

TECNOLOGIA BIOLOGICA PER IL TRATTAMENTO DI POLLINA DI OVAIOLE (BREV. EUROPEO EP 1314710 A1): PROGETTO MIDA (MANURE HYGIENIZATION DEVELOPMENT AND APPLICATION) SANITIZZAZIONE

Golfari G.¹, Dall'Ara A.², Massi P.³, Poglayen G.⁴

1. *Veterinario libero professionista (ex borsista SPINNER)*

2. *ENEA, UTTMF, Unità Tecnica Tecnologie dei Materiali Faenza*

3. *IZSLER - Sezione di Forlì*

4. *Università di Bologna, Dip. di Sanità Pubblica Veterinaria*

Abstract

L'obiettivo è quello di superare la gestione della pollina come rifiuto e la necessità di terreni agricoli per il suo spandimento, attraverso la produzione diretta di fertilizzante di qualità, igienico, in grado di migliorare la struttura del terreno e la sua fertilità, oltre a recuperare il suolo dalla predesertificazione.

In dettaglio, l'obiettivo del progetto era quello di verificare l'igienizzazione della pollina di gallina ovaiole tramite bio-trattamento, ai sensi delle indicazioni contenute nel Reg. (CE) 1774/2002. Il prodotto ottenuto non è un rifiuto, ma un fertilizzante organico igienico, sicuro e commerciabile.

La pollina, essiccata a tre diversi livelli di umidità tramite MDS (Manure Drying System), è stata trattata all'interno di big-bags e in cumulo, con l'aggiunta di PAV (principi attivi vegetali) biocatalizzatori di origine vegetale, in un allevamento avicolo del nostro Paese.

Il campionamento e le analisi sulla pollina, prelevata a -3 (prima dell'ingresso nel MDS), 0, 38, 81, 123 giorni, sono stati condotti seguendo il Reg. (CE) 1774/2002 che prevede durante il processo:

- la riduzione di 5 unità log 10 di *Enterococcus faecalis*;
- la riduzione di 3 unità log 10 di *Parvovirus*.

Sono inoltre richieste nel prodotto finito e nell'immagazzinamento rispettivamente:

- concentrazione di *Escherichia coli* inferiore o uguale a 1.000 ufc/g;
- assenza di *Salmonella* spp.

In questa fase iniziale, a causa della elevata resistenza ambientale degli elementi di dispersione dei parassiti, abbiamo aggiunto anche la valutazione dell'attività dei PAV sulle oocisti dei coccidi e sulle uova di ascaridi. Questo ha giustificato il prelievo di campioni al giorno -3 utile per valutare la carica parassitaria della pollina all'atto della emissione. Contemporaneamente sono stati ricercati anche miceti patogeni e saprofiti. Per l'assenza di malattie da *Parvovirus* nel pollame, allo scopo di ottemperare al reg. (CE) 1774/2002, abbiamo sviluppato una prova "figlia" in condizioni controllate, aggiungendo *Parvovirus* di origine suina nella pollina.

In generale, l'attività sperimentale di MIDA ha dato buoni risultati nella riduzione dei parametri biologici dopo 123 giorni, dati che incoraggiano gli autori a perseverare nello sviluppo del progetto ed anche nella ricerca di un sostegno finanziario.

Overall, the goal is to overcome the management of manure as waste and the agricultural lands need for its spreading through the direct production of quality

hygienic fertilizer, that improves the soil structure, enhances its fertility and rehabilitates for predesertification.

In details, the aim of the project was to verify laying hen manure (LHM) hygienisation by bio-treatment, according to Reg. (CE) 1774/2002 indications. The obtained product, should be transformed not in a waste, but in an hygienic and marketable safe organic fertilizer.

LHM dried at three different level of humidity by MDS (Manure Drying System) was treated inside big-bags and pile, by adding PAV (Vegetal Active Principles) a biocatalyst of plant origin, in a poultry farm in Italy.

Manure sampling and analysis, taken at days -3 (before MDS), 0, 38, 81, 123, were carried out following Reg. (CE) 1774/2002 and taking into account also the chemical nutrients considered in D. Lgs. 217/06. Objectives for thermal and chemical process are:

- absence of *Salmonella* spp. in 25 grams;
- concentration of *Escherichia coli* in 1 gram lower than or equal to 1000 u.f.c.;
- reduction 5 log 10 of *Enterococcus faecalis* in 1 gram;
- reduction 3 log 10 of *Parvovirus*.

