

SEDE LEGALE

Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

T +39 06 47836.1

C.F. 97231970589 **P.I.** 08183101008

Report Task 2.2 - "Captive Insects"

campionamenti in allevamento sperimentale per la comparazione delle diete

Nell'ambito del task 2.2 sono state testate tre diverse diete analizzando la composizione chimica e la contaminazione microbiologica delle larve ottenute. È stata inoltre determinata la qualità microbiologica del substrato residuo di ogni dieta.

Le tre diete sono state somministrate alle larve sin dalla schiusa delle uova; i dati relativi a contaminazione microbiologica e composizione chimica sono stati registrati per poter comparare in maniera più completa le tre diete.

Diete testate

Benchmark : 95% crusca, 5% lievito

Trebbie : trebbie di birra

Razione 3 : 45% pane secco triturato, 5% lievito, 50% crusca

dieta	proteine %s.s.	grassi %s.s.	estrattivi inazotati %s.s.	ceneri %s.s.	fibre %s.s.	Umidità %t.q.
benchmark	15,3	2,8	70,7	6,0	5,2	7,8
trebbie	25,4	11,9	39,3	4,5	18,9	75,6
razione 3	15,4	4,6	71,4	4,2	4,4	17,8

Tabella 1. Composizione delle tre diete testate.

Per valutare l'influenza delle diete sulla composizione della flora microbica, sia le larve che il substrato residuo sono stati campionati per quantificare alcune classi di microrganismi usati come indicatori. Nello specifico sono stati quantificati i mesofili, gli enterobatteri, i lieviti, le muffe e il *Bacillus cereus* presunto. Nella dicitura *Bacillus cereus* presunto, oltre alla specie *Bacillus cereus*

sensu stricto sono incluse le specie ad esso strettamente correlate, come *B. thurigiensis* e *B. weheinstephanensi*, che il metodo analitico non riesce a distinguere.

Le cariche microbiche sono state espresse in CFU/g e successivamente trasformate come $\log(\text{CFU/g})$ per essere facilmente comparabili.

I campioni sono stati prelevati dall'allevamento sperimentale di Biological Care, campionando larve a tre mesi di età e il relativo substrato residuo con tre prelievi eseguiti a distanza di una settimana l'uno dall'altro, per valutare anche l'eventuale variabilità tra lotti.

Contaminazione del substrato residuo

Il substrato residuo nelle tre diverse prove era costituito prevalentemente da *frass*, ovvero dalle feci delle larve, segno che il substrato era stato interamente consumato. Nelle tabelle di seguito sono riportati i dati microbiologici dei diversi substrati residui.

microrganismi	Dieta		
	benchmark	trebbie	Razione 3
<i>Bacillus cereus</i> presunto	3,04 ($\pm 0,42$)	5,15 ($\pm 1,26$)	2,93 ($\pm 0,89$)
Enterobatteri	6,62 ($\pm 0,33$)	7,05 ($\pm 0,1$)	6,53 ($\pm 0,13$)
Lieviti	4,1 ($\pm 0,96$)	5,55 ($\pm 0,64$)	3,51 ($\pm 0,97$)
Muffe	4,71 ($\pm 0,54$)	6,48 ($\pm 0,28$)	4,7 ($\pm 0,46$)
Mesofili a 30°C	7,82 ($\pm 0,22$)	8,72 ($\pm 0,38$)	7,86 ($\pm 0,12$)

Tabella 2. Valori di contaminazione microbica medi del substrato residuo. Ogni valore è la media dei tre lotti campionati nelle tre diverse settimane, espresso come $\log(\text{CFU/g})$, con relativa deviazione standard.

microrganismi	Week 1 – frass		
	benchmark	trebbie	razione 3
<i>Bacillus cereus</i> presunto	3,6	6,79	3,28
Enterobatteri	6,41	6,92	6,36
Lieviti	2,78	4,65	2,6
Muffe	4	6,45	5,18
Mesofili a 30°C	7,76	9,26	7,72

Tabella 3. Valori di contaminazione microbica del substrato residuo relativi al primo campionamento (week 1), espressi come log(CFU/g).

microrganismi	Week 2 – frass		
	benchmark	trebbie	razione 3
<i>Bacillus cereus</i> presunto	2,9	4,91	3,79
Enterobatteri	7,08	7,04	6,54
Lieviti	5,04	6,11	3,08
Muffe	5,32	6,83	4,08
Mesofili a 30°C	8,11	8,51	8

Tabella 4. Valori di contaminazione microbica del substrato residuo relativi al secondo campionamento (week 2), espressi come log(CFU/g).

microrganismi	Week 3 – frass		
	benchmark	trebbie	razione 3
<i>Bacillus cereus</i> presunto	2,6	3,73	1,71
Enterobatteri	6,36	7,18	6,69
Lieviti	4,49	5,88	4,86
Muffe	4,81	6,15	4,86
Mesofili a 30°C	7,58	8,4	7,85

Tabella 5. Valori di contaminazione microbica del substrato residuo relativi al terzo campionamento (week 3), espressi come log(CFU/g).

