





# I GEORGOFILI

Quaderni  
2013-I



AFLATOSSINE DEL MAIS.  
DALL'EMERGENZA ALLA PREVENZIONE

Firenze, 21 marzo 2013



EDIZIONI POLISTAMPA

*Con il contributo di*



ENTE CASSA DI RISPARMIO DI FIRENZE

Copyright © 2013  
Accademia dei Georgofili  
Firenze  
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti della Accademia dei Georgofili»  
Anno 2013 - Serie VIII - Vol. 10 (189° dall'inizio)

Direttore responsabile: Paolo Nanni

Edizioni Polistampa  
Via Livorno, 8/32 - 50142 Firenze  
Tel. 055 737871 (15 linee)  
[info@polistampa.com](mailto:info@polistampa.com) - [www.polistampa.com](http://www.polistampa.com)  
Sede legale: Via Santa Maria, 27/r - 50125 Firenze

ISBN 978-88-596-1302-2

Servizi redazionali, grafica e impaginazione  
SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA

## INDICE

MARCO PASTI <i>La produzione di mais in Italia</i>	7
PAOLA BATTILANI, MARCO CAMARDO LEGGIERI, PAOLA GIORNI, ANTONIO MAURO <i>Aspergillus flavus in mais: conoscere per prevenire le contaminazioni</i>	17
AMEDEO REYNERI, MASSIMO BLANDINO, FRANCESCA VANARA <i>L'agrotecnica per la prevenzione della contaminazione da aflatossina in campo e nel post raccolta</i>	33
EMANUELE MAZZONI, PIERO CRAVEDI <i>Prevenire le aflatossine attraverso il controllo degli insetti</i>	49
LUCIA BAILONI, AMEDEO PIETRI, ANTONIO GALLO, FRANCESCO MASOERO, GIANFRANCO PIVA <i>Le aflatossine nelle filiere agro-alimentari: dal feed al food</i>	57
CARLO BRERA, CHIARA GUARINO <i>Aflatossina B1 nel mais: aspetti normativi e valutazione dei residui nelle specie animali</i>	83



MARCO PASTI\*

## La produzione di mais in Italia

Il mais viene coltivato in Italia su 950.000 ettari per la produzione di granella e su 350.000 ettari per la produzione di foraggio verde insilato destinato per 250.000 all'alimentazione dei bovini e per 100.000 ettari alla produzione di biogas<sup>1</sup>. La produzione si concentra nelle regioni della pianura padano veneta, dove si produce oltre il 90% del mais italiano. La coltivazione si svolge sia in regime irriguo che in asciutta, il primo è tendenzialmente più diffuso nelle aree pedemontane data l'abbondante disponibilità d'acqua irrigua e la minor capacità di ritenzione dei terreni, mentre il regime in asciutta è tendenzialmente più diffuso nella parte centrale e sud orientale della pianura padana dove i terreni più profondi garantiscono in annate normali una sufficiente riserva idrica anche in assenza di disponibilità di acqua irrigua. La coltura in irriguo è generalmente condotta con approccio più intensivo e mira ottenere a produzioni di 12-15 ton/ha mentre la coltura in asciutta viene normalmente impostata per rese di 9-11 ton/ha.

Il mais, introdotto in Italia nel Rodigino per coltivazioni estensive già a metà del 1500 (Gasperini, 2002), veniva coltivato all'inizio del 1900 su quasi due milioni di ettari. Le sue superfici si sono progressivamente ridotte nel corso del '900 fino a scendere sotto gli 800 mila ettari a metà degli anni '80 per poi recuperare parte della superficie negli anni successivi (fig. 1) (ISTAT, 2013a).

La riduzione delle superfici ha portato a una riduzione delle produzioni solo fino a metà del '900 poiché nel dopoguerra l'aumento delle rese ottenuto sia tramite il miglioramento della tecnica agronomica sia tramite il

\* *Associazione Italiana Maiscoltori, Venezia-Mestre*

<sup>1</sup> Elaborazione personale su dati ISTAT, CRPA, ASSOSEMENTI.

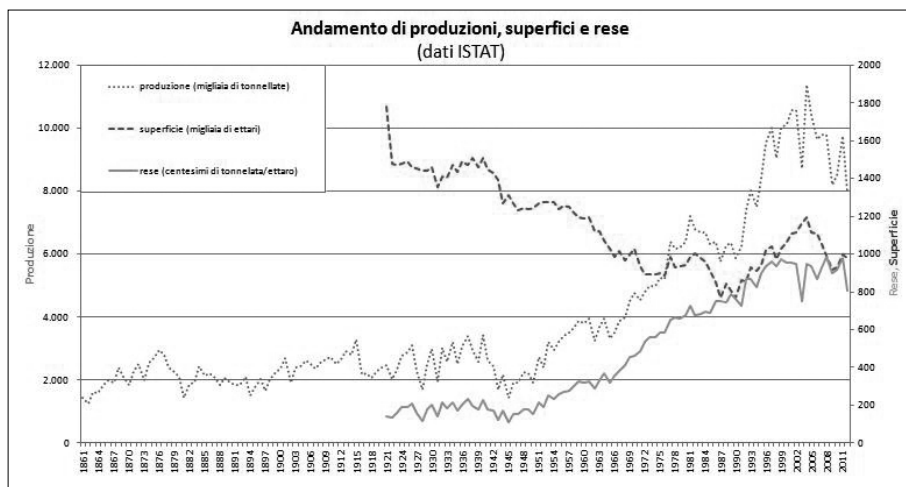


Fig. 1 *Andamento delle superfici, produzioni e rese in Italia (elaborazione su dati ISTAT)*

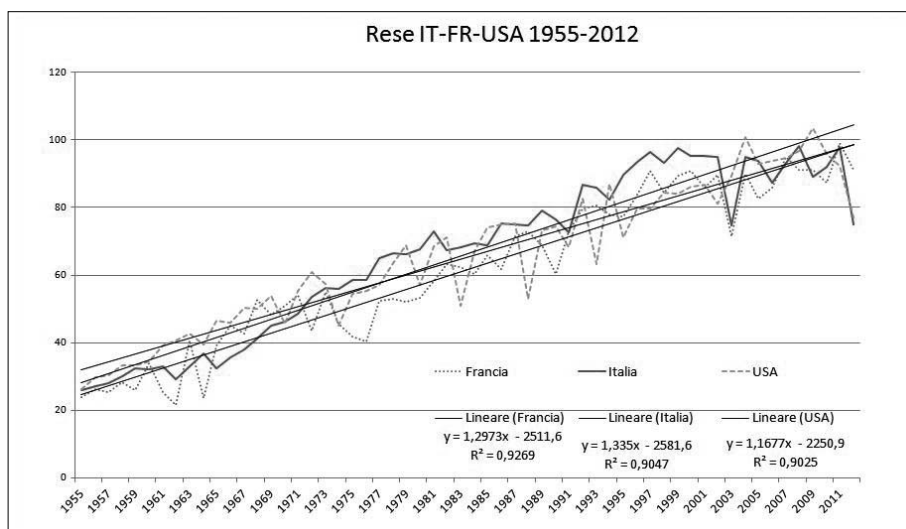


Fig. 2 *Andamento delle rese in Italia Francia e USA dal 1955 al 2012 (elaborazione su dati USDA e Eurostat)*

miglioramento genetico, ha permesso di recuperare ampiamente la riduzione delle superfici tanto che a metà degli anni '90 si è giunti a superare il quantitativo di 10 milioni di tonnellate (ISTAT, 2013b) arrivando quindi a coprire quasi totalmente i consumi nazionali di questo cereale. In particolare l'introduzione di varietà ibride avvenuta a partire dagli anni '50 ha



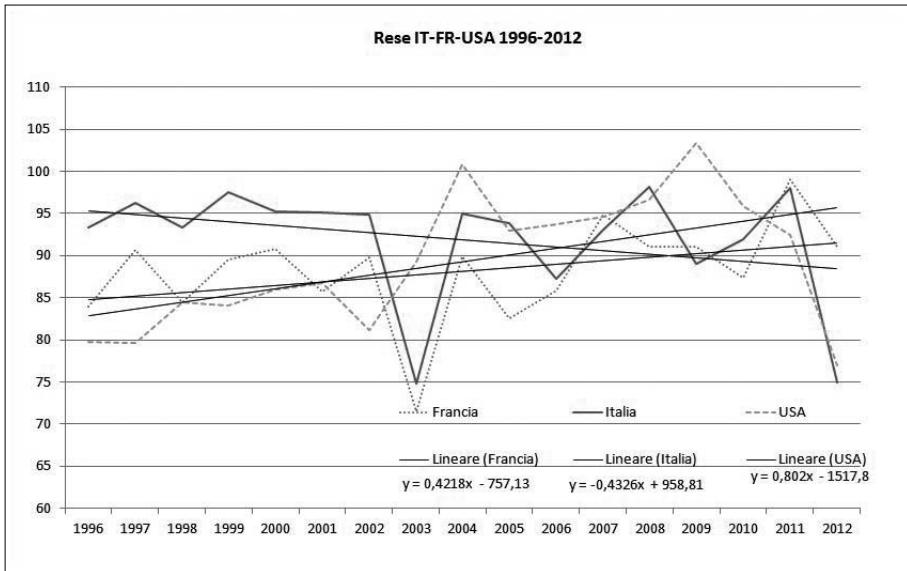


Fig. 3 Andamento delle rese in Italia Francia e USA dal 1996 al 2012 (elaborazione su dati USDA e Eurostat)

consentito un aumento delle rese tra gli anni '60 e '90 di oltre 150 kg/ha/anno (fig. 2).

Altri fattori importanti che hanno contribuito all'innalzamento delle produzioni in quegli anni sono stati la politica agricola comunitaria (PAC) che sosteneva i prezzi interni alla Comunità Europea rispetto al mercato mondiale e gli investimenti in infrastrutture, come le reti irrigue. La fase di sviluppo della maiscoltura è avvenuta in parallelo allo sviluppo della zootecnia che ha trovato in questo cereale la principale materia prima per l'alimentazione zootecnica, per le filiere di carne, latte e uova. Oggi oltre l'80% del mais è destinato all'alimentazione animale mentre la quota destinata all'alimentazione umana, che all'epoca dell'unità d'Italia era la prima destinazione (Gasperini, 2002), non raggiunge il 5%. La rimanente parte è destinata a usi industriali e principalmente alla produzione di amido.

A partire da metà degli anni '90 le condizioni sono sostanzialmente mutate: la PAC ha trasferito l'aiuto ai redditi agricoli dal sostegno dei prezzi a un contributo disaccoppiato dalla produzione (fig. 4), gli investimenti in infrastrutture si sono ridotti, in molte zone le reti irrigue e di scolo hanno via via perso di efficienza e il progresso genetico ha subito un netto rallentamento anche a causa della chiusura nel nostro paese alle piante geneticamente modificate. In questo scenario i redditi dei produttori si sono consistentemente

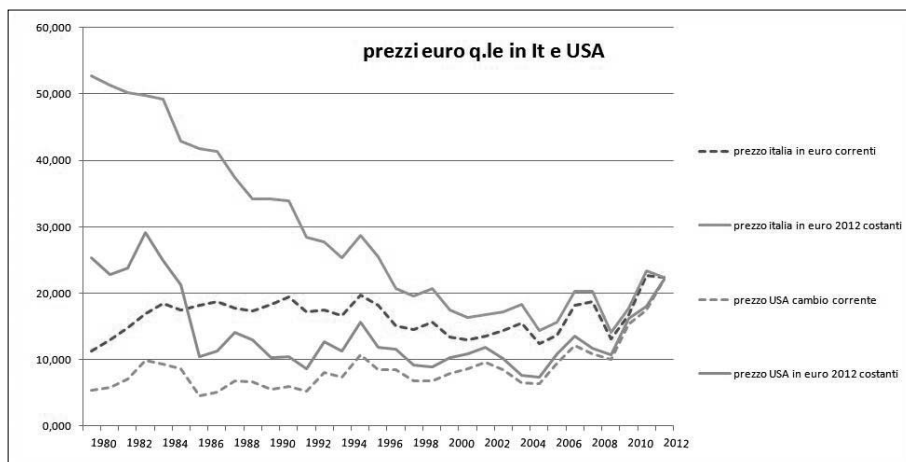


Fig. 4 Andamento dei prezzi in Euro 2012 in Italia e negli USA (Elaborazione su dati ISTAT, Banca d'Italia, USDA)

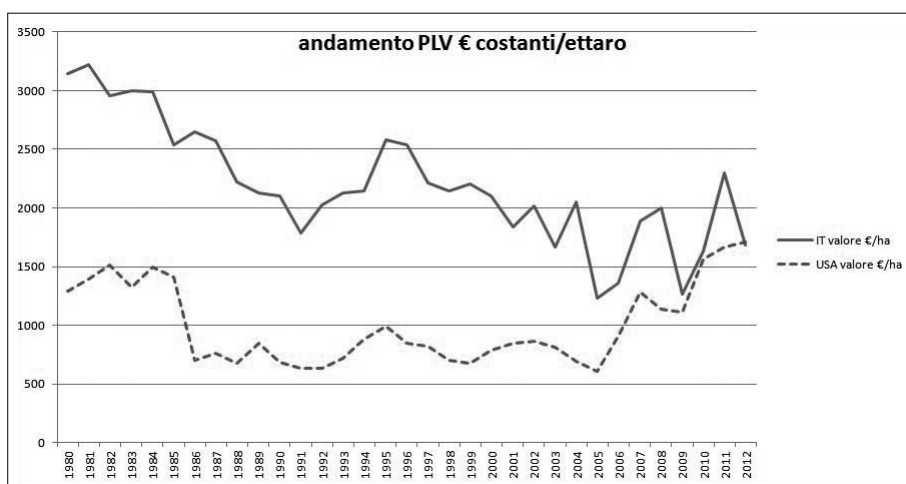


Fig. 5 Andamento del valore della produzione per ettaro in Italia e negli USA (Elaborazione su dati ISTAT, Banca d'Italia, USDA)

ridotti (fig. 5) e di conseguenza anche l'impegno profuso nella coltivazione del mais si è, in molti casi, ridotto per dedicare maggiore attenzione ad attività più remunerative. In questo contesto le rese del mais sono rimaste sostanzialmente stagnanti mentre nel resto del mondo sono progressivamente aumentate (fig. 3).

La produzione risulta inoltre estremamente frammentata in aziende di piccola superficie la cui meccanizzazione è affidata in buona parte a imprese

agromeccaniche, che hanno saputo nel tempo dotarsi di macchine moderne ed efficienti con grande capacità produttiva, causando talvolta difficoltà di ricevimento nei centri di raccolta ed essiccazione del mais.

A livello globale le produzioni di mais sono costantemente aumentate grazie anche al miglioramento genetico che ha permesso maggiori incrementi delle rese del mais rispetto ad altre colture: dall'inizio degli anni duemila il mais è il primo cereale prodotto a livello mondiale e circa 2/3 degli oltre 850 milioni di tonnellate prodotti vengono utilizzati per l'alimentazione animale. All'inizio degli anni duemila l'aumento delle rese, portando l'offerta a volumi più elevati della domanda, aveva fatto scendere i prezzi a livelli poco remunerativi. L'ampia disponibilità di questo cereale ricco di amido a prezzi bassi ha stimolato lo sviluppo di nuove filiere come l'etanolo negli Stati Uniti che ha conosciuto negli scorsi anni fasi di sviluppo molto intenso arrivando a utilizzare 127 milioni (USDA, 2013) di tonnellate per la produzione di etanolo per autotrazione e di farine proteiche per l'alimentazione del bestiame. Questa nuova domanda di mais ha favorito una ripresa dei prezzi permettendo da una parte il recupero di una certa remuneratività anche nelle zone meno competitive, e dall'altra stimolando nuovi investimenti in ricerca e sviluppo. Inoltre va osservato che nel 2012, per la forte siccità che ha colpito gli Stati Uniti oltre che il sud est Europa, l'andamento elevato dei prezzi dei cereali ha indotto diversi impianti di etanolo a sospendere la produzione lasciando disponibile nel mercato 13 milioni di tonnellate di mais.

#### IL PROBLEMA DELLE MICOTOSSINE NELLA PRODUZIONE DI MAIS IN ITALIA

La pianura padano veneta è un ambiente vocato alla produzione del mais, ma al contempo caratterizzato da una forte presenza di piralide, che oltre a causare consistenti danni produttivi facilita lo sviluppo di muffe produttrici di un tipo di micotossine, le fumonisine, che sono presenti tutti gli anni con valori medi variabili tra 4.000 e 12.000 µg/kg. I valori più alti si riscontrano normalmente in annate caratterizzate dall'assenza di pioggia nel periodo della fioritura seguito da un periodo piovoso nella fase di maturazione. Nelle estati più fredde e umide con un allungamento della maturazione del mais a ottobre, specie negli areali più freschi, si possono sviluppare muffe produttrici di Deossinivalenolo, un altro tipo di micotossine più tipiche del centro nord Europa. Nelle annate più calde e siccitose invece il rischio principale specie negli areali più caldi e siccitosi, è legato allo sviluppo di un'altra muffa, l'*Aspergillus Flavus*, produttore di aflatossine che sono molto più tossiche delle altre

MONITORAGGIO AFLATOSSINE NEL MAIS 2012 - DATI AIRES + COORDINAMENTO CEREALI														
REGIONE	N. IMPIANTI MONITORATI - per fasce di prodotto stoccato (tons)					CALO CONSEGNE		Analisi effettuate	LIVELLI DI AFLATOSSINA B1 - prodotto stoccato per fasce di contaminazione (tons e % STIME AL 30.11.2012)					
	< 5000	< 10.000	< 15.000	< 20.000	>20.000	%	%		< 5ppb	< 20ppb	< 40ppb	< 80ppb	> 80ppb	Totale
VENETO	23	9	12	14	6	-45	17.082		138.250	200.300	212.610	271.150	158.050	980.360
	115.000	90.000	180.000	280.000	300.000				14,1	20,4	21,7	27,7	16,1	100,0
LOMBARDIA	1	2	2	3	3	-21	9.463		253.550	125.250	21.500	3.500	6.200	410.000
	5.000	20.000	30.000	60.000	300.000				61,8	30,5	5,2	0,9	1,5	100,0
PIEMONTE	0	3	0	0	0	-15	83		20.000	9.000	1.000	0	0	30.000
	0	30.000	0	0	0				66,7	30,0	3,3	0,0	0,0	100,0
EMILIA ROMAGNA	9	3	4	1	1	-51	2.660		8.550	68.550	29.000	35.950	44.950	185.000
	45.000	30.000	60.000	20.000	35.000				4,6	36,0	15,7	19,4	24,3	100,0
FRIULI V.G.	5	1	3	0	2	-25	2.038		96.250	33.000	750	0	0	130.000
	25.000	10.000	45.000	0	50.000				74,0	25,4	0,6	0,0	0,0	100,0
TOTALE	38	18	21	18	12	-31	31.326		516.600	434.100	264.860	310.600	209.200	1.735.360
	190.000	180.000	315.000	360.000	685.000				29,8	25,0	15,3	17,9	12,1	100,0

Nota: il monitoraggio riguarda un campione di 107 imprese con attività di essiccazione e stoccaggio di mais, rappresentativo di una quantità di prodotto di oltre 1,7 milioni di tons (pari a oltre il 25% della produzione stimata della corrente campagna 2012-2013)

Nota: il monitoraggio riguarda un campione di 107 imprese con attività di essiccazione e stoccaggio di mais, rappresentativo di una quantità di prodotto di oltre 1,7 milioni di tons (pari a oltre il 25% della produzione stimata della corrente campagna 2012-2013)

Fig. 6 Monitoraggio Aflatossine AIRES 2012 (comunicazione personale)

micotossine citate sopra e pertanto con limiti massimi molto inferiori e posti non solo per l'alimentazione umana, ma anche per quella animale. Due sono state le annate particolarmente critiche per queste micotossine: il 2003 caratterizzato da picchi di temperatura particolarmente elevati, ma non troppo duraturi, e il 2012 caratterizzato da una siccità iniziata già durante l'inverno e da temperature elevate presenti ininterrottamente da metà giugno a inizio settembre anche se con picchi meno estremi rispetto al 2003.

La contaminazione del 2003 è la prima avvisaglia di un problema che si è ripetuto in modo molto più esteso e grave nel 2012. Nel 2003 i volumi coinvolti erano inferiori e la contaminazione era prevalentemente esterna al chicco e quindi con interventi di decontaminazione tramite operazioni di pulitura intensa con le attrezzature presenti nei centri di raccolta è stato possibile gestire la maggior parte dei lotti facendoli rientrare entro i limiti di legge. I principali casi di contaminazione di mangimi oltre i limiti nel 2003 erano dovuti alla sorpresa di un problema mai verificatosi prima. Nel 2012 invece il problema si è manifestato in modo molto più grave sia per i volumi coinvolti, si stimano circa 2 milioni di tonnellate, oltre un quarto della produzione italiana, sia per i livelli di contaminazione, ben più alti che nel 2003, sia per la scarsa efficacia degli interventi di pulizia dalle polveri poiché lo sviluppo dell'aspergillo ha interessato anche la parte interna del chicco.

Sono quindi state fatte svariate prove di pulizia con macchine tecnologicamente più avanzate come i selezionatori ottici in grado di eliminare chicchi decolorati. L'impiego di queste macchine si è dimostrato efficiente solo per i lotti con contaminazioni non troppo elevate, generalmente inferiori ai 60/70 µg/kg, e con scarti di prodotto importanti dell'ordine del 30% (AIRES comunicazione personale).

I processi di detossificazione tramite ammoniaca o ozono sono a oggi difficilmente applicabili su larga scala sia per la mancanza di impianti autorizzati sia per la scarsa esperienza del settore. La destinazione agli impianti di biogas nonostante la loro recente diffusione, non appare oggi in grado di assorbire più di 2/300.000 tonnellate, anche nel caso in cui tutte le Regioni autorizzassero tale destinazione. Di fatto quindi a oggi non s'intravede quale destino possa avere oltre un milione di tonnellate stoccate nei magazzini che andrebbero liberati prima del prossimo raccolto.

La gestione delle partite è ulteriormente complicata dalle difficoltà di eseguire un campionamento rappresentativo, una corretta preparazione del campione e un'analisi riproducibile. Quando si cercano concentrazioni così basse, la rappresentatività del campione è molto difficile da garantire e la riproduci-

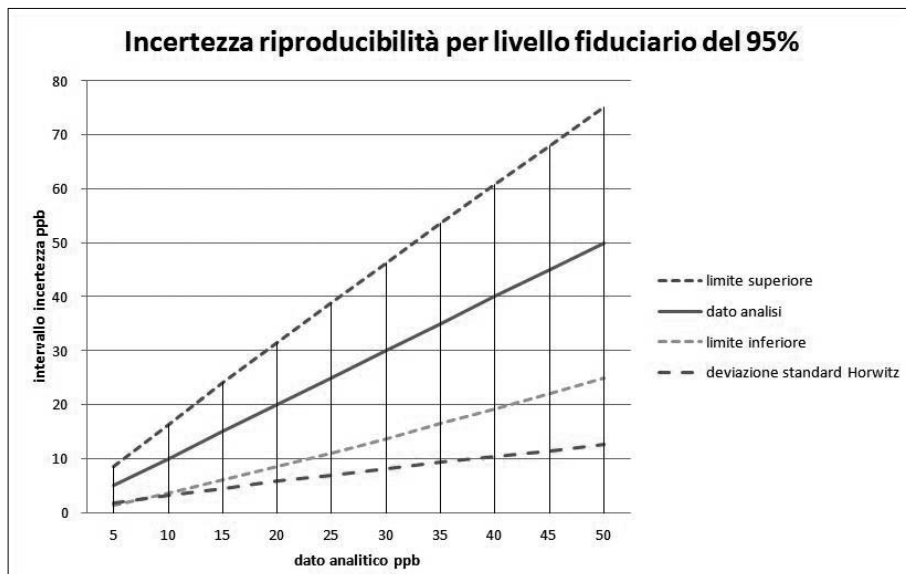


Fig. 7 *Calcolo della Deviazione Standard con la Formula di Horwitz e degli intervalli fiduciari rispetto al dato analitico*

bilità delle analisi scende di pari passo con la concentrazione cercata (AMC, 2004). Quello che interessa non è tanto la ripetibilità dell'analisi all'interno dello stesso laboratorio e con lo stesso metodo analitico, che viene spesso riportata nel certificato di analisi, ma la riproducibilità in laboratori diversi e con metodi diversi purché rispettino i requisiti minimi previsti dalle norme vigenti. Il legislatore europeo, che ha normato le procedure di campionamento e analisi per le derrate alimentari con il Reg. 401/2006 della Commissione, ha previsto di calcolare l'incertezza analitica legata alla riproducibilità delle analisi considerando il doppio della deviazione standard calcolata con la formula di Horwitz. Applicando tale formula, che non dipende dal tipo di sostanza ricercata e dal tipo di analisi ma solo dalla concentrazione cercata, si vede che l'incertezza per la riproducibilità analitica per un valore 20 ppb è pari a 11.5 ppb. Ovvero ripetendo 100 volte l'analisi, ci aspettiamo che almeno 95 volte il valore ottenuto sia compreso tra 8.5 e 30.5 ppb. Guardando questa incertezza dall'altro lato possiamo dire che un valore analitico di 41 ppb può non essere statisticamente diverso da 20 ppb. Poiché nel Regolamento 401/2006 è previsto che un lotto vada scartato quando supera il limite di legge al di là di ogni ragionevole dubbio si potrebbe dedurre che un dato analitico a 41 ppb non comporterebbe il rifiuto del lotto se si applicasse tale Regolamento anche alle materie prime per mangimi.

La scarsa ripetibilità delle analisi fatte per valori così bassi viene spesso trascurata e aggiunge non poche difficoltà agli operatori del settore poiché porta frequentemente a contestazioni della merce consegnata.

#### RIASSUNTO

Nel XVI secolo è iniziata in Italia la coltivazione estensiva di mais che era destinato prevalentemente all'alimentazione umana fino alla seconda metà del XIX secolo. Nel corso del XX secolo, nonostante il dimezzamento delle superfici, la produzione è aumentata di cinque volte grazie soprattutto al miglioramento genetico ottenuto con l'introduzione delle varietà ibride. La crescente disponibilità di questo cereale ha favorito un importante sviluppo delle filiere zootecniche di carne, latte e uova. In epoca recente la tenuta economica del settore maidicolo zootecnico è più incerta a causa della riduzione dei prezzi al netto dell'inflazione e del sostegno Comunitario oltre che del mancato incremento delle rese. L'impossibilità di impiegare varietà geneticamente modificate resistenti alla piralide ha reso più difficoltoso non solo l'incremento delle rese ma anche il contenimento delle micotossine. La crescente conoscenza dei problemi sanitari legati alla presenza delle micotossine e gli stringenti limiti normativi richiedono una sempre maggior attenzione alla gestione della coltura resa più difficoltosa nelle annate con andamenti climatici particolarmente anomali.

#### ABSTRACT

Extensive maize cultivation started in Italy in the 16th century and was principally used for direct human consumption until the second part of 19th century. During 20<sup>th</sup> century, the acreage dedicated to maize production halved, but the production increased 5 fold. This was mainly due to genetic improvements obtained with hybrid varieties. The growing availability of maize prompted a significant increase in the development of meat, milk and egg production. However more recently, the economy of the maize/animal production sector has become more uncertain. This has resulted from a combination of reduced prices (net of inflation), subsidies by the European Community, and the lack of further increases in yields. The slowed improvement in yields can be partially attributed to the banning of genetically modified ECB resistant varieties. Moreover, this ban has created difficulties in the control of mycotoxins, presenting a significant challenge in light of the growing knowledge of animal health problems. Tight legal limits require an always increasing control in the management of crops while extreme climate variations make that management all the more challenging

#### BIBLIOGRAFIA

- AMC (2004): *The amazing Horwitz function*, The Royal Society of Chemistry, «Amc Technical brief», No. 17, July 2004.
- GASPERINI D. (2002): *Polenta e formenton*, Cierre Edizioni, Sommacampagna, p. 15.

ISTAT (2013a): *Superficie delle principali coltivazioni erbacee: cereali e leguminose da granella, anni 1921-2011.*

ISTAT (2013b): *Produzione delle principali coltivazioni erbacee: cereali e leguminose da granella, anni 1861-2011.*

USDA (2013): <http://usda01.library.cornell.edu/usda/waob/wasde//2010s/2013/wasde-03-08-2013.pdf>



PAOLA BATTILANI\*, MARCO CAMARDO LEGGIERI\*,  
PAOLA GIORNI\*, ANTONIO MAURO\*

## *Aspergillus flavus* in mais: conoscere per prevenire le contaminazioni

### AFLATOSSINE NEL MAIS: I FUNGHI PRODUTTORI

La contaminazione da aflatossine nel mais è un problema a diffusione mondiale che è maggiormente presente nelle aree tropicali ma recentemente, a causa dei cambiamenti climatici in atto, si manifesta sempre più frequentemente anche in Europa. *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* sono ritenuti i principali responsabili della produzione di aflatossine; questi funghi sono xerofili e quindi più adatti a condizioni di alte temperature e piogge limitate o assenti (Payne, 1998).

*Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* sono funghi appartenenti alla medesima sezione di *Asperigilli*, la sezione *Flavi*, che possono contaminare i prodotti agricoli già in campo, al momento della raccolta, durante lo stoccaggio e durante i processi di trasformazione (Diener et al., 1987). Una caratteristica che aiuta a distinguere queste due specie è che *A. parasiticus* sembra essere più adattato all'ambiente terricolo con maggiore incidenza nelle arachidi, mentre *A. flavus* sembra essere più adattato all'ambiente aereo e fogliare risultando dominante nel mais e nel cotone (Diener et al., 1987). Entrambi queste specie possono produrre aflatossine.

I ceppi di *A. flavus* possono essere suddivisi in 2 gruppi sulla base della dimensione degli sclerozi che producono: i ceppi S sono quelli che producono sclerozi molto piccoli (<400 µm) e sono in grado di produrre alte quantità di aflatossine mentre i ceppi L producono meno sclerozi ma più grandi (>400µm) e la capacità di produrre aflatossine è molto variabile (Cotty, 1989).

\* Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

Le aflatossine sono sostanze tossiche per l'uomo e gli animali superiori classificate dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC, 2002) in classe 1 in quanto cancerogene per l'uomo. Sono considerate come le sostanze naturali più tossiche che si conoscano, in grado di causare tossicità sia acuta sia cronica e contribuiscono in modo significativo alla collocazione delle micotossine al primo posto come sostanze tossiche che giungono all'uomo attraverso il cibo (Amaike e Keller, 2011). Tra gli effetti di maggiore rilevanza è certamente da ricordare l'immunodepressione, che contribuisce in modo significativo alla manifestazione di diverse patologie quali l'epatite, soprattutto in popolazioni a elevata esposizione (Shephard, 2008). L'alta tossicità di questi composti giustifica l'attenzione che hanno suscitato nell'ultimo ventennio e gli sforzi fatti per ridurre il rischio di esposizione sia dell'uomo sia degli animali, sia con la definizione di limiti di legge che definiscono la massima presenza ammessa in varie materie prime e prodotti derivati, sia negli studi volti ad approfondire le conoscenze al fine di comprendere meglio i fenomeni e come prevenirli.

Le aflatossine, e più in generale le micotossine, sono metaboliti secondari e quindi non si riconosce loro un ruolo nel processo di patogenesi. Pertanto, lo sviluppo dei funghi produttori sull'ospite, e in particolare la comparsa di sintomi visibili, non sono proporzionalmente correlati alla presenza dei metaboliti. Da qui la necessità di individuare e applicare mezzi preventivi che minimizzino le contaminazioni.

#### ECOLOGIA DI *ASPERGILLUS* SEZIONE *FLAVI*

Sebbene il suolo sia l'habitat primario di *Aspergillus* sezione *Flavi*, poco si conosce riguardo al ciclo vitale di questi funghi nel suolo. *Aspergillus flavus* è in grado di sopravvivere e svernare nei residui colturali come micelio o sclerozi; questi rappresentano la fonte di nuovi conidi che possono iniziare il ciclo d'infezione su nuove piante ospiti. I principali fattori che influenzano la popolazione nel suolo di questi funghi sono la temperatura e l'umidità del terreno.

Le temperature per la crescita di *A. flavus* possono variare da un minimo di 10-12°C, a un massimo di 43-48.8°C con un ottimo di 33-34°C. Il livello di acqua libera ( $a_w$ ) necessaria per la crescita varia secondo la temperatura (Pitt e Hocking, 2009), ma *A. flavus* può crescere e produrre micotossine fino a una minima  $a_w$  di 0.73 e 0.85, rispettivamente (Sanchis e Magan, 2004). Questi livelli corrispondono indicativamente a 8-12% e a 17-19% di contenuto di umidità nel mais (Battilani et al., 2007).

*Aspergillus flavus* ha un'elevata efficienza nella produzione di aflatossine e *in vitro* su substrato artificiale è stata osservata una produzione media giornaliera fino a 12 µg/kg che può essere molto maggiore su substrato naturale quale la granella di mais (Giorni et al., 2011). Infatti, in mais raccolto e mantenuto a temperatura ambiente per 10 giorni è stato riscontrato un valore di aflatossine superiore a 800 µg/kg a fronte di tracce quantificate in corrispondenza della raccolta.

In presenza di alte temperature e bassa  $a_w$ , condizioni associate normalmente alla siccità nelle colture agricole delle zone sub-tropicali, *A. flavus* può diventare molto competitivo e la specie fungina dominante nel terreno (Payne, 1998). L'elevata competitività in queste condizioni è stata confermata anche da Giorni et al. (2009).

*Aspergillus flavus* può rimanere attivo, o originare nuove infezioni in post-raccolta, e ciò può risultare in un aumento nella contaminazione da aflatossine se le fasi di essiccazione e di stoccaggio non sono state gestite adeguatamente. L'infezione in post-raccolta è strettamente legata alla presenza del fungo in campo, infatti, le cariossidi colonizzate da *Aspergillus* sezione *Flavi* rappresentano l'inoculo per l'infezione durante il periodo di stoccaggio. In questo modo, le infezioni fungine in campo possono essere un'importante fonte per la formazione di micotossine nelle successive fasi della catena di lavorazione e utilizzo. Negli ecosistemi della granella stoccata, le condizioni abiotiche identificate come più importanti per l'influenza che possono esercitare sulla crescita e la produzione di micotossine sono l' $a_w$ , la temperatura e, quando la granella è umida, la composizione dei gas atmosferici (Guynot et al., 2003; Magan et al., 2004; Giorni et al., 2008b).

#### DIFFUSIONE NEL MONDO DI *ASPERGILLUS* SEZIONE *FLAVI*

I funghi appartenenti ad *Aspergillus* sezione *Flavi* sono ampiamente diffusi in natura. Vengono isolati regolarmente dal suolo, dal foraggio e dalla vegetazione in decomposizione, dai semi, dalla granella in stoccaggio e da diversi tipi di prodotti alimentari. Questi funghi contribuiscono al processo di decomposizione e alcuni di questi sono patogeni per gli insetti e, per esempio, *A. flavus* e *A. parasiticus* per gli animali superiori incluso l'uomo (Raper e Fennell, 1965).

Le contaminazioni da aflatossine sono un fenomeno globale. Generalmente le colture nelle aree tropicali e subtropicali sono più suscettibili alla

contaminazione rispetto a quelle presenti nelle regioni temperate (Widstrom et al., 1996; Fandialan e Ilag, 2003; Hell et al., 2003). Siccome il clima gioca un ruolo cruciale per lo sviluppo di questi funghi e la conseguente produzione di aflatossine, il problema varia molto in termini di incidenza e gravità di anno in anno, e i cambiamenti climatici in atto anche nel nostro Paese favoriscono la presenza e l'attività di questi patogeni.

#### IL SISTEMA *ASPERGILLUS FLAVUS* - MAIS - AMBIENTE

Il patosistema mais - *A. flavus* - ambiente è molto complesso. Il periodo della fioritura e le fasi immediatamente successive sono gli stadi di crescita dell'ospite cruciali per l'infezione da funghi e per i danni da insetti che incrementano la disseminazione degli *Aspergilli*, la presenza di infezioni e la produzione di aflatossine.

Il ciclo vitale di *A. flavus* può essere diviso in due parti principali: la colonizzazione dei residui colturali nel terreno e l'infezione dei tessuti della coltura. All'inizio della stagione colturale, quando le condizioni ambientali iniziano a essere favorevoli, gli sclerozi, le strutture di svernamento, germinano producendo un micelio che differenzia numerosi conidiofori che rilasciano conidi nell'aria. Il teleomorfo (stadio sessuale) di *A. flavus* non è mai stato osservato in natura; pertanto, i conidi costituiscono l'inoculo primario (Giorni et al., 2008a). Dal suolo, i conidi vengono trasportati dall'aria e depositati sulle sete e sulle cariossidi (Payne, 1998); nei giorni di pioggia la dispersione delle spore non avviene (Battilani et al., 2013). Le colture infettate contribuiscono all'aumento dell'inoculo presente nel terreno durante gli anni aridi (Horn, 2003).

In uno studio sull'effetto della temperatura e del potenziale idrico sullo sviluppo di *A. flavus* è stato provato come la crescita di questi funghi sia massima in condizioni ottimali, 30°C e potenziale idrico di -1.4 e -2.8 MPa (che corrispondono, rispettivamente, a 0.98 e 0.99  $a_w$ ), ma possibile fino a situazioni di stress idrico di -18 MPa (0.88  $a_w$ ) (Giorni et al., 2008a). Anche la sporulazione di *A. flavus* viene molto influenzata da questi parametri di temperatura e potenziale idrico; i risultati suggeriscono che questi funghi possono colonizzare il terreno e i residui colturali molto rapidamente in condizioni di alto stress idrico e alte temperature (Giorni et al., 2008a; Giorni et al., 2012).

Il tempo necessario alla germinazione delle spore varia in base a quanto le condizioni ecologiche sono idonee alle necessità del fungo. In particolare, in base al ceppo di *A. flavus*, il numero di giorni necessari per avere la germina-

zione delle spore va da 8 a 16 a  $0.78 a_w$  e temperature di  $33^{\circ}\text{C}$ , aumentando fino a 95 giorni quando la temperatura aumenta o decresce di  $7^{\circ}\text{C}$ . In condizioni ottimali, la germinazione delle spore si ha dopo 1 giorno (Ayerst, 1969).

I fattori che influenzano l'infezione, indipendentemente dalle condizioni ambientali, sono la concentrazione delle spore presenti in campo e la suscettibilità delle piante (che dipende dalla specie, dalla varietà e dallo stato di stress), dal sistema colturale e dalla popolazione di insetti presente (Northolt, 1979).

Diversi studi hanno determinato che la colonizzazione delle sete e della superficie delle cariossidi avviene subito dopo l'emissione delle sete e può continuare ad aumentare durante la stagione colturale. Sebbene molta crescita del micelio appare sulla superficie delle sete e delle cariossidi, *A. flavus* può penetrare all'interno delle cariossidi direttamente dalle sete o attraverso le rotture o la base del pedicello (Payne, 1998); normalmente anche quando la colonizzazione da *A. flavus* della superficie delle cariossidi è estesa, l'infezione interna è bassa (Marsh e Payne, 1984), e in qualche caso inferiore all'1% (Windham e Williams, 2007).

Anche lo stress della pianta di mais può facilitare l'infezione da questi funghi, la produzione di micotossine e la contaminazione delle cariossidi. Siccità, caldo eccessivo, inadeguata fertilizzazione, presenza di insetti, presenza di erbe infestanti, eccessivo numero di piante e presenza di altre malattie possono comportare stress alla pianta e facilitare l'infezione delle cariossidi (Bruns, 2003).

Nel mais, infezioni significative e produzione di aflatossine non si manifestano fino a che l'umidità delle cariossidi è superiore al 32%; quando l'umidità scende sotto il 28% l'incremento di produzione delle tossine è molto rapido (Payne, 1998). Le aflatossine possono continuare a essere prodotte finché l'umidità della granella non raggiunge il 13% (Anonimo, 2003). A questo riguardo è molto importante la dinamica dell' $a_w$  nella granella durante la fase di maturazione (Battilani et al., 2011). Se il danno da insetti ha luogo dopo che la coltura ha raggiunto un livello di umidità non favorevole alla crescita fungina, ci si aspetta che il livello di aflatossine rimarrà basso finché la pioggia successiva non andrà a incrementare nuovamente l'umidità della granella (Dowd et al., 2005).

Anche il momento in cui la raccolta ha luogo influenza il livello di aflatossine nella granella; con raccolte ritardate si rileva un aumento nel livello di aflatossine. L'effetto delle raccolte ritardate è più grave quando le colture vengono bagnate dalla pioggia appena prima o durante la raccolta (Cotty e Jaime-Garcia, 2007). Comunque, anche in annate in cui non intervengono piogge durante la fase finale di matu-

razione, un ritardo della raccolta di 2 settimane può comportare, a fronte di un calo di umidità di 6-7 punti percentuali (da 26-27% a 19-20%) almeno un raddoppio del contenuto di aflatossine nelle cariossidi (Scudellari et al., dati non pubblicati).

In campo, un importante fattore da considerare è che i funghi sembrano continuare a sintetizzare e degradare aflatossine. Conseguentemente, i cambiamenti ambientali giornalieri possono modificare l'entità delle due vie metaboliche e quindi influenzare il livello finale di tossina (Schroeder e Hein, 1968; Stutz e Kruperman, 1976).

Un interessante studio condotto da Criseo e collaboratori (1990) ha evidenziato che, sebbene si ritenga che la temperatura ottimale per la produzione di aflatossine sia intorno ai 28°C, o intorno ai 25°C come riportato da Giorni et al. (2011), le escursioni termiche sembrano esercitare un ruolo più significativo delle temperature massime raggiunte. Infatti, ceppi di *A. flavus* inoculati su substrato artificiale e incubati per 18 giorni alternativamente a 15°C (8 ore/giorno) e 20°C (16 ore/giorno) oppure a 23°C (8 ore/giorno) e 30°C (16 ore/giorno) hanno prodotto al termine del periodo di incubazione quantitativi molto simili di aflatossina B<sub>1</sub>, di gran lunga superiore rispetto al quantitativo prodotto quando incubati a 28°C per l'intero periodo.

Diversi altri fattori possono influenzare la quantità di aflatossine prodotte in campo; per esempio la competizione con altri funghi o la presenza di cariossidi danneggiate può produrre stress e facilitare la crescita fungina e, conseguentemente, favorire la formazione di aflatossine (Diener et al., 1987; Lee e Magan, 2000; Giorni et al., 2009).

Un altro fattore studiato in quanto potenzialmente importante e in grado di influenzare la produzione di aflatossine in campo è l'uso di fungicidi; diversi studi mostrano che l'uso dei fungicidi a concentrazioni sub-letali può favorire la produzione di micotossine a causa dello stress causato al fungo (D'Mello e Macdonald, 1997).

Sono stati presi in considerazione anche agenti di biocontrollo, con risultati incoraggianti, ma le prove sono state svolte solo *in vitro* (Etcheverry et al., 2009; Formenti et al., 2012).

#### RUOLO DEI PARAMETRI METEOROLOGICI

Diversi fattori possono influenzare lo sviluppo di *A. flavus* su mais, prima di tutto le condizioni meteorologiche registrate nell'area di coltivazione; questo perché sia l'umidità sia la temperatura può influenzare significativamente l'attività fungina.

Lavori pubblicati riportano che alte temperature e bassa umidità nelle aree maidicole stimolano la crescita e la produzione di aflatossine da parte degli *Aspergilli* (Payne, 1998; Abbas et al., 2004; Scheidegger e Payne, 2005). In condizioni di stress idrico e alte temperature, *Aspergillus* sezione *Flavi* è in grado di prendere il sopravvento nella competizione con altri funghi e inoltre, queste condizioni, favoriscono la produzione di aflatossine da parte di questi funghi (Payne, 1998).

Le condizioni minime di temperature e  $a_w$  per la crescita di *A. flavus* sono più alte rispetto a quelle necessarie per la germinazione delle spore. In particolare, 0.83 è il valore minimo di  $a_w$  necessario per avere crescita in un intervallo di temperature fra 25° e 37°C (Pitt e Mischamble, 1995).

Gli anni in cui le contaminazioni da aflatossine sono state un serio problema erano caratterizzati da temperature sopra la media e piogge sotto la media per la zona considerata (Payne, 1998; Payne e Brown, 1998; Scheidegger e Payne, 2005; Piva et al., 2006). Studi in campo negli USA hanno mostrato che in un anno con temperature di 2-3°C superiori al normale, sono stati trovati alti livelli di aflatossine. Negli studi in campo è difficile separare gli effetti delle alte temperature da quelli della siccità in quando questi si presentano contemporaneamente.

#### IL RUOLO DELLE TECNICHE COLTURALI

Gli *Aspergilli* coinvolti nella produzione di aflatossine sono fortemente influenzati dalle condizioni meteorologiche delle zone di coltivazione del mais ed è spesso sottolineato come le condizioni di stress producano un aumento della sintesi di questi metaboliti. Con questo non si fa solo riferimento al fungo, ma anche alle condizioni della pianta ospite; in particolare, ogni condizione di stress della pianta ospite, quale lo stress idrico o nutrizionale, è di stimolo all'attività del fungo. Ne consegue che tutte le tecniche colturali adottate, dalla lavorazione del terreno alla scelta dell'ibrido e del momento della semina, dalla concimazione e irrigazione alla decisione di raccogliere il prodotto, a seconda di come vengono gestite possono risultare significative nel determinare il livello di contaminazione della granella.

#### LA PREVENZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DA AFLATOSSINE

L'ottimizzazione delle tecniche colturali e della gestione della raccolta e del post-raccolta rappresentano certamente la base per ottenere granella con la

minima contaminazione da aflatossine. Questo comporta in genere un aumento dei costi di produzione; ad esempio, la raccolta precoce, con umidità della granella non troppo bassa, comporta un maggior costo per l'essiccazione. Pertanto, soprattutto in un'area geografica come il nord Italia, dove le contaminazioni si presentano con intensità assai variabile tra gli anni e le zone geografiche, risulta particolarmente importante individuare altri mezzi a supporto della razionalizzazione della gestione di filiera. In particolare, sono stati fatti notevoli sforzi per lo sviluppo di un modello previsionale affidabile, in grado di prevedere le condizioni di rischio sia delle aree geografiche, sulla base di dati storici, sia dei singoli appezzamenti durante la stagione colturale, utilizzando come input i dati raccolti in tempo reale, sia in scenari di cambiamenti climatici, utilizzando dati meteorologici simulati in proiezioni future.

#### I MODELLI PREVISIONALI

I modelli previsionali sono degli strumenti matematici che hanno diversi obiettivi. In biologia uno scopo può essere di descrivere e prevedere il verificarsi di un determinato fenomeno come per esempio la previsione del rischio di comparsa o di sviluppo epidemico di una determinata malattia infettiva, per potere così adattare la strategia di intervento e razionalizzare la difesa di alcune colture.

Nello specifico, per il pato-sistema *A. flavus*-mais grande attenzione è stata posta dalla comunità scientifica internazionale alla previsione di produzione di aflatossina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>).

Sviluppare sistemi di previsione per questo fenomeno è molto complesso a causa di tutti i fattori agronomici coinvolti: dalla tecnica di coltivazione all'ibrido coltivato, alle applicazioni di fungicidi, ecc., condizioni difficili da quantificare matematicamente; pertanto i modelli oggi disponibili sono costruiti considerando l'andamento meteorologico il fattore con maggiore influenza sulla crescita del fungo in campo.

Nel 2008 Battilani et al., ha sviluppato e validato un primo modello-prototipo per prevedere la contaminazione da AFB<sub>1</sub> basato sull'indice di aridità calcolato in tre decenni nei mesi tra giugno e agosto. L'output ottenuto dal modello prevede la probabilità di avere contaminazione da AFB<sub>1</sub> nella granella superiore a 2 µg/Kg. Questo sistema è stato utilizzato per diversi anni in Emilia Romagna con buoni risultati ma nel tempo è divenuta crescente l'esigenza di sviluppare un modello dinamico, capace di prevedere il rischio dalla semina alla raccolta del mais.



Attualmente è in corso di pubblicazione un modello meccanicistico (Battilani et al., 2013) che, diversamente dal precedente modello, prende in considerazione l'intero ciclo d'infezione del fungo e ne prevede ogni fase (sporulazione, dispersione, colonizzazione/invasione delle cariossidi e produzione di AFB<sub>1</sub>), in relazione alle fasi di crescita del mais; per questo aspetto è stato sviluppato un sub-modello ad-hoc. L'uso combinato di questi modelli consente di prevedere il rischio di contaminazione da *A. flavus*, la produzione di AFB<sub>1</sub> e la probabilità di superare il limite di contaminazione fissato dalla Comunità Europea (EC, 2006) per alimenti destinati al consumo umano, o per quelli a uso alimentare per animali da latte, pari a 5 µg AFB<sub>1</sub> per kg di mais. Il modello è già stato validato su una base-dati di tre anni (2008-2011) di rilievi effettuati nel nord Italia con soddisfacenti risultati, fornendo previsioni corrette circa nel 70% dei casi. Il prossimo passo da compiere sarà quello di migliorare questo risultato, validando il modello in altri Paesi vocati alla coltivazione maidicola, e implementare funzioni che considerino il ruolo delle pratiche agronomiche che influenzano la contaminazione del mais in campo.

Il modello è già stato impiegato anche per simulare l'effetto che potrebbe avere il cambiamento climatico sulla contaminazione da aflatossine in Europa, tenendo conto anche del presumibile effetto che questo avrà sull'area di coltivazione del mais (Battilani et al., 2012).

#### CONTROLLO BIOLOGICO DI CEPPI PRODUTTORI DI AFLATOSSINE

Il controllo di funghi o batteri patogeni attraverso l'utilizzo di microrganismi non patogeni è frequentemente utilizzato in patologia vegetale (Lorito et al., 2010). Nonostante siano stati testati lieviti, batteri e diverse specie fungine per il controllo della contaminazione da aflatossine, il controllo biologico attraverso l'utilizzo di ceppi di *A. flavus* non produttori è la strategia più promettente (Amai e Keller, 2011). Questa tecnica si basa sulla capacità dei ceppi non produttori o atossigeni, di escludere i ceppi produttori o tossigeni e di conseguenza ridurre la produzione e l'accumulo di aflatossine nelle colture (Cotty, 2006). I ceppi atossigeni vengono applicati, durante il ciclo vegetativo delle colture, mediante un carrier sul quale il fungo germina e produce coni di prima di disperdersi nell'ambiente. Caratteristica essenziale di un ottimo agente di biocontrollo è che sia selezionato nell'area in cui si intende utilizzarlo in quanto adattato alle condizioni climatiche e di microflora presenti e che non appartenga allo stesso gruppo di compatibilità vegetativa (VCG) dei ceppi tossigeni (Probst et al., 2011). La compatibilità vegetativa è un sistema

che permette il trasferimento di materiale genetico solo tra individui appartenenti alla stessa VCG (Leslie, 1993).

Negli Stati Uniti sono presenti in commercio due formulati a base di ceppi atossigeni di *A. flavus*: AF36 prodotto dall'Arizona Cotton Research e Afla-Guard distribuito da Syngenta, mentre in Africa è stata registrata con il nome di AflaSafe dall'International Institute of Tropical Agriculture (IITA) una miscela di 4 ceppi atossigeni di *A. flavus*. In Italia, a partire dal 2003, primo anno in cui sono stati segnalati seri problemi di contaminazione da aflatossine in mais (Piva et al., 2006), è iniziata la raccolta di isolati da granella di mais al fine di caratterizzare la popolazione presente sul territorio (Giorni et al., 2007). Successivamente, la popolazione fungina è stata caratterizzata per capacità di produrre aflatossine e per distribuzione delle VCG (Mauro et al., 2013); attualmente è in corso uno studio per identificare potenziali agenti di biocontrollo nell'ambito della popolazione di *A. flavus* italiana.

L'efficacia di questa tecnica è stata ampiamente dimostrata su diverse colture con percentuale di riduzione del contenuto di aflatossine anche superiori al 90% (Cotty, 1990; Abbas et al., 2006; Dorner, 2010). La contaminazione da aflatossine su importanti colture quali mais, cotone, pistacchio, arachidi determina ogni anno ingenti perdite economiche in tutto il mondo (Yu et al., 2005) con gravi problemi anche per la salute umana (Probst et al., 2007). Nonostante numerose strategie quali miglioramento genetico, controllo degli insetti, buone pratiche agronomiche sono continuamente studiate e perfezionate per offrire una valida soluzione al problema, l'utilizzo di ceppi atossigeni di *A. flavus* sembra essere la migliore tecnica, che consente di ridurre la contaminazione a valori accettabili anche nelle condizioni maggiormente predisponenti per l'attività del patogeno.

## CONCLUSIONI

Gli studi svolti riguardo alla presenza di *A. flavus*, in particolare quelli attuati in Italia dopo l'annata critica per il mais verificatasi nel 2003, hanno avuto come obiettivo principale quello di acquisire conoscenze per prevenire e prevedere le contaminazioni da aflatossine, tutto ciò in un'ottica di *agricoltura sostenibile*. Infatti, i 2 supporti proposti, da una parte l'impiego di un modello previsionale e dall'altra quello di agenti di biocontrollo selezionati dalla popolazione naturalmente presente nelle zone di coltivazione, hanno l'obiettivo di tutelare la salute del consumatore, salvaguardare il reddito degli agricoltori ed enfatizzare la gestione di filiera nel rispetto dell'ambiente. I gravi proble-

mi riscontrati nella campagna 2012, segnalati dalle previsioni del modello, devono costituire un insegnamento per tutti gli operatori della filiera che devono agire in modo sinergico, tenendo presente gli insegnamenti ottenuti dalla ricerca.

#### RIASSUNTO

*Aspergillus flavus* è il principale responsabile della produzione di aflatossina in diversi prodotti agricoli, quali il mais. La contaminazione può avvenire già in campo e aumentare durante lo stoccaggio e i processi di trasformazione se vengono mantenute condizioni idonee per il fungo. Condizioni di alta temperatura e bassa attività dell'acqua, associate a siccità nelle colture sono ottimali per *A. flavus* che diventa molto competitivo e dominante. Inoltre, ogni stress subito dalla pianta stimola l'attività del fungo. Nel mais, infezioni significative e produzione di aflatossine non si manifestano con umidità delle cariossidi superiori al 32%; quando l'umidità è compresa tra il 28% e il 13%, la produzione di tossine è molto rapida. L'ottimizzazione delle tecniche colturali e della gestione della raccolta e del post-raccolta sono fondamentali per ottenere granella con la minima contaminazione da aflatossina. L'impiego di modelli previsionali e di ceppi atossigeni, adeguatamente selezionati e caratterizzati, come agenti di biocontrollo, rappresentano i 2 supporti più innovativi per gli agricoltori.

#### ABSTRACT

*Aspergillus flavus* is the main responsible for the production of aflatoxin in various agricultural crops, maize included. The contamination can occur in the field and increase during storage and processing if suitable conditions for the fungus are maintained. High temperature and low water activity, associated with drought in crops are optimal for *A. flavus*, which becomes very competitive and dominant. In addition, each plant stress stimulates the activity of the fungus. In maize, significant infection and aflatoxin production do not occur with kernel humidity higher than 32%; when the humidity is between 28% to 13%, the toxin production is very fast. The optimization of cropping system, harvest and post-harvest management are crucial to minimize aflatoxin contamination. The use of predictive models and atoxigenic strains, carefully selected and characterized, as biocontrol agents are the two most innovative supports for farmers.

#### BIBLIOGRAFIA

- ABBAS H.K., ZABLOTOWICZ R.M., LOCKE M.A. (2004): *Spatial variability of Aspergillus flavus soil populations under different crops and corn grain colonization and aflatoxins*, «Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique», 82, pp. 1768-1775.
- ABBAS H.K., ZABLOTOWICZ R.M., BRUNS H.A., ABEL C.A. (2006): *Biocontrol of aflatox-*

- in corn by inoculation with non-aflatoxigenic Aspergillus flavus isolates*, «Biocontrol Science Technology», 16, pp. 437-449.
- AMAIKE S., KELLER N.P. (2011): *Aspergillus flavus*, «Annual Review of Phytopathology», 49, pp. 107-133.
- ANONIMO (2003): *Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems*, Council of Agricultural Science and Technology (CAST) (Ed.), Ames, Iowa, USA, pp. 199.
- AYERST G. (1969): *The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi*, «Journal of Stored Products Research», 5, pp. 127-141.
- BATTILANI P., SCAPIM C.A., FORMENTI S., ROSSI V., PIETRI A., MAROCCO, A., RAMPONI C. (2007): *L'acqua nelle cariossidi facilita l'accumulo di fumonisine*, «Informatore Agrario», 63, pp. 49-52.
- BATTILANI P., PIETRI A., BARBANO C., SCANDOLARA A., BERTUZZI T., MAROCCO A. (2008): *Logistic regression modeling of cropping systems to predict fumonisin contamination in maize*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 56, pp. 10433-10438.
- BATTILANI P., FORMENTI S., ROSSI V., RAMPONI C. (2011): *Dynamic of water activity in maize hybrids is crucial for fumonisin contamination in kernels*, «Journal of Cereal Science», 54, pp. 467-472.
- BATTILANI P., ROSSI V., GIORNI P., PIETRI A., GUALLA A., VAN DER FELS-KLERX H.J., BOOIJ C.J.H., MORETTI A., LOGRIECO A., TOSCANO P., MIRAGLIA M., DE SANTIS B., BRERA C. (2012): *Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change*, Scientific/Technical Report submitted to EFSA, published on line 23 January, pp. 172, <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/223e.htm>
- BATTILANI P., CAMARDO LEGGIERI M., ROSSI V., GIORNI P. (2013): *AFLA-maize, a predictive model for Aspergillus flavus infection and aflatoxin B<sub>1</sub> contamination in maize*, «Computers and Electronics in Agriculture», in stampa
- BRUNS H.A. (2003): *Controlling aflatoxin and fumonisin in maize by crop management*, «Journal of Toxicology, Toxin Reviews», 22, pp. 153-173.
- COTTY P.J. (1989): *Virulence and cultural characteristics of two Aspergillus flavus strains pathogenic on cotton*, «Phytopathology», 79, pp. 808-814.
- COTTY P.J. (1990): *Effect of atoxigenic strains of Aspergillus flavus on aflatoxin contamination of developing cottonseed*, «Plant Disease», 74, pp. 233-235.
- COTTY P.J. (2006): *Biocompetitive exclusion of toxigenic fungi*, in D. Barug, D. Bhatnagar, H.P. van Egmond, J.W. van der Kamp, W.A. van Osenbruggen, A. Visconti (Eds.), *The mycotoxin factbook*, Wageningen Academic Publisher, The Netherlands, pp. 179-197.
- COTTY P.J., JAIME-GARCIA R. (2007): *Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination*, «International Journal of Food Microbiology», 119, pp. 109-115.
- CRISEO G., URZI C., PERNICE I., MEDICI M.A. (1990): *Growth and aflatoxin production by Aspergillus flavus Link under cycling temperatures*, «Italian Journal of Food Science», 1, pp. 43-51.
- DIENER U.L., COLE R.J., SANDERS T.H., PAYNE G.A., LEE L.S., KLICH M.A. (1987): *Epidemiology of aflatoxin formation by Aspergillus flavus*, «Annual Review of Phytopathology», 25, pp. 249-270.
- D'MELLO J.P.F., MACDONALD A.M.C. (1997): *Mycotoxins*, «Animal Feed Science and Technology», 69, pp. 155-166.
- DORNER J.W. (2010): *Efficacy of a biopesticide for control of aflatoxins in corn*, «Journal of Food Protection», 73, pp. 495-499.

