



# **UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**

*DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE*

*ALIMENTARI E AMBIENTALI*

*Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari*

***Efficacia del processo di tindalizzazione per la riduzione  
della carica microbica di insetti edibili***

***Efficacy of tyndallization in reducing the microbial load  
of edible insects***

***Tesi di laurea di:  
Jacopo Franciotti***

***Relatore:  
Prof.ssa Lucia Aquilanti***

***Correlatore:  
Dott.ssa Vesna Milanović***

***Sessione estiva***

***Anno Accademico 2020-2021***

# SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	1
ELENCO DELLE FIGURE.....	2
1.INTRODUZIONE.....	3
1.1 Gli insetti edibili .....	3
1.1.1 <i>Acheta domesticus</i> .....	5
1.1.2 <i>Tenebrio molitor</i> .....	5
1.2 Insetti edibili e sicurezza alimentare .....	6
1.3 Batteri sporigeni negli insetti edibili .....	8
1.4 Trattamenti per la riduzione della carica microbica di insetti edibili.....	9
2. SCOPO DELLA TESI .....	11
3. MATERIALI E METODI.....	12
3.1 Campionamento .....	12
3.2 Tindalizzazione .....	12
3.3 Conte vitali di batteri mesofili totali e sporigeni.....	14
3.4 Isolamento.....	15
3.5 Crioconservazione.....	16
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	17
4.1 Conte vitali di batteri mesofili totali e sporigeni.....	17
4.2 Isolamento di batteri mesofili totali.....	19
5. CONCLUSIONI .....	24
6. BIBLIOGRAFIA.....	25

## ELENCO DELLE TABELLE

**Tabella 1** - Elenco dei campioni oggetto di analisi

**Tabella 2** - Composizione del terreno di coltura Plate Count Agar (PCA)

**Tabella 3** - Composizione del terreno di coltura Nutrient Broth

**Tabella 4** - Risultati delle conte vitali di batteri mesofili totali e sporigeni aerobi eseguite sui campioni freschi (F) e durante il processo di tinalizzazione; 1H dopo prima fase di trattamento termico e 2H, dopo seconda fase di trattamento termico. I risultati sono espressi in log UFC/g  $\pm$  deviazione standard.

**Tabella 5** - Risultati delle conte vitali di batteri mesofili totali e sporigeni anaerobi eseguite sui campioni freschi (F) e durante il processo di tinalizzazione; 1H dopo prima fase di trattamento termico e 2H, dopo seconda fase di trattamento termico. I risultati sono espressi in log UFC/g  $\pm$  deviazione standard.

**Tabella 6** – Elenco degli isolati aerobi ottenuti da campioni freschi di *T. molitor* (F) e durante il processo di tinalizzazione; 1H dopo prima fase di trattamento termico; 2H, dopo seconda fase di trattamento termico.

**Tabella 7** - Elenco degli isolati anaerobi ottenuti da campioni freschi di *T. molitor* (F) e durante il processo di tinalizzazione; 1H dopo prima fase di trattamento termico; 2H, dopo seconda fase di trattamento termico.

**Tabella 8** - Elenco degli isolati aerobi ottenuti da campioni freschi di *A. domesticus* (F) e durante il processo di tinalizzazione; 1H dopo prima fase di trattamento termico; 2H, dopo seconda fase di trattamento termico.

**Tabella 9** - Elenco degli isolati anaerobi ottenuti da campioni freschi di *A. domesticus* (F) e durante il processo di tinalizzazione; 1H dopo prima fase di trattamento termico; 2H, dopo seconda fase di trattamento termico.

## ELENCO DELLE FIGURE

**Figura 1** – Lo schema del processo di tindalizzazione di campioni di *Tenebrio molitor* (A) e *Acheta domestica* (B)

**Figura 2** – Procedura di conta vitale utilizzando il metodo di piastramento in superficie

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 Insetti edibili

La FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nation*) stima che entro il 2050 la popolazione mondiale raggiungerà i 9 miliardi di persone. Tale aumento richiederà un netto incremento della richiesta di alimenti a base di proteine animali come carne o pesce dovuto principalmente alla forte richiesta dei paesi emergenti, dove l'incremento medio stimato del consumo di carne è pari al 113%, rispetto alle nazioni sviluppate dove invece si assesta al 27% (Alexandratos et al., 2012). Ciò implicherà un aumento nelle produzioni che purtroppo non può essere sostenuto a causa di rilevanti ripercussioni in ambito ecologico, soprattutto legate all'utilizzo di risorse non rinnovabili quali l'acqua e il suolo ed altri fattori ambientali connessi agli allevamenti convenzionali quali emissioni di gas a effetto serra (CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>), inquinamento provocato dai liquami prodotti ed utilizzo di antibiotici con conseguente aumento del fenomeno di antibiotico-resistenza (van Huis et al., 2013).

Grazie alle loro caratteristiche nutrizionali ed il loro scarso impatto ambientale, gli insetti edibili potrebbero essere considerati uno dei principali alimenti candidati a sostituire in maniera efficace gli alimenti a base di carne o pesce. Dal punto di vista della sostenibilità ambientale, l'impatto che gli allevamenti di insetti hanno sull'ambiente è di gran lunga minore, in quanto gli allevamenti di carne sono responsabili del 18% delle emissioni di gas serra globali e di un elevato consumo d'acqua. Per produrre 1 kg di proteine animali sono necessari volumi di acqua dalle 5 alle 20 volte maggiori di quelli necessari per la produzione di proteine vegetali (Chapagain and Hoekstra, 2003). L'allevamento di insetti edibili comporta diversi vantaggi fra i quali la riduzione delle emissioni di gas serra, minore consumo d'acqua e minore necessità di spazio destinato all'allevamento, produzione e trasformazione rispetto agli allevamenti zootecnici convenzionali. Ulteriori vantaggi sono rappresentati dall'elevata capacità degli insetti di utilizzare scarti dell'industria agroalimentare come substrati di crescita e di convertirli in materia organica.

Gli insetti edibili presentano interessanti caratteristiche dal punto di vista nutrizionale anche se risulta difficile fare una stima generale della loro composizione. Infatti, molti fattori fra i quali habitat, dieta e stadio di sviluppo nella quale vengono consumati e anche il processo di lavorazione a cui sono andati incontro (essiccamento, liofilizzazione e cottura) influenzano la loro composizione. Tuttavia, ponendo un quadro più generale si è stimato che gli insetti edibili sono caratterizzati da un contenuto energetico comparabile alla carne ad eccezione delle carni suine a causa del contenuto di grassi più

elevato. Gli insetti edibili sono inoltre ricchi di acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi, quali l'acido linoleico e  $\alpha$ -linoleico, che sono anche considerati essenziali al sano sviluppo dei neonati e bambini (Womeni et al., 2009). Inoltre, gli insetti edibili si presentano anche come un fonte di micronutrienti (ferro, magnesio, rame, zinco, selenio, manganese) e vitamine, in particolare vitamine B1, B2, B6, D, E, K e C (Mlcek et al., 2014; Rumpold e Schütler, 2013). Gli insetti edibili risultano soddisfacenti anche sotto il profilo proteico, garantendo anche la giusta quantità di amminoacidi essenziali (fenilalanina, valina, treonina, triptofano, isoleucina, metionina, leucina e lisina) per l'alimentazione umana (Rumpold e Schütler, 2013). Riguardo il contenuto di fibre, gli insetti ne presentano quantità significative, dalle fibre grezze alle fibre acido detersive e neutro detersive. La forma più comunemente presente è la chitina; essa è un componente dell'esoscheletro degli insetti, rappresentato dal 5 al 20% del peso secco dell'insetto. Spesso la si trova complessata ad altri composti come le proteine, lipidi e piccole quantità di minerali (Baker et al., 1998; Finke, 2002).