Le cariche microbiche identificate nel substrato residuo risultano comparabili tra le tre diete per quanto riguarda i valori di enterobatteri e lieviti. Nel caso di *B. cereus* presunto si può notare una differenza tra la razione 3 e la razione benchmark (p-value <0.1). Le differenze con la dieta a base di trebbie non risultano invece significative.

La dieta a base di trebbie presenta invece valori significativamente più alti rispetto alle altre due per quanto riguarda la contaminazione di muffe (p-value <0.1) e di mesofili (p-value <0.05) (Figura 1).

La maggior quantità di muffe rilevata nella dieta a base di trebbie può essere dovuta all'iniziale elevata umidità delle trebbie ed al loro processo produttivo.

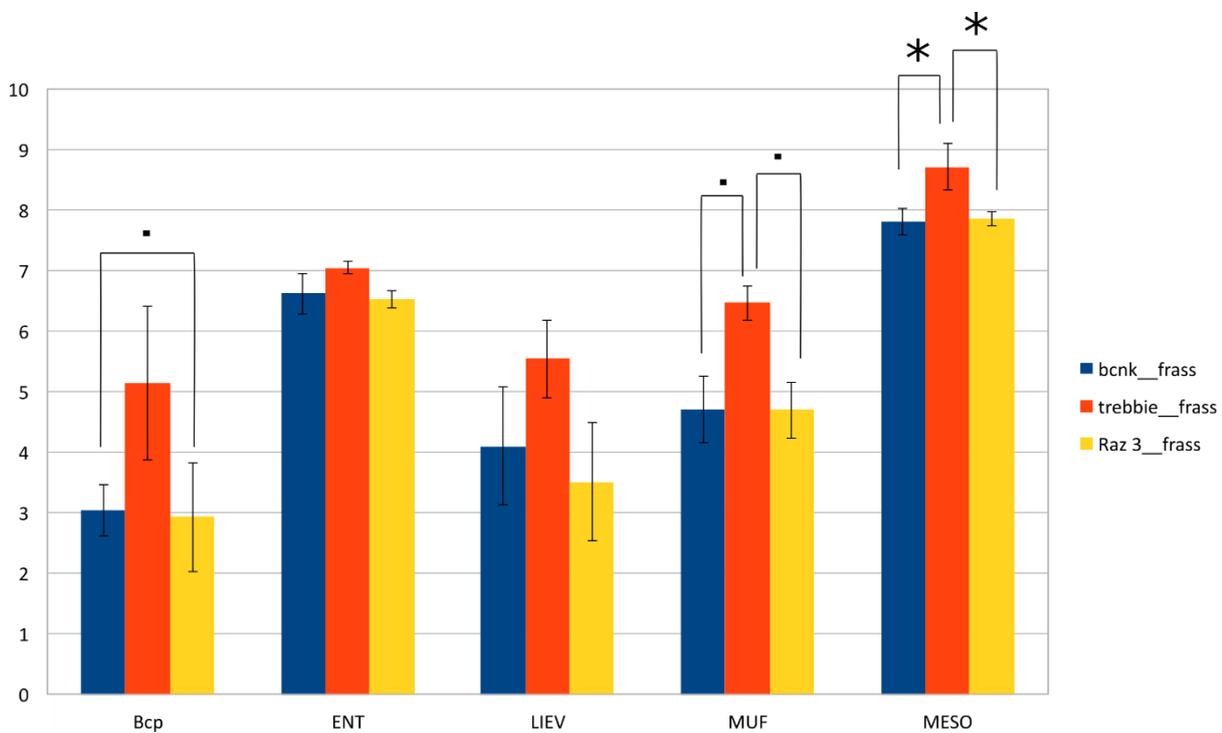


Figura 1. Nel grafico a barre sono riportati i valori medi delle tre settimane campionate con la relativa deviazione standard. Sono evidenziate le differenze statisticamente significative: "." p-value < 0.1, "*" p-value < 0.05.

