

I GEORGOFILI

Quaderni
2005-III



MICOTOSSINE E ALIMENTAZIONE
UMANA E ZOOTECNICA

Firenze, 9 novembre 2005

SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA

Copyright © 2006
Accademia dei Georgofili
Firenze
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti dell'Accademia dei Georgofili»
Anno 2005 - Serie VIII - Vol. 2 (181° dall'inizio)

Responsabile redazionale: dott. Paolo Nanni

Servizi redazionali, grafica e impaginazione
SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA
Via G. Benivieni 1 - Firenze
Tel. 055 5532924
Fax: 055 5532085
info@sefeditrice.it
www.sefeditrice.it

INDICE

GIANFRANCO PIVA, GIAMPIERO MARACCHI, MARINA MIRAGLIA, SIMONE ORLANDINI, ANNA DALLA MARTA, PAOLA BATTILANI <i>Micotossine e alimentazione: profilo storico</i>	7
ANTONIO LOGRIECO, ANTONIO MORETTI, GIUSEPPINA MULÈ, GIANCARLO PERRONE, ANTONIO BOTTALICO <i>Micotossine e funghi tossigeni nei cereali e nei prodotti cerealicoli (con particolare riferimento alla situazione europea)</i>	35
GIANFRANCO PIVA, AMEDEO PIETRI <i>Filiera delle produzioni animali: latte, latticini, carni e derivati</i>	71
PAOLA BATTILANI, STEFANIA POLLASTRO, ANGELA SILVA, FRANCO FARETRA <i>Cause e azioni di prevenzione della contaminazione dei vini da ocratossina A</i>	87
GIORGIO CANTELLI FORTI, FRANCESCA MAFFEI <i>Micotossine: aspetti tossicologici</i>	127
HARRY KUIPER, MARINA MIRAGLIA, BARBARA DE SANTIS, CARLO BRERA <i>Principi innovativi per l'analisi del rischio negli alimenti: il caso delle micotossine</i>	141
ANDREA CANZANO <i>Punto di vista di un'industria alimentare</i>	161

MARCO AURELIO PASTI, MARCO MARCELLO DEL MAJNO <i>Punto di vista di un imprenditore agricolo</i>	171
<i>Considerazioni conclusive</i>	175

GIANFRANCO PIVA*, GIAMPIERO MARACCHI**, MARINA MIRAGLIA***,
SIMONE ORLANDINI**, ANNA DALLA MARTA**, PAOLA BATTILANI****

Micotossine e alimentazione: profilo storico

I. IL PASSATO

I.1 *Sviluppo dell'agricoltura e variazioni climatiche*

Le condizioni climatiche hanno da sempre avuto una grandissima influenza sulla vita e sulle attività dell'uomo. La nascita dell'agricoltura risale al decimo millennio a.C., quando, dopo l'era glaciale, la temperatura cominciò a risalire e il ghiaccio a ritirarsi.

In quel periodo, infatti, in Mesopotamia venivano già seminati i primi cereali, sfruttando i fertili fanghi depositati dalle piene del Tigri e dell'Eufrate. Il pieno sviluppo dell'attività agricola però venne raggiunto molto più tardi, quando fra il 4000 e il 3500 a.C. la Mesopotamia venne occupata dai Sumeri, popolo di abili agricoltori e ottimi ingegneri, che utilizzarono le acque dei fiumi per irrigare le loro colture.

Il costante aumento della temperatura, però, provocò il progressivo scioglimento dei ghiacciai e di conseguenza una sempre minore piovosità nella fertile valle, la cui parte coltivabile andava riducendosi lungo gli alvei dei fiumi.

Anche la grande civiltà egizia fondò la sua ricchezza sull'agricoltura grazie alle inondazioni del Nilo, che con le sue piene rendeva la terra ricca e fertile.

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

** *Dipartimento di Scienze Agronomiche e Gestione del Territorio Agro-forestale, Università degli Studi di Firenze*

*** *Istituto Superiore di Sanità, Roma*

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

Le piene del Nilo e la gestione delle opere per il loro controllo, da cui dipendeva la sopravvivenza della popolazione, furono alla base della costituzione di uno dei primi stati della storia, nel 3200 a.C.

La temperatura continuò la sua lenta risalita finché, nel primo millennio a.C. il suo abbassamento riportò un clima mite e prevalentemente piovoso. Ed è in questo contesto climatico che si sviluppa la grande civiltà greca. Il clima favorì l'attività agricola e le molte colonie della Grecia ne consentirono l'espansione. La civiltà greca però, a causa delle numerose guerre intraprese, cominciò il suo declino, che si concluse nel primo secolo d.C. con la conquista da parte di Roma. Questo periodo fu caratterizzato da un nuovo aumento della temperatura che si protrasse per quasi tre secoli. La piovosità diminuì nuovamente e l'agricoltura venne abbandonata in molte regioni. Contemporaneamente lo scioglimento dei ghiacci della Groenlandia e dell'Islanda permise ai Vichinghi di colonizzare le terre divenute fertili. Qui, però, le brevi stagioni di coltivazione e la povertà dei suoli presenti nei fiordi scandinavi determinarono le grandi migrazioni, costringendoli a lunghe navigazioni per la caccia al merluzzo.

Le complesse interazioni tra l'atmosfera e l'oceano, che governavano il clima europeo, determinarono gelidi inverni seguiti da lunghe e intense piogge che portarono disastrose inondazioni su tutta l'Europa del nord. Nei primi anni del 1300, infatti, i campi arati divennero delle distese di fango inutilizzabili, le dighe crollarono e molti feudi vennero allagati. Tali condizioni si protrassero per un ventennio e furono seguite da un inverno glaciale che gelò il Tamigi, mentre migliaia di persone continuavano a morire di fame. In seguito il clima diventò imprevedibile e contrassegnato da estati caldissime e asciutte, da un aumento dei fenomeni temporaleschi e dal rafforzamento dei venti sulla Manica e sul Mare del Nord. Era iniziata la Piccola Era Glaciale.

Le condizioni climatiche però hanno agito e influito sulla storia dell'umanità anche in modo meno evidente, ma non per questo meno dannoso. Verso la metà del 1800, infatti, si apre uno dei peggiori periodi di carestia, determinato dall'arrivo della peronospora della patata in Irlanda. Non è chiaro come la malattia arrivò in Europa, ma sta di fatto che una volta arrivata si diffuse con terrificante velocità. L'estate del 1845, infatti, fu fredda e umida e i venti persistenti trasportarono gli organi di moltiplicazione in ogni direzione. Inizialmente la situazione non sembrava molto preoccupante, ma ben presto cominciò la penuria e poi la carestia. Nel giro di pochi anni la superficie di coltivazione della patata si ridusse a un quinto e i contadini non avevano più soldi per pagare l'affitto dei campi e non avevano più cibo per sfamarsi. Nulla poté evitare che l'infezione colpisse tutti gli areali di coltivazione, poiché non

era chiaro da cosa fosse causata. Così, la presenza di una singola coltura e le condizioni climatiche fredde e molto umide, favorevoli allo sviluppo della malattia, provocarono in una decina di anni più di un milione di vittime (Fagan, 2001).

1.2 Evoluzione del consumo dei prodotti alimentari: relazioni tra clima, epidemie e alimentazione

Probabilmente nel periodo nel quale i nostri antenati si procuravano il cibo con la caccia o con la raccolta di radici, tuberi, molluschi e piccoli animali e nel periodo dello sviluppo della pastorizia, il problema delle micotossine per l'uomo era inesistente. Il problema fondamentale da risolvere era la ricerca del cibo seguendo anche le mandrie di animali, dalle quali ottenere risorse nei loro periodici spostamenti stagionali alla ricerca di pascoli abbondanti. Era questa la situazione trovata dagli europei nel periodo della conquista delle praterie del Nord America. Terreni sterminati nei quali si era realizzata una perfetta simbiosi fra praterie, bisonti e popolazioni indiane che dalle mandrie di questi animali ottenevano tutto quanto era loro necessario.

La conquista della terra da parte della specie umana è stato però un processo che è avvenuto lentamente, con fasi evolutive differenti nelle varie aree, e che ha sempre avuto come obiettivo primario quello di ottenere adeguate risorse alimentari in tutto il periodo dell'anno. Nel corso dei millenni l'uomo ha progressivamente arricchito la propria esperienza biologica attraverso la conquista di nuovi e sempre più vasti areali e ambienti tra loro molto diversi, attraverso il progressivo sviluppo di nuove tecnologie, capaci di assicurargli superiorità nei riguardi degli altri animali e potenziare la sua capacità di governo del territorio. L'uomo ha imparato a utilizzare via via nuovi alimenti e a manipolarli con l'impiego di tecnologie innovative, la più importante delle quali è stata certamente l'uso del fuoco. L'uomo di Pechino 300.000 anni fa utilizzava questo importante strumento per difendersi, riscaldarsi e forse per cuocere i cibi. La cottura dei cibi ha ampliato la base alimentare dell'uomo, sia per la possibilità di rendere eduli alimenti che non lo erano, o lo erano molto poco, sia perché potente strumento di conquista del territorio attraverso la sottrazione alle foreste. Un momento di grande rilievo in questa fase evolutiva è stato certamente quello dell'avvento delle prime forme di agricoltura nel Neolitico, che consentì di assicurare maggiori disponibilità alimentari. Il passaggio da una fase nella quale le risorse alimentari derivavano dalla raccolta di frutti, radici, molluschi, insetti o dalla caccia, magari già

realizzata in modo selettivo per assicurare il mantenimento delle disponibilità venatorie, al pascolo di greggi di erbivori, alla coltivazione dei terreni, ha rappresentato un modo per assicurare migliori disponibilità alimentari e ha comportato una fondamentale rivoluzione alimentare, con l'introduzione dei cereali. Si tratta di processi che si sono sviluppati nell'area della Mesopotamia e sembra, quasi contemporaneamente e senza che siano noti contatti, in zone della Cina. La coltivazione avveniva nei terreni disboscati prevalentemente con il fuoco. La popolazione poté così rapidamente aumentare e diventare stanziale, soprattutto nelle zone ove si svilupparono sistemi agricoli che si basavano su una fertilità rinnovabile dei terreni. L'esempio più rilevante è rappresentato dall'Egitto, ove le periodiche inondazioni del Nilo assicuravano una adeguata fertilizzazione. La fertilizzazione era il limite del sistema agricolo agli alberi. Quando non vi erano le condizioni perché avvenisse spontaneamente, come nella valle del Nilo, dopo un certo numero di cicli produttivi i terreni esaurivano la loro capacità di produrre e venivano abbandonati e destinati a diventare zone desertiche. Anche nelle zone dove il sistema della fertilità rinnovabile assicurava raccolti costanti non mancavano i problemi, costituiti soprattutto dalla variabilità climatica, che condizionava la qualità e l'abbondanza dei raccolti. In questo ambito potrebbero essere inquadrate le piaghe, che colpirono le popolazioni della valle del Nilo, descritte nell'Antico Testamento (Esodo 7, 14-13,16), e che afflissero gli Egiziani, si stima fra il 1250-1300 a.C. (acqua mutata in sangue, invasione di rane, zanzare, mosche velenose, pestilenza fra il bestiame, *pustole/piaghe*, grandine, locuste, tenebre, *morte dei primogeniti degli Egiziani*).

Il succedersi degli eventi descritti nell'Esodo è verosimilmente riconducibile a un alternarsi di situazioni climatiche che hanno determinato situazioni favorevoli ai fatti indicati. Probabilmente alcune potrebbero essere in relazione all'utilizzo di cereali contaminati da micotossine, responsabili di manifestazioni patologiche per azione diretta, a seguito di ingestione di alimenti contaminati, o indiretta, per inalazione di pulviscolo ricco di spore di muffe tossigene o direttamente contaminato da micotossine. Il fatto che gli Ebrei non siano stati colpiti dalla morte dei primogeniti potrebbe essere spiegato con le abitudini di questo popolo, dedito soprattutto alla pastorizia, che aveva ovviamente un regime alimentare diverso da quello tipico degli agricoltori egiziani, i quali conservavano i cereali in primitivi granai-sili alla gestione dei quali erano delegati i primogeniti.

Il problema delle micotossine non è quindi un problema nuovo e forse ha condizionato la storia e la salute dei popoli più di quanto normalmente si pensi.

Nell'autunno del 943 nella regione di Limoges, in Francia, migliaia di persone vennero colpite da una strana malattia caratterizzata da convulsioni, dolori lancinanti alle estremità e lesioni cutanee vaste, accompagnate da febbre alta e senso di bruciore insopportabile; in pochi giorni si poteva manifestare cancrena in uno o più arti e seguire la morte. Nelle situazioni meno gravi, il decorso si svolgeva in modo sub-acuto ma con formazione di piaghe e grandi sofferenze. La causa è attribuibile all'azione vasocostrittrice dell'ergotamina, il più importante principio attivo presente negli sclerozi della segale cornuta, che spesso contaminava abbondantemente i raccolti di questo cereale, base dell'alimentazione di quel periodo. Proprio a causa del senso di bruciore insopportabile, la malattia venne chiamata in Francia "mal des ardents" e "fuoco di S. Antonio"¹ o "ignis sacer" in Italia.

L'ergotismo epidemico assurse a tale importanza nel Medioevo e nei secoli successivi, da essere compreso fra le pestilenze, sospettato di essere una malattia infettiva trasmissibile e diffusiva. Peraltro l'infezione e la diffusibilità esistevano, ma non avvenivano direttamente attraverso l'uomo, bensì attraverso la contaminazione dei cereali; l'uomo, ma anche gli animali, ne subivano la conseguenza tossica per via alimentare, consumando pane di segale e prodotti derivati contaminati dal fungo.

Per soccorrere l'ingente numero dei colpiti sorse l'Ordine degli Antoniani del Delfinato. S. Antonio fu considerato il patrono protettore; da ciò la denominazione "fuoco di S. Antonio". L'Ordine degli Antoniani si diffuse ben presto in molte nazioni, dove furono fondati ospedali dedicati al santo protettore; fra le mansioni di questo Ordine vi era quella di praticare le amputazioni degli arti cancrenososi e di curare le piaghe. Le porte degli ospedali e dei chiostri dell'Ordine erano tinte di rosso, simbolo del fuoco, o recavano dipinte le fiamme. Gli arti amputati delle persone scampate alla morte venivano talora essiccati e conservati quasi come *ex voto* di chi era riuscito a seguito delle cure e dell'amputazione a sopravvivere.

Fra la fine del Medioevo e l'inizio del Rinascimento, più precisamente nel 1400, la popolazione vivente in Italia era molto ridotta (tab. 1). Vaste zone e

¹ La denominazione "fuoco di S. Antonio" è anche attribuita all'*herpes zoster*, come testualmente è richiamato in una nota di Major (1959). La denominazione colloquiale comune alle due malattie deriva senza dubbio da una similitudine della sintomatologia principale: l'intenso bruciore della zona del corpo interessata. Peraltro le differenze tra le due affezioni morbose restano sostanziali e consistono soprattutto nel fatto che l'*herpes zoster* è malattia sporadica, non epidemica per riattivazione del virus latente varicella-zoster nelle radici dorsali dei gangli nervosi, e si presenta con maggiore frequenza tra 60 e 70 anni.

POPOLAZIONE STIMATA (MILIONI)			NUMERO DI EPIDEMIE		
EPOCA	ITALIA	EUROPA NORD OCCIDENTALE	EPOCA	ITALIA	EUROPA NORD OCCIDENTALE
1400	7	26,75	1351-1430	235	625
1500	10	23,4	1431-1499	220	710

Tab. 1 *Popolazione residente e incidenza di epidemie in Italia ed Europa nord occidentale (*) dal 1351 al 1499 (McEvedy et al., 1978; Biraben, 1976, cit. da Matossian, 1989, modificata). (*) Isole britanniche, Francia, Paesi Bassi, Germania, Austria, Boemia, Svizzera*

interi villaggi erano praticamente disabitati, sul territorio vivevano circa sette milioni di persone (contro gli oltre 55 milioni di oggi). La popolazione era concentrata nei borghi e nelle poche città.

L'Europa nord occidentale non presentava certo una situazione migliore; nello stesso periodo la popolazione era stimata in 26,7 milioni di abitanti (tab. 1). Alla fine del Medioevo la popolazione complessiva dell'Europa nord occidentale e dell'Italia si attestava su un valore di poco superiore ai 33 milioni di abitanti.

Le "epidemie" erano un fatto ricorrente; fra il 1400 e il 1500 le cronache ne riportano un altissimo numero (tab. 1), accompagnate spesso da gravi carestie. Le epidemie falciavano le popolazioni delle città e dei borghi e le popolazioni rurali, togliendo forze di lavoro alla coltivazione dei campi, con effetti drammatici sulle fragilissime economie agricole e sulla disponibilità di alimenti.

L'andamento di varie epidemie, a un'analisi epidemiologica attenta, manifestava un comportamento definibile "bizzarro".

Matossian (1989), nell'intento di comprenderne le ragioni, ha analizzato il succedersi delle epidemie a partire dall'Alto Medioevo, in relazione con l'alternarsi delle situazioni climatiche, e ha tratto la convinzione di una possibile relazione più con la qualità dei cibi, fortemente condizionata dalle situazioni meteorologiche, che con la quantità. Non sempre è chiaro il rapporto causa-effetto fra carestia e il manifestarsi di una "epidemia", tanto è vero che in situazioni di abbondanza di cereali si riscontrava, a volte, una incidenza più frequente della peste, specie della peste bubbonica. Il fatto viene spiegato con la proliferazione di topi nei granai, quando i cereali venivano conservati più a lungo del solito e venivano alterati da attacchi di insetti e di muffe.

Nel Medioevo le popolazioni erano fortemente dipendenti dai cereali di produzione locale. La segale era il cereale più utilizzato per la panificazione, soprattutto a nord delle Alpi, seguita dall'orzo, dal frumento, dall'avena, dal riso e da molti altri cereali minori oggi quasi scomparsi.

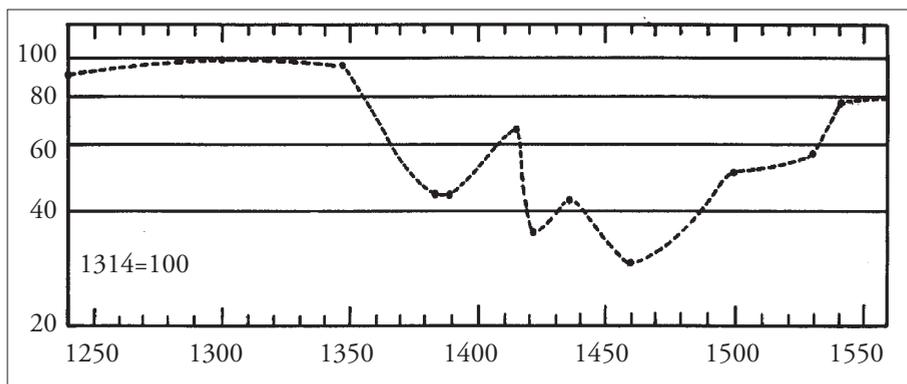


Fig. 1 *Andamento dell'indice della popolazione nella Normandia orientale fra il 1250 e il 1550 (Bois, 1984, cit. da Matossian, 1989)*

Nei due anni precedenti la comparsa della grande pandemia che colpì l'Europa fra il 1348 e il 1350, il clima era stato estremamente piovoso, freddo, umido, i raccolti scarsi e di cattiva qualità. Inoltre, a causa delle poche giornate di sole, non sempre avevano potuto essere essiccati adeguatamente. La pandemia colpì non solo l'uomo ma anche, e in modo evidente, i topi e si ebbe anche una elevata mortalità fra cavalli, bovini, pecore, capre e altri animali domestici.

Il grafico riportato in figura 1 evidenzia in modo drammatico lo stato della popolazione, fra il 1250 e il 1550, in Normandia. A partire dal 1350 si ebbe un progressivo decremento demografico che vide la popolazione ridotta a circa il 45% attorno al 1380, per scendere a poco più del 30% attorno al 1460. Occorreranno quasi 100 anni per ritornare alla situazione precedente.

Condizioni climatiche caratterizzate da elevata piovosità, alta umidità e temperature relativamente basse erano risultate estremamente favorevoli allo sviluppo di muffe responsabili della produzione di varie micotossine sui cereali, in campo e in magazzino. I paesi a clima più secco e freddo nello stesso periodo (Islanda, il nord della Norvegia e della Svezia, la Finlandia, larghe aree della Russia o dei Balcani) furono colpiti dalla pandemia in ritardo, solo quando si verificarono condizioni di elevata piovosità. Nei territori a clima secco quindi la pandemia non si diffuse e non causò elevata mortalità, nonostante i commerci e gli spostamenti degli abitanti rendessero il contagio possibile.

Matossian (1989) osserva che oltre al contagio «altri fattori aggravanti od altre malattie erano probabilmente necessari per causare un'elevata mortalità»

ANNI	PERCENTUALE DI FRUMENTO
1300-1350	30,8
1350-1400	51,5
1400-1450	66,0
1450-1500	78,8

Tab. 2 *Variazioni delle percentuali di frumento nella dieta nella zona di Lione (Lorcin, 1974, cit. da Matossian, 1989)*

e conclude che «Se queste premesse sono corrette, appare giustificato orientare l'attenzione dall'agente patogeno causale della peste al sistema immunitario di difesa degli uomini e dei topi».

Significativo è il fatto che la situazione migliorò drasticamente all'aumentare della percentuale di frumento nella dieta a scapito di altri cereali e soprattutto della segale. La quota del frumento utilizzato nell'alimentazione è passata in certe zone dal 30% circa nel periodo 1300-1350 a quasi l'80% nel periodo 1450-1500 (tab. 2).

I medici inglesi avevano evidenziato, a metà del XVII secolo, una relazione fra la dieta a base di segale e una serie di disturbi nervosi anche gravi, con manifestazioni caratterizzate da convulsioni e allucinazioni, che facevano considerare le persone colpite indemoniate. A volte gli ammalati erano sottoposti a pratiche esorcistiche. In alcune situazioni queste manifestazioni nervose portarono anche a processi con l'accusa di stregoneria.

I processi per stregoneria, fra la fine del 1550 e la prima metà del 1600, furono particolarmente concentrati nelle zone dove prevalente era il consumo di segale. La segale, in condizioni climatiche sfavorevoli, può essere facilmente attaccata da *Claviceps purpurea* i cui sclerozi contengono vari alcaloidi, alcuni dei quali a effetto allucinogeno. Sono le aree a nord delle Alpi, caratterizzate in quel periodo da clima freddo e particolarmente umido, ove questi episodi raggiunsero una particolare intensità (fig. 2). L'Irlanda, con un'alimentazione a base di latticini e orzo, fu praticamente indenne, oltre che da situazioni epidemiche, anche dai processi per stregoneria.

In Inghilterra, nello stesso periodo storico, si era verificata una situazione di bassa fertilità ad andamento variabile condizionata dal modificarsi del rapporto fra il prezzo della segale e quello del frumento. La fertilità diminuiva quando il prezzo del frumento era elevato e aumentava il consumo di segale. La segale era il cereale base per la preparazione del pane, che anche le madri allattanti consumavano. Gli alcaloidi della segale cornuta, eliminati con il latte, determinavano una elevata mortalità dei neonati.

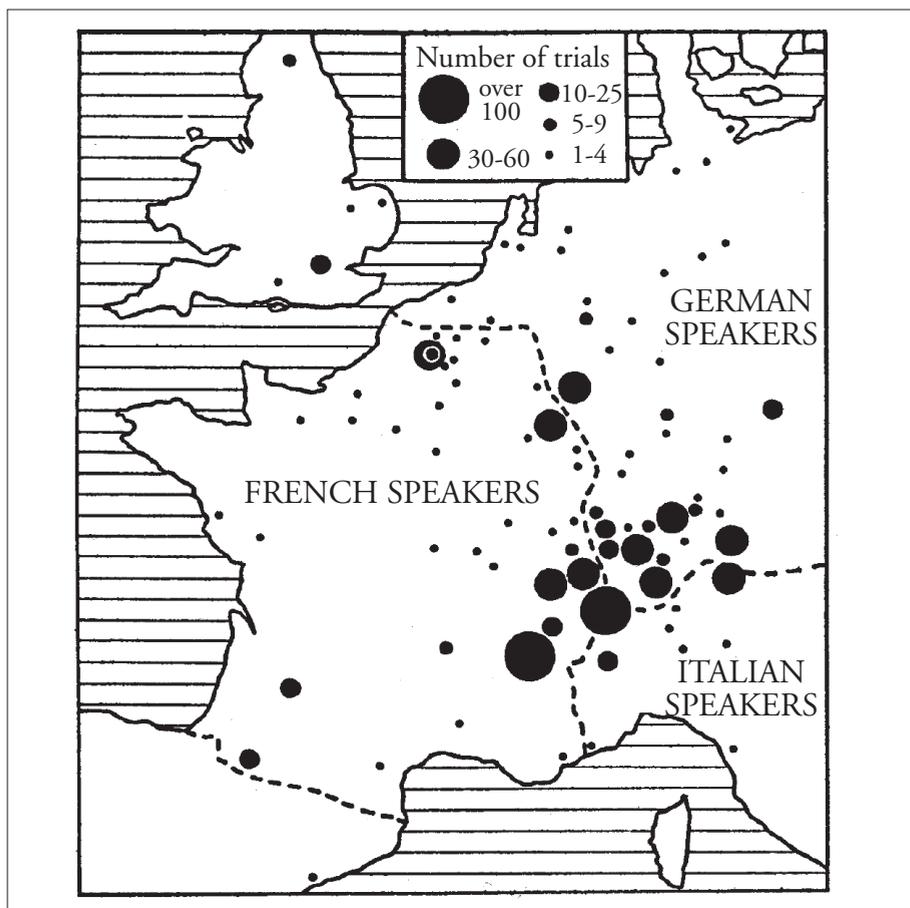


Fig. 2 Distribuzione dei processi per stregoneria nell'Europa occidentale fra il 1580 e il 1650 (Monter, 1980; Matossian, 1989)

Alcuni medici francesi avevano già preso coscienza di questa situazione tanto che, all'inizio del 1600, consigliavano alle madri allattanti di consumare pane bianco per evitare che i loro bambini avessero "spasmi".

Un famoso quadro del pittore fiammingo Pieter Bruegel il Vecchio (ca. 1525-1569), *I mendicanti*, documenta i drammatici effetti dell'ergotismo su alcune vittime in Olanda.

Anche la particolare situazione di panico che percorse la Francia nel 1789 e che si associò a manifestazioni di particolare ferocia in occasione della Rivoluzione Francese, sembra possa essere associabile al consumo di segale di cattiva qualità per le avverse condizioni climatiche di quel periodo.

La popolazione italiana, come molte popolazioni in Europa, ha sofferto, nei secoli scorsi, di ergotismo, nelle aree ove maggiore era la diffusione della segale. I Greci e i Romani, oltre venti secoli fa, non usavano questo cereale per l'alimentazione, anche se sintomi di ergotismo sembrano citati da Lucrezio (98-55 a.C.), come "ignis sacer" (van Dongen e de Groot, 1995).

La cattiva qualità dei cereali, probabilmente alterati anche a causa delle muffe, nella Firenze del 1700 era considerata la causa patologica che colpiva tutti i ceti sociali. L'Accademia dei Georgofili, una delle più antiche Accademie, fondata a Firenze il 4 giugno 1754, si era data come uno dei primi compiti quello di diffondere la coltivazione e l'uso della patata, per sostituire e integrare i cereali nella fabbricazione del pane, proprio per ridurre quei problemi (Bigliuzzi e Bigliuzzi, 2001).

Forse la manifestazione di tipo epidemico più rilevante e relativamente recente, nella quale, alla luce delle attuali conoscenze, possiamo vedere un coinvolgimento delle micotossine, è rappresentata dalla pellagra.

La pellagra, malattia tossico-carenziale, attribuita alla scarsa disponibilità di vitamina PP del mais, nel 1800 ha colpito migliaia di persone nel Nord Italia, con sintomatologia caratterizzata da dermatite, diarrea e demenza. La malattia era diffusa, soprattutto nelle aree rurali del Nord Italia, ad alimentazione quasi esclusivamente basata sulla polenta, ma coinvolgeva anche zone non tipicamente maidicole, come la Toscana. L'incidenza dei disturbi nervosi era così rilevante da determinare la necessità della realizzazione di una vera e propria rete di ospedali psichiatrici diffusi anche nei piccoli centri.

Alcuni medici, di quel tempo, per la prevenzione della pellagra, ponevano una particolare attenzione alla qualità del mais che risultava spesso ammuffito. In particolare Cesare Lombroso (illustre professore della Regia Università di Torino), nella seconda metà del 1800, riconduceva la pellagra a una sostanza tossica denominata *pellagrozeina* che si sarebbe formata nel mais ammuffito o alterato. Non tutti condividevano questa ipotesi. Nel 1883, il Ministero dell'Agricoltura italiano pubblica un Disegno di Legge, «finalizzato a ridurre le cause della pellagra, che vieta la vendita, distribuzione e macinazione del granturco (*Zea mais*) quando venga riconosciuto immaturo, guasto o avariato» («Bollettino del Manicomio provinciale di Ferrara», 1883).

Alcuni dei miceti che si trovano di norma sul mais, ma anche in altri cereali, possono produrre micotossine responsabili di disturbi nervosi (es.: fumonisine, ac. ciclopiazonico, ergoline, ecc.). La loro presenza, nella granello di cattiva qualità, può aver certamente contribuito ad aggravare la sintomatologia nervosa, da carenza di vitamina PP.

La situazione era particolarmente grave in Russia alla fine dell'Ottocento. Nel 1897 la mortalità infantile era di 260 su 1000 nati contro i 156/1000 in Italia e Inghilterra. La situazione migliorò leggermente solo negli anni precedenti la prima guerra mondiale, per la diffusione del consumo della patata in sostituzione dei cereali. Nello stesso tempo si ebbe anche una diminuzione della mortalità da ergotismo, che era associato all'aleuchia tossico-alimentare (ATA). Il governo russo era ben al corrente delle cause alimentari che erano all'origine di questi fatti; ma la prevenzione veniva realizzata solo per i militari, ai quali venivano destinati i cereali di migliore qualità. Nel 1943 il Ministero della Salute dell'Unione Sovietica ha descritto l'ATA indotta da fusariotossina T-2. Tutti i cereali risultarono substrati più o meno contaminati o contaminabili, ma non la patata.

Probabilmente l'ultimo grave episodio, legato a neuro-intossicazione da cereali contaminati, si è avuto nel 1951 a Pont-Saint-Esperit (Francia meridionale) e coinvolse 300 persone (Samorini, 1992) che una notte tutte contemporaneamente colte da scatti di violenza isterica, da allucinazioni, da convulsioni, in preda a stato confusionale o di disperazione, si erano riversate urlanti per le strade. Tutti avevano consumato pane venduto dallo stesso fornaio. La prima ipotesi dell'effetto della presenza di sclerozi di segale cornuta non convinse completamente e dopo 30 anni fu chiamata in causa una possibile contaminazione da *Aspergillus fumigatum* Fr. (Bouchet, 1980).

Pertanto le micotossine, anche se identificate e studiate solo recentemente, hanno causato problemi all'uomo e agli animali sin dall'antichità.

2. IL PRESENTE

2.1 *Le variazioni climatiche oggi*

Il profondo mutamento delle condizioni di vita e il progresso scientifico e tecnologico degli ultimi decenni sono sicuramente in grado di scongiurare le pesanti catastrofi accadute in passato. L'alimentazione, infatti, non si basa più su un'unica coltura, molte fitopatie sono state studiate a fondo e vengono tenute sotto controllo dall'utilizzo di cultivar resistenti, la meteorologia e la climatologia permettono all'uomo di prevedere con un certo anticipo quali condizioni si verificheranno e rappresentano un'informazione importante per le attività decisionali a breve e lungo termine.

Oggi giorno quindi non si pone più il problema delle grandi carestie dovute all'azione diretta dei microrganismi patogeni, che il clima può rendere

più o meno aggressivi, ma l'interesse si è spostato sul loro effetto indiretto, ossia non direttamente sulla pianta ma sui prodotti che da essa derivano. I funghi tossigeni, ad esempio, non rappresentano solo un problema di difesa della coltura ma soprattutto di contaminazione degli alimenti, sia destinati all'uomo che all'alimentazione animale.

La situazione è diventata più complessa a causa dei cambiamenti climatici in corso, che stanno modificando le risposte del sistema pianta-patogeno. Di conseguenza, adattamenti delle tecniche colturali e di difesa si renderanno necessari per gestire i nuovi equilibri.

I cambiamenti si originano da un aumento della quantità di energia disponibile sulla superficie del pianeta a causa delle modificate caratteristiche dell'atmosfera per l'aumento dei gas «a effetto serra», che altera i meccanismi che nel loro insieme prendono il nome di circolazione generale dell'atmosfera e degli oceani, alla base di tutti i fenomeni meteorologici e della loro distribuzione sulla superficie terrestre (Maracchi et al., 2000). A questo si aggiungono anche modifiche della stratosfera nella fascia intorno ai 20 km, dove si assiste a una progressiva diminuzione della fascia di ozono dovuta ai clorofluorocarburi, che contribuisce a una modifica del bilancio radiativo terrestre (Antonelli et al., 1996). Tali alterazioni si traducono in un cambiamento del clima, così come si era stabilizzato negli ultimi millenni, in tempi molto rapidi.