In this early stage, due to the high environmental resistance of dispersal stages of parasites, we have added also the evaluation of PAV's activity on coccidia and ascarid eggs. This justified the sampling at day -3 useful to assess the parasites burden in the fresh LHM.

Also pathogen and saprophytic fungi were searched with the same timing.

Due to the absence of *Parvovirus* in poultry, to follow the reg. (CE) 1774/2002 we have developed a “daughter” trial in controlled conditions adding *Parvovirus* of swine origin to LHM.

From a general point of view, the experimental activity of MIDA has shown good results in reducing biological parameters after 123 days and appears to be encouraging for the authors to go on, developing the project and searching for financial support.

Premessa Contesto applicativo

MIDA (Manure hygienisation Development and Application) è un progetto di ingegnerizzazione di un processo di igienizzazione delle deiezioni (tecnicamente definite pollina) delle galline ovaiole, attraverso l'applicazione di nuove tecnologie biologiche (bio-trattamento). L'obiettivo generale del progetto mira a superare la gestione della pollina come sottoprodotto e la necessità di disporre di suolo agricolo per la sua distribuzione, attraverso la produzione diretta di un fertilizzante di qualità con la capacità di migliorare la struttura dei terreni per una loro maggiore fertilità e un recupero della predesertificazione. Obiettivo specifico della sperimentazione è la verifica dell'igienizzazione della pollina di galline ovaiole essiccata tramite MDS (Manure Drying System), rispettando le indicazioni contenute nel reg. CE 1774/2002 s.m.i. In termini pratici si richiede durante il processo (Allegato VIII, cap. III):

- la riduzione di 5 unità log 10 di *Enterococcus faecalis*;
- la riduzione di 3 unità log 10 di *Parvovirus*.

Sono inoltre richieste nel prodotto finito e nell'immagazzinamento

rispettivamente:

- concentrazione di *Escherichia coli* inferiore o uguale a 1.000 ufc/g;
- assenza di *Salmonella* spp.

Il prodotto ottenuto, tenendo conto anche dei nutrienti chimici considerati nel D. Lgs. 217/06, non è più un sottoprodotto, ma un fertilizzante organico igienico e sicuro che può essere immesso sul mercato.

MIDA è ispirato dalla necessità di risolvere:

- 1) il costoso smaltimento della pollina in eccesso;
- 2) l'inquinamento ambientale correlato alla pollina;
- 3) la mineralizzazione troppo veloce dell' azoto;
- 4) il divieto di commercializzazione della pollina come fertilizzante a meno che non sia sottoposta ad adeguato processo igienizzante, conformemente alla normativa vigente reg. CE 1774/2002 e s. m. i., che prevede il mantenimento del materiale a 70 °C per almeno un'ora.

1) La legislazione europea e la normativa italiana (direttiva nitrati CEE/91/676 e PUA: Piano di Utilizzo Agronomico, D. Lgs. 152/99) prevedono l'individuazione preventiva di terreni convenzionati a disposizione e l'uso delle deiezioni animali con vincoli di distribuzione di 340 kg di azoto per ettaro, ridotti a 170 nei terreni vulnerabili. Il mancato rispetto di questi limiti può portare all'inquinamento delle falde acquifere sottostanti i terreni ed a problemi di asfissia nel suolo. Alcune province, come ad esempio quella di Forlì-Cesena, non hanno a disposizione suolo agricolo sufficiente per il numero di animali allevati, con il rischio di dover ridurre la produzione di pollame.

2) Un uso con spandimento improprio della pollina sul suolo può essere fonte di inquinamento, causando:

- a) contaminazione da nitrati delle acque sotterranee;
- b) emissioni in atmosfera di odori e di sostanze inquinanti, tra cui l'ammoniaca;
- c) eutrofizzazione delle acque di superficie dal deflusso di composti dell'azoto e del fosforo;
- d) inquinamento di acqua potabile da agenti patogeni.

3) Attualmente, in Italia, il concime è sparso sui campi, sui terreni agricoli ed interrato in pre-semina (in base alla legislazione citata). L'azoto (elemento fondamentale per lo sviluppo e la crescita delle piante) in essa contenuto, composto ureico, mineralizza in poche settimane; è prontamente disponibile per l'inquinamento ma non viene assorbito dalle piante, a meno che non siano caratterizzate da un ciclo di vita breve.