Contaminazione delle larve

Le larve sono state campionate vive al terzo mese d'età e lasciate spurgare per 24h prima di essere analizzate.

microrganismi	dieta		
	benchmark	trebbie	Razione 3
<i>Bacillus cereus</i> presunto	2,2 ($\pm 0,28$)	4,19 ($\pm 0,7$)	3,14 ($\pm 1,6$)
Enterobatteri	7,71 ($\pm 0,25$)	7,73 ($\pm 0,07$)	7,39 ($\pm 0,61$)
Lieviti	3,4 ($\pm 0,76$)	5,07 ($\pm 0,32$)	2,64 ($\pm 0,53$)
Muffe	3,96 ($\pm 0,56$)	6,07 ($\pm 0,19$)	3,56 ($\pm 1,31$)
Mesofili a 30°C	8,18 ($\pm 0,27$)	8,4 ($\pm 0,21$)	8,13 ($\pm 0,31$)

Tabella 6. Valori di contaminazione microbica medi delle larve. Ogni valore è la media dei tre lotti campionati nelle tre diverse settimane, espresso come log(CFU/g), con relativa deviazione standard.

microrganismi	Week 1 – larve		
	benchmark	trebbie	Razione 3
<i>Bacillus cereus</i> presunto	2	5,18	5,4
Enterobatteri	7,89	7,63	8,2
Lieviti	2,7	4,63	2
Muffe	4,71	6,18	5,18
Mesofili a 30°C	7,89	8,69	8,54

Tabella 7. Valori di contaminazione microbica delle larve relativi al primo campionamento (week 1), espressi come log(CFU/g).

microorganismi	Week 2 – larve		
	benchmark	trebbie	Razione 3
<i>Bacillus cereus</i> presunto	2	3,74	2
Enterobatteri	7,36	7,79	6,73
Lieviti	3,04	5,4	2,6
Muffe	3,8	6,23	3,53
Mesofili a 30°C	8,11	8,34	7,81

Tabella 8. Valori di contaminazione microbica delle larve relativi al secondo campionamento (week 2), espressi come log(CFU/g).

microorganismi	Week 3 – larve		
	benchmark	trebbie	Razione 3
<i>Bacillus cereus</i> presunto	2,6	3,65	2
Enterobatteri	7,88	7,76	7,23
Lieviti	4,46	5,18	3,3
Muffe	3,36	5,81	1,96
Mesofili a 30°C	8,54	8,18	8,04

Tabella 9. Valori di contaminazione microbica delle larve relativi al terzo campionamento (week 3), espressi come log(CFU/g).

Anche nelle larve si può osservare come le cariche delle muffe siano più alte nelle larve cresciute sulle trebbie (p-value <0.1 tra benchmark e trebbie e p-value <0.05 tra trebbie e razione 3). Inoltre, anche le cariche dei lieviti risultano più elevate per le larve cresciute su trebbie (p-value <0.1). I valori sono invece comparabili tra le tre diete per mesofili, enterobatteri e *B. cereus* presunto (Figura 2).

