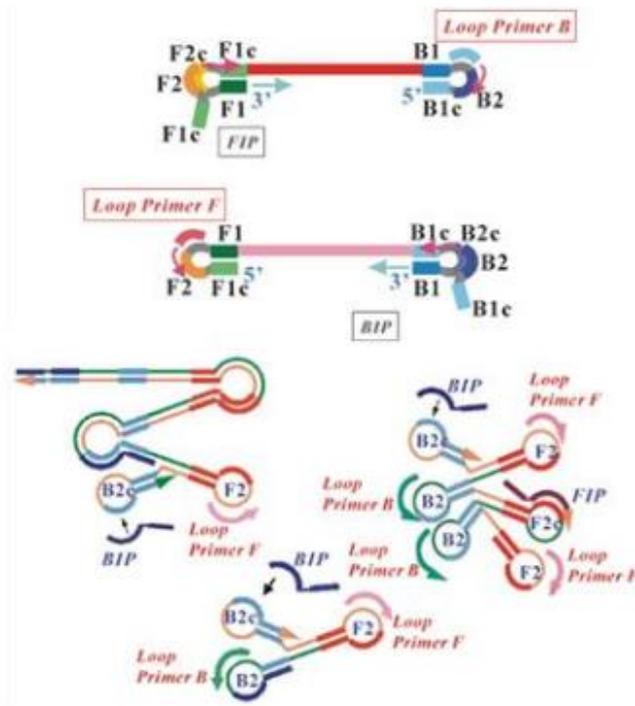


Figura 14 – Azione dei primer Loop.

3.3. SCOPO DEL LAVORO

I risultati delle analisi finora condotte hanno messo in luce frequenti contaminazioni da aspergilli, agenti di degradazione delle derrate e anche potenzialmente micotossinogeni. Tra questi, particolare preoccupazione destano quelli appartenenti alla sezione dei *Flavi*. Come già accennato in precedenza, infatti, questa sezione contiene un gran numero di specie, capaci di produrre un'ampia varietà di tossine, aflatossine nello specifico, che risultano essere le più importanti in riferimento alla sicurezza alimentare. Gli aspergilli della predetta sezione, noti per la produzione delle pericolose molecole tossiche sono, principalmente, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii* e *A. bombycis* (Gonzalez-Salgado et al., 2008). Alla stessa sezione appartengono, inoltre, funghi morfologicamente molto simili a quelli precedentemente citati, ma non produttori di aflatossine come *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. tamarii*, che trovano, invece, impiego per la produzione di alcuni alimenti fermentati (Cary e Ehrlich, 2006).

Le analisi effettuate su matrici alimentari, mirate ad implementare il livello di sicurezza sanitaria e prevenire la contaminazione sia da funghi che, quindi, da micotossine, dovrebbero garantire la possibilità di rilevare, in maniera rapida e precisa, la presenza di questi microrganismi potenzialmente aflatossinogeni, direttamente nelle derrate. Ad oggi, infatti, questo tipo di prevenzione, risulta l'unico strumento realmente utile per evitare che le aflatossine entrino nella filiera alimentare. Inoltre, lo sviluppo di questo tipo di saggi, basati sull'amplificazione del DNA, dovrebbe tener conto della complessità delle matrici analizzate e del fatto che alcune delle loro componenti chimiche possano determinare fenomeni di inibizione delle reazioni (Luque et al., 2012).

Sulla base di tali premesse, è stato proposto un metodo diagnostico per il rapido rilevamento di *A. flavus* (comune fungo contaminante gli alimenti, ubiquitario, particolarmente attivo nella decomposizione delle sostanze organiche e noto produttore di aflatossine direttamente su derrate alimentari), in modo tale da diminuire tempi e costi di analisi e la frequenza di falsi positivi. Lo sviluppo di questi saggi può essere, infatti, utile per determinare in quale punto della filiera si instaurino questi funghi, consentendo, quindi, di prevenire a monte il problema della contaminazione da micotossine.

3.4. MATERIALI E METODI

3.4.1. Scelta delle regioni target da amplificare

L'efficienza della LAMP è correlata all'amplificazione di una specifica regione di DNA, caratteristica di uno specifico microrganismo target. Dalla bibliografia si rileva che molte reazioni di amplificazione prevedono l'utilizzo di primer specifici per l'amplificazione di geni direttamente coinvolti nella biosintesi di aflatoxine (Niessen, 2008; Liu et al., 2014; Niessen et al., 2018). Tuttavia, considerato lo scopo di questo lavoro, si è ritenuto opportuno indagare sulla presenza di un fungo contaminante, potenzialmente aflatoxinogeno impiegando come target la regione ITS specifica per *A. flavus* (Gonzales-Salgado et al., 2008; Liu et al., 2014) e, per la prima volta, il gene *rmt-A* che codifica per un'arginina metiltransferasi in *A. flavus* con un ruolo fondamentale nel controllo della produzione di conidi e sclerozi e nel suo metabolismo secondario (Satterlee et al., 2019).

3.4.2. Amplificazione PCR con primer specifici

La prima fase è consistita nell'amplificazione, mediante primer specifici, della regione ITS di 2 ceppi di *A. flavus* precedentemente isolati (SAAF 38 e SAAF 43) e del ceppo aflatoxinogeno *A. flavus* MUCL18903, al fine di ottenere la regione ITS target per i successivi saggi LAMP. Il saggio di PCR specifica è stato messo a punto secondo quanto riportato da Gonzales-Salgado et al., 2008, utilizzando i primer specifici per *A. flavus*:

FLA1 (5'-GTAGGGTTCCTAGCGAGCC-3');

FLA2 (5'-GGAAAAAGATTGATTTGCGTTC-3').

La reazione di amplificazione è stata eseguita in 25 µl di miscela di reazione contenente: 2.5 µl di Buffer PCR 10X (Thermo Scientific), 0.25 µl di dNTPs (10 mM), 1.25 µl di ciascun primer (20 mM) e 0.2 µl di Taq DNA polimerasi 0.5 U (Dream Taq, Thermo Scientific). Come DNA bersaglio per la reazione di PCR sono stati utilizzati 3 µl di DNA precedentemente estratto con il protocollo basato sull'uso del CTAB (Torta et al. 2015).

L'amplificazione è stata effettuata in termociclatore MultiGene OptiMax (Labnet International Inc.) con il seguente programma: 1 ciclo di 5 min a 95°C, 26 cicli di 30 sec a 95°C (denaturazione), 30 sec a 58°C (annealing), 45 sec a 72°C (estensione) e 1 ciclo finale di 5 min a 72°C. Successivamente il prodotto di amplificazione è stato separato in gel d'agarosio all'1% e l'amplicone visualizzato al transilluminatore UV (330 nm).

La sequenza del gene *rmt-A* specifico per *A. flavus*, utilizzata successivamente per il disegno dei relativi primer LAMP, è stata invece scaricata da GenBank (accession number XM002381889; Satterle et al., 2016).

3.4.3. Purificazione del prodotto PCR e ottenimento della sequenza target ITS

I prodotti PCR sono stati purificati utilizzando il protocollo Exo I-SAP secondo le istruzioni della casa produttrice (Applied Biosystems, Foster City, CA). Il primer FLA 1 è stato utilizzato nella reazione di sequenziamento eseguita con il kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA), seguita dalla precipitazione con Etanolo/EDTA/Sodio Acetato (secondo le istruzioni della casa produttrice). Infine, l'elettroforesi capillare è stata eseguita in un 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) e le sequenze ottenute sono state allineate con quelle depositate in GenBank utilizzando BLASTn.

3.4.4. Disegno dei primer LAMP e messa a punto della reazione

I primer LAMP, sulla base delle sequenze target selezionate, sono stati disegnati utilizzando il software PrimerExplorer v.5. Questo software permette di caricare online la sequenza di DNA target e impostare i parametri utili al fine della creazione dei primer. I parametri presi in considerazione sono:

- la temperatura di melting (T_m), temperatura alla quale il 50% delle molecole si trova in forma di doppia elica e il restante 50% in forma di singola elica, che deve essere attorno ai 65°C;
- la stabilità dell'estremità dei primer che fungono da innesco per la sintesi del nuovo filamento di DNA. Queste estremità, per avere un elevato grado di stabilità devono essere disegnate in modo tale che l'energia libera sia di -4 kcal/mol o più bassa. Se la variazione di energia libera ΔG è negativa, allora, la reazione procede in modo spontaneo;
- il contenuto in GC che deve essere compreso tra il 40 e il 65%;
- la distanza tra i primer che normalmente è compresa tra 120 e 180 paia di basi e che può essere aumentata fino a 250 pb per i primer F2-B2, tra 40 e 60 e fino a 80 pb per i primer Loop, da 0 a 20 per F2-F3 e da 0 a 100 per i primer F1c-B1c.

Una volta caricate nel programma le sequenze bersaglio ed impostati i parametri termodinamici specifici, il software ha generato automaticamente diversi set di primer. Poiché l'ibridazione dei primer al DNA bersaglio nella fase iniziale è fondamentale per

l'efficienza della reazione LAMP, le sequenze e le dimensioni dei primer sono state selezionate tra quelle con temperature di melting comprese tra 60-65 °C, valori di temperatura ottimali per la *Bst* polimerasi.

I saggi LAMP sono stati eseguiti testando tutti i set di primer selezionati in 12 µl di volume di reazione contenente 1X WarmStart LAMP Master Mix (New England BioLabs Inc.), 200 nM di ogni primer F3 e B3, 1.6 µM di ogni primer FIP e BIP, 400 nM di ogni Loop primer, 1X fluorescent dye (New England BioLabs Inc.) e 1 µl di DNA templatato o sospensioni conidiche. Le reazioni sono state eseguite a 65 °C per 60 min utilizzando un Rotor-Gene Q2plex HRM Platform Thermal Cycler (Qiagen, Hilden, Germany). Infine, per ogni esperimento è stato rilevato il T_p (tempo necessario per ottenere un'amplificazione positiva), cioè il tempo al quale la curva di fluorescenza di ciascun campione di DNA o sospensione conidica supera il livello della threshold.

3.4.5. Specificità e sensibilità dei saggi LAMP

Al fine di valutare la specificità dei saggi LAMP e dei set di primer selezionati, sono stati condotti saggi utilizzando, come target, il DNA estratto da colture pure dei tre ceppi di *A. flavus*, mentre il DNA di 12 ceppi appartenenti a 9 specie differenti di *Aspergillus*, assieme ad altre specie fungine, sono stati utilizzati come non-target (Tabella 12).

Per determinare il limite di rilevamento delle reazioni sono state utilizzate diluizioni decimali seriali del DNA genomico del ceppo di riferimento *A. flavus* MUCL 18903, partendo dalla concentrazione iniziale del DNA di 124 ng/µl fino a 0,0124 fg/µl. Inoltre, la sensibilità del saggio è stata valutata utilizzando diluizioni decimali seriali di sospensioni conidiche di *A. flavus* MUCL 18903 preparate secondo quanto riportato da Niessen et al., (2018). In dettaglio, colonie pure di *A. flavus* MUCL 18903 sono state fatte crescere in piastre Petri monouso del diametro di 90 mm contenenti PDA a 25 °C per 7 giorni o fino ad avvenuta sporulazione e i conidi sono stati prelevati aggiungendo 15 ml di acqua distillata sterile e spatolando la superficie della colonia. La concentrazione conidica è stata quindi determinata utilizzando una camera di conta tipo Thoma Zeiss e portata a 10^7 conidi/ml. Successivamente, 1 ml di sospensione conidica è stato vigorosamente vortexato con biglie di vetro (0.2 g di biglie del diametro 1.25 mm) allo scopo di frantumare i conidi e, partendo dalla sospensione madre (10^7 conidi/ml), sono state preparate diluizioni decimali seriali fino ad ottenere una concentrazione di 1 conidio/ml. Infine, 1 µl di ciascuna sospensione conidica

è stato direttamente aggiunto alla mix di reazione. Entrambe le prove sono state ripetute tre volte.

Tabella 12 – Ceppi utilizzati per la prova di specificità.

Specie	Matrice	Provenienza	Anno di isolamento
<i>A. flavus</i> MUCL18903	Caffè	Messico	–
<i>A. flavus</i> SAAF 38	Farro	Italia	2018
<i>A. flavus</i> SAAF 43	Frumento	Sicilia	2018
<i>A. fumigatus</i> SAAF 34	Lenticchia	Canada	2018
<i>A. fumigatus</i> SAAF 46	Frumento	Sicilia	2018
<i>A. brasiliensis</i> MUCL 29039	Mirtillo	USA	1988
<i>A. pseudoglaucus</i> SAAF 9	Avena	Sicilia	2017
<i>A. niger</i> SAAF 7	Mangime per suini	Sicilia	2017
<i>A. niger</i> SAAF 15	Mangime per cavalli	Sicilia	2017
<i>A. amstelodami</i> SAAF 6	Avena	Sicilia	2017
<i>A. awamori</i> SAAF 5	Mais fioccato	Sicilia	2017
<i>A. versicolor</i> SAAF 28	Orzo	Sicilia	2018
<i>A. calidoustus</i> SAAF 32	Pastazzo di ficodindia	Sicilia	2018
<i>A. tubingensis</i> SAAF 39	Cece	Italia	2018
<i>A. tubingensis</i> SAAF 14	Mangime per bovini	Sicilia	2017
<i>Fusarium spp.</i>	Frumento	Sicilia	2018
<i>F. cubense</i>	Banana	Sicilia	2018
<i>Botrytis cinerea</i>	Uva	Sicilia	2018
<i>Alternaria brassicicola</i> CBS125088	Cavolfiore	Ungheria	1947

3.4.6. Applicazione del saggio LAMP su campioni artificialmente contaminati e commerciali

La sensibilità del saggio LAMP in matrici potenzialmente contaminate è stata valutata inoculando aliquote di mais da 10 g con 1 ml di sospensioni conidiche di *A. flavus* MUCL 18903 con concentrazioni comprese tra 10^7 e 1 conidi/ml. Come controllo negativo 1 ml di acqua distillata sterile è stato utilizzato al posto della sospensione conidica. Dopo l'inoculazione, 99 ml di acqua distillata sterile sono stati aggiunti a ciascun campione e il sistema è stato agitato vigorosamente per 2 minuti. Successivamente, 1 ml del surnatante è stato trasferito in Eppendorf sterili da 2 ml con 0.2 g di biglie di vetro e il sistema è stato vortexato per 10 minuti (Niessen et al., 2018). Infine, 1 µl del surnatante è stato utilizzato direttamente come templatato nella reazione LAMP. La prova è stata eseguita tre volte. Con la stessa procedura, il saggio LAMP è stato inoltre applicato su 17 campioni naturalmente contaminati.

3.4.7. PCR

I saggi LAMP messi a punto sono stati infine comparati con il tradizionale metodo PCR, utilizzando la regione ITS, specifica di *A. flavus*, come target e i primer specifici FLA1/2 per la reazione di amplificazione (Gonzalez-Salgato et al., 2008). La reazione PCR è stata eseguita secondo il protocollo di amplificazione riportato nel paragrafo 3.4.2.

3.4.8. Saggio ELISA su campioni commerciali

Tutti i campioni impiegati nei saggi LAMP per l'accertamento della presenza di *A. flavus* sono stati sottoposti ad analisi per la determinazione delle aflatossine totali utilizzando un kit ELISA per campioni ad alto effetto matrice (Astori s.n.c), utilizzato secondo quanto riportato nelle istruzioni della casa produttrice.

3.5. RISULTATI

3.5.1. Disegno dei primers

L'utilizzo del software Primer Explorer v.5 ha permesso di ottenere 4 set di primer: 3 per la regione ITS e uno per il gene *rmt-A* (Tabelle 13 e 14).

Tabella 13 - set di primer selezionati per la regione ITS.

