

TOSSINE DELL'ALTERNARIA SPP. NEL FRUMENTO: EFFETTI DELLA DIGESTIONE ANAEROBICA E BMP

Gabriella Aureli (a), Angela Iori (a), Claudio Fabbri (c), Francesco Gallucci (b), Mariangela Soldano (c)
(a) CREA Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari, Roma, Italia
(b) CREA Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari, Monterotondo, Italia
(c) Centro Ricerche Produzioni Animali, Reggio Emilia, Italia

Introduzione

L'importanza della sostenibilità del processo nell'ambito di un sistema di "economia circolare" per le aziende agricole si basa non solo sulla possibilità di abbattimento della concentrazione dei contaminanti organici presenti in fase di pre-trattamento ma anche sul vantaggio dello sfruttamento energetico di matrici cerealicole per la produzione di biogas (biometano).

La potenzialità di sfruttamento offerta dalla digestione anaerobica di substrati di diversa origine è supportata, fra l'altro, dall'interesse che sull'argomento suscitano gli aspetti normativi i quali, soprattutto in tempi recenti, ne hanno qualificato ulteriormente i vantaggi e le possibilità di applicazione. Un passo decisivo in tal senso è costituito dalle disposizioni legislative in merito al riconoscimento della digestione anaerobica come "trattamento" per ridurre i rischi igienico-sanitari dei substrati e, non ultimo, la definizione del prodotto di digestione (digestato) come "sottoprodotto" e non "rifiuto" se sono soddisfatte, fra l'altro, le norme igienico-sanitarie e di tutela ambientale (1).

La valorizzazione energetica di substrati contaminati da micotossine attraverso la digestione anaerobica rappresenta un mezzo efficace per la gestione sostenibile di prodotti cerealicoli, non utilizzabili per l'alimentazione umana o animale, che si inquadra nell'ambito di un sistema potenzialmente vantaggioso per le aziende agricole. L'alternariolo (AOH) è una micotossina diffusa in diverse derrate alimentari, anche cerealicole, attualmente all'attenzione della Commissione Europea ai fini della valutazione dei livelli di esposizione della popolazione agli effetti tossici della micotossina nonché di altri metaboliti derivanti dagli stessi funghi produttori e per questo definiti, nell'insieme, come "tossine dell'*Alternaria*". L'alternariolo, infatti, è una delle micotossine prodotte da funghi tossigeni del genere *Alternaria*, largamente diffusi nelle colture cerealicole (2-4). Nel 2011 l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) ha espresso un'opinione scientifica in merito al rischio per l'uomo e per gli animali in relazione alla contaminazione di alimenti e mangimi da parte di questi composti tossici e, successivamente, una valutazione dell'esposizione della popolazione europea attraverso la dieta. Nel parere espresso dall'EFSA è stata messa in evidenza, fra l'altro, la preminenza dell'acido tenuazonico (TeA) fra le tossine dell'*Alternaria* rilevate negli alimenti analizzati (5-6).

Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare l'efficacia del processo di digestione anaerobica, in termini di capacità di abbattimento della concentrazione di micotossine nel digestato e di potenziale biochimico di metanazione (BMP), su prodotti di prima trasformazione (sfarinati integrali, frazioni cruscali, semole e farine) ottenuti da granella di frumento contaminata, sia con infezione naturale sia mediante inoculazioni artificiali, da tossine prodotte dall'*Alternaria* spp. A tal fine sono state considerate le seguenti micotossine: alternariolo (AOH), alternariolo monometil-etero (AME) e acido tenuazonico (TeA).