Secondo la FAO, gli insetti caratterizzano la dieta di circa 2,5 miliardi di persone al mondo, particolarmente in Asia, Africa e Sud America dove gli insetti maggiormente consumati sono scarafaggi, bruchi, api, vespe, formiche, cavallette, grilli, cicale, cicaline, cocciniglie, cimici, termiti, libellule e mosche (van Huis et al., 2013). Gli insetti edibili possono essere consumati freschi, trattati con processi come frittura, bollitura, essiccazione e arrostitimento, trasformati sotto forma di farine o paste oppure possono essere utilizzati per l'estrazione di proteine, lipidi o fibre (Van Huis et al., 2013). L'EFSA (European Food Safety Authority) ha pubblicato una lista di specie di insetto dove troviamo *Musca domestica*, *Hermetia illucens*, *Tenebrio molitor*, *Zophobas atratus*, *Alphitobus diaperinus*, *Galleria mellonella*, *Achroia grisella*, *Bombyx mori*, *Acheta domesticus*, *Gryllobates sigillatus*, *Locusta migratoria migratorioides* e *Schistocerca americana*, da poter usare nell'alimentazione umana e animale (EFSA, 2015).

Tuttavia, in Europa il consumo di insetti, anche chiamato entomofagia, risente di una percezione negativa da parte dei consumatori poiché genera disgusto e viene vista come abitudine primitiva (Gere et al., 2017). In uno studio recente condotto da Belleggia et al. (2019) è stata valutata la propensione al consumo di insetti o alimenti a base di insetti di 222 potenziali consumatori italiani. A tale scopo sono stati utilizzati insetti edibili reperibili in commercio (cavallette, camole della farina e grilli) e prodotti da forno sperimentali (pane, *waffle* e *muffin*) con insetti o loro trasformati. Gli insetti commerciali hanno incuriosito l'80% degli intervistati. Il 25% degli intervistati si è dichiarato favorevole all'acquisto degli alimenti contenenti insetti edibili interi. Dai dati è emersa una prevalente neofobia alimentare nelle femmine, che hanno espresso una sensazione di disgusto nel 27% dei casi.

Il 45% degli intervistati ha evidenziato una sorprendente propensione al consumo di alimenti contenenti farine di insetto fra i quali il pane con grillo polverizzato che ha ottenuto il 29% delle preferenze. Gli autori hanno riportato la necessità di formulare preparazioni alimentari nelle quali le caratteristiche sensoriali e nutrizionali risultino bilanciate al fine di sfruttare al meglio le numerose potenzialità degli insetti edibili.

### **1.1.1 *Acheta domestica***

Grillo domestico (*A. domestica*) appartiene all'ordine degli Ortoteri (Orthoptera), sottordine Esinfera, famiglia Gryllidae. L'ordine è caratterizzato da specie terrestri di varie dimensioni con forme attere, microattere e alate. Il capo è ipognato o metagnato con antenne di varia forma e lunghezza; l'apparato boccale è di tipo masticatorio; le ali anteriori sono sclerificate e quelle posteriori sono membranose. Le zampe posteriori sono atte al salto e presentano femori molto sviluppati. L'addome si presenta composto in 10 articoli. Gli adulti possiedono organi stridulanti e timpani uditivi molto sviluppati. In particolare, le forme adulte di *A. domestica* si presentano di colore grigio giallastro con macchie brune e dimensioni variabili dai 12-20 mm di lunghezza; la femmina è distinta dal maschio in quanto provvista di ovopositore. La specie è cosmopolita, originaria dei climi caldi. L'insetto è lucifugo e vive preferibilmente in ambienti con elevati livelli di umidità, per questo è spesso rinvenuto in abitazioni di campagna o all'interno di magazzini. L'alimentazione è costituita da detriti e rifiuti alimentari, nonché di farinacei (Pollini, 2002).

Il contenuto di proteine e lipidi presente nel comune grillo domestico sono rispettivamente 20-25 g e 4-7 g per 100 g di peso fresco. Questi valori sono paragonabili a quelli di carni convenzionali come la carne di manzo o pollo (Kulma et al. 2019). Per quanto riguarda la composizione grassa, il grillo domestico contiene 29-31 % di acidi grassi polinsaturi. Inoltre, grazie alla sua composizione il grillo domestico può essere considerato una preziosa fonte di vitamine (Rumpold e Schlüter, 2013). Parlando di efficienza di produzione, sono necessari 2,1 kg di mangime essiccato per produrre 1 kg di prodotto commestibile.

### **1.1.2 *Tenebrio molitor***

Il *T. molitor* o la più comunemente nota "larva di tarma della farina", è un coleottero appartenente alla famiglia dei Tenebrionidi. Il suo habitat naturale prevede climi secchi e temperature comprese tra i 23 e i 26 C°. Sebbene la sua dieta in stato larvale sia onnivora essa predilige prodotti a base di

crusca, cereali o resti di cariossidi, verdure e carne. Al livello nutrizionale le larve di *T. molitor* rappresentano un'ottima fonte di proteine, acidi grassi polinsaturi e amminoacidi essenziali.

In quanto le larve di *T. molitor* sono comunemente utilizzate senza una preliminare eviscerazione, il loro microbiota intestinale viene inevitabilmente a contatto con il microbiota del tratto gastro-intestinale dei consumatori, rappresentando un potenziale rischio per la salute umana (Grau et al., 2017). Questo rischio è particolarmente legato alla presenza di batteri patogeni e quelli sporigeni in quanto all'interno di questo ultimo gruppo potrebbero essere presenti specie patogene quali *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus* (Roncolini et al., 2018). Infatti, due recenti studi (Stoops et al., 2016; Vandeweyer et al., 2017) hanno riportato la concentrazione di batteri sporigeni in campioni freschi di *T. molitor* che variavano tra  $<10$  UFC/g e  $10^4$  UFC/g. In un ulteriore studio condotto da Osimani et al. (2017) è stata effettuata la conta vitale in piastra di batteri sporigeni in campioni essiccati di *T. molitor* acquistati da quattro diversi produttori originari di Paesi Bassi, Thailandia, Belgio e Francia. Fra i campioni analizzati, quelli provenienti dalla Thailandia hanno mostrato i valori più bassi di sporigeni ( $<10 - 10^3$  UFC/g), mentre quelli più alti sono stati rilevati nei campioni prodotti in Belgio ( $10^4$  UFC/g).

Il microbiota intestinale dell'insetto può essere influenzato dal substrato utilizzato per l'allevamento. Infatti, alcuni studi precedenti (Wynants, et al., 2019; Mancini, et al., 2019) hanno dimostrato che se i mangimi vengono contaminati con patogeni umani quali ad esempio *Salmonella* e *Listeria*, questi riescono a sopravvivere all'interno del loro intestino e in alcuni casi anche a proliferare rappresentando un serio rischio per i consumatori. Inoltre, Wynants, et al. (2019) hanno confermato la possibilità che alcuni mangimi a base di frumento e crusca possano essere stati contaminati da *Salmonella* direttamente in campo, sulle spighe.

Un altro potenziale rischio oltre al microbiota intestinale è rappresentato dalla cuticola delle larve dove sono presenti microrganismi che derivano dall'ambiente che gli insetti frequentano per nutrirsi. Date queste premesse, risulta necessario approfondire le conoscenze riguardo il microbiota associato degli insetti edibili.