In sintesi ci troviamo di fronte a due fenomeni principali: il primo è l'aumento della quantità di energia, messo in evidenza dal progressivo innalzamento della temperatura media terrestre; il secondo è l'alterazione dei meccanismi a grande scala che regolano la circolazione generale dell'atmosfera (Cronin, 1999).

Nell'area del Mediterraneo, dove i fenomeni del tempo sono determinati dallo scontro delle masse d'aria fredda e umida provenienti dal Canada e dalla Groenlandia e di quelle fredde e asciutte provenienti dal nord della Russia con le masse d'aria calde d'origine africana, e sono modulati a scala locale dai rilievi e dalla temperatura del mare Mediterraneo, è possibile identificare il nuovo trend climatico in atto che può essere sintetizzato nei seguenti aspetti.

- Aumento della frequenza delle precipitazioni intense.

Tali precipitazioni hanno una duplice conseguenza: il verificarsi delle cosiddette *flash floods* o alluvioni improvvise, con effetti spesso catastrofici, e la concentrazione delle piogge in pochi eventi, con conseguente ruscellamento e diminuzione delle acque che vengono accumulate nelle falde.

- Diminuzione delle precipitazioni nei mesi invernali.

Anche in questo caso il quadro climatico è fortemente mutato in quanto

le ridotte precipitazioni che hanno luogo in questi mesi si concentrano in pochissimi giorni con conseguenze evidenti sui fenomeni di siccità invernale e sul rifornimento di falda.

- Aumento del valore delle temperature nel periodo autunno-primaverile.
In questi mesi è stato osservato un livello della temperatura crescente. Ciò può avere ripercussioni molto significative su numerosi processi biologici, quali lo sviluppo di insetti, le cui popolazioni non sono più distrutte dalle basse temperature invernali.
- Aumento della nuvolosità primaverile-estiva.
Ciò si spiega con l'aumento del vapor d'acqua di origine locale dovuto al riscaldamento del mare che, in mancanza di estesi sistemi frontali in periodi di permanente alta pressione, non riesce a innescare fenomeni piovosi.
- Aumento delle temperature estive.

Dal punto di vista termico si assiste a un aumento nel numero di giorni durante l'estate con temperature eccezionalmente elevate; ciò configura il fenomeno noto in climatologia come *heat wave*, onda di calore, che negli ultimi anni anche negli Stati Uniti ha determinato un aumento dei decessi di persone sofferenti per età o per patologie cardiocircolatorie. Tali valori elevati di temperatura, causati da masse di aria calda di origine tropicale, si alternano con temperature notevolmente inferiori alle medie stagionali, causate da masse di aria provenienti da nord-ovest o nord-est. Sono tali brusche oscillazioni che vengono registrate dalla memoria collettiva che non riconosce più i tradizionali comportamenti del clima mediterraneo, nel passato caratterizzato da una variabilità intergiornaliera relativamente contenuta (Maracchi e Orlandini, 2000).

2.2 *I funghi micotossigeni e le loro esigenze ecologiche*

Le micotossine sono sostanze naturali, sintetizzate da alcuni funghi, in grado di causare effetti tossici, acuti o cronici, sugli animali e sull'uomo, per ingestione, ma anche per contatto o per inalazione. Si tratta di molecole non necessarie per la crescita del fungo, che in genere non svolgono un ruolo specifico noto nel processo infettivo, quindi sono considerate metaboliti secondari. Le condizioni ottimali per la crescita del fungo, in genere non sono quelle che massimizzano la produzione di tossine, anzi, il fungo tende a esprimere la sua massima potenzialità tossigena in condizioni lontane da quelle ottimali, quindi in stress.

GENERE	SPECIES	TOSSINE
Aspergillus	A. flavus	Aflatossina B ₁ , B ₂
	A. parasiticus	Aflatossina B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂
	A. ochraceus	Ocratossina
	A. section Nigri	Ocratossina
Penicillium	P. verrucosum	Ocratossina
	P. expansum	Patulina
Fusarium	F. culmorum	Tricoteceni, Zearalenoni
	F. graminearum	
	F. verticillioides	Fumonisin B ₁ , B ₂ , B ₃
	F. proliferatum	Fumonisin B ₁
Claviceps	C. purpurea	Alcaloidi (ergoline, ergotamine)

Tab. 3 *Principali funghi tossigeni e tossine prodotte*

I principali generi a cui appartengono i funghi micotossigeni sono: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. A ciascuno di questi appartengono alcune specie micotossigene (tab. 3).

La presenza di micotossine negli alimenti di origine vegetale ha origine in campo; aflatossine, fumonisine, tricoteceni e zearalenoni si riscontrano nei cereali alla raccolta, anche se il loro contenuto può aumentare durante la conservazione post-raccolta dei prodotti; solo le ocratossine sono principalmente un problema di raccolta/post-raccolta. Nell'uva l'unica tossina al momento segnalata è l'ocratossina e la sintesi avviene in campo, essenzialmente durante la fase di maturazione dell'uva. Il clima svolge un ruolo fondamentale nel determinare la presenza delle micotossine in quanto influisce sullo sviluppo e sull'attività metabolica dei funghi produttori e in particolare, temperatura pioggia e umidità dell'aria svolgono un ruolo primario. Le condizioni meteorologiche, però, non agiscono solo in modo diretto sul ciclo biologico dei funghi, ma possono anche agire indirettamente mettendo la coltura in condizioni di stress. Le piante indebolite, o comunque in condizioni non ottimali, sono più suscettibili agli attacchi dei patogeni. Infine, condizioni di stress possono verificarsi anche per i funghi stessi che vengono così indotti alla produzione di metaboliti secondari tossici.

Le micotossine possono essere presenti in diverse matrici (tab. 4), soprattutto di origine vegetale, ma alcune tossine, in particolare aflatossine e ocratossine, sono state segnalate in misura apprezzabile anche in prodotti di origine animale, quali latte, formaggio, uova e carne di maiale, soprattutto se sottoposta a processi di stagionatura.

TOSSINE	PRODOTTI CONTAMINATI
Aflatossine (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂)	Arachidi, mais, frumento, riso, semi di cotone, noci, fichi Latte, formaggio, uova
Ocratossina (A)	Cereali, arachidi, caffè, cacao, uva passita, uva, frutta secca, vino, spezie Formaggio, carne di maiale conservata
Tricoteceni	Frumento, mais, orzo, avena
Zearalenoni	Frumento, mais, orzo, avena, fieno
Fumonisine B ₁ , B ₂ , B ₃	Mais
Patulina	Mele, succhi di mele

Tab. 4 *Principali micotossine e prodotti di origine vegetale e animale (in grassetto) in cui possono essere contenute*

Diversi sono i fattori che influenzano la presenza di tossine nella catena alimentare, e quindi il rischio di ingestione da parte dell'uomo.

Durante la fase di coltivazione dei prodotti vegetali, sono rilevanti innanzitutto i fattori biologici, ovvero la presenza del patogeno e la suscettibilità dell'ospite; poi l'ambiente, inteso sia come condizioni meteorologiche, sia come altri fattori biotici, che possono interferire con il sistema ospite-patogeno. La presenza di altri funghi o insetti, soprattutto se in grado di causare ferite sui vegetali, quali oidio sugli acini dell'uva o piralide sulle spighe di mais, sono fattori predisponenti. Al momento della raccolta sono rilevanti l'epoca, il livello di maturazione, in relazione anche al livello di umidità, e le modalità, soprattutto per il potenziale danno meccanico che queste possono arrecare al prodotto. Per i prodotti che si conservano a bassa umidità, è importante il livello di umidità e la modalità con cui viene ottenuto. Infine, durante lo stoccaggio, è fondamentale il mantenimento delle condizioni del prodotto.

Le conoscenze riguardo alle cause di presenza di micotossine nei prodotti di origine animale sono buone per il latte, mentre necessitano di approfondimenti per le carni; è importante sottolineare che anche i prodotti di origine animale entrano nella catena alimentare come possibili fonti di micotossine. Inoltre, le micotossine sono molecole abbastanza stabili e i normali processi di conservazione e preparazione dei cibi non esercitano un adeguato effetto di sanificazione. Ne deriva che tutta la filiera alimentare ne può essere contaminata (CAST, 2003).

Anche per quanto riguarda lo stoccaggio nei magazzini l'effetto delle condizioni ambientali determina la possibilità di contaminazione dei prodotti. In questa fase, infatti, l'elevata temperatura e soprattutto alti livelli di umidità sia dell'aria che del substrato, possono favorire la crescita delle muffe.

Diversi sono gli studi condotti riguardo alle problematiche connesse con le micotossine, ma le informazioni disponibili non sono ancora sufficienti (Magan e Olsen, 2004; Sinha e Bhatnagar, 1998). Infatti, un approccio serio al problema micotossine non può prescindere dallo studio dei funghi, dei loro cardinali di sviluppo, della biologia ed epidemiologia e del rapporto con l'ospite in tutte le fasi della filiera produttiva. Naturalmente ogni sistema ospite-patogeno è un caso a sé, ogni fungo predilige determinate condizioni di temperatura e umidità che lo differenziano dagli altri; inoltre, le colture hanno una struttura e una fisiologia, come pure un periodo di coltivazione, che le rendono uniche. A titolo di esempio può essere interessante considerare il mais, dato che è il prodotto di origine vegetale che desta maggiori preoccupazioni in tutto il mondo in relazione alla presenza di micotossine.

Il mais è ospite idoneo per l'infezione da parte di 3 importanti funghi micotossigeni: *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides* (accompagnato in misura limitata da *F. proliferatum*), e *Aspergillus flavus*. Si tratta di funghi responsabili della presenza delle tossine più diffuse nel mondo, rispettivamente deossinivalenolo (DON) e zearalenone (ZEA), fumonisine (FB) e aflatossine (AF). In realtà, la rilevanza pratica delle varie micotossine è molto diversa in tutti i paesi e anche nella realtà italiana (tab. 5). Infatti, mentre la fumonisina rappresenta un problema quasi tutti gli anni in Italia, deossinivalenolo e zearalenone lo rappresentano raramente, come pure le aflatossine. Inoltre, i livelli elevati segnalati per la fumonisina interessano in genere la maggior parte dei campioni, mentre per l'aflatossina il numero di campioni oltre i limiti di legge è solitamente limitato. Le ragioni di queste differenze vanno ricercate principalmente nelle caratteristiche dei funghi, in particolare nelle loro esigenze termiche e di umidità. Passando da *F. graminearum* a *F. verticillioides* e *A. flavus*, le esigenze termiche aumentano, mentre quelle in umidità diminuiscono. Quindi la presenza di questi funghi è in stretta relazione con l'andamento meteorologico.

	1995	1996	1997	1998	1999	2002	2003
ZEA (PPM)	0.07	0.45	0.03	0.003	0.02	0.174	--
DON (PPM)	0.19	2.72	0.80	0.30	0.29	0.54	--
FB ₁ (PPM)	3.35	1.32	3.10	2.66	5.17	4.80	5.19
AFB ₁ (PPB)	1.9	0.3	1.5	1.5	4.1	--	4.4
Nota: i valori in grassetto rappresentano valori superiori al limite di legge per la granella a uso umano, in vigore per AFB ₁ e proposto per le altre tossine							

Tab. 5 *Contenuto medio di micotossine in campioni di mais raccolti in Nord Italia (da Pietri et al., 2004 e Battilani et al., 2005, modificati)*

2.3 *Aspetti normativi ed economici delle micotossine*

Tutti i continenti sono interessati dai problemi causati dalle micotossine. Infatti, vi sono differenze in termini di scala di importanza, ma aflatoxine, fumonisine, ocratossine, tricoteceni e zearalenoni preoccupano tutti i paesi, in particolare quelli emergenti.

Le micotossine sono dei killer silenziosi che colpiscono ovunque. Ci limitiamo a segnalare quello che riteniamo sia l'ultimo episodio grave. Da aprile a settembre del 2004 e nell'aprile 2005 nelle aree centro-occidentali del Kenia è stata segnalata una diffusa contaminazione da aflatoxine nel mais che, nell'area occidentale del paese, ha portato a 123 morti. Le analisi epidemiologiche hanno evidenziato una relazione fra problematiche emerse e modalità locali di raccolta, conservazione e utilizzo del mais. Il 55% dei campioni controllati ha dimostrato una contaminazione superiore a 20 ppb e il 7% superiore a 1000 ppb (Nayamongo e Okioma, 2005).

Anche l'Italia ha dovuto affrontare il problema delle micotossine, come risulta dallo schema riportato, che riassume gli episodi che abbiamo avuto occasione di rilevare direttamente.

Casi da noi rilevati negli animali allevati in Italia dagli anni '60:

- fine anni '60: mortalità di tacchini da arachide di importazione con AFB₁;
- anni '70: iperstrogenismo e rifiuto del cibo in suini da mais con ZEA e DON (Piana e Piva, 1975);
- anni '70: necrosi della coda in vitelloni da insilato di mais con tossina T-2 (Piana e Piva, 1975);
- anni '90: LEM in cavalli per mangime a base di mais con fumonisine;
- anni '90: episodi vari in suini e polli per alimenti con tricoteceni, DON, ocratossina A;
- 2003: latte e latticini contenenti AFM₁ da mais con AFB₁.
- 2004-2005: vacche da latte con manifestazioni patologiche concomitanti alla ingestione di foraggi con presenza di *A. versicolor*, micete produttore di acido ciclopiazonico (CPA).

Le micotossine sono un problema che viene da lontano, ma del quale, solo di recente, si è presa coscienza.

Non possiamo trascurare una situazione di microcontaminazione evidenziata recentemente nel latte umano. Giustificata quindi una certa presenza (22/112) di ocratossina nel latte materno in Italia, evidenziata da Micco et al. (1995), e confermata su più larga scala in una indagine effettuata in una zona del Nord Italia su latte proveniente da 231 madri donatrici, in buono stato di salute, per le quali si evidenzia una positività relativamente elevata (tab. 6).

MICOTOSSINE	POSITIVI	PERCENTUALE
AFLATOSSINE	Positivi 1/231	0,43 %
AFB1	11,4	
AFM1	194,0	
OCRATOSSINE	Positivi 194/231	83,7%
OTA	<0,5-5	72,3%
OTA	6-10	16,0%
OTA	11-57	11,7%

Tab. 6 *Micotossine in latte umano rilevate nell'ambito di un'indagine svolta nella Regione Lombardia nel 2001 (Turconi et al., 2004). Nota: i dati sono espressi in ng/L*

L'approccio scientifico inizia negli anni '60, a seguito della sindrome che colpì un elevato numero di tacchini in Inghilterra (Blount, 1961). A prescindere dalle notazioni storiche – che associano la probabile presenza di micotossine a situazioni patologiche gravi che hanno colpito intere popolazioni; hanno influito sul numero di abitanti di intere zone, sulla diffusione di epidemie di vario tipo, probabilmente sul comportamento individuale e collettivo – possiamo chiederci perché le micotossine siano un problema.

Ormai è accertato che le micotossine agiscono sull'organismo animale per ingestione, inalazione o per semplice contatto, esplicando una serie di effetti:

- Citotossico, teratogeno, cancerogeno, danni al DNA
- Epato-, nefro-, enterotossico
- Dermatossico, emorragico
- Estrogenosimile
- Neurotossico, ecc.
- Immunosoppressore.

Solo in alcuni casi sono chiari i rapporti di causa-effetto fra la presenza di una micotossina e una manifestazione patologica.

Probabilmente è l'effetto immunosoppressore il più subdolo, in quanto predispose a una serie di malattie di altra origine, con conseguenze epidemiologiche difficilmente valutabili.

L'organismo animale non sembra disporre di molti meccanismi di difesa nei riguardi di queste molecole; in vari casi sono attivi processi di trasformazione, che hanno come obiettivo quello di favorire l'eliminazione delle molecole stesse, magari aumentandone la solubilità in acqua. La suscettibilità nei

riguardi delle varie micotossine è molto differenziata in funzione della specie e del momento fisiologico. Per i ruminanti la presenza del rumine rappresenta una barriera rilevante per alcune micotossine. L'adattamento alle micotossine è in genere poco noto, anche se è stato possibile selezionare ceppi di polli resistenti all'aflatossina B₁.

2.4 *Definizione degli aspetti normativi e commercio internazionale*

L'importanza di fissare limiti massimi per le micotossine in alimenti e mangimi è una esigenza ormai riconosciuta dalla maggior parte dei paesi industrializzati. Purtroppo molti paesi in via di sviluppo non hanno ancora emanato questo tipo di regolamentazione, come indicato in figura 1. Secondo quanto recentemente emerso da uno studio condotto dalla FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004) i paesi nei quali attualmente è in vigore una regolamentazione sulle micotossine sono 99, che rappresentano l'87% della popolazione mondiale. Tutti i paesi hanno limiti per l'aflatossina B₁ o per la somma delle aflatossine. Altre micotossine soggette a regolamentazione in un numero variabile di paesi sono l'aflatossina M₁, il deossinivalenolo, il diacetossiscirpenolo, la tossina T-2 e HT-2, le fumonisine, l'acido agarico, gli alcaloidi dell'ergot, l'ocratossina, la patulina, la fomopsina, la sterigmatocistina e lo zearalenone. I livelli massimi adottati variano molto da paese a paese, anche se negli ultimi anni si è registrato un tentativo di armonizzazione in alcuni blocchi di paesi quali Australia/Nuova Zelanda, i paesi dell'Unione Europea e quelli del MERCOSUR (Argentina, Brasile, Paraguay e Uruguay). Limiti troppo bassi nei paesi importatori possono portare a forti restrizioni causando notevoli difficoltà nei paesi esportatori. Per i paesi in via di sviluppo, che spesso sono fra i più soggetti alla contaminazione da micotossine, queste difficoltà rappresentano un problema sia economico che sanitario. Infatti l'adozione di limiti particolarmente restrittivi nei paesi importatori può indurre il paese esportatore a lasciare per il consumo interno il prodotto di qualità inferiore che non ha i requisiti per l'esportazione.

L'adozione di normative specifiche per le micotossine nei vari paesi comporta un rilevante impatto economico sul mercato internazionale. La World Bank ha valutato l'impatto economico dovuto all'adozione di limiti massimi per le micotossine secondo vari scenari. In particolare la valutazione era relativa alla ricaduta che vari limiti potenzialmente fissati in 15 paesi importatori potrebbero causare sulle esportazioni provenienti da 32 paesi. È risultato che se il limite per l'aflatossina B₁ fosse armonizzato a 9 µg/kg fra tutti i paesi

considerati si avrebbe un incremento nel commercio di cereali e frutta secca del 51% (pari a \$ 6,1 miliardi) rispetto al flusso commerciale che si avrebbe con le attuali discrepanze di limiti che in alcuni paesi presentano livelli molto inferiori a 9 µg/kg.

2.5 La normativa sulle micotossine in Europa e in Italia

A partire dal 1976, anno in cui sono stati definiti limiti massimi per le aflatossine nei mangimi, sono stati emanati, sia a livello nazionale che comunitario, provvedimenti legislativi relativi a livelli massimi ammissibili per le più importanti micotossine in molte matrici alimentari. A partire dal 1998 l'UE ha iniziato il processo sistematico di definizione di limiti massimi tollerabili per le micotossine in alimenti e mangimi, e tuttora il pacchetto normativo, anche se notevolmente sviluppato, non risulta completo. A livello italiano la Circolare 10 del 9 giugno 1999 aveva fissato un numero considerevole di limiti per le più importanti micotossine nelle principali matrici alimentari a rischio, con valori più restrittivi per gli alimenti per l'infanzia. Molti dei valori contenuti nella Circolare citata sono stati successivamente adottati anche dall'UE. Attualmente in Italia sono in vigore, oltre ai limiti adottati dall'UE, che verranno successivamente descritti, limiti per le aflatossine nelle piante infusionali, per lo zearalenone nei cereali e negli alimenti per l'infanzia, per l'ocratossina nel caffè crudo, nel cacao, nei prodotti carnei e nella birra.

La normativa comunitaria attualmente in vigore prevede limiti nei cereali per le aflatossine, per l'ocratossina A e per le fumonisine, nella frutta secca e nelle spezie per le aflatossine, nei prodotti derivati dalla vite per l'ocratossina A, negli alimenti per l'infanzia per l'aflatossina B₁ (AFB₁), l'aflatossina M₁ (AFM₁) e l'ocratossina A. Per quanto riguarda il caffè è stato stabilito a livello europeo il limite massimo tollerabile per l'ocratossina esclusivamente per il caffè torrefatto e solubile, e solo nei prossimi anni la stessa tossina dovrebbe essere regolamentata anche nel caffè crudo. Analogamente nel prossimo futuro saranno stabiliti limiti massimi per questa tossina per la birra, il cacao e le spezie. Anche i succhi di frutta, con particolare riferimento ai prodotti a base di mela, sono regolamentati a livello comunitario per la patulina. Nei prodotti per l'infanzia sono previsti valori per questa tossina cinque volte inferiori a quelli stabiliti per i prodotti destinati alla popolazione adulta.

L'aflatossina M₁ nei prodotti lattiero-caseari è stata regolamentata a li-

vello europeo con il Reg. 466/2001. Tuttavia secondo questa normativa l'unico prodotto che può essere effettivamente sottoposto a controllo è il latte, per il quale l'aflatossina M_1 non può superare il valore di $0,05 \mu\text{g}/\text{kg}$. Per i prodotti lattiero-caseari viene solo indicato che devono essere ottenuti da latte con valori di AFM_1 nei limiti sopraindicati. Non è stato possibile fissare limiti specifici per i vari prodotti derivati dal latte a causa della mancanza di informazioni sui fattori di conversione latte-prodotto derivato. In Italia, a causa dell'*outbreak* di contaminazione da AFB_1 nel mais verificatosi nel 2003 e della conseguente presenza di AFM_1 nel latte, è stato necessario definire quale fosse il valore della tossina nei formaggi a pasta dura e a lunga stagionatura (tipo grana) ottenuti a partire da latte contaminato a $0,05 \mu\text{g}/\text{Kg}$. Sulla base del fattore di conversione trovato sperimentalmente è stato possibile stabilire un limite massimo temporaneo di $0,45 \mu\text{g}/\text{kg}$ per questa categoria di formaggi.

Il settore mangimistico è regolamentato a livello comunitario già dal 1976 per l' AFB_1 nelle varie categorie di mangimi ed è in fase di studio a livello comunitario la normativa relativa ai limiti massimi ammissibili per lo zearalenone e il deossinivalenolo (DON).

2.6 *Importanza economica delle micotossine*

La presenza di micotossine in alimenti e mangimi comporta sia a livello internazionale che nazionale, perdite/squilibri economici, riferibili principalmente al deterioramento di derrate alimentari e di mangimi e all'aumento di prezzo delle derrate con bassi livelli di contaminazione. Costi aggiuntivi, riferibili alla contaminazione da micotossine, sono principalmente imputabili ai costi per la ricerca, per l'applicazione della normativa, per la prevenzione, per le dispute legali, per le analisi e per il controllo della produzione. A queste voci vanno aggiunti i costi sanitari, riferibili ai danni sulla salute dell'uomo, e le perdite economiche derivanti dall'impatto delle micotossine sugli animali da allevamento.

A causa della complessità di questo scenario è attualmente molto difficile effettuare stime economiche affidabili. Studi in tal senso sono stati iniziati solo negli Stati Uniti, limitatamente alle perdite economiche e ai costi derivanti dalla contaminazione da aflatossine, fumonisine e DON. Inoltre le voci di perdite economiche e costi considerate sono state solamente quelle riferibili alle perdite di derrate alimentari, a quelle derivanti dagli animali da allevamento e ai costi per prevenire la contaminazione.



Fig. 3 Stato della regolamentazione per le micotossine a livello internazionale (FAO, 2004)

L'impatto economico annuo derivante dalla perdita di derrate alimentari è stato valutato mediamente in \$ 932 milioni, quello attribuibile agli animali da allevamento in \$ 6 milioni, i costi per gestire la prevenzione in \$ 466 milioni.

3. IL FUTURO

3.1 Scenari futuri in relazione a possibili mutamenti climatici

Per comprendere quali siano le possibili conseguenze dei cambiamenti climatici sull'agricoltura vengono oggi utilizzati gli scenari futuri, ossia delle proiezioni future su quale sarà l'andamento delle principali variabili meteorologiche (soprattutto temperatura e precipitazioni).

Gli scenari si basano sullo studio delle serie storiche e sulla ricostruzione del clima, prevedendone il trend futuro in base a condizioni quali deforestazione, incremento demografico, uso di combustibili fossili, ecc. Sulla base degli scenari possono quindi essere sviluppate le possibili strategie di adattamento allo scopo di ottenere la massima efficacia dalle tecniche colturali, dal miglioramento genetico e dalle scelte agronomiche operate.

Poiché il clima influisce non solo sulle colture ma anche sui loro organismi patogeni, l'analisi degli scenari mediante specifici indici e modelli di simu-

lazione potrà fornire delle importanti indicazioni su come i funghi tossigeni potranno adattarsi ai cambiamenti climatici previsti per le prossime decadi e su quali siano le strategie più adatte al loro controllo in modo da ridurre il rischio di contaminazione da micotossine.

In base al modello di sviluppo che verrà perseguito nei prossimi 100 anni, e quindi in base al conseguente ritmo di emissione dei gas serra, sono stati ipotizzati dall'IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) degli scenari climatici futuri (fig. 4). Lo scenario più pessimistico prevede che le emissioni continuino al ritmo di crescita attuale; lo scenario realistico ipotizza che le emissioni vengano ridotte con provvedimenti su scala internazionale; infine, nello scenario ottimistico il ritmo delle emissioni viene stabilizzato sui livelli attuali con drastici interventi (fig. 5). In generale, i principali effetti dei cambiamenti climatici ipotizzati per la fine di questo secolo riguardano l'aumento delle temperature e l'innalzamento del livello dei mari (tab. 7).

In base agli scenari futuri il clima del bacino del Mediterraneo dovrebbe

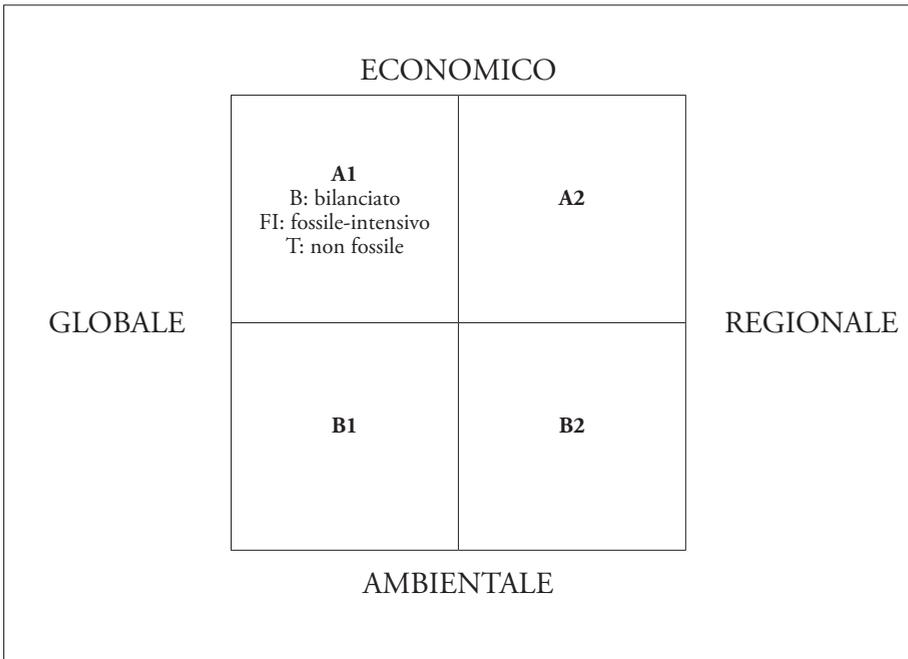


Fig. 4 Scenari futuri previsti dall'IPCC a seconda del modello di sviluppo prevalente

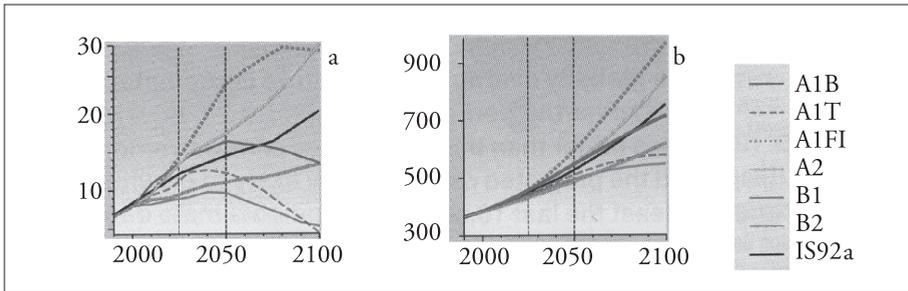


Fig. 5 Emissioni (Gt C) (a) e concentrazione (ppm) (b) di CO_2 secondo i diversi scenari futuri (IPCC, 2001)

modificarsi, nel corso dei prossimi 100 anni, nel seguente modo:

- la temperatura potrebbe aumentare mediamente da un minimo di 1 °C fino a un massimo di 5,8 °C (Kattemberg et al., 1996); non sono state riscontrate marcate differenze a livello stagionale;
- le precipitazioni dovrebbero diminuire tra 1,5% e il 7,3% (Rosenzweig e Tubiello, 1997), con variazioni stagionali molto marcate: in inverno ci sarà un aumento del 10% delle piogge, mentre in estate si avrà una riduzione del 5-15% (Kattemberg et al., 1996, Palutikof et al., 1992);
- la disponibilità idrica sarà circa quella attuale per il periodo invernale, mentre in estate potrebbe subire una riduzione del 5-15% (IPCC, 1992) a causa delle maggiori temperature (più evapotraspirazione) e della riduzione delle precipitazioni;
- è previsto un aumento nella frequenza di condizioni climatiche estreme, come temperature molto alte, intensità delle precipitazioni (dal 10-30% in più, Kattemberg et al., 1996), siccità (estate) e inondazioni (inverno).

	2025	2050	2100
CONCENTRAZIONE DI CO_2	405-460 ppm	445-640 ppm	540-970 ppm
CAMBIAMENTO DELLA TEMPERATURA MEDIA GLOBALE DAL 1990	0,4-1,1 °C	0,8-2,6 °C	1,4-5,8 °C
INNALZAMENTO DEL LIVELLO MEDIO GLOBALE DEI MARI DAL 1990	3-14 cm	5-32 cm	9-88 cm

Tab. 7 Principali mutamenti previsti per i prossimi 100 anni (IPCC, 2001)

3.2 *Previsioni annuali e sistemi di supporto alle decisioni*

I modelli sono alla base delle previsioni dello sviluppo dei funghi anche a breve e medio termine, ad esempio nell'annata agraria, e rappresentano uno strumento appropriato vista la complessità del problema. Lo sviluppo di modelli previsionali richiede l'acquisizione di informazioni dettagliate riguardo ai funghi patogeni, alle loro esigenze ecologiche e allo sviluppo epidemico (Battilani et al., 2004). Queste informazioni sono disponibili solo in parte, o raccolte in ambienti diversi da quello italiano, soprattutto per i funghi emergenti quali *A. flavus* su mais.

L'approccio più razionale per la raccolta dei dati necessari allo sviluppo di modelli previsionali, come pure alla razionalizzazione della filiera produttiva, consiste nell'organizzazione di progetti interdisciplinari che, unendo diverse competenze, ottimizzano il risultato.

Un esempio è rappresentato dal progetto nazionale AFLARID (Ricerca per la riduzione della contaminazione da aflatossina nel latte e derivati), finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali nel 2004, finalizzato ad approfondire i problemi relativi alla presenza di aflatossina nel mais e al suo passaggio nella filiera lattiero-casearia. Uno degli obiettivi del progetto è appunto quello di raccogliere informazioni utili per l'elaborazione di un modello previsionale per lo sviluppo di *A. flavus* su mais e la conseguente presenza di aflatossina.

4. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Dato che con la presenza delle micotossine negli alimenti saremo costretti a convivere, in quanto gli interventi di carattere agronomico in senso lato ben difficilmente saranno in grado di assicurare un livello di contaminazione zero (anche per le micotossine cancerogene) e quanto meno a livelli di non effetto sulla salute dell'uomo e degli animali, dovranno essere sviluppati adeguati sistemi di decontaminazione delle derrate alimentari, interventi di tipo alimentare che ne riducano l'assorbimento e che migliorino la resistenza dell'organismo animale (uomo e animali) all'azione delle micotossine, almeno alle più dannose.

Per poter fare questo è necessario conoscere con precisione il rischio di esposizione delle varie fasce della popolazione, in funzione delle disponibilità di alimenti e delle abitudini alimentari, per potere prevedere degli interventi corretti. Si tratta di considerare il problema del controllo della presenza di

micotossine negli alimenti come un problema prioritario di sicurezza alimentare.