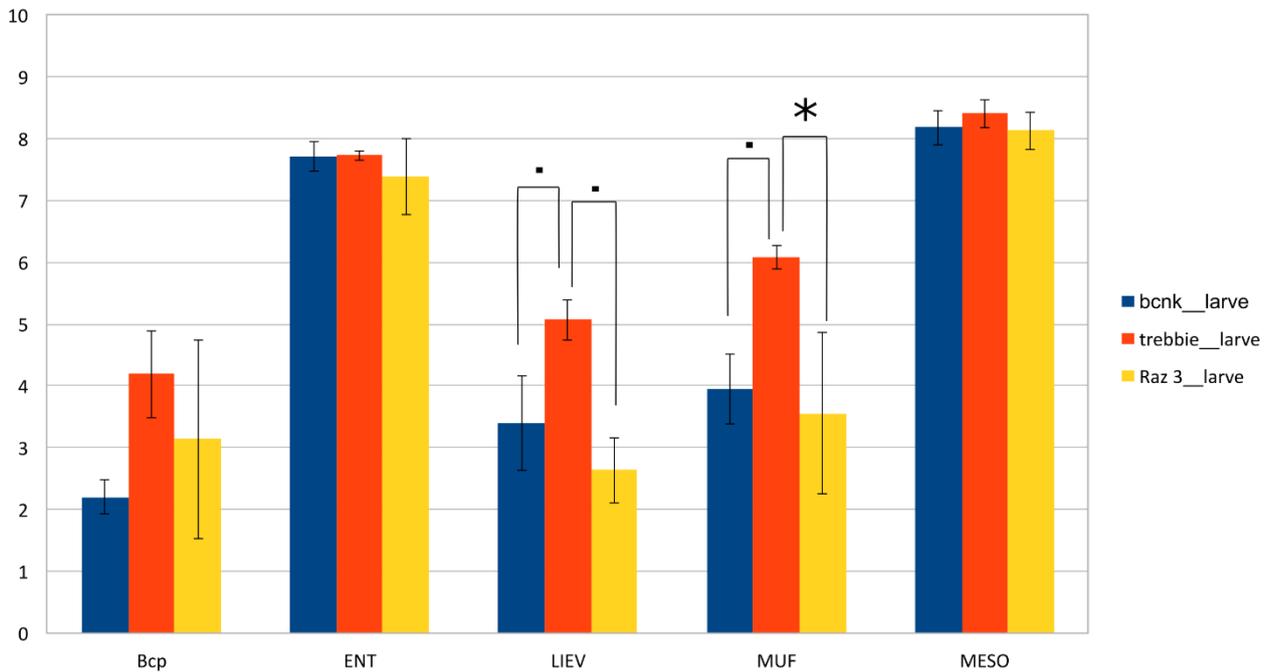


Figura 2. Nel grafico a barre sono riportati i valori medi delle tre settimane campionate con la relativa deviazione standard. Sono evidenziate le differenze statisticamente significative: "." p-value < 0.1, "*" p-value < 0.05.

Correlazione tra contaminazione delle larve e substrato residuo

In generale si osserva una buona correlazione (Pearson = 0.90) tra le cariche microbiche rilevate nel substrato residuo e le cariche microbiche delle larve corrispondenti (figura 3). Questo può essere dovuto all'elevata quantità di feci presenti nel substrato residuo che inevitabilmente riflettono la composizione microbica intestinale delle larve e non più quella del substrato utilizzato. La composizione della flora batterica verrà ulteriormente caratterizzata nella dieta scelta come ottimale per l'allevamento.

Comparando le cariche nelle larve e nei rispettivi substrati si può anche notare che *B. cereus* presunto, lieviti e muffe sono solitamente più alti nel substrato residuo. Un trend opposto si nota invece per mesofili ed enterobatteri che risultano più alti nelle larve.