- DOWD P.F., JOHNSON E.T., WILLIAMS W.P. (2005): *Strategies for insect management targeted toward mycotoxin management*, in H.K. Abbas (Ed.), *Aflatoxin and food safety*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London and New York, pp. 517-541.
- EUROPEAN COMMISSION (EC), (2006): *Commission regulation No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*, in Official Journal of European Union (Ed.), pp. 5-24.
- ETCHEVERRY M.G., SCANDOLARA A., NESCI A., RIBEIRO VILAS BOAS M.S., PEREIRA P., BATTILANI P. (2009): *Biological interactions to select biocontrol agents against toxigenic strains of Aspergillus flavus and Fusarium verticillioides from maize*, «Mycopathologia», 167, pp. 287-295.
- FANDIALAN I.M., ILAG L.L. (2003): *Aflatoxin production of Aspergillus flavus isolates from rough rice, corn, soybean, peanut and copra*, «Philippine Agriculturist», 57, pp. 254-263.
- FORMENTI S., MAGAN N., PIETRI A., BATTILANI P. (2012): *In vitro impact on growth, fumonisins and aflatoxins production by Fusarium verticillioides and Aspergillus flavus using anti-fungal compounds and a biological control agent*, «Phytopatologia Mediterranea», 51, pp. 247-256.
- GIORNI P., MAGAN N., PIETRI A., BERTUZZI T., BATTILANI P. (2007): *Studies on Aspergillus section Flavi isolated from maize in northern Italy*, «International Journal of Food Microbiology», 113, pp. 330-338.
- GIORNI P., BATTILANI P., MAGAN N. (2008a): *Effect of solute and matric potential on in vitro growth and sporulation of strains from a new population of Aspergillus flavus isolated in Italy*, «Fungal Ecology», 1, pp. 102-106.
- GIORNI P., BATTILANI P., PIETRI A., MAGAN N. (2008b): *Effect of  $a_w$  and  $CO_2$  level on Aspergillus flavus growth and aflatoxin production in maize post-harvest*, «International Journal of Food Microbiology», 122, pp. 109-113.
- GIORNI P., MAGAN N., BATTILANI P. (2009): *Environmental factors modify carbon nutritional patterns and niche overlap between Aspergillus flavus and Fusarium verticillioides strains from maize*, «International Journal of Food Microbiology», 130, pp. 213-218.
- GIORNI P., MAGAN N., PIETRI A., BATTILANI P. (2011): *Growth and aflatoxin production of an Italian strain of Aspergillus flavus: influence of ecological factors and nutritional substrates*, «World Mycotoxin Journal», 4, pp. 425-432.
- GIORNI P., CAMARDO LEGGIERI M., MAGAN N., BATTILANI P. (2012): *Comparison of ecological needs for sporulation of Aspergillus flavus sclerotia on natural and artificial substrates*, «Fungal Biology», 116, pp. 637-642.
- GUYNOT M.E., MARÍN S., SANCHIS V., RAMOS A.J. (2003): *Modified atmosphere packaging for prevention of mold spoilage of bakery products with different pH and water activity levels*, «Journal of Food Protection», 66, pp. 1864-1872.
- HELL K., FANDOHAN P., CARDWELL K.F. (2003): *Development of management options for the control of aflatoxin in maize in West Africa*. Advances in stored product protection: Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored Product Protection, York, UK, 22-26 July 2002.
- HORN B.W. (2003): *Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil*, «Journal of Toxicology, Toxin Reviews», 22, pp. 351-379.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) (2002): *Some mycotoxins in World Health Organization (Eds.), IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans/Some Traditional Herbal Medicines, some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene*, vol. 82, IARC Press, Lyon, pp. 169-366.
- LEE H.B., MAGAN N. (2000): *Impact of environment and interspecific interactions between*

- spoilage fungi and Aspergillus ochraceus on growth and ochratoxin production in maize grain*, «International Journal of Food Microbiology», 61, pp. 11-16.
- LESLIE J.F. (1993): *Fungal vegetative compatibility*, «Annual Review of Phytopathology», 31, pp. 127-150.
- LORITO M., WOO S.L., HARMAN G.E., MONTE E. (2010): *Translational research on Trichoderma: from 'omics to the field*, «Annual Review of Phytopathology», 48, pp. 395-417.
- MAGAN N., ALDRED D., SANCHIS V., ARORA D.K. (2004): *The role of spoilage fungi in seed deterioration*, in D.K. Arora (Ed.), *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 311-323.
- MARSH S.F., PAYNE G.A. (1984): *Scanning EM studies on the colonization of dent corn by Aspergillus flavus*, «Phytopathology», 74, pp. 557-561.
- MAURO A., BATTILANI P., CALLICOTT K.A., GIORNI P., PIETRI A., COTTY P.J. (2013): *Structure of an Aspergillus flavus population from maize kernels in northern Italy*, «International Journal of Food Microbiology», 162, pp. 1-7.
- NORTHOLT M.D. (1979): *The effect of water activity and temperature on the production of some mycotoxins*, Wageningen University, the Netherlands, Wageningen, pp. 491.
- PAYNE G.A. (1998): *Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops*, in K.K. Sinha and D. Bhatnagar (Eds.), *Mycotoxins in agriculture and food safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 279-306.
- PAYNE G.A., BROWN, M.P. (1998): *Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis*, «Annual Review of Phytopathology», 36, pp. 329-362.
- PITT J.I., HOCKING A.D. (2009): *Fungi and food spoilage 3<sup>rd</sup> Ed.*, Springer-Verlag, Inc., New York, pp. 536.
- PITT J.I., MISCAMBLE B.F. (1995): *Water relations of Aspergillus flavus and closely related species*, «Journal of Food Protection», 58, pp. 86-90.
- PIVA G., BATTILANI P., PIETRI A. (2006): *Emerging issues in Southern Europe: aflatoxins in Italy*, in D. Barug, D. Bhatnagar, H.P. van Egmond, J.W. van der Kamp, W.A. van Osenbruggen, A. Visconti (Eds.), *The mycotoxin factbook*, Wageningen Academic Publisher, The Netherlands, pp. 139-153.
- PROBST C., BANDYOPADHYAY R., PRICE L.E., COTTY P.J. (2011): *Identification of atoxigenic Aspergillus flavus isolates to reduce aflatoxin contamination of maize in Kenya*, «Plant Disease», 95, pp. 212-218.
- PROBST C., NJAPAU H., COTTY P.J. (2007): *Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent*, «Applied and Environmental Microbiology», 73, pp. 2762-2764.
- RAPER K.B., FENNELL D.I. (1965): *The Genus Aspergillus*, Williams & Wilkins, pp. 686.
- SANCHIS V., MAGAN N. (2004): *Environmental conditions affecting mycotoxins*, in N. Magan, and M. Olsen (Eds.), *Mycotoxins in food: Detection and Control*, Woodhead, Oxford, pp. 174-189.
- SCHIEDEGGER K.A., PAYNE G.A. (2005): *Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of Aspergillus flavus from pathogenicity to functional genomics*, in H.K. Abbas (Ed.), *Aflatoxin and food safety*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London and New York, pp. 137-165.
- SCHROEDER H., HEIN J.H. (1968): *Effect of diurnal temperature cycling on the production of aflatoxin*, «Applied Microbiology», 16, pp. 988-990.
- SHEPHARD G.S. (2008): *Risk assessment of aflatoxins in food in Africa*, «Food Additives and Contaminants, Part A», 25, pp. 1246-1256.

- STUTZ H., KRUMPERMAN P. (1976): *Effect of temperature cycling on the production of aflatoxin by Aspergillus parasiticus*, «Applied and Environmental Microbiology», 32, pp. 327-332.
- WINDHAM G.L., WILLIAMS W.P. (2007): *Systemic infection of stalks and ears of corn hybrids by Aspergillus parasiticus*, «Mycopathologia», 164, pp. 249-254.
- WIDSTROM N.W., FORSTER M.J., MARTIN W.K., WILSON D.M. (1996): *Agronomic performance in the southeastern United States of maize hybrids containing tropical germplasm*, «Maydica», 41, pp. 59-63.
- YU J., CLEVELAND T.E., NIERMAN, W.C., BENNETT J.W. (2005): *Aspergillus flavus genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases*, «Revista Iberoamericana de Micología», 22, pp. 192-202.





## L'agrotecnica per la prevenzione della contaminazione da aflatossina in campo e nel post raccolta

### INTRODUZIONE

La prima sistematica e attenta individuazione dei fattori agronomici predisponenti lo sviluppo dell'infezione da *Aspergillus flavus* Link e il conseguente accumulo di aflatossine risale agli anni '70 negli Stati Uniti del sud con gli studi condotti da Widstrom et al. (1975) e da Widstrom (1979) e poi successivamente da Jones et al. (1981a, b), Payne et al. (1986). Questi individuano come principali fattori di rischio le rotazioni con precessione mais, l'epoca di semina, gli stress nutrizionali e idrici; altri fattori ricordati di minore rilevanza sono l'ibrido, l'infestazione da insetti fitofagi e l'umidità di raccolta. McGee et al. (1996), Down (1998), e Payne, 1998 riportano che l'infezione in campo da parte di *A. flavus* sulla spiga di mais è generalmente associata a danni alle brattee e alla granella causati anche da insetti che favoriscono la penetrazione dell'inoculo, nonché da forti condizioni di stress della coltura e alte temperature nel corso della fase di maturazione della coltura.

Tali studi, anche per la struttura organizzativa e produttiva di quegli areali non porta però a nessun tentativo di applicazione sistematica e su larga scala. Il primo disciplinare integrato è invece proposto per la regione di Tamaulipas (Mexico) nel 1996, a seguito di una serie di campagne caratterizzate da fortissime contaminazioni. INIFAP propone il *Paquete tecnologico* che vede organicamente combinati 3 interventi agronomici potenzialmente vincolanti: l'epoca di semina precoce, l'investimento controllato alla semina e l'irrigazione, quest'ultimo considerato come il fattore chiave (Rodriguez del Bosque, 1996). Lo stesso disciplinare pone in attenzione l'importanza dell'ibrido e

\* Università di Torino - Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari

della difesa da insetti. In Italia i primi indirizzi concreti sono proposti nel 2004 dopo l'emergenza del 2003. La Regione Emilia Romagna e il Consorzio Granarolo-AgriOK, definiscono come vincolo l'umidità alla raccolta e quindi elencano come fattori di primaria importanza l'epoca di semina, il controllo degli stress e, infine, la difesa dalla piralide (Casagrandi et al., 2004). Nello stesso anno sotto il coordinamento de l'AIA si definiscono nel dettaglio le agrotecniche ad alto e a basso rischio e quindi i percorsi produttivi consigliati considerando anche le principali misure del post raccolta e nella formazione e impiego degli insilati (Pietri et al., 2004 e Reyneri et al., 2004). A distanza di 9 anni dall'emergenza del 2012 quelle indicazioni rimangono valide e attuali; ciò nondimeno l'evoluzione della maidicoltura e le nuove acquisizioni tecnico-scientifiche hanno permesso di puntualizzare e affinare gli interventi per la prevenzione agrotecnica e di post raccolta.

Nel presente contributo saranno sinteticamente esposti tali interventi focalizzando l'attenzione per le esperienze nei nostri areali colturali e con cenni a complementari ricerche in ambienti a forte rischio di contaminazione.

#### PREVENZIONE IN PRE-RACCOLTA

Le tecniche di prevenzione nel mais, a differenza dei cereali vernini, non si basano tanto sulla riduzione della potenziale infezione attraverso il controllo dell'entità dell'inoculo o sulla lotta diretta mediante fungicidi irrorati sulla spiga, ma nell'attuazione delle pratiche agronomiche volte a contrastare le condizioni favorevoli all'infezione dalla fioritura alla prima maturazione e quindi lo sviluppo delle muffe tossigene nel corso della fase finale della maturazione. Infatti nel mais l'applicazione di fungicidi è resa difficile dalla collocazione della spiga all'interno del manto vegetale e dalla presenza del cartoccio che impedisce la bagnatura delle cariossidi con la soluzione fungicida.

In termini più generali per ridurre le probabilità di incorrere in un'elevata contaminazione occorre innanzitutto tenere presenti questi aspetti generali che devono orientare le tecniche di coltivazione:

- scelta di un ibrido adatto all'ambiente colturale in termini di durata del ciclo e con accettabile adattamento ai possibili e più frequenti stress dell'areale;
- riduzione della quantità di inoculo che può raggiungere gli organi più sensibili della pianta;
- anticipo della fioritura in un periodo (giugno) quando è minore la probabilità di incorrere in elevate temperature e pronunciati stress idrici;

- contenimento degli stress alla pianta sia di natura biotica (competizione con le malerbe, presenza di fitofagi), sia abiotica (carenze o eccessi nutrizionali e idrici).

#### SCELTA IBRIDO E CICLO

La risposta dell'ibrido è fortemente dipendente dall'ambiente colturale e dall'agrotecnica oltre che dal patrimonio genetico presente al momento della ricerca: pertanto non sempre sono state tratte chiare indicazioni sul loro ruolo e sui caratteri associati al livello di contaminazione (Davis et al., 1985). In condizioni di forte stress Betrán e Isakeit (2004) hanno evidenziato che i cicli precoci presentano una maggiore concentrazione di aflatossine rispetto ai più produttivi cicli tardivi: in quelle condizioni ciò appare dovuto al momento di fioritura che coincide con le maggiori temperature, alla minore umidità degli ibridi precoci alla raccolta e al cartoccio che appare più aperto nel corso della maturazione; quest'ultimo carattere risulta infatti positivamente correlato con la contaminazione finale (McMilliam et al., 1987, Widstrom et al., 1994). In altre esperienze (fig. 1), in condizioni irrigue e annate con andamenti meteorologici inducenti un moderato stress, la contaminazione da aflatossine aumenta negli ibridi a ciclo più lungo, probabilmente perché la fioritura ha coinciso con le maggiori temperature e la maturazione più prolungata ha permesso un più lungo periodo di accumulo della tossina (Reyneri, 1996). In altre ricerche è stata evidenziata una correlazione negativa tra la presenza di carotenoidi e l'accumulo di aflatossine: in generale quindi gli ibridi a granella bianca sono più esposti di quelli con granella colorata (Rodriguez del Bosque, 1998). L'impiego di ibridi transgenici con carattere BT ha in genere portato vantaggi di ordine sanitario anche sulle aflatossine per l'effetto indiretto operato sulla riduzione del danno da insetti sulla spiga, sebbene le riduzioni di contaminazione rilevate sulla granella non siano di uguale entità a quelle registrate sulle fumonisine B1 e B2 (Wiatrak et al. 2005).

#### *Riduzione dell'inoculo*

La principale fonte di inoculo di *Aspergillus flavus* sono i residui colturali al suolo lasciati dalla coltura in precessione (Lillehoj et al., 1980). Pertanto gli avvicendamenti che portano a ridotti residui colturali (girasole, soia) sono più

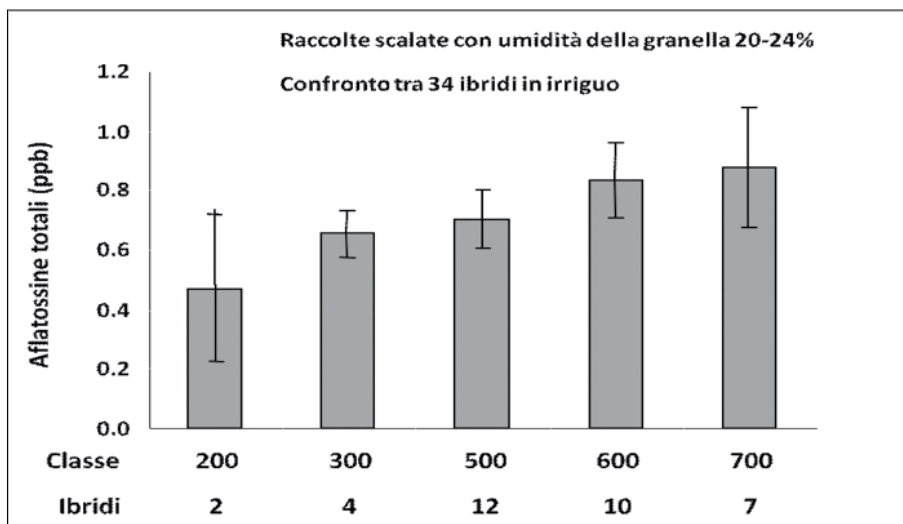


Fig. 1 Effetto della classe di precocità FAO sul contenuto di fumonisine in coltura irrigua (Reyneri, 2013)

indicate di quelle che lasciano residui abbondanti (mais, sorgo) o intermedi (frumento, orzo) per la minore produzione potenziale di inoculo. In talune condizioni, per ridurre quest'ultimo è quindi consigliato l'interramento delle paglie e delle stoppie e/o l'eventuale distribuzione superficiale di calce sugli stessi per favorirne la degradazione e ostacolare la proliferazione fungina (Rolon Gonzales, 2010), mentre il numero di lavorazioni superficiali per il controllo delle infestanti non ha portato a effetti significativi (Bilgrami et al., 1998).

#### EPOCA DI SEMINA E ANTICIPO DELLA FIORITURA

La fioritura e il periodo immediatamente successivo, ovvero fino a quando le barbe non sono completamente imbrunite, sono le fasi in cui, attraverso il canale delle sete fiorali, è più facile che le spore di *A. flavus*, siano poste nelle condizioni di penetrare nella cariosside in formazione e dare origine a una infezione "sistemica". Inoltre, in condizioni di temperature elevate la capacità di infezione del fungo tossigeno sono maggiori, probabilmente per la maggiore capacità di crescita competitiva rispetto a quello di altre muffe, tra cui quelle del genere *Fusarium* (Causin, 2013).

Nelle condizioni più frequenti nei principali areali maidicoli italiani le

Epoca di semina	AFB1 ( $\mu\text{g/kg}$ )	Casi
Marzo	$0.50 \pm 0.2$	194
Aprile	$0.83 \pm 0.3$	352
Maggio	$2.26 \pm 1.8$	61

Tab. 1 *Effetto dell'epoca di semina sul contenuto in aflatossina B1. (2008, media di 607 campi aziendali nelle province di VE, PN, TV, UD)*

temperature raggiungono il massimo picco nella seconda decade di luglio. Pertanto, soprattutto in ambienti irrigui, l'anticipo della fioritura a giugno permette di ridurre la probabilità di incorrere in condizioni particolarmente favorevoli allo sviluppo di *A. flavus*. Ciò può essere raggiunto con semine tempestive, per quanto possibile collocate a marzo e inizio aprile, combinate con le migliori attenzioni agronomiche dopo l'emergenza per assicurare il maggiore *early vigor* e, infine, con la scelta dell'ibrido di media precocità e adatto alle condizioni colturali (tab. 1). Inoltre, data la distribuzione delle precipitazioni, le fioriture anticipate a giugno sono meno soggette a stress idrici e ad attacchi pesanti di piralide e altri fitofagi (Blandino et al., 2008).

Lo stesso comportamento è stato rilevato da Payne et al. (1986) e Bilgrami e Choudhary (1998) che in ambienti a forte rischio di contaminazioni hanno evidenziato i vantaggi delle semine anticipate, analogamente a quanto osservato in Mexico da Rodriguez del Bosque (1996); viceversa alcuni autori (Widstrom et al. 1990; Wiatrak et al. 2005) hanno evidenziato livelli di accumulo di aflatossine minori nelle semine molto tardive interpretando questo con le meno favorevoli condizioni di fine estate e inizio autunno per la produzione di inoculo e tra la fioritura e la maturazione cerosa. Lo stesso andamento è rilevato comunemente negli areali maidicoli italiani nel caso delle semine più tardive effettuate dopo erbaio o cereale vernino.

Gli ibridi nelle semine tempestive sono spesso rallentati nello sviluppo dalle basse temperature: pertanto, tutti gli interventi che ne favoriscono la rapida crescita iniziale o *early vigor* e il regolare sviluppo radicale sono positivi perché permettono alla coltura di meglio predisporre alle fioriture anticipate e agli stress. Tra gli interventi preventivi più efficaci e in grado di anticipare la fioritura si ricordano quindi l'applicazione di fertilizzanti a base di azoto e fosforo localizzati alla semina accoppianti con sarchiature precoci e concimazioni azotate tempestive in copertura (Blandino et al., 2011).

## CONTENIMENTO DEGLI STRESS

Gli stress sono riconosciuti come i fattori più chiaramente coinvolti nel determinare la suscettibilità all'attacco da *A. flavus* e l'accumulo delle aflatossine.

Diverse sperimentazioni realizzate in diversi ambienti confermano come l'adozione di concimazioni azotate tali da evitare stress nutrizionali alla coltura riducono in maniera consistente i livelli di contaminazione da aflatossine (Anderson et al., 1975; Jones and Duncan, 1981; Payne et al. 1989, Lisker and Lillehoj, 1991; Tubajika et al., 1999). Lo stesso è stato osservato in prove di lunga durata in ambienti irrigui italiani (fig. 2); significative contaminazioni sono state rilevate infatti solo in presenza di evidenti carenze di dotazione azotata nel suolo (Blandino et al., 2010). Apporti di azoto equilibrati con gli asporti e quindi con le produzioni (200-300 kg/ha di N) in 2 o 3 somministrazioni permettono di contribuire a ridurre gli stress nutrizionali e i maggiori rischi di contaminazione da aflatossine (Reyneri, 2006).

Lo stress idrico esercita un riconosciuto effetto positivo sull'accumulo di aflatossine e spesso è ricordato come la condizione che più influenza la concentrazione finale. Pertanto è stato evidenziato che un'elevata densità di piante alla semina in ambienti asciutti può essere fonte di maggiori contaminazioni per l'accentuazione dei consumi idrici della coltura (Bilgrami and Choudhary, 1998; Reyneri et al., 2004); viceversa in ambienti irrigui l'investimento non appare spesso correlato alla presenza di aflatossine in quanto non induce un incremento significativo dello stress idrico (Rodriguez-Del-Bosques, 1996).

Più in generale lo stress idrico prolungato nei nostri areali, proprio della coltura non irrigua o soggetta a irrigazioni di emergenza, nelle annate siccitose aumenta in modo rilevante l'esposizione al rischio (Cinti et al., 2004). I rilievi effettuati nella Pianura Padana orientale nel 2012 hanno evidenziato che la contaminazione rilevata nei lotti in fase di riempimento dei silos è positivamente correlata con la percentuale di granella proveniente da mais coltivato in asciutta (Reyneri et al., 2013 dati inediti) e più in generale con le condizioni di multi-stress colturale (tab. 2).

Come è stato evidenziato da McMillian et al. (1988), Saladini et al. (2008) e riassunto da Mazzoni e Cravedi (2013) l'attività dei fitofagi e in particolare della piralide (*Ostrinia nubilalis*) può favorire la contaminazione di aflatossine. In alcune esperienze recenti sono state rilevate riduzioni dei tenori di contaminazione di aflatossine con il trattamento chimico di lotta alle larve di seconda generazione del fitofago, effettuato al momento in cui le catture degli adulti della prima generazione diventano rilevanti (Cinti et al, 2004; Del Pupo et al., 2007). Il trattamento risulta meno efficace nelle colture seminate

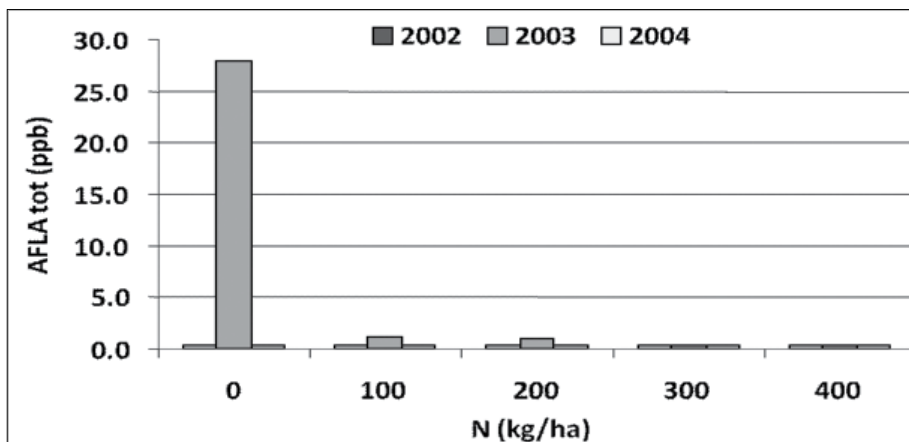


Fig. 2 *Effetto concimazione azotata sul tenore in aflatossina B1. Dati ottenuti in coltura irrigua in una prova di lunga durata a concimazione N costante (Reyneri et al. 2006)*

	AFB1 ( $\mu\text{g/kg}$ )	Casi
No stress	$1.8 \pm 0.7$	340
Stress ridotto	$2.16 \pm 1.1$	141
Stress elevato	$3.06 \pm 2.1$	85

Nessuno stress: coltura uniforme, irrigua, fioritura entro 5 luglio; stress ridotto: uno dei fattori non corrisponde; Stress elevato: coltura disforme, fioritura dopo 5 luglio, stress idrico evidente.

Tab. 2 *Effetto degli stress sulla contaminazione aflatossine. Dati 2009 da 566 campi in provincia di VE, PD, UD, TV*

tardivamente e nelle annate più calde, in presenza anche di tre generazioni di piralide. Infine, una elevata infestazione da malerbe può influenzare negativamente la sanità della granella per l'accentuazione degli stress sia idrici sia nutrizionali alla pianta (Blandino et al., 2007).

#### EPOCA DI RACCOLTA

Le raccolte anticipate garantiscono un prodotto di sanità superiore (Rodriguez-Del-Bosques, 1996, Reyneri et al., 2007). In caso di colture soggette a stress idrico o in periodi di maturazione particolarmente caldi il ritardo delle raccolte

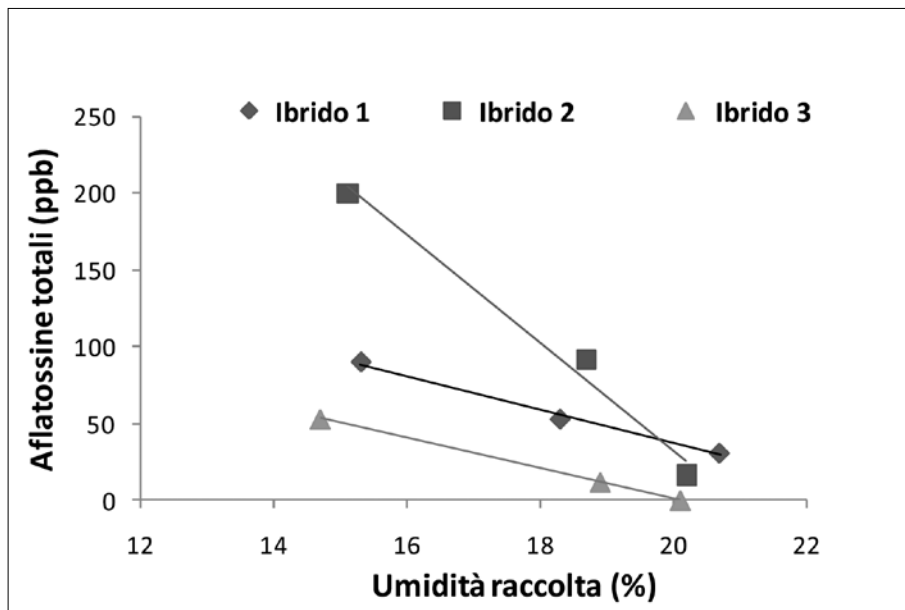


Fig. 3 *Effetto dell'umidità di raccolta sul contenuto in aflatossine totali (Reyneri e Rolon Gonzales, 2010)*

con livelli di umidità della granella inferiori al 20% comporta un netto aumento del rischio di un aumento del contenuto in aflatossine in quanto le condizioni di maturazione avanzata sono quelle più favorevoli alla crescita di *A. flavus* (fig. 3). Anche al fine di evitare eccessivi danneggiamenti alle cariossidi, l'umidità ideale per la raccolta si colloca pertanto tra il 24 e il 26% di umidità.

#### PERCORSI CULTURALI

Nessuna delle pratiche colturali fino a ora considerata è singolarmente in grado di assicurare una riduzione importante delle aflatossine, mentre si ottengono risultati apprezzabili solo applicando le diverse pratiche in modo corretto, e combinato secondo definiti percorsi colturali.

Nella tabella 3 sono riassunti i percorsi migliori per ridurre il rischio di incorrere in elevate contaminazioni da aflatossine secondo 2 livelli di attenzione: elevato (Codice A di attenzione) o medio (Codice B di attenzione), suddividendo gli interventi in indicati (utili ma non obbligatori) e richiesti (vincolanti).

In ogni caso è largamente convenuto che nelle condizioni in cui la coltura è messa in grado di esprimere le maggiori produzioni si riscontrano in genere



Livello di attenzione	CODICE A (controllo molto alto)		CODICE B (controllo alto)	
	Indicate	Richieste	Indicate	Richieste
Precessione		no monocoltura	non cereale	
Gestione residui		Interramento dopo calcitazione		Interramento
Ibrido	Ciclo medio precoce		No ciclo tardivo	
Epoca di semina		Prima del 10 aprile		Prima del 20 aprile
Pratiche early vigor		Concia microelementi + concimazione localizzata + sarchiatura precoce		Concimazione localizzata
Controllo degli insetti		Si (miscela di s.a.)		Si
Irrigazione		Si attenta ad evitare stress	Si	
Umidità alla raccolta		> 24%		> 20%

Tab. 3 *Percorsi culturali per ridurre la probabilità di incorrere in elevate contaminazioni da aflatossine secondo 2 livelli (Codici) di attenzione (Reyneri e Rolon Gonzales, 2010, mod.; Reyneri 2013)*

livelli sensibilmente minori di contaminazione (Widstrom, 1996; Betrán e Isakeit, 2004). L'adozione di percorsi culturali attenti deve però essere coerente, ovvero coordinando razionalmente tutti gli interventi preventivi ricordati così da attuare percorsi integrati.

#### GESTIONE NEL POST RACCOLTA

La presenza delle aflatossine nella granella di mais raccolta nel corso del 2012, come era avvenuto nel corso del 2003, ha sollevato l'emergenza relativa alla

gestione del prodotto contaminato presso i centri di stoccaggio. In questo contributo non si intende ricordare le condizioni ambientali e di conservazione che inducono uno stoccaggio sicuro di lungo periodo e da tempo riconosciute come di grande rilevanza per la capacità di *A. flavus* di crescere in condizioni prossime a quelle comuni nei silos (Munkvold et al., 2002).