Materiali e metodi

I campioni di granella di frumento duro (*Triticum durum* Desf.) e di frumento tenero (*Triticum aestivum* L.) sono stati reperiti da coltivazioni sperimentali e, in alcuni casi, da fonti commerciali. I campioni sono stati utilizzati come matrici cerealicole naturalmente contaminate ad eccezione di alcuni di essi per i quali si è proceduto con inoculazioni artificiali della granella con sospensioni fungine a concentrazione nota di conidi di *Alternaria* spp. (v. sotto). Lo sfarinato integrale, sia per il frumento duro che per il tenero, è stato ottenuto con l'impiego del molino Cyclotec™ (FOSS) mod. 1093 (Ø <0,500 mm) mentre per la trasformazione in frazioni di molitura è stato utilizzato l'impianto pilota MLU 202 (Bühler) per il frumento duro; per il frumento tenero, e in caso di quantitativi limitati di granella di frumento duro, sono stati impiegati impianti di molitura di dimensioni ridotte (rispettivamente molini BONA e CHOPIN) ma con caratteristiche tecniche analoghe agli impianti di più grandi dimensioni. Le caratteristiche granulometriche delle frazioni di molitura ottenute sono state le seguenti: crusca (rimacinata con Cyclotec™ (FOSS) mod. 1093 (Ø <0,500 mm), cruschello (Ø <1,00 mm), semola (0,180 mm < Ø <0,500 mm), farinetta (Ø <0,180 mm), farina di frumento tenero) (Ø <0,200 mm).

Le analisi con metodo immunoenzimatico (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA) sono state svolte con l'Alternariol Plate Kit (Beacon Analytical Systems), con limite di quantificazione (*Limit of Quantification*, LOQ) nel campione di 22,5 µg/kg, utilizzato con modifiche minori. Lo standard di alternariolo in acetonitrile (Alternariol RK-102076, 10 µg/mL, OR SELL) è stato utilizzato per la preparazione di campioni di sfarinato integrale di frumento addizionati con concentrazioni note di micotossina (50 e 250 µg/kg) per la verifica della percentuale di recupero nella matrice d'interesse. È stato utilizzato il preparatore automatico per immunodosaggi (BRIO, SEAC, Radim Group), il lettore per micropiastre Sirio-S Microplate Reader (SEAC, Radim Group) e, per l'elaborazione dei dati di concentrazione, il RIDA® Soft Win software (R-Biopharm AG). Le analisi in cromatografia liquida (*Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) sono state eseguite presso l'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, Facoltà di Scienze agrarie, alimentari e ambientali, Dipartimento di Scienze animali, della nutrizione e degli alimenti (DIANA).

Le inoculazioni artificiali sono state effettuate utilizzando un isolato di *Alternaria* spp. ottenuto presso il CREA Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari di Roma da carioidi di frumento duro con infezione naturale. Dopo la sterilizzazione il materiale infetto è stato posto in piastre Petri contenenti agar (Agar-Agar 15g/L Merck) ed è stato incubato a 20°C con fotoperiodo di 12 h. Con l'ausilio dello stereomicroscopio, i conidi sono stati prelevati e inoculati in piastre Petri contenenti Potato Dextrose Agar (PDA 41 g/L, Formedium), poi le capsule sono state trasferite in un armadio climatico per circa 7-10 giorni alle stesse condizioni di temperatura e di ciclo luce/buio suddette. Al termine di tale periodo, sulle colture fungine sono stati aggiunti 10 mL di acqua distillata sterile e la superficie delle colonie è stata strofinata delicatamente con una bacchetta di vetro; quindi, la sospensione fungina è stata filtrata e diluita al fine di ottenere la concentrazione finale di 5×10^6 conidi/mL. Tale sospensione è stata utilizzata per inoculare i campioni di granella di frumento duro e tenero, risultati negativi al precedente test ELISA per l'alternariolo ($c < 22,5$ µg/kg). e sterilizzati in autoclave a 121°C per 20 minuti. Il controllo negativo è stato allestito con aggiunta di acqua sterile. Il campione inoculato e il controllo sono stati incubati a 20°C con fotoperiodo di 12 h per 30-40 giorni, e, successivamente, sono stati posti in stufa a 55°C per 24 ore.

La verifica della resistenza dell'alternariolo alle condizioni termiche di essiccazione (55°C) adottate è stata effettuata con la misura (test ELISA) della concentrazione della micotossina su sfarinato integrale di frumento precedentemente inoculato con conidi di *Alternaria* spp. e suddiviso in due gruppi di 5 campioni ciascuno: 1) n. 5 beute contenenti 2,0 g di sfarinato integrale

poste in stufa a 55°C per 3 giorni, 2) n. 5 beute contenenti 2,0 g di sfarinato integrale conservate a -20°C per 3 giorni (controllo).