4) questo trattamento è costoso in termini di energia e difficile da attuare da parte degli agricoltori.

Il raggiungimento degli obiettivi del progetto MIDA può contribuire al superamento di problematiche ambientali quali:

A) l'esaurimento materia organica nel suolo a causa della produzione intensiva con l'utilizzo di fertilizzanti sintetici, che riduce la quantità di carbonio nel terreno, provoca la compattazione dei suoli (riduzione della porosità), e ne riduce la ritenzione idrica;

B) i cambiamenti climatici in corso che hanno effetto diretto sulle condizioni di

produzione agricola e sul suolo stesso; queste modifiche influenzano l'intensità e la distribuzione delle precipitazioni durante tutto l'anno (periodi caratterizzati da piogge intense e frequenti sono seguiti da periodi di siccità), stressando le colture, in particolare quelle ad alto fabbisogno idrico (mais, frutta, verdura), aumentando il rischio di erosione e frane.

Protocollo operativo

Materiali utilizzati

Con il progetto MIDA è stata testata una tecnologia italiana innovativa, sviluppata e brevettata da AMEK s. c. r. l. e CTI ("Processo di maturazione e stabilizzazione di biomassa per ridurre le emissioni maleodoranti", numero EP1314710). Il brevetto si riferisce a Principi Attivi Vegetali (PAV), un prodotto complesso, contenente una miscela di enzimi, biocatalizzatori preparati con piante o parti di esse. I PAV sono stati sviluppati con l'obiettivo primario di accelerare il processo di stabilizzazione aerobica della biomassa, e di conservare l'azoto in una forma a lento rilascio.

La miscela enzimatica è preparata utilizzando, come materie prime, piante appartenenti alle famiglie delle Cucurbitacee, Graminacee, Labiate, Ombrellifere e Rutacee oppure parti di esse in grado di sviluppare aromi. I vegetali vengono raccolti nel loro periodo balsamico e dopo l'eliminazione di parti danneggiate o non idonee, vengono sminuzzati fino a raggiungere le dimensioni di un chicco di riso. Segue la miscelazione con liquidi naturali fino ad ottenere una poltiglia semisolida (<http://ep.espacenet.com>). Per il prodotto vengono individuati anche i dosaggi di impiego variabili tra 0,1 e 2 kg/m³ di substrato da trattare.

Tipologia di pollina

E' stata impiegata la pollina essiccata tramite MDS (Manure Drying Sistem) proveniente da diversi capannoni di allevamento intensivo di galline ovaiole stabulate in gabbia (Petronelli, 2008). Gli animali erano tutti di razza Hyline brown, allevati in batteria, provenivano da pulcinaie sempre in batteria; erano stati vaccinati per malattia di Marek, pseudopeste aviare, bronchite infettiva, malattia di Gumboro, laringotracheite infettiva, vaiolo, corizza, *Salmonella* (ceppo *enteritidis*), encefalomielite, *Micoplasma gallisepticum*, sindrome del calo dell'ovodeposizione.

Tipologia di impianto

Si è previsto di testare sia la produzione di pollina direttamente in big bag, quindi la confezione già pronta per la commercializzazione finale, sia in cumulo presso le tettoie di stoccaggio presenti in allevamento. Lo schematizzazione del sistema di produzione del fertilizzante nel suo complesso è riportato in Figura 1.

La sperimentazione è stata condotta nel periodo novembre 2008 – aprile 2009.

Disegno sperimentale

Il progetto è stato sviluppato tramite l'applicazione del Design of Experiment (DOE). Si tratta di una metodologia statistica per la progettazione di un esperimento usata per descrivere un processo biologico complesso (Montgomery, 2005) . La DOE riduce il numero di esperimenti da effettuare in sistemi complessi caratterizzati da molte variabili che influenzano il processo. Il procedimento logico è riportato nella figura 2.