## **1.2 Insetti edibili e sicurezza alimentare**

Il principio di precauzione rappresenta uno degli aspetti fondamentali previsti dalla legislazione europea sulla sicurezza alimentare. Il Regolamento (CE) 178/2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'EFSA e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare, protegge i consumatori dell'Unione Europea quando possono verificarsi effetti



nocivi per la salute ma persiste l'incertezza scientifica. Quindi, grazie al Regolamento (CE) 178/2002, nell'attesa di risultati scientifici esaurienti possono essere attuate azioni temporanee di gestione del rischio in modo tale da assicurare un elevato livello di protezione della salute dei consumatori. Inoltre, il "Pacchetto Igiene" fornisce agli operatori del settore alimentare e alle autorità pubbliche per la sicurezza alimentare una serie di disposizioni con lo scopo di prevenire ogni sorta di rischio legato a alimenti che vengono prodotti, importati e commercializzati all'interno dell'UE. In conformità ai regolamenti (CE) 852/2004, 853/2004, (UE) 2017/625 e il 2073/2005 si stabiliscono i criteri microbiologici necessari che gli operatori del settore alimentare devono rispettare per garantire la salute dei consumatori. Più specificatamente il Regolamento (CE) 2073/2005 stabilisce i criteri microbiologici per alcuni microrganismi alimentari, le loro tossine e i loro metaboliti negli alimenti e nei processi alimentari.

Parlando di insetti edibili, uno dei primi pareri scientifici sul profilo del rischio è stato emesso nel 2015 dall'EFSA, evidenziando la necessità di studi scientifici relativi ai possibili pericoli che possono emergere a seguito dell'uso di insetti edibili come alimenti o mangimi.

Nonostante facciano parte della dieta umana da sempre, non tutte le specie di insetto sono sicure dal punto di vista alimentare. I principali rischi che rispondono a questa categoria di alimenti sono dovuti alla presenza di contaminanti chimici (pesticidi, tossine o metalli pesanti) usati durante l'allevamento che possono portare a fenomeni irritativi, intossicazioni o anche azione mutagena o cancerogena (Devkota e Schmidt, 2000). È stata riscontrata anche la presenza di allergeni (chitina), tossine, micotossine, tossine batteriche e microrganismi patogeni o potenzialmente tali (Reese et al., 2007; van der Spiegel et al., 2013; Belluco et al., 2015; Milanović et al., 2016; Garofalo et al., 2017; Osimani et al., 2017)

Klunder et al. (2012) hanno analizzato la carica batterica nei campioni freschi di *T. molitor* e *A. domesticus*, riscontrando alte cariche di Enterobacteriaceae e batteri sporigeni. Nella stessa ricerca i campioni sono stati poi sottoposti a specifici trattamenti termici come una breve cottura portandole quasi all'eliminazione di Enterobacteriaceae e la riduzione di un ordine di grandezza di batteri sporigeni

Un altro fattore molto importante da tenere in considerazione è che gli insetti raccolti negli allevamenti hanno una maggiore possibilità di presentare residui di pesticidi o metalli pesanti rispetto a quelli prelevati nel loro habitat naturale. Gli insetti sia quelli che provengono da un allevamento sia quelli cresciuti in natura vivono in associazione con un elevato numero di microrganismi, quindi entrambi possono essere portatori di microrganismi patogeni tra cui virus, batteri, funghi e protozoi

(Vega e Kaya, 2012). L'allevamento però consente un maggiore controllo sulle pratiche igieniche e sulle fonti alimentari riducendo considerevolmente i potenziali rischi microbiologici (Allotey e Mpuchane, 2003).

### **1.3 Batteri sporigeni negli insetti edibili**

Come già descritto in precedenza, gli insetti edibili possono essere vettori di rischi biologici associati ai microrganismi presenti all'interno del tratto intestinale o quelli presenti sulla cuticola dell'insetto. In particolare, la presenza di batteri sporigeni rappresenta un grave rischio per i consumatori poiché questa loro caratteristica li rende particolarmente resistenti e perché comprendono noti patogeni di origine alimentare. Le spore, resistenti al calore, possono sopravvivere ai comuni trattamenti adottati per gli insetti edibili come essiccazione, bollitura e frittura (Osimani et al., 2017; Vandeweyer et al., 2017). Alcuni studi sul microbiota degli insetti edibili hanno rilevato la presenza di batteri sporigeni. Più nel dettaglio, Stoops et al. (2017) hanno recentemente valutato le dinamiche microbiche durante produzione e stoccaggio di prodotti alimentari ottenuti dalla lavorazione delle larve di tarma della farina (*T. molitor*) e larve di camola minore della farina (*Alphitobius diaperinus*). Per ottenere il prodotto finale gli autori hanno sottoposto le larve di insetto fresco a diversi trattamenti termici quali cottura a vapore e frittura. Sebbene i trattamenti termici applicati fossero diversi per i due tipi di insetti (5 minuti di cottura al vapore per le larve di *T. molitor* e 2 minuti di frittura per larve di *A. diaperinus*), è stata ottenuta una riduzione generale della carica dei batteri sporigeni. Inoltre, durante la conservazione dei prodotti ad atmosfera modificata per un periodo di 35 giorni, la carica dei batteri sporigeni è rimasta stabile (0,7 - 1,5 log UFC/g) indipendentemente dalla specie dell'insetto utilizzata. È interessante notare che l'isolamento e le analisi metagenomiche effettuate durante la conservazione dei prodotti hanno rivelato la presenza di generi sporigeni come *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Psychrobacillus* (Stoops et al., 2017).

Recentemente, De Smet et al. (2019) hanno riportato la riduzione dei clostridi solfito-riduttori nell'impasto fermentato a base di insetti dopo l'aggiunta di nitriti e colture starter, nello stesso modo in cui avviene nei prodotti fermentati a base di carne.

Osimani et al. (2018) hanno studiato i batteri sporigeni presenti nel pane prodotto con concentrazioni crescenti (fino ad un massimo del 30%) della farina a base di *A. domesticus* come sostituto della farina di frumento. Nonostante la cottura, i risultati delle conte vitali hanno mostrato la presenza dei batteri sporigeni fino ad un valore di 3,7 log UFC/g, in base alla quantità di farina sostituita. Inoltre, le analisi molecolari effettuate via PCR-DGGE (PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) hanno

mostrato la presenza di varie specie di *Bacillus* (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* e *Brevibacillus brostelensis*).

Similarmente, Roncolini et al. (2019) hanno studiato l'utilizzo della farina delle larve di *T. molitor* per l'arricchimento proteico del pane utilizzando diversi livelli (5% o 10%) di sostituzione della farina di frumento. Le conte vitali non hanno rilevato la presenza di batteri sporigeni nel pane prodotto, sebbene l'analisi PCR-DGGE abbia rivelato la presenza di batteri del genere *Bacillus* compresi quelli già osservati da Osimani et al. (2018).

Per quanto riguarda la legislazione europea, non esistono ancora regolamenti che pongono dei limiti di riferimento specifici sulla presenza di questo gruppo microbico negli alimenti a base di insetti, eccetto per quelli stabiliti dal regolamento della commissione 2073/2005, modificato nel regolamento (CE) n. 1441/2007 per presunta presenza di *B. cereus* in alimenti liofilizzati e dietetici per lattanti.

#### **1.4. Trattamenti per la riduzione della carica microbica di insetti edibili**

Un problema importante per la futura crescita ed espansione del mercato degli insetti edibili riguarda i trattamenti termici poiché sono determinanti per prevenire la contaminazione microbica dei prodotti a base di insetti. Questo perché gli insetti posseggono naturalmente un alto contenuto di grassi e proteine che verrebbero modificati dai trattamenti termici volti a rendere l'alimento sicuro per i consumatori dal punto di vista microbiologico.

Poiché gli insetti edibili possono essere consumati con svariate modalità; come portata principale, spuntino o ingrediente alimentare, sono commercializzati in diverse forme; come insetti interi (crudi o lavorati cioè essiccati, fritti, bolliti, tostati e arrostiti) o lavorati meccanicamente con processi come macinatura, schiacciatura e polverizzazione. La polverizzazione di insetti interi solitamente aumenta la carica microbica degli stessi di 1,6-2,2 log UFC/g probabilmente a causa della dispersione del microbiota intestinale. Pertanto, rende necessari la pulizia e/o il trattamento termico degli insetti prima del consumo per ridurre la contaminazione microbica (Garofalo et al., 2017; Klunder et al., 2012; Schlütler et al., 2017; Vandeweyer, et al., 2017).