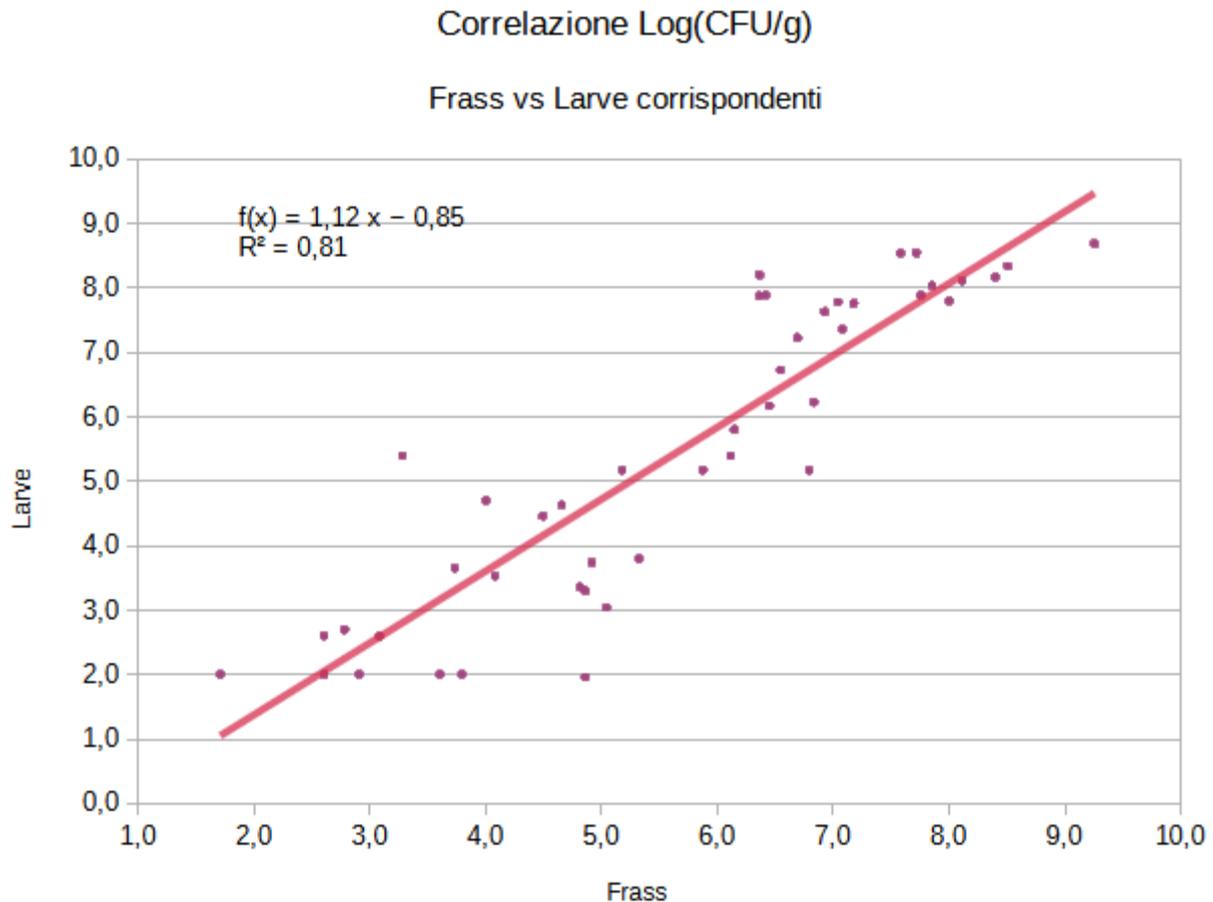


Figura 3. correlazione tra le cariche microbiche delle larve e dei corrispondenti substrati residui.

Analisi composizionale

Le larve cresciute sulle tre diete sono state analizzate per determinarne la composizione in termini di proteine, grassi, umidità, ceneri e fibre. Tutti i dati sono riportati nella tabella 3 e nella figura 4.

Utilizzando il dato dell'umidità tutti gli altri valori sono stati corretti in modo da essere espressi in percentuale sul peso secco. Il laboratorio nella stima delle proteine ha utilizzato un fattore di conversione di 6,25. Tuttavia, il fattore di conversione più corretto per *Tenebrio molitor* sarebbe di 4,76 come suggerito in letteratura (Janssen et al., 2017): i valori potrebbero quindi dover essere corretti al ribasso.

La prima cosa che si può notare è la variabilità dei valori ottenuti nelle diverse settimane, in particolare per quanto riguarda l'umidità nella dieta benchmark e nella razione 3. Nella razione 3 si segnala un'elevata deviazione standard tra le tre settimane in particolare per i valori dei grassi, che oscillano tra il 10 e il 22% e le proteine, che oscillano tra il 51 e il 79%. Queste grosse variazioni potrebbero essere dovute alla non uniformità della composizione del pane, che costituiva il 45% della razione 3. L'unica differenza significativa dal punto di vista statistico è quella nel contenuto di grassi che risulta più elevato nelle larve alimentate con razione 3 rispetto a quelle alimentate su trebbie.

Le variazioni osservate nell'umidità potrebbero invece essere dovute a variazioni ambientali all'interno dell'allevamento sperimentale e non risultano significative.

Benchmark					
componente	week 1	week 2	week 3	media	dev. St.
fibra	13,01	12,08	11,61	12,23	0,58
proteine	67,55	77,15	75,98	73,56	4,28
grassi totali	10,63	10,14	8,79	9,85	0,78
umidità	73,10	79,30	77,60	76,67	2,62
ceneri	5,13	6,81	6,43	6,12	0,72

Tabella 10. Composizione delle larve allevate su dieta benchmark. Tutti i dati sono espressi come percentuale del peso secco ad eccezione dell'umidità.

Trebbie					
componente	week 1	week 2	week 3	media	dev. St.
fibra	11,71	12,62	9,42	11,25	1,35
proteine	71,76	75,23	72,38	73,12	1,51
grassi totali	3,51	9,86	8,52	7,30	2,73
umidità	77,80	78,60	77,70	78,03	0,40
ceneri	6,08	6,17	5,74	6,00	0,19

Tabella 11. Composizione delle larve allevate su trebbie. Tutti i dati sono espressi come percentuale del peso secco ad eccezione dell'umidità.