Set 1	
Primer	Sequenza 5'-3'
F3 FLA1	AATGGATCTCTTGGTTCCGG
B3 FLA1	CTACAGAGCGGGTGACAAAG
FIP FLA1	GCGCAATGTGCGTTCAAAGACT-GAAGAACGCAGCGAAATGC
BIP FLA1	GCCCATCAAGCACGGCTTGT-CATACGCTCGAGGATCGGA
LF FLA1	CGGAATTCTGCAATTCACACTAGTT
LB FLA1	TGTTGGGTCGTCGTCCC

Set 2	
Primer	Sequenza 5'-3'
F3FLA2	AATGGATCTCTTGGTTCCGG
B3 FLA2	CCTACAGAGCGGGTGACA
FIP FLA2	GCGCAATGTGCGTTCAAAGACT-AAGAACGCAGCGAAATGC
BIP FLA2	CCATCAAGCACGGCTTGTGTG-CCCATACGCTCGAGGATC
LFFLA2	CGGAATTCTGCAATTCACACTAGTT
LBFLA2	TTGGGTCGTCGTCCCCT

Set 3	
Primer	Sequenza 5'-3'
F3FLA3	AATGGATCTCTTGGTTCCGG
B3 FLA3	CTACAGAGCGGGTGACAAAG
FIP FLA3	GGCGCAATGTGCGTTCAAAGA-GAAGAACGCAGCGAAATGC
BIP FLA3	GCCCATCAAGCACGGCTTGT-CATACGCTCGAGGATCGGA
LFFLA3	CGGAATTCTGCAATTCACACTAGTT
LBFLA3	TGTTGGGTCGTCGTCCCCT

Tabella 14 - Set di primer selezionato per il gene *rmt-A*.

Primer	Sequenza 5'-3'
F3 <i>rmtA</i>	CGCTTTCAAGGTTCCCTTCT
B3 <i>rmtA</i>	CAACACTCCCGAAACGACTT
FIP <i>rmtA</i>	GGTGATGGGCTTGTGGCAGG-GCGACTTCATCCACGCTG
BIP <i>rmtA</i>	CACGCGAAGTACACACTGGA-TCCTCTTCGACGGTCAGAAC
LF <i>rmtA</i>	TCGATATCGAACCAAGCGATCA
LB <i>rmtA</i>	AGCAGACCGTCTTCTACCTC

3.5.2. Specificità della reazione LAMP

Le reazioni LAMP sono state eseguite, utilizzando tutti i set di primer, a 65 °C per 60 minuti. Le prime prove effettuate utilizzando i set di primer selezionati per l'amplificazione della regione ITS specifica per *A. flavus* hanno mostrato un'aspecificità della reazione, con curve di amplificazione rilevate per tutte le specie fungine testate. Al contrario, utilizzando il set di primer per l'amplificazione del gene *rmt-A*, in meno di 10 minuti, reazioni positive sono state rilevate solamente per i tre ceppi target di *A. flavus*, mentre nessuna amplificazione è stata registrata per gli altri ceppi fungini, confermando così la specificità della reazione (Figura 15). Per questo motivo le prove successive sono state condotte utilizzando come target solamente il gene *rmt-A*.

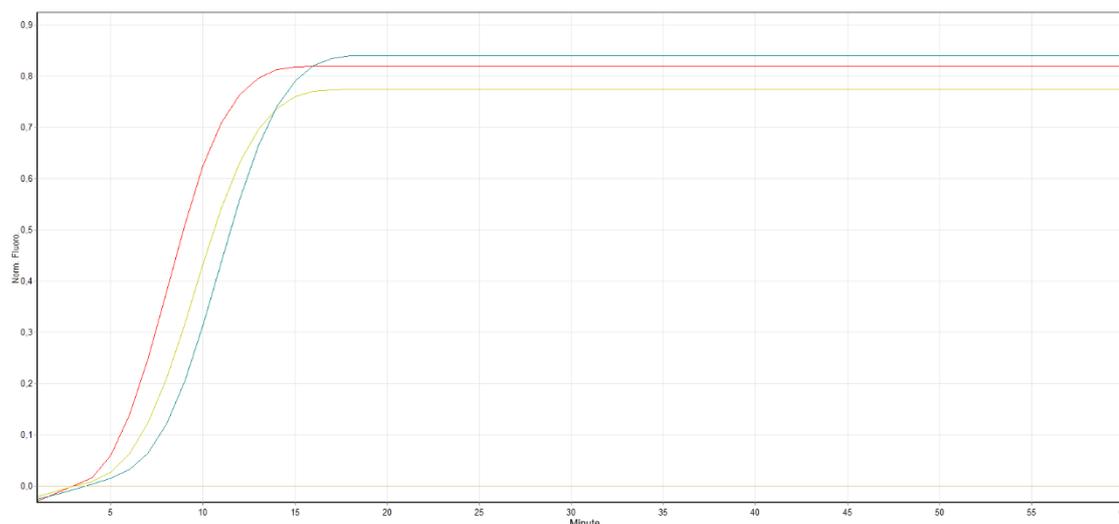


Figura 15 - Specificità del saggio LAMP utilizzando DNA genomico dei tre ceppi di *Aspergillus flavus* (MUCL 18903 curva rossa, SAAF 38 curva azzurra, SAAF 43 curva gialla) e ceppi no-target. Le curve rappresentano una reazione positiva.

3.5.3. Sensibilità del saggio LAMP e applicazione in derrate commerciali

Il limite di rilevamento del saggio è stato testato su diluizioni decimali seriali di DNA genomico, sospensioni conidiche e mais artificialmente contaminato. Le analisi condotte sul DNA genomico hanno mostrato che il limite di rilevamento della reazione era di 12.4 pg/reazione, mentre i test condotti con le sospensioni conidiche e con mais artificialmente contaminato hanno mostrato un limite di rilevamento di 10^4 conidi/g (10 conidi/reazione). I

valori più bassi di T_p sono stati rilevati per l'amplificazione del DNA genomico e andavano da 4 min e 22 sec a 10 min e 24 sec (Figura 16), mentre variavano tra 6 min e 17 sec e 20 min e 09 sec per le sospensioni conidiche (Figura 17) e da 12 min e 40 sec a 31 min e 01 sec per il mais artificialmente contaminato (Figura 18). Al fine di testare l'efficacia del saggio LAMP per rilevare *A. flavus* in derrate alimentari sono stati analizzati 17 campioni tra materie prime (12) e mangimi (5) commerciali. Di questi 17 campioni 12 sono risultati positivi al saggio LAMP mentre 5 sono risultati negativi. In dettaglio, tutti e tre i campioni di mangime per ovaiole e due campioni di mix di granelle sono risultati contaminati da *A. flavus* e in quattro di essi il fungo è stato rilevato in tutte e tre le repliche biologiche; mentre per quel che riguarda le materie prime il 41% dei campioni sono risultati positivi al saggio, anche se, in questo caso, *A. flavus* non è stato rilevato in tutte le repliche biologiche (Tabella 15).

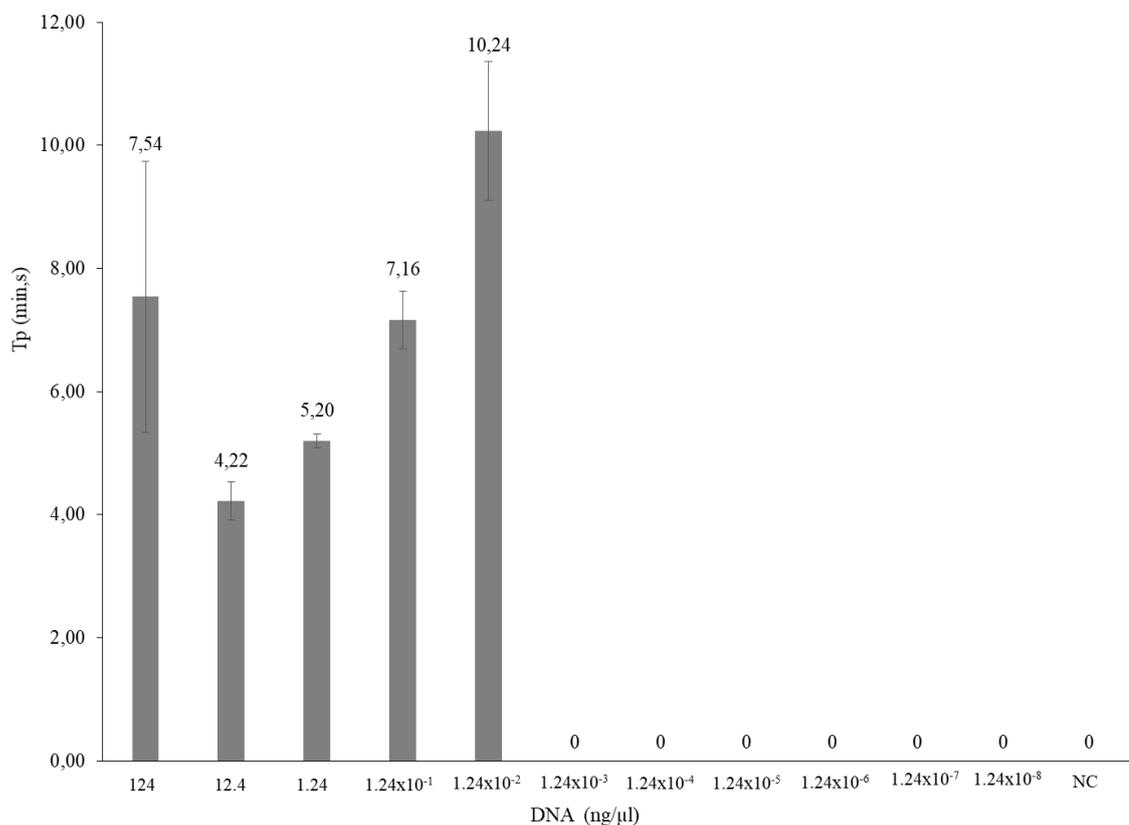


Figura 16 - Sensibilità del saggio LAMP utilizzando diluizioni decimali seriali del DNA di *Aspergillus flavus* MUCL18903 espressa come il tempo necessario per ottenere un'amplificazione positiva (T_p). Ogni barra rappresenta la media e la deviazione standard di tre repliche.

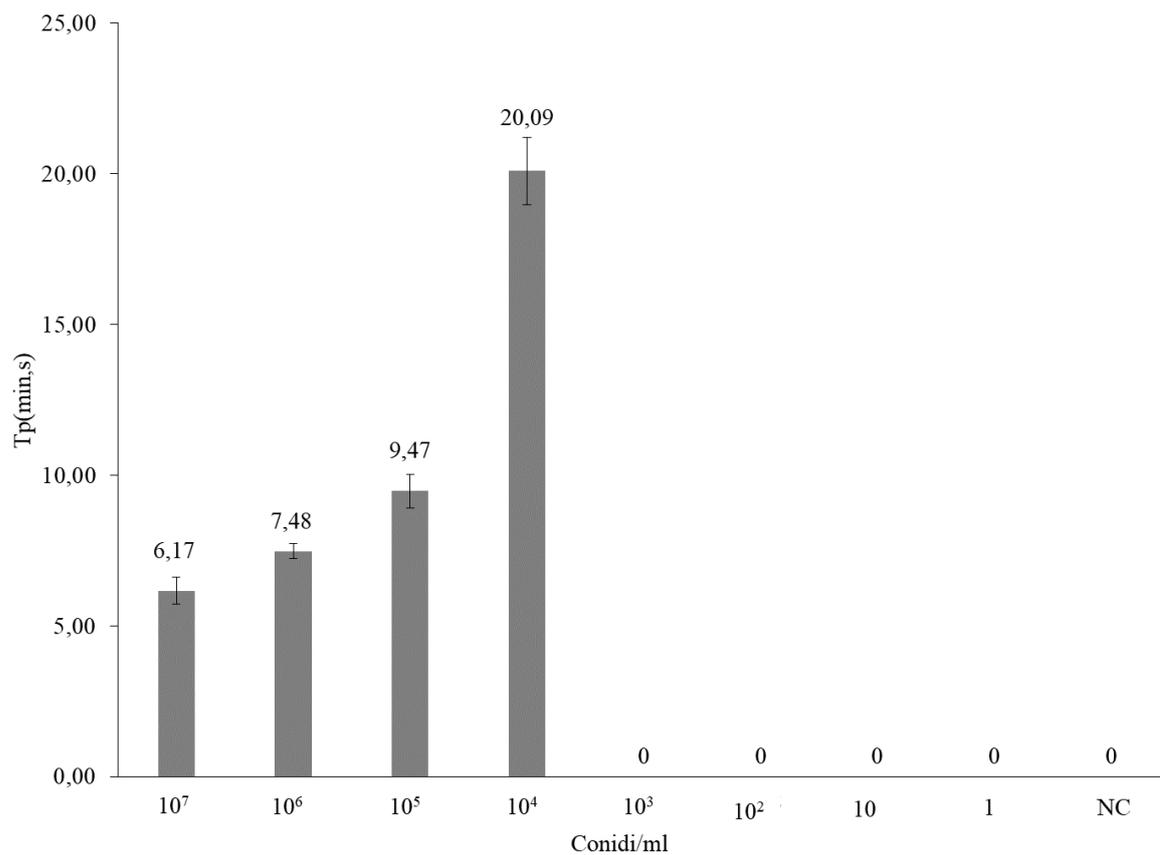


Figura 17 - Sensibilità del saggio LAMP utilizzando diluizioni decimali seriali di sospensioni conidiche di *Aspergillus flavus* MUCL18903 espressa come il tempo necessario per ottenere un'amplificazione positiva (Tp). Ogni barra rappresenta la media e la deviazione standard di tre repliche.

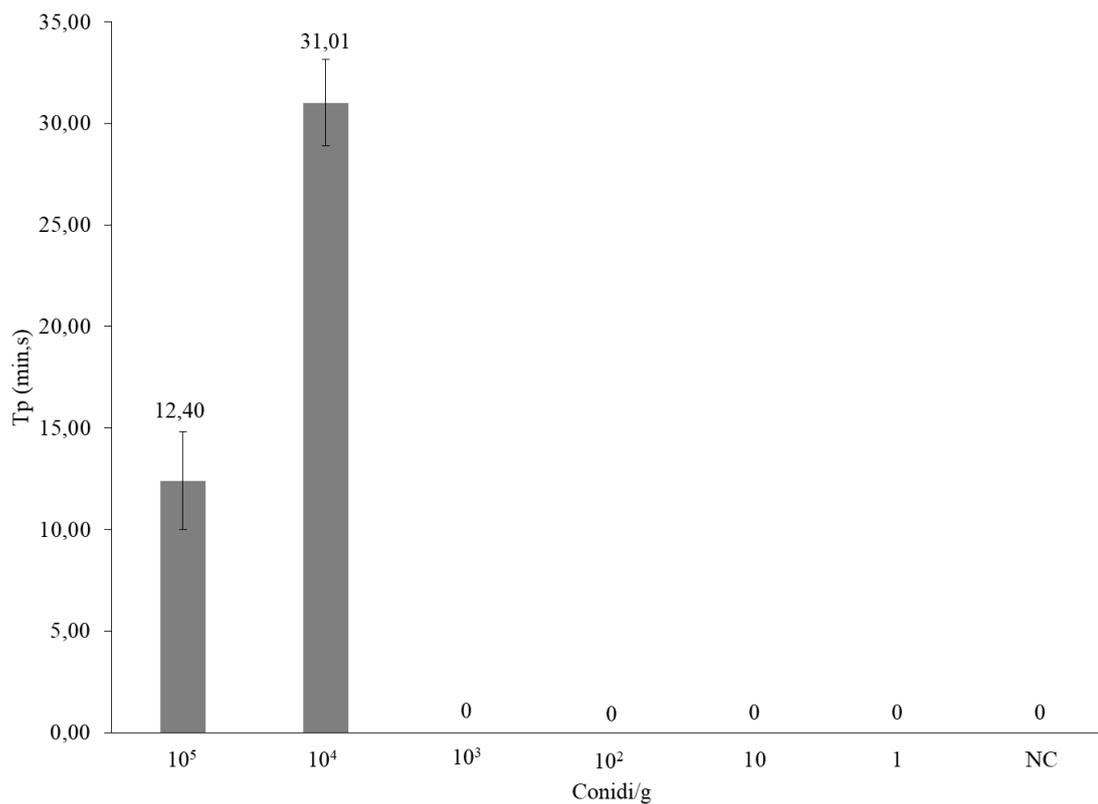


Figura 18 - Sensibilità del saggio LAMP su campioni di mais artificialmente contaminati con diluizioni decimali seriali di sospensioni conidiche di *Aspergillus flavus* MUCL18903 espressa come il tempo necessario per ottenere un'amplificazione positiva (Tp). Ogni barra rappresenta la media e la deviazione standard di tre repliche.