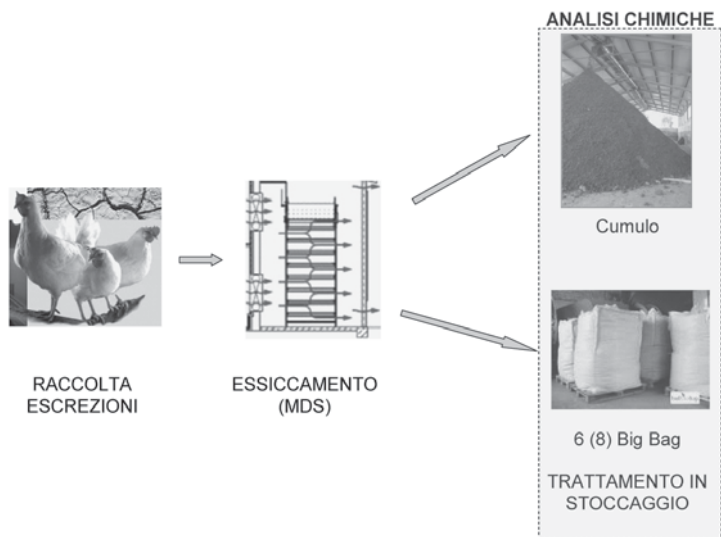


Figura 1. Schema a blocchi del processo di produzione del fertilizzante

La fase 1 (screening iniziale) è stata condotta su test e prove di trattamento eseguite negli anni precedenti presso lo stesso impianto ed ha permesso di individuare il grado di essiccamento iniziale della pollina (SS%) e il tempo di maturazione (t) quali fattori significativi¹ da usare come variabili di processo. È stata effettuata la fase 2 di approfondimento, per valutare gli effetti dei fattori significativi e le loro interazioni. Si è realizzato un esperimento fattoriale completo 2^k (*full factorial*), in cui k rappresenta il numero dei fattori (2), cioè 2^2 con 4 punti centrali (Petronelli, 2008).

Le analisi sono state pianificate a 38, 81, 123 giorni sulla pollina essiccata al 63%, 72%, 81%. I test sono stati eseguiti con trattamento della pollina all'interno di *big bags* (bioreattori) e in cumulo. Si è inoltre proceduto alla caratterizzazione della pollina all'uscita dell'MDS ($t = 0$) e si è deciso di effettuare prelievi anche a $t = -3$ g (prima dell'ingresso nel MDS) per caratterizzare il materiale appena escreto e valutare gli effetti dell'MDS su diversi agenti biologici.

Il **trattamento** è stato eseguito tramite additivazione di Principi Attivi Vegetali (PAV), in un'unica soluzione, nello strato inferiore dei *big bag* durante il loro allestimento, e sul cumulo in parecchi punti verso la fine della sua formazione, al tempo $t = 0$. I dosaggi di impiego sono stati di 1kg per big bag ($\geq 1m^3$).

Nel caso del trattamento in cumulo, la sua formazione ha richiesto 4 settimane, con un volume (stimato) di $480 m^3$; sono stati utilizzati 90 kg di PAV additivati durante la sua formazione.X

¹ Altri fattori quantitativi (variabili indipendenti) hanno influenza sul processo (ad es. temperatura del sistema, pH), ma non possono essere controllati, pertanto ci siamo limitati unicamente a misurarli. Ancora altri fattori di tipo qualitativo (presenza di tettoia/assenza di tettoia, sistema di gestione della pollina, tipo di impianto, estate/inverno, trattato con PAV/non trattato) che per motivi tecnici e logistici non sono stati considerati.

Campionamento

La procedura di campionamento si basa su istruzioni contenute nel regolamento (CE) 1774/2002 (allegato VIII, capitolo III), che indica la necessità di effettuare analisi su 5 campioni dello stesso tipo di materiale. Pertanto, al momento del campionamento, per ogni big bag e per il cumulo, sono stati prelevati 5 campioni per le analisi batteriologiche e virologiche e 5 campioni per l'analisi parassitologiche e micologiche. Si è scelto di aprire e vuotare completamente i sacconi per ogni prelievo. Per questo motivo sono stati allestiti nuovi big bag, 1 per ogni momento del campionamento. X Le analisi batteriologiche e virologiche sono state effettuate in giornata .