Razione 3					
componente	week 1	week 2	week 3	media	dev. St.
fibra	14,92	12,00	9,18	12,03	2,34
proteine	51,75	66,72	79,81	66,09	11,46
grassi totali	22,46	14,96	10,72	16,05	4,85
umidità	61,80	75,00	79,30	72,03	7,45
ceneri	3,48	5,40	6,91	5,26	1,40

Tabella 12. Composizione delle larve allevate su razione 3. Tutti i dati sono espressi come percentuale del peso secco ad eccezione dell'umidità.

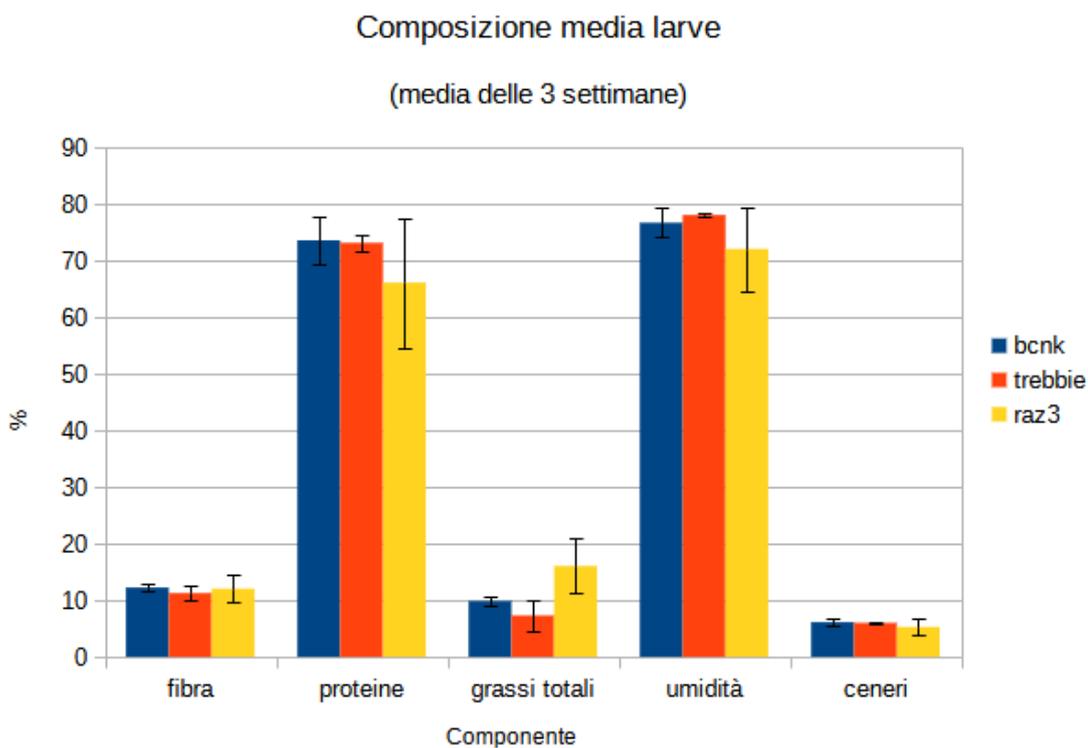


Figura 4. Composizione delle larve, media delle tre settimane di campionamento con relativa deviazione standard.

Performance di allevamento

Gli insetti cresciuti sulle tre diete testate sono poi stati valutati anche sulla base delle performance di allevamento andando a rilevare i pesi complessivi della loro biomassa, il peso dell'alimento fornito e, soprattutto, la capacità di conversione del substrato alimentare in massa corporea (calcolata come il rapporto tra la quantità di alimento fornito in Kg ed il peso dell'insetto – sempre in Kg – da cui si capisce come ad un indice più basso corrisponda una migliore efficienza nutrizionale; Tabella 13).

TESI	Valori medi a 3 mesi		
	Peso alimento (Kg)	Peso larve (g)	Conversione
Controllo	4,007	1238,667	3,235
Trebbie	4,454	1120,000	3,976
Razione 3	4,488	1862,000	2,410

Tabella 13. Dati a tre mesi sulla quantità di alimento fornito, il peso di larve prodotte e la relativa efficienza di conversione in base al substrato alimentare. I numeri riportati rappresentano i valori medi di quattro repliche.

I valori riportati in Tabella 13 sono stati rilevati ad una distanza di tempo pari a tre mesi ed evidenziano come la Razione 3 abbia una resa di conversione migliore rispetto alle altre tesi prese in esame. Il controllo ha evidenziato una resa di conversione intermedia mentre l'alimentazione basata su trebbie ha dato l'indice di conversione peggiore (valore numericamente più elevato): questo vuol dire che per ottenere la stessa quantità in Kg di insetti servono quantitativi maggiori di alimento.