Il test BMP (*Bio-Methane Potential*) è una prova di laboratorio di digestione anaerobica in batch che consente di misurare la massima quantità di metano producibile da una determinata matrice organica sottoposta a digestione anaerobica, espressa come Nm³/t di solido volatile (SV) o sostanza organica caricata. L'analisi viene effettuata secondo la norma UNI 11703/2018 (7). Il sistema di misura è costituito da reattori di vetro del volume utile di 1,35 litri, posti in armadi termostati alla temperatura di 38°C, completi di valvole, flussimetri e sistemi di misura manometrici per la quantificazione del biogas prodotto. La metodica prevede l'aggiunta nel reattore di prova di un inoculo, pre-incubato 7 giorni, prelevato da un digestore di un impianto di biogas operante alla stessa temperatura e costituito da un equilibrato consorzio batterico. Per garantire la crescita batterica anaerobica e una adeguata capacità tampone, viene aggiunta una soluzione di sali e di micro e macronutrienti. La misura della qualità del gas prodotto (percentuale di CH₄, CO₂, O₂ e concentrazione di H₂S) è effettuata mediante analizzatore dei gas a infrarossi. Nella presente sperimentazione sono stati condotti test BMP della durata di 27 giorni in doppio, su campioni di frumento duro e tenero di diverso tipo (sfarinato integrale, crusca, cruschetto, semola, farina, farinetta), contaminato in modo naturale o artificiale dalle micotossine d'interesse. Ciascun reattore di prova è stato riempito con 25,0 g di substrato, in miscela con 700 g di inoculo, in modo da ottenere un rapporto tra gli SV dell'inoculo e gli SV del substrato di circa 2, come indicato nella norma UNI. All'inizio di ciascun test BMP, e successivamente all'analisi di screening con il test ELISA, i campioni sono stati sottoposti all'analisi cromatografica per la determinazione della concentrazione delle tossine dell'*Alternaria* spp. (AOH, AME e TeA) (LC-MS/MS triplo quadrupolo, limite di quantificazione = 5 µg/kg); l'analisi della concentrazione di micotossine è stata ripetuta sui campioni di digestato ottenuti al termine di ciascun test di digestione anaerobica.

L'analisi statistica dei dati analitici è stata effettuata con software Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis (PAST) ed Excel di Microsoft Windows® 8. Ai fini dell'elaborazione dei dati i risultati negativi sono stati considerati come LOD/2 o LOQ/6 in funzione della metodica utilizzata (8).

Risultati e discussione

I risultati ottenuti hanno permesso di approfondire le conoscenze, su base sperimentale, sui seguenti aspetti: 1) efficienza del processo di fermentazione anaerobica nell'abbattimento (in post-digestione) della concentrazione delle tossine dell'*Alternaria* (AOH, AME e TeA) rispetto alla condizione iniziale (in pre-digestione) di substrati a base di frumento, naturalmente e/o artificialmente contaminati; 2) resa in biogas e biometano; 3) influenza della concentrazione di micotossine, presenti nel substrato nella fase di pre-digestione, sia sull'efficienza del processo di digestione anaerobica e quindi sulla resa nella produzione di biogas che di abbattimento delle stesse.

I risultati relativi alle prove preliminari di resistenza al calore (55°C) di campioni di sfarinato integrale di frumento artificialmente contaminato con la sospensione fungina di *Alternaria* spp. hanno evidenziato la non significatività (P-same = 0,38) delle differenze tra i valori medi di concentrazione dell'alternariolo (Tabella 1), determinati con test immunoenzimatico, a ulteriore conferma di quanto riportato in letteratura (9).