La presenza di limiti massimi tollerati sia nel settore alimentare umano sia nel settore zootecnico obbliga i centri di raccolta alla corretta classificazione del prodotto conservato nelle proprie strutture. La separazione delle partite è quindi la prima operazione da mettere in atto al fine di destinare in modo corretto il prodotto. Allo stesso tempo questa fase consente al centro di stoccaggio di ridurre il rischio di livellamento dei lotti e quindi l'incapacità di valorizzare alcune produzioni. Un esempio concreto potrebbe essere la non separazione della granella derivante da campi trattati con la piralide e irrigui, rispetto alla granella derivante da campi più a rischio perché non protetti dall'insetto e non irrigui.

La separazione delle partite implica sicuramente una gestione attenta durante la fase di accettazione e un'organizzazione preventiva con gli agricoltori, con lo scopo di programmare la trebbiatura e la consegna presso il centro di stoccaggio (Reyneri et al., 2004).

Per effettuare la segregazione delle partite sono necessari alcuni prerequisiti strutturali, quali ad esempio più fosse di raccolta e strutture di stoccaggio sufficienti per ciascuna tipologia di prodotto da separare. Inoltre devono essere definiti i metodi interni rapidi in grado di classificare la granella. Nel caso delle aflatossine uno strumento ampiamente diffuso è la lampada UV. Questo strumento consente la determinazione della presenza di acido kojico, un metabolita prodotto da funghi del genere *Aspergillus* che possono produrre anche le aflatossine. La fluorescenza derivante dalla presenza di questo acido viene rilevata quando il prodotto è sottoposto alla radiazione UV e il conteggio delle cariossidi fluorescenti rappresenta l'indice per prevedere il contenuto in aflatossine. Questo sistema non è però una misura diretta della micotossina, considerando anche che l'acido kojico può essere prodotto dal fungo senza che avvenga in contemporanea la produzione delle aflatossine.

Un metodo interno di analisi diretto delle aflatossine sono i saggi immunoenzimatici. Questi metodi necessitano di una fase accurata di campionamento e di una macinazione ed estrazione della granella prima di eseguire il test. I tempi medi stimati per tutte queste operazioni sono di circa 20 minuti, e questo tempo implica un'attesa da parte di chi consegna in modo da consentire la segregazione delle partite (Pascale, 2009).

Il processo di prima trasformazione effettuato presso il centro di stoccaggio, oltre alla riduzione dell'umidità tramite essiccazione forzata, prevede più fasi di

Fase di lavorazione	Aflatossine totali (ppb)
Accettazione	4.4
Pulitura verde ed essiccazione	<0.5
Pulitura a secco	<0.5
Scarti di pulitura	> 8.0

Tab. 4 *Contaminazione da aflatossine durante il processo di essiccazione*

pulizia. Queste sono eseguite sia sul prodotto “verde” sia sul prodotto secco prima dello stoccaggio nei sili e capannoni. La pulitura svolge un’azione correttiva e preventiva, in quanto permette l’allontanamento di quei materiali come chicchi spezzati, farina e polveri più contaminati o a maggiore rischio di successive contaminazioni. Queste operazioni di pulitura eseguite con macchinari che agiscono setacciando o aspirando le parti più leggere o di dimensioni minori sono in grado di riportare sotto una soglia accettabile per l’uso zootecnico (20 ppb) quando il contenuto iniziale di aflatossine non è troppo elevato e con uno scarto di circa il 20-30% (Pizzolato, 2013). I risultati di una prova sperimentale condotta in Piemonte nel 2003 presso un impianto dotato di sistema con aspiratore confermano quanto riportato sopra (tab. 4). In caso di presenza di micotossine in piccole quantità, l’azione della prima pulitura è efficace nell’abbattere questi contaminanti, che si ritrovano concentrati negli scarti di pulitura.

Un sistema più avanzato di pulizia delle partite è rappresentato dalle selezionatrici ottiche. Questi macchinari consentono di individuare e rimuovere i grani neri e ammuffiti che possono essere considerati come indicatori di una contaminazione fungina. Come per gli altri sistemi di pulitura fisici, con una percentuale di scarti rilevante (35-40%) è possibile riportare sotto la soglia di 20 ppb il contenuto in aflatossine di lotti con contaminazioni inferiori a 60 ppb. Se le contaminazioni sono superiori a 100 ppb questi sistemi fisici non sono sufficienti a garantire la pulizia del prodotto (Pizzolato, 2013).

La gestione delle aflatossine durante lo stoccaggio è molto importante al fine di evitare incrementi della contaminazione in questa fase. In annate a rischio come il 2012, dove la presenza di inoculo fungino è superiore alla media, non si deve dimenticare che i funghi del genere *Aspergillus* sono in grado di svilupparsi con umidità anche molto basse (17-18%). Di conseguenza la granella deve essere conservata con umidità del 12-13%, per ridurre la probabilità di nuova proliferazione fungina in zone particolari della massa (bordi e cappello) dove è più facile la formazione di condensa e di conseguente incre-

mento della contaminazione da aflatossine. Il monitoraggio della temperatura all'interno della massa stoccata può essere sicuramente un sistema rapido di allerta in grado di segnalare un'alterazione (Widstrom, 1996).

## CONCLUSIONI

Negli ultimi anni la contaminazione da aflatossine nella maiscoltura italiana è risultata ricorrente e spesso così elevata da causare danni rilevanti di carattere commerciale sia nel breve sia nel medio periodo. In particolare le filiere direttamente o indirettamente legate al mais hanno subito un danno apprezzabile anche di immagine. Data la ricorrenza con la quale si è manifestato questo grave problema sanitario si deve ritenere che il problema possa definirsi strutturale, cioè legato alle caratteristiche del sistema ambientale e produttivo locale. Da questa situazione è possibile emergere solo attraverso la risoluzione delle cause di fondo che inducono il manifestarsi delle contaminazioni: in sintesi occorre rivedere profondamente l'agrotecnica secondo le linee sopra indicate, riprogrammare le raccolte introducendo criteri rigorosi per evitare la trebbiatura a umidità troppo bassa, evitare i ritardi tra la trebbiatura stessa e l'essiccazione, e attuare la selezione dei conferimenti e la conseguente segregazione dei lotti in relazione al rischio agronomico o meglio alla presenza del fungo tossigeno o della tossina stessa.

Tutto ciò richiede di orientare urgentemente sforzi e investimenti da parte di tutti gli operatori dei primi anelli della filiera e di riesaminare gli indirizzi della politica agraria e del territorio avendo ben presente che gli aspetti sanitari sono un ineludibile pre-requisito a cui altri interventi debbono essere subordinati.

## RIASSUNTO

Nella realtà agricola e ambientale italiana la contaminazione da aflatossine si presenta in modo più rilevante nella granella di mais. La frequenza con cui si manifestano importanti contaminazioni dipende in larga parte dall'andamento meteorologico dell'annata e dai caratteri strutturali del sistema maidicolo.

Elevate concentrazioni nel mais si riscontrano già in campo durante la maturazione soprattutto quando la coltura è soggetta a stress idrico e ad alte temperature che assieme permettono ad *Aspergillus flavus*, di crescere e di sintetizzare le tossine. In relazione a ciò, l'areale sud orientale della Pianura padano-veneta è quella che da più anni si è dimostrato il più soggetto a elevate contaminazioni.

Le ricerche hanno evidenziato che sono di primaria importanza per ridurre il rischio

di infezioni: la scelta di ibridi di mais adatti alle condizioni colturali, l'interramento dei residui, gli interventi volti a stimolare l'early vigor e l'anticipo della fioritura, la difesa da insetti fitofagi e tutti gli interventi volti a ridurre gli stress e in particolare quello idrico. D'altra parte per ridurre il rischio di elevate concentrazioni di aflatoossine è necessario limitare la durata in campo della fase terminale della maturazione quando è maggiore la tossinogenesi, anticipando le raccolte. L'adozione di percorsi colturali attenti deve però essere coerente, ovvero coordinando razionalmente tutti gli interventi preventivi ricordati.

Infine il sistema di raccolta e conservazione deve essere strutturato per segregare le partite provenienti in relazione alle condizioni colturali, oppure attraverso un'analisi diretta della presenza della muffa tossigena o delle aflatoossine.

#### ABSTRACT

In the Italian environmental cultural conditions, aflatoxins are found mainly in maize kernels. The extension of the contamination is mainly depending by the meteorological conditions during summer and by the crop practices adopted. High concentrations on maize kernel occur in the field particularly when the crop is under water stress and high temperature from tasseling to late ripening; in such conditions *Aspergillus flavus* becomes more competitive and able to synthesize high amount of aflatoxins. Thus the production from the East part of the Po Plain, warmer and drier, is more prone to aflatoxin contamination.

Several researches have pointed up that, in order to reduce the risk of diffuse contamination, it is necessary to apply the following good practices; choice of hybrid well adapted to the environmental crop conditions, burial of residues, early fertilization able to increase the crop early vigor, restrain of phytophagous and control of plant stresses, particularly water deficit. Moreover, the reduction of the risk of high contamination could be achieved through the reduction of the last part of the ripening period obtained by an earlier harvest. A significant decrease of aflatoxins could be achieved only if the mentioned practices are combined in rational good procedures.

Finally, the harvest organization and the storage system need to be structured to segregate the lots featuring different mycotoxin concentration through the analysis of the cropping system, or the presence of *A. flavus* on kernels, or direct analysis of aflatoxin concentration.

#### BIBLIOGRAFIA

- BETRÁN F.J., ISAKEIT T. (2004): *Aflatoxin contamination in maize hybrid with different maturities*, «Agron. J.», 96, pp. 565-570.
- BROWN R.L., BHATAGNAR D., CLEVELAND T.E., CARY J. W. (1998): *Recent advances in preharvest prevention of mycotoxin contamination*, in Sinha, K. K., Bhatagnar, D. (Eds.), *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, Marcel Dekker, New York, pp. 381-398.
- CINTI F., GASPARI F., CASAGRANDE M. (2004): *Influenza della modalità di coltivazione, essiccamento e stoccaggio sulla presenza di aflatoossine in granella di mais*, Atti del "1° Con-

- gresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare", Istituto Superiore di Sanità, Roma 29-30 novembre, p. 74.
- CINTI F., GRANDI S., CASAGRANDE M. (2004): *Effetto del trattamento antipirale sulla presenza di tossine in granella di mais*, Atti del "1° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare", Istituto Superiore di Sanità, Roma 29-30 novembre, p. 56.
- CAUSIN R. (2013): *Cosa sapere per prevenire il rischio aflatossine nel mais*, «L'Informatore agrario», 3, pp. 46-49.
- DAVIS N.D., CURRIER C.G., DIENER U.L. (1985): *Response of corn hybrids on aflatoxin formation by Aspergillus flavus*, «Alabama Agric. Exp. Stn. Bull.», 575.
- DEL PUPO G., FELLONI S., CASAGRANDE M. (2007): *Trattare la pirale per ridurre le aflatossine*, «Terra e Vita», 48 (6), pp. 54-56.
- DOWN P.F. (1998): *Involvement of arthropods in the establishment of mycotoxigenic fungi under field condition*, in *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety* (Sinha K. K. and Bhatnagar D., Eds.), Marcel Dekker, New York, pp. 307-350.
- JONES R. K., DUNCAN H. E. (1981a): *Effect of nitrogen fertilizer, planting date and harvest date on aflatoxin production in corn inoculated with Aspergillus flavus*, «Plant Dis.», 65, pp. 741-744.
- JONES R. K., DUNCAN H. E., HAMILTON P. B. (1981b): *Planting date, harvest date and irrigation effect on infection and aflatoxin production by Aspergillus flavus in field corn*, «Phytopathology», 71, pp. 810-816.
- LILLEHOJ E.B., McMILLIAN W.W., GUTHRIE W.D., BARRY D. (1980): *Aflatoxin producing fungi in preharvest corn: inoculum source in insects and soils*, «J. Environ. Qual.», 9, pp. 691-694.
- LISKER N., LILLEHOJ E. B. (1991): *Prevention of mycotoxin contamination (principally aflatoxins and Fusarium toxins) at the preharvest stage*, in Smith, J. E., Henderson, R. A. (Eds.), *Mycotoxins and Animal Foods*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 689-719.
- MCGEE D. C., OLANYA O. M., HOYOS G. M. (1996): *Populations of Aspergillus flavus in the Iowa cornfield ecosystems in years not favourable for aflatoxin contamination of corn grain*, «Plant Disease», 80, pp. 742-746.
- McMILLIAN R.W., WIDSTROM N.W., WILSON D.M. (1987): *Impact of husk type and species of infesting insects on aflatoxin contamination in pre-harvest corn at Tifton, Georgia*, «J. Entomol. Sci.», 22, pp. 307-310.
- MUNKVOLD G.P. (2002): *Aflatoxin in corn*, Iowa State University Publication, n. 1800.
- MUNKVOLD G.P. (2003): *Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize*, «Annu. Rev. Phytopathol.», 41, pp. 99-116.
- NICHOLSON P., GOSMAN N., DRAEGER R., STEED A. (2004): *Control of Fusarium and Aspergillus species and associated mycotoxins on wheat and maize*, in Barug D., van Egmond H., Lopez-Garcia R., van Osenbruggen T., Visconti A. (Eds.), *Meeting the mycotoxin menace*, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp. 113-132.
- PASCAL M. (2009): *Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products*, «Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences», 117, pp. 15-25.
- PAYNE G. A. (1998): *Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops*, in *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety* (Sinha K. K. and Bhatnagar D. Eds.), Marcel Dekker, New York, pp. 279-306.
- PAYNE G.A., CASSEL D.K., ADKINS C.R. (1986): *Reduction of aflatoxin contamination in corn by irrigation and tillage*, «Phytopathology», 76, pp. 181-196.
- PAYNE G.A., KAMPFRATH E.J., ADKINS C.R. (1989): *Increased aflatoxin contamination in nitrogen-stressed corn*, «Plant Disease», 73, pp. 556-559.

- PIETRI A., BERNABUCCI U., REYNERI A., VISCONTI A. (2004): *Come prevenire le aflatossine nel latte*, «L'Informatore Agrario», 14 (60), pp. 49-50.
- PIZZOLATO G. (2013): *Mais 2012: la gestione del problema aflatossine dalla raccolta alla commercializzazione*, Convegno Rovigo: Mais e aflatossine 2012: l'emergenza continua.
- REYNERI A. (2006): *The role of climatic condition on mycotoxin production*, «Veterinary Research Communications», 30 (Suppl. 1), pp. 87-92.
- REYNERI A., BLANDINO M., VANARA F., MAIORANO A. (2005): *Fattori agronomici che influenzano la produzione di micotossine*, «Informatore Fitopatologico», 55, pp. 3-10.
- REYNERI A. (2013): *Aflatossine mais, per prevenire la contaminazione in campo*, «Informatore Fitopatologico» (Suppl. di Terra e Vita), 9, pp. 33-36.
- REYNERI A., VISCONTI A., AVVANTAGGIATO G., BLANDINO M., DESIDERIO E. (2004): *Ridurre il rischio aflatossine negli alimenti zootecnici è possibile*, «L'Informatore Agrario», 14 (60), pp. 53-56.
- RODRIGUEZ-DEL-BOSQUE L. A. (1996): *Impact of agronomic factors on aflatoxin contamination in preharvest field corn in northeastern Mexico*, «Plant Dis.», 80, pp. 988-993.
- SALADINI M., BLANDINO M., REYNERI A., ALMA A. (2008): *The impact of insecticide treatments on Ostrinia nubilalis (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) and their influence on the mycotoxin contamination of maize kernels*, «Pest Management Science», pp. 88-97.
- THOMPSON D.L., PAYNE G.A., LILLEHOJ E.B., ZUBER M.S. (1983): *Early appearance of aflatoxin in developing corn kernels after inoculation with Aspergillus flavus*, «Plant Dis.», 67, pp. 1321-1322.
- TUBAJIKA K.M., MASCAGNI H.J., DAMANN K.E., RUSSIN J.S. (1999): *Nitrogen fertilizer influence on aflatoxin contamination of corn in Louisiana*, «J. Agric. Food Chem.», 47 (12), pp. 5257-5260.
- WIATRAC P.J., WRIGHT D.L., MAROIS J.J., WILSON D. (2005): *Influence of planting date on aflatoxin accumulation in Bt, non-Bt, and Tropical non-Bt Hybrids*, «Agron J», 97, pp. 440-445.
- WIDSTROM N.W. (1979): *The role of insect and other plant pest in aflatoxin contamination of corn*, «J. Environ. Qual.», 8, pp. 5-11.
- WIDSTROM N.W. (1996): *The aflatoxin problem with corn grain*, in Sparks, D. (Ed.), *Advances in Agronomy*, Academic Press, Inc. New York, 56, pp. 219-280.
- WIDSTROM N.W., McMILLIAN W.W., BEAVER R.W., WILSON D.M. (1990): *Weather-associated changes in aflatoxin contamination in preharvest maize*, «J Prod Agric», 3, pp. 196-199.
- WIDSTROM N.W., SPARK A.N., LILLIHOJ E.B., KWOLEK W.F. (1975): *Aflatoxin production and lepidopteran insect injury on corn in Georgia*, «J. Econ. Entomol.», 68, pp. 855-856.
- WIDSTROM N.W., WILSON D.M., RICHARD J.L., McMILLIAN W.W. (1994): *Resistance in maize to preharvest contamination by aflatoxin*, «Plant Pathol.», 1, pp. 49-54.





## Prevenire le aflatossine attraverso il controllo degli insetti

### L'ASSOCIAZIONE "INSETTI - MICOTOSSINE"

Il legame tra insetti fitofagi dannosi al mais e funghi micotossigeni è stato dimostrato per numerose specie (Dowd et al., 2005). Gli insetti possono favorire l'infezione fungina sia attraverso l'attività trofica di erosione della granella, sia attraverso la disseminazione diretta del fungo da parte delle larve durante i loro movimenti (Dowd, 1998). L'elenco di insetti associati allo sviluppo delle micotossine è piuttosto numeroso e comprende specie appartenenti a vari ordini (Dowd, 1998; Dowd et al., 2005), accomunate da abitudini alimentari che le portano a nutrirsi della pianta di mais in generale e in molti casi direttamente della granella in vari stadi di maturazione. Il ruolo che gli insetti hanno nell'interazione pianta-patogeno non è sempre di facile quantificazione e in vari studi svolti mostra una variabilità notevole a causa di vari fattori ambientali che influenzano contemporaneamente la pianta ospite, i funghi micotossigeni e gli insetti; spesso in modo non concorde. Ad esempio, quando si verificano condizioni sfavorevoli per la pianta e idonee per il fungo, la sintesi di micotossine è comunque tanto elevata da essere poco influenzata dalla presenza dell'insetto e dei danni da questo prodotti.

Anche la fase fenologica della pianta al momento dell'attacco da parte degli insetti ha un'influenza importantissima: varie prove di campo hanno dimostrato che i danni causati da insetti alla spiga nelle fasi fenologiche che vanno dall'allegagione all'inizio della maturazione cerosa, possono favorire la contaminazione da parte dei funghi micotossigeni. Al contrario, se l'insetto infesta la spiga quando questa ha perso umidità fino a un livello che non rende

\* *Istituto di Entomologia e Patologia vegetale, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

possibile l'attività del fungo, il livello finale di tossine non viene influenzato (Dowd et al., 1999).

In Europa il ruolo principale è svolto da alcune specie di Lepidotteri tra cui spicca per importanza e diffusione la piralide del mais, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) (Avantaggiato et al., 2003; Mazzoni e Battilani, 2007). Le larve di *O. nubilalis* nei loro movimenti possono raccogliere e trasportare le spore trasferendole poi alle cariossidi durante la fase di nutrimento.

#### LA PIRALIDE DEL MAIS

*O. nubilalis*, soprattutto nelle aree maidicole più importanti dell'Italia settentrionale, è, per importanza economica, il principale fitofago del mais. Nelle aree maidicole dell'Italia meridionale alcuni nottuidi del genere *Sesamia* (*Sesamia nonagroides* (Lef.) e *S. cretica* (Led.)) si comportano da specie vicarianti producendo danni simili (Riolo et al., 2001).

*O. nubilalis* è una specie spiccatamente polifaga, in grado di completare il proprio ciclo di sviluppo a spese di molte piante spontanee e coltivate. Le graminacee coltivate (mais, sorgo, saggina) sono gli ospiti preferenziali ma sono ampiamente noti i danni a piante orticole (peperone, fagiolo, fagiolino) o ad altre piante erbacee quali barbabietola, tabacco, canapa, luppolo e ornamentali. Sono stati segnalati attacchi anche a fruttiferi con danni ai frutti (melo, pesco, actinidia). Infine è anche noto che la specie può sviluppare a carico di piante spontanee quali *Artemisia* sp., *Polygonum* sp., *Chenopodium* sp., *Plantago* sp.

Le larve hanno tipicamente abitudini endofitiche e sviluppano scavando gallerie più o meno profonde nei tessuti dell'ospite.

La specie è nota per il suo polivoltinismo: in Italia normalmente il numero di generazioni annue è di 2-3 e sembrerebbe che solo raramente si abbia una sola generazione (Manachini, 2005).

I danni prodotti direttamente dalle larve sono, in genere, piuttosto gravi. Mentre le larve della prima generazione si cibano delle foglie di piante ancora relativamente poco sviluppate, le larve delle generazioni successive sviluppano a spese dello stocco e delle varie parti della spiga. I tunnel di alimentazione, soprattutto quelli nello stocco e nel peduncolo della spiga portano a gravi perdite produttive sia per la distruzione del sistema vascolare che altera la traslocazione di acqua e nutrienti (Lynch, 1980) sia perché facilitano la caduta a terra delle spighe a ridosso e durante la raccolta meccanica.

Il monitoraggio della piralide rappresenta un punto chiave per lo sviluppo di efficaci strategie di difesa fitosanitaria. Tuttavia ancor oggi esistono varie difficoltà perché lo si possa applicare su larga scala in modo efficiente. La conta delle masse di uova rappresenta una metodica in grado di individuare con precisione i momenti di massima attività della specie e di definire il momento di maggior rischio per la coltura ma richiede notevoli risorse di tempo e un certo livello di esperienza che ne impediscono una applicazione di routine (Hudon et al., 1989). Per molti Lepidotteri le trappole a feromone sono uno strumento di monitoraggio semplice, economico e molto efficace (Molinari, 2007). Nel caso della piralide però i dati e le esperienze sono contraddittori. Accanto a varie esperienze positive (Maini e Burgio, 1999; Pelozuelo e Frerot, 2006) sono anche riportati casi di minor efficienza (Laurent e Frerot, 2007). La causa di alcuni insuccessi delle trappole a feromoni potrebbe essere legata a una composizione non ottimale della miscela feromonica utilizzata. La sostanza che viene considerata il feromone sessuale della piralide è l'11-tetradecenilacetato che presenta 2 isomeri: Z (cis) ed E (trans). Si ritiene che la miscela attrattiva sia Z:E (97:3) ma sia in Italia che negli Stati Uniti d'America esistono ceppi che rispondono alla miscela Z:E (3:97) e, sempre in Italia, sono note anche popolazioni che rispondono alla miscela Z:E (50:50). È pertanto piuttosto complicato scegliere il feromone più adatto, senza considerare poi il fatto che potrebbero esistere anche altre sostanze non ancora identificate nella vera miscela feromonica della piralide.

L'uso di trappole luminose, su cui si sono basati sistemi di allerta su base comprensoriale, presenta invece notevoli difficoltà logistiche date dalla necessità di fornire energia elettrica e dalla mancanza di selettività che conduce a una eccessiva abbondanza di catture con il conseguente lungo lavoro di identificazione degli individui catturati (Laurent e Frerot, 2007).

#### IL CONTROLLO DELLA PIRALIDE

La monocoltura certamente favorisce l'espansione e l'incremento di abbondanza delle popolazioni di *O. nubilalis*. Al contrario la rotazione colturale, le variazioni dell'epoca di semina e la distruzione e interrimento invernale degli stocchi possono contribuire a ridurre il numero di individui. Tecniche come la confusione sessuale sono ancora a uno stadio sperimentale e pertanto non applicabili su vasta scala (Molinari et al., 2009).

La polifagia della specie la rende "molto flessibile" e in grado di sviluppare a spese di molti ospiti alternativi.

È sempre più comune, nelle aree a maggior specializzazione maidicola, l'applicazione di insetticidi contro la seconda generazione. I benefici di questa pratica sono stati più volte confermati: si riducono le perdite produttive ma soprattutto, alla luce delle problematiche attuali, si riduce significativamente la contaminazione da micotossine (Saladini et al., 2008; Mazzoni e Battilani, 2009; Mazzoni et al., 2011).

Tuttavia sussistono ancora problemi logistici che si frappongono a un'applicazione su vasta scala di queste pratiche. Innanzi tutto vi è la scarsa disponibilità delle specifiche attrezzature per il trattamento (trampoli) (Baldoin, 2012). Il costo elevato di tali attrezzature ne limita la diffusione con la conseguente difficoltà di poter trattare nel momento ottimale vaste superfici, e quindi risulta quasi impossibile sincronizzare in modo ottimale l'applicazione dell'insetticida con la fase fenologica più suscettibile della piralide. A causa delle ampie estensioni coltivate a mais è consistente il rischio di effettuare i trattamenti in un momento sbagliato riducendo significativamente l'efficacia dell'intervento stesso. Talvolta la presenza di piogge o i turni di irrigazione, limitando l'ingresso in campo alle macchine per i trattamenti, possono ulteriormente ridurre la possibilità di colpire la piralide nel momento migliore (Mazzoni e Battilani, 2009). Anche la possibile presenza contemporanea di popolazioni con differente voltinismo rende più difficile, in alcune aree, attuare strategie efficaci di difesa fitosanitaria. La contemporanea presenza di popolazioni con voltinismo diverso rende infatti possibile avere in campo, per un periodo di tempo più lungo, varie stadi di sviluppo del fitofago con la conseguenza che si estende notevolmente la fase di rischio per la coltura.

L'impiego di insetticidi con diversa modalità di azione in base al momento di distribuzione consente di valorizzarne l'efficacia. La maggior parte dei prodotti utilizzati appartiene al gruppo dei piretroidi (Blandino et al., 2010; Blandino et al., 2010; Mazzoni et al., 2011). Risultati positivi sono stati ottenuti anche applicando prodotti appartenenti al gruppo genericamente indicato come "regolatori di crescita" (Benzoiluree, insetticidi con meccanismo d'azione IRAC 15: inibitori della biosintesi della chitina di tipo 0) (Mazzoni e Battilani, 2009). Si tratta, nella quasi totalità dei casi, di insetticidi privi di attività citotropica o sistemica e pertanto non in grado di colpire le larve dopo che queste hanno iniziato a scavare le gallerie all'interno dei tessuti della pianta. In generale l'enorme massa di vegetazione del mais rappresenta un'oggettiva difficoltà per applicare gli insetticidi. Non è quindi applicabile ed efficiente trattare le larve dopo la loro nascita e penetrazione nei tessuti.

Evidenze sperimentali indicano che il costo del trattamento potrebbe essere recuperato da incrementi produttivi (Del Pupo et al., 2007).

L'efficienza dei trattamenti insetticidi nel ridurre lo sviluppo di micotossine dipende da vari fattori. Negli anni caratterizzati da una ridotta abbondanza delle popolazioni di *O. nubilalis* la differenza tra appezzamenti trattati e non trattati si riduce. Anche in annate particolarmente favorevoli allo sviluppo fungino i trattamenti possono non ottenere l'effetto desiderato non riuscendo a ridurre il livello di micotossine al di sotto delle soglie di accettabilità; tuttavia si osserva in genere una significativa riduzione della contaminazione rispetto agli appezzamenti non trattati (Mazzoni et al., 2011).

In genere i trattamenti sono piuttosto efficaci contro le larve di piralide soprattutto in presenza di elevate infestazioni (Mazzoni e Battilani, 2009). Varie esperienze indicano una significativa riduzione delle micotossine. L'abbattimento del contenuto di fumonisine, in percentuale rispetto alle colture non trattate, può variare tra il 15% circa, nelle annate poco favorevoli alla piralide e a *Fusarium verticillioides*, quindi con valori di contaminazione molto bassi, e l'80% in condizioni opposte. Dati simili sono stati riscontrati anche per le aflatossine.

Rimane tuttavia importante effettuare nel modo migliore i trattamenti scegliendo il principio attivo più adatto e applicandolo nel momento di maggior efficacia (Baldoin, 2012). Contenere le larve presenti sulla spiga è importante perché è stata dimostrata una significativa correlazione tra il numero di larve attive nella spiga alla maturazione cerosa e la concentrazione di micotossine ( $FB1_{\mu g/kg} = 2127.6 \ln_{larve/spiga} + 1969.2$ ;  $R^2 = 0.74$ ;  $P = 0.00$ ). Infestazioni inferiori a 2 larve per spiga garantirebbero contaminazioni della granella, prima della pulitura, al di sotto dei 4.000  $\mu g/kg$  (Mazzoni et al., 2011). Il momento di applicazione è altrettanto importante e varie esperienze condotte in provincia di Cremona hanno evidenziato che la fase di invecchiamento sete (BBCH 67), considerata ottimale per l'infezione fungina (Headrick et al., 1990) in molti anni è risultato coincidente con l'ovideposizione da parte della seconda generazione di *O. nubilalis* (Mazzoni et al., 2011). Applicazioni successive degli insetticidi a questa fase possono essere ancora efficaci contro le larve ma il controllo delle micotossine è decisamente meno soddisfacente (Mazzoni e Battilani, 2009).