Non va dimenticato che la contaminazione degli alimenti da micotossine ha influito in modo rilevante sulla qualità della vita delle popolazioni nei secoli scorsi e non è escluso che, se le evoluzioni climatiche che sembrano in corso saranno confermate, dovranno diventare argomento di particolare attenzione anche per le nostre popolazioni.

BIBLIOGRAFIA

- ANTONELLI F., GRIFONI D., ZIPOLI G. (1996): *Ozono stratosferico e rischio UV-B*. «Quaderni CNR-IATA», Nota tecnica, 2, Firenze.
- BATTILANI P., SCANDOLARA A., BARBANO C., BERTUZZI T., PIETRI A. (2004): *Variabilità spaziale e temporale di specie fungine e delle loro tossine in mais*, Atti del Convegno “Metodi numerici, statistici e informatici nella difesa delle colture agrarie e delle foreste: ricerca e applicazione”, pp. 30-33.
- BATTILANI P., SCANDOLARA A., BARBANO C., PIETRI A., BERTUZZI T., MAROCCO A., BERRARDO N., VANNOZZI G.P., BALDINI M., MIELE S., SALERA E., MAGGIORE T. (2005): *Monitoraggio della contaminazione da micotossine in mais*, «L'informatore agrario», 61 (6), pp. 47-49.
- BIGLIAZZI L., BIGLIAZZI L. (2001): *In cucina... ai Georgofili – Alimenti, pietanze e ricette fra '700 e '800*, Firenze.
- BIRABEN J.N. (1975): *Les hommes et la peste en France et dans les pays européens et méditerranéens*, Mouton, Paris.
- BLOUNT W.P. (1961): *Turkey “X” disease*, «Turkeys», 9 (2), pp. 52-61.
- BOIS G. (1984): *The Crisis of Feudalism*, Cambridge University Press, Cambridge.
- «Bollettino del Manicomio provinciale di Ferrara», X, 7, 1883, pp. 4-7 cit. da Ippedito L., Riefolo G., Ferro F.M., *Nota storica sul manicomio di Ferrara*.
- BOUCHET R.L. (1980): *L'affaire du «pain maudit» de Pont-Saint-Esprit*. «Phytoma-Def. des Cultures», 22, pp. 33-36.
- CAST (2003): *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems*, Task force report, Iowa, 200 pp.
- CRONIN T.M. (1999): *Principles of Paleoclimatology*, Columbia University Press, New York.
- FAGAN B. (2001): *La rivoluzione del clima. Come le variazioni climatiche hanno influenzato la storia*. Sperling & Kupfer, Milano.
- FAO – Food and Agriculture Organisation of the United Nations (2004): *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*, Paper 81.
- HOUGHTON J.T., MEIRA FILHO L.G., CALLANDER B.A., HARRIS N., KATTENBERG A., MASKELL K., IPCC (2001): *Climate Change 2001: The Scientific Basis*, Cambridge University Press, Cambridge, 944 pp. (Technical Summary (TS) of the Working Group I Report, p. 47).
- KATTENBERG A. ET AL. (1996): *Climate models – projections of future climate*, in Houghton, J.T. et al., (eds). *Climate Change 1995: The Science of Climate Change*, Report of IPCC Working Group I, pp. 289-357.

- LORCIN M.T. (1974): *Les campagnes de la region lyonnaise aux XIVE et XVe siècle*, Bosc Frères, Lyon.
- MAGAN N., OLSEN M. eds. (2004): *Mycotoxins in food. Detection and control*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 471 pp.
- MAJOR R.H. (1959): *Testo di Storia della Medicina*, Sansoni, Firenze.
- MARACCHI G., BINDI M., CASTELLANI M., MIGLIETTA F. (1993): *L'aumento dell'anidride carbonica nell'atmosfera ed i suoi effetti sulle piante*, «Inquinamento», 12, pp. 68-77.
- MARACCHI G., ORLANDINI S. (2000): *I cambiamenti climatici: problemi e prospettive in Convegno Nazionale Clima e Salute*, a cura di Dalla Marta A., Orlandini S., Firenze, pp. 1-12.
- MATOSSIAN M.K. (1989): *Poison of the past, Molds, Epidemics, and History*, Yale University Press, New Haven.
- McEVEDY C., JONES R. (1978): *Atlas of world population history*, Harmondsworth, New York.
- MICCO C., MIRAGLIA M., BRERA C., CORNELI S., AMBRUZZI M.A. (1995): *Evaluation of ochratoxin A level in human milk in Italy*, «Food Additives and Contaminants», 12, pp. 351-354.
- MONTER E.W. (1980): *French and Italian witchcraft*, «History Today», 30, pp. 31-35.
- NAYAMONGO J., OKIOMA M. (2005): *The aflatoxin outbreaks in Kenia in 2004 and 2005: a case study*. Proceedings "Reducing Impact of mycotoxins in tropical agriculture, with emphasis on health and trade in Africa", Accra (Ghana), p. 3.
- PALUTIKOF J.P. ET AL. (1992): *Regional Changes in Climate in the Mediterranean Basin Due to Global Greenhouse Gas Warming*, MAP Technical Report Series. Athens: UNEP.
- PIANA G., PIVA G., (1975): *Su taluni aspetti delle micotossicosi da Fusarium*, «Rivista di Zootecnica e Veterinaria», 3, pp. 221-232.
- PIETRI, A., BERTUZZI, T., PALLARONI, L., PIVA, G. (2004): *Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy*, «Food Additives and Contaminants» 21, pp. 479-487.
- ROSENZWIEG C., TUBIELLO E.N. (1997): *Impacts of global climate change on Mediterranean agriculture: current methodologies and future directions. An introductory essay*, «Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change», 1 (3), pp. 219-232.
- SAMORINI G. (1992): *Neuropsichiatria delle graminacee e dei loro patogeni: un'introduzione*, «Annali Museo Civico di Rovereto», 7, pp. 253-264.
- SINHA K.K., BHATNAGAR D. (1998): *Mycotoxins in agriculture and food safety*. Marcel Dekker Inc, New York, 511 pp.
- TURCONI G., GUARCELLO M., LIVIERI C., COMIZZOLI S., MACCARINI L., CASTELLAZZI A.M., PIETRI A., PIVA G., ROGGI C. (2004): *Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn. An epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy)*, «European Journal of Nutrition», 43, pp. 191-197.
- VAN DONGEN P.W., DE GROOT A.N. (1995): *History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine*, «Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.», 60 (2), pp. 109-116.

ANTONIO LOGRIECO*, ANTONIO MORETTI*, GIUSEPPINA MULÈ*,
GIANCARLO PERRONE*, ANTONIO BOTTALICO*

Micotossine e funghi tossigeni nei cereali e nei prodotti ceralicoli (con particolare riferimento alla situazione europea)

INTRODUZIONE

La presenza di micotossine nelle derrate ceralicole rappresenta un problema di notevole portata socio-sanitaria, perché la loro formazione nelle colture infette e la loro persistenza negli alimenti e nei mangimi è spesso associata con malattie (micotossicosi) acute e croniche degli allevamenti zootecnici e, direttamente o indirettamente, anche dell'uomo. È stato stimato che almeno il 25% della produzione mondiale di alimenti sia contaminata da micotossine ma per alcune fusariotossine nel mais, come deossinivalenolo (DON) e fumonisina B₁ (FB₁), tale percentuale è verosimilmente molto più elevata (CAST, 2003).

Abbreviazioni: **AFs** = Aflatossine (**AFB1**, **AFB2**, **AFG1**, **AFG2**, **AFM1**); **ALT** = Altenuene; **ATs** = *Alternaria*-tossine; **AOH** = Alternariolo; **AME** = Etere metilico dell'alternariolo; **ATXs** = Altertossine; **ATX-I** = Altertossina I; **ATX-II** = Altertossina II; **BEA** = Beauvericina; **CIT** = Citrinina; **CPA** = Acido cilopiazonico; **DAS** = Diacetossiscirpenolo; **DON** = Deossinivalenolo (3Ac-DON, 15-Ac-DON); **EDP** = Esaciclodepsi-peptidi; **ENs** = Enniatine; **ENAs** = Enniatine di tipo A (**ENA**, **ENA1**); **ENBs** = Enniatine di tipo B (**ENB**, **ENB1**); **FCN** = Fusarocromanone; **FEB** = Fusariosi della spiga (*Fusarium* ear blight); **FTs** = *Fusarium*-tossine; **HT2** = Tossina HT-2; **FBs** = Fumonisine (**FB1**, **FB2**); **FUC** = Fusarina C; **FUS** = Fusarenone-X; **FUP** = Fusaproliferina; **LOQ** = Limite di quantificazione; **MAS** = Monoacetossiscirpenolo; **MON** = Moniliformina; **NEO** = Neosolaniolo; **NIV** = Nivalenolo; **OTA** = Ocratossina A; **OTs** = Ocratossine; **PAT** = Patulina; **ppm** = parti per milione (mg/kg = mg di tossina per kg di matrice); **ppb** = parti per miliardo o bilione (µg/kg = µg di tossina per kg di matrice); **ppt** = parti per trilione (ng/kg = ng di tossina per kg di matrice); **RFC** = Roquefortina C; **SPT** = Scirpentriolo; **TA** = Acido tenuazonico; **T2** = Tossina T-2; **T2trol** = Tossina T-2 tetraol; **TTs** = Tricoteceni di *Fusarium*; **TTAs** = Tricoteceni di *Fusarium* di tipo A; **TTBs** = Tricoteceni di *Fusarium* di tipo B; **ZEN** = Zearalenone; **ZENs** = Zearalenoni; **ZLs** = Zearalenoli (α -ZL, β -ZL).

* Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari

Nei cereali, le micotossine sono prodotte da funghi parassiti o saprofiti appartenenti in particolare ai generi *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria* e *Penicillium*, diffusi in aree geografiche sia a clima temperato sia a clima semi-tropicale e tropicale. Tra i cereali interessati vi sono, quindi, sia quelli autunno-vernini (microtermi), quali frumento, orzo, avena, segale e triticale, sia quelli primaverili-estivi (macrotermi), quali mais, riso, sorgo e miglio. In condizioni favorevoli al loro sviluppo, le muffe tossigene possono svilupparsi e formare micotossine in una qualunque delle fasi che caratterizzano la filiera cerealicola: dalla produzione in campo alla utilizzazione del prodotto finito. A tal riguardo merita ricordare la suddivisione pratica dei funghi tossigeni in base alle loro esigenze in contenuto di umidità della matrice in: funghi di campo (≥ 20 -22%), appartenenti ai generi *Fusarium* e *Alternaria*; e funghi di magazzino, comprendenti quelli capaci di accrescersi anche a contenuti di umidità più bassi (≤ 18 -20%) e appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium*. Anche se tale suddivisione non è netta, per la presenza di ceppi con esigenze intermedie, appare evidente che la formazione di fusariotossine e di alternariotossine appare più probabile in pre-raccolta da parte di ceppi rispettivamente di *Fusarium* e *Alternaria*, anche in considerazione del fatto che specialmente il genere *Fusarium* contiene numerosi ceppi fitopatogeni dotati di elevate capacità di causare fusariosi dei cereali in campo. Invece, la formazione di micotossine da parte di *Aspergillus* e di *Penicillium* è più probabile nel corso delle operazioni di raccolta e in post-raccolta, anche perché tali generi o sono poco rappresentati da ceppi fitopatogeni o hanno esigenze specifiche, come nel caso di alcuni ceppi di *A. flavus* che, normalmente saprofiti, dimostrano una crescente capacità patogenica a temperature superiori a 30 °C. Di particolare importanza per i cereali sono le micotossine formate da specie di *Fusarium* fitopatogene, agenti di fusariosi della spiga, capaci di attaccare le colture in pieno campo e accumulare nelle spighe infette notevoli quantità di fusariotossine. Trattandosi di composti molto resistenti ai più comuni agenti fisici, chimici e microbiologici che vengono impiegati nelle tecnologie delle preparazioni alimentari, essi si ritrovano praticamente intatti, o sottoforma di loro derivati altrettanto tossici, nei mangimi e alimenti finiti (Bottalico, 2004).

In questa nota sono riportati i principali aspetti riguardanti la formazione e la diffusione di micotossine nei cereali, con particolare enfasi per le fusariotossine, che almeno per le aree di coltivazione delle zone temperate del pianeta, rappresentano sicuramente il rischio di gran lunga più elevato. A tal riguardo, un cenno particolare sarà dedicato agli aspetti ecologici della distribuzione delle specie di *Fusarium* tossigene e del relativo profilo mico-

tossicologico dei raccolti, nonché delle condizioni agro-culturali che influenzano le contaminazioni. Tali elementi sono utili da un lato per la previsione dell'origine delle contaminazioni, e dall'altro per la messa in atto di misure idonee a contenerle.

PRESENZA NEI CEREALI DI MICOTOSSINE DI FUSARIUM

Fusariotossine riscontrate nei cereali

Le colture e i prodotti alimentari più a rischio per la presenza di fusariotossine sono essenzialmente i cereali e le derrate cerealicole, sia per le numerose specie di *Fusarium* tossigene che parassitizzano i cereali in campo, sia per l'elevata suscettibilità delle derrate cerealicole a essere colonizzate nel corso dello stoccaggio e delle preparazioni alimentari. Nei cereali è possibile ritrovare quasi tutte le principali micotossine prodotte da specie di *Fusarium*, e in particolare: tricoteceni (DON, NIV, FUS, T-2, DAS), fumonisine (FB₁ e FB₂), zearalenoni (ZEN, ZOL), moniliformina (MON), esaciclodepsipeptidi (ENs e BEA) e fusaproliferina (FUP, tab. 1).

Tricoteceni. Tutti i tricoteceni prodotti da specie di *Fusarium* contengono nella loro molecola una funzione chetonica in posizione C-8. I tricoteceni di tipo A, a differenza di quelli di tipo B, contengono anche un altro gruppo funzionale. Il più diffuso tricotecene di tipo B è il DON, noto anche come vomitossina, prodotto essenzialmente da *Gibberella zeae* (Schw.) Petch (*Fusarium graminearum* Schw.) e da *F. culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. Il DON si ritrova spesso associato con altri suoi derivati acetilati (3-AcDON, 15-AcDON, 3,15-AcDON) o con composti analoghi come nivalenolo (NIV) e fusarenone-X (FUS) prodotti, oltre che dalle due specie summenzionate, anche da *F. cerealis* Cooke (= *F. crookwellense* L.W. Burgess, P.E. Nelson & T.A. Toussoun) e da *F. poae* (Peck) Wollenw. Tra i tricoteceni di tipo A, si ritrovano con frequenza la T-2 e diversi suoi derivati (tossina HT-2) nonché composti analoghi, tra cui: neosolaniolo (NEO) e diacetossiscirpenolo (DAS), prodotti essenzialmente da *F. sporotrichioides* Sherb., *G. acuminata* Wollenw (*F. acuminatum* Ellis & Everh.), *F. langsethiae* Torp & Nirenberg. I tricoteceni sono responsabili della comparsa negli allevamenti zootecnici di diverse sintomatologie raggruppabili in una sindrome emetica e in una sindrome emorragica. I tricoteceni non dimostrano attività genotossica e pertanto figurano tra le sostanze non carcinogene del Gruppo 3. Manifestazioni di tricotecenotossicosi hanno interessato anche l'uomo, sia in passato, con la leucopenia tossi-

SPECIE DI FUSARIUM	MICOTOSSINE (a)
<i>Liseola</i>	
- F. anthophilum	FMs, MON.
- F. fujikuroi (MP-C)	FBs, MON, BEA, ENs.
- F. nygamai (MP-G)	FBs, MON.
- F. proliferatum (MP-D)	FBs, MON, BEA, FUP.
- F. subglutinans (MP-E)	MON, BEA, FUP.
- F. verticillioides (MP-A)	FBs.
<i>Dlaminia</i>	
- F. dlaminii	FBs.
- F. beomiforme	MON
- F. napiforme	MON, FMs.
<i>Discolor</i>	
- F. cerealis	NIV, FUS, ZEN, ZOH.
- F. culmorum	DON, ZEN, NIV, FUS, AcDON, ZOH.
- F. graminearum	DON, NIV, FUS, AcDON, ZEN.
- F. heterosporum	ZEN, ZOH.
- F. sambucinum	DAS, T2, NEO, MAS, ZEN, BEA.
<i>Roseum</i>	
- F. avenaceum	MON, ENs, BEA.
- F. arthrosporioides	ENs, BEA.
Gibberella/Gibbosum	
- F. equiseti	ZEN, ZOH, FUC, NIV, FUS, MAS, DAS, FUS, BEA.
- F. acuminatum	MON, ENs, BEA.
<i>Lateritium</i>	
- F. lateritium	BEA, ENs, TTAs,
<i>Sporotrichiella</i>	
- F. chlamyosporum	MON.
- F. langsethiae	T2, HT2, NEO, MAS, DAS, BEA, ENs.
- F. poae	NIV, FUS, DAS, BEA, ENs, MAS.
- F. sporotrichioides	T2, HT2, NEO, MAS, DAS, ENs, BEA.
- F. tricinctum	MON, BEA, ENs.
<i>Arthrosporiella</i>	
- F. semitectum	ZEN, BEA.
<i>Elegans</i>	
- F. oxysporum	MON, ENs, ZEN, FMs.

Tab. 1 *Produzione di micotossine da parte delle principali specie di Fusarium parassite dei cereali*

(a) – Per le abbreviazioni vedere l'elenco in nota all'inizio del lavoro.

ca alimentare (ATA), e sia più recentemente con le intossicazioni alimentari da DON segnalate negli anni '90 in India, Cina e Giappone (IARC, 1993;

WHO, 2002; Bottalico, 2004).

Fumonisine. Le specie di *Fusarium* che producono le fumonisine sono essenzialmente *G. moniliformis* Wineland [*F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg = *F. moniliforme* J. Sheld.], *G. intermedia* (Kuhlman) Samuels et al. [*F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg], e poche altre specie di minore importanza ecologica. Delle quattro serie di fumonisine finora descritte, e indicate come A, B, C e P, la serie che include i composti più interessanti è la serie B con FB₁ e FB₂ che rappresentano i composti micotossicologicamente più importanti. A mangimi a base di mais contaminati da FB₁ sono associate diverse micotossicosi, tra cui la leucoencefalomalacia degli equini (ELEM), l'edema polmonare nei suini (PPE) e decrementi produttivi nelle specie aviarie e nei bovini. Un caso di ELEM è stato segnalato anche in Italia. Le fumonisine sono sospettate di causare un cancro dell'esofago (HEC) in popolazioni rurali della Cina, Sud-Africa, USA e Italia. Le fumonisine dimostrano attività cancerogene per gli animali, pertanto sono state classificate tali per gli animali zootecnici e tale attività è ritenuta possibile anche per l'uomo (Gruppo 2B, IARC, 1993; WHO, 2000; Bottalico, 2004).

Zearalenoni. Il composto più interessante e più diffuso è senz'altro lo zearalenone (ZEN), che spesso si accompagna con gli zearalenoli (miscela di stereoisomeri α - e β -zearalenolo), prodotti da *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis* e *G. intricans* Wollenw. [*F. equiseti* (Corda) Sacc. = *F. scirpi*]. È noto che lo ZEN, non è dotato di tossicità acuta, ma esplica attività ormono-simile con effetti anabolizzanti e uterotrofici. Lo ZEN è responsabile della ricorrente comparsa di iperestrisimo negli allevamenti suini e di ipofertilità e riduzione delle produzioni negli allevamenti di bovini e di specie aviarie (IARC, 1993).

Moniliformina. Le specie di *Fusarium* da segnalare per la produzione di MON sono, nel frumento e in altri cereali autunno-vernini: *G. avenacea* R.J. Cooke [*Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc.], *F. tricinctum* (Corda) Sacc., *F. acuminatum* e *F. chlamydosporum* Wollenw. & Reink. (= *F. fusarioides*); mentre nel mais, sono: *G. subglutinans* Nelson, Toussoun & Marasas [*F. subglutinans* (Wollenw. & Reink.) Nelson, Toussoun & Marasas]; *F. proliferatum* e *F. oxysporum* Schlecht. La presenza di MON nella dieta delle specie aviarie è causa di disordini ematologici, di alterazioni morfologiche del miocardio e di riduzione delle produzioni (Bottalico, 2004).

Esaciclodepsipeptidi. Le specie di *Fusarium* da segnalare per la produzione di BEA e ENs sono *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. arthrosporioides* Sherb., *F. sporotrichioides* e *F. poae* nel frumento e in altri cereali autunno-vernini; e, *F. subglutinans*, *F. proliferatum* e *F. semitectum* Berk. & Rav. (= *F. pallidoroseum*, *F. incarnatum*) nel mais. Sebbene gli esaciclodepsipeptidi non sono dotati di

tossicità acuta, essi presentano una elevata citotossicità dovuta alla loro attività ionoforica e apoptotica. Tali attività, oltre a causare danni diretti, lasciano presumere la possibilità un'interazione sinergica con le numerose altre fusariotossine (DON, MON, FB₁, FUP) con le quali si trovano associate nelle matrici cerealicole contaminate (Logrieco, 2002a).

Fusaproliferina. La fusaproliferina (FUP) è un sesteterpene prodotto da *F. proliferatum* e da *F. subglutinans* e ritrovato nelle spighe di mais affette da marciume rosato. Somministrazioni nella dieta di mais contaminato con colture *F. proliferatum* hanno causato elevata mortalità nel pollastro. Inoltre la FUP ha dimostrato un'elevata citotossicità anche su linee cellulari umane ed è risultata teratogenica su embrioni di pollo (Ritieni et al., 1997).

Fusarocromanone. Il fusarocromanone (FCN) è prodotto da ceppi di *F. equiseti* isolati da mangimi cerealicoli implicati in una particolare sintomatologia delle specie aviarie nota come discondroplasia tibiale. Questa sindrome, riprodotta nei polli con diete contenenti FCN (75-240 ppm) è caratterizzata da un difetto di ossificazione della parte prossimale della regione tibio-tarsica che porta a un inarcamento degli arti (Bottalico, 2004).

Formazione di fusariotossine nel frumento e agli altri cereali autunno-vernini

I problemi micotossicologici connessi con la presenza di fusariotossine nel frumento e in altri cereali autunno-vernini (avena, orzo, segale, triticale) sono originati essenzialmente da condizioni in pre-raccolta e conseguenti agli attacchi di specie di *Fusarium* fitopatogene alle spighe dei cereali nel corso della loro coltivazione. La fusariosi della spiga dei cereali microtermi ("*Fusarium* ear Blight" = FEB), diffusa in forma epidemica nella maggior parte delle aree cerealicole del mondo (Europa, Nordamerica, Sudafrica, Australasia), è stata segnalata in Italia agli inizi del secolo scorso e poi più frequentemente riscontrata nelle principali aree cerealicole italiane (Balmas et al., 2000). La sintomatologia della fusariosi della spiga, evidente su spighe immature, consiste in disseccamenti che interessano parzialmente o completamente la spiga, a seconda della gravità d'attacco. Andamenti climatici piovosi o caldo-umidi nel periodo compreso tra la spigatura e la maturazione latteo-cerosa, costituiscono le condizioni ideali per l'insorgenza e la diffusione della malattia. In tali condizioni, sulle aree infette di colorazione giallo-pagliarino contrastanti con il verde delle spighette ancora sane, è possibile talora osservare la presenza di masserelle color arancio, costituite dalle fruttificazioni agamiche (sporodochi) del fungo.

L'attacco di fusariosi della spiga può determinare marcati decrementi produttivi, che facilmente raggiungono anche il 30% della produzione attesa, in quanto le spighe colpite giunte a maturazione risultano vuote o con cariossidi striminzite (scabbia). Questa fitopatia, con le relative conseguenze micotossicologiche, è particolarmente sentita in Europa la cui produzione di cereali autunno-vernino raggiunge i due terzi di quella mondiale, con l'80% costituito da frumento e orzo. Le granaglie colpite sono inservibili come semente e nel caso di attacchi severi il loro contenuto in micotossine è talmente elevato da sconsigliarne l'utilizzo non solo come alimento ma anche come mangime.

Il quadro eziologico della fusariosi della spiga dei cereali autunno-vernino è abbastanza complesso e consiste di diverse specie di *Fusarium* che possono coesistere o avvicinarsi in rapida successione, soprattutto in relazione all'ambiente agro-climatico. A questo riguardo, una distribuzione dell'incidenza delle diverse specie nelle aree centro-settentrionali e centrali europee, con le corrispondenti micotossine potenzialmente ritrovabili, è rappresentata nella tabella 2. Un ruolo primario in tutti gli ambienti cerealicoli è svolto da *F. graminearum*, al quale si associano frequentemente, a volte anche in ma-

SPECIE	DIFFUSIONE EUROPEA		MICOTOSSINE (a)
	NORD/CENTRO	SUD	
<i>F. graminearum</i>	++++	+++	DON, NIV, ZEN , AcDON, FUS
<i>F. avenaceum</i>	++++	++	MON , ENs, BEA
<i>F. culmorum</i>	+++	++	DON, ZEN , ZOH, NIV
<i>F. poae</i>	++	++	NIV , DAS, FUS, ENS, BEA
<i>F. equiseti</i>	++	+	DAS, ZEN , ZOH
<i>F. tricinctum</i>	++	+	MON , ENs, BEA
<i>F. langsethiae</i>	++	-	T2, HT2 , NEO, MAS, DAS, BEA, ENs
<i>F. arthrosporioides</i>	++	-	ENs , BEA
<i>F. cerealis</i>	+	±	NIV, FUS, ZEN , ZOH
<i>F. sporotrichioides</i>	+	±	T2, HT2, T2ol , NEO
<i>F. acuminatum</i>	±	±	MON, ENs, BEA
<i>F. subglutinans</i>	±	-	MON BEA, FUP
<i>F. solani</i>	±	-	-
<i>F. oxysporum</i>	±	-	MON
<i>F. verticillioides</i>	-	±	FB1, FB2 , FB3
<i>F. proliferatum</i>	-	±	FB1, FB2 , FUP, MON , BEA

Tab. 2 Specie di *Fusarium* agenti di marciume della spiga del frumento in Europa e relative micotossine riscontrate nelle derrate cerealicole

(a) – Per le abbreviazioni vedere l'elenco in nota all'inizio del lavoro. In grassetto sono evidenziate le micotossine più significative.

niera prevalente, *F. culmorum* e *F. avenaceum*. Una presenza a volte significativa specialmente con andamenti climatici freddo-umidi, è rappresentata da *Monographella nivalis* (Schff.) E. Müller [*Microdochium nivalis* (Fr.) Samuels & I.C. Hallett], un patogeno riportato per lungo tempo come *Fusarium nivale* Ces. ex Berl. & Voglino, che è in grado di causare serie decurtazioni di prodotto, ma che fortunatamente non è tossigeno. Assieme alle specie di *Fusarium* tossigene summenzionate, ve ne sono diverse altre con comportamento saprofitario o opportunistico, che a seconda delle condizioni agro-climatiche possono assumere consistenze rilevanti e quindi, essendo anche esse tossigene, modificare il profilo micotossico del prodotto finale. Tra le altre specie meno frequentemente incontrate vi sono: *F. poae*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* e *F. tricinctum*. Inoltre è possibile, anche se sporadicamente, incontrare ancora altre specie di *Fusarium* tossigene, quali: *F. chlamydosporum*; *F. acuminatum*; *F. semitectum*; *F. oxysporum*; *F. sambucinum* Fuckel; *F. verticillioides*; *Nectria haematococca* Berk & Broome [*F. solani* (Mart.) Sacc.] (Balmas et al., 2000; Parry et al., 1995; Bottalico, 1998).

Le numerose indagini di campo condotte sulla presenza di fusariotossine nel frumento colpito da FEB alla raccolta, indicano che DON è la tossina più largamente diffusa. Nelle annate di gravi fusariosi alle spighe dei cereali, presenze di DON fino a 9 ppm nell'orzo e fino a 6 ppm nel frumento sono piuttosto frequenti sia nelle aree cerealicole extra-europee sia in quelle europee. Per quanto riguarda l'Italia, le indagini condotte dal 1998 al 2004 su un totale di 945 campioni prelevati all'epoca di raccolta, hanno indicato una diffusa presenza di DON nel frumento in Italia, più incisiva nelle regioni settentrionali, con concentrazioni fino a 1 ppm, ma quasi assente in quelle meridionali. Inoltre è stata osservata una maggiore suscettibilità alla fusariosi, e una conseguente maggiore contaminazione di DON, nei campioni di frumento duro rispetto a quelli di frumento tenero (Campagna et al., 2005). È risultato che il frumento ottenuto in agricoltura biologica è più contaminato da DON rispetto a quello ottenuto in agricoltura convenzionale. Infine anche il farro (*Triticum dicoccum*, *T. monococcum*, *T. spelta*), il triticale (*T. secalotricum*) e l'orzo, ottenuti in agricoltura biologica, non sono risultati esenti da DON, con contenuti rispettivamente fino a 0,35; 0,2; e 1,54 ppm.

Una presenza di DON così diffusa nelle spighe infette dei cereali all'epoca della raccolta non può che portare a una sua altrettanto larga contaminazione delle derrate cerealicole. In effetti, dalla consultazione della bibliografia specifica si rileva un costante ritrovamento di questa tossina nei cereali del commercio (frumento, orzo, avena, triticale, segale), con incidenze medie superiori al 70% e concentrazioni che variano da 0,01-49,6 ppm in Asia, 0,02-

10 ppm in Canada e USA; 0,25-9,25 ppm in Argentina e 0,02-5 ppm in Europa. Per quanto riguarda il solo frumento, una recente indagine sistematica, condotta da una Commissione congiunta WHO/FAO di esperti di additivi alimentari (JEFCA) ha mostrato come il DON sia un comune contaminante di questo cereale in tutto il mondo, rilevando la presenza della tossina nel 57% di 11.022 campioni esaminati e riscontrando concentrazioni fino a 3 ppm (FAO/WHO, 2001). Un'indagine analoga condotta in Europa ha mostrato che il 63% di 6358 campioni sono risultati contaminati (Schothorst e Van Egmond, 2004).

Assieme a DON, nelle spighe dei cereali affette da fusariosi, è stato segnalato frequentemente anche ZEN, prodotto dagli stessi ceppi di *F. graminearum* e di *F. culmorum* produttori di DON, in Francia, Austria, Germania (fino a 330 ppb). Attacchi significativi da parte di *F. cerealis* e di *F. poae* possono portare alla formazione nelle spighe infette di NIV, sia nelle aree cerealicole centro-europee (fino a 232 ppb) e sia, in maggior misura, nelle aree più nordiche, come nell'avena (fino a 532 ppb) e nell'orzo (fino a 1496 ppb) in Finlandia nel 2000-2002 (Logrieco e Visconti, 2004 e bibliografia ivi riportata).

Gli attacchi alle spighe di *F. sporotrichioides* portano all'accumulo di tricoteceni di tipo A (T2, HT2, T2-tetraol, DAS, NEOS), come dimostrano le indagini condotte in Polonia, che riportano la presenza in cariossidi visibilmente infette, fino a 1,7 ppm di tali tricoteceni. Un contributo notevole all'accumulo di T2 e HT2 nelle spighe dei cereali (orzo, avena, frumento, segale), specialmente delle regioni nord-europee (Norvegia, Finlandia, Inghilterra, Danimarca, Repubblica Ceca, Olanda, Austria e Germania), fino a 1,5 ppm, è determinato dagli attacchi di *F. langsethiae* (una entità tassonomica segregata da *F. poae* come variante polverulenta, Logrieco e Visconti, 2004 e bibliografia ivi riportata).

Presenze di EDP (BEA e ENs) sono segnalate con sempre maggior frequenza nei cereali microtermini delle regioni nord-europee (Finlandia e Norvegia), conseguenti agli attacchi di *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. arthrosporioides*, *F. poae* e *F. sporotrichioides*. A questo riguardo, le più elevate concentrazioni di EDP sono state riscontrate nel frumento (fino a 24 ppm), nell'orzo (fino a 18 ppm) e nella segale (fino a 17 ppm, Logrieco e Visconti, 2004 e bibliografia ivi riportata).

Elevate concentrazioni di MON sono accumulate nelle spighe dei cereali microtermini delle regioni nord-europee (Finlandia, Norvegia, Polonia), a seguito di attacchi di *F. avenaceum* e di *F. tricinctum*, con presenze più significative nel frumento (fino a 810 ppb) e nell'orzo (fino a 747 ppb, Logrieco e Visconti, 2004 e bibliografia ivi riportata).

In questi ultimi anni viene sempre più spesso segnalata la presenza anche sui cereali autunno-vernini (frumento, segale) di ceppi di *F. proliferatum* produttori di fumonisine. Tale crescente diffusione, in linea con il divenire di andamenti climatici sempre più caldo-asciutti di quest'ultimo decennio, porta a far temere per una contaminazione di FMs anche in questi cereali (Bottalico e Perrone, 2002).