Klunder et al. (2012) hanno proposto svariati trattamenti termici come bollitura, tostatura e frittura con l'obiettivo di ridurre la carica microbica nei campioni di *T. molitor*, *A. domesticus* e *Brachytrupes sp.* Dopo il trattamento termico, alcuni campioni sono stati conservati refrigerati a 5-7° C mentre altri a temperatura ambiente (28-30°C). I risultati hanno dimostrato l'efficienza di questi trattamenti termici nella completa eliminazione delle Enterobacteriacee ma non delle spore batteriche. Inoltre, lo stesso studio suggerisce che i trattamenti termici potrebbero attivare le spore batteriche che

germinando aumenterebbero il rischio per i consumatori. Sono quindi necessari ulteriori trattamenti per eliminare le endospore batteriche dagli insetti edibili. Una delle possibili soluzioni è il processo di tindalizzazione, un metodo di sterilizzazione frazionata che consiste in un primo trattamento termico che elimina le forme vegetative, seguito da un periodo di incubazione che favorisce la germinazione delle spore. Il materiale così trattato viene riportato alla temperatura di 60-100 °C per 30 minuti, al fine di uccidere le cellule vegetative originatesi dalla germinazione delle spore. Queste fasi di riscaldamento vanno ripetute due o tre volte con un periodo di incubazione nel mezzo (Goud, 2006). Lo scopo di questo processo è quello di sterilizzare il prodotto alimentare cercando di conservare le proprietà organolettiche e nutritive.

## 2. SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni, in Europa, come nel resto del mondo, si sta dando uno spazio sempre maggiore ad alternative alimentari ecosostenibili, tra cui gli insetti edibili, che potrebbero rappresentare una fonte proteica alternativa sia per l'alimentazione umana che animale.

Seppur gli insetti edibili rappresentino una valida alternativa agli alimenti tradizionali, il loro impiego nell'industria alimentare potrebbe rappresentare un rischio per la salute dei consumatori, soprattutto per la possibile presenza di microrganismi patogeni. Infatti, nonostante gli insetti edibili vengano generalmente scottati in seguito all'allevamento per la riduzione della carica microbica, alcuni batteri sporigeni, che possono essere patogeni o deterioranti, riescono a sopravvivere. Sono quindi necessari ulteriori trattamenti per la riduzione della carica microbica, senza che questi impattano negativamente sulle proprietà nutrizionali e sensoriali degli insetti edibili. Una possibile soluzione è il processo di tindalizzazione, che consiste in due o tre fasi di trattamento termico con un periodo di incubazione intermedio.

Date queste premesse, la presente tesi sperimentale si propone come obiettivo la valutazione dell'impatto del processo di tindalizzazione sulle endospore batteriche nei campioni di larve di tarma della farina (*T. molitor*) e grilli (*A. domesticus*), prima, durante e al termine del trattamento.

## MATERIALI E METODI

### 3.1 Campionamento

Quattro campioni di larve di tarma della farina (*T. molitor*) e due campioni di grilli (*A. domesticus*) (Tabella 1) sono stati ottenuti direttamente da allevatori provenienti da Belgio e successivamente conservati in contenitori di plastica sigillati alla temperatura di -18 °C fino al momento dell'analisi.

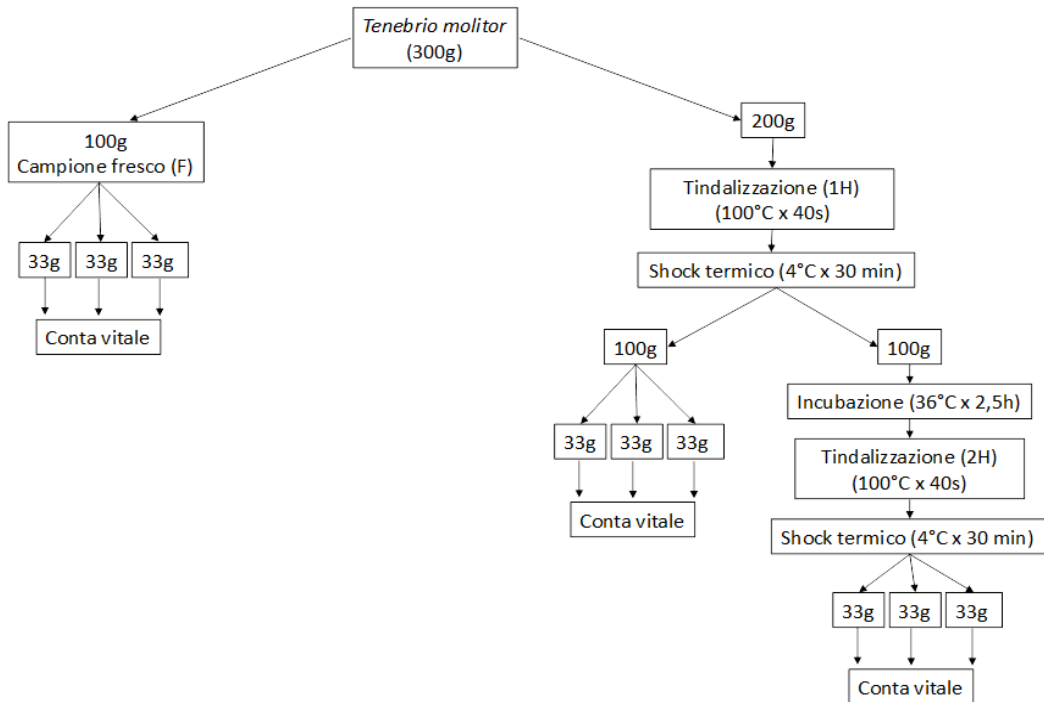
**Tabella 1** - Elenco dei campioni oggetto di analisi

CODICE DEL CAMPIONE	CAMPIONE	DATA DI CAMPIONAMENTO
1	<i>Tenebrio molitor</i>	18/10/2017
2	<i>Tenebrio molitor</i>	24/10/2017
3	<i>Tenebrio molitor</i>	7/11/2017
4	<i>Acheta domesticus</i>	14/11/2017
5	<i>Tenebrio molitor</i>	21/11/2017
6	<i>Acheta domesticus</i>	28/11/2017