Tabella 1. Alternariolo (AOH): concentrazione ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (test ELISA) in campioni di sfarinato integrale di frumento conservati a due diverse temperature (55°C e -20°C). T-test su distribuzione Log-normale: P-same = 0,38

N. campioni	T ($^\circ\text{C}$) di incubazione	
	-20°C	55°C
1	936	1025
2	747	735
3	710	1147
4	809	920
5	1008	823
Media	842	930
DS*	126	163

*DS=Deviazione Standard

Per quanto riguarda i risultati dello screening ELISA in confronto con l'analisi cromatografica è stata evidenziata una risposta positiva al test immunoenzimatico anche nel caso di assenza della micotossina principale (AOH) (Tabella 2). Ciò nonostante, l'andamento dei valori di concentrazione ottenuti con test ELISA per l'AOH e la somma dei valori di concentrazione delle tre tossine sopra citate, ottenuti tramite analisi LC-MS/MS, sono risultati positivamente, anche se debolmente, correlati ($r = 0,60$). Considerato che le prove di recupero su matrice (sfarinato integrale di frumento) addizionata con quantità note di AOH (50 e 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) hanno messo in evidenza un buon livello di riconoscimento e quantificazione della micotossina (valore medio: $115 \pm 29 \mu\text{g}/\text{kg}$, n totali = 9), i risultati ottenuti hanno delineato una elevata specificità del test nel caso in cui la contaminazione sia stata limitata alla sola presenza dell'AOH. Nel caso, invece, di una contaminazione da più tossine dell'*Alternaria* spp., relativa cioè a campioni naturalmente contaminati e/o a matrici addizionate con funghi produttori, dai risultati ottenuti si potrebbe ipotizzare un effetto di *cross-reaction* anche verso altri metaboliti fungini non compresi tra quelli analizzati in LC-MS/MS. A tale riguardo è noto che le *Alternaria*-tossine conosciute appartengono ad un gruppo di più di 70 composti ma soltanto alcune di esse sono state caratterizzate dal punto di vista chimico-fisico (10).

Tabella 2. Livelli di contaminazione ($\mu\text{g}/\text{kg}$) \pm DS delle tossine dell'*Alternaria* spp. su substrati a base di frumento (pre-digestione)

Prove	ELISA	AOH	LC-MS/MS	
	AOH		AME	TeA
#1	208 \pm 36	19	17	<5
#2	190 \pm 51	18	23	<5
#3	99 \pm 39	<5	<5	<5
#4	137 \pm 25	12	36	2500
#5	1729 \pm 21	625	5690	748000
#6	1956 \pm 415	<5	32	439
#7	2139 \pm 651	<5	16	391
#8	2745 \pm 909	<5	111	1461
#9	1380 \pm 207	<5	24	2457
#10	706 \pm 23	<5	<5	394
#11	1253 \pm 223	<5	29	353
#12	353 \pm 58	<5	<5	559
#13	610 \pm 113	<5	<5	468

AOH alternariolo; AME alternariolo monometil-etere; TeA acido tenuazonico

ELISA: valori medi ($n \geq 2$), LOQ = 22,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; LC-MS/MS: LOQ = 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; DS = deviazione standard

In merito all'efficacia del processo di digestione anaerobica nel ridurre la concentrazione delle micotossine nel substrato le percentuali di abbattimento registrate per la somma delle tossine AOH, AME e TeA sono state comprese nell'intervallo 27,7-100% nel 71% dei campioni analizzati (17/24 repliche totali). L'elaborazione statistica dei dati, effettuata tramite analisi della varianza, ha evidenziato che le differenze di tali percentuali di abbattimento sono risultate significative ($P < 0,05$) solo relativamente allo sfarinato integrale e alle frazioni di molitura considerate nel loro insieme (semola/farina/farinetta) (Figura 1). Per i restanti campioni analizzati (29% del totale) l'abbattimento delle tre tossine considerate, inteso come somma totale delle concentrazioni, non è risultato efficace per la presenza dell'AME nel digestato finale. Quest'ultimo aspetto dovrà quindi essere oggetto di ulteriori sperimentazioni e approfondimento.