Tabella 15 - Campioni naturalmente contaminate testati con saggio LAMP ed ELISA.

Codice	Campione	Composizione	LAMP Positivi/totale ^a	ELISA (ppb)
1	Mix per ovaiole	Mais, frumento, carbonato di calcio, grassi vegetali	3/3	5.58
2	Mix per ovaiole	Farina di soia, mais, farina di frumento, farina di mais, pula di riso, soia tostata, fosfato dicalcico, cloruro di sodio	1/3	5.02
3	Mix per ovaiole	Mais, crusca di frumento, carbonato di calcio, melassa, olio di soia, fosfato dicalcico, cloruro di sodio, bicarbonato di sodio	3/3	0
4	Crusca di frumento		0/3	0
5	Mais		1/3	4
6	Avena		2/3	0
7	Avena		2/3	2.80
8	Orzo		1/3	0
9	Veccia		3/3	0
10	Pisello		0/3	0
11	Mix di granelle	Fave, veccia, piselli	3/3	1.93
12	Scarti di favino		3/3	1.80
13	Mix di granelle	Fave, veccia	3/3	0.13
14	Favino		3/3	0
15	Orzo		0/3	0
16	Frumento		0/3	0
17	Lenticchia		0/3	0

3.5.4. Confronto tra saggio LAMP e PCR tradizionale

Il limite di rilevamento del saggio LAMP è stato inoltre confrontato con quello della tradizionale tecnica PCR, utilizzando come coppia di primer FLA1/2, specifici per la regione ITS di *A. flavus*. I risultati sono sintetizzati in Tabella 16 e 17. Utilizzando diluizioni decimali seriali del DNA genomico di *A. flavus* MUCL18903 (concentrazione iniziale 124 ng/μl), ampliconi di 500 pb sono stati rilevati per concentrazioni di DNA che andavano da 12.4 a 0.124 ng/μl. La mancata amplificazione, mediante PCR tradizionale, del DNA tal quale, lascia supporre, quindi, che la sua elevata concentrazione, o la presenza di inibitori dovuti al

metodo di estrazione utilizzato, abbia causato fenomeni di inibizione della reazione che non sono stati registrati, invece, utilizzando il saggio LAMP. Inoltre, il tradizionale saggio PCR, condotto con il DNA estratto da sospensioni conidiche di *A. flavus* MUCL18903 e da mais artificialmente contaminato, è risultato 10 volte meno sensibile rispetto al saggio LAMP sviluppato. Infatti, ampliconi della misura attesa di 500 pb sono stati rilevati per sospensioni conidiche con concentrazioni da 10^7 a 10^5 conidi/ml, mentre una reazione di amplificazione positiva è stata ottenuta solamente per il campione di mais contaminato con la sospensione di 10^7 conidi/ml. Infine, il saggio PCR tradizionale non è stato in grado di rilevare la presenza di *A. flavus* in nessuna delle derrate naturalmente contaminate.

Tabella 16 – Limite di rilevamento della LAMP e della PCR tradizionale utilizzando diluizioni decimali seriali del DNA genomico di *Aspergillus flavus* MUCL 18903.

DNA (ng/ μ l)	LAMP	PCR
124	+	-
12.4	+	+
1.24	+	+
1.24×10^{-1}	+	+
1.24×10^{-2}	+	+
1.24×10^{-3}	-	-
1.24×10^{-4}	-	-
1.24×10^{-5}	-	-
1.24×10^{-6}	-	-
1.24×10^{-7}	-	-
1.24×10^{-8}	-	-
NC	-	-

Tabella 17 - Limite di rilevamento della LAMP e della tradizionale PCR utilizzando sospensioni conidiche e mais artificialmente contaminato

CFU/ml	Conidi (conidi/ml)		Mais artificialmente contaminato (conidi/g)	
	LAMP	PCR	LAMP	PCR
10^7	+	+	nt	nt
10^6	+	+	nt	nt
10^5	+	+	+	+
10^4	+	-	+	-
10^3	-	-	-	-
10^2	-	-	-	-
10	-	-	-	-
1	-	-	-	-
NC	-	-	-	-

nt= not tested

3.5.5. Saggio ELISA su campioni commerciali

I risultati delle analisi condotte sui campioni con il kit ELISA, per il rilevamento delle aflatossine totali, sono riportati in Tabella 15, da cui si evince che non tutti i campioni risultati positivi al saggio LAMP siano poi risultati contaminati da aflatossine, confermando il fatto che non sempre la presenza di *A. flavus* nelle derrate sia direttamente correlata alla presenza dei relativi metaboliti tossici nelle stesse.

3.6. DISCUSSIONI

L'attività di ricerca ha consentito di sviluppare, per la prima volta, un saggio LAMP, basato sull'amplificazione del gene *rmt-A* specifico per *A. flavus*, utile ai fini dell'identificazione del fungo direttamente in derrate contaminate. Il gene selezionato come target regola lo sviluppo di strutture asessuali come conidi e la formazione di sclerozi in *A. flavus*; è coinvolto nel suo metabolismo secondario e gioca un ruolo importante nella risposta agli stress ambientali (Satterlee et al., 2019). Poiché *A. flavus* è generalmente coinvolto nei processi di deterioramento di una vastissima gamma di prodotti, nonché nella produzione di pericolosi metaboliti tossici, un metodo rapido e sensibile per il suo rilevamento potrebbe essere molto utile per prevenire la contaminazione fungina e garantire la salubrità delle derrate. Precedenti saggi PCR e LAMP sono stati sviluppati utilizzando come target, per rilevare *A. flavus*, geni coinvolti nella biosintesi di aflatossine, anche se la presenza nel genoma di questi geni strutturali non ne garantisce sempre la produzione (Levin, 2012). Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che questi saggi PCR concordano con i risultati di saggi ufficiali per l'analisi delle aflatossine, come HPLC e TLC, solamente quando gli isolati di *A. flavus* mostrano la presenza di tutti e 4 i geni strutturali e regolatori (*nor-1*, *ver-1*, *omtA*, *AflR*) coinvolti nel processo di produzione delle aflatossine (Rashid et al., 2008, Davari et al., 2015). Dal momento che la presenza di *A. flavus* in matrici contaminate indica generalmente bassi livelli di qualità delle derrate e non appropriate tecniche di stoccaggio e lavorazione dei prodotti, e dal momento che utilizzare come target un solo gene coinvolto nella produzione di aflatossine non è abbastanza per assicurare la salubrità degli alimenti, è fondamentale rilevare questo fungo contaminante a prescindere dalla produzione dei suoi metaboliti tossici.

Nel presente studio è stato dimostrato come il set di primer disegnato per l'amplificazione del gene *rmt-A* è altamente specifico per l'identificazione e il rilevamento del microrganismo target, dal momento che nessun'altra specie di *Aspergillus* o altri ceppi non-target hanno mostrato amplificazione positiva. Inoltre, i risultati ottenuti mostrano come una quantità davvero bassa di DNA sia sufficiente per ottenere reazioni positive. Infatti, il limite di rilevamento per il DNA genomico puro è risultato di 12.4 pg/reazione, valore comparabile con quelli ottenuti da Luo et al., (2012) e Niessen et al., (2018) che hanno utilizzato come target geni coinvolti nella biosintesi di aflatossine.

Il limite di rilevamento del nuovo saggio LAMP è stato inoltre comparato con quello di un saggio di PCR specifica per l'identificazione di *A. flavus* messo a punto da Gonzales-Salgado et al., (2008). Sebbene utilizzando il DNA genomico puro il limite di rilevamento dei due

saggi è risultato pressoché uguale, problemi di inibizione sono stati rilevati nella tradizionale PCR quando il DNA utilizzato nella reazione era troppo concentrato. In generale, per evitare reazioni di inibizione, le tecniche basate sulla PCR per l'identificazione e il rilevamento dei funghi necessita di diversi passaggi intermedi che prevedono l'isolamento delle colonie fungine dalle matrici contaminate, l'estrazione del DNA dal micelio di colture pure e la concentrazione e purificazione del DNA estratto (Khan et al., 2018). Questi passaggi richiedono molto tempo, spesso più di una settimana. Per evitare tutti questi step e ridurre i tempi di analisi, nel saggio sviluppato sospensioni conidiche sono state, dopo un breve pretrattamento, aggiunte direttamente nella mix di reazione LAMP. In questo modo il saggio è stato in grado di rilevare fino a 10 conidi/reazione, dimostrandosi molto più sensibile rispetto ad altri studi pubblicati (Luo et al., 2014 a,b; Niessen et al., 2018). Utilizzando le stesse sospensioni conidiche il saggio tradizionale di PCR si è dimostrato invece 10 volte meno sensibile rispetto al saggio LAMP. Inoltre, con l'obiettivo di sottolineare l'importanza e l'utilità della reazione LAMP come saggio diagnostico "*point of care*", applicando una semplice e rapida procedura di preparazione dei campioni, sono stati analizzati campioni sia commerciali, che artificialmente contaminati. Le stesse matrici, allo stesso tempo, sono state analizzate anche con il saggio di PCR tradizionale. I risultati indicano che il nuovo saggio LAMP offre una più che valida alternativa ai metodi di analisi tradizionali utilizzati per rilevare *A. flavus* direttamente in matrici contaminate, dal momento che non si sono verificati fenomeni di inibizione della reazione e dal momento che l'analisi può essere completata in tempi molto brevi (circa un'ora). Al contrario la tradizionale PCR testata non è stata in grado di rilevare la presenza di *A. flavus* nei campioni naturalmente contaminati, probabilmente per la sensibilità a composti presenti nei campioni che inibiscono la reazione (Rossen et al., 1992). Inoltre, il saggio ELISA condotto sui campioni naturalmente contaminati sottolinea ancora di più l'importanza del saggio LAMP sviluppato dal momento che non tutti i campioni contaminati da *A. flavus* sono risultati contaminati dalle relative aflatoossine. Dal momento che la presenza di *A. flavus* provoca decadimento qualitativo delle derrate, dovuto ai processi di colonizzazione del fungo, l'assenza di metaboliti tossici non garantisce un'elevata qualità dell'alimento, né che il fungo contaminante non sia in grado di liberare le tossine in momenti successivi. L'assenza di aflatoossine potrebbe essere dovuta, infatti, solamente a momentanee condizioni ambientali (temperatura, umidità, *aw*) non ideali per la loro produzione.

Per concludere, quindi, il saggio LAMP messo a punto, mostra un potenziale di applicazione interessante. Grazie alla sua elevata specificità e sensibilità, infatti, potrebbe essere

considerato una valida alternativa alle metodiche tradizionali e soprattutto, in futuro, potrebbe essere impiegato come valido test “*point of care*”, grazie allo sviluppo di kit utilizzabili in loco (es. centri di stoccaggio), per lo screening di un gran numero di campioni, prima di procedere con analisi più approfondite e costose.

CAPITOLO 4: CONTROLLO BIOLOGICO DI *ASPERGILLUS* SPP.

4.1. DIFESA BIOLOGICA

Si definisce difesa biologica, o controllo biologico, l'impiego di qualsiasi organismo vivente (escluso l'uomo) per il contenimento dell'attività parassitaria di un fitopatogeno. Questi organismi vengono definiti antagonisti, cioè agenti biologici in grado di interferire con i processi vitali dei fitopatogeni (Cook e Baker, 1983). E' un metodo di difesa che si pone a tutela dell'ambiente e dei consumatori, con l'obiettivo di ridurre l'impiego di fitofarmaci, l'inquinamento sia del terreno, che delle falde ed i residui presenti nei prodotti agricoli.

Le specie presenti in un ecosistema sono soggette all'interazione con diversi fattori di controllo, viventi e non, che regolano la dinamica della popolazione. Qualsiasi evento, applicato ad un ecosistema che comporti il controllo di una specie dannosa da parte di un suo antagonista naturale può essere definito un mezzo di difesa o lotta biologica. A differenza dei metodi di difesa tradizionali che mirano all'azzeramento delle popolazioni dannose, la lotta biologica mira al loro mantenimento entro livelli tali per cui non costituiscano un danno e può essere attuata mediante diverse strategie in relazione alla biologia delle specie da contrastare, delle condizioni climatiche ed ambientali e dalla dimensione del contesto in cui si opera (Ferrari et al., 2000). Tra i diversi metodi di difesa biologica si annoverano:

- metodo propagativo, che consiste nell'introduzione nell'areale di origine della specie da combattere, di uno o più nemici naturali. Una volta adattatosi al nuovo ambiente, gli organismi antagonisti consentono una regolazione naturale della dinamica di popolazione del patogeno;
- metodo inondativo, consiste nella liberazione di un numero molto elevato di predatori o parassitoidi in modo da alterare sensibilmente i rapporti numerici tra la specie da combattere e l'antagonista. Tale metodo viene sovente escluso a causa di due principali motivi. Innanzitutto, gli elevati costi per mantenimento di un elevato numero di antagonisti e in secondo luogo per l'impatto negativo che la loro immissione in un ambiente potrebbe causare nei confronti di altre specie selvatiche e non dannose;
- metodo inoculativo, che consiste nella liberazione periodica di esemplari di una specie, che sia introdotta o autoctona, già presente nell'ecosistema. In questo caso, la periodica reintroduzione risulta utile in quanto il potenziale biologico

dell'antagonista può essere indebolito da condizioni ambientali poco favorevoli (Altieri et al., 2003).

In generale, i microrganismi antagonisti utilizzano diversi meccanismi d'azione per il controllo degli organismi patogeni:

- competizione per spazio, siti di ingresso nella pianta e sostanze nutritive. La competizione può essere infatti definita come un'interazione biologica tra due microrganismi a causa della quale le funzioni vitali di uno vengono ridotte a causa della presenza dell'altro. Esistono diversi tipi di competizione quali: competizione per interferenza, che si verifica quando un individuo interferisce con l'altro per le fonti di nutrimento, la sopravvivenza o la riproduzione; competizione per sfruttamento che avviene indirettamente a causa di una risorsa limitata comune che, a causa della sua scarsità, agisce come intermediario (anche la competizione per lo spazio può essere considerata competizione per sfruttamento); competizione apparente, che si verifica quando nell'ambiente viene introdotto un superpredatore. Alcune specie, abituate ad essere predate hanno sviluppato strategie di difesa per non estinguersi, come ad esempio ritmi riproduttivi estremamente veloci. Altre specie nello stesso ambiente, che invece non sono abituate ad essere predate cominciano piano piano a scomparire.
- Antibiosi, quando i microrganismi antagonisti interagiscono con gli altri mediante la produzione di sostanze chimiche che ne inibiscono o ne rallentano lo sviluppo.
- Predazione, che consiste nella vera e propria cattura e uccisione, a scopo alimentare, dell'antagonista nei confronti della specie da combattere.
- Iperparassitismo, che si verifica quando un parassita è a sua volta attaccato da un altro parassita.
- Ipovirulenza indotta, quando la presenza di RNA virale localizzato nel citoplasma dell'ospite ne causa l'inibizione dei processi biologici.
- Induzione di resistenza o resistenza sistemica acquisita (SAR) quando le piante, mediante l'utilizzo di induttori di resistenza che simulano un attacco fungino o batterico, attuano una risposta immunitaria per difendersi, preparandosi in questo modo alle infezioni vere e proprie.