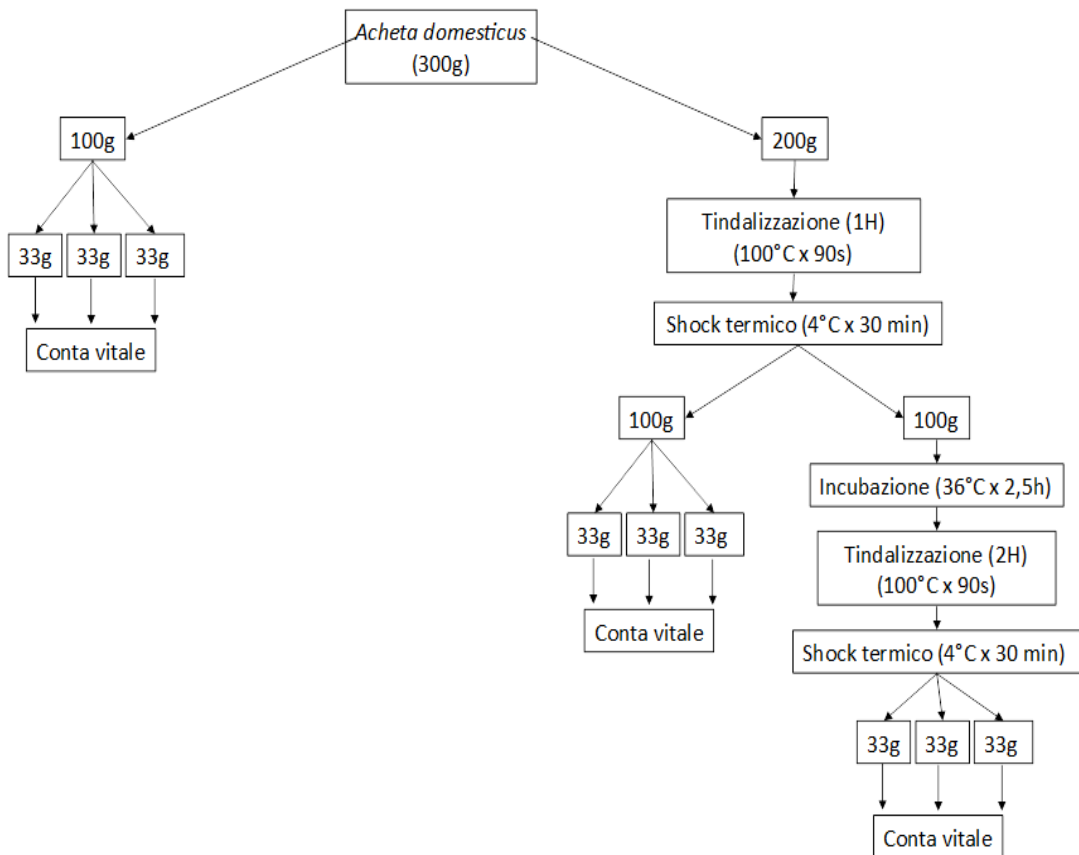
### 3.2 Tindalizzazione

Tutti i campioni (Tabella 1) sono stati scongelati e sottoposti al processo di tindalizzazione seguendo lo schema riportato in Figura 1A per i campioni di *T. molitor* e Figura 1B per i campioni di *A. domesticus*. In dettaglio, circa 300g di ogni campione sono stati divisi in 2 aliquote contenenti 100 g e 200 g, rispettivamente. La prima aliquota (100 g) è stata ulteriormente suddivisa in 3 aliquote da circa 33g l'una, destinate per la conta vitale di batteri aerobi e anaerobi mesofili totali ed eventuali sporigeni. La seconda aliquota (200 g) è stata sottoposta alla prima fase di trattamento termico (ebollizione); 40s per i campioni di *T. molitor* e 90s per i campioni di *A. domesticus*, seguita dallo shock termico a 4°C per 30 min. Dopo questa prima fase di tindalizzazione, 100 g sono stati ulteriormente suddivisi in 3 aliquote da circa 33g l'una, destinate per la conta vitale di batteri sporigeni (aerobi e anaerobi mesofili), mentre i rimanenti 100 g sono stati incubati a 36°C per 2.5 h. Dopo l'incubazione, i campioni sono stati sottoposti alla seconda fase di riscaldamento (40 s a 100°C) seguita dallo shock termico e la conta vitale di batteri sporigeni (aerobi e anaerobi mesofili).

A)



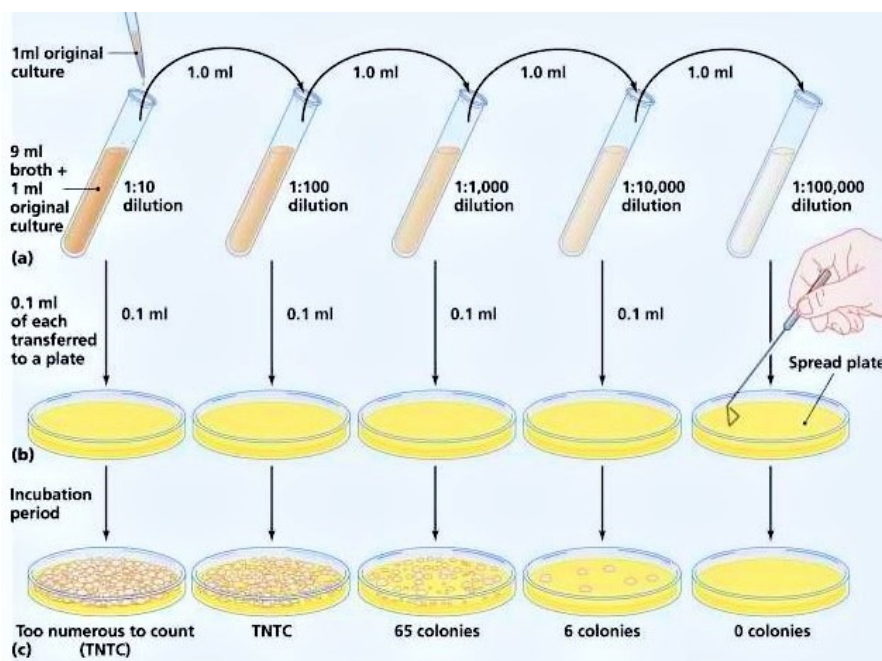
B)



**Figura 1** – Lo schema del processo di tindalizzazione di campioni di *Tenebrio molitor* (A) e *Acheta domesticus* (B). F, Campione fresco; 1H, Prima fase di trattamento termico; 2H, Seconda fase di trattamento termico

### 3.3 Conte vitali

Per effettuare la conta vitale in piastra, 5 g di ciascun campione (Figura 1A e 1B) sono stati prelevati ed aggiunti a 45 mL di acqua peptonata sterile (peptone, 2 g/L). La sospensione è stata omogeneizzata utilizzando omogeneizzatore peristaltico Stomacher® 400 Circulator (International PBI, Milano, Italia) impostando il programma a 260 rpm (*rotation per minute*) per una durata di 2 minuti. In questo modo è stata ottenuta la prima diluizione ( $10^{-1}$ ) di ogni campione. A partire da questo omogenato sono state allestite successive diluizioni seriali decimali; con una micropipetta è stato prelevato 1 mL dalla diluizione  $10^{-1}$  ed inserito in un tubo contenente 9 mL di acqua peptonata sterile, ottenendo così una diluizione  $10^{-2}$ , e così via per le altre diluizioni (Figura 2).



**Figura 2** – Procedura di conta vitale mediante utilizzo di diluizioni seriali decimali del campione e piastramento in superficie

Da ciascuna delle diluizioni seriali decimali ottenute in precedenza è stata prelevata un'aliquota di 100  $\mu$ L e distribuita uniformemente sulla superficie di piastre Petri sterili contenenti il terreno colturale *Plate Count Agar* (PCA) (Tabella 2) per la determinazione della carica batterica totale in condizioni di aerobiosi e anaerobiosi. Per l'enumerazione delle spore batteriche in campioni freschi,



un'aliquota (1 mL) di ciascun omogenato (diluizione  $10^{-1}$ ) è stata preliminarmente sottoposta a trattamento termico (80°C per 15 minuti) per la rimozione delle cellule vegetative. Tutte le operazioni sono state eseguite in condizioni di sterilità.

**Tabella 2** - Composizione del terreno di coltura Plate Count Agar (PCA)

<b>Ingredienti</b>	<b>Concentrazione (g/L)</b>
Triptone	5,0
Estratto di lievito	2,5
Glucosio	1,0
Agar	15,0

Completato il piastramento, le piastre sono state incubate a 36°C per 24 h per la determinazione del numero dei batteri totali mesofili aerobi, inclusi i batteri sporigeni. Per la conta dei batteri totali mesofili e batteri sporigeni anaerobi, le piastre Petri sono state chiuse ermeticamente in delle giare di plastica per creare un ambiente carente di ossigeno ed incubate a 36 C° per 24 ore.

Una volta terminato il periodo di incubazione, sono state prese in considerazione solo le piastre con un numero di Unità Formanti Colonia (UFC) comprese tra 30 e 300. I risultati sono stati espressi come la media del log delle UFC per grammo di campione ( $\log \text{UFC/g} \pm$  deviazione standard).