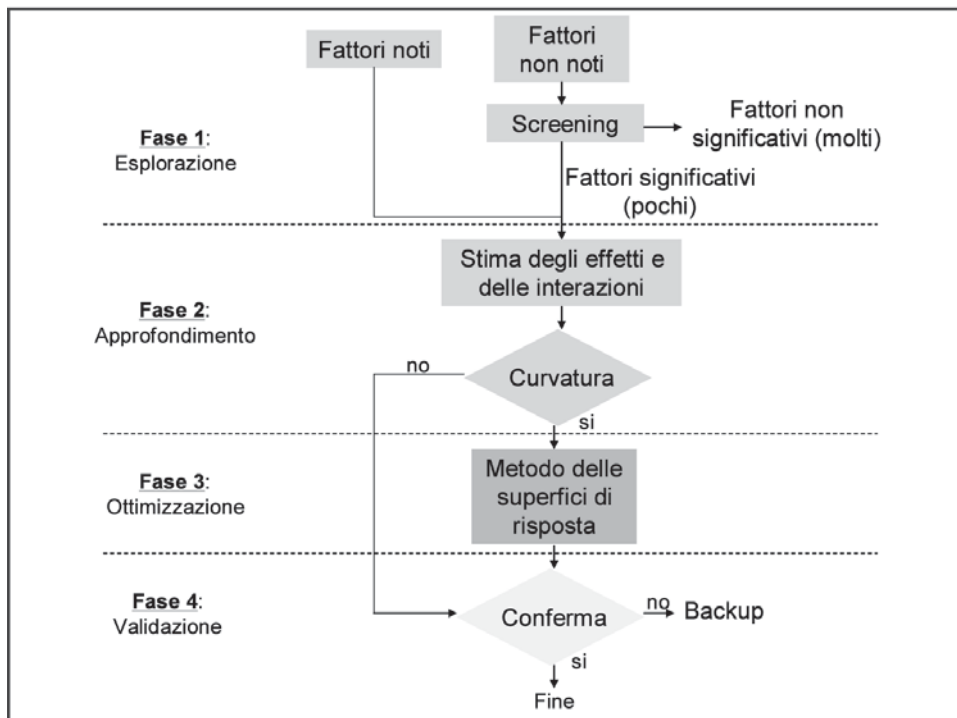


Figura 2. Schema del disegno sperimentale

Metodologie analitiche

In accordo con il Reg. (CE) 1774/2002, sono state effettuate **analisi** sui campioni di pollina per rilevare come la presenza di batteri (*Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella* spp) e virus (*Parvovirus*) varia nel tempo. Sono stati ricercati anche funghi e protozoi (*Eimeria* spp.), per la notevole resistenza delle forme di dispersione nell'ambiente.

Le analisi, di tipo batteriologico, virologico, parassitologico e micologico, sono state condotte in base alle linee guida indicate nel regolamento 1774/2002, recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale non destinate al consumo umano, utilizzando le metodiche ISO 9000.

a) Esami batteriologici.

Gli esami batteriologici sono mirati alla individuazione di *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* spp. ed *Escherichia coli*, in base alle metodiche descritte in “Manual of standars for diagnostic tests and vaccines” dell’ Office International des Epizooties (World Organisation for Animal Health).

Il metodo adoperato consente la numerazione degli Streptococchi (o Enterococchi) fecali formanti colonia e si sviluppa in 5 stadi successivi:

1. allestimento dell’omogenato;
2. allestimento delle diluizioni seriali decimali successive;
3. allestimento delle piastre;
4. incubazione;
5. lettura, conferma e numerazione delle colonie caratteristiche.

b) Esami virologici.

Gli esami virologici, mirati all’isolamento di parvovirus, sono stati condotti seguendo le metodiche descritte in “Manual of standars for diagnostic tests and vaccines” (Fourth edition, 2000). Sono state eseguite analisi al microscopio elettronico, utilizzando il metodo di colorazione negativa, noto anche come “metodo della goccia”.

c) Esami parassitologici.

Gli esami parassitologici sono stati volti ad isolare ed identificare le specie di coccidi eventualmente presenti e le uova di eventuali elminti. Sono stati realizzati esami copromicroscopici per concentrazione a mezzo centrifugazione e successiva levitazione in soluzioni ad alto peso specifico (1300 kg/m³), secondo “Manual of Veterinary Parasitology - Laboratory techniques” (MAFF/ADAS, 1986).

d) Esami micologici.

Per gli esami micologici i campioni, dopo l’allestimento ottenuto sospendendo 2 g di feci in 10 ml di soluzione fisiologica sterile antibiotata (50.000 U di Penicillina G Potassica e 50.000 U g di streptomina / 100 ml di soluzione fisiologica), sono stati lasciati in frigorifero per una notte. Per ogni campione si procedeva alla semina di 0,1 ml di sospensione, in doppio, su piastre di terreno ai semi di niger e creatinina (Shields e Ajello, 1966). Le piastre erano poi incubate a 26°C e 37°C per 10 giorni e controllate periodicamente. Le colonie di lieviti sviluppatasi venivano trapiantate su Sabouraud dextrose agar e incubate a 26°C per 2-3 giorni per essere quindi identificate, utilizzando primariamente gallerie API20C AUX (Biomérieux) e allestendo piastre di Dalmau su Yeast Morphology agar (DIFCO). Quando necessario, sono stati effettuati esami microscopici con tecnica di contrasto con inchiostro di china e test aggiuntivi di crescita e/o fermentazione.