A livello mondiale sono poi già ampiamente disponibili ibridi di mais geneticamente modificati con l'inserzione di geni provenienti dal batterio entomopatogeno *B. thuringiensis*. Tali ibridi producono una proteina tossica per le larve dei Lepidotteri e si sono dimostrati, in vari anni e località, in grado di ridurre significativamente il contenuto di micotossine anche se le indicazioni sono assai variabili, con valori di

fumonisine da 2 a 40 volte maggiori nei corrispondenti ibridi non Bt coltivati nelle medesime condizioni e con differenze minori in corrispondenza dei più bassi livelli di contaminazione. Nelle prove con mais Bt è stata riscontrata una buona correlazione tra il numero di cariossidi colpite da piralide e il contenuto di fumonisine. Riguardo all'effetto dei Bt sul contenuto di aflatossine, i dati sono assai variabili, dall'assenza di effetto a riduzioni rilevanti (Dowd, 2001; Dowd et al., 2005).

I risultati sin qui ottenuti nel controllo della piralide sono molto interessanti ma non risolutivi. Esistono ampi spazi per il miglioramento cercando nuove strategie di difesa che possano superare le difficoltà legate a problemi tecnici e che rientrino in un approccio di produzione integrata.

#### RIASSUNTO

La piralide è sempre stata considerata una specie chiave per la coltivazione del mais a causa dei gravi danni diretti che portano a perdita di produzione. Più recentemente è emerso in tutta la sua gravità il ruolo che ricopre questo insetto nella contaminazione da micotossine. La difesa con insetticidi si è sempre più affermata nelle principali aree maidicole italiane: vengono discusse l'importanza di tali pratiche e le problematiche a esse connesse.

#### ABSTRACT

European corn borer since long time was considered a key pest in maize growing, due to direct damage causing significant yield reductions. Recently the impact of this pest on mycotoxin contamination was confirmed. Chemical control in maize growing area of Italy is increasing: the impact and problems linked to such activity are discussed.

#### BIBLIOGRAFIA

- AVANTAGGIATO G., QUARANTA F., DESIDERIO E., VISCONTI A. (2003): *Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by Sesamia*, «Journal of the Science of Food and Agriculture», 83, pp. 13-18.
- BALDOIN C. (2012): *Per la lotta alla piralide del mais ci vogliono i "trampoli"*, «L'Informatore Agrario», 9, Supplemento, pp. 20-22.
- BLANDINO M., PEILA A., REYNERI A. (2010): *Timing clorpirifos+cypermethrin and indoxacarb applications to control european corn borer damage and fumonisin contamination in maize kernels*, «Journal of the Science of Food and Agriculture», 90, pp. 521-529.
- BLANDINO M., SALADINI M.A., ALMA A., REYNERI A. (2010): *Pyrethroid application timing to control European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) and minimize fumonisin contamination in maize kernels*, «Cereal Research Communications», 38, pp. 75-82.

- DEL PUPO G., FELLONI S., CASAGRANDI M. (2007): *Trattare la piralide per ridurre le aflatoossine*, «Terra e Vita», 48, pp. 54-56.
- DOWD P.F., BENNETT G.A., MCGUIRE M.R., NELSEN T.C., SHASHA B.S., SIMMONS F.W. (1999): *Adherent malathion flour granules as an environmentally selective control for chewing insect pests of dent corn ears: indirect reduction of mycotoxigenic ear molds*, «Journal of Economic Entomology», 92, pp. 68-75.
- DOWD P.F., JOHNSON E.T., WILLIAMS W.P. (2005): *Strategies for insect management targeted towards mycotoxin management*, in *Aflatoxin and food safety*, Abbas H. Ed., CRC Press LLC, Boca Raton, USA, pp. 517-541.
- DOWD P.F. (1998): *Involvement in arthropods in the establishment of mycotoxigenic fungi under field conditions*, in *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, Sinha K.K. & Bhatnagar D. Eds., Marcel Dekker, New York, NY, USA, pp. 307-350.
- DOWD P.F. (2001): *Biotic and abiotic factors limiting efficacy of Bt corn in indirectly reducing mycotoxin levels in commercial fields*, «Journal of Economic Entomology», 94, pp. 1067-1074.
- HEADRICK J.M., PATAKY J.K., JUVIK J.A. (1990): *Relationships among carbohydrate content of kernels, condition of silks after pollination, and the response of sweet corn inbred lines to infection of kernels by Fusarium moniliforme*, «Phytopathology», 80, pp. 487-494.
- HUDON M., LEROUX E.J., HARCOURT D.G. (1989): *Seventy years of European corn borer (Ostrinia nubilalis) research in North America*, «Agricultural Zoology Reviews», 3, pp. 53-96.
- LAURENT P. & FREROT B. (2007): *Monitoring of European corn borer with pheromone-baited traps: review of trapping system basics and remaining problems*, «Journal of Economic Entomology», 100 pp. 1797-1807.
- LYNCH R.E. (1980): *European corn borer: yield losses in relation to hybrid and stage of corn development*, «Journal of Economic Entomology», 73, pp. 159-164.
- MAINI S., BURGIO G. (1999): *Ostrinia nubilalis (Hb.) (Lep., Pyralidae) on sweet corn: relationship between adults caught in multibaited traps and ear damages*, «Journal of Applied Entomology», 123, pp. 179-185.
- MANACHINI, B. (2005): *Uso di tecniche biomolecolari per la distinzione dei biotipi mono, bivoltini e polivoltini di Ostrinia nubilalis Hb. (Lepidoptera: Crambidae)*, in *Atti del XX Congresso nazionale italiano di Entomologia 13-18/06/2005 Assisi (PG), Italy*, pp. 421.
- MAZZONI E., BATTILANI P. (2007): *La piralide favorisce i funghi che producono micotossine*, «Informatore Agrario», 8, pp. 51-54.
- MAZZONI E., BATTILANI P. (2009): *Pyrethroids and the food chain - mycotoxin management*, «Bayer CropScience Journal», 62, pp. 227-242.
- MAZZONI E., SCANDOLARA A., GIORNI P., PIETRI A., BATTILANI P. (2011): *Field control of Fusarium ear rot, Ostrinia nubilalis (Hubner), and fumonisins in maize kernels*, «Pest Management Science», 67, pp. 458-465.
- MOLINARI F., IODICE A., CAPPELLARO P., BASSANETTI C., SAMBADO P., CIGOLINI M., ANACLERIO M., SAVINO F. (2009): *The use of pheromone mating disruption technique for the control of Ostrinia nubilalis: preliminary research and field applications*, «IOBC/WPRS Bulletin», 41, pp. 41-44.
- MOLINARI F. (2007): *Uno strumento a supporto della difesa di pesco, albicocco e susino: l'uso dei feromoni su drupacee contro i lepidotteri carpofagi*, «L'Informatore Agrario», 63, pp. 53-56.
- PELOZUELO L., FREROT B. (2006): *Behaviour of male European corn borer, Ostrinia nubilalis Hubner (Lep.; Crambidae) towards pheromone-baited delta traps, bucket traps and wire mesh cone traps*, «Journal of Applied Entomology», 130, pp. 230-237.

- RIOLO P., NARDI S., MAINI S. (2001): *Sesamia e piralide: attacchi su mais da granella nel Marchigiano*, «L'Informatore Agrario», 57 (7), pp. 101-105.
- SALADINI M.A., BLANDINO M., REYNERI A., ALMA A. (2008): *Impact of insecticide treatments on Ostrinia nubilalis (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae) and their influence on the mycotoxin contamination of maize kernels*, «Pest management science», 64, pp. 1170-1178.



LUCIA BAILONI\*, AMEDEO PIETRI\*\*, ANTONIO GALLO\*\*,  
FRANCESCO MASOERO\*\*, GIANFRANCO PIVA\*\*\*

## Le aflatossine nelle filiere agro-alimentari: dal feed al food

### PREMESSA

La contaminazione da aflatossine (AF) degli alimenti zootecnici deve essere considerata sia dal punto di vista degli effetti diretti che la loro ingestione può avere sulla salute, sul benessere e sulle performance degli animali (De Liguoro, 2006; Piva et al., 2009) che, indirettamente, dal punto di vista della sicurezza alimentare dei prodotti di origine animale consumati dall'uomo (Bailoni, 2006; Piva et al., 2009). Obiettivo di questo lavoro è quello di i) valutare la contaminazione delle materie prime e dei mangimi composti ottenuti nell'annata agraria 2012, ii) comprendere i meccanismi che regolano il trasferimento delle AF dal feed al food, nonché i fattori in grado di influenzare il carry-over, iii) descrivere i principali metodi di detossificazione e di decontaminazione che possono o potranno essere utilizzati nel futuro per ottenere alimenti più sani per gli animali, iv) fornire indicazioni sull'efficacia delle sostanze in grado di ridurre la contaminazione e l'assorbimento dell'aflatossina o modificarne le modalità di azione.

### I. LA CONTAMINAZIONE DA AFLATOSSINE DELLE MATERIE PRIME E DEI MANGIMI

Molte delle materie prime di origine vegetale prodotte in azienda e acquistate direttamente dagli allevatori per l'alimentazione degli animali da reddito oppure impiegate dall'industria mangimistica per la preparazione di mangimi

\* *Dipartimento di Medicina Comparata e Alimentazione, Università di Padova*

\*\* *Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Università Cattolica del Sacro Cuore*

\*\*\* *Presidente Com. Scientifico Agrisystem, UCSC, Piacenza*

ALIMENTO	RISCHIO
Arachide e derivati	Medio o elevato
Cocco pannello	Medio o elevato
Palma pannello	Medio o elevato
Lino pannello	Medio o elevato
Granella/farina di mais	Medio o elevato
Corn gluten feed	Medio o elevato
Semola glutinata di mais	Medio o elevato
Farina estrazione germe di mais	Medio o elevato
Semi di cotone e derivati (panello)	Possibile
Pastone di mais	Possibile
Insilato di mais	Modesto – possibile
Orzo, frumento, altri cereali	Trascurabile
Fieni, foraggi verdi	Trascurabile
Soia	Trascurabile
Crusca	Trascurabile

Schema 1 *Alimenti zootecnici a più alto rischio di contaminazione da aflatossine*

completi/complementari e premiscele possono presentare livelli più o meno gravi di contaminazione da AF. Il mais e i derivati del mais (glutine, semola glutinata ecc.) si collocano fra le materie prime a più alto rischio di contaminazione (Piva et al., 2006).

Fra gli alimenti con grado di rischio medio-elevato (schema 1), il mais è sicuramente quello più utilizzato nell'alimentazione zootecnica. Dalle stime fornite da ASSALZOO (2012) la produzione nazionale di mais nel 2010 è risultata pari a 8.566.182 t (pari al 50% del totale dei cereali prodotti in Italia); inoltre sono state importate poco più di 2 milioni di t a fronte di una esportazione di poco più di 100.000 t. Una percentuale pari all'80.2% del mais disponibile a livello nazionale è stata destinata nel 2010 all'alimentazione zootecnica mentre la quota rimanente è stata utilizzata per altre finalità (alimenti per l'uomo e derivati industriali). Il mais viene impiegato nella preparazione dei mangimi in quote variabili dal 5 al 60% in funzione della specie animale, come evidenziato da Piva et al. (2009), ma può raggiungere valori anche più elevati quando è ottenuto a livello aziendale ed è incluso direttamente nelle razioni in allevamento, come granella intera o sottoposta a vari trattamenti fisici (farine, fiocchi, estrusi) oppure come insilato della pianta intera (silomais) o di parti della pianta (pastone di pannocchia, di granella ecc.).

In tabella 1 si riportano i risultati di contaminazione da aflatossina B1 (AFB1) ottenuti presso il laboratorio accreditato (Accredia, certificato n. 0655 del 03/03/2006) dell'Associazione Regionale Allevatori del Veneto (De Paoli, 2013), su campioni di autocontrollo per la verifica della

TIPOLOGIA DI ALIMENTO	CAMPIONI ANALIZZATI (n.)	CONTENUTO MEDIO DI AFB1 (µg/kg)	CAMPIONI POSITIVI > 5 µg/kg (n.)	CAMPIONI POSITIVI > 5 µg/kg (%)	CAMPIONI POSITIVI > 20 µg/kg (n.)	CAMPIONI POSITIVI > 20 µg/kg (%)
Mais farina/granella	646	34,3	378	58,5	230	35,6
Mais Insilato	404	2,8	39	9,7	6	1,5
Mais pastone	222	18,87	103	46,4	54	24,3
Mangime complementare	149	3,7	31	20,8	3	2,0
Cotone seme	45	8,7	12	26,7	5	11,1
Unifeed (razione completa)	25	3,3	7	28,0	0	0,0
Orzo farina	10	0	0	0,0	0	0,0
Soia farina di estrazione	8	0,25	0	0,0	0	0,0
Sorgo insilato	5	0	0	0,0	0	0,0
Altri alimenti zootecnici	79	4.2	11	13.9	6	7.6

Tab. 1 *Livelli di contaminazione da AFB1 in campioni di alimenti zootecnici (De Paoli, 2013)*

qualità degli alimenti di interesse zootecnico. Pur non essendo questo un campione statisticamente rappresentativo della realtà veneta, l'elevata numerosità di analisi realizzate a partire dal 25/08/2012 fino al 18/02/2013 consente di effettuare alcune considerazioni interessanti sul livello di contaminazione degli alimenti presenti nelle aziende zootecniche del Veneto, che risulta la regione nella quale si sono registrate, accanto alle maggiori perdite economiche dovute alla siccità, anche elevate contaminazioni da AFB1 nel mais (come riportato nel lavoro di Pasti nel presente volume, a cui si rimanda).

In tabella 1 sono riportati due diversi livelli di “positività” considerando in primo luogo i 5 µg/kg di AFB1 che riguardano i “mangimi composti per bovini da latte e vitelli, ovini da latte e agnelli, caprini da latte e capretti, suinetti e pollame giovane” e i 20 µg/kg di AFB1 che sono indicati sia per le “materie prime per mangimi” che per “i mangimi composti per bovini (eccetto bovini da latte e vitelli), ovini (eccetto ovini da latte e agnelli), caprini (eccetto caprini da latte e capretti), suini (eccetto suinetti) e pollame (eccetto pollame giovane)” secondo quanto riportato dal Regolamento UE 574/2011 (vedi lavoro Brera e Guarino di questo volume).

Partendo dalla granella o farina di mais presente in allevamento (tab. 1), sia di origine aziendale che acquistata sul mercato, si può osservare come più di un terzo (35.6%) dei campioni sottoposti ad analisi sia risultato “non conforme” per l’alimentazione animale, concordando con le evidenze ottenute da altre fonti sul livello di contaminazione da AFB1 del mais della campagna 2012 (vedi lavoro Pasti del presente volume).

Riguardo alla presenza di AFB1 nel silomais e nel pastone di mais (sia di granella che di pannocchia), emerge, come atteso, un livello di contaminazione più alto nel pastone, dove la granella rappresenta la componente quantitativamente più importante della massa insilata rispetto all’insilato della pianta intera di mais (dove ovviamente si crea un effetto “diluizione”); solo l’1.5% degli oltre 400 campioni di silomais analizzati sono da ritenersi “fuori norma” mentre per il pastone quasi un quarto dei 222 campioni analizzati risulta al di sopra del limite consentito dalla legge (tab. 1). Più in generale, riguardo agli insilati va ricordato che i processi che avvengono nella massa durante il processo di fermentazione creano generalmente condizioni ambientali poco favorevoli (anaerobiosi, pH basso) allo sviluppo di funghi filamentosi produttori di aflatossine, come l’*Aspergillus flavus* (Scudamore e Livesey, 1998; Boreani et al., 2003). La contaminazione degli insilati di mais dipende molto dalla contaminazione ante insilamento, che si riduce anticipando la raccolta del trinciato nelle annate particolarmente a rischio.

Per i mangimi composti complementari (tab. 1) non sempre è stato possibile identificare, al momento della consegna al laboratorio, la destinazione dell’alimento; se si considera il limite più restrittivo (mangimi composti/complementari per animali da latte e giovani) si può osservare una percentuale di campioni superiore al 23% di mangimi composti/complementari non conformi mentre se si considera il limite di AFB1 più ampio (20 µg/kg), la percentuale scende drasticamente al 2%. In un’indagine condotta da Cinti et al. (2006) a livello nazionale su 42 mangimifici, nel triennio 2003-2005, è emerso che, nei mangimi per lattifere, solo pochi campioni (7.6% con un valore medio di 7.9 µg/kg) hanno superato analiticamente il limite di 5 µg/kg nel 2003, annata molto critica per le condizioni climatiche e, per alcuni aspetti, comparabile a quella del 2012.

In riferimento invece alle altre materie prime riportate in tabella 1, si conferma quanto osservato nello schema 1 riguardo agli alimenti zootecnici a rischio: i cereali diversi dal mais (orzo e sorgo), e la farina di estrazione di soia (principale fonte proteica nelle razioni per tutte le specie da reddito) non destano preoccupazioni per la contaminazione da AFB1. Fa eccezione il cotone che invece si colloca fra le prime fonti ad alto rischio e, anche nel campione

analizzato, pur non elevato in termini di numerosità, questa posizione sembra confermata.

## 2. II TRASFERIMENTO DELLE AFLATOSSINE DAGLI ALIMENTI AI PRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE

### 2.1 *Effetto delle aflatossine sui ruminanti e monogastrici*

I ruminanti sono considerati meno suscettibili dei monogastrici agli effetti negativi conseguenti l'ingestione delle micotossine, in quanto il comparto rumine-reticolare è in grado di modificare la struttura delle micotossine convertendola in metaboliti meno tossici per l'animale (es. tossina T-2 in vari metaboliti, ocrtaossina A in ocratossina  $\alpha$ , DON in DOM-1; Fink-Gremmels, 2008) o di legare le micotossine a dei composti in esso presenti rendendole non disponibili per l'animale (es. clorofille, strutture porfiriniche e pareti di batteri e lieviti) (Yiannikouris e Jouany, 2002; Diaz e Smith, 2005). Nel caso delle aflatossine, il meccanismo di protezione ruminale è ascrivibile quasi esclusivamente al sequestro della tossina, in quanto le molecole madri (es: AFB1) vengono trasformate in metaboliti come l'aflatossicolo, che presenta un grado di tossicità e cancerogenicità per l'animale uguale alle molecole di partenza (Cast, 2003; Moschini et al., 2008). Inoltre, il processo di conversione dell'AFB1 ad aflatossicolo avviene nelle due direzioni.

Un altro aspetto alla base della bassa efficienza di protezione del rumine nei confronti dell'AFB1 è il rapido assorbimento con cui queste tossine passano dal tratto gastro-intestinale al circolo ematico. In particolare, il basso peso molecolare e le caratteristiche lipofile della molecola delle aflatossine suggeriscono che il meccanismo alla base dell'assorbimento di queste tossine sia la diffusione passiva (Yiannikouris e Juoany, 2002). Diversi autori hanno riportato che l'assorbimento dell'AFB1 attraverso i tessuti dell'organismo avviene rapidamente (Polan et al., 1974; Trucksess et al., 1983; Coulombe, 1993; Hies and Wong, 1994). Tali aspetti sono stati confermati e approfonditi da prove condotte presso l'Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione di Piacenza (Moschini et al., 2007; Gallo et al., 2008), che hanno evidenziato come le aflatossine madri (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) e i loro metaboliti (AFM1), compaiono nel plasma dopo appena 5 minuti dalla somministrazione degli alimenti contaminati (fig. 1). La rapidità con la quale avviene l'assorbimento e la loro metabolizzazione è legata a un passaggio delle molecole che si verifica già a livello della bocca, dell'esofago e solo successivamente del

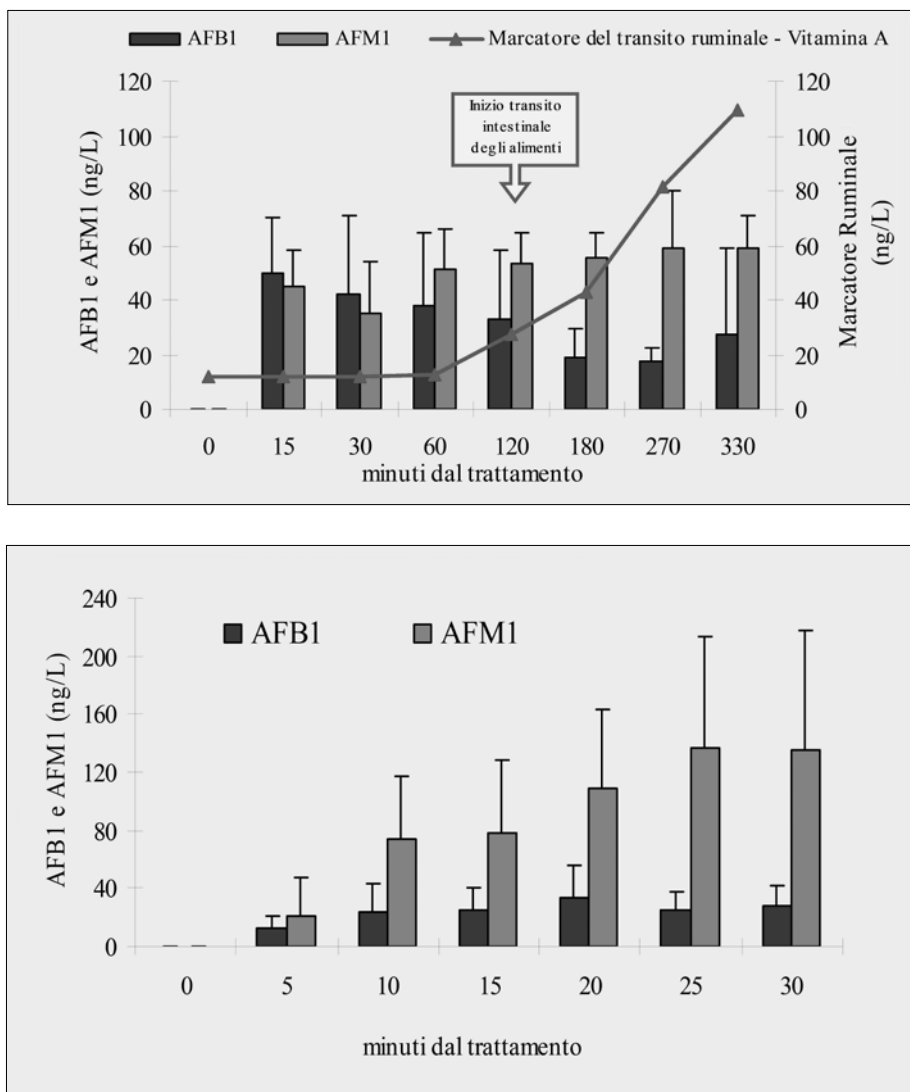


Fig. 1 *Comparsa ematica dell'AFB1 e dell'AFM1 dopo somministrazione di un singolo bolo contaminato*

rumine e dell'intestino (Gallo et al., 2008). Inoltre, il processo di idrossilazione della molecola madre ad AFM1 avviene a opera del sistema ossidativo citocromo P450 presente in diversi tessuti e organi dell'organismo, oltre che nel fegato (Eaton et al., 1994). Questa la ragione alla base della rapida comparsa ematica dell'AFM1.

### 2.1.1 Carry-over delle aflatossine nelle vacche da latte

L'escrezione delle aflatossine madri e dei loro metaboliti avviene principalmente via bile e con le urine (Eaton et al., 1994). Studi ormai datati (Wogan and Hiesh, 1980; Coulombe e Sharma, 1985; Holeski et al., 1987) hanno dimostrato come circa il 45-60% delle aflatossine ingerite vengano eliminate attraverso le feci, mentre il 15-20% con le urine. Negli animali in lattazione una piccola quantità di AFB1 viene escreta nel latte sotto forma del metabolita idrossilato AFM1. Molti studi sono stati condotti negli anni per determinare l'entità e i meccanismi che stanno alla base di tale processo di escrezione. In generale, gli studi condotti fra gli anni '60 e '70 hanno impiegato alte dosi di micotossina, animali poco produttivi e tecniche analitiche meno accurate delle attuali (Van de Linde et al., 1964; Polan et al., 1974). Fra il 1980 e il 2010, invece, le prove sono state condotte con bassi dosaggi di micotossine, animali più produttivi e tecniche analitiche migliori, in grado di quantificare concentrazioni di pochi ng/kg nel latte (Veldman et al., 1992; Battaccone et al., 2003; Masoero et al., 2007).

Da questi studi è stato possibile chiarire sia le dinamiche che il tasso di escrezione dell'AFB1 nel latte come AFM1. In particolare, quando l'animale inizia ad assumere alimenti contaminati, si osserva un aumento dell'AFM1 già dalla prima munta, che si stabilizza dopo vari giorni (da 1 a 5-6 giorni) fino al raggiungimento di una condizione stazionaria (Veldman et al., 1992; Masoero et al., 2007). Quando l'alimento contaminato viene rimosso dalla dieta, si osserva una rapida diminuzione dell'AFM1 nel latte fino al raggiungimento delle condizioni iniziali. Una tipica dinamica di escrezione dell'AFM1 nel latte è rappresentata in figura 2 (Masoero et al., 2007).

Il tasso di escrezione dell'AFB1 nel latte, denominato "carry-over", può variare dallo 0.1% a più del 6% (valori medi di gruppo pari a 1-3%) e dipende da diversi fattori quali specie (Battaccone et al., 2003), variabilità dell'individuo (Munksgaard et al., 1987; Pettersson et al., 1989; Veldman et al., 1992), attività ruminale (Westlake et al., 1989), attività epatica (Auerbach et al., 1998), induzioni del sistema ossidativo CYP450 (Steiner et al., 1990), permeabilità di membrana (Lafont et al., 1983; Veldman et al., 1992) e livello produttivo degli animali (Battaccone et al., 2003; Masoero et al., 2007) (tab. 2).

Recentemente, Van Eijkeren et al. (2006) hanno sviluppato un modello meccanicistico statico per la determinazione del carry-over dell'AFB1, suggerendo che il limite di 5 µg/kg di AFB1 nei mangimi sia appropriato per avere

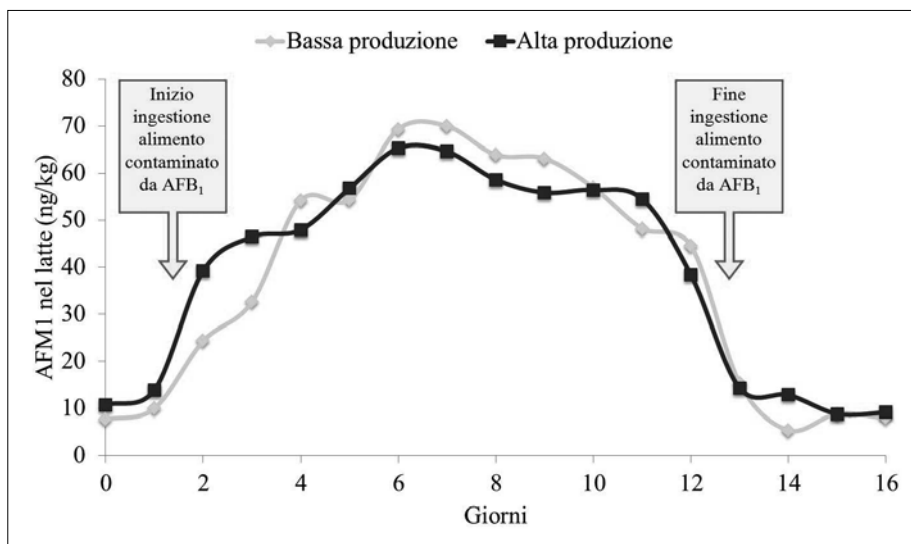


Fig. 2 *Dinamica dell'escrezione di AFB1 nel latte come AFM1 in animali a bassa (< 30 kg/capo/giorno) o alta (> 30 kg/capo/giorno) produzione di latte*

contaminazioni nel latte minori di 50 ng/kg di AFM1. Nella nostra realtà zootecnica, sembra che il limite imposto dalla comunità europea sui mangimi completi/complementari e sulle materie prime (20 µg/kg di AFB1) non sia in grado di salvaguardare gli allevatori dal rischio di contaminazione elevata del latte. A tal proposito, diverse equazioni sono state proposte per avere una prima valutazione del rischio in allevamento e queste mettono in relazione il livello produttivo degli animali e il carry-over dell'AFM1. Fra queste, riportiamo:

$$\text{Carry-over (\%)} = 0.013 \times \text{Latte prodotto (kg/capo/giorno)} - 0.026$$

(Veldman et al., 1992);

$$\text{Carry-over (\%)} = 0.0769 \times \text{Latte prodotto (kg/vacca/d)} - 0.3255$$

(Masoero et al., 2007).

A parità di ingestione di AFB1, gli animali con un livello produttivo più alto, pur avendo un carry-over dell'AFB1 maggiore, mostrano una concentrazione di AFM1 nel latte simile a quella riscontrata in animali a bassa produzione (Masoero et al., 2007) (tab. 2). Dato che il limite proposto dalla Comunità Europea (EC, 2003) riguarda la concentrazione e non l'escrezione totale di AFM1 nel latte, più che il carry-over risulterà importante conoscere la quota giornaliera totale di AFB1 ingerita dagli animali. Infatti, esiste una



	INGESTIONE DI AFB1 ( $\mu\text{g/d}$ )	PRODUZIONE DI LATTE	CONCENTRAZIONE DI AFM1 NEL LATTE ( $\mu\text{g/kg}$ )	ESCREZIONE DI AFM1 NEL LATTE( $\mu\text{g/d}$ )	CARRY- OVER (%)
Inizio lattazione	39	39.5	0.06	2.40	6.2
Fine lattazione	34	16.6	0.04	0.60	1.8
Alta produzione	7	39.4	0.01	0.3	3.6
Bassa produzione	14	17.4	0.02	0.4	2.6
Alta produzione	33	39.3	0.03	1.2	3.8
Bassa produzione	36	16.8	0.05	0.9	2.5
Alta produzione	57	37.0	0.06	2.3	4.0
Bassa produzione	56	14.8	0.10	1.4	2.5

Tab. 2 *Carry-over di aflatossina B1 ( $\mu\text{g/kg}$ ) in vacche a diverso stadio di lattazione e diversa produzione*

relazione lineare fra quantità di AFB1 ingerita con la dieta ( $\mu\text{g/capo/giorno}$ ) e la concentrazione di AFM1 nel latte ( $\text{ng/kg}$ ).