### **3.4 Isolamento**

Dopo il periodo di incubazione, le piastre che mostravano la crescita di colonie ben separate sono state utilizzate per l'isolamento e purificazione delle colonie stesse, mediante la tecnica di isolamento per strisci successivi sul terreno PCA per un totale di due strisci. Il fattore preso in considerazione per l'isolamento è stato la "morfologia" di ciascuna colonia.

### 3.5 Crioconservazione

Per la crioconservazione dei batteri isolati è stato utilizzato il terreno Nutrient broth la cui composizione è riportata in Tabella 3.

**Tabella 3** - Composizione del terreno di coltura Nutrient Broth

<b>Ingredienti</b>	<b>Concentrazione (g/L)</b>
Tryptone	5,0
Estratto di lievito	2,0
Cloruro di sodio	1,0

Il terreno è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 15 minuti ad 1 atm. I ceppi sono stati crioconservati a -80°C in una miscela sterile composta da Nutrient broth e glicerolo in rapporto 3:2.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Conte vitali di batteri mesofili totali e sporigeni

Nelle Tabelle 4 e 5 sono mostrati i risultati delle conte vitali di batteri mesofili totali e sporigeni (aerobi e anaerobi, rispettivamente) eseguite sui campioni di *T. molitor* e *A. domesticus* durante il processo di tindalizzazione.

**Tabella 4** - Risultati delle conte vitali di batteri mesofili totali e sporigeni aerobi eseguite sui campioni freschi (F) e durante il processo di tindalizzazione; 1H dopo prima fase di trattamento termico e 2H, dopo seconda fase di trattamento termico. I risultati sono espressi in log UFC/g  $\pm$  deviazione standard.

Codice	Campione	Batteri mesofili totali		Batteri sporigeni	
		F	F	1H	2H
1	<i>Tenebrio molitor</i>	2,59 $\pm$ 0,52	n.d.	n.d.	n.d.
2	<i>Tenebrio molitor</i>	7,49 $\pm$ 0,014	2,46 $\pm$ 0,14	1,9 $\pm$ 0,19	<1
3	<i>Tenebrio molitor</i>	8,21 $\pm$ 0,75	2,54 $\pm$ 0,22	1,24 $\pm$ 0,27	<1
4	<i>Acheta domesticus</i>	8,86 $\pm$ 0,08	3,76 $\pm$ 0,20	3,57 $\pm$ 0,38	1,34 $\pm$ 0,18
5	<i>Tenebrio molitor</i>	8,41 $\pm$ 0,21	2,76 $\pm$ 0,20	3,62 $\pm$ 0,67	1,47 $\pm$ 0,30
6	<i>Acheta domesticus</i>	8,62 $\pm$ 0,13	2,46 $\pm$ 0,23	3,52 $\pm$ 0,59	2,43 $\pm$ 0,32

n.d., non determinato

I risultati mostrano la carica dei batteri mesofili totali aerobi compresa tra 2,59 $\pm$ 0,52 log UFC/g nel campione 1 (*T. molitor*) e 8,86 $\pm$ 0,08 log UFC/g nel campione 4 (*A. domesticus*). La carica dei batteri sporigeni aerobi in tutti i campioni era nell'ordine di 2 log UFC/g con l'eccezione del campione 4 (*A. domesticus*) caratterizzato dal valore più alto (3,76 $\pm$ 0,20 log UFC/g). Come previsto, dopo la prima fase di tindalizzazione, la carica iniziale dei batteri mesofili totali è stata ridotta a valori che corrispondono ai risultati della carica dei batteri sporigeni nei campioni freschi. Ciò conferma che quasi tutti i batteri ancora vitali dopo il primo trattamento termico erano sporigeni. Questo risultato è in linea con quello riportato precedentemente da Vandeweyer et al. (2017) dove la prima fase di

tindalizzazione ha causato solo la minima riduzione (da 1,2 a 2,3 log CFU/g) delle endospore batteriche nei campioni di *T. molitor*. Infine, il secondo trattamento termico eseguito dopo l'incubazione delle endospore batteriche attivate con il primo trattamento, ha causato una riduzione della carica dei batteri sporigeni sotto il limite di rilevamento ( $< 1 \log \text{ UFC/g}$ ) nei campioni di *T. molitor* con l'eccezione di campione 5 ( $1,47 \pm 0,30 \log \text{ UFC/g}$ ). Diversamente, i batteri sporigeni aerobi nei campioni di *A. domesticus* sembrano essere più resistenti al processo di tindalizzazione mostrando il valore massimo di  $2,43 \pm 0,32 \log \text{ UFC/g}$  nel campione 6. Questo ultimo risultato è simile a quello ottenuto dopo la conta vitale eseguita sul campione fresco mostrando l'inefficienza del processo di tindalizzazione nella riduzione di batteri sporigeni nei campioni di *A. domesticus*.

**Tabella 5** - Risultati delle conte vitali di batteri mesofili totali e sporigeni anaerobi eseguite sui campioni freschi (F) e durante il processo di tindalizzazione; 1H dopo prima fase di trattamento termico e 2H, dopo seconda fase di trattamento termico. I risultati sono espressi in  $\log \text{ UFC/g} \pm$  deviazione standard.

Codice	Campione	Batteri			
		mesofili totali		sporigeni	
		F	F	1H	2H
1	<i>Tenebrio molitor</i>	$1,95 \pm 0,63$	n.d.	n.d.	n.d.
2	<i>Tenebrio molitor</i>	$7,55 \pm 0,06$	$1,58 \pm 0,25$	$1,22 \pm 0,27$	$<1$
3	<i>Tenebrio molitor</i>	$7,55 \pm 0,06$	$2,33 \pm 0,47$	$1,24 \pm 0,27$	$<1$
4	<i>Acheta domesticus</i>	$8,63 \pm 0,23$	$3,40 \pm 0,22$	$2,25 \pm 0,06$	$<1$
5	<i>Tenebrio molitor</i>	$8,33 \pm 0,23$	$3,01 \pm 0,19$	$3,37 \pm 0,69$	$<1$
6	<i>Acheta domesticus</i>	$8,41 \pm 0,21$	$1,72 \pm 0,45$	$1,29 \pm 1,05$	$1,47 \pm 0,30$

n.d., non determinato

I risultati delle conte vitali di batteri mesofili totali anaerobi, inclusi sporigeni, mostrano una carica compresa tra  $1,95 \pm 0,63$  log UFC/g nel campione 1 (*T. molitor*) e  $8,63 \pm 0,23$  log UFC/g nel campione 4 (*A. domesticus*). La carica di batteri sporigeni anaerobi nei campioni freschi era compresa tra un minimo di  $1,58 \pm 0,25$  log UFC/g nel campione 2 (*T. molitor*) e un massimo di  $3,40 \pm 0,22$  log UFC/g nel campione 4 (*A. domesticus*). Come previsto, i valori delle conte vitali eseguite dopo la prima fase di tindalizzazione erano molto simili o leggermente ridotti rispetto quelli ottenuti per i batteri sporigeni nei campioni freschi confermando anche in questo caso che quasi tutti i batteri ancora vitali dopo il primo trattamento termico erano sporigeni. Infine, il secondo trattamento termico ha causato una riduzione della carica dei batteri sporigeni sotto il limite di rilevamento ( $< 1$  log UFC/g) in tutti i campioni eccetto il campione 6 (*A. domesticus*) mostrando una particolare resistenza di batteri sporigeni anaerobi al processo di tindalizzazione per quanto riguarda i campioni di *A. domesticus*.

#### 4.2 Isolamento di batteri mesofili totali

In totale, sono state isolate e purificate 209 colonie, rispettivamente 126 da *T. molitor* e 83 da *A. domesticus*. Per quanto riguarda il tipo di metabolismo, sono state isolate e purificate 89 colonie di batteri aerobi e 120 colonie di batteri anaerobi. L'elenco degli isolati aerobi e anaerobi ottenuti dai campioni di *T. molitor* con le rispettive morfologie è riportato nelle Tabelle 6 e 7 rispettivamente. Nelle Tabelle 8 e 9 è riportato rispettivamente l'elenco degli isolati aerobi e anaerobi ottenuti dai campioni di *A. domesticus*.