Formazione di fusariotossine nel mais e agli altri cereali primaverili-estivi

La maggior parte dei problemi micotossicologici connessi con la presenza di tossine di *Fusarium*, nel mais e in altri cereali primaverili-estivi (sorgo, riso, miglio), sono derivati dagli attacchi di specie di *Fusarium* fitopatogene alle spighe dei cereali nel corso della loro coltivazione. Comunque, altri fattori di rischio non trascurabili intervengono anche in post-raccolta, derivanti dalla difficoltà prima di abbattere e poi di mantenere a livelli di sicurezza (13%) il contenuto di umidità che presentano tali cereali al momento di iniziare la raccolta (25-30%), e quindi dalla necessità di provvedere al loro essiccamento prima dello stoccaggio.

In relazione alle specie di *Fusarium* coinvolte, le spighe infette di mais possono manifestare diverse sintomatologie, riconducibili essenzialmente a un marciume rosso della spiga (*Red ear rot*) causato da specie di *Fusarium* della Sezione *Discolor*; e a un marciume rosato della spiga (*Pink ear rot*), causato da specie di *Fusarium* della Sezione *Liseola*. Nella patogenesi di questi due marciumi è predominante la progressione dell'infezione a partire dall'apice della spiga, estendendosi poi verso la base della stessa. Come conseguenza di infezioni stilar da parte delle specie sistemiche (*Seed-borne*) agenti di marciume rosato, è possibile osservare anche il marciume di singole cariossidi distribuite in maniera casuale lungo la spiga (*Random ear rot*).

Le specie di *Fusarium* agenti del marciume rosso della spiga sono essenzialmente *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. cerealis*. Tra le altre specie isolate con minor frequenza vi sono: *F. subglutinans*, *F. avenaceum* e *F. verticillioides*. Le specie di *Fusarium* agenti di marciume rosato sono in particolare: *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*. Tra le altre specie di *Fusarium* occasionalmente isolate da spighe di mais affette da marciume, assieme alle specie predominanti, vi sono: *F. equiseti*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. acuminatum*, *F. semitectum*, *F. solani* e *F. oxysporum*. Infine, ci sono ancora altre specie di *Fusarium* che, in determinate circostanze agro-ambientali, sono state riportate quali problemi emergenti, tra cui: *F. anthophilum* (A. Braun) Wollenw.,

F. chlamydosporum, *F. compactum* (Wollenw.) Gordon, *F. flocciferum* Corda, *G. gordonii* Booth (*F. heterosporum* Nees ex Fr.), *F. graminum* Corda, *F. lateritium* Nees, *F. sambucinum* Fuckel, *F. torulosum* (Berk & Curt.) Nirenberg, *F. venenatum* Nirenberg.

La distribuzione e la prevalenza delle diverse specie di *Fusarium*, e del tipo di marciume della spiga risultante in una determinata area geografica, dipendono essenzialmente dalle condizioni climatiche, primariamente dalla temperatura, nonché da molti altri fattori, comprese le tecniche agro-colturali. A questo riguardo, una distribuzione dell'incidenza delle diverse specie nelle aree centro-settentrionali e centrali europee, in relazione al tipo di marciume

SPECIES	DIFFUSIONE EUROPEA		MICOTOSSINE (a)
	NORD/CENTRO	SUD	
MARCIUME ROSSO			
<i>F. graminearum</i>	++++	++	DON, AcDON, NIV, FUS, ZEN
<i>F. subglutinans</i>	+++	±	MON, BEA, FUP
<i>F. avenaceum</i>	++	±	MON, ENs
<i>F. cerealis</i>	+	±	NIV, FUS, ZEN, ZOH
<i>F. culmorum</i>	+	-	DON, NIV, ZEN, ZOH
<i>F. sporotrichioides</i>	+	-	T2, HT2, NOS
<i>F. poae</i>	+	-	DAS, NIV
<i>F. equiseti</i>	+	±	DAS, ZEN, ZOH
<i>F. acuminatum</i>	+	±	T2, NEO
<i>F. verticillioides</i>	+	+	-
<i>F. proliferatum</i>	+	+	-
MARCIUME ROSATO			
<i>F. verticillioides</i>	+	++++	FB₁, FB₂, FB₃
<i>F. proliferatum</i>	±	+++	FB₁, FB₂, FUP, MON, BEA
<i>F. subglutinans</i>	++	+	MON, BEA, FUP
<i>F. graminearum</i>	+	±	-
<i>F. culmorum</i>	+	±	-
<i>F. equiseti</i>	+	±	-
<i>F. solani</i>	±	+	-
<i>F. semitectum</i>	±	+	-
<i>F. cerealis</i>	±	±	-
<i>F. sporotrichioides</i>	±	-	-
<i>F. oxysporum</i>	-	+	-

Tab. 3 Specie di *Fusarium* e micotossine presenti in spiga del mais affette da marciume in Europa

(a) – Per le abbreviazioni vedere l'elenco in nota all'inizio del lavoro. In grassetto sono evidenziate le micotossine più significative

e con l'indicazione delle corrispondenti micotossine potenzialmente ritrovabili, è rappresentata nella tabella 3. In relazione all'andamento climatico, negli ambienti europei il marciume rosso è particolarmente severo negli anni e nelle località caratterizzati da frequenti precipitazioni e basse temperature nel corso dell'estate e dell'autunno; mentre il marciume rosato prevale nei climi caldo-asciutti delle aree più meridionali (Bottalico, 2004). Nell'ultimo decennio, in coincidenza del persistere di andamenti climatici sempre più asciutti del normale, è stata osservata una crescente dominanza di *F. verticillioides* (marciume rosato) associato a *F. subglutinans*, rispetto a *F. graminearum* (marciume rosso), a partire dalle aree più meridionali dell'Europa e risalente sempre più a nord. A questa tendenza, si è associato a *F. verticillioides* con una presenza sempre più incisiva anche *F. proliferatum*, un altro agente di marciume rosato di ben più elevata potenza tossigena (FB₁, MON, FUP, BEA) (Bottalico, 1998; Logrieco et al., 2002b).

In relazione alle specie di *Fusarium* dominanti, nelle spighe di mais affette da marciume si possono trovare in maggiore concentrazione: DON, ZEN e loro derivati in presenza di *F. graminearum* e di *F. culmorum*; T2, DAS e loro derivati in presenza di *F. sporotrichioides* e di *F. poae*; MON in presenza di *F. subglutinans*, *F. proliferatum* e di *F. avenaceum*; fumonisine (FB₁ e FB₂) in presenza di *F. verticillioides* e di *F. proliferatum*; BEA e fusaproliferina (FUP) in presenza di *F. subglutinans* e di *F. proliferatum* (tab. 3).

Nelle spighe di mais affette da marciume rosso, causato da *F. graminearum* e *F. culmorum*, elevate concentrazioni di DON, ZEN e NIV vengono normalmente segnalate nelle annate caratterizzate da gravi attacchi, praticamente in tutte le aree maidicole europee, con particolare incidenza nelle aree più settentrionali (Spagna, Francia, Italia, Austria, ex-Iugoslavia, Polonia, Romania, Ungheria) con livelli davvero elevati di DON (fino a 500 ppm), ZEN (fino a 40 ppm) e NIV (fino a 10 ppm, Logrieco e Visconti, 2004 e bibliografia ivi riportata). Alcuni ceppi fitopatogeni di *Fusarium*, agenti anche di marciume del culmo, possono accumulare zearalenone anche nelle colture utilizzate come foraggio (fino a 0,3 ppm di sostanza secca). Tale eventualità spiegherebbe l'origine delle contaminazioni che si riscontrano di frequente nei cereali insilati (silo-mais, CAST, 2003).

L'eventuale associazione di *F. equiseti* contribuisce a elevare la presenza di ZEN, mentre quella di *F. cerealis* e di *F. poae*, contribuisce a elevare l'accumulo di NIV e di FUS (fino a 0.9 ppm). Inoltre, la presenza di *F. subglutinans* nelle aree maidicole più settentrionali (Austria, Polonia) e quella di *F. proliferatum* in quelle meridionali (Italia) portano a significativi ritrovamenti di MON nelle spighe infette (fino a circa 400 ppm, Logrieco e Visconti, 2004).

Nelle spighe di mais affette da marciume rosato causato da *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, elevate concentrazioni di FMs o FBs, BEA e FUP vengono segnalate sempre con maggior frequenza soprattutto nelle aree maidicole caratterizzate da andamenti climatici caldo-asciutti. In Europa, le fumonisine sono particolarmente presenti nel mais delle regioni meridionali (Portogallo, Francia, Spagna, Croazia, Italia); mentre sembrano poco presenti nel mais delle aree centro-settentrionali (Austria, Svizzera, Germania, Repubblica Ceca, Slovacchia, Polonia). Le indagini condotte in Italia hanno portato al ritrovamento di elevate concentrazioni di FB₁ sia nelle spighe infette (fino a 300 ppm, Bottalico, 2004), sia nelle cariossidi di mais del commercio (fino a 5,31 ppm), e sia nella farina di mais (polenta) prodotta nel Nord-Est dell'Italia (fino a 3,6 mg/kg). La presenza di BEA nelle spighe infette di mais, associata alla presenza di *F. subglutinans* e di *F. proliferatum*, è stata segnalata in Italia, Polonia, Austria e Slovacchia. Inoltre, le indagini condotte in Italia sulla presenza di fusariotossine nelle spighe di mais affette da marciume rosato causato da *F. proliferatum* hanno portato al ritrovamento di FUP (fino a 500 ppm) assieme a FB₁ e BEA (Logrieco e Visconti, 2004 e bibliografia ivi riportata).

Chiaramente, la formazione di micotossine nelle spighe di mais colpite da fusariosi porta a un livello medio finale delle diverse fusariotossine (DON, T2, ZEN, FB₁) nei raccolti, che spesso va oltre la soglia di rischio e rappresenta quindi un grave pregiudizio per la sanità delle derrate maidicole nel corso della filiera alimentare.

PRESENZA NEI CEREALI DI MICOTOSSINE DI ALTRI MICROMICETI TOSSIGENI

Oltre a tossine prodotte da specie di *Fusarium*, nei cereali possono essere presenti altre micotossine prodotte da altri funghi tossigeni e, in particolare, da specie di *Aspergillus*, *Claviceps*, *Penicillium* e *Alternaria*.

Micotossine di Aspergillus

Le aflatossine sono prodotte da alcuni ceppi di *A. flavus* (45%) e dalla maggior parte dei ceppi di *A. parasiticus* (98%). Mentre *A. flavus* produce quasi esclusivamente AFs di tipo B (AFB₁, AFB₂), *A. parasiticus* produce AFs sia di tipo B (AFB₁, AFB₂), sia di tipo G (AFG₁, AFG₂). Le AFs sono le micotossine per antonomasia, la cui scoperta nei primi anni '60 del secolo scorso ha deter-

minato la nascita della moderna micotossicologia su basi sperimentali. Anche come conseguenza della globalizzazione delle produzioni alimentari, esse vengono ormai correntemente riscontrate un po' ovunque nei mangimi e negli alimenti. Le AFs sono sostanze dotate di elevata tossicità sia acuta, sia cronica, responsabili di ricorrenti micotossicosi sia negli allevamenti zootecnici e sia direttamente e indirettamente nell'uomo. L'elevatissima attività biologica e l'ampio spettro di azione delle AFs scaturiscono dalla loro peculiare capacità di legarsi con gli acidi nucleici e con le nucleoproteine cellulari, determinando effetti deleteri sulla sintesi proteica e sull'integrità cellulare. Le AFs sono essenzialmente delle potenti epatotossine dotate di elevata attività genotossica e responsabili di epatocarcinomi (Bottalico, 1999). La formazione delle aflatossine nei cereali avviene sia in pre-raccolta, sia in post-raccolta. Per la sintesi delle AFs i ceppi aflatossigeni richiedono condizioni termo-igrometriche che sono proprie dei climi tropicali e subtropicali (temperatura ottimale intorno ai 30 °C, per lunghi periodi). Pertanto, mentre nelle aree geografiche più suscettibili all'attacco dei funghi aflatossigeni in campo, il problema delle contaminazioni di AFs alle colture di mais assume aspetti davvero preoccupanti, alle nostre latitudini il problema è normalmente trascurabile se non inesistente, e può raggiungere livelli a rischio solo in condizioni climatiche eccezionali. Nelle aree di coltivazione più suscettibili (aree tropicali e subtropicali) la presenza di AFB₁ nelle derrate maidicole locali primarie (cariossidi e sfarinati) raggiunge un'incidenza di contaminazione del 50%, con presenza media di: 53 ppb in Africa, 110 ppb in Australasia, 666 ppb in India, 126 ppb in America centrale; mentre in USA si registra un diverso livello di contaminazione per le regioni del Corn-Belt (2,5%; <1 ppb) e del Sud-Est (41%; 18 ppb) che, notoriamente, per ragioni climatiche, sono diversamente soggette a rischio di AFs. La strettissima dipendenza tra formazione di AFs nelle colture di mais infette e condizioni climatiche è apparsa evidente anche in Italia nel corso della stagione maidicola del 2003. Tale stagione è stata caratterizzata da elevate temperature da maggio a settembre (medie giornaliere di 28 °C per diversi giorni), con conseguenti lunghi periodi di siccità, che hanno favorito un esteso attacco delle spighe da parte di ceppi aflatossigeni, con il conseguente accumulo di AFs nel prodotto alla raccolta. Ne è derivato, a livello aziendale, un'incidenza di mangimi per lattifere (mediamente del 13%) con contenuti di AFB₁ superiori al limite massimo tollerabile fissato dalla UE (5 ppb), con un conseguente *carry over* di AFM₁ nel latte superiore a quello fissato dalla UE (50 ppt) nel 50-60% dei campioni esaminati dalle autorità competenti italiane (ASL), che pertanto ne decretarono la distruzione. Ma a parte queste eccezionali endemie, il problema della AFs nei prodotti cerealicoli (mangimi

e alimenti), non solo in Italia ma in tutta l'Europa, è strettamente legato alle importazioni di derrate cerealicole contaminate provenienti dalle aree più a rischio, che condizionano pertanto la sanità delle filiere cerealicole dei paesi importatori. A tal riguardo sono significative le numerose indagini condotte sia autonomamente, sia in commissioni congiunte (SCOOP) dai paesi della Comunità Europea (Miraglia et al., 1998; Logrieco e Visconti, 2004).

Le ocratossine (OTs) sono prodotte da specie di *Aspergillus* e di *Penicillium*. Tra le diverse specie di *Aspergillus* produttrici di OTs quelle più diffuse sono: alcuni ceppi di *A. ochraceus* (*A. alliaceus*), la maggior parte dei ceppi di *A. carbonarius* e altri pochi ceppi di *A. niger*. Tra le specie di *Penicillium* vi è essenzialmente *P. verrucosum*. Il composto più tossico delle OTs è l'ocratossina A (OTA), una nefrotossina che in relazione alla dose può anche spiegare attività immunotossica, cancerogena e genotossica. Tra i funghi ocratossigeni che colonizzano i cereali, vi sono: una popolazione di *A. ochraceus* diffusa nelle regioni temperate (intervallo di crescita 12-37 °C), che si sviluppa sulle derrate e sui prodotti cerealicoli per lo più in magazzino; e diversi ceppi di *P. verrucosum* che invece crescono bene a temperature inferiori a 25 °C su substrati non molto disidratati ($aw \geq 0,85$) e pertanto diffusi essenzialmente nelle regioni temperato-fredde del Nord Europa e del Canada sui cereali che alla raccolta hanno problemi di essiccamento prima dello stoccaggio e nel corso della conservazione. Tra i prodotti cerealicoli che con più frequenza vengono trovati contaminati da OTA vi sono sia le cariossidi in stoccaggio (frumento, orzo, avena, sorgo, mais riso), sia i relativi prodotti di filiera (farine, crusca, pane e altri prodotti da forno), anche se con un'incidenza piuttosto bassa (5-30%). Particolarmente contaminati sono i prodotti cerealicoli Europei (0,1-5.000 ppb) ma, anche se in minor misura, anche quelli prodotti in Africa (10-360 ppb), America (tracce-170 ppb) e Australasia (2,5-25 ppb). Particolarmente sentita è la contaminazione di OTA nei mangimi, con concentrazioni che raggiungono punte da 1 ppm nel Nord Europa, a 6 ppm nei cereali foraggeri in Canada, a 8 ppm in Egitto e fino a 7 ppm in Australasia. In Europa, associata alla presenza di OTA nei mangimi a base di cereali, è da ricordare la nefropatia endemica balcanica, una micotossicosi umana, analoga alla nefropatia micotossica dei suini, ricorrente nell'area dei Balcani (Castegnaro et al., 1991).

La sterigmatocistina (STG) è una micotossina epatotossica, la cui biosintesi è correlata con quella delle aflatossine, prodotta da numerose specie non solo di *Aspergillus*, ma anche di *Penicillium* e di altri genere fungini. Particolare importanza micotossicologica assume la formazione di STG da parte di ceppi di *A. versicolor* sia raramente nelle spighe dei cereali (frumento, orzo) in

occasione di andamenti climatici caldo-umidi alla raccolta e sia, più frequentemente, nelle granaglie mantenute in magazzino in condizioni di umidità favorevoli ai funghi tossigeni. Tracce di STG sono state ritrovate in più di una circostanza nel frumento e in altri cereali del commercio.

Micotossine di Claviceps

Le specie di *Claviceps*, e in particolare *C. purpurea* Tul., sono dei parassiti florali delle graminacee (“mal dello sclerozio dei cereali”), che trasformano l’ovario dell’ospite in uno sclerozio tossico. Tra le piante ospiti vi sono sia graminacee da granella (segale, frumento, orzo, avena, triticale, mais, riso, sorgo, miglio), sia numerose graminacee prative. Gli sclerozi, che si accompagnano alle cariossidi, contengono elevate quantità di alcaloidi tossici (fino all’1% del proprio peso) e ingeriti con gli alimenti contaminati sono causa di ergotismo. Nelle farine contaminate è possibile trovare diversi alcaloidi di *Claviceps*, come dimostrano i ritrovamenti di derivati dell’acido lisergico (ergotamina, ergometrina, ergocriptina, ergotina, ergocornina) nelle farine di frumento e di segale provenienti da colture attaccate da *C. purpurea* in Canada. Altri ritrovamenti riguardano i derivati della clavina (epoclavina, emyclavina) presenti nel miglio attaccato da *C. fusiformis* in India (Beardall e Miller, 1994).

Micotossine di Penicillium

Tra le micotossine di specie di *Penicillium*, alcune delle quali prodotte anche da specie di *Aspergillus*, vi sono in particolare: citrinina, citreoviridina, ciclocolorotina, luteoschirina, islanditossina e acido ciclopiazonico (Bottalico, 2004).

La citrinina (CIT) è una micotossina nefrotossica prodotta da numerose specie di *Penicillium* e da alcune specie di *Aspergillus*. Particolare importanza micotossicologica assume la produzione di CIT da parte di ceppi di *P. citrinum* agenti di ammuffimento (ingiallimento) del riso; e, di ceppi di *P. verrucosum* agenti di ammuffimento di cereali con contenuti di umidità a rischio (intorno al 18%). La CIT è stata trovata, sia da sola e sia più frequentemente assieme a OTA, nell’orzo e in altri cereali (frumento, mais, riso, avena, segale, sfarinati vari), colonizzati da ceppi ocratossigeni di *P. verrucosum*.

La citreoviridina (CTV) è una neurotossina prodotta da diverse specie di *Penicillium* e da una specie di *Aspergillus*. Di particolare importanza mico-

tossicologica è la produzione di CTV da parte di *P. citreonigrum*, agenti di ammuffimento (ingiallimento) del riso in magazzino; e, da ceppi di *Eupenicillium ochrosalmoneum* colonizzatori delle spighe di mais in campo. La CTV è stata trovata sia nel mais del commercio, sia in alimenti e mangimi.

Ciclocolorotina (CCT) e luteoschirina (LSC), sono due metaboliti di ceppi di *P. islandicum* agenti di ammuffimento (ingiallimento) del riso. Queste micotossine, assieme a citrinina, citreoviridina, eritroschirina, rugulosina e islanditossina, sono ritenute responsabili della “Sindrome da riso ingiallito” (“*Yellowed rice toxicosis*”) delle popolazioni orientali. Di tale sindrome complessa, la CCT e la LSC sarebbero responsabili rispettivamente della sintomatologia cancerogena ed epatotossica.

L'acido ciclopiazonico (CPA) è prodotto da diverse specie di *Penicillium* e di *Aspergillus* di interesse agro-alimentare. Tra le specie fungine produttrici di CPA nei cereali vi sono *P. comune* e alcuni ceppi aflatossigeni di *A. flavus*. L'acido ciclopiazonico è stato trovato in campioni di mais e di miglio, ed è stato anche coinvolto in India in una neurotossicosi umana associata al consumo di miglio ammuffito.

Micotossine di Alternaria

La specie che riveste qualche significato micotossicologico per i cereali è *A. alternata* (= *A. tenuis*), agente di nerume delle spighe di frumento e di altre graminacee. Tra i metaboliti di interesse vi sono l'acido tenuazonico e gli alternarioli (alternariolo ed etere metilico dell'alternariolo), dei quali però, in mancanza di dati tossicologici più completi, non è possibile definire il potenziale micotossicologico. L'acido tenuazonico e gli alternarioli sono stati a volte trovati associati in campioni di frumento, sorgo e mangimi (Bottalico, 2004).

PERSISTENZA DI MICOTOSSINE NEI PRODOTTI CEREALICOLI

Le micotossine sono dei composti molto stabili e persistono nei prodotti contaminati anche per molto tempo dopo la morte del fungo produttore. Inoltre, le micotossine non vengono completamente allontanate o distrutte con i normali processi di decontaminazione e di detossificazione impiegati dalle industrie alimentari, di natura fisica (cernita, calore, radiazioni), chimica (estrazione, raffinazione) e biologica (fermentazione). Pertanto le stesse micotossine o loro derivati ancora attivi si possono ritrovare negli alimenti e nei mangimi

cerealicoli, ottenuti con ingredienti contaminati, e nei prodotti delle fermentazioni (prodotti da forno, birra, brodi amilacei). La presenza di micotossine nei mangimi non ha solo effetti negativi sulla salute degli animali in produzione zootecnica e quindi sulla loro produttività, ma può portare al passaggio (*carry over*) di micotossine o di loro derivati ancora attivi nei prodotti zootecnici. Tale eventualità ha una notevole portata pratica per il latte e i prodotti lattiero-caseari, è temibile per alcune carni (reni, fegato), mentre è trascurabile per le carni in generale e per le uova. Di seguito vengono riportati alcuni dati analitici sulla persistenza delle micotossine, limitatamente alle fusariotossine che sono quelle più largamente formate nelle colture in campo e più diffuse alle nostre latitudini. Nelle tabelle 4 e 5 vengono riassunti alcuni dati più rappresentativi sulla presenza di micotossine di *Fusarium* nei cereali dei paesi europei e sulle derrate cerealicole più contaminate da micotossine di *Fusarium* in Europa.

In considerazioni dell'importanza alimentare delle derrate cerealicole, sono molto numerose le indagini condotte sulla persistenza delle micotossine nei mangimi e negli alimenti della filiera cerealicola, con particolare riguardo a quelli derivati da mais e dal frumento. Il mais, per essere la coltura più diffusa nelle aree geografiche costantemente soggette a rischio di micotossine e, per essere utilizzato come alimento di base in numerosi paesi è tra quelli che ha ricevuto le maggiori attenzioni. In effetti, in relazione alle aree di coltivazione, il mais e gli alimenti/mangimi derivati possono essere contaminati da AFs nelle regioni tropicali e subtropicali, o da fusariotossine (DON e FMs) nelle regioni temperate. Il DON, che si forma nel frumento in pre-raccolta, si riscontra con elevata frequenza nelle farine, pane, biscotti, crusca, germe, e varie preparazioni con cereali (snack, merendine, breakfast, paste alimentari) destinati anche alla prima infanzia. L'OTA presente nell'orzo e in altri cereali, in alcune particolari regioni europee (regioni europee settentrionali, Balcani), rappresenta un grave problema per la sua persistenza nei mangimi, soprattutto per gli allevamenti di maiale, ma con notevoli risvolti anche per la salute umana. Tra gli altri ritrovamenti più frequenti vi sono: OTA e CIT nel pane e in altri prodotti da forno; AFs negli spaghetti e in altre paste alimentari (Bottalico, 2004). Alcuni degli aspetti più significativi della persistenza delle micotossine nella filiera cerealicola sono qui di seguito esemplificati.

Il DON è molto resistente al calore e si ritrova quasi inalterato negli alimenti da forno (pane, merendine, semole, biscotti, cracker, cereali per breakfast, fiocchi, popcorn, fette biscottate ed estruse), come dimostrano i monitoraggi condotti in Argentina (93%, 0,2-2,8 ppm), in USA e Canada (50%, tracce-0,18 ppm), e in Europa. A quest'ultimo riguardo, sono significativi i dati riportati in una recente indagine condotta in Germania,

dove il DON è stato trovato: nella farina di frumento (98%, fino a 1,38 ppm), nella crusca di frumento (85%, fino a 2,1 ppm), farina integrale di frumento (100%, fino a 1,379 ppm), farina di segale (85%, fino a 0,167 ppm), pane (90%, fino a 0,69 ppm), spaghetti (91%, fino a 4,84 ppm), semoline di frumento (86%, fino a 1,26 ppm), pasta alimentare 10%, fino a 0,84 ppm), fiocchi di cereali (30%, fino a 0,598 ppm), malto (fino a 0,451 ppm), birra (fino a 0,123 ppm) e, in modo davvero preoccupante, negli alimenti cerealicoli per l'infanzia (79%, fino a 0,517 ppm). Il DON è anche molto resistente alle tecniche di preparazione dei mangimi, e si ritrova anche in elevate concentrazioni (fino a 15 ppm) nei formulati a base di cereali, che giustificano la frequente comparsa di sindrome emetica in forma acuta negli allevamenti zootecnici, soprattutto di maiali (Logrieco e Visconti, 2004; Bottalico, 2004).

Nei prodotti cerealicoli del commercio (cariossidi e sfarinati di frumen-

FUSARIOTOSSINE (b)	PAESI PARTECIPANTI (c) NO.	CAMPIONI ESAMINATI NO.	CAMPIONI POSITIVI %
Tricoteceni di tipo B:			
- DON	11	11.022	57
- NIV	7	4.166	16
- 3-AcDON	6	3.721	8
- 15-AcDON	3	1.954	20
- FUS	3	1.872	10
Tricoteceni di tipo A:			
- T2	8	3.490	20
- HT2	6	3.032	14
- T-2 triol	2	1.389	6
- NEOS	2	1.323	1
- DAS	3	1.886	4
- MAS	1	853	1
Zearalenone	9	5.018	32
Fumonisine:			
- FB ₁	9	3.863	46
- FB ₂	6	1.010	42
- FB ₃	1	239	36

Tab. 4 *Presenza di micotossine di Fusarium nei cereali dei paesi europei (a)*

(a) – Dati ripresi da SCOOP (2003).

(b) – Per le abbreviazioni vedere l'elenco in nota all'inizio del lavoro.

(c) – Paesi europei partecipanti alla Cooperazione Scientifica (SCOOP 2003): Austria, Belgio, Danimarca, Finlandia, Francia, Germania, Irlanda, Italia, Olanda, Norvegia, Portogallo, Svezia e Regno Unito.

FUSARIOTOSSINE (b)	CARIOSSIDI E ALIMENTI (IN PARENTESI LA PERCENTUALE DEI CAMPIONI POSITIVI)
Tricoteceni di tipo B: - DON - NIV - 3-AcDON	mais (89%), frumento* (61%). mais (35%), avena (21%), frumento* (14%). mais (27%), frumento* (8%).
Tricoteceni di tipo A: - T2 - HT2	mais (28%), frumento (21%), avena (21%). avena (41%), mais (24%), segale* (17%).
Zearalenone	mais (79%), semole di mais (51%), prodotti a base di mais (53%), frumento (30%), farine di frumento (24%), prodotti a base di frumento (11%), cereali per l'infanzia (23%).
Fumonisine: - FB ₁ - FB ₂	mais (66%), semole di mais (79%), prodotti a base dei mais (31%), fiocchi di mais (46%), frumento (79%) mais (51%).

Tab. 5 *Derrate cerealicole più contaminate da micotossine di Fusarium in Europa (a)*
 (a) – Dati ripresi da SCOOP (2003). Paesi europei partecipanti alla Cooperazione Scientifica (SCOOP): Austria, Belgio, Danimarca, Finlandia, Francia, Germania, Irlanda, Italia, Olanda, Norvegia, Portogallo, Svezia e Regno Unito.
 (b) – Per le abbreviazioni vedere l'elenco in nota all'inizio del lavoro.
 (*) – Cariossidi e farine.

to, avena, orzo, segale, triticale, mais, riso) si riscontano anche presenze di tricoteceni di tipo A. Presenze anche elevate di T2 nelle derrate cerealicole alimentari sono state rilevate in Europa (fino a 4,4 ppm), Australasia (fino a 15 ppm) e America (fino a 25 ppm), nonché nei mangimi in Canada (fino a 2,5 ppm) e in Europa (fino a 5,8 ppm). Comunque, merita sottolineare che la tossina T-2 e altri tricoteceni di tipo A, forse perché presentano ancora notevoli difficoltà di analisi, non vengono riscontrati nei mangimi sospetti di indurre sintomatologie riferite a queste micotossine con quella frequenza che ci si aspetterebbe (CAST, 2003, Bottalico, 2004).

Anche lo ZEN è una micotossina piuttosto stabile al calore e si ritrova di frequente nelle derrate alimentari della filiera cerealicola. In un'indagine condotta in Francia su 115 campioni di alimenti a base di mais ha portato al ritrovamento di ZEN nel 56% dei campioni di polenta (media 16,3 ppb) e nel 3% dei biscotti per la colazione (media 14 ppb) con la più alta concentrazione in un campione di mais tostato e salato (66 ppb). In generale la presenza di ZEN nei prodotti cerealicoli non raggiunge quasi mai la concentrazione soglia (1 ppm) per la comparsa dell'iperestrismo in forma acuta, anche se sono più da temere le micro-contaminazioni a cui si associano manifestazioni di ipofertilità e altre turbe di carattere ormonale. Comunque non è raro incontrare contaminazioni

ben più elevate, come quelle a volte riscontrate in Europa (fino a 40 ppm), soprattutto nei mangimi, che giustificano i casi ricorrenti di iperestrismo negli allevamenti di maiale (CAST, 2003, Bottalico, 2004).

Oltre che nelle cariossidi di mais, le FMs si ritrovano anche in elevate concentrazioni sia nelle frazioni della molitura, sia nei prodotti alimentari. In Germania, le FMs sono state trovate in alimenti a base di mais (80%, fino a > 1 ppm), nelle farine di mais (polenta) (fino a 16 ppm), nel popcorn (fino a 1,6 ppm) e nei fiocchi di mais (fino a 0,13 ppm, Logrieco e Visconti, 2004).

MISURE DI LOTTA DI CARATTERE AGRONOMICO

Gli interventi contro le contaminazioni fungine e la formazione di micotossine nelle piante infette, nelle derrate agrarie e nelle filiere delle preparazioni alimentari, possono essere di carattere preventivo, curativo, legislativo e sanitario. In considerazione dell'elevata resistenza delle micotossine ai più comuni mezzi fisici, chimici e biologici di preparazione, conservazione e sanificazione dei prodotti alimentari, nonché dei costi aggiuntivi che tali strategie comportano, gli interventi più efficaci contro la formazione e la diffusione delle micotossine sono essenzialmente di carattere preventivo. Le strategie preventive per contenere la formazione delle micotossine assumono un significato particolare per quei composti che si formano in pre-raccolta o nel corso delle operazioni di raccolta, nelle colture infette ancora in pieno campo o nei raccolti non ancora immagazzinati, da parte di funghi fitopatogeni produttori di micotossine (tossigeni). In effetti, almeno per quanto riguarda i cereali, la maggior parte dei problemi micotossicologici hanno origine nelle colture in campo, e le strategie per la loro risoluzione sono dirette essenzialmente a prevenire le infezioni delle piante da parte dei funghi tossigeni, con particolare attenzione alla formazione di DON nel frumento e negli altri cereali microtermini, e alla formazione di AFs, DON e FMs nel mais e in altri cereali macrotermini. Tra i mezzi di lotta preventivi vi sono essenzialmente due ordini di strategie, che riguardano rispettivamente: l'insieme delle pratiche culturali e gli interventi di ordine genetico.

Agrotecnica e contaminazioni da micotossine

L'insieme delle pratiche colturali da mettere in atto per ridurre le contaminazioni da micotossine nei raccolti, derivano direttamente dalla conoscenza della epidemiologia degli agenti tossigeni e sono intese a contrastare lo sviluppo

delle infezioni. In particolare, i diversi accorgimenti da considerare sono gli stessi da mettere in atto per contrastare lo sviluppo della maggior parte delle fitopatie, e nel contempo per evitare condizioni di stress alle piante, con particolare riferimento a: lavorazione e preparazione del terreno; rotazione colturale; semina (epoca, modalità e densità); fertilizzazione (azotata); irrigazione; difesa fitosanitaria e controllo delle malerbe; e, raccolta (epoca, essiccamento, stoccaggio).