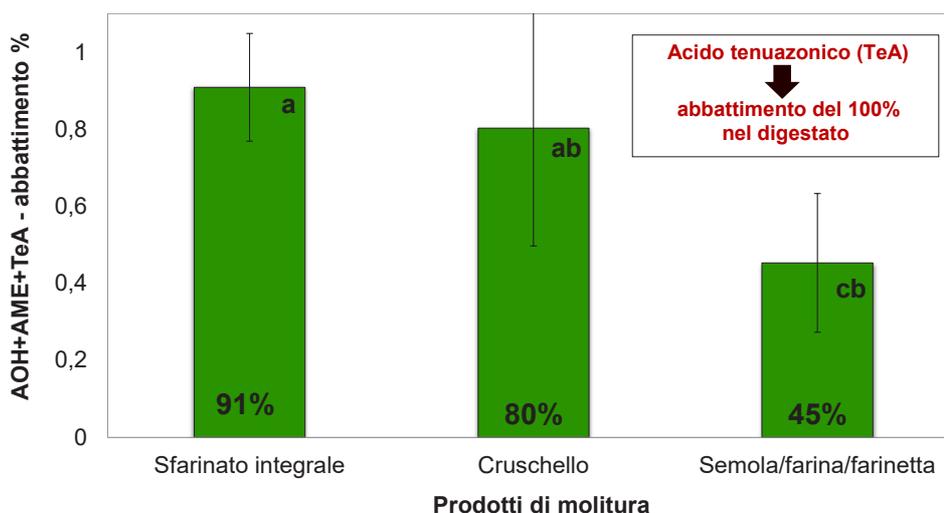


Figura 1. Abbattimento medio (%) \pm DS della concentrazione della somma delle tossine AOH, AME e TeA nel digestato ($n = 17$) (i valori sono riferiti ai solidi totali del digestato); analisi LC-MS/MS; lettere uguali: differenze non significative ($P > 0,05$)

Tuttavia, occorre sottolineare che l'abbattimento percentuale della concentrazione dell'acido tenuazonico (TeA) nel post-digestato è risultato pari al 100% in tutti i campioni analizzati, indipendentemente dai livelli di concentrazione in pre-digestione. Quest'ultimo aspetto riveste una particolare importanza tenuto conto, come sopra già accennato, della prevalenza di questo tipo di micotossina, fra quelle prodotte dall'*Alternaria* spp. e dell'elevato grado di tossicità finora riscontrato (11-12).

Il BMP, misurato nei test di digestione anaerobica dei campioni analizzati (totale = 24 repliche) è risultato compreso nell'intervallo 280,8-383,4 Nm³ CH₄/t SV (normal metri cubi di metano per tonnellata di solidi volatili), con una media di 338,6 \pm 22,3 Nm³ CH₄/t SV e quindi sostanzialmente confrontabile con la resa media in metano, misurata in condizioni di digestione analoghe (mesofilia), ottenuta dall'impiego di scarti e/o residui vegetali (Figura 2) (13). L'analisi statistica ha evidenziato che la resa in biogas (BMP) non è risultata correlata in modo significativo ($P > 0,05$) né con la somma dei valori di contaminazione delle micotossine esaminate dei campioni in pre-digestione né con le diverse tipologie di matrice a base di frumento (sfarinato integrale, frazioni cruscali e farine/farinette) impiegate.