Più è approfondita la conoscenza di questi meccanismi d'azione, maggiore è la possibilità di sfruttare con la massima efficacia questi mezzi biologici di lotta (Del Fabro, 2006).

4.2. SCOPO DEL LAVORO

Nell'ambito della definizione di strategie per il controllo dei funghi contaminanti gli alimenti e, in particolare, degli aspergilli micotossinogeni, una notevole mole di Letteratura pone in evidenza il possibile impiego di microrganismi antagonisti come efficaci fattori di contenimento. Alcuni funghi e batteri, infatti, hanno mostrato differenti meccanismi di biocontrollo nei confronti delle principali specie di *Aspergillus*, tra questi:

- aspergilli non aflatossinogeni che, se presenti nello stesso substrato insieme alle loro controparti tossinogene, espletano un meccanismo di competizione per spazio e nutrienti limitandone la crescita e la produzione di tossine (Cotty, 1990; Ruiquian et al., 2004).
- *Trichoderma* spp., noti micoparassiti di patogeni delle piante (Papavizas, 1985; Inglis et al., 2002). L'azione di micoparassitismo coinvolge meccanismi contemporanei di antibiosi, competizione per spazio e nutrienti, parassitismo e degradazione delle pareti del micelio tramite azione di enzimi chitinasi (Kifle et al., 2016).
- *Penicillium* spp., noti funghi contaminanti le derrate alimentari, che a loro volta agiscono come antagonisti tramite parassitismo o antibiosi (Gomathi e Ambikapathy, 2011).
- Bacilli, che hanno un ruolo nell'inibizione della crescita degli aspergilli mediante meccanismi di antibiosi, attraverso la produzione e accumulazione di composti tossici (Cho et al., 2009; Kong et al., 2010).

Sulla base di tali premesse e dei risultati riportati finora in letteratura si è ritenuto, dunque, opportuno avviare dei saggi di controllo biologico su ceppi di *Aspergillus*, utilizzando microrganismi antagonisti presenti in collezione presso il Dipartimento SAAF.

4.3. MATERIALI E METODI

4.3.1. Selezione di aspergilli e microrganismi antagonisti da testare

I saggi di antagonismo sono stati condotti impiegando quattro isolati fungini quali *Trichoderma pleuroticola* (Tp; Dipartimento SAAF, Università degli Studi di Palermo), *T. harzianum* (T22; Dipartimento di Agraria, Università di Napoli Federico II), *T. atroviride* (P1; Dipartimento di Agraria, Università di Napoli Federico II), *Penicillium italicum* (Pi; Dipartimento SAAF, Università degli Studi di Palermo) e uno batterico *Bacillus amyloliquefaciens* (AG1; Dipartimento SAAF, Università degli Studi di Palermo), contro gli isolati di aspergilli risultati i più attivi per quanto riguarda l'attività enzimatica e contro quelli noti in letteratura come micotossinogeni (Tabella 18).

Tabella 18– Specie di *Aspergillus* selezionate per le prove di controllo biologico.

<i>Specie</i>	<i>Ceppo</i>
<i>A. flavus</i>	SAAF 43
<i>A. fumigatus</i>	SAAF 47
<i>A. tubingensis</i>	SAAF 14
<i>A. calidoustus</i>	SAAF 32
<i>A. niger</i>	SAAF 7
<i>A. amstelodami</i>	SAAF 6
<i>A. sydowii</i>	SAAF 31

4.3.2. Coltura duale

L'attività antagonistica dei microrganismi fungini è stata inizialmente saggiata tramite l'allestimento di colture duali con gli aspergilli in parola, in piastre Petri monouso del diametro di 90 mm, contenenti PDA. In ciascuna piastra sono stati posti due dischetti di colonie fungine (6 mm di diametro) di antagonista e di aspergillo, allevati su PDA a 25 °C per 7 giorni, alla distanza di 7 cm tra loro (Xu e Kim, 2014). Per quanto riguarda i saggi di antagonismo condotti con AG1, piccole quantità del ceppo batterico sono state trasferite ai quattro lati di una piastra Petri, contenenti PDA, ad un 1 cm dal bordo, mentre al centro di ciascuna piastra sono state posizionate porzioni di micelio delle colonie di ciascun *Aspergillus* (Strano et al., 2017). Come controllo negativo, in entrambi i casi, singoli dischetti di colonia degli aspergilli sono stati posti al centro di ciascuna piastra Petri. Le

piastre sono state poste ad incubare a 30 °C. Dopo 3, 6 e 9 giorni di incubazione, per ciascuna colonia fungina, sono stati rilevati due diametri ortogonali e calcolato il diametro medio di crescita. Per entrambe le prove sono state eseguite tre repliche. L'attività antifungina è stata quindi espressa come percentuale di inibizione della crescita secondo quanto riportato da Vincent (1974): $PGI (\%) = 100 \times (GC-CT) / GC$, dove GC rappresenta la media del diametro dei funghi controllo e GT la media del diametro dei funghi in presenza degli antagonisti. Sulla base dei risultati preliminari ottenuti con il saggio in coltura duale si è ritenuto opportuno selezionare alcune specie sia di antagonisti che di aspergilli, da impiegare in ulteriori prove.

4.3.3. Substrato avvelenato con *T. harzianum* T22

Allo scopo di accertare l'attività antibiotica di *T. harzianum* T22 ipotizzata nel precedente saggio di coltura duale, colonie dell'antagonista sono state allevate in piastre Petri contenenti PDA a 25 °C per 7 giorni. Al termine dei 7 giorni, frammenti di micelio di 6 mm di diametro sono stati prelevati dalle colonie e inoculati in beute di tipo Erlenmeyer contenenti 200 ml Potato Dextrose Broth (PDB). Le beute così inoculate sono state messe ad incubare a 25 °C per 15 giorni. Al termine del periodo di incubazione il contenuto delle beute è stato filtrato sottovuoto tramite membrana (0.45 e 0.22 µm). Aliquote di 100 ml di filtrato sono stati aggiunti a 1 L di PDA, precedentemente sterilizzato, prima che si solidificasse. Il substrato avvelenato è stato quindi versato in piastre Petri da 90 mm e una volta solidificate si è proceduto con l'inoculazione degli aspergilli. Dischetti di micelio (diametro 6 mm) di ciascuna specie di *Aspergillus* sono stati posti al centro delle piastre Petri contenenti il substrato avvelenato, mentre come controllo sono state inoculate delle piastre contenenti semplice PDA. Le piastre sono state quindi incubate a 30 °C per 9 giorni. I saggi sono stati condotti in triplo e ogni 3 giorni si è proceduto alla misura del diametro medio delle colonie. Anche in questo caso, l'inibizione della crescita è stata misurata calcolando la riduzione percentuale del diametro delle colonie allevate su substrato avvelenato rispetto ai controlli (Vincent, 1974).

4.3.4. Prove *in vivo* con *T. atroviride* P1

Sulla base dei risultati preliminari ottenuti nel corso dei saggi di coltura duale si è ritenuto opportuno valutare l'attività di antagonismo del ceppo P1, nei confronti di *Aspergillus niger* SAAF 7, *in vivo*, impiegando come substrato colturale cariossidi di mais. Aliquote di 10 g

di mais sono state sterilizzate in 9 beute di tipo Erlenmeyer per la realizzazione di 3 tesi (tre repliche per ogni tesi):

1. inoculazione contemporanea del mais con P1 e SAAF 7;
2. inoculazione con P1 tre giorni dopo l'inoculazione con SAAF 7;
3. inoculazione con SAAF 7 tre giorni dopo l'inoculazione con P1.

Le beute sono state messe ad incubare per 21 giorni, al termine dei quali sono stati condotti gli opportuni rilievi.

4.3.5. Prove in Bioscreen con *B. amyloliquefaciens* AG1

L'efficacia del biocontrollo da parte del batterio AG1 nei confronti degli aspergilli selezionati è stata testata, inoltre, per via turbidimetrica tramite Bioscreen (ScanReady P-800, Life Real Biotechnology Co., LTD) (Medina et al., 2012). Questo saggio permette di evidenziare, in maniera rapida e semplice gli effetti dell'antagonista sulla crescita dei funghi patogeni, tramite la misura della densità ottica (O.D.) che varia in base alla torbidità del substrato (maggiore o minore produzione di masse miceliali e/o conidi).

Per la messa a punto del metodo si è proceduto inizialmente alla selezione del substrato liquido migliore per la crescita degli aspergilli selezionati. A tale fine sono state condotte prove di crescita in Bioscreen allevando i tre ceppi di aspergilli in due substrati di coltura: lo YES semi-agarizzato (0.125% agar w/v) (Yeast Extract with Supplement) e il PDB (Medina et al., 2012). Per il saggio è stata utilizzata una piastra da 96 pozzetti dal volume di 200 µl ciascuno, contenenti 180 µl di ogni substrato e 20 µl di sospensione conidica di un singolo aspergillo (10^5 conidi/ml). I pozzetti controllo sono stati invece riempiti con i soli substrati. Per ogni tesi sono state eseguite 8 repliche e l'O.D. in Bioscreen è stata misurata, a 600 nm, ogni ora per 7 giorni, al fine di ricavare le curve di crescita degli aspergilli.

Una volta scelto il substrato più idoneo per la crescita dei funghi si è proceduto con la prova di biocontrollo. Inizialmente il ceppo AG1 è stato fatto crescere in LB (Luria Broth) per 48 ore a 30 °C, al termine delle quali è stato preparato un filtrato culturale mediante centrifugazione e sonicazione. Ottenuto il filtrato di AG1 si è proceduto con la prova in Bioscreen. Anche in questo caso è stata utilizzata una piastra da 96 pozzetti dal volume di 200 µl ciascuno e per ogni fungo sono state allestite le seguenti tesi:

1. 160 µl di substrato + 20 µl di filtrato + 20 µl di sospensione conidica (10^5 conidi/ml);

2. 140 µl di substrato + 40 µl di filtrato + 20 µl di sospensione conidica (10^5 conidi/ml);
3. 160 µl di substrato + 20 µl di sospensione conidica (10^5 conidi/ml) + 20 µl di LB, per verificare eventuali effetti di inibizione della crescita degli aspergilli dovuti al substrato utilizzato per produrre il filtrato del batterio;
4. 160 µl di substrato + 20 µl di sospensione conidica (10^5 conidi/ml) + 40 µl di LB;
5. 180 µl di substrato + 20 µl di sospensione conidica (10^5 conidi/ml), per rilevare la normale crescita degli aspergilli senza fattori di inibizione;
6. 200 µl di substrato, come controllo negativo.

Per ogni tesi sono state eseguite 6 repliche e anche in questo caso è stata misurata l'O.D in Bioscreen, a 600 nm, ogni ora per 7 giorni. Al termine dei 7 giorni i dati forniti dal Bioscreen sono stati quindi elaborati per ottenere le curve di crescita degli aspergilli.

Inoltre, sulle strutture miceliari accresciute all'interno dei singoli pozzetti sono state condotte osservazioni microscopiche mirate al rilevamento di eventuali alterazioni morfologiche. In particolare, porzioni di micelio sono state prelevate da ciascun pozzetto, montate su vetrino in lattofenolo chiaro o con blu di metilene e osservate al microscopio ottico.

4.4. RISULTATI

4.4.1. Coltura duale

Al termine del periodo d'incubazione, è stata rilevata una generale inibizione della crescita miceliare degli aspergilli saggiati, seppure con valori percentuali molto variabili. In particolare il ceppo antagonista T22 (*T. harzianum*) ha prodotto percentuali di inibizione rispetto al controllo (PGI %) in un range compreso tra 6.19% e 53.71%, rispettivamente su *A. calidoustus* e *A. niger*; Tp (*T. pleuroticola*) tra il 3.46% in *A. amstelodami* ed il 53.03% in *A. niger*; P1 (*T. atroviride*) dal 7.25% in *A. sydowii* al 54.83% in *A. niger*; Pi (*P. italicum*) da 1.89 % al 32.24%, rispettivamente in *A. calidoustus* e *A. tubingensis* (Tabella 19). Per quanto riguarda i 4 funghi antagonisti, le percentuali di inibizione maggiori sono state registrate nei confronti del ceppo SAAF 7 in coltura duale con i tre ceppi di *Trichoderma*. Come mostra la Figura 19, infatti, ad esclusione del ceppo T22, le colonie antagoniste si sono sviluppate sulle colonie di aspergilli, mostrando anche una maggiore velocità di crescita. Inoltre, seppur non sia stata registrata un'elevata riduzione percentuale dello

sviluppo radiale, nel caso di SAAF 43 + T22 è stato possibile osservare un'area di inibizione di circa 2 mm tra i due microrganismi, come mostra la Figura 20. Relativamente ad AG1 (*B. amyloliquefaciens*), è stato rilevato, in generale, il maggiore livello di inibizione per tutti i ceppi di aspergilli testati, con un range di PGI % compreso tra 46.53% e 60.92% (Tabella 19, Figura 21).

Tabella 19- Percentuale di inibizione degli aspergilli selezionati dovuta all'attività antimicrobica, in coltura duale, di funghi e batteri antagonisti contro gli aspergilli selezionati, dopo 9 giorni di incubazione.

Codice	Specie	T22	Tp	P1	Pi	AG1	Media fungo ¹
SAAF 43	<i>A. flavus</i>	31.85bB	30.19bB	29.26bB	29.26bB	60.92cC	36.30bB
SAAF 47	<i>A. fumigatus</i>	28.52bB	28.33bB	29.07bB	29.81bB	59.26bcC	35.00bB
SAAF 14	<i>A. tubingensis</i>	31.49bB	34.76bB	33.75bB	32.24bB	59.41bcC	38.33bB
SAAF 32	<i>A. calidoustus</i>	6.19aA	7.73aA	14.95aA	1.89aA	48.67aAB	15.89aA
SAAF 7	<i>A. niger</i>	53.71cC	53.03cC	54.83cC	26.74bB	55.25bcBC	48.71cC
SAAF 6	<i>A. amstelodami</i>	12.99aA	3.46aA	12.99aA	8.66aA	46.53aA	16.92aA
SAAF 31	<i>A. sydowii</i>	7.25aA	7.59aA	7.25aA	1.9aA	54.26bBC	15.65aA
Media antagonista ²		24.57bB	23.59bB	26.02bB	18.64aA	54.9cC	

Analisi statistica ad una via. Valori in colonna seguiti dalla stessa lettera non differiscono statisticamente con il test Student-Newman-Kewls per $p=0.05$ (lettera minuscola) o per $p=0.01$ (lettera maiuscola). ¹ I dati in colonna riportano la percentuale di inibizione media di ciascun *Aspergillus* rispetto a tutti i microrganismi antagonisti testati. ² I dati in riga riportano la percentuale di inibizione media causata dal singolo microrganismo antagonista nei confronti di tutti i ceppi di *Aspergillus* testati. T22= *Trichoderma harzianum*; Tp= *Trichoderma pleuroticola*; P1= *Trichoderma atroviride*; Pi= *Penicillium italicum*; AG1= *Bacillus amyloliquefaciens*.