Punti critici dell'attività di allevamento

Sono state riscontrate diverse problematiche durante l'avvio dell'allevamento.

Il primo problema è stato la presenza di umidità in alcune cassette. Questa era dovuta ad un insufficiente ricircolo dell'aria che se non opportunamente dimensionato alla biomassa in allevamento può causare condensa sulle pareti delle cassette con il relativo rischio microbiologico associato ad acqua libera. Durante la sperimentazione si sono individuati i parametri ottimali per garantire il mantenimento di temperature adeguate e al contempo un buon ricircolo d'aria che eviti la formazione di condensa.

Un altro punto critico è risultato essere la presenza di altri insetti nell'allevamento, in particolare *Plodia interpunctella* e *Tribolium spp*, probabilmente provenienti dall'esterno o dalla crusca utilizzata.

La presenza di *P. interpunctella* rappresenta un rischio perché oltre a competere per il substrato e rappresentare una fonte di contaminazione microbica, complica la fase di separazione delle larve di *T. molitor* dalla crusca. A causa delle ragnatele prodotte dalle sue larve, la crusca forma degli agglomerati, rischiando che una parte della crusca stessa o di larve di *P. interpunctella* venga processata con le larve di *T. molitor*, inquinando il prodotto finito.

Nel caso di contaminazione derivante dall'ambiente esterno, un opportuno isolamento dell'ambiente di allevamento o l'utilizzo di trappole può prevenire il problema. Una piccola stanza che separi l'allevamento dall'esterno potrebbe aiutare a filtrare eventuali insetti infestanti, come anche la presenza di una leggera pressione positiva all'interno dell'allevamento. Qualora si trovino insetti nell'allevamento le cassette con presenza di *P. interpunctella* o altri infestanti, come *Tribolium spp* vanno isolate o scartate appena le si identifica.

Anche la dieta stessa può contenere insetti nel caso in cui i substrati fossero originariamente infestati. Mentre è improbabile che il pane sottoposto a cottura possa contenere uova di insetti vitali, la crusca stoccata potrebbe essere la probabile fonte di contaminazione, per questo andrebbe periodicamente controllata prima della preparazione della dieta

Infine, la dieta stessa, una volta preparata andrebbe stoccata in ambienti separati dall'allevamento e possibilmente a temperature più basse.

Eventuale macinatura della dieta o della crusca potrebbe evitare eliminare eventuali insetti presenti ma risulterebbe economicamente poco fattibile.

Occasionalmente si sono anche osservati fenomeni di mortalità delle pupe destinate alla riproduzione, probabilmente dovuti a batteriosi non meglio identificate.

Punti critici legati al rischio microbiologico e misure preventive per mitigarlo

La presenza di microrganismi è fisiologica in qualsiasi allevamento ed è normale che *T. molitor*, come tutti gli esseri viventi possieda un suo microbioma, non necessariamente dannoso per l'uomo. Tuttavia, negli allevamenti, date le alte densità e data la modalità di allevamento che prevede un parziale accumulo delle feci (*frass*) nelle cassette di allevamento, c'è la possibilità che i microrganismi pongano dei rischi per la salute dell'insetto e dell'operatore.

Questo può avvenire per la crescita di microrganismi potenzialmente dannosi che potrebbero essere naturalmente presenti negli insetti o introdotti accidentalmente nell'allevamento.

Le principali fonti di microrganismi estranei al microbioma del *T. molitor* potrebbero venire da:

1) **substrato contaminato**

Può succedere che i substrati utilizzati nella dieta, specie la crusca che a differenza del pane non è cotta, vengano colonizzati da microorganismi. Questo può avvenire a causa di scorrette condizioni di stoccaggio o a causa di infestazioni da parte di altri insetti.

La principale misura preventiva consiste nel testare periodicamente i substrati, a campione e nel corretto stoccaggio di substrati e diete in ambienti non troppo caldi o umidi e lontani da possibili insetti o altri animali. Analisi periodiche sui substrati utilizzati per la formulazione delle diete potrebbero aiutare ad identificare lotti contaminati.

2) **Attrezzature contaminate**

Le attrezzature usate in allevamento (setacci manuali e automatici, sessole, cassette, ecc.), entrando in contatto con tutte le larve di diversi batch, possono contaminarsi con diversi microrganismi e rappresentare una causa di cross-contaminazione, particolarmente pericolosa in caso di batteriosi o particolari patologie del *T. molitor* che potrebbero diffondersi molto velocemente.