Risultati e discussione

Caratterizzazione iniziale della pollina

La caratterizzazione biologica qualitativa della pollina appena escreta (t = -3) ha rilevato la presenza di *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, coccidi, miceti (*Candida albicans*, *Geotrichum klebahnii*, mucoracee) e l’assenza di *Salmonella* spp. e *Parvovirus*.

Enterococcus faecalis

I risultati delle determinazioni sono riportati in Tabella 1, per ogni sacco (o big bag) e per il cumulo (P- pile); l'anadamento della concentrazione media nei big bag è riportata in figura 2. Per quanto riguarda *Enterococcus faecalis*, la sua presenza è stata riscontrata in tutti i campioni.

La sua concentrazione iniziale, nella pollina all'uscita del MDS, si è mantenuta costante sia nella pollina essiccata utilizzata per allestire i sacconi a novembre che a dicembre, con un ordine di grandezza pari a 10^9 u.f.c./g. Nella pollina utilizzata a febbraio, la concentrazione è compresa tra 10^5 e 10^6 u.f.c./g. L'evoluzione nel tempo è riportata in Tabella 1; la sua riduzione, in unità logaritmiche è riportato nel grafico di Figura 2. *Enterococcus faecalis* si è ridotto di 6 unità logaritmiche dopo 123 gg. La riduzione di 5 unità logaritmiche in base 10, come previsto dalla normativa, è raggiunta nei big bag in soli 105 giorni (fig. 2).

Tabella 1 Andamento dell'*Enterococcus faecalis* nel corso della sperimentazione per singoli sacchi (big bag) e nel cumulo (P-pile)

% S.S. a t = 0	SACCO	B (t = 0)	C (t = 38)	D (t = 81)	E (t = 123)
63	11	$4,2 \times 10^9$			< 100
72	2	$8,5 \times 10^9$		$2,0 \times 10^5$	
72	3	$3,9 \times 10^9$		$4,0 \times 10^5$	
81	4	$8,4 \times 10^9$			$4,0 \times 10^2$
72	44	$4,0 \times 10^6$		$9,0 \times 10^3$	
72	5	$4,3 \times 10^9$		$5,0 \times 10^7$	
81	6	$2,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$		
72	7	$9,0 \times 10^9$			$3,0 \times 10^3$
63	77	$4,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$		
55	P	$1,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$	<100

CONSIDERAZIONI IN MERITO:

B→C: 77: ↓2 unità logaritmiche
6: =
P: =

B→D: 2: ↓ 4 unità logaritmiche
3: ↓ 4 unità logaritmiche
44: ↓ 3 unità logaritmiche
5: ↓ 2 unità logaritmiche
P: =

B→E: 11: ↓ 7-8 unità logaritmiche
4: ↓ 7 unità logaritmiche
7: ↓ 6 unità logaritmiche
P: ↓ 4-5 unità logaritmiche

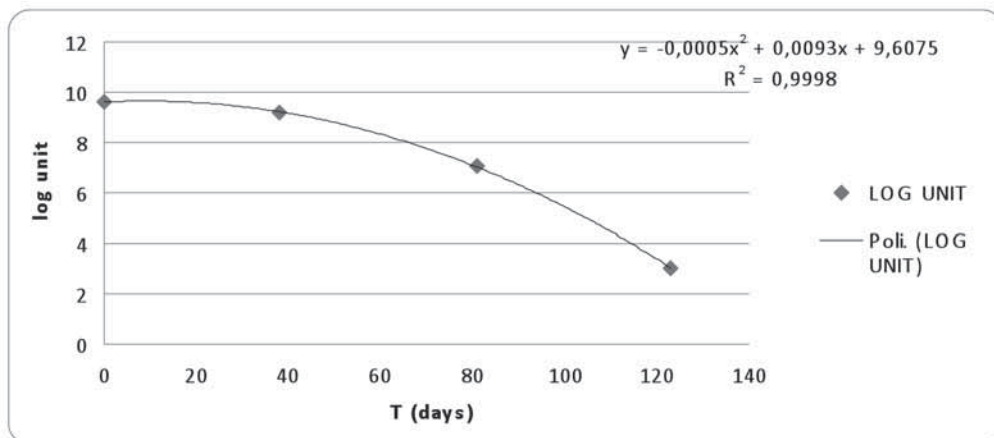


Figura 3. Andamento della concentrazione di *Enterococcus faecalis* nel tempo

Salmonella spp.