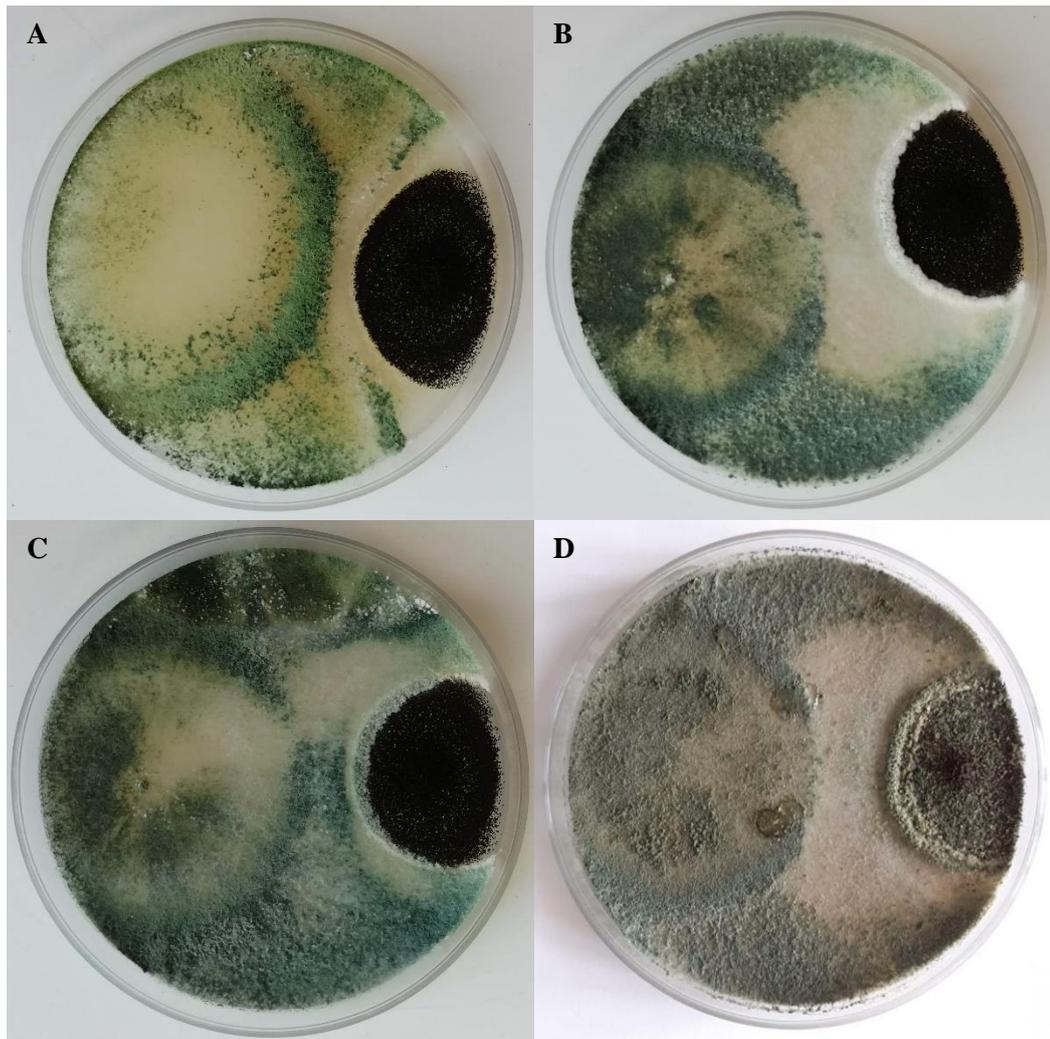


Figura 19 - A) Coltura duale di *A. niger* SAAF 7 e *T. harzianum* T22 (9 giorni di incubazione); B) Coltura duale di *A. niger* SAAF 7 e *T. pleuroticola* Tp (9 giorni di incubazione); C) Coltura duale di *A. niger* SAAF 7 e *T. atroviride* P1 (9 giorni di incubazione); D) Coltura duale di *A. niger* SAAF 7 e *T. atroviride* P1 (14 giorni di incubazione).

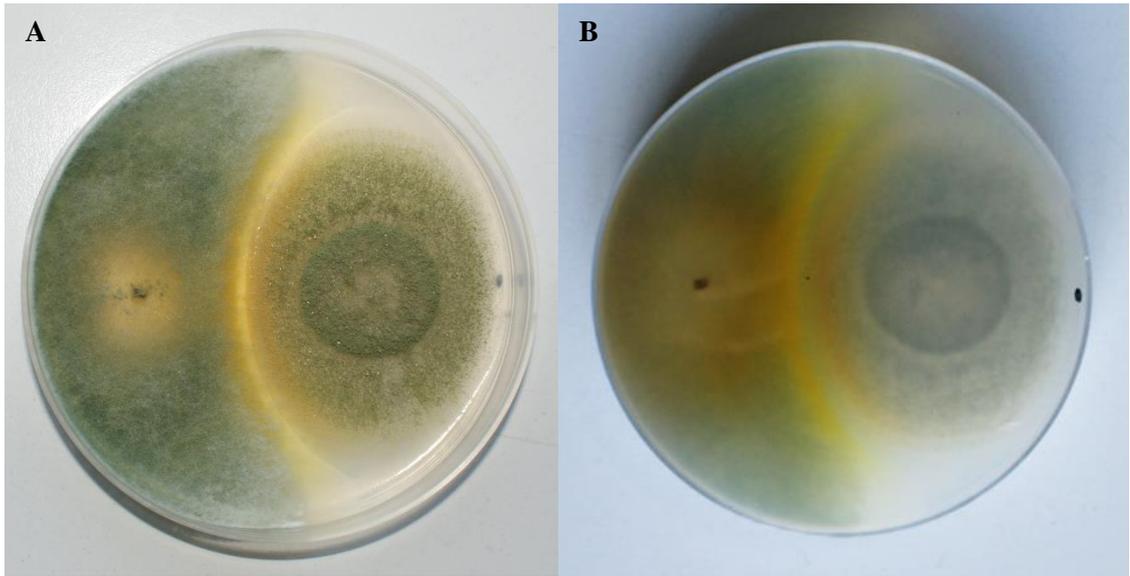


Figura 20 - Attività di *T. harzianum* T22 nei confronti di *A. flavus* SAAF 43: riduzione di sviluppo radiale e presenza di un'area di inibizione di circa 2 mm (A= fronte della colonia; B= retro della colonia).

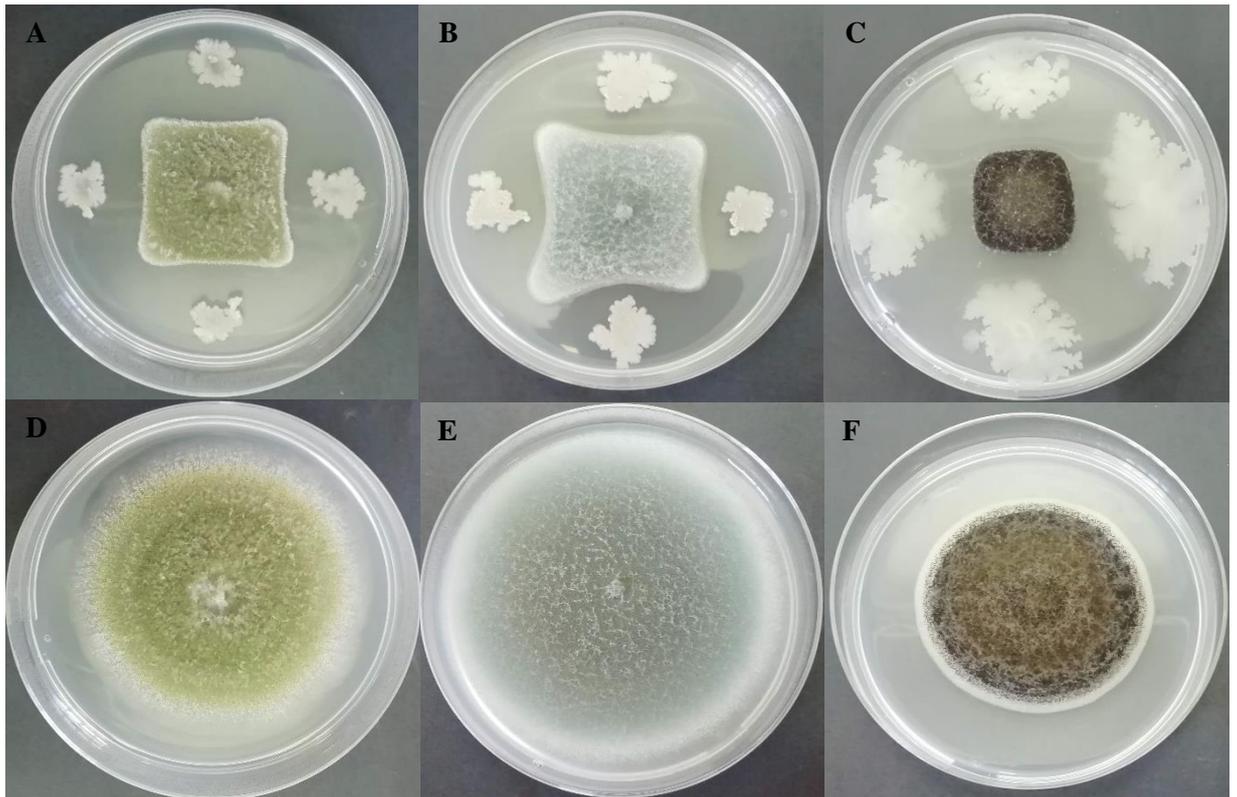


Figura 21- A) Coltura duale di *A. flavus* SAAF 43 e *B. amyloliquefaciens* AG1; B) Coltura duale di *A. fumigatus* SAAF 47 e *B. amyloliquefaciens* AG1; C) Coltura duale di *A. niger* SAAF 7 e *B. amyloliquefaciens* AG1. D-E-F) Piastre controllo rispettivamente di *A. flavus* SAAF 43, *A. fumigatus* SAAF 47 e *A. niger* SAAF 47

4.4.2. Substrato avvelenato con *T. harzianum* T22

Il filtrato colturale di T22 ha manifestato effetti inibenti sullo sviluppo di SAAF 7, in particolare, mentre attività nulla o assai limitata è stata rilevata negli altri casi (Tabella 20).

Tabella 20 – Percentuale di inibizione dei ceppi di *Aspergillus* spp. trattati con il filtrato di *Trichoderma harzianum* (T22)

Codice	Specie	%Inibizione
SAAF 43	<i>A. flavus</i>	0.00aA
SAAF 47	<i>A. fumigatus</i>	0.00aA
SAAF 14	<i>A. tubingensis</i>	0.00aA
SAAF 32	<i>A. calidoustus</i>	12.97bB
SAAF 7	<i>A. niger</i>	27.41cC
SAAF 6	<i>A. amstelodami</i>	3.92aA
SAAF 31	<i>A. sidowy</i>	2.11aA

Analisi statistica ad una via. Valori in colonna seguiti dalla stessa lettera non differiscono statisticamente con il test Student-Newman-Kewls per $p=0.05$ (lettera minuscola) o per $p=0.01$ (lettera maiuscola).

4.4.3. Prove *in vivo* con *T. atroviride* P1

Nei saggi di antagonismo su cariossidi di mais, SAAF 7 non ha mostrato differenze nella colonizzazione e nello sviluppo, quando inoculato tre giorni prima rispetto a P1. Nel caso in cui la colonizzazione dei due funghi è avvenuta contemporaneamente, l'aspergillo ha evidenziato una maggiore produzione di conidi, rispetto al testimone. E' stata, invece, rilevata, un'inibizione dello sviluppo di SAAF 7 sulle cariossidi di mais, quando inoculato tre giorni dopo P1. (Figura 22).

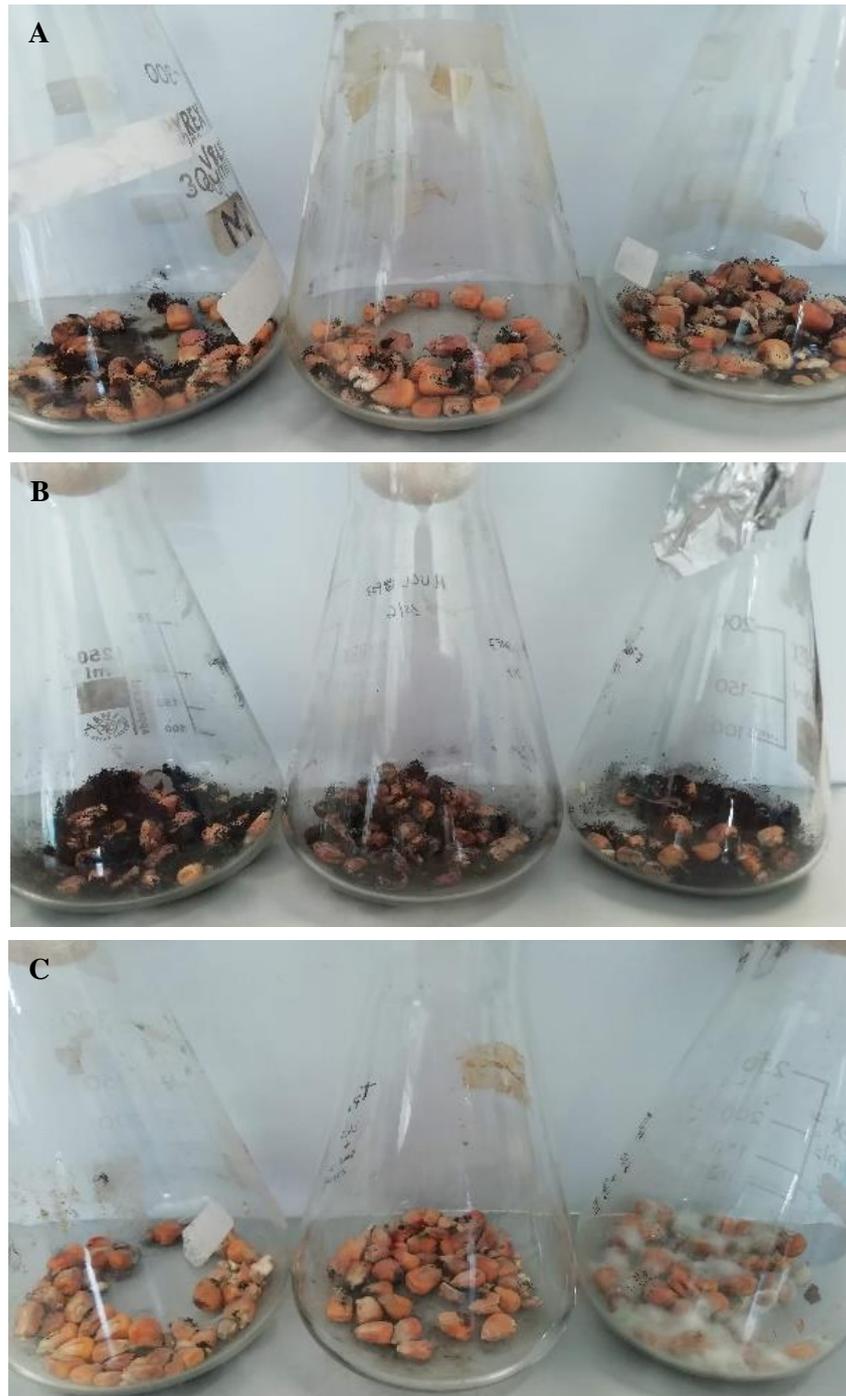


Figura 22 - A) inoculazione con *T. atroviride* P1 tre giorni dopo l'inoculazione con *A. niger* SAAF7; B) inoculazione contemporanea con *T. atroviride* P1 e *A. niger* SAAF 7; C) inoculazione con *A. niger* SAAF 7 tre giorni dopo l'inoculazione con *T. atroviride* P1.

4.4.4. Saggi di antagonismo con *B. amyloliquefaciens* AG1 in Bioscreen

Confrontando i valori di O.D. e le curve di crescita ottenute nella presente prova con i risultati di precedenti studi condotti in Bioscreen (Medina et al., 2012; García-Díaz et al., 2020) per testare l'attività antifungina di alcuni prodotti nei confronti di alcune specie di *Aspergillus*, si è ritenuto opportuno scegliere il PDB come substrato di crescita più idoneo per gli aspergilli da testare (Figura 23).