**Tabella 6** – Elenco degli isolati aerobi ottenuti da campioni freschi di *T. molitor* (F) e durante il processo di tindalizzazione; 1H dopo prima fase di trattamento termico; 2H, dopo seconda fase di trattamento termico.

Morfologia della colonia	Codice dell'isolato
Colonia bianca, bordi frastagliati e diametro di 5 mm.	F7
Colonia bianca, forma allungata, diametro di 2 cm.	F8
Colonia bianca con bordi lisci, non con una forma specifica e diametro di 1,5 cm.	F9
Colonia bianca, forma circolare, diametro 1 mm.	1H1
Colonia bianca, forma circolare, bordi frastagliati, diametro 5 mm.	1H3
Colonia bianca, forma circolare, bordi lisci, diametro 1 mm.	1H7, 1H8, 1H9
Colonia bianca, forma circolare, diametro 5 mm.	2H2, 2H4, 2H6, 2H8

---

Bianco scuro, bordi frastagliati, diametro 2 cm.	F10, F11, F12, F25, F27, F28, F29, F30, F31, F32, F33, F34, F35, F36
Colore bianco, di forma circolare, diametro di circa 1 mm.	F15, F16, F17, F18, F26
Colore bianco quasi trasparente, diametro di circa 4 cm, forma non definita.	F19
Colore bianco, con bordi frastagliati, di forma circolare, diametro di circa 4 cm.	F37
Colore giallo quasi trasparente, diametro di 1 cm, con bordi frastagliati.	F38
Colore bianco, diametro di circa 2 mm, di forma circolare, con bordi frastagliati.	1H11
Colore bianco, diametro di circa 1 mm, di forma circolare, con bordi frastagliati.	1H12
Colore bianco, diametro di circa 1 mm, di forma circolare.	1H13, 1H14, 1H20
Colore bianco, diametro di 4 mm, di forma circolare	1H21
Colore bianco, forma circolare, diametro di circa 1 cm.	F39
Colore bianco, forma circolare, diametro di circa 1,5 cm.	F40, F42, F42, F43, F44, F45, F46, F47
Colore bianco trasparente, forma circolare, diametro di 2 cm.	F48
Colore bianco, di forma circolare, con bordi frastagliati, diametro di circa 3 mm.	1H26, 1H27, 1H30
Colore bianco trasparente, forma irregolare, con bordi frastagliati, diametro di 1 cm.	F53, F54
Colore bianco trasparente, forma irregolare, con bordi lisci, diametro di 1 cm.	F60, F61, F62,
Colore bianco quasi trasparente, consistenza quasi liquida, forma circolare.	1H22, 1H23
Colore bianco trasparente, forma rotonda, diametro di 1 cm.	F101, F102, F103, F104
Colore bianco scuro, di forma circolare, diametro di circa 3 mm.	F105, F106, F107
Colore bianco, di forma circolare, diametro di circa 1mm.	F114, F115, F116, F117, F118, F119, F120, F121

---

**Tabella 7**– Elenco degli isolati anaerobi ottenuti da campioni freschi di *T. molitor* (F) e durante il processo di tindalizzazione; 1H dopo prima fase di trattamento termico; 2H, dopo seconda fase di trattamento termico.

<b>Morfologia della colonia</b>	<b>Codice dell'isolato</b>
Colonia bianca, bordi frastagliati e diametro di 1,5 cm.	F1
Colonia bianca, con bordi frastagliati, ricopre gran parte della piastra.	F4
Colonia bianca, forma circolare e diametro di circa 6 mm.	F5
Colonia bianca trasparente, forma circolare con bordi lisci e diametro di 1 cm.	F6
Colonia giallo chiaro, bordi lisci e diametro di 1,8 cm.	F2
Colonia bianca chiara, ricopre quasi tutta la superficie della piastra.	F3
Campione prelevato dalla superficie totale della piastra data l'assenza di colonie.	1H2, 1H4, 1H5
Colonia bianca, forma circolare, bordi lisci, diametro 1 mm.	1H6, 1H9
Colonia bianca, forma circolare, diametro 5 mm.	2H1, 2H3, 2H5, 2H7
Campione preso da tutta la superficie poiché le colonie sono troppo piccole per essere prelevate.	F13, F14
Colore bianco, di forma circolare, diametro di circa 1 mm.	F20, F21, F22, F23, F24, 1H24, 1H25
Colore bianco, diametro di circa 1 mm, di forma circolare.	1H15, 1H16, 1H17, 1H18, 1H19
Colore bianco trasparente, forma circolare, diametro di 1 mm.	F49, F50, F51, F52
Colore bianco, di forma circolare, con bordi frastagliati, diametro di circa 3 mm.	1H28, 1H29
Colore bianco trasparente, forma irregolare, con bordi frastagliati, diametro di 1 cm.	F55, F56, F57, F58, F59, F63, F64, F65, F66, F67, F68, F69, F70, F71
Colore bianco, di forma circolare, diametro di circa 1mm.	F108, F109, F110, F111, F112, F113

**Tabella 8** – Elenco degli isolati aerobi ottenuti da campioni freschi di *A. domesticus* (F) e durante il processo di tindalizzazione; 1H dopo prima fase di trattamento termico; 2H, dopo seconda fase di trattamento termico.

<b>Morfologia della colonia</b>	<b>Codice dell'isolato</b>
Colore bianco, di forma circolare, bordi frastagliati, diametro di circa 1 cm	F77, F79, F80, F81, F82, 1H39, 1H40, 1H41
Colore bianco, di forma circolare, diametro di circa 0,5 cm.	1H35
Colore bianco scuro, forma irregolare, diametro 2 cm.	F84, F85, F86
Colore bianco, di forma circolare, bordi frastagliati, diametro di circa 3 cm.	1H34

**Tabella 9** – Elenco degli isolati anaerobi ottenuti da campioni freschi di *A. domesticus* (F) e durante il processo di tindalizzazione; 1H dopo prima fase di trattamento termico; 2H, dopo seconda fase di trattamento termico.

<b>Morfologia della colonia</b>	<b>Codice dell'isolato</b>
Colore bianco, di forma circolare, diametro di circa 1 mm	F72, F73, F74, F75, 1H27, 1H31, 1H32, 1H33, 1H42, 1H43, 1H44 1H45
Colore bianco, diametro di circa 1 cm, di forma irregolare.	F100
Campione prelevato da tutta la superficie poiché le colonie sono troppo piccole per essere prelevate.	F76, F78
Colore bianco, di forma circolare, diametro di circa 0,5 cm.	F82, F83, 1H36, 1H37, 1H38
Colore bianco, diametro di circa 1 mm, di forma circolare.	F87, F88, F89, F90, F91, F96, F97, F98
Colore bianco, diametro di circa 1 mm, di forma ovale, con bordi frastagliati.	F92, F93, F94, F95



---

Colore bianco quasi trasparente, forma circolare, diametro di circa 4 cm. F99

---

## 5. CONCLUSIONI

In questa tesi sperimentale è stato valutato l'impatto del processo di tindalizzazione sulle endospore batteriche nei campioni di *T. molitor* e *A. domesticus*. Dopo la prima fase di ebollizione (40 s per *T. molitor* e 90 s per *A. domesticus*), i valori della conta vitale eseguita sui campioni freschi sono stati ridotti ad una quantità che corrispondeva ai valori della carica delle endospore prima di trattamento termico. Ciò conferma che i batteri ancora vitali dopo il primo trattamento termico erano quelli sporigeni. Il secondo trattamento termico ha ridotto la carica dei batteri sporigeni aerobi sotto il limite di rilevamento soltanto in due campioni di *T. molitor*, mentre per le endospore anaerobiche le riduzioni sono state importanti portando tutti tranne un campione di *A. domesticus* sotto il limite di rilevamento (1 log UFC/g). In conclusione, la tindalizzazione può ridurre in maniera efficace la quantità di endospore anaerobiche nei campioni di *T. molitor*. Diversamente, la resistenza delle endospore nei campioni di *A. domesticus* al processo di tindalizzazione nonostante una fase di riscaldamento più lunga potrebbe essere dovuta dal fatto che le dimensioni di *A. domesticus* non permettono al calore di penetrare in maniera efficace all'interno dell'insetto durante i trattamenti termici. Ulteriori studi sono necessari per verificare l'efficienza della tindalizzazione nella riduzione delle endospore batteriche negli insetti edibili modificando alcuni parametri del processo.