Fruento e altri cereali microtermi. L'andamento climatico resta uno dei fattori di rischio principale, poiché influenza sia la maturazione dell'inoculo, sia le infezioni alle spighe in fioritura, sia il successivo sviluppo dei funghi tossigeni. È stato stimato che in condizioni climatiche favorevoli agli attacchi di fusariosi alle spighe, il contenuto di DON nella granella può arrivare fino a 1,25 ppm, con un fattore di moltiplicazione pari a 5,2 rispetto a situazioni con andamenti climatici non favorevoli. Per quanto riguarda l'influenza della coltura precedente, si ricorda che la maggior parte dei funghi tossigeni sopravvive sui residui colturali e la gestione di tali residui sulla superficie dei terreni mediante le lavorazioni e le rotazioni colturali assume aspetti importanti per una strategia di contenimento delle micotossine. Nel caso del frumento, in successione al mais, appare determinante una buona preparazione del letto di semina con lavorazioni profonde per l'interramento dei residui. Infatti, poiché i ceppi di *F. graminearum* e di *F. culmorum* agenti di FEB su frumento sono gli stessi che causano il marciume rosso della spiga di mais, la permanenza o l'insufficiente interrimento dei residui della coltura di mais, rappresentano un pericoloso serbatoio di inoculo per la successiva coltura del frumento e viceversa. I livelli di DON nel frumento sono risultati notevolmente superiori nel caso di una successione con mais rispetto a quella con patata, barbabietola, girasole o colture prative. È stato stimato che in caso di precessione con mais o sorgo da granella, il contenuto di DON nel frumento può raggiungere livelli di 1,02 ppm, con un fattore di moltiplicazione di 4,6 rispetto a precessioni con altre colture (fino a 0,22 ppm) e di 2 anche nel caso di mais e sorgo da foraggio (fino a 0,52 ppm). Il problema dei residui assume aspetti drammatici nel caso di semine di frumento su sodo o di lavorazioni minime in successione a mais. A tal riguardo è stato stimato che in mancanza di adeguate lavorazioni, si può raggiungere livelli di DON nel frumento di 1,51 ppm, con un fattore di moltiplicazione di 5 rispetto a situazioni in cui si è operato con l'interramento dei residui colturali (Campagna et al., 2005).

Modelli predittivi per le contaminazioni del frumento da DON. La valutazione

dei diversi fattori che influenzano gli attacchi di fusariosi al frumento e il conseguente accumulo di DON, ha portato in Francia e in Germania allo sviluppo di modelli previsionali che tengono conto del rischio derivante dalla concomitanza sfavorevole di uno o più fattori. Uno dei modelli più elaborati considera in particolare: sia le condizioni climatiche all'epoca della fioritura (temperatura e umidità dell'aria durante lo stadio della botticella e dell'antesi; sia alcuni tra i più importanti fattori agronomici, tra cui: tipo di coltura precedente (con il mais tra quelle più predisponenti; sia del sistema di coltivazione), la semina su sodo o con lavorazioni minime, tra quelle più predisponenti; e, sia della suscettibilità varietale. A tal riguardo è stato costruito un modello previsionale a ideogrammi con sei classi di rischio, corrispondenti a un'attesa di presenze di DON nelle spighe infette di: 30, 60, 120, 315 e 1.220 ppb. Ogni ideogramma, rappresentativo di ciascuna classe di rischio, è composto da segmenti corrispondenti ai diversi fattori predisponenti. L'ideogramma con la classe di rischio più elevata (1.220 ppb di DON) comprende: coltura precedente mais o (che è quella più predisponente); lavorazioni minime o semina su sodo (che non assicurano l'interramento dei residui della coltura precedente e quindi non evitano un'elevata presenza di inoculo del fungo); eccessive fertilizzazioni azotate che prolungano lo stadio fenologico di suscettibilità alle infezioni floreali; andamento climatico caldo-umido (piovigginoso) alla fioritura che favorisce le infezioni floreali da parte di *F. graminearum*; varietà di frumento suscettibili alle fusariosi. Per contro, la classe di rischio più bassa (30 ppb di DON) comprende: coltura precedente barbabietola o patata o leguminose); buona preparazione del letto di semina, con interrimento dei residui della coltura precedente (che assicura l'abbattimento del livello di inoculo); fertilizzazioni azotate equilibrate nella fase di "levata"; andamento climatico fresco-asciutto alla fioritura, poco favorevole alle infezioni floreali; varietà di frumento resistenti alla fusariosi. A quest'ultimo riguardo è stato notato che la resistenza alla fusariosi ha il suo peso solo in presenza di inoculo non molto elevato (Barrier-Guillot et al., 2004).

Mais e altri cereali macrotermi. Per quanto riguarda il mais invece, non è stata osservata nessuna correlazione tra coltura precedente e il livello di micotossine, sia nel caso di marciume rosso della spiga causato da *F. graminearum*, sia nel caso di marciume rosato causato da *F. verticillioides* e *F. proliferatum* e sia nel caso di infezioni da parte di ceppi aflatossigeni di *A. flavus* e *A. parasiticus*. Tale mancata correlazione non dipenderebbe da una minore sopravvivenza dell'inoculo nei residui, ma piuttosto dall'elevato gradiente di dispersione di tali agenti tossigeni, che attenuerebbe il peso dell'inoculo presente nel campo sull'inciden-

za delle infezioni (Munkwold, 2003). Pertanto, per il mais, la contaminazione da micotossine dipende più dalla concomitanza favorevole dei fattori che determinano l'incidenza delle infezioni, quali: la suscettibilità dell'ospite, le condizioni ambientali e, in alcuni casi, l'attività degli insetti vettori. Per esempio, per quanto riguarda le fumonisine nel mais in Italia, epoche di semina che tengano conto dell'areale di coltivazione (anticipate in quelli nordici più freddi) e della classe di maturità (anticipate per gli ibridi a ciclo lungo) possono contenere il livello di contaminazione. Anche la densità di semina, che influenza le condizioni microclimatiche nell'interno della coltura, a investimenti superiori a 8 piante/mq, può determinare aumenti significativi non solo di *F. verticillioides* e di FBs, ma anche di *F. graminearum* e quindi di DON e ZEN. Per quanto riguarda l'influenza della concimazione azotata, apporti equilibrati compresi tra 200 e 300 kg/ha assicurerebbero il miglior contenimento di FBs, dosi superiori ne favorirebbero un loro maggior accumulo assieme a DON e ZEN, mentre una carenza di azoto causerebbe uno stress delle piante con formazione non solo di fusariotossine ma anche di AFs. Per quanto riguarda il regime irriguo, è noto che gli stress idrici esasperano gli attacchi di *A. flavus* e l'accumulo di AFs. Meno evidente è l'effetto del regime idrico sull'accumulo delle FBs, mentre l'effetto del rifornimento idrico sembra essere più evidente per DON e ZEN i cui accumuli sono favoriti nelle piante che prolungano lo stadio vegetativo. Sebbene sia i ceppi di *Aspergillus* produttori di AFs, sia i ceppi di *Fusarium* produttori di FBs sono capaci di infezioni fiorali e di causare la colonizzazione delle spighe, l'attacco di insetti fitofagi alle spighe (*Ostrinia* spp., *Sesamia* spp) potenzia enormemente la diffusione di questi funghi tossigeni e l'accumulo delle relative micotossine. L'azione dei fitofagi sembra essere meno evidente sulla diffusione dei ceppi fungini produttori di TTs e ZEN. In generale, un anticipo nella raccolta risulta in un minor contenuto di micotossine, mentre il ritardo, che a volte è volutamente cercato per contenere i costi dell'essiccamento delle cariossidi, può comportare un accumulo di FBs, DON e ZEN. Soprattutto negli ibridi più tardivi, che mantengono più a lungo elevati contenuti di umidità della granella, lo sviluppo di *Fusarium* e di *Aspergillus* tossigeni è favorito anche dalla prolungata attività dei fitofagi (Munkwold, 2003). Nel corso della raccolta sono da evitare tutte le operazioni che compromettono l'integrità delle cariossidi, le cui eventuali lesioni rappresentano facili vie di ingresso ai funghi tossigeni.

Dopo la raccolta, notevole importanza assume la riduzione del contenuto di umidità delle cariossidi fino a livelli di sicurezza ($\leq 13\%$, $a_w \leq 0,70$), ritenuti incompatibili con la crescita fungina. Nel caso di granella con evidenti attacchi di scabbia, i migliori risultati si ottengono con essiccatoi a temperature elevate per ridurre i tempi necessari ad abbattere l'umidità e minimizzare

i rischi di progressivi accumuli di fusariotossine.

Resistenza genetica per il controllo delle fusariotossine. Gli interventi genetici per aumentare la resistenza dei cereali alle fusariosi e alla formazione di fusariotossine possono riguardare sia il miglioramento della resistenza nativa, con l'introduzione di caratteri specifici di resistenza, sia il potenziamento del corredo genico mediante l'introduzione transgenica di nuovi caratteri di resistenza (Munkvold, 2003). Questo argomento viene qui di seguito solo accennato, ma data la sua enorme importanza sicuramente meriterebbe una sua presentazione particolare più completa.

Resistenza nativa. Per quanto riguarda l'impiego di varietà resistenti ai funghi fitopatogeni e tossigeni, che appare la strategia più risolutiva, qualche progresso è stato ottenuto nella ricerca di varietà di frumento resistenti a ceppi di *Fusarium* produttori di DON e quindi all'accumulo di questa tossina. Tale strategia però, sembra funzionare solo in ambiente con basso inoculo fungino e in condizioni climatiche poco favorevoli al patogeno. Parziali risultati di miglioramento della resistenza ai funghi tossigeni sono stati ottenuti anche nel caso del mais (Munkvold, 2003).

Resistenza transgenica. Le attuali strategie sono indirizzate all'ottenimento di piante geneticamente modificate, percorrendo essenzialmente due direzioni: sviluppare la resistenza alle infezioni da *Fusarium* e da altri funghi fitopatogeni; e sviluppare piante con la capacità di detossificare le micotossine *in planta*. Sono un esempio gli ibridi di mais *Bt* che contengono i geni trasferiti da *Bacillus thuringensis*, che sovrintendono alla sintesi di entomotossine attive per ingestione verso le larve di piralide (*Ostrinia* spp., *Sesamia* spp.) e verso numerosi altri insetti parassiti. La presenza di tali geni in ibridi transgenici di mais, rendendo le piante resistenti alla piralide, portano in definitiva anche a un contenimento delle infezioni di *F. verticillioides* (di cui la piralide è un'attiva disseminatrice) e di FBs. Purtroppo, tale tecnica non riduce le infezioni di altre specie di *Fusarium*, come *F. graminearum* e *F. culmorum*, che portano all'accumulo di DON. Sono anche in corso di realizzazione pratica i buoni risultati ottenuti sul trasferimento in ibridi di mais dei geni della degradazione enzimatica di FB₁ dal lievito *Exophiala spinifera*. Tali ibridi di mais transgenici, pur rimanendo suscettibili alle infezioni di *F. verticillioides*, sembrano contenere notevolmente i livelli di FB₁ nelle spighe colonizzate (Munkwold, 2003).

DIAGNOSTICA MICOLOGICA MOLECOLARE E BIODIVERSITÀ

Diagnosi molecolare di funghi tossigeni

L'identificazione delle più importanti specie di funghi tossigeni è ancora basata principalmente su caratteristiche morfo-colturali, che utilizzano substrati di arricchimento e substrati selettivi. L'identificazione viene effettuata mediante analisi morfologiche, quali: sviluppo vegetativo del micelio; forma, dimensioni e colorazione delle colonie; presenza e colore di micelio aereo; presenza, differenziazione e morfologia delle strutture di moltiplicazione agamica (conidiofori, conidi, conidiogenesi, clamidospore) e gamica (ascospore). Nonostante i numerosi tentativi di perfezionamento delle classificazioni morfo-tassonomiche, l'identificazione delle diverse specie nell'ambito di ciascun genere e, se si vuole di particolari ceppi tossigeni nell'ambito della stessa specie, risulta alcune volte difficile e comunque soggettiva. Pertanto, sono state sviluppate tecniche molecolari, basate sull'analisi degli acidi nucleici, per una diagnosi rapida e altamente specifica dei funghi tossigeni, al passo con le esigenze di una corretta identificazione nella prevenzione del rischio micotossicologico nella filiera cerealicola.

I nuovi sistemi basati sull'analisi molecolare di DNA, finalizzati alla costruzione di sonde nucleiche specifiche, rappresentano uno strumento rapido e attendibile per il monitoraggio in tempo reale dei funghi tossigeni. L'identificazione basata su tecniche molecolari presenta, rispetto a quella morfo-tassonomica notevoli vantaggi, tra cui: elevata specificità e ripetibilità; semplicità di esecuzione e rapidità di risposta; assenza di variabilità legata al ciclo di sviluppo del fungo da identificare e alle condizioni ambientali; e, la possibilità di analisi contemporanea di diversi loci in ogni ceppo da analizzare, indipendentemente dalla loro espressione fenotipica, che è legata a una particolare fase del ciclo vitale o a particolari strutture somatiche.

Tra le diverse tecniche attualmente in via di perfezionamento per un'analisi qualitativa e quantitativa della contaminazione fungina meritano di essere ricordate: la PCR (reazione di polimerizzazione a catena); la DNA-DNA ibridizzazione; l'analisi dei polimorfismi di restrizione (AFLP); e la PCR *real-time* (Mulè et al., 2002; 2004).

La PCR è uno strumento di diagnosi che, mediante l'utilizzo di *primers* specifici, consente di identificare direttamente alcune più importanti specie fungine tossigene, e i relativi geni coinvolti nella biosintesi delle micotossine. Di particolare interesse pratico è la realizzazione di kit diagnostici commercializzabili, volti alla identificazione di funghi tossigeni nelle matrici alimentari vegetali. Tali kit diagnostici dovrebbero consentire sia l'identificazione di singole specie, mediante l'impiego di sonde specifiche per una determinata

specie (*species-specific primers*), sia l'identificazione di un gruppo di specie, mediante l'impiego di marker multipli (*multiplex assay*), e sia per l'identificazione di gruppi di specie tossigene produttrici di un determinato gruppo o sottogruppo di tossine (*toxigenic-group primers; chemotype-specific primers*). *Primers* specie-specifici sono stati sviluppati per l'identificazione di *F. graminearum* e di *F. culmorum* (impiegando la tecnica SCAR); per la distinzione tra *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* (utilizzando il gene della calmodulina) e per *F. cerealis*, *F. sambucinum*, *F. torulosum* e *F. venenatum*. Le osservazioni sui geni coinvolti nella via biosintetica di alcune micotossine hanno consentito di chiarire, mediante diverse tecniche tra cui la *Differential display PCR* (DDRT-PCR), la cinetica della biosintesi di tali tossine, rilevando la differente espressione dei geni nei diversi ceppi. Attualmente sono disponibili diversi *primers* in grado di discriminare produttori di tricoteceni del tipo A da quelli del tipo B, alti e bassi produttori di DON e NIV (Mulè et al., 2002; Knoll et al., 2002); e rilevare eventuali similarità tra specie produttrici di tricoteceni, per es. tra ceppi *F. sporotrichioides* e di *F. langsethiae* entrambi produttori di tricoteceni di tipo A (Niessen et al., 2004). Tecniche PCR più raffinate, basate sulle variazioni di sequenze del gene della β -tubulina (*tub-1*) ottenute con nuovi metodi di denaturazione (DGGE) e di amplificazione (ARMS) consentono, mediante un tetra-primer ARMS-PCR di due frammenti di *tub1*, di differenziare tra loro *F. sporotrichioides*, *F. poae* e *F. langsethiae* anche se in miscela e in presenza di DNA dell'ospite (frumento, avena, mais), con possibilità di rilevare *F. langsethiae* direttamente nell'ospite infetto (Mach et al., 2004).

Le reazioni di ibridizzazione e l'analisi di sequenza dei geni possono dare utili informazioni non solo per l'identificazione delle specie e per gli studi di filogenesi, ma anche per evidenziare alcune caratteristiche fisiologiche dei funghi tossigeni, come la produzione di metaboliti tossici. In effetti, i geni codificati dal DNA ribosomiale e le regioni spaziatriche comprese tra essi, sono un interessante bersaglio per l'identificazione molecolare e per studi filogenetici, poiché sono presenti con un alto numero di copie, possiedono sequenze sia altamente conservate sia variabili, che possono essere amplificate con primer universali basati sulle sequenze conservate. Mediante l'analisi della sequenza nucleotidica dell'rDNA di alcune specie tossigene di *Fusarium* è stato possibile distinguere due gruppi di specie produttrici di tricoteceni, corrispondenti ai produttori di tricoteceni di tipo A (T2 e derivati) e di tipo B (DON e derivati). Inoltre, i geni codificanti per l'rRNA ribosomiale (rRNA) 5.8S, 18S e 28S sono di solito organizzati in tandem, identicamente ripetuti con 60-200 copie di genoma aploide. Nonostante l'elevata conservazione dei geni dell'rRNA, essi possono essere portatori di sufficienti

variazioni che ne permettono l'utilizzo come target in applicazioni di diagnostica e tassonomia fungina. Un più elevato tasso di variabilità delle sequenze sussiste invece nelle regioni spaziatrici (ITS, NTS, IGS) dei geni codificanti per l'rRNA; che meglio si prestano a essere utilizzate per discriminare i funghi tossigeni a livello di specie e sottospecie. A tal riguardo, Zur et al. (1999) hanno individuato nella regione che comprende ITS1, 5.8S e ITS2 alcuni primers in grado di rilevare la presenza di specie di *Alternaria* in matrici alimentari. Inoltre le sequenze delle regioni spaziatrici ITS 1 e 2 e di parte della IGS dei geni codificanti per l'rDNA, nonché di parte del gene della β -tubulina hanno consentito di separare la nuova specie *F. langsethiae* da *F. sporotrichioides* e da *F. poae*, e di stabilire le relazioni filogenetiche tra questi diffusi agenti tossigeni di fusariosi dei cereali microtermi dell'Europa settentrionale (Yli Mattila et al., 2004). L'analisi delle sequenze del gene nucleare EF-1 α , che dimostra di possedere molte informazioni filogenetiche, hanno anche chiarito che *F. langsethiae* è filogeneticamente più vicino a *F. sporotrichioides*, con il quale condivide la capacità di produrre tricoteceni di tipo A, che non con *F. poae* con il quale invece condivide più alcuni caratteri morfologici (Knutsen et al., 2004). L'analisi di sequenza di diversi geni di *F. graminearum*, ha consentito di individuare in seno a questa specie ben sette *lineages*, in relazione alla loro provenienza geografica; e mediante l'analisi genica (28S rDNA, ITS, mtSSU e β -tubulina) di delineare nuove entità specifiche all'interno della specie complessa *Gibberella fujikuroi* (O'Donnell et al., 2000a, 2000b). La disponibilità di numerose informazioni geniche consente lo screening simultaneo di un gran numero di sequenze, mediante la costruzione di *bio-chips*, cioè di un supporto (in genere silicio, plastica o vetro) sul quale vengono immobilizzate diverse centinaia o migliaia di molecole organiche di varia natura (oligonucleotidi di DNA o di RNA complementare) definite sonde, riconosciute a loro volta attraverso l'ibridizzazione selettiva del DNA target (con *microarray*, Logrieco et al., 2005). Si tratta di sonde specifiche per la specie o il genere di un determinato microrganismo, che consentono quindi di riconoscere tutti i ceppi di una stessa popolazione tossigena, senza formare ibridi con altre popolazioni. Pertanto, la tecnica si presenta rapida, specifica e con possibilità di automatizzare o robotizzare le analisi.

Anche la tecnica di analisi dei polimorfismi del DNA, consente di esaminare contemporaneamente più loci e quindi di identificare i funghi a livello di specie e di genere. Il metodo si basa sull'amplificazione selettiva di gruppi di frammenti di restrizione generati dal DNA genomico (*Amplified fragment length polymorphism* = AFLP). Sebbene tale tecnica non abbia uno specifico bersaglio all'interno del genoma, l'elevato numero di loci che possono essere analizzati in una singola osservazione, aumenta notevolmente la possibilità di identificare il microrganismo. Questa tecnica, in congiunzione

con l'amplificazione delle regioni spaziatrici (ITS-RFLP; IGS-RFPL) IGS, è stata impiegata con successo nello studio della variabilità genetica di diverse specie di *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. cerealis*, *F. tricinctum*, *F. poae*, *F. equiseti*, *F. torulosum*); e, più recentemente, nel separare tra loro le tre entità tassonomiche più importanti della Sezione *Sporotrichiella* di *Fusarium*: *F. sporotrichioides*, *F. poae* e *F. langsethiae*, distinguendo in particolare *F. langsethiae* da *F. sporotrichioides*, essendo esse confondibili per la stessa capacità tossigena (Schmidt et al., 2004; Konstantinova e Yli-Mattila, 2004).

La *real-time* PCR utilizza sonde molecolari con elevati gradi di specificità, che consentono contemporaneamente una valutazione sia qualitativa sia quantitativa degli amplificati. La tecnica consente di determinare la quantità iniziale del DNA target e quindi di quantizzare non solo la presenza dei funghi tossigeni ma, con opportune correlazioni, anche la presenza di tossina. Una preliminare applicazione di questa tecnica ha consentito di identificare e quantizzare la presenza di *Fusarium* tossigeni in matrici alimentari e di stimare la concentrazione di tricoteceni (Waalwijk et al., 2004). In particolare utilizzando la reazione TaqMan gli autori sono riusciti a identificare, quantizzare e studiare la dinamica dei principali agenti di FEB dei cereali, quali *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* e *F. poae*, nel corso della stagione vegetativa dei cereali attaccati.

Una banca dati per l'identificazione di specie di *Fusarium* (FUSARIUM-ID), basata sulle sequenze del gene nucleare EF-1 α (*translation elongation factor*, TEF), è stata recentemente resa disponibile in rete. Tale banca dati consiste in circa 200 sequenze TEF filogeneticamente diverse, proposte per la identificazione di diversi gruppi di specie, tra cui: circa 30 entità tassonomiche della specie complessa *G. fujikuroi*; diverse specie e numerose linee delle specie complesse *F. solani*, e *F. oxysporum*; nonché le specie di *Fusarium* produttrici di tricoteceni di tipo A; e, le specie di *Fusarium* produttrici di tricoteceni di tipo B (Geiser et al., 2004).

Biodiversità dei funghi tossigeni

Il tema della ricognizione, identificazione, conservazione e uso sostenibile delle risorse biologiche, intese come espressione di diversità di organismi sulla Terra in termini genetici ed ecologici, è al centro dell'attenzione di Organismi internazionali e nazionali sia politici sia scientifici. In questo ambito, la diversità dei funghi ha un posto di grande rilievo. Il numero davvero notevole

delle specie fungine e la vasta diffusione nei diversi eco-ambienti terrestri sono alla base della loro importanza fondamentale nell'equilibrio e nel funzionamento dei diversi ecosistemi. In tale contesto, le popolazioni fungine rappresentano sicuramente una fonte di studio estremamente interessante sia perché sono fra le più ubiquitarie che si conoscano, sia per la loro multiforme espressione genica e sia, non per ultimo, per l'elevata capacità di produrre metaboliti secondari. Tra gli strumenti utilizzabili per indagare simile diversità vi sono diverse tecniche morfotassonomiche, molecolari e biochimiche, che consentono un approccio poli-fasico utile a individuare differenze sia intra-specifiche fra i ceppi appartenenti alle popolazioni fungine studiate. Di particolare importanza per lo studio della biodiversità fungina sono i parametri ambientali che caratterizzano i diversi eco-sistemi e che influenzano lo sviluppo delle singole specie, le loro interazioni e che contribuiscono alla formazione di specifiche nicchie di sviluppo.

La disponibilità di una collezione di micromiceti produttori di metaboliti bioattivi, oltre a costituire un'importante riserva di biodiversità microbica, offre la possibilità di numerose potenziali applicazioni biotecnologiche. In effetti, tali metaboliti stanno acquistando sempre più interesse sia per gli aspetti scientifici, sia per quelli socio-economici. Si tratta di composti dotati di notevolissime potenzialità di applicazione pratica, in numerosi campi, fra cui il fitopatologico, il micotossicologico, l'agro-industriale e il farmaceutico. Pertanto la raccolta, la collezione e la caratterizzazione dei ceppi più interessanti, sia per studi tassonomici e filogenetici e sia per una loro potenziale valorizzazione, sembra essere alla base per ogni ulteriore sviluppo di interesse micologico. Merita ricordare che a tale riguardo presso l'ISPA è stata costituita una collezione (Collezione ITEM) di oltre 5.000 colture di funghi tossigeni appartenenti a diversi generi di notevole importanza fitopatologica e agro-industriale, come *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Beauveria*, *Trichoderma*, ecc., associati alla produzione di più di un centinaio di diversi metaboliti dotati di varia attività biologica (per esempio antibiotici, entomotossine, fitotossine, micotossine). Un'edizione aggiornata del catalogo di tale collezione è disponibile anche su internet, al sito <http://www.ispa.cnr.it/Collection/>. In tale sito è possibile, mediante opportuni motori di ricerca, procedere alla ricerca delle informazioni desiderate sia a partire dal nome del ceppo fungino, sia a partire dal metabolita di interesse. La collezione è stata riconosciuta da organizzazioni internazionali quali ECCO (Organizzazione Europea delle Collezioni di Colture Cellulari) e WFCC (Federazione Mondiale delle Collezioni di Colture Cellulari).

CONCLUSIONI

La formazione di micotossine nei cereali può avvenire sia in pre-raccolta, cioè nelle colture infette in pieno campo e nel corso delle operazioni di raccolta e di essiccamento dei prodotti, sia in post-raccolta, cioè nel corso dello stoccaggio e in ognuna delle fasi della filiera cerealicola di produzione di alimenti e mangimi. Questa ampia eventualità, che può verificarsi ogni qualvolta che si instaurano nelle derrate cerealicole condizioni favorevoli allo sviluppo di muffe tossigene, copre praticamente tutte le fasi produttive: dal campo alla tavola. La formazione di micotossine nelle colture cerealicole infette in campo, è una eventualità piuttosto frequente per le fusariotossine (tricoteceni, zearalenoni, fumonisine, moniliformina), poiché esse sono prodotte da specie di *Fusarium*, agenti di fusariosi della spiga, presenti praticamente in tutte le aree di coltivazione dei cereali. Anche le aflatossine possono essere prodotte nelle colture infette in campo, ma solo nelle aree tropicali e subtropicali e, per quanto riguarda i cereali, solo nel mais e in altri cereali macrotermi (sorgo, miglio). Invece la formazione di ocratossine nei cereali è legata essenzialmente alle condizioni termo-igrometriche in post-raccolta e in particolare alla rapidità dell'essiccamento prima dello stoccaggio e al mantenimento di condizioni sfavorevoli alla crescita delle muffe ocratossigene nel corso della filiera cerealicola. Ciò vale anche per le numerose altre micotossine di minore importanza che si possono incontrare nei cereali (citrinina, sterigmatocistina, patulina, acido penicillico, chetomine), che sono prodotte da funghi di magazzino, pronti a colonizzare le derrate cerealicole con l'instaurarsi di condizioni termo-igrometriche favorevoli. Un aspetto particolare assume invece la presenza nelle derrate cerealicole di sclerozi tossici di specie di *Claviceps*, i quali come è noto si possono formare solo in pieno campo, poiché i funghi produttori sono parassiti fiorali obbligati.

Nelle aree temperate e quindi in Europa, la presenza di aflatossine nei prodotti cerealicoli è strettamente legata all'importazione di derrate contaminate dalle aree tropicali e subtropicali. Il contenimento della loro diffusione può essere attuato solo con misure di sorveglianza e di controllo delle importazioni soprattutto delle derrate più suscettibili, e con il rispetto dei limiti di tolleranza per i prodotti più a rischio (latte, alimenti per l'infanzia, mangimi). Comunque, l'evento climatico eccezionalmente favorevole allo sviluppo di ceppi aflatossigeni su mais, verificatosi in Italia nel 2003, con livelli di AFB₁ nei raccolti e, conseguentemente di AFM₁ nel latte, largamente superiori a quelli consentiti dall'UE, devono rappresentare segnali di allarme per le conseguenze che possono derivare da profondi mutamenti climatici.

La ricorrente presenza di OTA nel frumento e in altri cereali microtermi, specialmente nelle aree europee settentrionali, è connessa alla difficoltà di

un rapido essiccamento dei cereali alla raccolta. La presenza di un eccesso di umidità nel frumento e nell'orzo, vicino alla soglia del 18%, favorisce l'immancabile sviluppo di *P. verrucosum*, capace di produrre elevata quantità di OTA, che poi si ritrova nel malto e nella birra.

La fusariotossina più frequentemente incontrata nei cereali colonizzati da *F. graminearum* e da *F. culmorum* è DON, seguito da ZEN. Con il DON, spesso si riscontra anche NIV e FUS, formati dagli stessi funghi oltre che da *F. cerealis* e da *F. poae*. Inoltre, in quasi tutte le colture cerealicole è possibile incontrare MON, prodotta da *F. avenaceum* nei cereali microtermi e anche da *F. subglutinans* e da *F. proliferatum* nei cereali macrotermi. Gli attacchi alle spighe dei cereali di *F. sporotrichioides* e, limitatamente a quelli microtermi (frumento, avena, orzo) anche di *F. langsethiae*, porta all'accumulo di tricoteceni di tipo A (T2, HT2, DAS, NEOS). Nelle spighe di mais colonizzate da *F. subglutinans* e da *F. proliferatum*, si riscontra sempre più frequentemente BEA la quale, assieme a varie ENs, è stata trovata anche nei cereali microtermi colpiti da *F. avenaceum*, *F. arthrosporioides*, *F. poae* e *F. tricinctum* in Finlandia e in altre regioni dell'Europa settentrionale. Nelle spighe di mais colpite da marciume rosato, causato da *F. verticillioides* e da *F. proliferatum*, si accumulano anche in notevoli concentrazioni le fumonisine. In particolare la FB₁, che si dimostra una sostanza molto stabile ai trattamenti che si mettono in atto nel corso delle preparazioni alimentari, rappresenta per il mais delle aree temperate di coltivazione, la micotossina più a rischio sia per la salute animale, sia per quella umana.

RIASSUNTO

Il rischio di contaminazione dei cereali da parte di micotossine è molto elevato e può interessare sia i cereali autunno-vernini (frumento, avena, orzo, triticale, segale), sia quelli primaverili-estivi (mais, sorgo, riso, miglio). In relazione alla specie fungina tossigena e all'aria geografica di produzione, nei cereali possono essere presenti differenti micotossine. Nelle regioni temperate sono particolarmente diffuse le fusariotossine (deossinivalenolo e altri tricoteceni, zearalenoni, fumonisine, moniliformina), prodotte nelle piante infette da specie di *Fusarium*, agenti di marciume della spiga del frumento e del mais. Nelle stesse regioni è frequente incontrare anche le ocratossine, prodotte da specie di *Aspergillus* e *Penicillium* colonizzatrici dei cereali umidi alla raccolta. Invece, nelle aree tropicali e subtropicali e più frequente incontrare, soprattutto nel mais, le aflatossine prodotte anche in pre-raccolta da specie di *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*). Un'importanza più ridotta hanno gli alcaloidi (ergotamine) contenuti negli sclerozi di specie di *Claviceps* parassite fiorali dei cereali; e di alcune tossine (acido tenuazonico, alternarioli) prodotte da specie di *Alternaria* agenti di nerume della spiga. In questa nota sono riportati aspetti riguardanti la formazione e la presenza delle principali micotossine nei cereali; la patogenicità, l'epidemiologia e la diagnosi

delle specie tossigene; la persistenza delle principali micotossine negli alimenti cerealicoli; e, alcuni aspetti agronomici relativi alla prevenzione del loro accumulo nei cereali.

ABSTRACT

Mycotoxins in cereal grains and cereal-based foods. The risk of contamination of cereals by fungi capable to produce mycotoxins is high and can involve both winter (wheat, barley, oats, triticale, rye) and spring (maize, sorghum, rice, millet) cereals. Cereals can be contaminated by different mycotoxins in relation to the toxigenic fungal species and geographical area of cultivation. In temperate regions, particularly widespread are the *Fusarium*-toxins (deoxynivalenol and other trichothecenes, zearalenones, fumonisins, moniliformin) produced in infected plants by *Fusarium* species causal agents of wheat and maize ear rots. In the same regions, ochratoxins are also frequently found in freshly harvested cereals colonized by species of *Aspergillus* and *Penicillium*. In tropical and sub-tropical regions, the mycotoxins are frequently encountered in cereals. Especially in maize, the aflatoxins are formed in infected ears by species of *Aspergillus* (*A. flavus* e *A. parasiticus*). Among the other mycotoxins, less frequently found in cereals, there are the toxic alkaloids (ergotamines) contained in sclerotia of species of *Claviceps*; and some toxic metabolite (tenuazonic acid, alternariols) produced by species of *Alternaria* causing black heads. In this paper are also reviewed the formation and the natural occurrence of the most important mycotoxins; the pathogenicity, epidemiology and diagnosis of the toxigenic fungi; the persistence and the occurrence of mycotoxins in foods and feeds; and some aspects related to the agronomic factors conducive to *Fusarium* infections and related strategy to prevent the fusariotoxin accumulation.