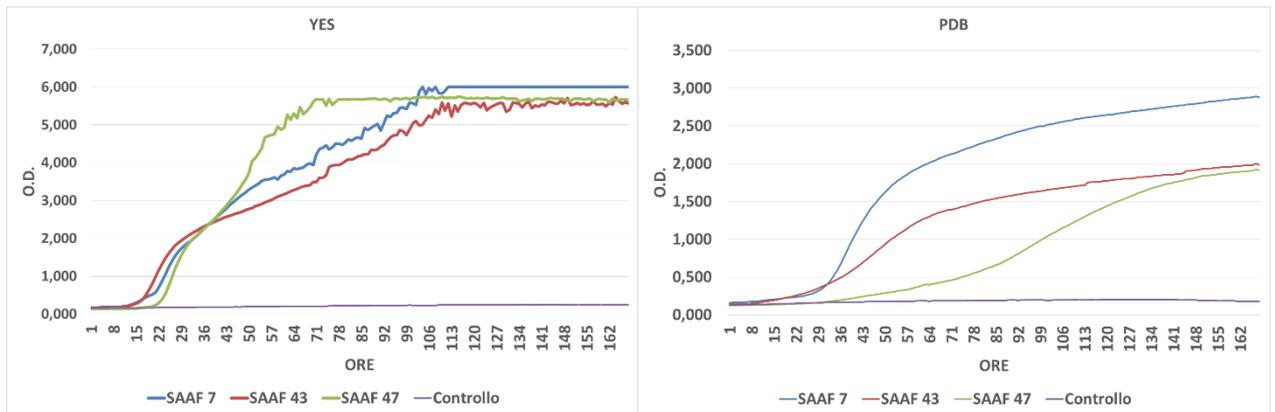


Figura 23 - Curve di crescita di *A. niger* SAAF 7, *A. fumigatus* SAAF 47, *A. flavus* SAAF 43 in YES e PDB.

I saggi di antagonismo effettuati impiegando il filtrato colturale di AG1 (Figura 24) non hanno evidenziato differenze significative nei valori di O.D tra gli isolati di aspergilli impiegati. Tuttavia, da una prima analisi macroscopica dei pozzetti è stato possibile rilevare differenze morfologiche nei ceppi SAAF 43 (*A. flavus*) e SAAF 47 (*A. fumigatus*) rispetto ai controlli e, in particolare, la mancata produzione di conidi. Le osservazioni al microscopio ottico, inoltre, hanno permesso di evidenziare, nel ceppo SAAF 43 trattato con 20 µl di filtrato, un'elevata produzione di cleistoteci, nessuna produzione di rami conidiofori e conidi, ife ispessite e melanizzate e assenza della tipica colorazione giallastra (Figura 25 A-B), caratteristiche ancora più accentuate all'aumentare della concentrazione del filtrato batterico (40 µl). Per quanto riguarda il ceppo SAAF 47, nella tesi con 20 µl di filtrato, oltre l'assenza di rami conidiofori e conidi, è stato osservato uno sviluppo miceliare piuttosto compatto e la formazione di alcuni giovani cleistoteci; inoltre, nella tesi con 40 µl di filtrato erano presenti sia alcune teste conidiche, sia evidenti ingrossamenti ifali (Figura 25 C-D). Seppure la misura della densità ottica non ha consentito di rilevare gli effetti del filtrato sulla base dello sviluppo della massa miceliare e, quindi, dell'incremento o meno della torbidità del substrato liquido, il filtrato di AG1 ha mostrato di alterare in maniera sostanziale la produzione di conidiofori, di conidi e lo stato vegetativo in particolare di *A. flavus* e *A. fumigatus*, anche in funzione delle differenti concentrazioni del filtrato batterico.

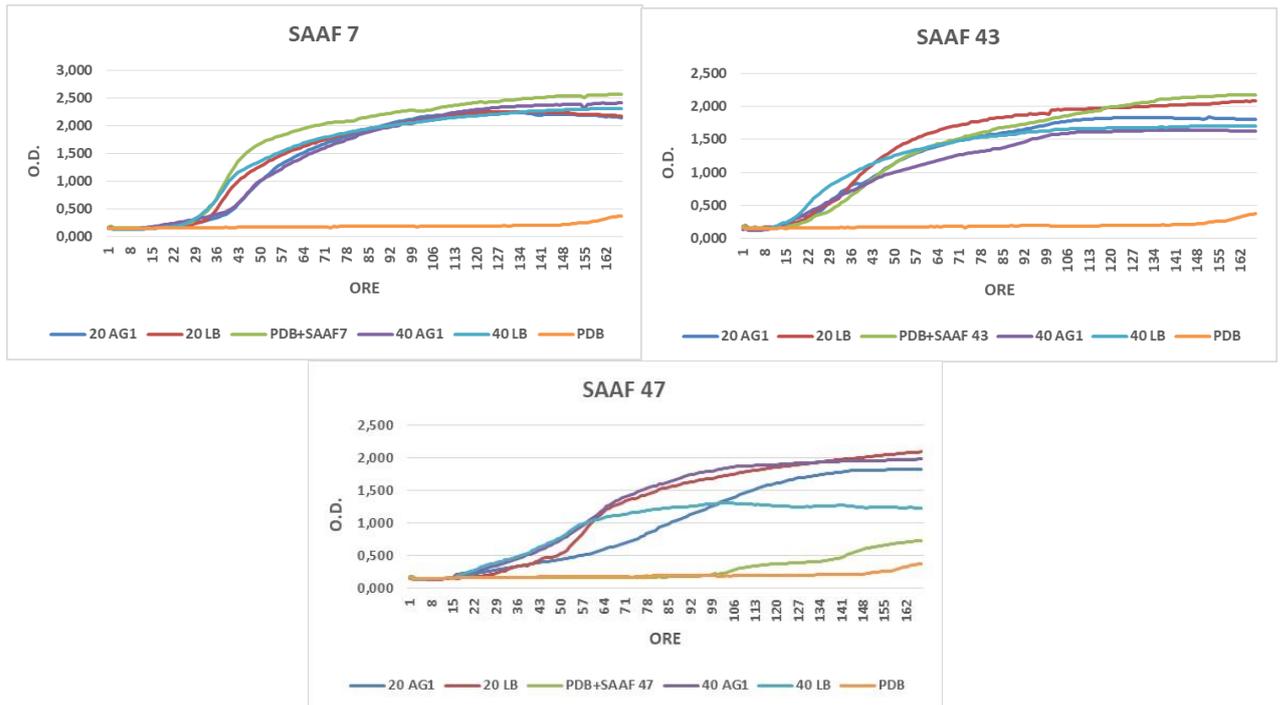


Figura 24– Curve di crescita in Bioscreen di *A. niger* SAAF 7, *A. flavus* SAAF 43 e *A. fumigatus* SAAF 47 utilizzando diverse concentrazioni del filtrato batterico di *B. amyloliquefaciens* AG1. 20 AG1= 20 µl di filtrato; 40 AG1= 40 µl di filtrato; 20 LB= 20 µl di substrato LB; 40 LB= 40 µl di substrato LB; PDB= controllo.

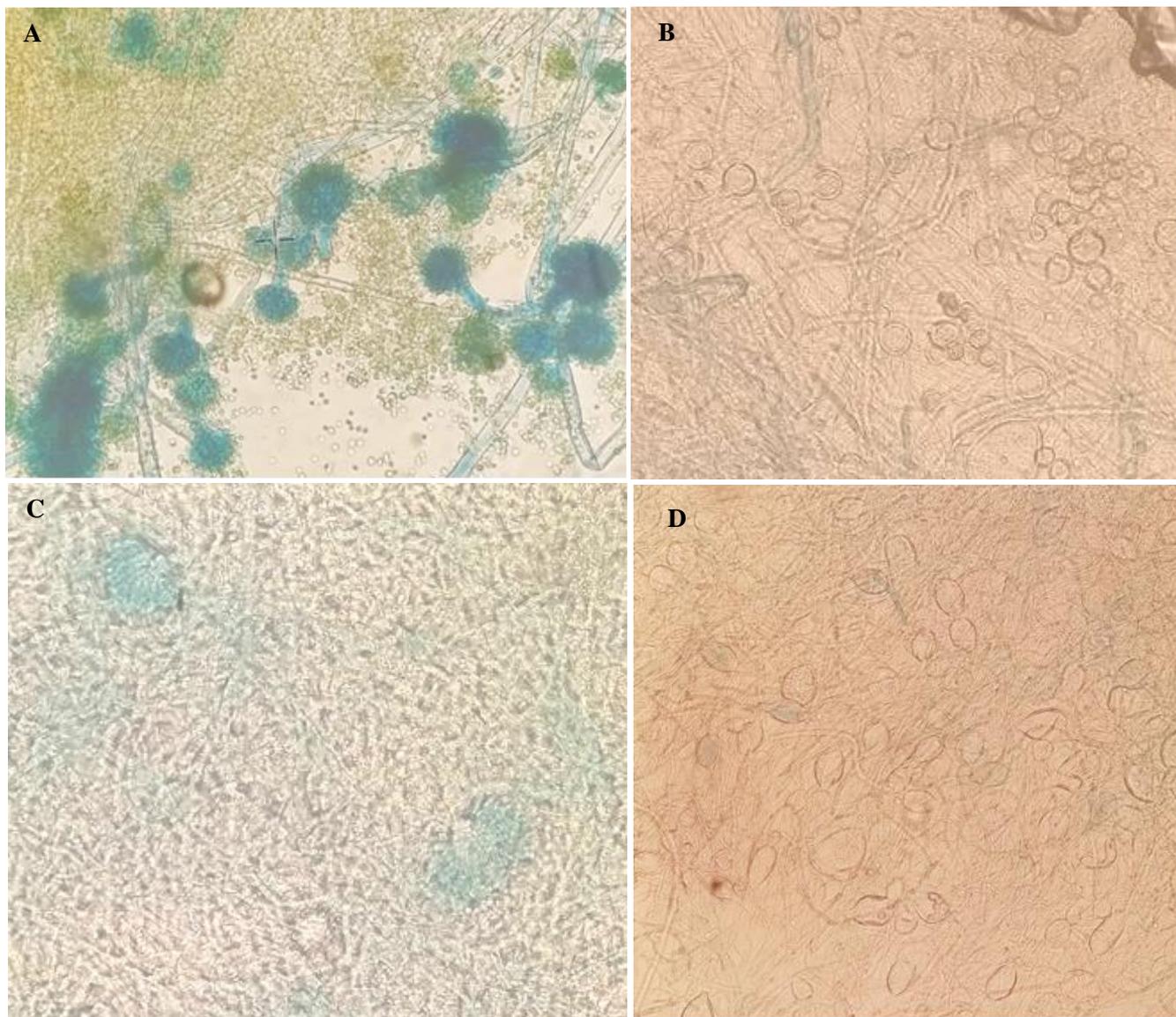


Figura 25 - A) Teste conidiche di *A. flavus* SAAF 43 nella tesi controllo; B) Presenza di ispessimenti ifali in *A. flavus* SAAF 43 trattato con 20 µl di filtrato batterico; C) Teste conidiche di *A. fumigatus* SAAF 47 trattato con 40 µl di filtrato; D) Formazione di evidenti ispessimenti ifali in *A. fumigatus* SAAF 47 tratto con 40 µl di filtrato.

4.5. DISCUSSIONI

I saggi preliminari di difesa biologica condotti in laboratorio hanno consentito di selezionare alcuni microrganismi con attività antagonista, in particolare 4 ceppi fungini (*Trichoderma harzianum*, *T. pleuroticola*, *T. atroviride*, *Penicillium italicum*) e 1 ceppo batterico (*Bacillus amyloliquefaciens*), nei confronti di 7 specie di aspergilli selezionati tra quelli più frequentemente isolati, con maggiore attività enzimatica e noti in letteratura come potenziali produttori di tossine. Relativamente agli antagonisti fungini, i saggi preliminari hanno consentito di fornire indicazioni sulla loro bioattività, evidenziando possibili interessanti ambiti di approfondimento. Tuttavia, tra i 5 microrganismi testati, quello che in tutte le prove

ha evidenziato maggiore efficacia è stato il *B. amyloliquefaciens* (AG1). Grazie alle sue note attività antibiotiche (Arguelles-Arias, 2009) infatti, è stato in grado di inibire in maniera più o meno rilevante la crescita della maggior parte degli aspergilli trattati, sia nelle prove duali in piastra che mediante l'utilizzo del suo filtrato. In questo secondo caso, l'inibizione nella produzione di propaguli vegetativi infettivi, come i conidi, può giocare un ruolo fondamentale nella limitazione della diffusione di aspergilli patogeni.

Ulteriori indagini rivolte alla selezione di microrganismi antagonisti, alla determinazione della loro attività di biocontrollo e alla messa a punto delle più opportune metodologie d'impiego in sanità, potrebbero fornire utili risultati per la realizzazione di eventuali formulati commerciali per il contenimento da aspergilli micotossinogeni in derrate alimentari ad uso umano e zootecnico.

CAPITOLO 5: CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'attività di ricerca condotta nel corso del triennio di Dottorato si inserisce in una tematica di importanza globale e di grande impatto: la contaminazione degli alimenti da parte di funghi e di micotossine.

Se la maggior parte degli studi presenti in letteratura mira ad approfondire lo stato di contaminazione delle derrate da parte di micotossine, questo lavoro sposta l'attenzione sulla presenza dei funghi responsabili della loro produzione (in particolare, sul genere *Aspergillus* noto aflatossinogeno) e sui meccanismi che questi mettono in atto per degradare gli alimenti, con l'obiettivo di mettere a punto tecniche diagnostiche innovative e nuovi metodi di lotta in grado di controllare a monte della filiera agroalimentare tale tipo di contaminazione.

I risultati ottenuti durante l'indagine preliminare, infatti, hanno evidenziato la presenza di generi micotossinogeni, in particolare *Penicillium* e *Aspergillus*, a prescindere dalla provenienza dei campioni, indice di una problematica piuttosto diffusa. Tra le specie di *Aspergillus* isolate ed identificate, inoltre, alcune hanno mostrato elevata attività enzimatica dei complessi cellulolitici (endo ed eso-glucanasi) e delle sostanze proteiche, indice di una spinta attività degradatoria nei confronti delle derrate contaminate, che oltre a non essere idonee dal punto di vista igienico-sanitario risultano, inevitabilmente, organoletticamente e qualitativamente scadenti.

Carattere innovativo del progetto è la messa a punto di un nuovo saggio di diagnostica molecolare LAMP per il rapido rilevamento, direttamente in derrate alimentari, di una delle specie di *Aspergillus* maggiormente coinvolte nei fenomeni di contaminazione: *A. flavus*. Questa specie fungina, a causa della capacità di alcuni ceppi di produrre aflatossine pericolose per la salute del consumatore, risulta ad oggi una delle più indagate. Inoltre, indagini più approfondite, condotte nel presente studio, su un ceppo aflatossinogeno di *A. flavus* (MUCL18903), hanno dimostrato come questo risulti particolarmente attivo anche nella degradazione della componente cellulosa delle derrate contaminate.

Il saggio LAMP sviluppato nel presente lavoro di tesi, grazie alla sua specificità, alla sua capacità di rilevare quantità bassissime sia di DNA che di propaguli fungini e grazie alla scarsa sensibilità a composti inibenti che possono trovarsi nei campioni alimentari, potrebbe quindi essere utilizzato anche al di fuori dei laboratori diagnostici, come test “*point of care*”, ottenendo risultati affidabili in tempi molto brevi e semplificando il monitoraggio e il controllo di *A. flavus* nella filiera agroalimentare, con conseguente riduzione della contaminazione da aflatossine.

Infine, i saggi avviati durante le fasi conclusive del triennio di Dottorato, hanno messo in evidenza nuove possibilità di controllo biologico, nei confronti di alcune specie di *Aspergillus*, che sicuramente meritano di essere approfondite alla luce della necessità di sostituire prodotti chimici dannosi per l'uomo, gli animali e l'ecosistema, con formulati biologici a ridotto impatto ambientale.