L'equazione più usata per stimare la concentrazione di AFM1 nel latte è quella proposta da Veldman et al. (1992):

$$\text{AFM1 (ng/kg)} = 1,19 \times \text{AFB1 ingerita } (\mu\text{g/capo/giorno}) + 1,9.$$

Sempre Veldman et al. (1992) suggeriva che altri fattori in grado di modificare la permeabilità di membrana della ghiandola mammaria potessero innalzare il tasso di escrezione dell'AFM1 nel latte. Le esperienze fatte da Masoero et al. (2007) sembrano contraddire tale assunto, in quanto animali con diverso numero di cellule somatiche (minori o molto superiori a 350'000 cellule/ml) e quindi con una presumibile diversa permeabilità di membrana hanno avuto una concentrazione di AFM1 nel latte simile, a parità di ingestione di AFB1 con gli alimenti. È quindi fondamentale la corretta valutazione della contaminazione da AFB1 degli alimenti per poter effettuare stime attendibili della concentrazione di AFM1 nel latte. A questo proposito, è di grande interesse l'osservazione derivante da un recente lavoro (Gallo et al., 2010) che evidenzia come la presenza di sostanze in grado di ridurre la contaminazione o l'assorbimento della micotossina, denominati comunemente sequestranti, in mangimi o miscele di alimenti interferisca in maniera determinante sulla determinazione analitica dell'AFB1. Per questo, nella fase analitica di estrazione della micotossina deve essere utilizzata una miscela estraente a base di acetone:acqua in sostituzione della tradizionale miscela di metanolo:acqua. La ricaduta sull'allevatore di questo potenziale errore analitico si traduce in un'errata valutazione del rischio di contaminazione del latte.

### 2.1.2 Carry-over delle aflatossine al latte di altre specie

Anche per il latte prodotto da animali da latte appartenenti a specie diverse da quella bovina si fa riferimento al limite massimo di AFM1 sopra riportato per il latte vaccino (50 ng/kg).

Nel latte caprino si ritrova, analogamente a quello bovino, la presenza di aflatossina AFM1 derivante dall'assunzione di alimenti contaminati da AFB1 con una concentrazione massima già a 3-6 ore dalla somministrazione (Mazette et al., 2009). Il carry-over nelle pecore sembra piuttosto basso ( $0.112 \pm 0.011\%$ ) rispetto alle vacche e capre (Battaccone et al., 2003). Nel latte ovino la presenza di M1 può essere stimata a partire da una equazione simile a quella di Veldman et al. (1992) riportata sopra per le bovine:

$$\text{AFM1}(\text{ng/kg}) = 1.36 \times \text{AFB1 ingerita} (\mu\text{g/capo/giorno}) + 4.3$$

Da questa equazione emerge che per non superare il limite di legge (50 ng/kg), la quantità di AFB1 somministrata giornalmente alle pecore non può superare i 34  $\mu\text{g/d}$ . La concentrazione di AFB1 nel mangime quindi dovrà essere inferiore a 34, 45, 67, 134  $\mu\text{g/kg}$  per quantità somministrate pari rispettivamente a 1 kg/d, 750 g/d, 500 g/d e 250 g/d.

In una prova effettuata somministrando alimenti naturalmente contaminati a bufale in lattazione, si è potuto osservare che nel latte di bufala oltre alla aflatossina M1 sono presenti anche le aflatossine M2, B1 e B2. Le percentuali di escrezione nel latte rispetto alle quantità ingerite sono risultate molto basse per la AFM1 (0.2%), AFB1 (0.05%) e AFB2 (0.2%) mentre notevolmente più elevata è stata quella della AFM2 (2%). L'escrezione di AFB1 nel latte di bufala potrebbe essere legata alla più alta percentuale di grasso (7-8%) rispetto al latte vaccino, essendo la AFB1 meno polare della AFM1 oppure a una più bassa efficienza metabolica (Pietri et al., 2003).

### 2.1.3 Passaggio delle aflatossine dal latte al formaggio

Una trattazione specifica merita anche la presenza di micotossine nei prodotti lattiero-caseari, considerando la notevole importanza che rivestono nel nostro Paese sia dal punto di vista quantitativo (circa il 77% del latte è trasformato) che qualitativo (46 formaggi DOP). Il Regolamento (CE) n. 165/2010 riporta che anche per il latte trattato termicamente e destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte vale il limite riferito al latte crudo (0.050  $\mu\text{g/kg}$ ). Per i

prodotti ottenuti da processi che non comportano separazione di costituenti del latte (trattamenti termici, conservazione a basse temperature, produzione di yogurt) non ci sono variazioni significative dei livelli di AFM1 (se si escludono dei possibili effetti negativi su *Lactobacillus bulgaricus* e su *Streptococcus thermophilus* nello yogurt). Nei formaggi si verifica invece un effetto di concentrazione della AFM1 nel corso della processo di maturazione e stagionatura. In questo caso va ricordato quanto riportato nel Regolamento 1881/2006 (articolo 2) dove si precisa che bisogna tener conto delle modifiche di concentrazione del contaminante e che gli stessi operatori del settore alimentare devono fornire i fattori specifici di concentrazione e diluizione. Sulla base di queste disposizioni la regione Veneto, già a seguito dell'emergenza del 2003, ha suggerito di adottare, per calcolare i limiti di aflatoxina M1 nei formaggi i coefficienti di trasformazione del latte in formaggio (riportati per i formaggi italiani nella G.U. n. 183 dell'8 agosto 2003). A titolo esemplificativo si riporta il calcolo del tenore massimo di AFM1 nell'Asiago Pressato, che presenta un coefficiente pari a 8.95, cioè una resa casearia pari all'11.2%:

AFM1 nel formaggio =  $0.05 \mu\text{g/kg}$  (limite AFM1 nel latte)  $\times 8.95 = 0.447 \mu\text{g/kg}$ .

In Italia inoltre è stata pubblicata in data 24 agosto 2004 la nota D.G.V.A./IX/25664/f.5.b.b.2/P del Ministero della Salute che fissa un limite di  $0.45 \mu\text{g/kg}$ , quale valore provvisorio e riferito solo ai formaggi a pasta dura e lunga stagionatura (es. Parmigiano Reggiano DOP e Grana Padano DOP). Alcuni paesi europei hanno fissato invece dei limiti nei formaggi senza distinzione fra le diverse tipologie (ad esempio la Svizzera:  $0.250 \mu\text{g/kg}$ ). Riguardo alla mozzarella di bufala, infine, va ricordato come la presenza di AFB1 nelle mozzarelle, accanto alla AFM1, AFM2 e AFB2 (Pietri et al., 2003), può indurre qualche preoccupazione nel caso di somministrazione di alimenti contaminati agli animali e per questo dovrebbe essere considerata la possibilità di una legislazione specifica (Fedele et al., 2007).

#### 2.1.4 Carry-over delle aflatossine negli animali da carne e nelle ovaiole

Mentre gli studi effettuati sulla presenza di micotossine nel latte sono numerosi, per quanto riguarda la carne e altri tessuti edibili, le sperimentazioni sono generalmente più limitate sia nei bovini che in altre specie da reddito.

SPECIE ANIMALE	TESSUTO	AFLATOSSINA	TASSO DI TRASFERIMENTO %	RAPPORTO AF ALIMENTO/AF TESSUTO
Vacche da latte	Latte	M1	1.3 – 2.5	75-40
Suini	Fegato	B1	0.125	800
Pollo da carne	Fegato	B1	0.083	1200
Ovaiole	Uova	B1	0.05	2000
Bovini da carne	Fegato	B1	0.007	14000

Tab. 3 *Relazione tra livello di AFB1 nella dieta e quantità di aflatossine nei tessuti edibili*

Molto scarse sono le evidenze scientifiche che riportano, ad esempio, risultati di contaminazione riferiti al suino pesante, una tipica produzione italiana, oppure ai sistemi di allevamento intensivo del vitellone caratteristici dell'Italia settentrionale, nei quali le razioni si basano su un largo impiego di insilato di mais e, anche se in misura minore, di pastoni. In alcuni casi inoltre le prove sono state effettuate negli anni '70/'80, quando le strumentazioni scientifiche per la rilevazione della contaminazione da AF presentavano un livello di sensibilità non molto elevato. Tuttavia alcune esperienze possono darci interessanti indicazioni sul carry-over delle AF dall'alimento alla carne bovina, suina e alle uova, come evidenziato nel lavoro di Brera e Guarino, riportato in questo volume, a cui si rimanda.

Per fornire una valutazione comparativa fra varie specie e categorie animali, si riportano in tabella 3, alcuni dati riassuntivi di prove riportate nella letteratura scientifica sul trasferimento della AFB1 dall'alimento (feed) ai diversi tessuti in animali di diversa specie e categoria. Il carry-over riportato per le aflatossine nel fegato (sito preferenziale di accumulo rispetto ad altre parti edibili) di bovini da carne è pari a 0.007% e risulta molto inferiore rispetto a quello relativo al fegato di altre specie come il pollo (0.083%) e il suino (0.125%). Riguardo al trasferimento di AFB1 dall'alimento all'uovo, i risultati di prove condotte da vari autori sono piuttosto variabili ma il carry-over non supera lo 0.05% e in alcuni casi è pari a 0.

### 3. METODI DI DECONTAMINAZIONE E DI DETOSSIFICAZIONE DA AFLATOSSINE

Va ricordato che sia i metodi di decontaminazione, che si basano sull'allontanamento delle particelle contaminate da aflatossine, che quelli di detossificazione, che invece prevedono la distruzione o inattivazione delle micotossine, devono soddisfare alcuni importanti requisiti (schema 2), come riportato nelle linee guida CAST (2003). Si può intervenire con trattamenti fisici, chimici e biologici.

Essere efficaci nel rimuovere/distruggere/inattivare le aflatossine
Distruggere le spore fungine per impedire una ri-contaminazione successiva
Non apportare, generare e lasciare residui, metaboliti o sottoprodotti tossici o cancerogeni/mutageni
Mantenere il valore nutritivo e l'appetibilità del prodotto
Non alterare significativamente le caratteristiche tecnologiche
Essere convenienti dal punto di vista economico e tecnologico e non influenzare il costo
Essere semplici e non richiedere tempi lunghi di applicazione
Essere a basso impatto ambientale

Schema 2 *Caratteristiche dei metodi di decontaminazione e detossificazione degli alimenti (CAST 2003)*

### 3.1. *Trattamenti fisici*

#### 3.1.1 Separazione meccanica e segregazione per densità

La separazione fisica di frazioni molto contaminate (polveri, cariossidi spezzate, ecc.) da una partita, riduce il livello di AF. Il processo non porta a una decontaminazione completa, ma può fornire risultati assai significativi (Phillips et al., 1994).

La segregazione per densità di granaglie contaminate comporta la separazione per flottazione delle cariossidi contaminate da quelle sane. Questa procedura è compatibile con le tecniche di macinazione a umido del mais e con i trattamenti alcalini (es. nixtamalizzazione per la produzione di masa). Va tuttavia rilevato che l'aspetto e il peso delle cariossidi non sempre indica la presenza o assenza di AF (Piva et al., 1995).

#### 3.1.2 Inattivazione termica

Le AF sono resistenti al calore, pertanto esse non sono completamente distrutte da trattamenti termici come bollitura in acqua, autoclavaggio ed estrusione. Una parziale distruzione di AF può essere ottenuta (es. nel mais) mediante tostatura. Tuttavia, la riduzione del livello di AF non è completa e uniforme ed è influenzata da temperatura, tempo di trattamento e livello di umidità. Recentemente è stata rilevata una riduzione del 20% della concentrazione di AF in mangimi trattati a 100°C per 30 minuti (Oluwafemi, 2004).

#### 3.1.3 Irradiazione

L'esposizione di olio di arachide contaminato a luce UV ha ridotto il livello di AF, ma sembra che i prodotti di degradazione siano mutageni. Il tratta-

mento con luce UV per 20 minuti di latte contaminato ha ridotto la concentrazione di AFB1 dell'89,1% e del 60,7% in presenza o in assenza dello 0,05% di perossido, rispettivamente. Anche in questo caso è stata manifestata la preoccupazione che il trattamento causi una perossidazione e la formazione di composti più tossici (Yousef e Marth, 1989).

Anche la luce solare, con un'esposizione di 14 ore, ha distrutto tra il 77 e il 90% della AFB1 aggiunta a fiocchi di arachidi, ma la riduzione è stata solo del 50% nel prodotto naturalmente contaminato.

I raggi gamma non sono stati in grado di degradare l'AF in farina di arachide contaminata.

L'irraggiamento con microonde è stato sperimentato per detossificare le AF; il trattamento sembra abbastanza efficace sia in sistemi modello che in alimenti reali. La percentuale di distruzione è risultata positivamente correlata con la potenza applicata e il tempo di esposizione (Farag et al., 1996).

### 3.2 *Trattamenti chimici*

Molti agenti chimici sono stati valutati per la loro capacità di detossificazione dell'AFB1. Fra questi, vi sono:

- a) agenti cloranti: sodio ipoclorito, biossido di cloro, cloro gassoso;
- b) agenti ossidanti: perossido di idrogeno, ozono, sodio bisolfito;
- c) agenti idrolitici: acidi e alcali;
- d) solventi;

tutti questi hanno evidenziato una maggiore o minore efficacia. Molti agenti chimici intervengono direttamente sulla molecola (fig. 3) modificandone la struttura chimica (Piva et al., 1995; CAST, 2003).

#### 3.2.1 Cloro

Il cloro in soluzione acquosa è utilizzato nell'industria alimentare per sanitzare gli impianti e per lavare diversi tipi di prodotti, quali frutti, frutta secca, pesce e carne. Il cloro gassoso è utilizzato come agente sbiancante e ossidante nell'industria delle farine, senza particolari rischi.

L'ipoclorito di sodio si è dimostrato efficace nel degradare le AF negli alimenti (Phillips et al., 1994). La clorazione con sodio ipoclorito a concentrazione dello 0,2, dell'1, del 5 o dell'11%, con acido perclorico al 3%, con cloro gassoso al 10% o a concentrazione di 15 mg per 100 mg di AFB1 pura, ha

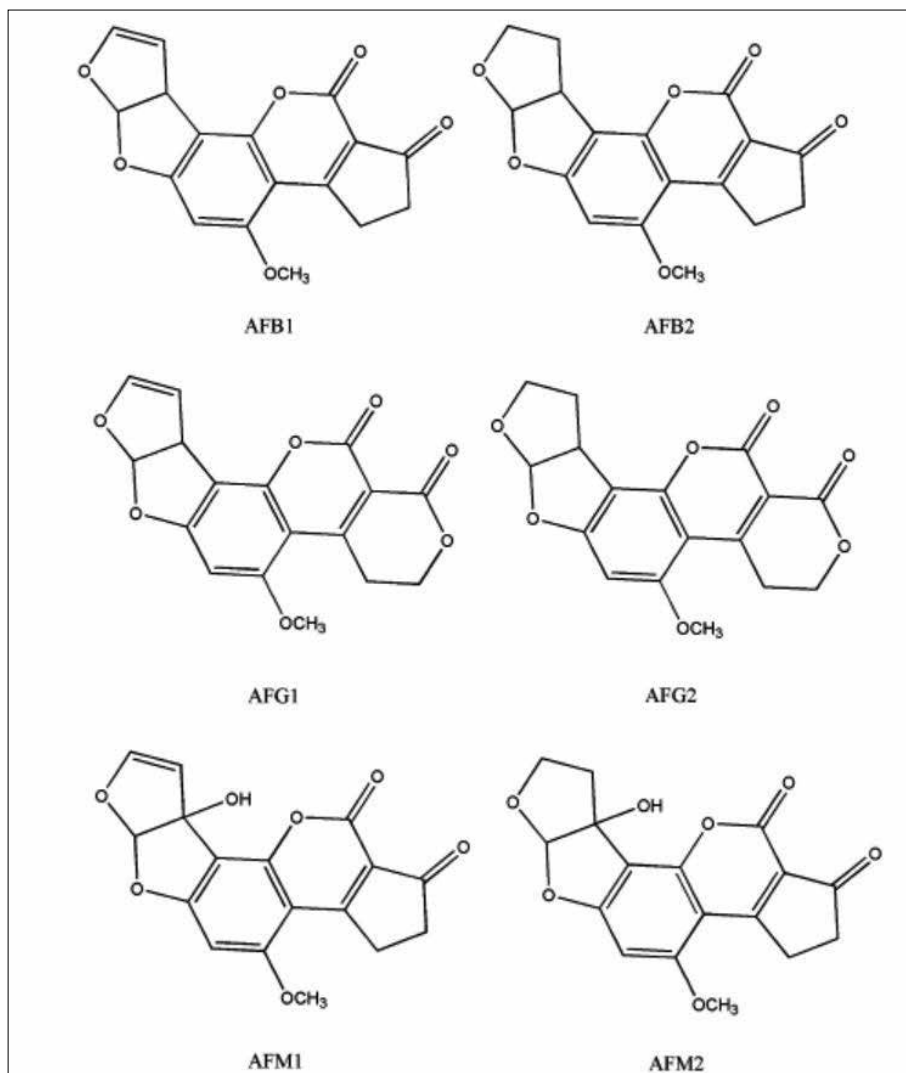


Fig. 3 *Struttura chimica delle aflatossine*

evidenziato la capacità di degradare quasi completamente l'AFB1 in purezza o in alimenti cui era stata aggiunta; l'eccezione a questi risultati è stata la farina di estrazione di arachide, per la quale è stata ottenuta una inattivazione solamente del 50%.

L'anione ipoclorito è un forte agente clorante o ossidante, a seconda delle condizioni di trattamento. In condizioni acide, la clorazione prevale sull'ossi-

dazione, ma alla fine si forma 8,9-diidrossi-AFB1. La non tossicità osservata su embrioni di pollo e su animali da esperimento e la non mutagenicità, rilevata dopo clorazione di alimenti tossici, confermano l'efficacia di questo tipo di trattamento.

Tuttavia, qualche preoccupazione riguardo alla sicurezza degli alimenti trattati persiste: la presenza di residui di cloro, la produzione di grassi e proteine modificati di tossicità non nota e la riduzione del contenuto in triptofano per effetto del trattamento, devono essere attentamente valutati. Le preoccupazioni sono minori se i prodotti trattati sono destinati a uso zootecnico. La capacità di penetrazione del cloro gassoso internamente alla massa del prodotto per degradare l'AFB1, deve essere pure attentamente considerata.

### 3.2.2 Perossido di idrogeno

Per l'efficienza e il basso costo è tra le sostanze più considerate per degradare le AF. I residui di perossido di idrogeno (acqua ossigenata se in soluzione) negli alimenti trattati degradano rapidamente lasciando residui non tossici (CAST, 2003).

Sono stati individuati diversi trattamenti con perossido di idrogeno in grado di degradare quasi totalmente l'AFB1, quali allo 0,5% a pH 4 su isolati proteici di arachide, al 3% su mais e al 6% a pH 9,5 per 30 minuti su farina di arachide. Questi trattamenti provocano solamente lievi effetti sulla qualità degli alimenti. L'AFB1 viene degradata ad acido succinico, passando attraverso il diidrossiderivato, quando viene trattata con una miscela di perossido di idrogeno e sodio idrossido.

### 3.2.3 Ozono

È un potente agente ossidante, utilizzato per la sanitizzazione delle acque e dei magazzini di stoccaggio dei prodotti alimentari (Phillips et al., 1994). Per quanto riguarda le AF, reagisce con il doppio legame in posizione 8,9 sull'anello furanico. In alcuni minuti a temperatura ambiente l'ozono degrada l'AFB1 e l'AFG1 sciolte in 4% dimetilsolfossido. Sperimentazioni condotte hanno confermato la non mutagenicità e non tossicità dei prodotti trattati (CAST, 2003). L'ozono ha ridotto del 91% il livello di AFB1 nella farina di cotone al 22% di umidità dopo trattamento a 100 gradi per 2 ore. Tuttavia, la riduzione ottenuta su farina di arachide al 30% di umidità è stata solamente



del 78%, dopo esposizione a ozono per 1 ora. La necessità di un trattamento lungo e la diminuzione del “protein efficiency ratio” e della lisina disponibile causata dal trattamento, lo rendono un metodo non del tutto soddisfacente.

#### 3.2.4 Bisolfito di sodio

Il bisolfito di sodio, un additivo utilizzato nell'industria, viene facilmente accettato come agente detossificante (Phillips et al., 1994; CAST, 2003). A basse concentrazioni (0,5 e 1%) è più efficace dell'ammoniaca o del sodio idrossido, nell'inattivare l'AFB1 nel mais. Il bisolfito può reagire sui due siti attivi dell'AFB1, o causando la rottura dell'anello del lattone o addizionandosi all'anello furanico terminale, o entrambi. Nonostante il mais trattato con bisolfito di sodio non evidenzia consistenti variazioni di colore o di altre caratteristiche tecnologiche, la scarsa efficienza nel degradare l'AFB2 e l'AFG2 e la scarsità di informazioni sulla possibile rigenerazione dell'AFB1 o di un derivato tossico (soprattutto l'eossido) durante la metabolizzazione dell'AFB1 negli alimenti trattati, limitano i progressi a livello industriale di questo trattamento.

#### 3.2.5 Ammoniaca

Il trattamento con ammoniaca degli alimenti a uso zootecnico è stato molto utilizzato in un ampio spettro di condizioni sia di laboratorio che di campo (Phillips et al., 1994; Piva et al., 1995). L'ammoniaca si è dimostrata ugualmente efficace nel decontaminare gli alimenti sia in fase acquosa che gassosa; il trattamento provoca una degradazione delle AF superiore al 95%. Numerose prove sottolineano la necessità di usare fino al 5% di ammoniaca, 10-20% di umidità e una combinazione di tempo-temperatura adeguati per una effettiva degradazione dell'AF. A temperature di 80-120°C o a elevate pressioni, il tempo di esposizione richiesto è di 15-30 minuti. Una degradazione delle AF quasi completa è stata ottenuta anche a temperatura ambiente, con durata del trattamento di 2-3 settimane.

Il trattamento con ammoniaca durante la pellettatura si è dimostrato meno efficace.

La degradazione dell'AFB1 con ammoniaca procede attraverso l'idrolisi dell'anello del lattone ed è seguita dalla decarbossilazione, così da produrre due principali composti non tossici, l'AFD1 e un derivato benzofuranico.

La degradazione chimica dell'AFB1 durante i trattamenti con ammoniacca, è stata valutata dal punto di vista tossicologico in prove di alimentazione su animali da esperimento e di interesse zootecnico: anatroccoli, giovani tacchini, ratti, topi, suini e trote alimentati con le farine decontaminate non hanno evidenziato alcun effetto negativo. Le vacche alimentate con farine decontaminate hanno prodotto latte con livelli proporzionalmente più bassi di AFM1; i vitelloni hanno addirittura evidenziato maggiori incrementi ponderali, probabilmente per il maggior apporto di azoto. Va tuttavia rilevato che, in seguito al trattamento con ammoniacca, pur avendosi una maggior digeribilità degli aminoacidi, si osserva una riduzione del 10% della qualità delle proteine delle farine trattate, con significative perdite di lisina e metionina e una riduzione irreversibile del grado di insaturazione dei lipidi. Il mais trattato ha una colorazione più scura dovuta alla caramellizzazione degli zuccheri.

Il trattamento con ammoniacca degli alimenti per animali è autorizzato dalla Food and Drug Administration. Va tenuto però presente che l'ammoniacca è corrosiva per le superfici metalliche; devono anche essere adottate specifiche norme di sicurezza per il suo impiego.

### 3.2.6 Alkali

Il trattamento alcalino idrolizza l'anello del lattone dell'AFB1. La degradazione dell'AF negli alimenti contaminati mediante trattamento con alcali, è stata ottenuta in farine di arachide, di cotone, mais.

Il meccanismo di degradazione dell'AF è analogo a quello dell'ammoniacca.

La cottura della farina di arachide (al 30% di umidità) con una soluzione di NaOH a 100°C per 90 minuti, ha ridotto la concentrazione di AF da 111 a 17 µg/kg. L'efficienza relativa di differenti agenti alcalini nel degradare l'AFB1 in soluzione a 110°C sembra essere la seguente: potassio idrossido > sodio idrossido > potassio carbonato > sodio carbonato > potassio bicarbonato > ammonio idrossido > sodio bicarbonato > ammonio carbonato.

Una maggiore azione di degradazione è stata osservata con trattamenti con miscele di calcio idrossido e formaldeide o monometilamina, con decontaminazioni del 94-97%.

Limitate sono le informazioni disponibili concernenti gli effetti dei trattamenti alcalini sul valore nutritivo e sulla tossicità residua delle farine.

### 3.2.7 Acidi

I trattamenti con acidi provocano l'idratazione dell'AFB1 nella posizione corrispondente al doppio legame 8,9- dell'anello furanico terminale, così da formare AFB2a, che ha una tossicità 200 volte inferiore all'AFB1.

Poiché il trattamento con acidi forti può influenzare la qualità del prodotto e la tossicità residua non è del tutto trascurabile, questo processo non è molto consigliabile.

### 3.2.8 Estrazione con solventi

Le AF possono essere efficacemente estratte da granaglie contaminate con specifiche miscele di solventi. Questa tecnica influenza in modo assai limitato il valore nutritivo del prodotto. I solventi testati sono stati etanolo, acetone acquoso, isopropanolo, esano in miscela con etanolo o metanolo o acetone e acqua, o etanolo e acqua; molti di questi trattamenti si sono dimostrati efficaci, ma i costi appaiono troppo elevati per applicazioni su scala industriale (Piva et al., 1995).

### 3.2.9 Altri agenti chimici

Una varietà di altri agenti chimici sono stati presi in considerazione per valutare la loro capacità di degradare le AF. Di questi, soluzioni contenenti il 5% di dimetilamina cloridrato, aldeidi, perossido di benzoile, tetrossido di osmio, iodio, solfato ferroso ammonico, permanganato di potassio, chinoni, borato di sodio o formaldeide, hanno dimostrato una più o meno accentuata capacità di degradare le AF. Tuttavia, la loro applicabilità agli alimenti viene limitata da problemi di sicurezza che possono sorgere da residui di sostanze chimiche.

## 3.3 *Metodi biologici*

Alcuni microorganismi (lieviti, funghi e batteri) sono stati valutati per la loro eventuale capacità di degradare le AF in post-raccolta (CAST, 2003). Il *Flavobacterium aurantiacum* è risultato in grado di rimuovere l'AF da un mezzo liquido senza produrre residui tossici. È stato osservato che certi funghi pro-

duttori di sostanze acide possono catalizzare la trasformazione dell'AFB1 in AFB2a, con forte riduzione della tossicità.

#### 4. USO DI AGENTI IN GRADO DI RIDURRE LA CONTAMINAZIONE O L'ASSORBIMENTO DELLE AFLATOSSINE

La pratica più diffusa in allevamento per contenere gli effetti negativi dovuti all'ingestione di micotossine e ridurre l'escrezione dei metaboliti nel latte (AFM1) è quella di aggiungere alle diete o nei mangimi gli agenti sequestranti, detti anche adsorbenti (Phillips et al., 1990; Diaz e Smith, 2005). Queste sostanze attuano una "riduzione della contaminazione delle micotossine negli alimenti" e sono in grado di "eliminare o ridurre l'assorbimento, favorire l'escrezione e modificare i meccanismi di azione delle micotossine", come sancito nel regolamento CE 386/2009 che ha definito questa nuova classe di additivi alimentari.

Gli agenti sequestranti appartengono a diverse categorie quali allumino-silicati, carboni attivati, pareti di lievito, fibre micronizzate, batteri e altri polimeri (CAST, 2003; EFSA, 2009), anche se quelli più diffusi nella realtà aziendale italiana sono le argille e le pareti di lievito. Affinché un agente sequestrante possa essere definito "efficace", è necessario che esso abbia un'alta affinità per la molecola, che il legame fra agente sequestrante e micotossina sia stabile e che esso avvenga il prima possibile nel tratto gastro-intestinale degli animali, dato il rapido assorbimento della molecola.

Per valutare l'efficacia di un agente sequestrante si possono utilizzare metodiche rapide (metodiche *in vitro*) o prove su animali. Le prime sono facilmente riproducibili in laboratorio, poco costose, rapide e non necessitano dell'impiego di animali. A ogni modo, si tratta prevalentemente di metodiche utili allo screening comparativo tra agenti sequestranti (Galvano et al., 1996; Moschini et al., 2008). A tal proposito, Gallo et al. (2010) hanno messo a punto due metodiche *in vitro* in grado di simulare le condizioni dei diversi compartimenti del tratto gastro-intestinale sia dei monogastrici che dei ruminanti, testando l'efficacia di sequestro di 8 diverse tipologie di agenti sequestranti (sodio, calcio e magnesio bentoniti, montorillonite, caolinite, clinoptinolite, carbone attivato e pareti di lievito). Per convenzione, un buon agente sequestrante deve essere in grado di sequestrare più dell'80% dell'aflatossina con cui viene a contatto, al di sotto di tale valore l'agente sequestrante non è ritenuto un buon adsorbente. Oltre la capacità di sequestro, anche la forza e la continuità di tale sequestro dovrebbe essere valutata in fase di screening: se

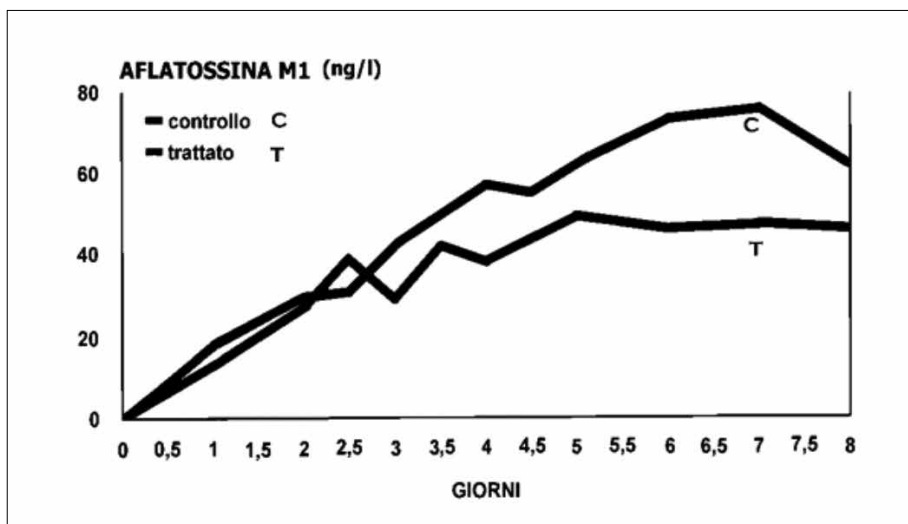


Fig. 4 Effetto dell'aggiunta di alluminio-silicato alla dieta sul tenore di aflatoxina M1 nel latte

l'adsorbente rilascia più del 20% della micotossina precedentemente legata quando messo a contatto con una miscela estraente, dovrebbe essere ritenuto non idoneo e scartato (Diaz, 2004; Moschini et al., 2009). Le prove *in vivo*, che prevedono l'impiego di vacche in lattazione, sono più onerose e occorrono periodi più lunghi per poter avere una risposta sulla efficacia di sequestro. Rappresentano, però, l'unico modo per avere informazioni sicure sulla reale efficienza degli adsorbenti che si avvicinano alla realtà di stalla (Masoero et al., 2009; Pietri et al., 2011).