L'unica misura preventiva sta nella sanificazione degli strumenti ogni qualvolta si passi da un batch all'altro di allevamento o almeno programmata periodicamente (una volta al giorno o una a settimana).

3) **Operatore**

L'operatore rappresenta sicuramente una fonte di contaminazione microbica, potendo rappresentare un rischio soprattutto per determinate classi di batteri come i coliformi.

In questo caso sia per tutelare gli animali che l'operatore si dovrebbe sempre lavare le mani prima di entrare in contatto con gli insetti o ancora meglio indossare dei guanti sterili.

Per la prevenzione dell'operatore si consiglia inoltre l'uso di mascherine e occhiali soprattutto durante le fasi di setacciatura in cui le polveri del substrato e le cuticole vengono disperse in aria. Un'ulteriore misura contenitiva atta a minimizzare la dispersione di eventuali microrganismi nocivi nell'ambiente e a tutelare l'operatore, consiste nell'utilizzo di cappe aspiranti durante la fase di setacciatura.

4) **altri animali**

L'entrata di insetti esterni all'allevamento oltre rendere difficoltosa la separazione delle larve dal substrato rappresenta anche un rischio microbiologico e sanitario.

Inoltre, qualora gli insetti indesiderati finissero assieme alle larve di *T. molitor*, si rischierebbe di inquinare il prodotto finale.

Altri animali che possono rappresentare un rischio microbiologico sono rappresentati da roditori la cui presenza andrebbe monitorata.

Le misure preventive sono rappresentate dal corretto isolamento dell'allevamento dall'ambiente esterno e dal posizionamento di trappole per catturare eventuali insetti indesiderati (es: *P. interpunctella*) e roditori. In caso si rilevi la presenza di altri insetti in determinate cassette si consiglia l'eliminazione del contenuto e la sanificazione della cassetta.

5) Frass

Il frass rappresenta lo scarto dell'allevamento, ed è composto dalle feci, le esuvie, ed eventuali larve morte. Si presenta come una polvere di diverse granulometrie facilmente disperdibile. Come osservato durante la sperimentazione, le cariche microbiche presenti nel frass sono correlate a quelle delle larve e solitamente sono più alte. Data la carica microbiologica e la facilità di dispersione nell'ambiente il frass rappresenta un rischio microbiologico, sia per le possibili cross-contaminazioni dei batch, sia per l'esposizione dell'operatore alle polveri che potrebbero essere inalate. Il frass può disperdersi in ambiente durante le operazioni di setacciatura e svuotamento delle cassette. Per questo si consiglia come misura preventiva, di effettuare queste operazioni in un ambiente separato dalla zona dell'allevamento che ospita gli insetti e possibilmente aspirando le polveri con una cappa, prevenendo anche il contatto delle polveri con naso, occhi e bocca dell'operatore.

Il frass secondo l'attuale normativa europea (EU regulations No. 2021/1925) può essere utilizzato come ammendante/fertilizzante previo trattamento termico che ne abbatta la carica microbica.

Conclusioni

Le tre diete testate si differenziano sia per la carica microbiologica che per la composizione finale della larva. Le larve alimentate su razione 3 presentano un contenuto di grassi più elevato rispetto alle larve alimentate su trebbie. I contenuti proteici delle larve cresciute su razione 3 presentano inoltre un'elevata deviazione standard.

La contaminazione microbica delle larve cresciute su trebbie risulta significativamente più alta per lieviti e muffe. Anche i substrati residui ottenuti dalla dieta a base di trebbie risultano più contaminati mostrando cariche più elevate rispetto alle altre due diete per quanto riguarda mesofili e muffe.

La razione 3 mostra cariche microbiologiche comparabili alla dieta benchmark, sebbene per quanto riguarda la composizione questa sia caratterizzata da una certa variabilità nel tempo. La variabilità identificata nella composizione delle larve per la razione 3 potrebbe riflettere la variabilità della

relativa dieta e andrebbe considerata nel caso si opti per questa dieta come quella ottimale su cui basare l'allevamento.

Comparando le performance di allevamento risulta evidente che la razione 3 a parità di tempo consente di ottenere più biomassa larvale rispetto alla dieta a base di trebbie e a quella di controllo. Al contempo produce meno frass indicando un miglior utilizzo della dieta.

Laboratorio di Gelsibachicoltura di Padova
Centro Agricoltura e Ambiente

Silvia Cappelletti