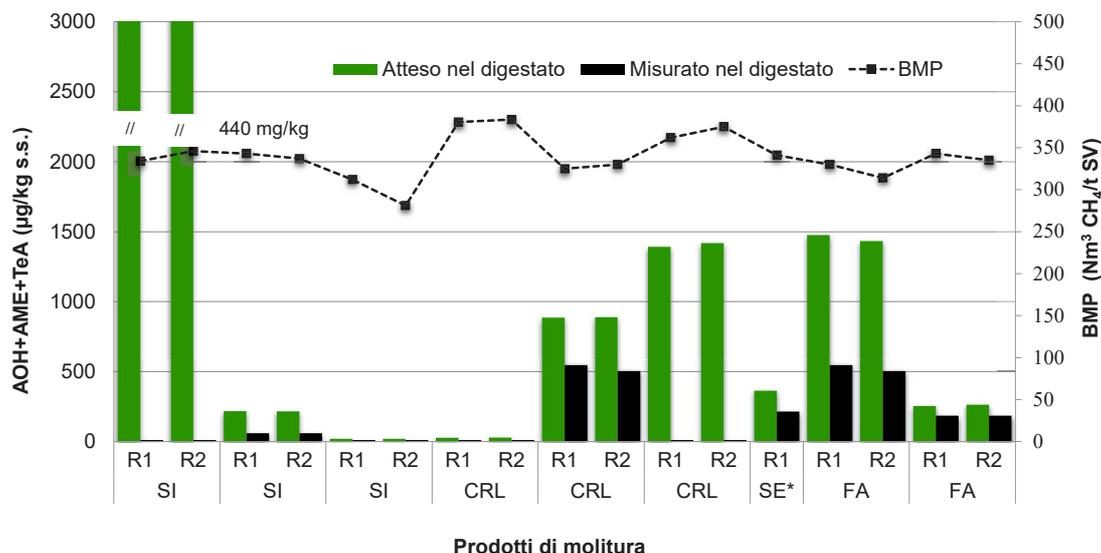


Figura 2. Concentrazioni attese e misurate della somma delle tossine AOH, AME e TeA nel digestato (i valori sono riferiti ai solidi totali del digestato) e resa BMP; R1, R2 (n=17): campione replicato; SI = sfarinato integrale; CRL = cruschello; SE = semola; FA = farina/farinetta; analisi LC-MS/MS; *campione singolo

Sono già noti sia gli effetti di riduzione tramite digestione anaerobica della concentrazione di alcune fra le micotossine più diffuse nei cereali (es. DON, aflatossine, fumonisine, tossine T-2 e HT-2, ecc.) in sfarinati di mais e/o frumento sia le potenzialità di sfruttamento a fini energetici (BMP) di substrati a base di frumento (14-17). I risultati ottenuti in questo lavoro, se da un lato confermano quanto riportato in letteratura in merito all'efficacia del processo di fermentazione anaerobica nel ridurre i livelli di contaminazione di micotossine in matrici vegetali, dall'altro contribuiscono ad ampliare le conoscenze sull'argomento sia per la tipologia dei substrati cerealicoli utilizzati, sia per i tipi di micotossine esaminate e sia per il tipo di contaminazione (naturale e/o artificiale). In particolare, nell'ottica di un eventuale impiego come risorsa energetica anche dei "residui dell'attività agroalimentare" il lavoro svolto ha permesso di acquisire informazioni non solo su sfarinati integrali ottenuti da granella macinata "in toto" ma anche su prodotti di prima trasformazione del frumento contaminati da micotossine dell'*Alternaria* spp., e con diverse concentrazioni delle stesse.

Conclusioni

Il lavoro svolto ha permesso di acquisire ulteriori conoscenze sulla possibilità di impiego di matrici cerealicole contaminate da micotossine sfruttabili come substrati dal punto di vista energetico e forse valutabili per un possibile ulteriore impiego. È stata studiata la fattibilità applicativa del processo fermentativo anaerobico per l'abbattimento della concentrazione di micotossine dell'*Alternaria* spp. anche a substrati cerealicoli naturalmente o artificialmente

contaminati e derivanti da processi di prima trasformazione del frumento (sfarinati integrali e frazioni di molitura con diversa granulometria).

I risultati hanno dimostrato l'efficacia del processo di digestione adottato nella riduzione della concentrazione totale delle tre micotossine esaminate (AOH, AME e TeA) nel 71% dei campioni analizzati e compresa tra il 27,7% e il 100,0 % della concentrazione attesa. In particolare, per quanto riguarda l'acido tenuazonico, la riduzione nella fase di post-digestione è risultata del 100%, rispetto alla fase di pre-digestione, a prescindere dal tipo di contaminazione (naturale/artificiale) e dal livello della stessa in pre-digestione.

È stata dimostrata una buona/ottima potenzialità di produzione in biogas con un livello medio di resa in metano pari a $338,6 \pm 22,3 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4/\text{t SV}$ e quindi comparabile con le produzioni medie ottenute dall'impiego di scarti e/o residui vegetali.

Ringraziamenti

Si ringraziano: il prof. Amedeo Pietri dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, Facoltà di Scienze agrarie, alimentari e ambientali, Dipartimento di Scienze animali, della nutrizione e degli alimenti (DIANA) per le analisi delle micotossine; il Dr. Fabrizio Quaranta e la Dr.ssa Francesca Nocente per la disponibilità riguardo ai campioni da analizzare e i Sig.ri Alessandra Arcangeli e Roberto Mortaro per la collaborazione tecnica.