L'uso di queste sostanze rappresenta un modo poco costoso e generalmente efficace per ridurre la concentrazione di AFM1 nel latte e quindi nella realtà di stalla dovrebbero essere considerati come un aiuto e non come la soluzione (fig. 4). Un altro risvolto pratico relativo all'impiego degli adsorbenti nelle diete per vacche da latte è stato studiato in una specifica sperimentazione (Masoero et al., 2009) che evidenzia come il contatto fra tossina e adsorbente, in ambiente umidificato, migliora le performance di sequestro. Per questo, l'agente sequestrante dovrebbe essere aggiunto direttamente all'alimento più contaminato della dieta e non diluito nel carro miscelatore durante la preparazione della miscelata (*unifed*). Se tale contatto avviene in presenza di acqua, come ad esempio in fase di pellettatura, il contatto e la captazione della tossina migliora. Infine, dato il particolare meccanismo di azione di questi adsorbenti, che si basa principalmente su un sequestro fisico/chimico

delle micotossine, si può immaginare che alcuni nutrienti (alcune vitamine, minerali) possano essere sequestrati da questi prodotti somministrati con l'alimentazione. Alcune segnalazioni da parte di latterie fanno riferimento a effetti negativi sul processo di acidificazione spontaneo del latte. Su questo aspetto non vi sono dati certi *in vivo*, anche se prove condotte da ricercatori del CRA di Lodi sembrano supportare l'idea che ci sia solo una minima interferenza fra uso di adsorbenti, caratteristiche del latte e metabolismo minerale nell'animale (Migliorati et al., 2007; Abeni, 2013). In ogni caso, questi effetti sembrano essere molto contenuti, suggerendo che gli adsorbenti possano essere somministrati agli animali senza problemi, purché tale somministrazione avvenga a dosaggi adeguati e per periodi di tempo non eccessivamente lunghi.

Nuove ricerche hanno dimostrato come sia possibile vaccinare gli animali nei confronti delle aflatossine. In uno studio recente (Polonelli et al., 2011), è stato possibile verificare come vacche in lattazione immunizzate contro l'aflatossina riducevano l'escrezione di AFM1 nel latte del 47%. Inoltre, in una recente sperimentazione degli stessi gruppi di ricerca, il vaccino migliorato ha mantenuto il suo effetto anche dopo il parto in manze gravide vaccinate con performance migliori rispetto alla prova su vacche in lattazione, confermando ancora una volta come questo approccio potrebbe rappresentare un via alternativa o, meglio, integrativa all'uso degli agenti sequestranti nella realtà aziendale.

## CONCLUSIONI

In conclusione si può affermare che le attuali conoscenze circa gli effetti dei vari livelli di aflatossina sullo stato di salute degli animali e sull'accumulo della molecola primaria e di vari metaboliti più o meno tossici sono limitate e dovrebbero essere ulteriormente approfondite per quanto riguarda soprattutto l'uso di alimenti naturalmente contaminati. Dovrebbero inoltre essere effettuate sperimentazioni sui metodi di detossificazione e/o decontaminazione del mais e delle altre materie prime a uso zootecnico, in grado di ridurre la presenza di aflatossine entro i limiti stabiliti dalla legislazione, come suggerito recentemente dal Comitato nutrizione animale della FEFAC (2013). La contaminazione naturale di aflatossina B1 nel mais, verificatasi quest'anno, potrebbe essere efficacemente sfruttata per impostare nel breve periodo prove in condizioni reali in modo da fornire a tutti gli operatori della filiera (agricoltori, stoccatrici, mangimisti, allevatori) indicazioni utili per provvedere al trattamento delle partite di mais "non conforme".

## RIASSUNTO

Il mais rappresenta una delle materie prime più a rischio nell'alimentazione animale perché può subire, in particolari situazioni ambientali, livelli di contaminazione da aflatossine anche elevati e pericolosi per la salute degli animali e la sicurezza alimentare. Le aflatossine possono trasferirsi ai prodotti di origine animale attraverso meccanismi diversi da specie a specie, non sempre prevedibili e influenzati da molti fattori. Materie prime e razioni devono quindi essere costantemente controllate, in particolare quando le diete contengono, oltre alla granella di mais, altri alimenti a base di mais (insilati, pastoni, glutine, ecc.) e altri prodotti a rischio (es. arachidi, cotone e derivati). I metodi di decontaminazione e di detossificazione possono contribuire a ridurre il livello di aflatossine nel mais, con efficacia diversa a seconda del trattamento utilizzato. Alcuni trattamenti sembrano fornire risultati incoraggianti ma vanno valutati su larga scala. Sostanze per ridurre la contaminazione o l'assorbimento dell'aflatossina possono risultare un valido supporto ma generalmente si caratterizzano per una ampia variabilità di risposta.

## ABSTRACT

Aflatoxin are known to contaminate corn, cottonseed meal and other feeds. When these contaminated feeds are consumed by animals at high levels, adverse effects on health and performance of animals are observed. In addition humans could be exposed indirectly to aflatoxins by consumption of products of animal origin. The carry-over of aflatoxins from feed to food depends on many factors and not always is predictable. Therefore, feeds and rations must be regularly monitored, in particular when diets contain, in addition to the corn grain, other corn-based feeds (corn silage, corn ears silage, corn gluten meal) and/or other feed at risk of contamination (peanut, cotton). The methods of decontamination and detoxification can help to reduce the level of aflatoxins in corn, with different efficiency depending on the treatment used. Some treatments seem to provide encouraging results but should be evaluated on a large scale. Substances to reduce contamination or absorption of aflatoxin can be a valid support but generally are characterized by a wide variability of response.

## BIBLIOGRAFIA

- ABENI F. (2013): Comunicazione personale.
- ASSALZOO (2012): Annuario 2012. Sito internet visitato il 14 marzo 2013: <http://www.assalzoo.it/default.asp?Sez=DOCU&SSez=ANNU>.
- AUERBACH H., MAAS R.F.M., OP DEN CAMP H.J.M., POL A., FINK-GREMMELS J. (1998): *Biodegradation of Aflatoxin B1 by bovine rumen micro-organism in vitro and its effects on rumen fermentation*, «Revue Med. Veter», 146, pp. 573.
- BAILONI L. (2006): *Micotossine nel mais utilizzato nell'alimentazione zootecnica: trasferimento ai prodotti di origine animale*, in *Mais e sicurezza alimentare*, a cura di Veneto Agricoltura, Legnaro (PD), pp. 73-84.

- BATTACONE G., NUDDA A., CANNAS A., CAPPIO BORLINO A., BOMBOI G., PULINA G. (2003): *Excretion of aflatoxin M1 in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B1*, «J. Dairy Sci.», 86, pp. 2667-2675.
- BORREANI G., TABACCO E., CAVALLARIN L. (2003): *Contaminazione da micotossine negli insilati di mais*, «L'Informatore Agrario», 31, pp. 49-55.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology) (2003): *Mycotoxins: Risk in plant, animal and human system*, «Ames», Iowa, USA.
- CINTI F., TORRICELLA C., GRANDI S., VECCHIETTINI M., CANEVER A., BORSARI A. (2006): *Un triennio di indagini sulla presenza di aflatossine nei mangimi*, in *Atti del 2° Congresso nazionale "Le micotossine nella filiera agro-alimentare"*, a cura di M. Miraglia, C. Brera, Istituto Superiore di Sanità, Roma, 16-18 ottobre 2006 (Rapporti ISTISAN 07/37). pp. 152-156.
- COULOMBE R.A. JR. (1993): *Biological action of mycotoxins*, «J. Dairy Sci.», 76 pp. 880-891.
- COULOMBE R.A. JR., SHARMA R.P. (1985): *Clearance and excretion of intratracheally and orally administered aflatoxin B1 in rat*, «Food Chem. Toxicol.», 23, pp. 827-830.
- DE LIGUORO M. (2006): *Micotossine: aspetti tossicologici per gli animali e per l'uomo*, in *Mais e sicurezza alimentare*, a cura di Veneto Agricoltura, Legnaro (PD), pp. 85-95.
- DE PAOLI S. (2013): Comunicazione personale.
- DIAZ D.E., SMITH T.K. (2005): *Mycotoxin sequestering agents: practical tools for neutralisation of mycotoxins*, in *The Mycotoxin Blue Book*. D. E. Diaz, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK., pp. 323-339.
- EATON D. L., RAMSDELL H. S., NEAL G.E. (1994): *Biotransformation of aflatoxins*, in *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. D. L. Eaton and J. D. Groopman (eds.). Academic Press Inc., San Diego, California, USA, pp. 45-72.
- EFSA (2009): *Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety*, Reference number of the call for proposal: CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01.
- FEFAC (2013): *Parere sull'aflatossina B1 nel mais nel sud-est Europa*, «Fefax», 9.
- FARAG R.S., RASHED M.M., ABO-HAGGER A.A. (1996): *Aflatoxin destruction by microwave heating*, «Intl. J. Food Sci. Nutri.», 47, pp. 197-208.
- FEDELE V., CIFUNI F.G., SEPE L., DI NAPOLI M.A. (2007): *Effect of two aflatoxin level treatments on contamination of Mozzarella di Bufale cheese*, «Ital. J. Anim. Sci.», 6 (suppl. 2), pp. 1120-1122.
- FINK-GREMMEIS J. (2008): *Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review*, «Food Additives & Contaminants: Part A», 25, pp. 172-180.
- GALLO A., MASOERO F. (2010): *In vitro models to evaluate the capacity of different sequestering agents to adsorb aflatoxins*, «Italian Journal of Animal Science», 9, pp. 109-116.
- GALLO A., MASOERO F., BERTUZZI T., PIVA G., PIETRI A. (2010): *Effect of the inclusion of adsorbents on aflatoxin B1 quantification in animal feedstuffs*, «Food Additives & Contaminants: Part A», 27, pp. 54-63.
- GALLO A., MOSCHINI M., MASOERO F. (2008): *Absorption of the aflatoxins in the gastrointestinal tract of the lactating dairy cows and toxins passage through vaginal mucosa*, «Italian Journal of Animal Science», 7, pp. 53-63.
- GALVANO F., PIETRI A., BERTUZZI T., FUSCONI G., GALVANO M., PIVA A., PIVA G. (1996): *Reduction of carryover of aflatoxin from cow feed to milk by addition of activated carbons*, «J. Food Protection», 59, pp. 551-554.



- HOLESKI C.J., EATON D.L., MONROE D.H., BELLAMY G.M. (1987): *Effects of phenobarbital on the biliary excretion of aflatoxin P1-glucuronide and aflatoxin B1-S-glutathione in the rat*, «Xenobiotica», 17, pp. 39-153.
- LAFONT P., SARFATI J., JACQUET J., GAILLARDIN M., LAFONT J. (1983): *Influenza de facteurs pathologiques et nutritionnels sur l'élimination de l'aflatoxine par la memelle chez la vache*, «Microbiologie Aliments Nutrition», 1, pp. 293-300.
- MASOERO F., GALLO A., MOSCHINI M., PIVA G., DIAZ D. (2007): *Carry-over of Aflatoxin from Feed to Milk in Dairy Cows with Low or High Somatic Cell Counts*, «Animal», 1, pp. 1344-1350.
- MAZZETTE A., DECANDIA M., ACCIARO M., FENU A., DIAS FRANCESCO A.H., BATTACONE G. (2009): *Excretion of aflatoxin M1 in milk of goats fed diet contaminated by aflatoxin B1*, «Ital. J. Anim. Sci.», 8 (suppl. 2), pp. 631-633.
- MIGLIORATI L., ABENI F., CATTANEO T.M.P., TORNIELLI C., PIRLO G. (2007): *Effects of adsorbents in dairy cow diet on milk quality and cheese-making*, «Ital. J. Anim. Sci.», 6 (suppl. 1), pp. 460-462.
- MOSCHINI M., GALLO A., PIVA G., MASOERO F. (2008): *The effects of rumen fluid on the in vitro aflatoxin binding capacity of different sequestering agents and in vivo release of the sequestered toxin*, «Animal Feed Science and Technology», 147, pp. 292-309.
- MOSCHINI M., MASOERO F., GALLO A., DIAZ D. (2007): *Mucosal absorption of aflatoxin B1 in lactating dairy cows*, «Italian Journal of Animal Science», 6 (suppl. 1), pp. 324-326.
- MUNKSGAARD L., LARSEN J., WERNER H., ANDERSEN P.E., VIU, B.T. (1987): *Carry over of aflatoxin from cows' feed to milk and milk products*, «Milchwissenschaft», 42, pp. 165-167.
- OLUWAFEMI F. (2004): *Fate of aflatoxin in cereals and cereal products during processing*, «J. Food Agr. Environ.», 2, pp. 33-60.
- PETTERSSON H., BERTILSSON J., WENNBERG O. (1989): *Carry-over of aflatoxin from dairy cattle feed to milk. Healthy animals, safe foods, healthy man*, "World Association of Veterinary Food Hygienists Xth Jubilee International Symposium", pp. 97-102.
- PHILLIPS T.D., CLEMENT B.A., PARK D.L. (1994): *Approaches to reduction of aflatoxins in foods and feeds*, in *The toxicology of aflatoxin: human health, veterinary and agricultural significance*, L.D. Eaton and J.D. Groopman (Eds.), Academic Press inc., San Diego, USA, pp. 383-406.
- PIETRI A., BERTUZZI T., FORTUNATI P., GUALLA A. (2003): *Excretion pattern of aflatoxins in buffalo milk and carry-over in mozzarella cheese*, «Ital. J. Anim. Sci.», 2 (suppl. 1), pp. 302-304.
- PIETRI A., BERTUZZI T., PIVA G., BINDER E.M., SCHATZMAYR D., RODRIGUES I. (2011): *Aflatoxin transfer from naturally contaminated feed to milk of dairy cows and the efficacy of a mycotoxin deactivating product*, «International Journal of Dairy Science», 4, pp. 34-42.
- PIVA G., BATTILANI P., PIETRI A. (2006): *Emerging issues in southern Europe: Aflatoxins in Italy*, in *The mycotoxin factbook – food and feed topics*, Barug D., Bhatnagar D., Van Egmond H.P., Van Der Kamp J.W., Van Osenbroggen W.A., Visconti A., Editors. Wageningen Academic Publishers, the Netherlands, pp. 139-153.
- PIVA G., GALVANO F., PIETRI A., PIVA A. (1995): *Detoxification methods of aflatoxins. A review*, «Nutrition Research», 15, pp. 767-776.
- PIVA G., PIETRI A., GALLO A. (2009): *Micotossine: fattore limitante nelle produzioni animali*, in *Micotossine nei cereali. Risultati del Progetto Interregionale "MICOCER"*, a cura

- di A.A.V.V., Accademia dei Georgofili, Atti della giornata di studio, Firenze 11 dicembre 2008, pp. 133-161.
- POLAN C.E., HAYES J.R., CAMPBELL T.C. (1974): *Consumption and fate of aflatoxin B<sub>1</sub> by lactating cows*, «J. Agric. Food Chem.», 22 pp. 635-638.
- POLONELLI L., GIOVATI L., MAGLIANI W., CONTI S., SFORZA S., CALABRETTA A., CASOLI C., RONZI P., GRILLI E., GALLO A., MASOERO F.; PIVA G. (2011): *Vaccination of lactating dairy cows for the prevention of aflatoxin B<sub>1</sub> carry over in the milk*, PLoS ONE 6: e26777. DOI:10.1371/journal.pone.0026777.
- SCUDAMORE K.A., LIVESY C.T. (1998): *Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review.*, «J. Sci. Food Agric.», 77, pp. 1-17.
- STEINER J., BLUTHGEN A., HEESCHEN W.S.H. (1990): *Untersuchungen zur beeinflussung der ausscheidung von aflatoxin M<sub>1</sub> durch polychlorierte biphenyle beim laktierenden rind*, «Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte» (Abstract), 42, pp. 543-552.
- TRUCKSESS M.W., RICHARD J.L., STOLOFF L., MCDONALD J.S., BRUMLEY W.C. (1983): *Absorption and distribution patterns of aflatoxicol and aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> in blood and milk of cows given aflatoxin B<sub>1</sub>*, «American Journal of Veterinary Research», 44, pp. 1753-1756.
- VAN EIJKEREN J.C.H., BAKKER M.I., ZEILMAKER D.M.J. (2006): *A simple steady-state model for carry-over of aflatoxins from feed to cow's milk*, «Food Addit. Contam.», 23, pp. 833-838.
- VELDMAN A., MEIJS J.A.C., BORGGREVE G.J., HEERES VAN DER TOL J.J. (1992): *Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk*, «Animal Production», 55, pp. 163-168.
- WESTLAKE K., MACKIE W.M., DUTTON M. (1989): *In vitro metabolism of mycotoxins by bacterial, protozoal and ovine ruminal fluid preparations*, «Anim. Feed Sci. Technol.», 25, pp. 169-178.
- WOGAN G.N., HSIEH D.P.H. (1980): *The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B<sub>1</sub> in the monkey, rat and mouse*, «Toxicol. Appl. Pharmacol.», 55, pp. 115-125.
- YIANNIKOURIS A., JOUANY J.P. (2002): *Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review*, «Animal Research», 51, pp. 81-99.
- YOUSEF A.E., MARTH E.H. (1989): *Stability and degradation of AFM<sub>1</sub>*, in *Mycotoxins in dairy products*, Edited by van Egmond, London: Elsevier Applied Science Publishers, Inc., January 1989, pp. 127-162.

## Aflatossina B1 nel mais: aspetti normativi e valutazione dei residui nelle specie animali

### INTRODUZIONE

Le micotossine occupano un ruolo di estrema rilevanza dal punto di vista sanitario, commerciale ed economico e continuano a essere al centro di dibattiti sia a carattere scientifico che normativo.

Sono ampiamente conosciute come contaminanti naturali derivanti dal metabolismo secondario di alcune specie fungine che colonizzano diversi alimenti. La contaminazione può avvenire durante tutta la filiera produttiva, ed è favorita da scenari climatici molto differenti caratterizzati da condizioni di caldo umido in alcuni casi ad altre in cui prevalgano condizioni di estrema siccità o di piovosità nel periodo di antesi. La presenza di micotossine non deve essere considerata un evento raro, basti pensare che secondo una stima effettuata dalla FAO ben un quarto della produzione mondiale di derrate destinate al consumo alimentare animale e umano risulta essere contaminato.

Questo dato, pertanto, non consente di sottovalutare l'impatto che la presenza delle micotossine esercita lungo tutta la filiera agro-alimentare, essendo in grado di esplicare una serie di potenti azioni tossiche che causano, sia nell'animale che nell'uomo, un'ampia varietà di quadri patologici acuti e cronici.

Pertanto, la loro possibile presenza in molti alimenti costituisce da sempre una causa di crescente interesse e preoccupazione per la salute dei consumatori, motivo per il quale il loro monitoraggio volto alla prevenzione è sempre più sinonimo di sicurezza alimentare.

\* *Istituto Superiore di Sanità – Dipartimento di Sanità Pubblica veterinaria e Sicurezza Alimentare, Roma*

\*\* *Università di Roma Tor Vergata, Dipartimento di Biologia*

Tra tutte le micotossine attualmente conosciute, oltre 300, l'aflatossina B1 (AFB1) è sicuramente la più nota per la sua diffusione e, soprattutto, per la sua elevata tossicità.

Viene prodotta da alcuni ceppi di *Aspergillus flavus* e di *Aspergillus parasiticus*, funghi che generalmente contaminano un numero rilevante di derrate alimentari, quali cereali, semi oleaginosi, spezie e frutta secca.

L'AFB1, per la sua azione genotossica ed epatocancerogena, è stata classificata dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) nel Gruppo 1 e considerata quindi come «agente cancerogeno per l'uomo».

Oltre all'uomo, è noto che anche gli animali alimentati con mangimi contaminati con l'AFB1 possono essere soggetti a una serie di reazioni patologiche denominate generalmente «aflatossicosi».

In particolare, si possono verificare danni a livello epatico e all'efficienza riproduttiva, riduzione del peso, anemia, ittero, e aumento della mortalità (Iheshiulor, 2011).

Inoltre, nel caso di galline ovaiole, l'esposizione ad AFB1 determina anche una considerevole riduzione della produzione di uova (Trucksess et al., 1983).

È importante considerare che una razione contaminata, oltre a incidere sulla salute dell'animale, può determinare in organi e tessuti, la presenza di residui di AFB1 come tale, o sottoforma dei suoi metaboliti come l'aflatossina M1 (AFM1), presente in prodotti quali il latte, o l'aflatossicolo presente nelle carni. La presenza della AFM1 nel latte si trasferisce nei prodotti lattiero-caseari in modo strettamente correlato al processo di caseificazione con fattori di concentrazione che variano a seconda della stagionatura e della componente proteica dei prodotti. L'aflatossicolo, prodotto dalla riduzione della AFB1, viene velocemente riconvertito ad AFB1 e ne costituisce quindi una riserva (Pompa, 1994; Yiannikouris e Jouany, 2002).

L'aflatossicosi animale e umana è quindi una problematica di forte attualità che può essere gestita solo attraverso una stretta collaborazione della comunità scientifica con gli organi legislativi che disciplinano i tenori massimi delle aflatossine consentiti nei prodotti destinati all'alimentazione umana (Regolamento UE 165/2010) e animale (Regolamento UE 574/2011).

A causa dei cambiamenti climatici, sempre più frequentemente si stanno manifestando nelle coltivazioni oscillazioni consistenti nelle contaminazioni di AFB1, così come di altre micotossine, con possibilità di alternanza tra campagne caratterizzate da assenza totale di rischio a campagne con elevato rischio agronomico e sanitario.

In base a questa peculiare caratteristica che da sempre è associata alla contaminazione da aflatossine e più in generale da micotossine, è facilmente

intuibile quanto sia indispensabile ricorrere a un approccio olistico mirato al massimo contenimento e controllo dei fattori, ormai noti, responsabili dell'attacco fungino e della conseguente produzione di aflatossine.

Più specificatamente, l'utilizzo di indicatori metereologici attraverso cui prevedere le condizioni climatiche nei periodi di maggiore rischio, di varietà resistenti, di opportuni fungicidi e insetticidi, di appropriati trattamenti di irrigazione, di corrette precessioni colturali, di strumenti di lotta biologica, di procedure di raccolta tecnologicamente avanzate e di mirate epoche e densità di semina sono solo alcune delle principali pratiche agricole che, se adeguatamente osservate, potrebbero portare a raggiungere importanti obiettivi nel controllo di questa classe di contaminanti.

C'è però da notare che la realtà produttiva, risente ancora di una certa lentezza nell'adottare in modo sistematico le azioni citate, ciò in relazione sia a un fatto culturale generalizzato sia alla effettiva necessità di capacità di impiegare forti investimenti nei percorsi produttivi a cui non corrisponde un adeguato riconoscimento economico seppur legato a un più alto livello di qualità sanitaria; dovrebbe inoltre essere considerato che le ingenti perdite economiche derivanti dalla presenza delle micotossine nelle coltivazioni dovrebbe indurre a una considerazione più equilibrata del rapporto rischio-beneficio. Altra condizione penalizzante è la scarsa conoscenza da parte del consumatore di questa possibile presenza nei prodotti alimentari che non alimenta pertanto una adeguata richiesta al mondo della produzione.

L'aflatossina B1, essendo come detto genotossica, non dovrebbe essere presente nei mangimi e nei prodotti alimentari, ma considerando la sua presenza come "naturale", la Commissione Europea tollera la presenza di questa micotossina raccomandando di mantenere la contaminazione ai livelli più bassi possibili (principio ALARA: *as low as reasonably achievable*).

Tale approccio non è universalmente adottato, infatti, negli Stati Uniti, ad esempio, il tenore ammesso è decisamente più alto (circa un fattore 10) rispetto a quello imposto dall'UE.

Questa discordanza, che si riflette prepotentemente negli scambi commerciali con Paesi terzi, genera quindi la necessità pressante di disporre di informazioni attendibili su cui basare i provvedimenti normativi e le azioni di gestione del rischio nel pieno rispetto delle esigenze produttive, economiche e sanitarie.

Per quanto attiene la presenza di aflatossina B1 nei mangimi, si deve ricordare che le fonti principali di rischio sono rappresentate dal mais e suoi sottoprodotti e dai semi di cotone. Le due matrici citate sono da considerare fortemente a rischio da aflatossina B1, soprattutto nei prodotti di importazione, e nel computo della concentrazione non si può escludere un fattore

addizionale che deve essere adeguatamente controllato per non produrre formulazioni mangimistiche con livelli di contaminazione eccedenti il limite previsto dal Regolamento 574/2011.

Pertanto un accurato controllo, in ambito aziendale, dei singoli fornitori unitamente ai controlli analitici per valutare la conformità delle materie prime sono sicuramente azioni da ritenersi altamente necessarie per garantire il benessere e la massima efficienza degli animali da un lato e la sicurezza alimentare per il consumatore di prodotti di origine animale dall'altro.

In merito a questi ultimi due aspetti, esiste una vastissima letteratura, in grado di fornire un background conoscitivo riguardante gli effetti sulla salute di animali alimentati con mangimi a base di mais contaminato con l'AFB1 in relazione alla dose e alle modalità e tempo di somministrazione.

Inoltre, sono stati effettuati anche studi incentrati sull'analisi di eventuali residui di AFB1 in tessuti quali fegato, muscolo e reni, degli animali alimentati con mais contaminato.

#### QUADRO NORMATIVO

La normativa sulle micotossine è materia in costante evoluzione, sia per le nuove conoscenze scientifiche apportate da continui studi nel settore, sia per le rilevanti ripercussioni che le misure adottate determinano negli scambi commerciali.

I limiti massimi tollerabili di aflatossine in prodotti destinati all'alimentazione umana sono riportati nel Regolamento UE 165/2010 (tab. 1), che reca modifiche al Regolamento CE/1881/2006 per quanto attiene i limiti massimi per alcune tipologie di frutta secca e spezie.

Si ricorda che secondo il Regolamento CE/1881/2006, non è consentito l'utilizzo di agenti chimici per la detossificazione e non è consentita la miscelazione di partite non conformi con quelle conformi.

Per quanto riguarda i mangimi, l'AFB1 è la sola micotossina normata sin dagli anni '80. Recentemente il Regolamento UE 574/2011 ha modificato la Direttiva comunitaria 2002/32 recepita in Italia con il Dlgs. 149/2004. Nel Regolamento vengono stabiliti i limiti massimi tollerabili per la sola aflatossina B1 nelle materie prime, nei mangimi complementari e composti, o che siano destinati ad animali produttori di latte.

Tra le materie prime di impiego zootecnico che contengono maggiori quantità di aflatossine (tra cui arachidi e derivati, pannello di cocco, di palma,

PRODOTTO ALIMENTARE	AFB1 (µg/kg)
FRUTTA SECCA E A GUSCIO	
Mandorle, pistacchi e semi di albicocca da sottoporre a cernita	12,0
Arachidi, nocciole, noci del Brasile, da sottoporre a cernita	8,0
Mandorle, pistacchi e semi di albicocca destinati al consumo umano diretto	8,0
Altra frutta a guscio e frutta secca da sottoporre a cernita	5,0
Nocciole e noci del Brasile destinati al consumo umano diretto	5,0
Arachidi, frutta a guscio, frutta secca e relativi prodotti derivati destinati al consumo umano diretto	2,0
Altra frutta a guscio destinati al consumo umano diretto	2,0
CEREALI	
Granoturco da sottoporre a cernita	5,0
Cereali e prodotti derivati eccetto granturco e alimenti per l'infanzia	2,0
Cereali e alimenti per lattanti e bambini	0,1
ALTRI ALIMENTI	
Spezie	5,0
Alimenti dietetici	0,1

Tab. 1 *Tenori massimi di AFB1 ammessi in prodotti destinati all'alimentazione umana come riportati nel Regolamento UE 165/2010*

MANGIME	AFB1 (mg/kg)
Materie prime per mangimi	0,02
Mangimi complementari e completi	0,01
a eccezione di:	
mangimi composti per bovini da latte e vitelli, ovini da latte e agnelli, caprini da latte e capretti, suinetti e pollame giovane.	0,005
mangimi composti per bovini (eccetto bovini da latte e vitelli), ovini (eccetto ovini da latte e agnelli), caprini (eccetto caprini da latte e capretti), suini (eccetto suinetti) e pollame (eccetto pollame giovane).	0,02

Tab. 2 *Tenori massimi di AFB1 nei prodotti destinati all'alimentazione animale (Regolamento UE 574/2011)*

di lino, ecc.), il mais e i suoi derivati e i semi di cotone (germe di mais, glutine, semola glutinata) occupano un posto di primaria importanza.

Per questi prodotti è previsto un limite massimo tollerabile pari a 0,02 mg/kg, riferito a un livello di umidità del 12%.

Come precedentemente detto, secondo il principio ALARA, l'esposizione a un agente tossico deve essere mantenuta ai livelli più bassi possibili, compatibilmente con la natura del contaminante, la efficienza dei processi produttivi, tecnologici e industriali e le condizioni economiche e sociali.