Parole chiave: Fusariosi dei cereali. Funghi tossigeni. Aflatossine. Deossinivalenolo. Fumonisine. Nivalenolo. Beauvericina. Fusaproliferina. Prevenzione. Persistenza. Diagnostica micologica molecolare.

BIBLIOGRAFIA

- BALMAS V., VITALE S., MARCELLO A., CORAZZA L. (2000): *Fusariosi della spiga*, «L'Informatore agrario», Suppl. 56 (16), 35, pp. 27-29.
- BARRIER-GUILLOT, DELAMBRE M., MOREL A., MAUMENE C., GOUET H., GROSJEAN F., LEUILLET M. (2004): *Occurrence of Deoxynivalenol (DON) in wheat (Triticum aestivum) grown in France and identification of agronomic factors involved in content variations*, in *An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe* (Logrieco A. e Visconti A., ed.). Kluwer Acad. Pub., Dordrecht, pp. 101-108.
- BEARDALL G.M. e MILLER J.D. (1994): *Diseases in humans with mycotoxins as possible causes*, in *Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxin* (Miller J.D. e Trenholm H.L., ed), Eagan Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 487-539.
- BOTTALICO A. (1998): *Fusarium diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe*, «Journal of Plant Pathology», 80, pp. 85-103.
- BOTTALICO A. (1999): *Micotossine negli alimenti e possibile rischio per la salute umana*.

- Parte I. Aflatossine*, «L'Igiene Moderna», 111, pp. 133-169.
- BOTTALICO A. (2004): *Micotossine*. In: *Chimica degli alimenti* (Cabras P. e Martelli A., ed.). Piccin Nuova Libreria, Padova, pp. 649-686.
- BOTTALICO A., PERRONE G. (2002): *Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe*, «European Journal of Plant Pathology», 108, pp. 611-624.
- CAMPAGNA C., HAIDUKOWSKI M., PASCALE M., VISCONTI A., PANCALDI D., RAVAGLIA S., SILVESTRI M. (2005): *Fonti di rischio e gestione delle micotossine nel frumento*, «L'Informatore agrario», 1/2005, pp. 39-47.
- CAST – COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (2003): *Mycotoxins: Risk in plant, animal and human system*. Council for Agricultural Science and Technology, Task Force Report No. 139, Ames, Iowa, USA, 199 pp.
- CASTEGNARO M., PLESTINA R., DIRHEIMER G., CHERNOZEMSKY I.N., BARTSCH H. (1991): *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary tract tumours*, International Agency for Research on Cancer, IARC Sci. Pub. No. 113, Lione, 340 pp.
- FAO/WHO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION (2001): *Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives (JEFCA)*, FAO food and nutrition paper 74, WHO food additives series 47, WHO, Ginevra, pp. 419-555.
- GEISER D.M., JIMÉNEZ-GASCO M., KANG S., MAKALOWSKA I., VEERARAGHAVAN N., WARD T.I., ZHANG N., KULDAU G.A., O'DONNELL K. (2004): *FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium*, «European Journal of Plant Pathology», 110, pp. 473-479.
- IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (1993): *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic risks to Humans. Vol. 56. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*, International Agency for Research on Cancer, Lione, pp. 397-444; pp. 445-466; pp. 467-488.
- KNOLL S., VOGEL R.F., NIESSEN L. (2002): *Identification of Fusarium graminearum in cereal samples by DNA Detection Test Strips*, «Letters of Applied Microbiology», 34, pp. 144-148.
- KNUTSEN A.K., TORP M., HOLST-JENSEN A. (2004): *Phylogenetic analyses of the Fusarium poae, Fusarium sporotrichioides and Fusarium langsethiae species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene*, «International Journal of Food Microbiology», 95, pp. 287-295.
- KONSTANTINOVA P., YLI-MATTILA T. (2004): *IGS-RFLP analysis and development of molecular markers for identification of Fusarium poae, Fusarium langsethiae, Fusarium sporotrichioides and Fusarium kyushuense*, «International Journal of Food Microbiology», 95, pp. 321-331.
- LOGRIECO A., VISCONTI A. (2004): *An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 252.
- LOGRIECO A., MORETTI A., RITIENI A., CAIFFA M.F., MACCHIA L. (2002a): *Beauvericin: Chemistry, Biology and Significance*, in *Advances in microbial toxin research and its biotechnological exploitation* (R.K. Upadhyay, ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 23-30.
- LOGRIECO A., MULÈ G., MORETTI A., BOTTALICO A. (2002b): *Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe*, «European Journal of Plant Pathology», 108, pp. 597-609.

- LOGRIECO A., ARRIGAN D.W.M., BRENGEL-PESCE K., SICILIANO P., TOTHILL I. (2005): *DNA arrays, electronic noses and tongues, biosensors and receptors for rapid detection of toxigenic fungi and mycotoxins: a review*, «Food Additives and Contaminants», 22, pp. 335-344.
- MACH R.L., KULLNIG-GRADINGER C.M., FARNLEITNER A.H., REISCHER G., ADLER A., KUBICEK C.P. (2004): *Specific detection of Fusarium langsethiae and related species by DGGE and ARMS-PCR of a b-tubulin (tub1) gene fragment*, «International Journal of Food Microbiology», 95, pp. 333-339.
- MIRAGLIA M., BRERA C., ONORI R., CORNELI S., COLATOSTI M., CAVA E., IPPOLITI D., QUAGLIA M. (1998): *Mycotoxin contamination in Italy over the last decade*, in *Mycotoxins and Phycotoxins – Development in Chemistry, Toxicology and Food Safety* (Miraglia M., Van Egmond H., Brera C., Gilbert J., ed.), Alaken Inc. Fort Collins, pp. 601-608.
- MULÈ G., MINERVINI F., SUSCA A. (2002): *Funghi tossigeni e micotossine: diagnosi e kit molecolari*, «Informatore fitopatologico», 12/2002, pp. 35-42.
- MULÈ G., BAILEY G.A., COOKE B.M., LOGRIECO A. (2004): *Molecular diversity and PCR-detection of toxigenic Fusarium species and ochratoxigenic fungi*, «European Journal of Plant Pathology», 110, pp. 449-669.
- MUNKVOLD G.P. (2003): *Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize*, «Annual Review of Phytopathology», 41, pp. 99-116.
- NIESSEN L., SCHMIDT H., VEGEL R.F. (2004): *The use of tri5 gene sequences for PCR detection and taxonomy of trichothecene-producing species in the Fusarium section Sporotrichiella*, «International Journal of Food Microbiology», 95, pp. 305-319.
- O'DONNELL K., KISTLER H.C., TACKE B., CASPER H.H. (2000a): *Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of Fusarium graminearum, the fungus causing wheat scab*, «PNAS», 14, pp. 7905-7910.
- O'DONNELL K., NIRENBERG H., AOKI T., CIGELNIK E. (2000b): *A multigene phylogeny of the Gibberella fujikuroi species complex: detection of additional phylogenetically distinct species*, «Mycosciences», 41, pp. 61-78.
- PARRY D.W., JENKINSON P., MCLEOD L. (1995): *Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals – a review*, «Plant Pathology», 44, pp. 207-238.
- RITIENI A., MONTI M.S., RANDAZZO G., LOGRIECO A., MORETTI A., PELUSO G., FERACANE R., FOGLIANO V. (1997): *Teratogenic effects of fusaproliferin on chicken embryos*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 45, pp. 3039-3043.
- SCHOTHORST R., VAN EGMOND H. (2004): *Report from Scoop task 3.2.10 “Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states”*, Subtask: trichothecenes, «Toxicology Letters», 153, pp. 133-143.
- SCHMIDT H., NIESSEN L., VOGEL R.F. (2004): *AFLP analysis of Fusarium species in the section Sporotrichiella – evidence for Fusarium langsethiae as a new species*, «International Journal of Food Microbiology», 95, pp. 297-304.
- SCOOP – REPORT ON TASK FOR SCIENTIFIC COOPERATION (2003): *Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states*. Final Report SCOOP Task 3.2.10. European Community, Health and Consumer Protection DG, April 2003, pp. 606.
- WAALWIJK C., VAN DER HEIDE R., DE VRIES I., VAN DER LEE T., SCHOEN C., COSTREL DE CORAINVILLE G., HÄUSER-HAHN I., KASTELEIN P., KÖHL J., LONNET P., DEMARQUET T., KEMA G.H.J. (2004): *Quantitative detection of Fusarium species in wheat using TaqMan*, «European Journal of Plant Pathology», 110, pp. 481-494.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION (2000): *International Programme on Chemical*

- Safety*, Environmental Health Criteria 219: Fumonisin B₁, World Health Organization, Geneva, 150 pp.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002): *Evaluation of certain mycotoxins in food*, Fifty-sixth report of Joint FAO/WHO expert committee on food additives, WHO Technical report Series 906, World Health Organization, Geneva, 62 pp.
- YLI-MATTILA T., MACH R.L., ALEKHINA I.A., BULAT S.A., KOSKINEN S., KULLNIG-GRADINGER C.M., KUBICEK C.P., KLEMSDAL S.S. (2004): *Phylogenetic relationship of Fusarium langsethiae to F. poae and F. sporotrichioides as inferred by IGS, ITS, B-tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis*, «International Journal of Food Microbiology», 95, pp. 267-285.
- ZUR G., HALLERMAN E.M., SHARF R., KASHI Y. (1999): *Development of a polymerase chain reaction-based assay for the detection of Alternaria fungal contamination in food products*, «Journal of Food Protection», 62, pp. 1191-97.

Filiera delle produzioni animali: latte, latticini, carni e derivati

RISCHIO MICOTOSSINE IN DERRATE DI ORIGINE ANIMALE, PREMESSA

Un caso, accaduto in Inghilterra nel 1960, diede inizio all'era delle micotossine. Questo incidente, denominato "Turkey X disease" (malattia X del tacchino), fu causato dall'aflatossina B₁ (AFB₁), una delle micotossine prodotte da *Aspergillus flavus*, che uccise più di 100.000 tra tacchini, anatre e fagiani. L'AFB₁ risultò provenire da una partita di farina di arachide di provenienza brasiliana, fortemente contaminata, utilizzata nell'alimentazione di quegli animali.

Attualmente sono note più di 300 micotossine e sono stati elencati parecchi generi di funghi – come *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Rhizopus* – produttori di micotossine.

La maggior parte delle ricerche sono però concentrate su alcune micotossine, come aflatossine, ocratossina, tricoteceni, zearalenone e fumonisine.

Le aflatossine (AF) sono un gruppo di micotossine prodotte da ceppi di *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Le AF che vengono riscontrate negli alimenti di origine vegetale sono quattro: B₁, B₂, G₁, G₂; le B sono prodotte sia da *A. flavus* che da *A. parasiticus*, mentre le G sono prodotte solo dal secondo.

L'ocratossina A (OTA) è un composto tossico comunemente prodotto da diverse specie di funghi del genere *Penicillium* e *Aspergillus*, ma principalmente da *P. verrucosum* e *A. ochraceus*. L'OTA esercita diversi effetti tossici nei mammiferi, il più rilevante dei quali è la nefrotossicità; ha anche un'azione immunosoppressiva, teratogena e cancerogena.

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

I tricoteceni sono generalmente classificati in gruppo A, B e tricoteceni macrociclici, questi ultimi meno frequenti e quindi meno studiati; i gruppi A e B sono tossine prodotte da funghi del genere *Fusarium*; il primo comprende tossina T-2 e HT-2, diacetossiscirpenolo e neosolaniolo (prodotti soprattutto da *F. sporotrichioides* e *F. poae*); il secondo comprende nivalenolo, fusarenone, deossinivalenolo (DON o vomitossina), 3-acetil- e 15-acetil-DON (prodotti soprattutto da *F. graminearum* e *F. culmorum*).

La contaminazione da fusariotossine è piuttosto frequente, soprattutto nei cereali. Questi composti si comportano come degli agenti citotossici assai potenti; essi causano infiammazione della pelle, diarrea, vomito, emorragie, rifiuto del cibo, degenerazione del midollo osseo, depressione del sistema emopoietico e disordini nervosi in varie specie, compreso l'uomo.

Lo zearalenone (ZEA) è prodotto da parecchie specie di *Fusarium* (in particolare *F. graminearum* e *F. culmorum*) e può essere presente in tutti i cereali e alcuni semi oleosi. Lo ZEA ha una azione estrogeno-simile e la specie suina è quella più sensibile.

Le fumonisine (FM) sono un gruppo di metaboliti tossici prodotti da *F. verticillioides* e da *F. proliferatum*; questi funghi sono ubiquitari e infestano i prodotti agricoli con notevole frequenza. Sino ad oggi sono state identificate due FM A e quattro B, tuttavia solo tre FM, e cioè la B₁, B₂ e B₃ sembrano contemporaneamente presenti in condizioni naturali e di queste la B₁ è nettamente più abbondante delle altre. Una elevata contaminazione del mais da FM è stata segnalata in Italia, negli USA, in Sud Africa e in Cina con conseguenti perdite economiche e rischi per la salute dell'uomo e degli animali allevati. La FMB₁ induce il carcinoma epatico in ratti e cavalli; essa causa anche leucoencefalomalacia nel cavallo ed edema polmonare nel suino.

MICOTOSSINE: PASSAGGIO NEL LATTE

Per essere presenti nel latte, le micotossine devono resistere alle condizioni d'idrolisi e di anaerobiosi esistenti nel rumine delle specie ruminanti. Ad esempio, per spiegare la relativa resistenza dei ruminanti alle fumonisine, è stato proposto un meccanismo di idrolisi e di degradazione; queste micotossine, essendo completamente degradate nel rumine, non potranno essere presenti nel latte.

L'eventuale degradazione delle micotossine può essere parziale, con una possibile escrezione nel latte, anche se inferiore a quella osservata nelle specie non ruminanti. Questo fenomeno è stato descritto per la tossina T-2 (un

tricotecene): tenori medi analoghi sono stati ritrovati nel latte in seguito alla somministrazione con la razione di 12,5 mg/kg di tossina alle scrofe e di 50 mg/kg alle vacche (concentrazione media nel latte di 76 e di 85 µg/kg, rispettivamente).

L'escrezione è preceduta da una fase di assorbimento ed eventualmente da una fase di metabolizzazione epatica delle diverse molecole. Una volta passata la barriera digestiva, la micotossina dovrà affrontare i differenti sistemi enzimatici di biotrasformazione (parziale o completa), i quali, modificandone la struttura, ne modificheranno anche la tossicità e le vie di escrezione.

Nel caso del DON (un tricotecene), la metabolizzazione è parziale, essendo escreto nel latte come deossinivalenolo (DON-1), come DON e DON glucuron-coniugato. L'OTA è in gran parte degradata in rumine, mentre nel latte si possono ritrovare tracce di OTA e di ocratossina α (OT α), la parte cumarinica della micotossina. Lo ZEA viene escreto in tracce nel latte come ZEA, come α - e β -zearalenolo e ZEA glucuron-coniugato.

I possibili meccanismi generali di escrezione delle micotossine nel latte sono quelli comuni a tutti gli xenobiotici:

1. Filtrazione intercellulare;
2. Diffusione passiva attraverso la membrana cellulare;
3. Trasporto attivo tramite le vescichette di secrezione.

In realtà, la filtrazione intercellulare riguarda soprattutto composti idrofili di piccole dimensioni; è importante nella formazione della fase acquosa del latte (passaggio d'acqua e di elettroliti), ma è poco importante per l'escrezione degli xenobiotici. La stessa cosa vale per il trasporto attivo.

La diffusione passiva trans-membrana riguarda i composti lipofili, in grado di attraversare il doppio strato lipidico delle membrane cellulari. Dato il gradiente di pH presente tra lo spazio extracellulare, il mezzo intracellulare e il latte (rispettivamente pH 7,4, 7,1, 6,5), questa escrezione potrà essere quantitativamente importante per composti basici, lipofili in forma non ionizzata e idrofili in forma ionizzata, in grado di subire un intrappolamento ionico. Secondo questa teoria, i trasferimenti maggiori plasma-latte avverranno per xenobiotici con caratteristiche di base debole, lipofili in forma non ionica; è possibile una escrezione importante di composti neutri; è assai improbabile l'escrezione di composti polari acidi (Guerre et al., 2000).

I dati riassuntivi di varie sperimentazioni, riguardanti il passaggio nel latte delle micotossine più diffuse, indicano che, escludendo l'aflatossina, la quantità escreta è molto bassa o addirittura nulla.

LE AFLATOSSINE

Nella maggior parte dei casi, la AFB₁ è quella presente in maggior quantità e sulla quale è stato focalizzato l'interesse dei ricercatori per via della sua elevata tossicità acuta e cronica e per l'attività cancerogena che esplica sugli animali, oltre che per i potenziali effetti sull'uomo.

Gli alimenti che contengono AF con maggior frequenza sono: arachidi e derivati, mais e derivati, noci brasiliane, pistacchi, mandorle, fichi secchi, alcune spezie (peperoncino); ma va ricordato che una cattiva conservazione può far comparire le AF anche in prodotti non considerati a rischio. Le AF provocano il cancro del fegato e a volte anche del rene, in tutte le specie animali studiate; l'AFB₁ è l'epatocancerogeno, attivo *per os*, più potente che si conosca. Lo IARC (Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro, 1993) ha classificato le aflatoossine (come miscela naturale delle 4 sopra citate) tra le sostanze sicuramente cancerogene per l'uomo (classe 1).

Per l'Italia, le AF sono soprattutto un problema connesso con l'importazione di derrate da paesi a clima caldo e umido, mentre la contaminazione dei prodotti locali è (o era) meno frequente e a livelli piuttosto contenuti, sia per motivi climatici sia per le migliori tecniche agronomiche, di raccolta e di conservazione dei prodotti stessi. L'UE ha emanato regolamenti (il 1525/98, il 466/01, il 257/02 e il 2174/03) che fissano il tenore massimo di AF in frutta secca, cereali e derivati: sono tollerati 2,0 e 4,0 µg/kg (microgrammi/kg, ppb) rispettivamente di AFB₁ e AF totali.

Diverse materie prime destinate all'alimentazione animale [mais e derivati (semola glutinata, glutine, germe), farine e panelli di cocco, cotone, palmisto] sono frequentemente contaminate da AF; la popolazione umana può quindi essere indirettamente esposta all'AF per il consumo di latte prodotto da animali che hanno ingerito alimenti contaminati. Durante il processo digestivo, l'AF viene in parte assorbita e trasportata al fegato, dove viene metabolizzata, dando origine a diversi idrossi-derivati che finiscono nel circolo sanguigno e vengono poi eliminati tramite l'urina e la bile (o il latte).

AFLATOSSINE: CONTAMINAZIONE DELLA FILIERA LATTIERO-CASEARIA

Particolarmente ben conosciuto è il caso dell'aflatoossina B₁ (AFB₁): la metabolizzazione effettuata dal citocromo P450, porta alla formazione dell'aflatoossina M₁ (AFM₁), che rappresenta la quasi totalità delle aflatoossine escrete nel latte da bovini, ovini e caprini (Galvano et al., 1996; Pietri et al., 2003).

Numerose ricerche condotte su specie di interesse zootecnico, hanno consentito di stabilire il rapporto tra concentrazione di AFB₁ nella dieta e livello di AFB₁ o dei metaboliti presenti nei tessuti. La quantità rilevabile nei tessuti è quasi sempre trascurabile, tranne che per l'AFM₁ nel latte (Kuiper-Goodman, 2004). L'AFM₁ ("milk toxin") è stato il primo metabolita della B₁ ad essere identificato; nel latte si trova anche l'aflatossina M₂, che è il metabolita della B₂. Tutti i mammiferi che ingeriscono AFB₁, ne eliminano una quota come AFM₁ nel latte; nel caso della vacca da latte, la quota eliminata è dell'1-3% di quella ingerita. L'AFM₁, che ha una struttura simile a quella della B₁, ha evidenziato una tossicità acuta paragonabile a quella della molecola da cui deriva, mentre la cancerogenicità epatica (verificata sulla trota e sul ratto) è all'incirca del 2-8% rispetto alla B₁ (Henry et al., 2001; Van Egmont, 1989). Lo IARC (1993) ha classificato l'AFM₁ tra le sostanze possibilmente cancerogene per l'uomo (classe 2B).

Il limite massimo per l'AFM₁ di 0,05 µg/kg (ppb) di latte, fissato dal Regolamento CE 1525/98, entrato in vigore dal 01.01.1999, era stato introdotto prima dalla Svizzera e poi da altri paesi, giustificandolo con la considerazione che la dose giornaliera tale da produrre un rischio di 1:10⁶ è dell'ordine di 1-10 ng/soggetto: pertanto, la concentrazione accettabile di AFM₁ nel latte deve essere inferiore ad alcune decine di ng/kg.

In base alle nostre conoscenze attuali, il rischio derivante dall'assunzione di queste quantità di aflatossine è estremamente ridotto (Kuiper-Goodman, 2004); tuttavia, la presenza dell'AFM₁ nel latte desta qualche preoccupazione, perché riguarda un alimento di largo consumo e indispensabile per l'infanzia, fase della vita nella quale le difese immunitarie non hanno ancora raggiunto la loro massima espressione. L'AFM₁ è legata alla frazione proteica del latte, per cui è presente nei formaggi e in altri latticini prodotti con latte contaminato (Pietri et al., 1997, 2003). Per questi motivi, con la Circolare n. 10 del 9 giugno 1999, il Ministero della Sanità ha fissato un limite per l'AFM₁ di 0,01 µg/kg nei prodotti per l'infanzia, mentre a livello europeo questo limite è di 0,025 µg/kg (Regolamento 683/04).

Per contenere il livello di AFM₁ nel latte, in tutti i paesi della UE (Direttiva 100/03) è stato fissato un limite di 0,005 mg/kg (cioè 5 ppb) di AFB₁ per i mangimi destinati alle bovine in lattazione, ma vi è un limite anche sulle materie prime (0,02 mg/kg cioè 20 ppb). Tuttavia, anche rispettando questi limiti, non si è sicuri di rientrare nei 0,05 µg/kg di M₁ nel latte.

Vediamo ora di affrontare questo punto: il cosiddetto *carry-over*, cioè la percentuale di AFB₁ che finisce nel latte come AFM₁. Sono state fatte molte ricerche, che possono essere così riassunte (Veldman et al., 1992):

- la percentuale di escrezione aumenta con l'aumentare del livello produttivo della mandria;
- l'ingestione media di AFB₁ della mandria deve essere inferiore a 40µg/capo/giorno se si vuole produrre latte di massa con AFM₁ < 0,05 µg/kg.

Quest'ultima è una situazione media, cioè quando gli animali ingeriscono una quantità costante di AF. Va tenuto presente che le variazioni sono molto rapide: se si somministra una razione contaminata, l'AFM₁ comparirà nel latte già nella mungitura successiva, anche se ci vogliono due o tre giorni perché il livello diventi più o meno costante. L'assorbimento sembra molto rapido, dato che in base a ricerche che abbiamo in corso, già dopo pochi minuti dall'assunzione di AFB₁, si trovano AFB₁ e AFM₁ nel sangue. Se poi si somministra una razione esente da AF, i livelli nel latte diminuiscono dalla mungitura successiva e vanno a zero in 2-3 giorni.

Se in una azienda viene prodotto latte con una concentrazione di AFM₁ che eccede 0,05 µg/kg, i regolamenti comunitari sopra citati proibiscono la diluizione con altro latte, per rientrare nel limite.

AFLATOSSINE: PASSAGGIO DAL LATTE AL FORMAGGIO

Quando del latte contaminato da AFM₁ viene utilizzato per la produzione di formaggio, la tossina si ripartisce tra cagliata e siero. Se questa ripartizione avvenisse sulla base della solubilità dell'AFM₁ in acqua, sarebbe logico aspettarsi una più elevata concentrazione nel siero, rispetto alla cagliata. Tutte le ricerche condotte indicano invece una più elevata concentrazione nella cagliata. L'AFM₁ da quest'ultima può essere recuperata attraverso successivi lavaggi con acqua; questo suggerisce che l'associazione della tossina con la caseina non è di natura chimica. Queste osservazioni possono essere spiegate con l'instaurarsi di una interazione idrofobica tra caseina e AFM₁; la molecola caseinica contiene infatti regioni idrofobiche sulla sua superficie e queste costituiscono i siti di assorbimento della tossina. La conseguenza è che troviamo concentrazioni della tossina più elevate nel formaggio, rispetto al latte di partenza; questa relazione può essere espressa in termini di fattore di arricchimento. I dati di letteratura evidenziano che la concentrazione di AFM₁ è più elevata di 2,5-3,3 volte nei formaggi molli e di 3,9-5,8 volte nei formaggi a pasta dura, rispetto al latte utilizzato per la loro produzione (Yousef e Marth, 1989).

Il Ministero della Salute nel settembre 2004 ha inviato agli organismi preposti al controllo degli alimenti una circolare avente per oggetto: «Metodi

di campionamento e di analisi per la ricerca di aflatossine nei formaggi». In questa circolare si afferma:

«L'emergenza verificatasi nel 2003 comporta l'esigenza di sottoporre a campionamento formaggi a pasta dura e a lunga stagionatura (tipo "grana") prodotti nell'ambito dell'emergenza..

Per quanto riguarda i criteri di conformità, sulla base delle sperimentazioni sinora effettuate devono essere considerati conformi i lotti di forme per le quali le analisi hanno dato risultati non superiori a 0,45 µg/kg. Tale valore deve considerarsi, in ogni caso, come valore temporaneo per fronteggiare l'attuale problema delle forme [...] a pasta dura e a lunga stagionatura stoccate e/o in vincolo sanitario».

DECONTAMINAZIONE DA AFLATOSSINE

In base all'attuale legislazione, sono applicabili solo metodi fisici.

I metodi fisici per la decontaminazione/detossificazione delle granaglie comprendono pulizia, lavaggio e trattamenti termici. Il successo di questi trattamenti dipende dal grado iniziale di contaminazione e dalla distribuzione dell'aflatossina nel seme. I metodi di pulizia comprendono la setacciatura; la rimozione di polveri, rotture, semi piccoli; lo spazzolamento; la decorticazione. I risultati ottenibili sono tanto più rilevanti quanto più incisivo è il trattamento.

La molecola dell'aflatossina B₁ è stabile al calore secco fino al suo punto di fusione (260 °C) e la temperatura a cui si verifica la decomposizione termica è 269 °C.

Tuttavia vi è una certa suscettibilità al calore dell'aflatossina contenuta negli alimenti. La sensibilità delle aflatoxine al calore dipende dalle condizioni ambientali; da un lato, la presenza di acqua nel prodotto può aumentare la degradazione idrolizzando l'anello del lattone; dall'altro, le aflatoxine possono essere protette e quindi meno degradabili per l'interazione con proteine e altri costituenti. Dati sperimentali evidenziano che sono in ogni caso necessarie temperature superiori ai 100 °C per ottenere almeno una parziale detossificazione, rilevabile analiticamente. Rimane da verificare se alla riduzione analitica corrisponda una reale riduzione di tossicità nel caso di trattamenti termici.

INDICAZIONI TECNICHE PER GLI ALLEVATORI

Il problema della aflatoxina nel latte è un tipico problema di filiera, ma l'anello centrale e il punto chiave sono senza dubbio l'allevatore e la sua gestione aziendale.

L'andamento climatico può favorire lo sviluppo del fungo produttore di AFB₁ (*A. flavus*), come accadde durante l'estate del 2003, sul mais in campo.

In generale, dalle indagini condotte sulla qualità del mais prodotto in Italia, emerge che quando l'andamento stagionale (soprattutto all'epoca del raccolto) è caratterizzato da un clima temperato, umido e piovoso (es. 1996 in Nord Italia), prevale una contaminazione da zearalenone e tricoteceni (soprattutto DON), in quanto vengono favoriti funghi quali *F. graminearum* e *F. culmorum*; con un clima più caldo e secco (es. le ultime annate), prevalgono i funghi produttori di fumonisine (*F. verticillioides* e altri), favoriti anche da forti attacchi di insetti (soprattutto dalla piralide) alle piante; in questo ultimo caso è possibile anche una contaminazione diffusa (anche se in genere quantitativamente modesta) da aflatossine (Pietri et al., 2004). Quando il clima è particolarmente caldo e siccitoso, come nell'estate 2003, la contaminazione da aflatossine può diventare rilevante. Le ragioni di queste differenze vanno ricercate principalmente nelle caratteristiche dei funghi, in particolare nelle loro esigenze termiche e di umidità. Passando da *F. graminearum* a *F. verticillioides* e a *A. flavus*, le esigenze termiche aumentano, mentre quelle in umidità diminuiscono. Lo stress idrico delle piante è un aspetto cruciale per *A. flavus*; è stato osservato un incremento del contenuto in aflatossine fino a 10 volte in condizioni di stress idrico, evento osservato anche in Italia nel 2003. Fumonisine e aflatossine si accumulano nelle cariossidi durante la maturazione: le prime si rilevano a partire dalla maturazione cerosa, mentre le seconde possono essere presenti a fine maturazione lattea. Le raccolte tardive tendono ad aumentare i problemi di presenza delle micotossine; in particolare, l'accumulo di fumonisine si incrementa rapidamente dalla maturazione cerosa, ma anche *A. flavus* trae particolare beneficio dall'abbassamento dell'umidità delle cariossidi, soprattutto quando le temperature sono elevate.

Anche altri cereali e farine di estrazione di girasole, di lino, di soia e altri sottoprodotti possono presentare contaminazioni, anche se di solito a livelli molto contenuti. In sintesi, si ritiene pertanto di fornire le seguenti indicazioni:

1. Monitoraggio latte: ogni 15 giorni (e a ogni modifica della razione) verifica del livello di AFM₁ nel latte presso un laboratorio di fiducia. Va tenuto presente che l'AFM₁ nel latte è la valutazione più attendibile del livello di AFB₁ nella razione.
2. Monitoraggio di alimenti aziendali: se il latte supera 0,05 µg/kg, togliere la farina di mais dalla razione, facendosi consigliare da un esperto in alimentazione su come sostituirla (riformulare la razione e non sostituire semplice-

mente il mais con un'altra materia prima; fare attenzione a non impiegare materie prime non ammesse ad es. nella produzione di formaggi tipici).

Dopo 2-3 giorni ricontrollare l'AFM₁ nel latte. Se il livello è sceso a valori di sicurezza, il problema è al momento risolto. Se il livello non è sceso a sufficienza, bisogna controllare gli altri componenti la razione (concentrati, silomais ed eventualmente i fieni).

Il reinserimento della farina di mais nella razione deve essere fatto solamente conoscendo la qualità del prodotto (contenuto in AFB₁).

3. Impiego di sequestranti: può essere opportuno utilizzare dei sequestranti efficaci (alluminosilicati), miscelandoli con il prodotto (farina di mais) contaminato. La miscelazione deve essere molto accurata perché l'efficacia dei sequestranti è direttamente collegata alla possibilità di contatto tossina-sequestrante. Chiedere ai fornitori garanzie sull'efficacia, che deve risultare da prove condotte *in vivo* su vacche da latte. L'impiego di questi prodotti è indicato soprattutto quando il livello di AFM₁ nel latte non è troppo oltre 0,05 µg/kg; diversamente, agire come al punto precedente. L'aggiunta di sequestranti nel *carro* non è efficace.
4. Gestione degli stoccaggi aziendali delle materie prime: monitorare il tenore di umidità (< 13%), la temperatura (< 18-20 °C); per il mais granella: se possibile eseguire vagliatura e spazzolatura della granella (in questo modo si allontanano le parti che contengono la quasi totalità della AFB₁). Controllare con attenzione lo stato di pulizia dei locali e dei silos in cui vengono stoccate le materie prime utilizzate nella razione. Eseguire una pulizia accurata e se necessario effettuare delle fumigazioni degli ambienti e dei silos.
5. Trattamento del latte contaminato: il latte bloccato all'azienda a seguito di positività oltre il limite della botte non è da considerarsi rifiuto speciale e come tale può essere smaltito in concimaia.

OCRATOSSINA A E FILIERA DELLE CARNI SUINE

Diffusione della micotossina, passaggio dagli alimenti ai tessuti, escrezione e strategie per ridurre la contaminazione

L'ocratossina A (OTA) è una micotossina prodotta da *Penicillium verrucosum* e *P. nordicum* e da un certo numero di specie di *Aspergilli* raramente

riscontrati in alimenti e mangimi, tranne il ben noto *A. ochraceus* (precedentemente conosciuto come *A. alutaceus*). I valori minimi di acqua libera (a_w) per la crescita di *P. verrucosum* e di *A. ochraceus*, sono rispettivamente 0,81 e 0,76, ma il valore minimo per la produzione di OTA è 0,85 per entrambi i funghi e i valori ottimali oscillano da 0,95 a 0,99. Ad a_w ottimale, l'intervallo di temperatura per la produzione di OTA da parte di *P. verrucosum* è 4-31 °C (ottimale 24 °C), mentre quella per *A. ochraceus* è 12-37 °C (ottimale 25 °C).