## 6. BIBLIOGRAFIA

**Alexandratos N., Bruinsma J. (2012)** World agriculture towards 2030/2050: The 2012 Revision. Global Perspective Studies Team ESA Working Paper No 12-03. Rome: Agricultural Development Economics Division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations.

**Allotey J., Mpuchane S. (2003)** Utilization of useful insects as food source. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 3(2): 1–6.

**Baker R. A. (1994)** Potential dietary benefits of citrus pectin and fiber. *Food Technology*, 11:133-139.

**Belluco S., Losasso C., Maggioletti M., Alonzi C., Ricci A., Paoletti M. G. (2015)** Edible insects: a food security solution or a food safety concern. *Animal Frontiers*, 5(2): 25-30.

**Chapagain A.K., Hoekstra A.Y. (2003)** Virtual water flows between nations in relation to trade in livestock and livestock products. Value of Water Research Report Series No. 13. Paris, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization.

**De Smet J., Lenaerts S., Borremans A., Scholliers J., Van Der Borgh M., Van Campenhout L (2019)** Stability assessment and scale fermentation of pastes produced on a pilot scale from mealworms (*Tenebrio molitor*). *LWT*, 102:113- 121.

**Devkota B., Schmidt G. H. (2000)** Accumulation of heavy metals in food plants and grasshoppers from the Taigetos Mountains, Greece. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 78(1), 85-91. 2000.

**Fernandez-Cassi X, Supeanu M, Vaga A, Jansson A, Boqvist S, Vagsholm I. (2019)** *Journal of Insects as Food and Feed*; 5(2): 137-157.

**Finke M.D. (2002)** Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biology* 2, 21(3): 269–285.

**Garofalo C, Milanović V, Cardinali F, Aquilanti L, Clementi F, Osimani A. (2019)** Current knowledge on the microbiota of edible insects intended for human consumption: A state-of-the-art review. *Food Research International*; 125:108527.

**Garofalo C., Osimani A., Milanović V., Taccari M., Cardinali F., Aquilanti L., Riolo P., Ruschioni S., Isidoro N., Clementi F. (2017).** The microbiota of marketed processed edible insects as revealed by high-throughput sequencing. *Food Microbiology* 62: 15–22.

**Gere A., Szekely G., Kovacs S., Kokai Z., & Sipos L. (2017).** Readiness to adopt insects in Hungary: A case study. *Food Quality and Preference*, 59, 81-86.

**Gould, G.W. (2006).** "History of science--spores". *Journal of Applied Microbiology*, 101 (3), 507–13.

**Klunder, H.C., Wolkers-Rooijackers, J., Korpela, J.M., & Nout, M. J. R. (2012).** Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control*, 26(2), 628–631.

**Kulma, M., Kouřimská, L., Plachý, V., Božik, M., Adámková, A. and Vrabc, V., (2019).** Effect of sex on the nutritional value of house cricket, *Acheta domestica* L. *Food Chemistry* 272: 267-272

**Klunder H.C., Wolkers-Rooijackers J., Korpela J.M., Nout M.J.R. (2012)** Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control* 26 (2), 628-631.

**Mancini, S., Moruzzo, R., Riccioli, F., & Pacia, G. (2019).** European consumers' readiness to adopt insects as food. A review. *Food Research International*.

**Milanović V., Osimani A., Pasquini M., Aquilanti L., Garofalo C., Taccari M., Cardinali F., Riolo P., Clementi F (2016).** Getting insight into the prevalence of antibiotic resistance genes in specimens of marketed edible insects. *International Journal of Food Microbiology* 227, 22–28.

**Mlcek J., Rop O., Borkovcova M., Bednarova M. (2014)** A comprehensive look at the possibilities of edible insects as food in Europe—a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64.3

**Osimani A, Aquilanti L. (2021)** Spore-forming bacteria in insect-based foods. *Current Opinion in Food Science*; 37:112-117.

**Osimani A., Garofalo C., Milanović V., Taccari M., Cardinali F., Aquilanti L., Pasquini M., Mozzon M., Raffaelli N., Ruschioni S., Riolo P., Isidoro N., Clementi F. (2017c).** Insight into the proximate composition and microbial diversity of edible insects marketed in the European Union. *European Food Research and Technology* 243, 1157 –1171. 2017c.

**Osimani A, Milanović V, Cardinali F, Garofalo C, Clementi F, Pasquini M, Riolo P, Ruschioni S, Isidoro N, Loreto N, Franciosi E, Tuohy K, Petruzzelli A, Fogliani M, Gabucci C, Tonucci F, Aquilanti L.** The bacterial biota of laboratory-reared edible mealworms (*Tenebrio molitor* L.): From feed to frass. *Int J Food Microbiol*, 2018; 272:49-60.

**Pollini A. (2002)** *Manuale di entomologia applicata*. Edagricole-Edizioni Agricole pp: 1462.

- Reese T.A., Liang H.E., Tager A.M., Luster A.D., Van Rooijen N., Voehringer D., & Locksley R. M. (2007).** Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature*, 447(7140), 92-96.
- Roncolini A, Osimani A, Garofalo C, Aquilanti L, Milanović V, Sabbatini R, Clementi F.** Il potenziale degli insetti edibili: aspetti microbiologici. In *Industrie alimentari*. Chiriotti Editori 2018; 57(592).
- Rumpold B. A., Schlüter O. K. (2013)** Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular nutrition & food research* 57.5: 802-823.
- Stoops J., Crauwels S., Waud M., Claes J., Lievens B., Van Campenhout L. (2016)** Microbial community assessment of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and grasshoppers (*Locusta migratoria migratorioides*) sold for human consumption 53: 122-127
- Van der Spiegel M., Noordam M.Y., van der Fels-Klerx H.J (2013).** Safety of novel protein sources (insects, microalgae, seaweed, duckweed, and rapeseed) and legislative aspects for their application in food and feed production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12.
- Vandeweyer D., Crauwels S., Lievens B., Van Campenhout, L. (2017)** (Microbial counts of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and crickets (*Acheta domesticus* and *Gryllobates sigillatus*) from different rearing companies and different production batches. *International Journal of Food Microbiology* 242: 13-18.
- Van Huis A., Van Itterbeeck, Klunder H., Mertens E., Halloran A., Muir G. (2013)** Edible insects: future prospects for food and feed security. *FAO Forestry Paper 171*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Vega F.E., Kay. H.K. (2012)** Scope and basic principles of insect pathology. *Insect Pathology*, second ed. Academic Press, San Diego pp508.
- Wynants, E., Crauwels, S., Verreth, C., Gianotten, N., Lievens, B., Claes, J., & Van Campenhout, L. (2018).** Microbial dynamics during production of lesser mealworms (*Alphitobius diaperinus*) for human consumption at industrial scale. *Food Microbiology*, 70, 181- 191.
- Womeni H.M., Linder M., Tiencheu B., Mbiapo F.T., Villeneuve P., Fanni J., Parmentier M. (2009)** Oils of insects and larvae consumed in Africa: potential sources of polyunsaturated fatty acids. *OCL – Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 16(4): 230–235.