Ad esempio nel caso dell'AFB1 nei mangimi, si suppone che se sono applicate le buone norme di coltivazione, la contaminazione delle materie prime può ragionevolmente essere inferiore a 0,02 mg/kg.

Inoltre, con il Regolamento 767/2009, la normativa europea ha previsto la possibilità che i mangimi contenenti livelli di sostanze indesiderabili superiori a quelle previste dalle disposizioni legislative, possano essere destinati all'alimentazione animale unicamente previa detossificazione in stabilimenti riconosciuti, il cui riconoscimento avviene ai sensi dell'articolo 10, paragrafi 2/3, del regolamento (CE) n. 183/2005 e recanti la dicitura «mangimi contenenti livelli eccessivi di ... (denominazione della sostanza o delle sostanze indesiderabili conformemente all'allegato I della direttiva 2002/32/CE)». Pertanto, diversamente dal settore alimentare, non essendo espressamente dichiarato un divieto, si propende per l'adozione di una tacita approvazione per l'uso di agenti chimici per la detossificazione.

Inoltre, l'articolo 5 della medesima Direttiva stabilisce che gli Stati membri prescrivono che i prodotti destinati all'alimentazione degli animali in cui il contenuto di sostanza indesiderabile superi il livello massimo fissato nell'allegato I non possano essere mescolati, a scopo di diluizione, con lo stesso prodotto o con altri prodotti destinati all'alimentazione degli animali.

Una situazione nettamente diversa viene riscontrata nella normativa statunitense, dove tale limite risulta essere più elevato. Dai dati riportati in tabella 3, si può notare che la Food and Drug Administration (FDA) ha stabilito un limite di 300 µg/kg per mangimi a base di mais da destinare a vitelloni in finissaggio, di 200 µg/kg per mangimi a base di mais da destinare a suini in finissaggio e di 100 µg/kg per mangimi a base di mais da destinare a bovini da carne e suini riproduttori o a pollame adulto, e infine di 20 µg/kg per mais da utilizzare per animali immaturi. Quindi, a parte il caso dei mangimi destinati ad animali non ancora svezzati, in tutti gli altri casi il limite risulta essere almeno 5 volte maggiore di quello imposto dalla Comunità Europea.

Tale scelta è stata attuata in seguito a studi che hanno a suo tempo garantito la stessa come un buon compromesso tra effetti sulla salute dell'animale e l'impatto socio-economico, ma anche come conseguenza di un ormai noto diverso approccio non basato sul principio di precauzione.

Nel 1969, in mancanza di studi a riguardo, negli USA il livello di contaminazione consentito per il mais, così come per tutti gli altri ingredienti dei mangimi, era pari a 0,020 mg/kg, ovvero lo stesso attualmente in vigore nella Comunità Europea.

Solo vent'anni dopo, nel 1989, in seguito a ricerche sull'effettiva tollerabilità negli animali, la FDA ha alzato il limite per il mais da destinare a vitelloni, suini e polli. E appena un anno dopo, nel 1990, la FDA ha esteso tale limite anche alle arachidi e prodotti derivati da utilizzare come ingredienti dei mangimi.



MANGIME	AFB1 (mg/kg)
prodotti del granturco e delle arachidi da destinare a vitelloni in finissaggio	0,300
farina di semi di cotone da destinare a vitelloni, suini o pollame (a prescindere dall'età o dallo stato riproduttivo)	0,300
prodotti del granturco o delle arachidi da destinare a suini in finissaggio di 45 kg (100 libbre) o più;	0,200
prodotti del granturco e delle arachidi da destinare a bovini da carne e suini riproduttori o a pollame adulto	0,100

Tab. 3 *Tenori massimi consentiti di AFB1 nei mangimi disciplinati dalla FDA*

Ma è imperativo considerare che le disposizioni legislative vigenti in un Paese non possono però essere trasferite come tali in realtà differenti in quanto un dato scientifico necessita di studi mirati finalizzati alla verifica della attendibilità e della trasferibilità delle evidenze registrate alla situazione di riferimento.

A livello nazionale, questi studi non sono ancora stati effettuati in modo sistematico e pertanto deve essere mantenuta una linea precauzionale in attesa di evidenze scientifiche più robuste.

Inoltre, il Ministero della Salute, al fine di contenere “l'emergenza AFB1 2012”, ha recentemente divulgato una nota introducendo indicazioni sulla prevenzione e la gestione del rischio da aflatossina B1, da applicare per ridurre al minimo la presenza della micotossina non solo negli alimenti destinati all'uomo ma anche nei mangimi e ogni qualvolta si verifichino condizioni climatiche e ambientali tali da causare un incremento dei livelli di contaminazione nel mais e, di conseguenza nel latte e prodotti derivati.

Inoltre, tra le numerose misure di gestione, è stato ripreso quanto stabilito nel Regolamento 767/2009 fornendo agli operatori del settore mangimistico la possibilità che «Il mais destinato all'alimentazione animale, non conforme ai limiti fissati per l'aflatossina B1, può essere destinato allo stabilimento che esegue i trattamenti fisici autorizzati a condizione che sia accompagnato da documento di trasporto/dichiarazione in cui si indica lo speditore, la quantità, il lotto, e che riporti la dicitura “mais semilavorato destinato alla detossificazione».

#### RESIDUI DI AFB1 IN SPECIE ANIMALI

Di seguito, si riporta un quadro riassuntivo dei principali risultati derivanti da studi condotti in alcuni Paesi per valutare la correlazione tra livelli di AFB1 somministrati con la dieta ed effetti clinici in ruminanti, in particolare

vitelloni in finissaggio e manzi, suini, svezzati e non, specie avicole quali polli, tacchini, anatre e galline ovaiole.

*Ruminanti nutriti con mais contaminato:  
effetti sulla salute e residui di AFB1 nei tessuti*

In letteratura sono presenti diversi studi volti a individuare i possibili effetti sulla salute di ruminanti nutriti con mais contaminato con quantità variabili di AFB1.

Per quanto riguarda i vitelloni, un'importante studio (Helferich et al., 1986) ha evidenziato come tali animali, esposti a 60, 300 e 600 µg/kg di AFB1 aggiunto nei mangimi per periodi variabili dai 2 ai 5 mesi, non hanno riportato alterazioni delle performance zootecniche e neppure dei parametri ematici. Solo negli animali nutriti con mangime contaminato con 600 µg/kg di AFB1 sono comparse lievi lesioni epatiche e modeste alterazioni delle transaminasi.

In un altro studio (Garrett et al., 1968) sono stati alimentati dei manzi per 133-196 giorni con mais fortificato con 0, 100, 300, 700 e 1000 µg/kg di AFB1.

Dallo studio è emerso che solo nei manzi alimentati con 700 e 1000 µg/kg, sono stati osservati effetti negativi quali significativa inibizione della crescita, diminuzione dell'efficienza di alimentazione e un aumento del peso di fegato e reni. Non sono state, invece, osservate anomalie apparenti nei gruppi alimentati con 100 e 300 µg/kg di aflatossina.

Risultati differenti sono stati riportati in una recente review (Iheshiulor et al., 2011), da cui emerge che, ad esempio, l'esposizione cronica derivante dalla somministrazione di mais naturalmente contaminato con 120 µg/kg di AFB1 ha evidenziato l'insorgere di gravi effetti sulla salute degli animali (Charoenpornsook et al., 2006).

Anche in un altro studio i vitelloni in finissaggio alimentati con mangimi naturalmente contaminati con concentrazioni di AFB1 comprese tra 96 a 1700 µg/kg sono stati considerati a rischio di aflatossicosi (Osweiler et al., 1985). La diagnosi è stata basata sulla correlazione di caratteristiche lesioni epatiche microscopiche, alta concentrazione di aflatossine in mangimi, e l'isolamento e l'individuazione di AFB1 e del suo metabolita, l'aflatossina M1, nelle urine e nel fegato dei vitelli interessati.

D'altra parte è importante considerare che altri autori, invece, non hanno evidenziato nessun danno a seguito di una dieta con mais fortificato con 75 µg/kg per 12 giorni (Queiroz et al., 2012).

BIBLIOGRAFIA	AFB1 ( $\mu\text{g/kg}$ )	TEMPO DI ESPOSIZIONE	EFFETTI	RESIDUI
Helferich (1986)**	60	2 mesi	no	si (fegato)
		5 mesi	no	no (adattamento metabolico)
	300	2 mesi	no	si (fegato)
		5 mesi	no	no (adattamento metabolico)
	600	2 mesi	si (lievi lesioni epatiche e modeste alterazioni delle transaminasi)	si (fegato)
		5 mesi	si (lievi lesioni epatiche e modeste alterazioni delle transaminasi)	no (adattamento metabolico)
Garrett (1968)**	100, 300, 700, e 1000	133-196 giorni	no si (inibizione della crescita, diminuzione dell'efficienza di alimentazione, e aumento del peso di fegato e reni)	
Charoenpornsook (2006)	120*	esposizione cronica	si (diarrea, mastite acuta, disturbi respiratori, inappetenza)	
Osweiler (1985)	96-1700*		si (lesioni epatiche)	si (fegato)
Queiroz (2012)	75	12 giorni	no	
Vaid (1981)	110*	7 giorni	si (lesioni epatiche)	si (fegato)
* mangime naturalmente contaminato con AFB1.				
** mangime formulato con semi di cotone.				

Tab. 4 *Effetti e residui di AFB1 in bovini nutriti con mangime contaminato*

Per quanto riguarda la possibilità di trovare residui di AFB1 nei tessuti, in uno studio precedentemente citato sono stati analizzati il fegato, i muscoli e il grasso e non sono state trovate concentrazioni di AFM1 nel fegato di tutti i vitelloni in esame (Helferich et al., 1986). Un dato particolarmente interessante è che nelle biopsie effettuate dopo il quinto mese di esposizione non è stato però rinvenuto alcun residuo. Ciò può essere un importante indice che testimonia una sorta di adattamento metabolico degli animali.

In un'altra ricerca gli autori hanno studiato la presenza di residui nel caso di intossicazione cronica con 110  $\mu\text{g/kg}$  di AFB1 naturalmente presente nel mangime in manzi e hanno riscontrato la presenza della micotossina nel fegato (Vaid et al., 1981).

Pertanto, dall'analisi delle informazioni schematizzate nella tabella 4, l'esposizione cronica di bovini a concentrazioni di AFB1 nella dieta inferiori

a 75 µg/kg sembrerebbe non determinare sostanziali danni alla salute degli animali e alle loro performance zootecniche.

Tale concentrazione sembrerebbe inoltre non causare la presenza di residui nei tessuti a eccezione del fegato.

*Suini nutriti con mais contaminato:  
effetti sulla salute e residui di AFB1 nei tessuti*

Per quanto riguarda i suini, in uno studio condotto diversi anni fa, dopo aver esposto gli animali dallo svezzamento sino al peso di macellazione a diversi livelli di AFB1, è stata individuata come concentrazione limite, per evitare effetti a carico delle performance zootecniche dell'animale e lesioni istopatologiche, un valore pari a 233 µg/kg (Gagné et al., 1968). D'altra parte concentrazioni pari a 51 µg/kg hanno comunque causato piccole alterazioni di alcuni parametri biochimici quali fosfatasi alcalina, e urea, così come concentrazioni pari o superiori a 615 µg/kg hanno provocato lesioni istopatologiche.

Diversi studi più recenti hanno evidenziato che concentrazioni di AFB1 maggiori di 200 µg/kg comportano effetti sulle performance zootecniche di suini (Rustemeyer, 2010; Devegowda, 1998; Silvotti, 1997).

Un'altra ricerca ha studiato gli effetti dovuti a esposizione orale cronica di AFB1 in suini svezzati (Dilkin, 2003). Gli animali alimentati per 28 giorni con razioni di mangime a cui sono stati aggiunti 50 µg/kg di AFB1 non hanno riportato alcun effetto.

È comunque importante notare che nel caso di mangimi contaminati con 50 µg/kg di AFB1 e 30 mg/kg di fumonisina B1 si è verificata una perdita delle performance zootecniche, evidenziando un effetto sinergico delle due micotossine.

Per quanto riguarda i residui in fegato, muscolo, sangue e rene in uno studio del 1975 sono stati esposti suini magroni a concentrazioni di AFB1 variabili da 0 a 400 µg/kg per 30 giorni (Jacobson et al., 1975). Gli autori hanno in seguito riscontrato nei soggetti esposti a 100 µg/kg, tracce di AFB1 in sangue e muscoli, pari a 0,19 e 0,17 µg/kg. In una successiva ricerca, invece, sebbene i suini siano stati alimentati con mais naturalmente contaminato con 400 µg/kg di AFB1 per 14 giorni, non sono stati trovati residui dopo 24 ore dall'interruzione della dieta (Trucksess et al., 1998).

Quindi, considerando i dati riassunti in tabella 5, l'esposizione cronica di suini svezzati a concentrazioni di AFB1 nella dieta non superiori a 50 µg/

BIBLIOGRAFIA	ANIMALE	AFB1 (µg/kg)	TEMPO	EFFETTI	RESIDUI
Gagné (1968)	suini adulti	51  233  615		si (ematici es. fosfatasi alcalina, urea) no (performance e lesioni istopatologiche) si (ematici es. fosfatasi alcalina, urea) no (performance e lesioni istopatologiche) si (ematici es. fosfatasi alcalina, urea, performance e lesioni istopatologiche)	
Rustemeyer (2010)	suini piccoli	250/500	7-28-70 giorni	si (performance e parametri ematici) effetti dovuti più al tempo di esposizione che alla concentrazione di AFB1	
Devegowda (1998)	suini in finissaggio	200*		si (sistema immunitario e crescita ridotta)	
Silvotti (1997)	suini non svezzati**	800	25 giorni	si (sistema immunitario)	
Dilkin (2003)	suini svezzati	50	28 giorni	no (si in presenza di FB1 30 mg/kg)	
Jacobson (1975)	suini magroni	100	30 giorni		si in sangue e muscoli (<0,002 mg/kg)
Trucksess (1988)	suini adulti	400*	14 giorni		no previa interruzione dieta per 24h
* mangime naturalmente contaminato con AFB1. **suini allattati da scrofe alimentate con mangime contaminato durante la gestazione e l'allattamento.					

Tab. 5 *Effetti e residui di AFB1 in suini nutriti con mangime a base di mais contaminato*

kg molto probabilmente non determina danni alla salute degli animali e alterazioni delle loro performance zootecniche e può comportare la presenza di residui di AFB1 molto inferiori a 1 µg/kg, ovvero inferiori al limite di legge attualmente in vigore (Regolamento UE 165/2010).

*Specie avicole nutrite con mais contaminato: effetti sulla salute e residui di AFB1 nei tessuti e nelle uova*

Le specie avicole prese in considerazione hanno riguardato in particolare polli, tacchini e anatre. Diversi studi, riportati nella tabella 6, hanno evidenziato la differente sensibilità delle varie specie. In particolare una ricerca ha eviden-

BIBLIOGRAFIA	ANIMALE	AFB1 ( $\mu\text{g/kg}$ )	TEMPO	EFFETTI	RESIDUI
Arafa (1981)	pollo	700		no	
	pulcino			si (crescita ridotta, mortalità)	
	anatra			si (crescita ridotta, mortalità)	
Coker (1979)	pollo	500		si (lesioni epatiche)	
	anatra	30		si (lesioni epatiche)	
	tacchino	300		si (lesioni epatiche)	
Hussain (2010)	pollo	1600, 3200, 6400	7 giorni	si	si
Micco (1984)	polli e galline da uova	50	14-33 giorni		no
Chen (1983)	pollo	2057*	35 giorni		si in stomaco, fegato e reni ( $< 3 \mu\text{g/kg}$ ) no se si interrompe dieta per 4 giorni
Hassan (2012)	gallina da uova	5000	3-5 giorni		si fegato ( $1,44 \mu\text{g/kg}$ ), reni ( $0,25 \mu\text{g/kg}$ ), muscolo ( $0,03 \mu\text{g/kg}$ ) si nelle uova nessun residuo previa interruzione dieta per 5/6 giorni
Trucksess (1983)	gallina da uova	8000	7 giorni		si in reni, fegato, muscolo, sangue e uova ( $0,2 \mu\text{g/kg}$ ) no in tessuti e nelle uova previa interruzione dieta per 7 giorni

\* mangime naturalmente contaminato con AFB1.

Tab. 6 *Effetti e residui di AFB1 in volatili nutriti con mangime a base di mais contaminato*

ziato l'insorgenza di danni al fegato in anatre esposte a  $30 \mu\text{g/kg}$  di AFB1, in tacchini esposti a  $300 \mu\text{g/kg}$  e in polli solo se esposti a  $500 \mu\text{g/kg}$  (Coker et al., 1979). Il pollo risulterebbe quindi essere il volatile più resistente anche per altri ricercatori che esponendo a  $700 \mu\text{g/kg}$  di AFB1 nella dieta, non hanno evidenziato effetti, mentre si è rilevata una diminuzione significativa della crescita in pulcini di tacchino e anatra, causando in questi anche un certo grado di mortalità (Arafa et al., 1981).

Altri studi, alcuni piuttosto recenti, evidenziano che alte concentrazioni di AFB1 (>500 µg/kg) provocano nel pollo effetti clinici negativi e residui in fegato, reni e stomaco (Agha et al., 2011; Hussain et al., 2010). Non vi sono effetti e/o residui a concentrazioni di AFB1 inferiori a 100 µg/kg. Ad alte concentrazioni (> 2000 µg/kg) si registra la presenza di residui nelle uova (Chen et al, 1983; Hassan et al., 2012; Trucksess et al., 1983), che, invece, non si ritrovano a concentrazioni minori di 50 µg/kg, sicuramente più rappresentative della realtà, o se viene interrotta la dieta contaminata (Micco et al., 1984). Nei pulcini di anatra e tacchino vi sono effetti patologici anche a concentrazioni più basse (30 µg/kg).

Quindi l'esposizione cronica di polli a concentrazioni di AFB1 nella dieta inferiore a 100 µg/kg non dovrebbe determinare danni alla salute degli animali e alle loro performance zootecniche, e sembrerebbe non comporti la presenza di residui nei tessuti e nelle uova.

Diverso il caso di pulcini di anatra e tacchino, dove invece, per non avere effetti patologici è necessario che l'AFB1 non superi 30 µg/kg di concentrazione.

## CONCLUSIONI

Dalla letteratura si evince che gli effetti dell'AFB1 su talune specie animali esposte alla tossina tramite una dieta basata su mais contaminato possono portare, a dosi tra 100 e 200 µg/kg, danni alla salute degli animali, mentre utilizzando mangimi contaminati con 75 µg/kg di AFB1 per i ruminanti, con 50 µg/kg per i suini e con 100 µg/kg per il pollame adulto, non si dovrebbero registrare danni alla salute degli animali né presenza di residui in tessuti e organi.

Considerando i limiti della FDA, che sono notevolmente più alti di quelli citati, sorgono, pertanto, alcune incertezze sulla attendibilità degli studi comprovanti la assoluta innocuità per la salute degli animali.

Inoltre, è necessario considerare che alcuni di questi studi non sono stati condotti utilizzando mais o mangimi naturalmente contaminato, per cui la clearance dell'AFB1 nell'animale potrebbe essere diversa e questi livelli potrebbero comunque rappresentare un rischio per la salute delle specie animali bersaglio, e conseguentemente per l'uomo.

Inoltre è bene sottolineare che nella pratica zootecnica il mangime può essere composto non esclusivamente da mais, ma anche da altre materie prime che potrebbero contenere anch'esse sia l'AFB1, sia anche altre micotossine

con possibili effetti tossici sinergici, come rilevato ad esempio nello studio sui suini precedentemente citato (Dilkin, 2003) dove la presenza di un'altra micotossina, la fumonisina B1, ha causato l'insorgenza di danni alla salute degli animali esposti.

Un altro dato importante da valutare è il tempo di esposizione, che in alcune delle ricerche prese in esame è stato troppo limitato per poter valutare la tossicità cronica.

D'altra parte in alcuni studi è stato fornito un dato fondamentale, ovvero il tempo di sospensione della dieta necessario per ridurre gli effetti e limitare i residui dell'aflatossina.

Pertanto, allo stato attuale delle conoscenze, è necessario acquisire informazioni più aggiornate su alcuni aspetti di fondamentale importanza più strettamente correlati alle condizioni in cui gli animali sono alimentati, come tempo e dose di somministrazione, individuazione di fonti nutrizionali alternative al mais, valutazione degli effetti sinergici dovuti alla co-presenza di più micotossine, tempi di sospensione della dieta contaminata, livelli di concentrazione dei residui nelle parti edibili, caratterizzazione della presenza di forme metaboliche derivanti dalla biotrasformazione in vivo della AFB1, come ad esempio l'aflatossicolo.

A completamento della informazione, si deve inoltre considerare che, accanto ai rilievi scientifici esposti, l'iter procedurale per la risoluzione di qualsiasi istanza alla Commissione Europea, necessita di un tempo che oscilla tra i sei e i dodici mesi, rendendo di fatto inattuabile, al momento, qualsiasi azione che possa portare elementi aggiuntivi per gestire la attuale situazione di emergenza.

#### RINGRAZIAMENTI

Cristina Barea Toscan per l'assistenza tecnica prestata.

#### RIASSUNTO

L'aflatossina B1 (AFB1) è una micotossina che contamina un'ampia varietà di alimenti tra cui il mais. È il più potente agente naturale epatotossico e mutageno sia per l'uomo, che per diverse specie animali. Come conseguenza del consumo di elevate quantità di mais, sono stati rilevati molteplici reazioni avverse in animali da allevamento intensivo quali pollame, suini e bovini. Inoltre, a causa del meccanismo di carry over, l'AFB1 può essere trovata come tale o sottoforma dei suoi principali metaboliti, come residuo nella



carne, nelle uova e nel latte di animali e può costituire una minaccia per la salute umana. Per questi motivi molti Paesi hanno stabilito dei limiti normativi che disciplinano il tenore di AFB1 nei mangimi, sebbene tali livelli siano spesso molto diversi tra loro. Il nostro obiettivo è stato quello di fornire una panoramica delle ricerche sugli effetti sulla salute e i residui nei tessuti e organi di bovini, suini e pollame derivanti dal consumo di mangimi prodotti con mais contaminato con AFB1. Sono stati considerati anche studi riguardanti eventuali residui nelle uova.

#### ABSTRACT

Aflatoxin B1 (AFB1) is the most potent hepatocarcinogenic mycotoxin naturally occurring in a wide variety of feedstuffs including corn. It is also a mutagenic agent to humans and several animal species. As a consequence of the consumption of high levels of corn with the diet, several adverse effects have been recognized in intensively farmed animals such as poultry, swine and cattle. Moreover, due to the carry over mechanism, parent AFB1 and/or its metabolites may be found as a residue in meat, egg and milk of some animal species and can pose a threat to human health. Due to these reasons, many countries have established regulatory limits that restrict AFB1 level in feed, although these are often very different.

Our aim is to give an overview of research studies about the effects on animal health and the residues in tissues of cattle, swine and poultry consuming AFB1 contaminated corn-based diet. Residues in eggs are reported too.

#### BIBLIOGRAFIA

- AGHA W.J., RAZZAZI-FAZELI E., BOHM J. (2011): *Aflatoxin B1 in Affecting Broiler's Performance, Immunity, and Gastrointestinal Tract: A Review of History and Contemporary Issues*, «Toxins», 3 (6), pp. 566-590.
- ARAFA A.S., BLOOMER R.J., WILSON H.R., SIMPSON C.F., HARMS R.H. (1981): *Susceptibility of various poultry species to dietary aflatoxins*, «British poultry science», 22, pp. 431-436.
- CHAROENPORNSOOK K., KAVISARASAI P. (2006): *Mycotoxins in animal feedstuff of Thailand*, «KMILT Sci.Tech. J.», 6, pp. 25-28.
- CHEN C., PEARSON A.M., COLEMAN T.H., GRAY J.I., PESTKA J.J., AUST S.D. (1983): *Tissue deposition and clearance of aflatoxins from broiler chickens fed a contaminated diet*, «Am. J. Vet. Res.», 44, pp. 1750-1752.
- COKER R.D. (1979): *Aflatoxin: past, present and future*, «Tropical science», 21, pp. 143-162.
- DECRETO LEGISLATIVO 149/2004: Decreto Legislativo N. 149/2004 del 10 maggio 2004, riguardante l'attuazione delle direttive 2001/102/CE, 2002/32/CE, 2003/57/CE e 2003/100/CE, relative alle sostanze ed ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali, «Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 139 del 16-6-2004».

- DEVEGOWDA G., RADU M.V.L., NAZAR A., SWAMY H.V.L.M. (1998): *Mycotoxin picture worldwide: Novel solutions for their counteraction. Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium on Biotechnology in Feed Industry: Passport of the Year 2000*, Nottingham University Press, Sheffield (England), pp. 241-255.
- DILKIN P., ZORZETE P., MALLMANN C.A., GOMES J.D.F., UTIYAM C.E., OETTING L.L., CORRÊA B. (2003): *Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B1 and fumonisin B1-containing Fusarium moniliforme culture material in weaned piglets*, «Food and Chemical Toxicology», 41, pp. 1345-1353.
- DIRETTIVA 2002/32/CE: Direttiva (CE) N. 32/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 7 Maggio 2002 relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali, «Gazzetta Ufficiale della Unione Europea», L 140/10.
- GAGNÉ W.E., DUNGWORTH D.L., MOULTON J.E. (1968): *Pathologic effects of aflatoxin in pigs*, «Pathol. Vet.», 5, pp. 370-384.
- GARRETT W.N., HEITMAN JR. H.A.N. (1968): *Booth Aflatoxin Toxicity in Beef Cattle*, «Proc. Soc. Exp. Biol. Med.», 127, pp. 188-190.
- HASSAN Z.U., KHAN M.Z., KHAN A., JAVED I., HUSSAIN Z. (2012): *Effects of individual and combined administration of ochratoxin A and aflatoxin B1 in tissues and eggs of White Leghorn breeder hens*, «J. Sci. Food Agric.», 92, pp. 1540-1544.
- HELFERICH W.G., GARRETT W.N., HSIEH D.P.H., BALDWIN R.L. (1986): *Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins*, «J. Anim. Sci.», 62, pp. 691-696.
- HUSSAIN Z., KHAN M.Z., KHAN A., JAVED I., SALEEMI M.K., MAHMOOD S., ASI M.R. (2010): *Residues of aflatoxin B1 in broiler meat: effect of age and dietary aflatoxin B1 levels*, «Food and Chemical Toxicology», 48, pp. 3304-3307.
- IHESHIULOR O.O.M., ESONU B.O., CHUWUKA O.K., OMEDE A.A., OKOLI I.C., OGBUEWU I.P. (2011): *Effects of Mycotoxins in Animal Nutrition: A Review*, «Asian Journal of Animal Sciences», 5, pp. 19-33.
- JACOBSON M., REFFERN R.E., MILLS G.D. JR. (1975): *Naturally occurring insect growth regulators. II Screening of insect and plant extracts as juvenile hormone mimics*, «Lloydia», 38, pp. 455-472.
- MICCO C., MIRAGLIA M., ONORI R., BRERA C., MANTOVANI A., IOPPOLO A., STASOLLA D. (1984): *Long-term administration of low doses of mycotoxins to poultry. 1. Residues of aflatoxin B1 and its metabolites in broilers and laying hens*, «Food Chem. Toxicol.», 22, pp. 447-451.
- OSWEILER G.D., TRAMPEL D.W. (1985): *Aflatoxicosis in feedlot cattle*, «J. Am. Vet. Med. Assoc.», 187, pp. 636-637.
- QUEIROZ O.C., HAN J.H., STAPLES C.R., ADESOGAN A.T. (2012): *Effect of adding a mycotoxin-sequestering agent on milk aflatoxin M1 concentration and the performance and immune response of dairy cattle fed an aflatoxin B1-contaminated diet*, «J. Dairy Sci.», 95, pp. 5901-5908.
- REGOLAMENTO UE 165/2010: Regolamento (UE) N. 165/2010 della Commissione del 26 Febbraio 2010 recante modifica, per quanto riguarda le aflatossine, del Regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, «Gazzetta Ufficiale della Unione Europea», L 50/8.
- REGOLAMENTO CE/1881/2006: Regolamento (CE) N. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, «Gazzetta Ufficiale della Unione Europea», L 364/5.
- REGOLAMENTO UE 574/2011: Regolamento (UE) N. 574/2011 della Commissione del

- 16 Giugno 2011 che modifica l'allegato I direttiva 2002/32/CE relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali, «Gazzetta Ufficiale della Unione Europea», L 159/7.
- RUSTEMEYER S.M., LAMBERSON W.R., LEDOUX D.R., ROTTINGHAUS G.E., SHAW D.P., COCKRUM R.R., KESSLER K.L., AUSTIN K.J., CAMMACK K.M. (2010): *Effects of dietary aflatoxin on the health and performance of growing barrows*, «J. Anim Sci.», 88, pp. 3624-3630.
- SILVOTTI L., PETTERINO C., BONOMI A., CABASSI E. (1997): *Immunotoxicological effects on piglets of feeding sows diets containing aflatoxins*, «Vet. Rec.», 141, pp. 469-472.
- TRUCKSESS M.W., STOLOFF L., BRUMLEY W.C., WILSON D.M., HALE O.M., SANGSTER L.T., MILLER D.M. (1988): *Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in the tissues of pigs receiving aflatoxin*, «Food Addit. Contam.», 5, pp. 303-308.
- TRUCKSESS M.W., STOLOFF L., YOUNG K., WYATT R.D., MILLER B.L. (1983): *Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed*, «Poult. Sci.», 62, pp. 2176-2182.
- YUNUS A.W., RAZZAZI-FAZELI E., BOHM J. (2011): *Aflatoxin B1 in Affecting Broiler's Performance, Immunity, and Gastrointestinal Tract: A Review of History and Contemporary Issues*, «Toxins», 3, pp. 566-590.
- VAID J., DAWRA R.K., SHARMA O.P., NEGI S.S. (1981): *Chronic aflatoxicosis in cattle*, «Veterinary & Human Toxicology», 23, pp. 436-438.

Finito di stampare in Firenze  
presso la tipografia editrice Polistampa  
nell'agosto 2013