Generalmente, i *Penicillium* spp. sono più psicrofili degli *Aspergillus*, pertanto *P. verrucosum* è il maggior produttore di OTA nei cereali nelle zone climatiche più fredde, come Scandinavia e Canada, mentre *A. ochraceus* predomina nelle zone climatiche più calde, come Balcani e Australia.

La contaminazione da OTA delle derrate agricole è stata ampiamente documentata a livello mondiale. La tossina può essere presente in diversi prodotti vegetali, come cereali, grani di caffè, fagioli, legumi e frutta secca; è stata trovata anche in bevande come birra, vino e succo d'uva (Benford et al., 2001).

Il trattamento fisico delle granaglie, come la spazzolatura durante la pulitura del frumento prima della molitura, ha consentito una riduzione della contaminazione da OTA nella risultante farina maggiore del 50%. La molitura sembra avere un effetto modesto o nullo sul livello di OTA, che è solo parzialmente distrutta durante la panificazione.

OTA è una micotossina che ha proprietà nefrotossiche, cancerogene, teratogene, immunotossiche e probabilmente genotossiche e neurotossiche. OTA è stata associata con la nefropatia endemica balcanica e lo sviluppo di tumori dell'apparato urinario nell'uomo (Pleština et al., 1996; Schlatter et al., 1996).

Nel 1993, lo IARC ha incluso l'OTA nel gruppo 2B (possibile cancerogeno per l'uomo, Castegnaro e Wild, 1995). Il Comitato Scientifico per gli alimenti della Commissione Europea (Commissione delle Comunità Europee, 1998) ha espresso l'opinione che sarebbe prudente ridurre l'esposizione all'OTA quanto possibile, facendo in modo che l'esposizione stessa si collochi verso i valori più bassi dell'intervallo di assunzione giornaliera tollerabile di 1,2-14 ng/kg di peso corporeo/giorno, stimati da altri organismi, cioè sotto i 5 ng/kg di peso corporeo/giorno.

L'esposizione della popolazione umana all'OTA è stata valutata in numerosi paesi mediante analisi di campioni di sangue, siero o plasma. In Italia, l'ingestione giornaliera stimata è stata 0,7 o 4,6 ng/peso corporeo: il primo valore è stato calcolato da dati di plasma ematico, il secondo è basato su dati di presenza e di consumo di alimenti.

L'esposizione all'OTA dell'uomo a livello individuale può essere meglio stimata dall'analisi di campioni di sangue che da quella della dieta, sfruttando il lungo periodo di emivita (35 giorni) dell'OTA nel sangue umano. Per di più, l'ingestione variabile di OTA in giorni diversi e dai differenti alimenti può essere mediata da un singolo campione (Schlatter et al., 1996).

Il periodo perinatale è una fase sensibile di sviluppo che presenta condizioni metaboliche differenti dagli adulti e un rapido sviluppo di tessuti vulnerabili, come il sistema nervoso centrale. L'OTA viene trasmessa al feto via placenta, interessando soprattutto il sistema nervoso centrale, l'occhio e lo scheletro. La tossina è stata anche trovata nel latte di alcune specie, inclusa quella umana.

In una nostra recente indagine abbiamo riscontrato positività, su circa 250 campioni di latte umano raccolto in ospedali della Lombardia, in oltre l'80% dei campioni (Turconi et al., 2004).

L'OTA può essere presente nelle carni e derivati come conseguenza di: (1) contaminazione diretta da muffe, (2) trasmissione indiretta da animali esposti ad alimenti naturalmente contaminati (Gareis, 1996). Mentre la prima via può riguardare un limitato numero di prodotti stagionati, il passaggio dell'OTA nei prodotti di origine animale attraverso gli alimenti deve essere visto come un problema da non trascurare.

Gli organi o il tessuto muscolare dei ruminanti non sono a rischio perchè la flora ruminale esercita un'attività detossificante. Fra gli animali di interesse zootecnico, i suini sono particolarmente sensibili all'OTA ed evidenziano tempi di emivita ematici relativamente alti, dell'ordine di 72-120 ore (Marquardt e Frohlich, 1992). I livelli più elevati della tossina sono riscontrabili nel sangue. La distribuzione tra i tessuti segue l'andamento rene > fegato > muscolo > grasso (Galtier et al., 1981; Patterson et al., 1976).

Le analisi di differenti prodotti a base di carne (alcuni tipi di salsicce, würstel, prosciutto) proveniente da suini alimentati con diete sperimentali contaminate, hanno rivelato che l'OTA è presente in questi prodotti a livelli dipendenti solamente dalla particolare formulazione degli stessi; le concentrazioni di OTA aumentano grandemente nei prodotti quando essi contengono anche sangue o fegato.

Processi o tecniche come il riscaldamento e la stagionatura non hanno alcun effetto sul tenore di OTA nei prodotti; infatti, l'OTA sembra essere molto stabile.

Il numero di dati disponibile sulla presenza naturale dell'OTA nei prodotti a base di carne suina è ancora limitato.

Indagine sulla contaminazione da ota di carni suine fresche e trasformate

È stata condotta un'indagine conoscitiva allo scopo di rilevare e quantificare l'eventuale presenza di ocratossina A nelle carni suine fresche e in alcuni prodotti trasformati, con particolare riferimento ai salumi tipici. Nello specifico sono stati acquistati 12 campioni di würstel, 30 campioni di prosciutto crudo di Parma, 18 campioni di coppa, 12 campioni di prosciutto cotto, 12 campioni di salame tipo Felino e Milano. Inoltre, alcuni salumifici della zona di Piacenza hanno fornito alcuni campioni di carne suina fresca destinati alla produzione di insaccati, e più precisamente 16 campioni di tagli freschi per coppa e 5 campioni di tagli freschi destinati alla produzione di prosciutto crudo. Dalle analisi effettuate è risultato che la realtà della situazione italiana non soddisfa completamente i limiti di legge italiani. In particolare, i campioni di würstel, prosciutto cotto, salame, coppa e carni fresche sono risultati conformi ai valori guida della Circolare 9 giugno 1999, n. 10, del Ministero della Sanità, mentre si è evidenziato che una parte dei campioni di prosciutto crudo (16,66%) superava il limite di 1 µg/kg.

Inoltre sono stati analizzati 84 campioni di prosciutto crudo in fase di stagionatura provenienti da sette stabilimenti differenti, allo scopo di rilevare la presenza di OTA nel prodotto stagionato e valutare, in base ai valori di contaminazione trovati, se si poteva trattare di una contaminazione diretta, dovuta a crescita fungina sulla superficie dell'alimento con conseguente produzione di tossina, o indiretta, dovuta alla presenza della stessa nel mangime utilizzato nell'alimentazione dei suini. Per ciascun prelievo ogni stabilimento ha fornito 4 campioni e durante questo periodo di tempo ogni prosciuttificio è stato più volte oggetto di indagine.

I valori di contaminazione da OTA espressi in µg/kg (ppb) rilevati nei campioni analizzati durante questo studio, possono essere esaminati considerando separatamente la parte interna e quella esterna.

Sono stati ipotizzati tre intervalli (classi) di concentrazione:

- 0,020 ppb < OTA < 0,50 ppb;
- 0,50 ppb < OTA < 1 ppb;
- OTA > di 1 ppb.

Per quanto riguarda la parte interna, il 3,57% dei campioni appartiene al terzo intervallo e solo il 2,38% si trova nel secondo, mentre la maggior parte di essi ed esattamente il 94,05% occupa il primo intervallo. Il valore medio è risultato pari a 0,105 µg/kg.

Per quanto riguarda i campioni esterni, l'88,10% dei campioni appartiene al primo intervallo di valori, il 2,38% al secondo, mentre il 9,52% dei prosciutti si trovano nel terzo intervallo, superando così il limite legislativo di 1 ppb. È stato calcolato un valore medio pari a 0,385 µg/kg. I dati riportati

dimostrano che la concentrazione è più alta nei campioni esterni rispetto agli interni.

CONCLUSIONI

La filiera latte e la filiera carne suina possono essere esposte alla contaminazione rispettivamente da aflatossina M₁ e da ocratossina A; generalmente, questa esposizione nel nostro paese è molto limitata, ma situazioni contingenti possono accrescere tale rischio. Si tratta di situazioni legate alla importazione di materie prime contaminate o a condizioni climatiche che hanno determinato situazioni favorevoli alla sviluppo di miceti tossigeni e alla produzione di tossine.

I mutamenti climatici, che sembrano essere in corso, aumentano questi rischi. Tuttavia un sistema di allerta che evidenzia situazioni di rischio e interventi mirati già a livello agronomico, possono certamente contribuire a minimizzare la problematica. È necessario un approccio globale che coinvolga tutti gli attori della filiera, compresi quelli impegnati nella parte finale della filiera produttiva per la produzione di formaggi e di vari prodotti di salumeria. Va tuttavia sottolineato che le produzioni di origine animale sono un problema limitato rispetto agli alimenti vegetali. Il passaggio attraverso l'animale è sempre un mezzo di riduzione del rischio.

In ogni caso, la contaminazione degli alimenti da micotossine costituisce una importante fonte di rischio cronico per la salute del consumatore; è un problema con il quale dobbiamo imparare a convivere ed adattare di conseguenza il nostro sistema produttivo.

BIBLIOGRAFIA

- BENFORD D., BOYLE C., DEKANT W., FUCHS R., GAYLOR D., HARD G., MC GREGOR D., PITT J., PLEŠTINA R., SHEPHARD G., SOLFRIZZO M., VERGERE P., WALKER R. (2001): *Ochratoxin A. Safety evaluation of certain mycotoxins in food*, WHO Food Additives Series 47 (Geneva: World Health Organization), p. 281.
- CASTEGNARO M., WILD C. (1995): *IARC activities in mycotoxins research*, «Nat. Toxins», 3, pp. 327-333.
- COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE (1998): Directorate General XXIV, Scientific Committee on Food, Outcome of discussions 14, expressed on 17 September 1998.
- COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE (1998): Regolamento 1525/98, 16.07.1998, «Official Journal of the EC», L201/43.
- COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE (2001): Regolamento 466/2001, 08.03.2001,

- «Official Journal of the EC», L77/1.
- COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE (2002): Regolamento 257/2002, 12.02.2002, «Official Journal of the EC», L41/12.
- COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE (2003): Direttiva 100/2003, 31.10.2003, «Official Journal of the EC», L285/33.
- COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE (2003): Regolamento 2174/2003, 12.12.2003, «Official Journal of the EC», L326/12.
- COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE (2004): Regolamento 683/2004, 15.04.2004, «Official Journal of the EC», L106/3.
- GALTIER P., ALVINERIE M., CHARPENTEAU J. (1981): *The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens*, «Food Cosmet. Toxicol.», 19, pp. 735-738.
- GALVANO F., GALOFARO V., GALVANO G. (1996): *Occurrence and stability of aflatoxin M₁ in milk and milk products: a world-wide review*, «J. Food Prot.», 59, pp. 1079-1090.
- GAREIS M. (1996): *Fate of ochratoxin A on processing of meat products*, «Food Addit. Contam.», 13, Suppl. 1, pp. 35-37.
- GUERRE P., BAILLY J.D., BENARD G., BURGAT V. (2000): *Excrétion lactée des mycotoxines: quels risques pour le consommateur?*, «Revue Med. Vet.», 151, pp. 7-22.
- HENRY S.H., WHITAKER T., RABBANI I., BOWERS J., PARK D., PRICE W., BOSCH F.X., PENNINGTON J., VERGER P., YOSHIKAWA, T., VAN EGMOND H., JONKER M.A., COKER R. (2001): *Aflatoxin M₁. Safety evaluation of certain mycotoxins in food*, WHO Food Additives Series 47 (Geneva: World Health Organization), p. 1.
- IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER) (1993): *Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*, «IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans», 56, IARC Scientific Publications, Lyon, p. 489.
- KUIPER-GOODMAN T. (2004): *Risk assessment and risk management of mycotoxins in food*, in Magan N. e Olsen M. (Ed.), p. 3. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- MARQUARDT R., FROHLICH A. (1992): *A review of recent advances in understanding ochratoxicosis*, «J. Animal Sci.», 70, pp. 3968-3988.
- MINISTERO DELLA SANITÀ (1999): Circolare n. 10, 9 giugno 1999, «Gazzetta Ufficiale Repubblica Italiana», 135, 11 giugno 1999.
- PATTERSON D., ROBERTS B., SMALL B. (1976): *Metabolism of ochratoxins A and B in the pig during early pregnancy and the accumulation in body tissue of ochratoxin A only*, «Food Cosmet. Toxicol.», 14, pp. 439-442.
- PIETRI A., BERTUZZI T., BERTUZZI P., PIVA G. (1997): *Aflatoxin M₁ occurrence in samples of Grana Padano cheese*, «Food Addit. Contam.», 14, pp. 341-344.
- PIETRI A., BERTUZZI T., MOSCHINI M., PIVA G. (2003): *Aflatoxin M₁ occurrence in milk samples destined for Parmigiano Reggiano Cheese production*, «Italian Journal of Food Science», 15 (2), pp. 301-306.
- PIETRI A., BERTUZZI T., FORTUNATI P., GUALLA A. (2003): *Excretion pattern of aflatoxins in buffalo milk and carry-over in mozzarella cheese*, Proceedings of the ASPA XV Congress, Parma, 18-20 giugno 2003, «Ital. J. Anim. Sci.», 2, Suppl. 1, pp. 302-304.
- PIETRI A., BERTUZZI T., PALLARONI L., PIVA G. (2004): *Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy*, «Food Addit. Contam.», 21, pp. 479-487.
- PLEŠTINA R. (1996): *Nephrotoxicity of ochratoxin A*, «Food Addit. Contam.», 13, Suppl. 1, pp. 49-51.
- SCHLATTER C., STUDER-ROHR J., RÁSONYI T. (1996): *Carcinogenicity and kinetic aspects*

- of ochratoxin A*, «Food Addit. Contam.», 13, Suppl. 1, pp. 43-45.
- TURCONI G., GUARCELLO G., LIVIERI C., COMIZZOLI S., MACCARINI L., CASTELLAZZI A. M., PIETRI A., PIVA G., ROGGI C. (2004): *Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn. An epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy)*, «Eur. J. Nutr.», 43, pp. 191-197.
- VAN EGMOND H.P. (1989): *Aflatoxin M₁: occurrence, toxicity, regulation*, in *Mycotoxins in Dairy Products*, H.P. van Egmond (Ed.), Elsevier Applied Science, London e New York, p. 11,
- VELDMAN A., MEIJST J.A.C., BORGGREVE G.J., HEERES-VAN DER TOL J.J. (1992): *Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk*, «Anim. Prod.», 55, pp. 163-169.
- YOUSEF A.E., MARTH E.H. (1989): *Stability and degradation of Aflatoxin M₁*, in *Mycotoxins in Dairy Products*, H.P. van Egmond (Ed.), Elsevier Applied Science, London e New York, p. 127.

PAOLA BATTILANI*, STEFANIA POLLASTRO**, ANGELA SILVA***,
FRANCO FARETRA**

Cause e azioni di prevenzione della contaminazione dei vini da ocratossina A

INTRODUZIONE

L'importanza che il comparto viti-vinicolo ha nell'economia nazionale è testimoniata dal primato che l'Italia ha confermato nel 2004 a livello mondiale, con oltre 53 milioni di hl di vino ottenuti a partire da 7,5 milioni di t di uva vendemmiata in 784.397 ha (ISTAT, <http://www.istat.it>; ultima consultazione 21 gennaio 2005).

Le produzioni nella filiera viticola-enologica sono spesso compromesse dalle varie forme di marciume del grappolo e, in particolare, da muffa grigia, marciume acido e marciumi secondari. Queste alterazioni, oltre a causare gravi perdite quantitative, costituiscono un importante fattore di rischio per la qualità e la sicurezza del vino.

L'influenza negativa della muffa grigia [*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz., teleomorfo di *Botrytis cinerea* Pers.] sulla composizione e sulle caratteristiche qualitative di mosti e vini è ben documentata (Gaia et al., 1978; Guerzoni et al., 1979; Fregoni et al., 1985; Pallotta et al., 1995). Enzimi, quali laccasi e polifenolossidasi, prodotti dal patogeno, causano la rottura del colore (casse ossidasica), un'alterazione particolarmente grave per i vini rossi destinati all'invecchiamento.

Anche per il marciume acido sono ben note le modificazioni, quali l'incremento di acidità volatile, di mosti e vini (Bisiach, 1982; Bisiach et al.,

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

** Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia applicata, Università degli Studi di Bari

*** Istituto di Enologia e Ingegneria Agro-Alimentare, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

1981, 1985; Guerzoni e Marchetti, 1982; Zironi et al., 1982, 1983). Non altrettanto può dirsi sull'eziologia, poiché la composizione della popolazione microbica responsabile dell'alterazione è molto condizionata sia dalla zona sia dall'andamento climatico dell'annata (Bisiach et al., 1981; Guerzoni e Marchetti, 1982; Vercesi et al., 1986).

Le modeste perdite di produzione attribuibili ai marciumi del grappolo causati da funghi secondari hanno fatto sì che l'attenzione a questi riservata sia stata molto limitata per lungo tempo. Negli ultimi anni, tali marciumi hanno destato interesse in quanto alcuni dei funghi coinvolti hanno mostrato di essere produttori di micotossine, metaboliti secondari tossici per l'uomo e gli animali, frequenti contaminanti degli alimenti.

Le micotossine sono numerose e includono le ocratossine. Fra queste, l'ocratossina A (OTA) è la più importante. Inizialmente riportata quale metabolita secondario di *Aspergillus ochraceus* Wilhem è stato poi accertato che è prodotta da oltre quindici specie di *Aspergillus* e da almeno tre specie di *Penicillium* (Van der Merwe et al., 1965a, 1965b; Varga et al., 1996).

L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro ha incluso la tossina, di nota attività nefrotossica, epatotossica, teratogena, immunotossica e probabilmente, neurotossica in molte specie animali, fra le sostanze (gruppo 2B) di accertata cancerogenicità per gli animali e potenziale per l'uomo (IARC, 1993).

L'OTA è un frequente contaminante di varie derrate alimentari, tra cui cereali e prodotti derivati, piante oleaginose, legumi, cacao, caffè, frutta secca, spezie, latte e altri prodotti di origine animale, quali siero, rene di suino, insaccati e altri alimenti derivati dal suino. Nel 1996, l'OTA è stata rilevata in campioni di vino di varia origine (Zimmerli e Dick, 1996) e di seguito anche in mosti concentrati, succhi d'uva e uva passa. Analisi condotte su mosti e vini prodotti in paesi europei e mediterranei hanno permesso di accertare un maggiore rischio di contaminazione di vini rossi e da dessert rispetto a quelli bianchi e rosé e, in particolare, di quelli prodotti negli areali europei a clima più caldo e nel Nord Africa, con concentrazioni di tossina anche superiori a 10 ng ml⁻¹ (Majerus e Otteneder, 1996; Zimmerli e Dick, 1996; Burdaspal e Legarda, 1999; Visconti et al., 1999; Otteneder e Majerus, 2000; Pietri et al., 2001; Wardan, 2001; Battilani e Pietri, 2002; Battilani et al., 2002, 2003; Pollastro et al., 2003, 2005a; Serra et al., 2004; Vercesi et al., 2004).

La diffusa contaminazione degli alimenti e la tossicità dell'OTA hanno indotto la Comunità Europea a stabilire i limiti massimi di tossina in diversi alimenti. Recente è la pubblicazione del Reg. (CE) N. 123/2005 della Commissione del 26.1.2005, che modifica il Reg. (CE) n. 466/2001, e fissa in 2,0

$\mu\text{g kg}^{-1}$ (ppb) il limite massimo tollerabile di OTA nel vino (rosso, bianco e rosé) e in altri vini e/o bevande a base di succo d'uva, in succo d'uva incluso il nettare d'uva e il succo concentrato, il mosto d'uva e il mosto d'uva concentrato ricostituito destinati direttamente al consumo umano. Il regolamento, entrato in vigore l'1.4.2005, è entrato in applicazione per i vini prodotti dopo la vendemmia del 2005.

FUNGHI OCRATOSSIGENI

L'OTA è prodotta da oltre quindici specie di *Aspergillus* e da almeno tre specie di *Penicillium* (Van der Merwe et al., 1965a, 1965b; Varga et al., 1996). Questi miceti, ubiquitari e polifagi, sono presenti in forma di conidi nell'aria e nel terreno. Alcune specie sono impiegate nella produzione di antibiotici o, nel settore agro-alimentare, per la produzione di formaggi e salse; altre sono invece importanti come agenti causali di malattie dell'uomo e degli animali o perché responsabili di deterioramento di pellami, tessuti e delle più disparate derrate vegetali, in particolare frutta e granaglie, che possono, pertanto, essere contaminate da metaboliti tossici. Entrambi i generi, pertanto, sono oggetto di intense ricerche sia perché responsabili di alterazioni di prodotti alimentari sia per le possibili applicazioni in campo farmaceutico o alimentare (Schuster et al., 2002).

La Sezione *Nigri* del genere *Aspergillus* comprende funghi cosmopoliti, che hanno acquisito rilevanza di recente in quanto responsabili della contaminazione da OTA del vino, mentre sono stati raramente presi in considerazione come causa di perdite quanti-qualitative a carico dell'uva.

Descrizione e classificazione

Entrambi i generi sono molto complessi e includono un elevato numero di specie, spesso difficilmente discriminabili fra loro. La tassonomia dei generi *Aspergillus* e *Penicillium* è, inoltre, costante oggetto di rivisitazioni.

La tassonomia di *Aspergillus* Sezione *Nigri*, che di seguito si riporta nella sua evoluzione, è stata recentemente rivista da Abarca et al. (2004). Le 35 specie di *Aspergillus* nere identificate inizialmente (Mosseray, 1934) furono ridotte a 12 circa 30 anni dopo (Raper e Fennell, 1965). Una revisione eseguita nel 1980 (Al-Musallam, 1980), principalmente su base morfologica, ha portato all'individuazione di sette specie (*Aspergillus japonicus* Saito, *Aspergillus*

carbonarius (Bainier) Thom, *Aspergillus ellipticus* Raper et Fennell, *Aspergillus helicothrix* Al-Musallam, *Aspergillus heteromorphus* Batista et Maia, *Aspergillus foetidus* Thom et Raper e *Aspergillus niger* van Tieghem, dove *A. niger* è descritto come un aggregato di sette varietà e due *formae*). Solo nove anni più tardi, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. japonicus*, *A. helicothrix*, *Aspergillus atro-violaceus* Mosseray e *A. carbonarius* sono state raggruppate come specie differenzianti conidi echinulati e distinguibili dalle altre specie con conidi verrucosi (Kozakiewicz, 1989). Questi ultimi includono *Aspergillus fonscaeus* Thom et Raper, *Aspergillus acidus* Nakazawa, *Aspergillus niger* var. *niger* Van Tieghem, *Aspergillus niger* var. *phoenicis* (Corda) Al-Musallam, *Aspergillus niger* var. *ficuum* (Reichert) Hennings, *Aspergillus niger* var. *tubingensis* Moss Kozakiewicz, *Aspergillus niger* var. *pulverulentus* Al-Musallam, *Aspergillus niger* var. *awamori* (Nakazawa) Al-Musallam, *Aspergillus citricus* (Wehmer) Mosseray (*A. foetidus*) e *Aspergillus citricus* var. *pallidus* (Nazak., Simo et A. Whatan.) Kozak.. Studi tassonomici condotti con l'impiego di marcatori molecolari hanno portato a un'ulteriore divisione del complesso *A. niger* nelle due specie, *A. niger* e *Aspergillus tubingensis* Mosseray (Abarca et al., 2004) e all'individuazione di nuove specie: *Aspergillus vadensis* de Vries (de Vries et al., 2004), *Aspergillus costaricanensis* Samson et Frisvad, *Aspergillus lacticoffeatus* Frisvad et Samson, *Aspergillus piperis* Samson et Frisvad, *Aspergillus sclerotio-niger* Samson et Frisvad, *Aspergillus homomorphus* Steiman, Guiraud, Sage et Sigle-Mur. ex Samson et Frisvad (Samson et al., 2004).

La complessa organizzazione dei generi, così come le difficoltà legate alla corretta identificazione dei miceti a livello di specie, potrebbero essere causa di errate segnalazioni sulla reale capacità delle specie sino a ora riconosciute come ocratossigene.

Di seguito sono riportate le principali caratteristiche delle specie di *Aspergillus* e *Penicillium* note quali produttrici di OTA:

Aspergillus aculeatus Lizuka.

Colonie di colore porpora-marrone o porpora-nero. Possibili sclerozi di colore bianco-crema, più abbondanti nella parte centrale della colonia. L'apice dei conidiofori, globoso e raggiato (500-700 μm di diametro), porta catene di conidi; la vescicola allungata nella fase giovanile, si presenta globosa a maturità raggiungendo un diametro compreso tra 30 e 100 μm . Gli sterigmi sono uniseriati e portano conidi di forma variabile, da ellittica a rotondeggiante. Micotossine note: ocratossina A, acido secalonico (Anderson et al., 1977) e altri metaboliti secondari di minore importanza (Frisvad e Samson, 1991).

Aspergillus alliaceus Thom et Church.

Colonie da marrone pallido a bruno con sclerozi grigio-neri. Teste conidiche radiate o a colonna. Conidiofori con pareti lisce, lunghi sino a 1,2 mm, ialini. Vescicole sferiche, raramente allungate. Cellule conidiogene biseriate su larghe vescicole, o spesso uniseriate su piccole vescicole. *Metulae* o fialidi ricoprenti a maturazione la metà superiore della vescicola. Conidi da ovoidali a sferici, con pareti lisce, giallastri, di 2,5-4 x 2-3,5 μm . Sclerozi, quando presenti, neri con apice biancastro, da ovoidali a ellittici, con dimensioni di 500-700 μm . Micotossine note: ocratossina A (Hesseltine et al., 1972).

Aspergillus auricomus (Guéguen) Saito.

Colonie talvolta striate radialmente e zonate marginalmente da un leggero ma continuo strato di sclerozi che dal bianco virano al giallo sino a diventare rossastri a maturazione, conferendo alla colonia tessitura e colorazione caratteristiche. Teste conidiche di due dimensioni, larghe e su lunghi stipi al margine della colonia, più piccole fra gli sclerozi. Le teste più grandi sono da globose a radiate o divise in colonne ben definite fino a 450-500 μm di diam. Conidiofori lunghi (1,0-)1,5 x 2,5(-3,0) mm e di 9,0-18,0 μm di diam, da ialini a leggermente colorati e, generalmente, da lisci a leggermente rugosi. Vescicole globose, 30-60 μm di diam, fertili sull'intera superficie. Sterigmi biserati, primari di 10-15 x 5-6 μm e secondari di 7,5-9,0 x 2,2-3,3 μm . Conidi da ellittici a ovali, a pareti spesse e lisce, di 3,3-4,4 x 2,5-3,0 μm . Sclerozi da globosi a sub-globosi da 500 a 700 μm di diam. Micotossine note: ocratossina A (Varga et al., 1996; Rizzo et al., 2002).

Aspergillus awamori Nakazawa (Sin. *Aspergillus pseudo-citricus* Mosseray, *Aspergillus pseudo-niger* Mosseray, *Aspergillus pseudo-nigra* Cost. et Lucet, *Aspergillus myakoensis* Nakazawa).

Teste conidiche globose, quindi leggermente radiate o divise in colonne ben definite, da 100 a 500 μm , individualmente di colore marrone-oliva quindi marrone-rossastro. Conidiofori con pareti sottili (fino a 2,0 μm), lisce, talvolta colorate nella parte terminale, variabili in lunghezza (da 200-300 μm a 2,0-3,0 mm) e diametro (5-20 μm). Vescicole globose, generalmente leggermente brune, in genere fra 25 e 50 μm di diam, fertili sull'intera superficie. Sterigmi biserati, primari di 10-20 x 4,5-7 μm e secondari di 5,5-10,0 x 3,0-4,0 μm . Conidi da globosi a sub-globosi, 3,5-6,0 μm in diam, da lisci a rugosi con grossolane echinature. Micotossine note: ocratossina A (Abarca et al., 1994; Téryen et al., 1996).

Aspergillus carbonarius (Bainier) Thom (Sin. *Aspergillus atropurpureus* Zimm., *Aspergillus fonscaeus* Thom et Raper).

È caratterizzato da uno sviluppo lento delle colonie e dalla presenza di un'abbondante efflorescenza nera. Le teste globose, molto grandi (500-600 µm di diametro), sono portate da lunghi rami conidiofori prodotti come ife emergenti dalla colonia. È possibile rinvenire la presenza di essudati in forma di goccioline attaccate all'apice. I conidiofori terminano con vescicole (60-80 µm in diam) portanti due serie di sterigmi all'apice dei quali sono inseriti i conidi in catene. Micotossine note: ocratossina A (Abarca et al., 1994, 2004; Téren et al., 1996).

Aspergillus foetidus (Nakazawa) Thom et Raper (Sin. *Aspergillus aureus* Nakazawa).

Colonia a sviluppo lento con micelio bianco giallognolo, formante un feltro compatto solcato radialmente. Fondo della colonia da giallo-arancio a rosso-marrone. Teste conidiche piuttosto piccole, da globose a radiate, concentrate nella porzione centrale della colonia, più sparse sui margini, da 200-300 a 500 µm di diam. Conidiofori lunghi da 500 a 800 µm sino a 1,0 mm e con diam di 12 µm, a parete liscia e spessa 1,0-2,0 µm, incolore o marroncini a maturazione. Vescicole piccole, sub-globose o leggermente allungate, da 25-35 a 40-50 µm di diam, fertili sull'intera superficie; sterigmi marroni in due serie, primari di 7-12 x 3,0-5,0 µm, secondari di 7-8 x 2,5-3,0; conidi globosi con pareti marroni che da lisce divengono irregolarmente e leggermente rugose, di 4,0-4,5 µm di diam, portati in catene. Micotossine note: ocratossina A (Ueno et al., 1991; Abarca et al., 1994; Téren et al., 1996).

Aspergillus fumigatus Fresenius.

Colonia da debolmente a marcatamente solcata con micelio biancastro e fondo da giallo chiaro a verdognolo. Possibile presenza di essudati in piccole quantità. Conidiofori emergenti da lunghe ife vegetative con stipi lunghi da 200 a 400 µm, talvolta sinuosi, con parete leggermente pigmentata e sottile, con all'apice vescicole da globose a leggermente piriformi di 20-30 µm di diam, fertili sull'intera superficie, portanti fialidi (6-8 µm di lunghezza) in particolare nella zona più esterna; conidi da sferici a subsferici (2,0-3,0 µm di diam), con pareti da leggermente rugose a marcatamente spinose, in catene definite. Micotossine note: ocratossina A (Samson et al., 2004).

Aspergillus glaucus Link (teleomorph *Eurotium herbariorum* Link).

Specie molto xerofita. Colonie da grigiastre a verdognole con un'area cen-

trale giallastra dove sono differenziati cleistoteci. Il fondo della colonia è da giallo a bruno pallido. Le ife sono settate e ialine. Le teste conidiche sono radiate e vagamente in colonna. Conidiofori lunghi 200-350 μm , a parete liscia e da ialini a marrone pallido. Vescicole da globose a sub-globose, 15-30 μm in diam, uniseriate. Fialidi ricoprenti la porzione superiore della vescicola. Conidi da globosi a sub-globosi, da leggermente rugosi a echinulati, 3,5-6,5 μm in diam. Cleistoteci gialli, con pareti sottili, globosi, 75-125 μm in diam, generalmente ricoperti da ife rosse. Aschi contenenti 8 spore; ascospore mature in 2-3 settimane, ialine, lisce o debolmente rugose, con un prominente solco equatoriale, di 6-7 x 3,5-5 μm . Micotossine note: ocratossina A (Chelkowski et al., 1987).

Aspergillus japonicus Saito.

Colonie generalmente a crescita rapida, consistenti in micelio basale denso, bianco e irregolarmente corrugato che, in seguito, origina un ammasso di strutture conidiche violaceo-brune o violaceo-nere. Gli sclerozi possono essere differenziati nella porzione centrale della colonia, sono globosi, da bianchi a color crema. Teste conidiche piccole, a raggi o suddivise in poche colonne indistinte, raramente superano i 300 μm in diam. Conidiofori lisci o con limitata superficie granulosa, incolore o leggermente pigmentati soprattutto in prossimità delle vescicole, per lo più di 500-1000 x 5-10 μm ma variabili nelle dimensioni. Vescicole leggermente colorate di tonalità brunastra gialla, spesso piuttosto allungate ma nelle teste più vecchie e larghe più tendenti al globoso, generalmente di 20-30 x 25-35 μm (da 15 a 45 μm di diam). Sterigmi uniseriati normalmente di 5,5-8,0 x 3,0-4,5 μm , raramente rigonfi. Conidi per lo più globosi, occasionalmente sub-globosi, fortemente echinulati. Gli sclerozi, prodotti abbondantemente ma tardivamente da alcuni isolati, misurano fino a 500 μm . Micotossine note: ocratossina A (Dalcero et al., 2002; Battilani et al., 2003a).