Questo patogeno, come atteso, era, assente nei campioni a $t = 0$, e la situazione si è mantenuta tale in tutti i prelievi successivi per entrambe le modalità operative (big bag e cumulo).

Escherichia coli

Presente in tutti i campioni per entrambe le modalità operative ha mostrato al termine del processo ($t = 123$) una concentrazione inferiore a 1000 u.f.c./g come richiesto dalla normativa.

Parvovirus

Non presente a partire da $t = 0$ e per tutti i campioni successivi. Per l'assenza di malattie da *Parvovirus* nel pollame, allo scopo di ottemperare al Reg. 1774/2002 abbiamo sviluppato una prova "figlia" in condizioni controllate, aggiungendo *Parvovirus* di origine suina nella pollina, patogeno risultato assente a fine processo, diminuito di 4 log 10 (la legge prevede un calo minimo di 3 unità).

Coccidi

I coccidi, presenti a $t = -3$ con una media di 808 OPG (range meno di 20-7180) hanno mantenuto la loro presenza lungo il processo dimostrando a $t = 123$ l'assenza di sporulazione e la contemporanea presenza di profonde alterazioni nella parete delle oocisti, indice di devitalizzazione.

Tabella 2. Andamento dei coccidi nel corso della sperimentazione nei sacchi (big bag) e nel cumulo (P-pile)

% S.S. a t = 0	SACCO	B (t = 0)	C (t = 38)	D (t = 81)	E (t = 123)
63	11	-----+			-----
72	2	+		---+ +-	
72	3	+		-	
81	4	+			+++++
72	44	--+ +-		-----	
72	5	+		+	
81	6	+++++	-----		
72	7	+			+++++
63	77	--+ +-	---+/-		
55	P	++++-	-----	-----	-----

Considerazioni

Dai risultati ottenuti è emersa sostanzialmente l'efficacia del trattamento con PAV della pollina nel trasformare il prodotto ottemperando le norme igieniche vigenti. I batteri, o hanno mantenuto la loro assenza (*Salmonella* spp.) oppure hanno ridotto la loro presenza anche oltre quanto previsto dalla legge. E' importante notare come il fenomeno si sia registrato sia nel cumulo sia nei big bag. Anche la sperimentazione "figlia" che siamo stati costretti a sviluppare con il parvovirus ha dimostrato di raggiungere l'obiettivo di eliminare questo patogeno dal materiale nei tempi previsti. Se vogliamo poi aggiungere un dato a nostro parere di estremo interesse, riteniamo importante l'osservazione relativa alla devitalizzazione delle oocisti dei coccidi che rappresentano forme di diffusione di questi protozoi fra le più resistenti in natura. L'attività dei PAV è quindi a largo spettro, abbracciando batteri, virus e protozoi e, come abbiamo potuto osservare, può essere ottimizzata da una riduzione della sostanza secca che ne abbrevia i tempi di efficacia dai 123 giorni previsti a 80. Il dato appare molto importante ma suggestivo di ulteriori approfondimenti la cui portata pratica potrebbe risultare in indubbi vantaggi economici.

Bibliografia

- MAFF/ADAS Ministry of Agriculture Fisheries and Food, 1986. "Manual of Veterinary Parasitology - Laboratory techniques" Reference Book 418, London, UK.
- Montgomery D.C., 2005. "Design and Analysis of Experiments" VI ed., John Wiley & Sons, New York
- Office International des Epizooties (World Organisation for Animal Health), anno. "Manual of standards for diagnostic tests and vaccines" Fourth edition, 2000.
- Petronelli, 2008. "Stabilizzazione e utilizzazione della pollina ai fini agronomici" Tesi di laurea Specialistica in Ingegneria Chimica. A.A. 2007/2008. Università di Bologna;
- Shields AB, Ajello L. (1966). "Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*". Science, 151:208-209.