Ulteriori e più dettagliati studi in tale ambito potrebbero fornire, quindi, utili mezzi rapidi ed economici per la definizione di strategie atte a:

- 1) determinare l'avvenuta contaminazione in un "anello debole" della filiera produttiva;
- 2) apportare gli eventuali interventi correttivi sia con modifiche agro-tecnologiche, che con interventi di controllo ecocompatibili;
- 3) garantire la sanità dell'alimento finito, con indubbi vantaggi per il consumatore, uomo o animale.

BIBLIOGRAFIA

- Ademark, P., Varga, A., Medve, J., Harjunpaa, V., Drakenberg, T., Tjerneld, F., Stålbrand, H. 1998. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of a α -mannanase. *J. Biotechnol.* 63, 199–200.
- Ademark, P., Lundqvist, J., Hagglund, P., Tenkanen, M., Torto, N., Tjerneld, F., Stålbrand, H. 1999. Hydrolytic properties of α -mannosidase purified from *Aspergillus niger*. *J. Biotechnol.* 75, 281–289.
- Ainsworth, G.C. 1976. Introduction to the history of mycology. Cambridge University Press.
- Alberto Vazquez, M., Valiño Cabrera, E.C., Ayala Aceves, M., Folch Mallol, J.L. 2019. Cellulolytic and ligninolytic potential of new strains of fungi for the conversion of fibrous substrates. *Biotechnol. Res. Innov.* 2, 177-186.
- Altieri, M.A., Nicholls, C.I., Ponti, L. 2003. Biodiversità e controllo dei fitofagi negli agroecosistemi. Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, Firenze.
- Andlar, M., Rezić, T., Mardetko, N., Kracher, D., Ludwing, R., Santek B. 2018. Lignocellulose degradation: an overview fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng. Life Sci.* 18, 768-778.
- Arantes, V., Goodell, B. 2014. Current understanding of brown-rot fungal biodegradation mechanisms: A review, in: Schultz, T. P., Goodell, B. and Nicholas, D. D. (Eds.), *Deterioration and Protection of Sustainable Biomaterials*, American Chemical Society, Mississippi, pp. 4–21.
- Arapcheska, M., Jovanovska, V., Jankuloski Z., Musliu, Z.H., Uznov, R. 2015. Impact of aflatoxins on animal and human health. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.* 2(2).
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., Fickers, P. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb. Cell. Fact.* 8, 63.
- Assante, G., Vercesi, A. in Belli, G. et al., 2016. *Elementi di Patologia Vegetale*. Seconda Edizione. Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova. pp 409 - 425.
- Atanda, O.O, Ogunrinu M.C., Olorunfemi F.M. 2011. A neutral red dessicated coconut agar for rapid detecion of aflatoxigenic fungi and visual determination of aflatoxins. *World Mycotoxin J.* 4(2), 147-155.

- Bartov, I., Lisker, N., Paster, N. 1982. The nutritional value of moldy grains for broiler chicks. *Poultry Sci. J.* 61(11), 2247-2254.
- Bastawde, K.B. 1992. Cellulolytic enzymes of a thermotolerant *Aspergillus terreus* strain and their action on cellulosic substrates. *World J. Microbiol. and Biotech.* 8, 45-49.
- Belli, G., Assante, G., Bianco, P. A., Casati, P., Cortesi, P., Faoro, F., Iriti, M., Saracchi, M., Sardi, P., Vercesi, A. 2016. *Elementi di Patologia Vegetale. Seconda Edizione.* Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova. pp. 5-90.
- Bennet, J.W. 2010. An overview of the Genus *Aspergillus*. *Aspergillus Molecular Biology and Genomics* (Machida M & Gomi K, eds), pp. 1–17. Caister Academic Press, Norfolk.
- Bennet, J.W., Klich, M. 2005. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 497–516.
- Bottalico, A., Perrone, G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. In: Logrieco, A., Bailey, J.A., Corazza, L., Cooke, B.M. (eds) *Mycotoxins in Plant Disease.* Springer, Dordrecht.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1-2), 248-454.
- Campos, S.G., Moura Keller, L.A., Cavaglieri, L., Krüger, C., Fernandez Juri, M.G., Dalcero, A.M., Magnoli, C.E., Da Rocha Rosa, C.A. 2009. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin B1 in commercial pet food in Brazil. *World Mycotoxin J.* 2(1), 85-90.
- Cary, J.W., Ehrlich, K.C. 2006. Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic, relationships and evolutionary implications. *Mycopathologia* 162, 167-177.
- Castor, L., Frederiksen A. 1981 International Symposium on Sorghum Grain Quality. Grain Deterioration in Sorghum, 177-184.
- Cho, K.M., Math, R.K., Hong, S.Y., Islam, S.M.A., Mandanna, D.K., Cho, J.J., Yun, M.G., Kim, J.M., Yun, H.D. 2009. Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from Korean soybean sauce (kanjang) inhibits growth of aflatoxin producing fungi. *Food Control* 20, 402–406.
- Cole, G.T, Kendrick, B. 1989. *Biology of Conidial Fungi.* Academic Press, New York, pp. 680.

- Cook, R.J., and Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Cotty, P. 1990. Effect of atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* on aflatoxin contamination of developing cottonseed. Plant Dis. 74, 233–235.
- Couri, S., Terzi, S., Saavedra, G., Pereira, S., Costa, A. 2000. Hydrolytic enzyme production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. Process Biochem. 36, 255-261.
- Couturier, M., Berrin, J.G. 2013. The saccharification step: the main enzymatic components, in: Faraco, V. (Ed.), Lignocellulose conversion: enzymatic and microbial tools for bioethanol production, Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- Covarelli, L., Beccari, G., Salvi, S. 2011. Infection by mycotoxigenic fungal species and mycotoxin contamination of maize grain in Umbria, central Italy. Food Chem. Toxicol. 49(9), 2365-9.
- Criseo, G., Bagnara, A., Bisignano, G. 2001. Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group. Lett. Appl. Microbiol. 33, 291-295.
- D’Mello, J.P.F., MacDonald, A.M.C. 1997. Mycotoxins. Anim. Feed Sci. Technol. 69, 155-166.
- Dagnas, S. Membré, J.M. 2013. Predicting and preventing mold spoilage of food products. J. Food Prot. 76(3), 538-551.
- Davari, E., Mohsenzadeh, M., Mohammadi, G., Rezaeian-Doloei, R. 2015. Characterization of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* strain isolates from animal feedstuffs in northeastern Iran. Iran. J. Vet. Res. 16 (2), 150-155.
- De Lucca, A.J. 2007 Harmful fungi in both agriculture and medicine. Rev. Iberoam Micol. 24, 3-13.
- De Saeger, S. 2011. Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed. Published by Woodhead Publishing Limited, 80 High Street, Sawston, Cambridge CB22 3HJ, UK.
- De Voscolncelos, N.M., Saavedra Pinto, G.A., de Souza Aragao, F.A. 2013. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. Empresa

- Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agroindústria Tropical, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 88, 4-23.
- De Vries, R.P, Visser, J. 2001 *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65(4), 497-522.
- Del Fabro, A. 2006. Guida completa alla difesa biologica, Giunti Demetra, Italia, pp 96.
- Devi, C.M., Kumar, M.S. 2012. Isolation and screening of lignocellulose hydrolytic saprophytic fungi from dairy manure soil. Ann. Biol. Res. 3(2), 1145-1152.
- Dinis, A.M.P., Lino, C.M., Pena A.S. 2007. Ochratoxin A in nephropathic patients from two cities of central zone in Portugal. J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 44, 553-557.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh
Dyer, S.K., McCammon, S. 1994. Detection of toxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and related species on coconut cream agar. Appl. Bacteriol. 76(1), 75-78.
- Edwards, S.G., O'Callaghan, J., Dobson, A.D.W. 2002. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. Mycol. Res. 106, 1005–1025.
- El-Nahrawy, S., Metwally, M., El-Kodoos, A., Belal, E.B., Shabana, S.A., El-Refai, M. 2017. Optimization of culture conditions for production of cellulase by *Aspergillus tubingensis* KY615746. Env. Biodiv. Soil Security 1, 177-189.
- Fakruddin, M., Chowdhury, A., Nur Hossain, M., Ahmed, M.M. 2015. Characterization of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* from food and feed samples. SpringerPlus 4, 159.
- Fente, C., Ordaz, J., Vazquez, B., Franco, C., Cepeda, A. 2001. New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. Appl. Environ. Microbiol. 67(10), 4858-4862.
- Ferrari, M., Marcon, E., Menta, A. 2000. Lotta biologica. Controllo biologico ed integrato nella pratica fitoiatrica. Bologna, Edagricole.
- Fleetwood, J., Rahman, S., Holland, D., Millson, D., Thomson, L., Poppy, G. 2019. As clean as they look? Food hygiene inspection scores, microbiological contamination, and foodborne illness. Food Control 96, 76-86.
- Floch, C., Alarcon-Gutiérrez, E., Criquet, S. 2007. ABTS assay of phenol oxidase activity in soil. J. Microbiol. Methods 71, 319-324.

- Food and Agriculture Organization (FAO) (2001). *FAO/WHO* Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives Series, No. 47. Food and Nutrition Paper 74.
- Francois, P., Tangomo, M., Hibbs, J., Bonetti, E.J., Boehme, C.C., Notomi, T., Perkins, M.D., Schrenzel, J. 2011. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62(1), 41-8.
- Frisvad, J.C., Hubka, V., Ezekiel, C.N., Hong, S.B., Novakova, A., Chen, A.J., Arzanlou, M., Larsen, T.O., Sklenar, F., Mahakarnchanakul, W., Samson, R.A., Houbraeken, J. 2019. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Stud. Mycol.* 93, 1-63.
- Fujimoto, H., Ooi T., Wang, S.L., Takiwaza, T., Hidaka, H., Murao, S., Arai, M. 1995. Purification and properties of three xylanases from *Aspergillus aculeatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59,538–540.
- García-Díaz, M., Gil-Serna, J., Patiño, B., García-Cela, E., Magan, N., Medina, A. 2020. Assessment of the effect of *Satureja montana* and *Origanum virens* essential oils on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production at different water activities. *Toxins* 12, 142.
- Gardes, M., Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2, 113-118.
- Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.* 59(2), 257-268.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(4), 1323-1330.
- Gomathi, S., Ambikapathy, V. 2011. Antagonistic activity of fungi against *Pythium debaryanum* (hesse) isolated from chilli field soil. *Adv. Appl. Sci. Res.* 2, 291–297.
- Gonzalez-Salgado, A., Gonzalez-Jaen, T., Vazquez, C., Patino, B. 2008. Highly sensitive PCR-based detection method specific for *Aspergillus flavus* in wheat flour. *Food Addit. Contam.* 25 (6), 758-764.

- Gregori, R., Meriggi, P., Pietri, A., Formenti, S., Beccarini, G., Battilani, P. 2013. Dynamics of fungi and related mycotoxins during cereal storage in silo bags. *Food Control* 30(1), 280-287.
- Gutiérrez-Correa, M., Villena, G. 2003. Surface adhesion fermentation: a new fermentation category. *Rev. Perú Biol.* 10, 113–124.
- Gutiérrez-Ramirez, L.A., Pérez-Bran, J.A., Uribe, M.A. 2012. Evaluacion *in vitro* de celulasas producidas por cepas nativas de *Trichoderma reesei*, *Cladosporium herbarum* y *Aspergillus niger*. *J. Agr. Animal Sci.* 1(1), 7-15.
- Henry, S., Whitaker, T., Rabbani, I., Brower, J., Park, D., Price, W., Coker, R. 2001. Aflatoxin M1. IPCS Inchem.
- Henry, T., Iwen, P.C., Hinrichs, S.H. 2000. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1510-1515.
- Houbraken, J., Samson, R.A. 2017. Current taxonomy and identification of foodborne fungi. *Curr. Opin. Food Sci.* 17, 84-88.
- Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C.M., Yilmaz, N., Wang, X.C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R.A., Frisvad, J.C. 2020. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud. Mycol.* 95, 5-169.
- Ichinose, S., Tanaka, M., Shintani, T., Gomi, K. 2014. Improved α -amylase production by *Aspergillus oryzae* after a double deletion of genes involved in carbon catabolite repression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 335–343.
- Inglis, G.D., Kawchuk, L.M. 2002. Comparative degradation of oomycete, ascomycete and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Can. J. Microbiol.* 48(1), 60-70.
- Jaimez, J., Fente, C.A., Franco, C.M., Cepeda, A., Vazquez, B.I. 2004. A survey of the fungal contamination and presence of ochratoxin A and zearalenone on Spanish feed and raw materials. *J. Sci. Food Agric.* 83, 832-840.
- Jarosz-Wilkolazka, A., Kochmańska-Rdest, J., Malarczyk, E., Wardas, W., Leonowicz, A. 2002. Fungi and their ability to decolorize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 30(4), 566-572.

- Jones, J. 1994. Fungal adhesion. *Mycol. Res.* 98, 961-981.
- Jurado, M., Vazquez, C., Marin, S., Sanchis, V., Gonzalez-Jaen, M.T. 2006. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Syst. Appl. Microbiol.* 29(8), 681-9.
- Kabak, B., Dobson, A.D.W., Var, I. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46(8), 593-619.
- Kanaani, H., Hargreaves M., Ristovski, Z., Morawska, L. 2008. Deposition rates of fungal spores in indoor environments, factors effecting them and comparison with non-biological aerosol. *Atmos. Environ.* 42(30), 7141-7154.
- Khan, M., Rongbo, W., Li, B., Liu, P., Weng, Q., Chen, Q. 2018. Comparative evaluation of the LAMP assay and PCR-based assays for the rapid detection of *Alternaria solani*. *Front. Microbiol.* 9, 2089.
- Kifle, M.H., Yobo K.S., Laing M.D. 2016. Biocontrol of *Aspergillus flavus* in groundnut using *Trichoderma harzanium* stain kd. *JPDP – New Series* 124(1), 1-6.
- Klich, M.A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Agricultural Research Service, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Kong, Q., Shan, S., Liu, Q., Wang, X., Yu, F. 2010. Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels byuse of a strain of marine *Bacillus megaterium*. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 31-35.
- La Guerche, S., Dauphin, B., Pons, M., Blancard, D., Darriet, P. 2006. Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by the development of rot on grapes. *J. Agric. Food Chem.* 54(24), 9193-200.
- Lacey, J. 1994. Aspergilli in feeds and seeds. In: *The Genus Aspergillus. From Taxonomy and Genetics to Industrial Application*, Powell, K.A., Renwick, A., and Peberdy, R.F., eds. (New York: Plenum Press), pp.73–92.
- Levin, R.E. 2012. PCR detection of aflatoxin producing fungi and its limitations. *Int. J. Food Microbiol.* 156(1), 1-6.