Ringraziamenti

Il lavoro è stato svolto nell'ambito del progetto AGROENER (Energia dall'agricoltura: innovazioni sostenibili per la bioeconomia), finanziamento MiPAAFT D.D. n. 26329 dell'1/04/2016 - <http://agroener.crea.gov.it/>

Bibliografia

1. Italia. Decreto Interministeriale 25 febbraio 2016 - Criteri e norme tecniche generali per la disciplina regionale dell'utilizzazione agronomica degli effluenti di allevamento e delle acque reflue, nonché per la produzione e l'utilizzazione agronomica del digestato. *Gazzetta Ufficiale* n. 90, Supplemento Ordinario n. 9 del 18 aprile 2016.
2. Patriarca A. Alternaria in food products. *Current Opinion in Food Science* 2016;11:1-9.
3. Solfrizzo M. Recent advances on *Alternaria* mycotoxins. *Current Opinion in Food Science* 2017;17:57-61.
4. Rychlik M, Lepper H, Weidner C, Asam S. Risk evaluation of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in foods for adults and infants and subsequent risk management. *Food Control* 2016;68:181-5.
5. Europa. Scientific Opinion on the risks for animal and Public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal* 2011;9(10):2407.
6. Scientific Report – Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. *EFSA Journal* 2016;14(12):4654.
7. UNI/TS 11703:2018. Metodo per la misura della produzione potenziale di metano da digestione anaerobica ad umido - Matrici in alimentazione. Milano: Ente Italiano di Normazione; 2018.
8. SCOOP TASK 3.2.10. *Report of experts participating in Task 3.2.10. Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States.* Brussels: European Commission, Directorate General- Health and Consumer Protection; 2003

9. Müller MEH, Korn U. *Alternaria* mycotoxins in wheat - A 10 years survey in the Northeast of Germany. *Food Control*, 2013;34,191-197.
10. Brera C. Micotossine note ed emergenti, discussione aperta. *Molini d'Italia* 2012;5/6:50-8.
11. Escrivà L, Oueslati S, Font G, Manyes L. *Alternaria* mycotoxins in food and feed: an overview. *Journal of Food Quality* 2017; Article ID 1569748.
12. Gotthardt M, Asam S, Gunkel K, Moghaddam AF, Baumann E, Kietz R, Rychlich M. Quantitation of six *Alternaria* toxins in infant foods applying stable isotope labeled standards. *Frontiers in Microbiol.* 2019;10:109. doi: 10.3389/fmicb.2019.00109.
13. Soldano M, Garuti M. Il valore dei sottoprodotti agricoli e agroindustriali. *Agricoltura* 2014;46-7.
14. De Gelder L, Audenaert K, Willems B, Schelfhout K, De Saeger S, De Boevre M. Processing of mycotoxin contaminated waste streams through anaerobic digestion. *Wast Manage* 2018;71:122-8.
15. Goux X, Bourguet L, Giraud F, Cocco E, Guignard C, Hoffmann L, Delfosse P. Deoxynivalenol concentration decrease during mesophilic anaerobic digestion of wheat flour. In: *Proceedings of 3th International Symposium on Energy from Biomass and Waste. 2010; Venice, Italy.*
16. Giorni P, Pietri A, Bertuzzi T, Soldano M, Piccinini S, Rossi L, Battilani P. Fate of mycotoxins and related fungi in the anaerobic digestion process. *Bioresource Technology* 2014;265, 554-57.
17. Rincón B, Banks CJ, Heaven S. Biochemical methane potential of winter wheat (*Triticum aestivum* L.): influence of growth stage and storage practice. *Bioresource Technology* 2010;101:8179-84.
18. ISO-11734:1995. *Water Quality - Evaluation of the Ultimate Anaerobic Biodegradability of Organic Compounds in Digested Sludge - Method by Measurement of the Biogas Production*. Geneva: International Organization for Standardization; 1995.