- Li F.Q., Yoshizawa, T., Kawamura, O., Luo, X.Y., Li Y.W. 2001. Aflatoxins and fumonisins in corn from the high incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4122-426.
- Lisboa Garcia, N. F., da Silva Santos, F. R, Gonçalves F. A., Fossada Paz M., Fonseca, G. G., Ribeiro Leite, R. S. 2015. Production of β -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. *Electron. J. Biotechn.* 18(4), 314-319.
- Liu, P., Li, B., Y R., Weng, Q., Chen, Q. 2014. Development and evaluation of ITS- and aflP-based LAMP assays for rapid detection of *Aspergillus flavus* in food samples. *Can. J. Microbiol.* 60, 1–6.
- Luo, J., Vogel, R.F., Niessen, L. 2012. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid identification of aflatoxigenic molds and their detection in food samples. *Int. J. Food Microbiol.* 159, 214–224.
- Luo, J., Taniwaki, M.H., Iamanaka, B.T., Vogel, R.F., Niessen, L., 2014a. Application of loop-mediated isothermal amplification assays for direct identification of pure cultures of *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, and *A. caelatus* and for their rapid detection in shelled Brazil nuts. *Int. J. Food Microbiol.* 172, 5 –12.
- Luo, J., Vogel, R.F., Niessen, L., 2014b. Rapid detection of aflatoxin producing fungi in food by real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification. *Food Microbiol.* 44, 142 –148.
- Luque, M. I., Rodriguez, A., Andrade, M.J., Martin A., Cordoba, J.J. 2012. Development of a PCR protocol to detect aflatoxigenic molds in food products. *J. Food Prot.* 75(1), 85-94.
- Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius, I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506-577.
- Maina, A., Wagacha, J., Mwaura, F., Muthomi, J., Woloshuk, C. 2016. Postharvest practices of maize farmers in Kaiti district, Kenya and the impact of hermetic storage on populations of *Aspergillus* spp. and aflatoxin contamination. *J. Food Res.* 5(6), 53-62.
- Mandels M., Andreotti R., Roche R. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioengng. Syrup.* 2, 21-33.

- Manjarrés, K., Piñeros, Y., Rodríguez-Sandoval, E. 2011. Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de *Aspergillus* sp y *Trichoderma* sp en fase sólida sobre residuos de palma. *Bioagro*. 23(1), 19-26.
- Mannaa, M., Kim, K.D. 2017. Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grain storage. *Mycobiology* 45(4), 240-254.
- Mannion, P., Blaney, B., Levitt, M. 1987. The nutritional value for meat chickens of water-damaged wheat from temporary bulk stores in Queensland. *Crop Pasture Sci.* 38(3), 621-628.
- McNeil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C., Albersheim, P. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 625-663.
- Medina A., Lambert R.J.W., Magan N. 2012. Rapid throughput analysis of filamentous fungal growth using turbidimetric measurements with the Bioscreen C: a tool for screening antifungal compounds. *Fungal Biol.* 116, 161-169.
- Milicevic, D., Skrinjar, M., Baltic, T. 2010. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. *Toxins* 2, 572-592.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 425-428.
- Mirabile G., Bella P., Conigliaro G., Giambra S., Alberto Vazquez M., Davino S., Torta L. 2019. Fungal contaminants in sicilian livestock feeds and first studies on the enzymatic activity of *Aspergillus* isolates. *Cuba. J. Agric. Sci.* 53(4), 1-14.
- Mojsov, K. D. 2016. *Aspergillus* enzymes for food industries. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 215–222.
- Mori, Y, Nagamine, K, Tomita, N, Notomi, T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289(1), 150-4.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 263-273.

- Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes.* 16(3), 223-9.
- Nagamine, K., Watanabe, K., Ohtsuka, K., Hase, T., & Notomi, T. 2001. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. *Clin. Chem.* 47(9), 1742-1743.
- Nayan, N., van Erven, G., Kabel, M.A., Sonnenberg, A.S.M., Hendriks, W.H., Cone, J.W. 2019. Evaluation of fungal degradation of wheat straw cell wall using different analytical methods from ruminant nutrition perspective. *J. Sci. Food Agric.* 99, 4054-4062.
- Niessen, L., 2008. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin-producing fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 54, 81–138.
- Niessen, L., Bechtner, J., Fodilb, S., Taniwakid, M. H., Vogel, R. F. 2018. LAMP-based group specific detection of aflatoxin producers within *Aspergillus* section *Flavi* in food raw materials, spices, and dried fruit using neutral red for visible-light signal detection. *Int. J. Food Microbiol.* 266.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, e63.
- Panno, S., Matić, S., Tiberini, A., Caruso, A.G. Bella, P., Torta, L., Stassi, R., Davino, S. 2020. Loop-mediated isothermal amplification: principles and applications in plant virology. *Plants* 9(4), 461.
- Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23, 23-54.
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P.K., Rao, P.V., Morita, K. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol.* 18(6), 407-21.
- Peraica, M., Domijan, A.M., Sarić, M. 2008. Mycotoxic and aristolochic acid theories of the development of endemic nephropathy. *Arh Hig Rada Toksikol.* 59, 59–65.

- Pereyra, C.M., Cavaglieri, L., Chiacchiera, S.M., Dalcero, A.M. 2011. Mycobiota and mycotoxins contamination in raw materials and finished feed intended for fattening pigs production in eastern Argentina. *Vet. Res. Commun.* 35(6), 367-79.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. 1999. *Fungi and food spoilage*. Aspen publication, Gaithersburg, pp. 421.
- Queiroz, B., Pereyra, C.M., Keller, K.M., Almeida, T., Cavaglieri, L.R., Magnoli, C.E., Da Rocha Rosa, C.A. 2012. Fungal contamination and determination of fumonisins and aflatoxins in commercial feeds intended for ornamental birds in Rio de Janeiro, Brazil. *Let. Appl. Microbiol.* 57, 405-411.
- Rahimi, S., Sohrabi, N., Ebrahimi, M.A., Tebyanian, M., Taghi Zadeh, M., Rahimi, S. 2016. Application of PCR in the detection of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* group of cattle feed isolated in Iran. *J. Mol. Biol. Res.* 6(1), 121-128.
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Ahmed, W., Ghaffarkhan, A. 2008. Categorization of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates of stored wheat grains in to aflatoxinogenics and non-aflatoxinogenics. *Pak. J. Bot.* 40, 2177-2192.
- Reddy, L., Bhoola, K. 2010. Ochratoxins-food contaminants: impact on human health. *Toxins (Basel)* 2(4), 771-9.
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., Rasmussen, O. F. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17(1), 37-45.
- Ruiquian, L., Qian, Y., Thanaboripat, D., Thansukon, P. 2004 Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *KMITL Sci. J.*, 4, 1685–2044.
- Russell, L., Cox, D.F., Larsen, G., Bodwell, K., Nelson, C.E. 1991. Incidence of molds and mycotoxins in commercial animal feed mills in seven midwestern states 1988–1989. *J. Anim. Sci.* 69, 5-12.
- Ryu, D., Bianchini, A., Bullerman, L.B. 2008. Effects of processing on mycotoxins. *Stewart Postarvest Review* 6(5), 1-7.

- Sadhasivam, S., Britzi, M., Zakin, V., Kostyufovsky, M., Trostanetsky, A., Quinn, E., Sionov, E. 2017. Rapid detection and identification of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in stored wheat grain. *Toxins* 9, 302.
- Saithi, S., Borg, J., Nopharatana, M., Tongta, A. 2016. Mathematical modeling of biomass and enzyme production kinetics by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation at various temperatures and moisture contents. *J. Microb. Biochem. Technol.* 8(2), 123-130.
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraken, J., Hong, S.B., Hubka, V., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert K.A., Susca, A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yagchi T., Frisvad, J.C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 78, 141-173.
- Satterlee, T., Entwistle, S., Y., Cary, J.W., Lebar, M., Losada, L., Calvo, A.M. 2019. *RmtA*-dependent transcriptome and its role in secondary metabolism, environmental stress, and virulence in *Aspergillus flavus* G3: Genes, Genomes, Genetics 9 (12), 4087-4096.
- Satterlee, T., J. Cary, W., Calvo, A.M. 2016. *RmtA*, a putative arginine methyltransferase, regulates secondary metabolism and development in *Aspergillus flavus*. *PLoS One* 11: e0155575.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R. 2012. PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1014-1026.
- Sforza, S., Dall'Asta, C., Marchelli, R. 2006. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Wiley InterScience* 25(1), 54-76.
- Shahriarinnour, M., Wahad, M.N., Ariff, A. B., Mustafa, S., & Mohama, R.. 2011. Kinetics of cellulase production by *Aspergillus terreus* at various levels of dissolved oxygen tension in a stirred tank bioreactor. *BioResources* 6 (4), 4909-4921.
- Shephard, S., Fabiani, A., Stockenström, S., Mshicileli, N., Sewram, V. 2003. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. *J. Agric. Food Chem.* 51(4), 1102–1106.
- Snyder, A.B., Churey, J.J., Worobo, R.W. 2019. Association of fungal genera from spoiled processed foods with physicochemical food properties and processing conditions. *Food Microbiol.* 83, 211-218.

- Solomon, B.O., Amigun, B., Betiku, E., Ojumu, T.V., Layokun, S.K. 1997. Optimization of cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn isolate NSPR101 grown on bagasse. J. NSChE, 16, 61-68.
- Stech, M., Hust, M., Schulze, C., Dubel, S. and Kubick, S. 2014. Cell-free eukaryotic systems for the production, engineering, and modification of scFv antibody fragments. Eng. Life Sci. 14, 387–398.
- Strano C.P., Bella P., Licciardello G., Caruso A., Catara V. 2017. Role of secondary metabolites in the biocontrol activity of *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea*. Eur. J. Plant. Pathol. 149, 103-115.
- Sudini, H., Srilakshmi, P., Kumar, K.V.K., Njoroge, S.M.C., Osiru, M., Seetha, A., Waliyar, F. 2015. Detection of aflatoxigenic *Aspergillus* strains by cultural and molecular methods: a critical review. Afr. J. Microbiol. Res. 9(8), 484-491.
- Tealdo, E. 2006. Campionamento e analisi delle micotossine. Veneto Agricoltura, 60-69.
- Tian, C., Beeson, W.T., Iavarone, A.T., Sun, J., Marletta, M.A., Cate, J.H., Glass, N.L. 2009. Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 106, 22157-162.
- Valero, A., Ortiz, J.C., Fongaro, G., Hernandez, M., Rodríguez-Lázaro, D. 2017. Definition of sampling procedures for collective-eating establishments based on the distribution of environmental microbiological contamination on food handlers, utensils and surfaces. Food Control 77, 8-16.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral-detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583-3597.
- Velkovska, S., Marten, M.R., and Ollis, D. F. 1997 Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30., SF J. Biotechnol. 54, 83–94.
- Viegas, C., Pacifico, C., Faria, T., Cebola de Oliveira, A., Quintal Gomes, A., Viegas, S. 2016. Fungi distribution in poultry feed. Conference ICOETOX 2016, Porto.
- Vincent J. M. 1974. Distortion of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors. Nature, 159(4051), 850.

von Arx, J.A. 1981. The genera of fungi sporulating in pure culture. Cramer, Lichtenstein, pp. 429.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and application. Innis, M. A., Gelfand, D.H., Sminsky, J. J. and White, T. J. Eds. P315-322.

Whitlow, L.W., Hagler, JR., Diaz, D.E. 2010. Mycotoxins in feeds. Feedstuffs, 74.

Wilson, D.B. 2011. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. Curr. Opin. Microbiol. 14, 259-263.

Woiciechowski, A.L., Porto de Souza Vandenberghe, L., Karp, S.G., Letti, L.A.J., de Carvalho, C., Bianchi Pedroni Medeiros, A., Spier, M.R., Faraco, V., Soccol, V.T., Soccol R. 2013. The pretreatment step in lignocellulosic biomass conversion: current systems and new biological systems, in: Faraco, V. (Ed.), Lignocellulose conversion: enzymatic and microbial tools for bioethanol production. Springer, Verlag Berlin Heidelberg.

World Health Organization International Agency for Research on Cancer (WHO-IARC), 1993a. Toxins derived from *Fusarium moniliforme*: fumonisins B1 and B2 and fusarin C. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 56, 445–462.

World Health Organization International Agency for Research on Cancer (WHO-IARC), 1993b. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.

Xu, S.J., Kim, B.S. 2014. Biocontrol of *Fusarium* Crown Root Rot and promotion of growth of tomato by *Paenibacillus* strains isolated from soil. Mycobiology 42(2), 158-166.

Zain, M. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. J. Saudi Chem. Soc. 15(2), 129-144.

Zambon E. 2015. La diagnostica molecolare nel laboratorio di patologia clinica veterinaria. Università degli Studi di Bologna. Tesi di dottorato.

ALLEGATO 1. LISTA PUBBLICAZIONI

Alberto Vazquez M., Valiño Cabrerías E. C., Torta L., Laudicina V. A., **Mirabile G.** (2020). Ligninolytic potential of *Curvularia kusanoi* L7 laccases for animal production. Cuban Journal of Agricultural Science, 54(2), 1-11.

Mirabile G., Torta L. (2020). Le endomicorrize dei fruttiferi tropicali: vantaggi e prospettive di impiego. *Agriscilia* n. 2-3, 51-54.

Mirabile G., Torta L. (2020). Pistachio fruits rust caused by *Tuberculina persicina* (Ditmar) Sacc., anamorph of *Helicobasidium purpureum* (Tul.) Pat. *Plant. Dis. Prot.* 127, 597–600.

Torta L., Bella P., Conigliaro G., **Mirabile G.**, Laudicina V.A., Giambra S., Venturella G., Gargano M.L. (2019). First report of *Pleurotus fuscusquamulosus* (*Pleurotaceae*, Basidiomycota) in Italy naturally occurring on new tropical hosts. *Flora Mediterranea*, 29, 197- 206.

Mirabile G., Bella P., Conigliaro G., Giambra S., Alberto Vazquez M., Davino S., Torta L. (2019). Fungal contaminants in Sicilian livestock feeds and first studies on the enzymatic activity of *Aspergillus* isolates. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 53(4), 1-14.

Mirabile G., Rotolo M.C., Torta L. (2018). Muffe e micotossine nelle derrate alimentari: danni, metodi di controllo e norme in vigore. *AGRISICILIA*, 6: 56-60.

In revisione:

Mirabile, G., Panno, S., Caruso, A.G., Torta, L., Davino, S., Bella, P. (2021). Development and application of *Rmt-A*-based LAMP assay for rapid detection of *Aspergillus flavus* in foodstuffs. *International Journal of Microbiology*.

Torta L., Laudicina V.A., Tiralongo G.A., **Mirabile G.**, Cancemi P., Conigliaro G., Maetzke F.G., Badalucco L. (2021). Degradative activity of five Basidiomycota strains to sweet chestnut wood. *Fungal Biology*.

RINGRAZIAMENTI

Sentiti ringraziamenti al mio Tutor, Prof. Salvatore Davino, per la sua professionalità e la disponibilità dimostratami in questi tre anni di lavoro. I suoi consigli sono stati preziosi per la realizzazione di questa tesi.

Un grande ringraziamento al Prof. Livio Torta, mio Co-Tutor, per avermi supportata nella realizzazione di questo progetto, per aver creduto sempre nelle mie capacità e per avermi guidata attraverso le difficoltà con pazienza, gentilezza e professionalità. I suoi insegnamenti sono stati fondamentali.

Un sincero grazie va anche al Coordinatore del corso di Dottorato, Prof. Vincenzo Bagarello, per la sua continua disponibilità e per il lavoro fatto per noi dottorandi nell'arco del triennio. Desidero, inoltre, ringraziare la Prof.ssa Patrizia Bella, non solo per il valido supporto scientifico senza il quale parte di questa tesi non sarebbe stata realizzabile, ma anche per la sua amicizia sincera e la consapevolezza di poter sempre fare affidamento su di lei.

Un sentito grazie anche al Dott. Gaetano Conigliaro, il suo supporto tecnico è stato fondamentale per apprendere come si lavora all'interno di un laboratorio. Grazie anche per la sua amicizia e le pause pranzo condivise.

Ringrazio la Dott.ssa Selene Giambra per aver sempre messo a mia disposizione la sua esperienza e per i suoi consigli, questo percorso non sarebbe stato lo stesso senza di lei.

Grazie anche al Dott. Stefano Panno e al Dott. Andrea Caruso, il loro aiuto è stato veramente prezioso.

Infine, ma non per ultimo in ordine di importanza, il mio più sentito ringraziamento va alla mia famiglia e a Giuseppe che mi hanno sempre supportata e sopportata, incoraggiandomi a seguire sempre i miei sogni e credendo in me più di chiunque altro.