Aspergillus lacticoffeatus Frisvad et Samson.

Colonie dense da bianco a marrone scuro. Ife settate e ialine. Assenza di sclerozi ed essudati, fondo della colonia da crema a marroncino. Teste conidiche inizialmente globose quindi in colonne; stipi corti (200-)300-(1200) x (7-)8-10(-15) μm , con pareti sottili, lisce, di colore arancio-bruno. Vescicole pressoché sferiche di 40-45 x 60-65 μm , biseriate; *metulae* ricoprenti l'intera superficie della vescicola, 12-25 x 3-6 μm ; fialidi 7-10 x 3-4 μm ; conidi subglobosi 3,5-4,1 x 3,4-3,9 μm , generalmente lisci o leggermente rugosi. Sclerozi assenti. Micotossine note: ocratossina A e B (Rizzo et al., 2002).

Aspergillus melleus Yukawa [sin. *Aspergillus quercinus* (Bainier) Thom et Church].

Colonie compatte a sviluppo lento, abbondantemente solcate e con margini depressi, sclerozi abbondantemente prodotti in uno strato denso che conferisce la caratteristica tessitura alla colonia; di colore crema tendente al miele. Ife settate e ialine. Teste conidiche globose e generalmente di diam inferiore a 200 μm , divise in poche colonne divergenti negli isolati a sporificazione più abbondante. Conidiofori lunghi sino a 3 mm con diam da 5,5 a 15 μm , di colore giallo pallido possono essere da poco a molto rugosi. Vescicole generalmente globose, raramente allungate, da 15-45 a 25-40 μm , fertili su tutta la superficie. Sterigmi in due serie, primari lunghi 4,5 μm e secondari solo raramente maggiori di 9,0 μm . Conidi di forma variabile da globosi/sub-globosi a leggermente ellittici, 2,8-3,5 μm di diam, lisci o solo leggermente rugosi. Sclerozi globosi talvolta allungati o irregolari, generalmente di 400 μm di diam. Micotossine note: ocratossina A (Hesseltine et al., 1972).

Aspergillus niger van Tieghem.

È caratterizzato da un rapido sviluppo delle colonie che presentano abbondante micelio immerso nel substrato e ife conidiogene emergenti; inizialmente bianche, divengono rapidamente nere per la differenziazione dei conidiofori. La colonia sul fondo si presenta giallo pallido e può produrre fessurazioni radiali dell'agar. Le ife sono settate e ialine. I conidiofori, di colore marrone-nero, coprono interamente la colonia eccetto una ristretta area marginale. Le teste conidiche sono globose o raggiate, di 700-800 μm di diametro, si dividono in catene a maturità. La specie è biseriata. I conidiofori sono lunghi (400-3000 μm), con pareti lisce e ialini, più scuri all'apice, terminanti con vescicole globose di 45-75 μm di diam che producono *metulae* che portano fialidi di 30-75 μm in diam. *Metulae* e fialidi ricoprono l'intera superficie della vescicola. Conidi da marroni a neri, molto rugosi, globosi, di 4-5 μm di diam. Micotossine note: ocratossina A (Abarca et al., 1994; Téren et al., 1996).

Aspergillus ochraceus K. Wilh. (Sin. *Aspergillus alutaceus* Berk. et Curtis).

Colonie a sviluppo ridotto, da giallo-arancio a ocraceo. Micelio biancastro costituito da ife settate di forma cilindrica. Sclerozi prodotti occasionalmente, bianchi da giovani divengono a maturità di colore da rosa a porpora. Conidiofori eretti prodotti da ife superficiali, stipi lunghi 1,0-1,5 mm da giallastro a bruno pallido, da finemente a grossolanamente rugosi, con occasionale presenza di essudati. Vescicole sferiche di 25-50 μm di diam, portanti *metulae*

fortemente raggruppate di 15-20 μm e filidi di 9-12 μm sull'intera superficie; cellule conidiogene biseriate; conidi giallo-bruni, da sferici a sub-sferici di 2,5-3,5 μm di diam, con parete da liscia a leggermente rugosa, quando giovani portati a raggiera sulle teste quindi a maturità in due o più ampie colonne. Sclerozi da rosa a rosso porpora, di forma irregolare, fino a 1 mm diam. Lo sviluppo di *A. ochraceus* è inibito da *Aspergillus niger* (Paster et al., 1992). Micotossine note: ocratossina A, B e C (Van der Merwe et al., 1965a, 1965b); solo alcuni isolati sono tossigeni (Ciegler, 1972).

Aspergillus ostianus Wehmer (sin. *Aspergillus butyracea* (Bain.) Tom et Raper).

Colonie a sviluppo rapido producenti conidiofori eretti con teste prima giallognole quindi ocracee; il fondo della colonia è di colore giallo-rosato. Teste conidiche inizialmente globose (200-250 μm di diam), quindi sviluppati due o più colonne compatte di conidi. Conidiofori eretti o leggermente inclinati nella parte terminale, giallo oro, grossolanamente rugosi, di lunghezza variabile da 600-750 μm a 1-2 mm, con pareti spesse. Vescicole tipicamente globose di 25-40 μm di diam con parete spessa e giallastra, fertili sull'intera superficie. Sterigmi biseriatati, generalmente lunghi 7-10 μm . Conidi da ellittici a piriformi di 4,0-4,5 μm , irregolarmente rugosi. Sclerozi prodotti occasionalmente nella porzione centrale della colonia, da globosi a ovoidi (500-1000 μm di diam). Micotossine note: ocratossina A (Hesseltine et al., 1972).

Aspergillus petrakii Vörös.

Colonie a sviluppo piuttosto lento, micelio bianco, talvolta solcato, produce conidiofori abbondanti di colore giallo ocraceo. Teste conidiche da globose a radiate, generalmente 100 μm in diam. Conidiofori lunghi da 200 a 1.500 μm e larghi da 4,0 a 10,0 μm , con parete sottile, giallo pallido e rugosa. Vescicole da globose ad allungate, fertili sull'intera superficie. Sterigmi in due serie, primari raramente superiori a 12,0 μm , secondari fra 5,0 e 9,0 μm . Conidi da sub-globosi a ellittici o ovoidali 3,0-4,0 x 2,5-3,0 μm , leggermente rugosi. Sclerozi non presenti. Micotossine note: ocratossina A (Hesseltine et al., 1972).

Aspergillus sclerotiorum Huber.

Colonie a sviluppo piuttosto lento, giallo pallido. Teste conidiche radiate, occasionalmente divise in due o più colonne compatte e divergenti. Conidiofori con stipi lunghi sino a 1,2 mm, leggermente gialli, con parete sottile ed echinulata. Vescicole sferiche, di 17-35 μm di diam. Cellule conidiogene

biseriate. *Metulae* ricoprenti l'intera superficie della vescicola. Conidi con parete liscia o leggermente rugosa, sferici, 2-3,5 μm in diam. Sclerozi da sferici a sub-sferici, 1-1,5 mm in diam, da bianchi a color crema. Micotossine note: ocratossina A (Hesseltine et al., 1972).

Aspergillus sclerotium Samson et Frisvad.

Colonia piuttosto tenue con sporulazione limitata. Micelio giallastro con abbondante differenziazione di sclerozi, larghi 1-1,6 mm, da globosi a sub-globosi, da giallo-arancio a rosso marrone, coperti da micelio giallastro. Teste conidiche radiate, stipi corti (400-)500-800(-1200) x (12-)14-16(-18) μm , a parete sottile, liscia e ialina; ampie vescicole 30-35 x 45-50 μm , piriformi, biseriate, *metulae* ricoprenti tre quarti della vescicola, misuranti 8-14 x 4-6 μm ; fialidi di 6,5-9,5 x 3-5 μm ; conidi sub-globosi (4,7-)5-6(-6,4) x (4,5) 4,9-5,6(-6,1) μm , lisci quando giovani, rugosi e di colore bruno scuro a maturità. Micotossine note: ocratossina A e B, aurasperone, piranonigrina A (Samson et al., 2004).

Aspergillus sulphureus (Fres.) Thom et Church.

Colonie a sviluppo piuttosto lento, mostranti leggeri solchi radiali, generalmente producono abbondanti sclerozi di colore bianco, crema o giallo pallido. Teste conidiche dello stesso colore degli sclerozi (da quasi crema a giallo) che raramente superano i 400 μm di diam. Conidiofori generalmente lunghi da 500 a 600 μm (fino a 1,0 mm) e di 6-8 μm in diam, con pareti di 1,0 μm o meno di spessore, lisce o finemente e irregolarmente granulose, variabili in colore (da quasi ialine a giallo pallido). Vescicole ialine, da globose ad allungate, di 12-25 μm di diam. Sterigmi in due serie, primari di 4,5-8,0 x 3,3-4,4 μm , secondari generalmente di 6,5-8,0 x 2,0-2,5 μm . Conidi, talvolta fusiformi e leggermente rugosi appena formati, sono globosi, lisci, di 2,0-2,5 μm di diam. Sclerozi da globosi a subglobosi, per lo più di 300-450 μm a maturità. Micotossine note: ocratossina A (Hesseltine et al., 1972).

Aspergillus versicolor (Vuillemin) Tiraboschi.

Colonie su PDA a 25 °C variamente colorate (da cui *versicolor*), dal verde pallido al beige, dal verde rosato al verde salmone o al verde scuro. Il fondo della colonia appare da rossastro a incolore. Gli essudati, quando presenti, sono da rosa a rosso-marrone. Lo sviluppo della colonia è piuttosto lento. Le ife sono settate e ialine. Le teste conidiche sono biseriate e vagamente radiate. Conidiofori lunghi 120-700 μm , da ialini a marrone pallido, a parete liscia e fragile. Vescicole piccole (circa 9-16 μm in diam) di forma variabile, con

metulae e fialidi ricoprenti l'intera vescicola. Conidi di 2,5-3 μm in diam, globosi, possono essere da finemente a distintamente rugosi. Micotossine note: ocratossina A, sterigmatocistina (Paul e Thurm, 1979; Rizzo et al., 2002).

Aspergillus wentii Wehmer.

Caratterizzato da una crescita lenta delle colonie che si presentano fiocose con ife bianche o gialle. Può produrre essudati chiari. Il fondo della colonia è giallo pallido. La produzione conidica è moderata. I conidiofori emergono da ife aeree, sono lunghi 500-1200 μm , con pareti sottili e lisce. L'apice dei conidiofori è slargato, globoso, 500 μm in diam. Vescicole pressoché sferiche, 25-35 μm di diam, con *metulae* e fialidi densamente distribuite sull'intera superficie. *Metulae* lunghe 10-18 μm ; fialidi ampolliformi lunghe 7-12 μm . Conidi, da sferici a ellittici (3,5-5,0 μm diam), con pareti lisce, poco colorati quando giovani, diventano globosi e di colore giallo-marrone a maturità. Micotossine note: ocratossina A, emodina (Wells et al., 1975; Varga et al., 1996; Rizzo et al., 2002).

Penicillium nordicum (Ramírez) Dragoni et Cantoni ex Ramírez.

Micelio fiocoso con possibile presenza di essudati chiari o leggermente gialli. Il fondo della colonia è di colore giallo crema. Conidiofori triverticillati, elementi appressati che si sviluppano dalla superficie o sulla superficie dell'ifa, cilindrici di 12-22 x 3-4 μm . Conidi con parete rugosa da globosi a subglobosi di 2,6-3,4 μm , di colore verde. Fialidi da cilindriche affusolate a colonna 7-9 x 2,2-2,8 μm . *Metulae* cilindriche di 8-13 x 3-4 μm . Stipi con parte rugosa di 200-450 x 3-4 μm a sinnema o fascicolati. Sclerozi assenti. Micotossine note: ocratossina A e B (Spotti et al., 1999).

Penicillium verrucosum Dierckx.

Colonie a crescita lenta, spesso dotate di strette scanalature, da rade e lanuginose a profonde, fascicolate e fiocose. Micelio bianco, con formazioni conidiche lievi ed essudati che vanno da candido a giallo nitido che diventano sempre più scuri con l'età. Rami conidiofori che nascono al di sotto della superficie o sulla superficie ifale, lunghi 200-500 μm , robusti, con pareti ruvide e recanti, nella parte terminale, penicilli molto variabili. Alcuni isolati li producono compatti e triverticillati o quadriverticillati, in altri predomina la forma triverticillata o biverticillata. Le ramificazioni, 1-2 per conidioforo, sono lunghe 10-15 μm . I conidi, caratterizzati da lieve colorazione verde brillante e dall'assenza di altre pigmentazioni evidenti, in genere di forma sferica, più raramente sferoidali o ellittici, sono di 2,5-3

µm di diam, con pareti lisce. Micotossine note: ocratossina A (Ciegler et al., 1973; Krogh et al., 1973; El-Banna et al., 1987; Pitt, 1987; Frisvad e Filtenborg, 1989; Scudamor et al., 1993; Castella et al., 2002; Lund e Frisvad, 2003).

Penicillium viridicatum Westling.

Colonie dense e compatte caratterizzate da una crescita moderatamente lenta, di 19-25 mm di diam dopo una settimana, solcate radialmente, dense, tipicamente rade, lanuginose e granulari o meno comunemente fiocose. Il fondo della colonia presenta colore rosso marrone-terracotta. Micelio inconsistente e bianco; produzione conidica moderata. Conidi giallo-verdi di forma subsferica o ellissoidale, di 3-4 µm, con pareti in genere lisce, disposti sulla superficie in modo disordinato. Producono essudati di colore candido. Conidiofori che si sviluppano al di sopra o al di sotto del micelio, lunghi circa 200-300 µm, in genere con pareti rugose e con penicilli in genere triverticillati e solo raramente quadriverticillati. Micotossine note: ocratossina A e B (El-Banna et al., 1987; Spotti et al., 1999).

Caratterizzazione molecolare di Aspergillus Sezione Nigri

La tassonomia dei funghi appartenenti alla Sezione *Nigri* del genere *Aspergillus* (aspergilli neri) è complessa, poiché la separazione delle specie è spesso basata su piccole differenze morfologiche di colore, dimensioni e ornamentazione delle spore e richiede tempi lunghi e competenze specifiche. Alcune specie della Sezione *Nigri*, in particolare *A. carbonarius*, sono state individuate quali responsabili della contaminazione da ocratossina A dell'uva e, quindi, la loro corretta identificazione a livello specifico, possibilmente con metodologie rapide e affidabili, ha grande rilevanza. I metodi molecolari sono quelli che meglio rispondono alle esigenze di stabilire dettagli tassonomici e di mettere a punto metodi diagnostici affidabili e rapidi.

Come è stato accennato in precedenza, la tassonomia degli aspergilli neri, basata su caratteri morfologici, è stata affrontata da Thom e Raper (1945) e Raper e Fennell (1965), che individuarono rispettivamente 15 e 12 specie. Al-Musallam (1980) ha rivisto la tassonomia di questo gruppo elaborando con l'analisi cluster tutti i dati morfologici e colturali disponibili; ha così individuato 5 specie facilmente distinguibili (*A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. helicothrix*, *A. heteromorphus* e *A. japonicus*) e un gruppo indistinto, definito *A. niger* "aggregate", suddiviso in 7 varietà.

Gli studi molecolari di Peterson (2000), il quale ha sequenziato le regioni D1 e D2 del DNA ribosomiale, hanno sostanzialmente confermato i risultati di Al-Musallam (1980). Le specie uniseriate, *A. japonicus* e *A. aculeatus*, formano una branca nella Sezione *Nigri*; le specie biseriate formano una branca separata, chiaramente distinta, comprendente *A. carbonarius*, *A. ellipticus* e *A. heteromorphus*, mentre le altre formano *A. niger* “aggregate”, con 2 gruppi in riferimento alle 2 specie *A. niger* e *A. tubingensis*. Questo risultato è stato poi confermato da vari autori (Kusters et al., 1991; Mégnéneau et al., 1993; Varga et al., 1993; Parenicová et al., 1997).

Sfortunatamente, *A. niger* e *A. tubingensis* sono molto difficili da distinguere morfologicamente, ma Accensi et al. (1999) utilizzando la tecnica RFLP sull'ITS-5-83rDNA hanno individuato 2 bande distinte, denominate N e T in riferimento ad *A. niger* e *A. tubingensis*, rispettivamente. Inoltre, quando questi studi sono stati integrati con la verifica della produzione di OTA; tutti i produttori sono stati classificati come “pattern N”, mentre nessuno degli isolati classificati come “pattern T” ha prodotto OTA (Accensi et al., 2001). Questo risultato è stato confermato applicando la medesima metodologia a isolati ottenuti da uva (Bau et al., 2005).

Applicando la tecnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) a isolati rappresentativi della popolazione di *Aspergillus* Sezione *Nigri* ottenuti da uva nel sud Europa, sono stati ottenuti 4 gruppi, 3 dei quali con elevata omogeneità: *A. carbonarius*, *A. tubingensis* e *Aspergillus* uniseriati. Il quarto gruppo, definito “tipo *A. niger*”, ha mostrato elevata eterogeneità. Alcuni isolati non sono stati compresi in alcun gruppo (Perrone et al., 2005).

Incidenza dei funghi ocratossigeni e di ocratossina A in Europa

Aspergillus Sezione *Nigri* sono stati rilevati sui grappoli già a partire dall'allegazione, ma con bassa frequenza nelle fasi precoci del ciclo vegetativo. Un monitoraggio eseguito in 5 paesi europei (Portogallo, Spagna, Francia, Italia e Grecia) e in Israele, nel triennio 2001-2003, ha evidenziato una presenza considerevole di questi funghi a partire da inizio invaiatura e un incremento proseguendo verso la maturazione (Battilani et al., 2005a). L'incidenza degli *Aspergillus* Sezione *Nigri* a inizio invaiatura, valutata come percentuale di bache positive per l'isolamento di questi funghi, è stata inferiore al 25% nella maggior parte dei paesi, ma in Italia e Israele ha superato in media il 30% con picchi fino al 65% in Israele nel 2003. L'incidenza di *Aspergillus* Sezione *Nigri* a maturazione è stata particolarmente alta in Grecia, Francia e Israele,

dove l'incidenza ha superato il 50%, mentre in Spagna non ha mai superato il 20%. L'incidenza maggiore è stata rilevata nel 2003, quando più dell'85% delle bacche è risultata colonizzata sia in Israele che in Francia. La variabilità di incidenza dei funghi in ciascun paese è stata alta, in molti casi compresa tra 0 e 100% a seconda del vigneto considerato.

Tra gli *Aspergillus* isolati dalle bacche, gli uniseriati sono stati i meno rappresentati, sempre assenti in Grecia e isolati solo sporadicamente in Portogallo e in Spagna. La maggior parte delle bacche è risultata colonizzata da *A. niger* "aggregate"; l'incidenza maggiore è stata rilevata in Francia e Israele con il 60% circa di bacche colonizzate. *A. carbonarius* è stato isolato in tutti i paesi e in tutti gli anni considerati, ma la sua incidenza è stata mediamente inferiore al 10%, con elevata variabilità tra i vigneti. Il numero più elevato di bacche infette da *A. carbonarius* è stato rilevato a maturazione in Francia, con una media, nei tre anni, intorno al 30%. Nei medesimi vigneti, in concomitanza con l'isolamento dei funghi, è stata quantificata l'OTA nei grappoli. Campioni positivi sono stati rinvenuti in tutti i paesi, a eccezione del Portogallo, ma la concentrazione è stata quasi sempre inferiore al limite di legge. I valori più elevati sono stati trovati nelle aree meridionali di Francia e Italia e in Grecia.

Risultati differenti sono stati ottenuti da un monitoraggio svolto in Italia nel 1999 e nel 2000 in vigneti situati in Romagna e in Puglia. Nel 1999, la tossina è risultata presente solo in tracce fino alla fase di inizio invaiatura, tranne in due vigneti in cui sono state raggiunte concentrazioni di OTA dell'ordine di 1 ng g⁻¹ di bacche, saliti a 3 ng g⁻¹ a maturazione. La quantità più elevata è stata ottenuta in un altro vigneto con 13 ng g⁻¹. Questi tre vigneti erano tutti localizzati in aree viticole del sud Italia. Nel 2000, sono state rilevate solo tracce della tossina in tutti i campioni raccolti, anche a maturazione (Battilani et al., 2003b).

Incidenza dei funghi ocratossigeni e di ocratossina A in Italia

Nel periodo 1999-2004 è stata svolta un'azione di monitoraggio in oltre 150 vigneti a uva da vino rappresentativi dell'ambiente viticolo meridionale (Puglia, Calabria, Campania, Molise e Basilicata) comprendenti 24 vitigni, di cui 4 a bacca chiara e 20 a bacca scura. In ciascun vigneto, al momento della vendemmia aziendale, da 4 gruppi di 10 viti ciascuno sono stati prelevati campioni di grappoli (25-50 kg) che, dopo rilevazioni sull'incidenza di muffa grigia, marciumi secondari (da *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.) e marciume acido, sono stati sottoposti a microvinificazione, analisi micologica e determinazione dell'OTA.

La microvinificazione è stata eseguita con le normali tecniche di vinificazione in rosso o in bianco. La micoflora presente in campioni di mosto ottenuti dopo la pigia-diraspatura, per le uve vinificate in rosso, o dopo la rimozione delle vinacce, per quelle in bianco, è stata determinata quantitativamente mediante substrati selettivi per l'isolamento di funghi tossigeni e l'identificazione delle colonie sviluppatesi (Pollastro et al., 2005b e in corso di stampa). La quantificazione dell'OTA è stata eseguita applicando la metodica descritta da Visconti et al. (1999).

Il marciume delle bacche da *Aspergillus* sp., più diffuso in Calabria, Puglia e Molise, è stato rinvenuto in media nel 78% dei vigneti, con un'incidenza che, sebbene variabile in funzione dell'annata, è stata abbastanza modesta, interessando sempre meno del 40% dei grappoli con un numero medio di 2-4 bacche marcescenti per grappolo. 'Chardonnay', 'Gaglioppo', 'Sangiovese', 'Primitivo', 'Negroamaro', 'Montepulciano' e 'Lambrusco' sono stati i vitigni maggiormente interessati dall'alterazione, mentre l'incidenza minore è stata rilevata su 'Cabernet Sauvignon'.

I marciumi dovuti a *Penicillium* sp. sono stati osservati in meno del 50% dei vigneti indagati. L'alterazione ha interessato tra lo 0,6 e il 28% dei grappoli, con al massimo 2 bacche marcescenti per grappolo. Tale forma di marciume è stata particolarmente presente su 'Cabernet Sauvignon', 'Gaglioppo' e 'Primitivo'. In Calabria, regione dove ne è stata riscontrata la maggiore incidenza, l'alterazione ha interessato mediamente il 7,7% dei grappoli.

Al momento della vendemmia, la presenza in campo di uva marcescente ha contribuito a determinare una contaminazione fungina dei mosti alquanto elevata: in media da 10^4 a 10^8 UFC (Unità Formanti Colonie) per ml. Gli *Aspergillus* sp. (10^4 - 10^6 UFC per ml di mosto) sono stati quasi sempre prevalenti rispetto ai *Penicillium* sp. (10^2 - 10^3 UFC per ml di mosto), rappresentando in media l'84% della totalità delle colonie fungine rinvenute. Fra gli *Aspergillus* spp., *A. niger* è stata la specie più abbondante (86%), seguita da *A. carbonarius* (12%), mentre è stato sporadico il rinvenimento di *A. aculeatus* e *A. wentii* (2%). La contaminazione da *Penicillium* spp. (16%) è risultata più eterogenea e prevalentemente costituita da *P. variabile* (43%), *P. paxilli* (27%), *P. janthinellum* (14%), *P. implicatum* (12%), *P. purpurogenum* (3%) e *P. brevi-compactum* (1%).

Osservazioni eseguite su campioni di uva prelevati dall'invaiaatura alla vendemmia hanno permesso di rilevare una differente composizione della micoflora tossigena nel tempo. In generale, la contaminazione fungina delle uve è progressivamente aumentata dall'invaiaatura alla fine di settembre per poi andare a ridursi. I *Penicillium* sp. sono stati rinvenuti con maggiore ab-

bondanza all'invasatura e in tarda estate-inizio autunno, mentre gli *Aspergillus* sp., rinvenuti solo occasionalmente all'invasatura, sono stati preponderanti in agosto-settembre.

Osservazioni sulla capacità tossigena dei funghi isolati dall'uva mediante analisi in TLC (Pollastro et al., dati non pubblicati) o HPLC di filtrati colturali o di estratti da micelio hanno evidenziato che *A. carbonarius* è il principale produttore di OTA.

In generale, *A. carbonarius* è stato rinvenuto con maggiore frequenza e abbondanza nei vigneti di Puglia, Calabria e Molise e molto meno o affatto in Campania e Basilicata e in particolare su 'Primitivo', 'Sangiovese', 'Negroamaro', 'Lambrusco' e 'Trebiano'; occasionale è stato il rinvenimento su 'Cabernet Sauvignon' e 'Uva di Troia'. I più elevati livelli di contaminazione da *Penicillium* sono stati osservati in Calabria su 'Greco nero' e 'Gaglioppo'.

In circa il 75% dei mosti è stata rilevata la presenza di OTA, il 95% dei quali erano stati ottenuti da uve a bacca pigmentata. La concentrazione di OTA è stata estremamente variabile in dipendenza degli anni, dei vitigni e dei vigneti di origine. In media, la concentrazione di OTA nel mosto (ng ml^{-1}) è stata pari a 3,8 nel 1999, 0,4 nel 2000, 1,4 nel 2001, 0,6 nel 2002, 1,3 nel 2003 e 0,5 nel 2004. Purtroppo, non sono mancati i casi in cui la concentrazione di OTA è stata molto elevata, superando anche i 10 ng ml^{-1} .

In generale, un maggiore livello di contaminazione da OTA è stato riscontrato nei mosti ottenuti da 'Gaglioppo', 'Negroamaro', 'Primitivo' e 'Sangiovese', mentre minore è stata la contaminazione di 'Cabernet Sauvignon', 'Montepulciano' e 'Uva di Troia'. L'Aglianico in Basilicata ha generalmente avuto una contaminazione molto bassa o nulla, mentre è stato tra i vitigni più suscettibili alla contaminazione (ad es., $7,6 \text{ ng ml}^{-1}$ di mosto) quando allevato in altri areali.

Produzione di ocratossina

Diverse sono le specie di *Aspergillus* e *Penicillium* riportate come produttrici di OTA e quindi responsabili della contaminazione di diverse derrate alimentari. Le valutazioni eseguite in numerosi vigneti localizzati nell'Italia meridionale hanno permesso di verificare che in oltre l'80% dei campioni analizzati le specie isolabili con maggiore frequenza erano riconoscibili come appartenenti al gruppo *Aspergillus*, con *A. niger* come specie prevalente, seguita nell'ordine da *A. carbonarius*, *A. aculeatus* e *A. wentii*.

Diverse sono le tecniche riportate in bibliografia per valutare la capacità degli isolati di produrre OTA. La rilevazione della fluorescenza in HPLC

è il metodo più idoneo per la quantificazione dell'OTA anche se i metodi semiquantitativi, più economici, quali la cromatografia su stato sottile o la rilevazione qualitativa della fluorescenza in piastra sono proposti per valutazioni massali. Alcune di queste tecniche sono state impiegate per valutare la capacità ocratossigena di isolati rappresentativi delle specie di *Aspergillus* e *Penicillium* rinvenute più di frequente in vigneti dell'Italia meridionale. In particolare, la rilevazione su Agar Cocco della fluorescenza verde-blu sul retro di capsule Petri esposte alla luce UV (365 nm) (Dyer e Mc Cammon, 1994) è stata impiegata per valutare la capacità ocratossigena di 20.000 isolati. La fluorescenza tipica non è stata mai osservata in alcuno dei 14.700 isolati di *A. niger*, 216 *A. aculeatus* e 50 isolati di ciascuna di 7 specie di *Penicillium* (*P. brevicompactum*, *P. implicatum*, *P. janthinellum*, *P. paxilli*, *P. purpurogenum* e *P. variable*), mentre risultati positivi sono stati ottenuti da 331 dei 2.207 isolati di *A. carbonarius* (15%) e da 10 di 2.000 isolati di *A. wentii* (0,5%).

La cromatografia su strato sottile (TLC; Betina, 1985) è stata impiegata per valutare la capacità di produrre OTA di 508 isolati di *A. niger*, 265 di *A. carbonarius*, 51 di *A. aculeatus*, 5 di *A. wentii*, e 5 di ciascuna delle specie di *Penicillium* prima indicate. Risultati positivi per la presenza di una tipica macchia blu-verdastra, evidenziabile con esposizione alla luce UV, con Rf analogo a quello dell'OTA (Rf = 0,5), sono stati ottenuti dal 95% degli isolati di *A. carbonarius* e dal 20% degli isolati di *A. wentii*.

Per l'analisi in HPLC è stata seguita la metodologia descritta da Visconti et al. (1999); gli estratti sono stati considerati positivi alla comparsa di un picco a un tempo di ritenzione uguale a quello dell'OTA. L'analisi in HPLC dei filtrati colturali di isolati rappresentativi delle stesse specie analizzate in TLC ha generalmente confermato i risultati. Le eccezioni sono state costituite dal fatto che nessuno degli isolati di *A. wentii* risultati produttori di OTA in TLC ha confermato tale capacità in HPLC e solo 2 dei 28 isolati di *A. niger* analizzati hanno rilasciato OTA nel filtrato colturale, dopo una settimana di allevamento, in quantità marcatamente modeste (0,02-0,03 ng ml⁻¹) e prossime al limite di rilevazione (0,01 ng ml⁻¹).

Un'ampia variabilità nella produzione di OTA è stata osservata fra gli isolati di *A. carbonarius*. Questi, risultati produttori nel 95% dei casi, hanno prodotto tossina a concentrazioni variabili da pochi ng ml⁻¹ a quantità anche superiori a 1 µg ml⁻¹.

Osservazioni condotte sulla influenza delle temperature comprese tra 15 e 40 °C sulla capacità ocratossigena di isolati di *A. carbonarius* e *A. niger* hanno confermato che *A. carbonarius* è il principale se non esclusivo produttore

di OTA. Le maggiori quantità di tossina sono state rilasciate a temperature comprese fra 20 e 25 °C (da 506 a 1.578 ng ml⁻¹), mentre temperature di 35-40 °C la riducono drasticamente anche in relazione al modesto se non nullo sviluppo del micelio.

La produzione di OTA da parte di *A. carbonarius* è influenzata dal tempo di incubazione; la massima quantità di accumulo si verifica nelle fasi di crescita più precoci, intorno a 5 giorni a 25 °C (Belli et al., 2004b). Pollastro et al. (dati non pubblicati) hanno seguito l'evoluzione temporale del rilascio di tossina da parte di *A. carbonarius* analizzando filtrati colturali campionati a intervalli di 24 ore per 7 giorni. Gli isolati sono risultati discriminabili in quattro gruppi: 1) isolati che non hanno prodotto OTA; 2) isolati che hanno prodotto la tossina in quantità modeste (non superiori a 10 ng ml⁻¹) costante nel tempo; 3) isolati che hanno prodotto alte concentrazioni di OTA crescenti nel tempo (da 13 a 502 ng ml⁻¹); 4) isolati che hanno prodotto alte concentrazioni di OTA decrescenti nel tempo (da 398 ng ml⁻¹ già dopo 24 ore a 35 ng ml⁻¹).

Diciassette isolati di *A. niger* e 12 di *A. carbonarius* sono stati impiegati singolarmente per inoculare artificialmente bacche di 'Negroamaro' e 'Montepulciano' mediante deposizione di 10 µl di una sospensione conidica sulla ferita causata dalla puntura di un ago. Dopo 4-5 e 17 giorni di incubazione in camera umida a 21±1 °C al buio, le bacche sono state pigiate e l'OTA è stata quantificata in HPLC. Dopo 4-5 giorni, quando la marcescenza interessava circa il 50% della superficie della bacca, indipendentemente dal vitigno, gli isolati di *A. carbonarius* hanno prodotto in ciascun acino quantità di OTA comprese fra 532 e 1,321 ng. Incubazioni più prolungate hanno incrementato di circa 10 volte (1,028 µg) il contenuto di OTA (Pollastro et al., dati non pubblicati).

Estrazioni condotte su quantità note di conidi quiescenti di due isolati di ciascuna specie (*A. niger*, *A. carbonarius*, *A. aculeatus* e *A. wentii*) e analisi in HPLC hanno evidenziato che l'OTA è presente solo in conidi di *A. carbonarius* e in quantità variabili (fino a 41 ng in 10³ conidi, Pollastro et al., dati non pubblicati).

Esigenze ecologiche

Aspergillus Sezione *Nigri* comprende funghi in grado di crescere nell'intervallo di temperature compreso tra 10 e 37 °C, con un *optimum* tra 30 e 37 °C. In realtà, la crescita a 10 °C è molto limitata, soprattutto con bassi valori di attività dell'acqua (a_w), compresi tra 0.90 e 0.93.

L'effetto di temperature comprese fra 10 e 40 °C nei riguardi della germinazione conidica e dello sviluppo radiale delle colonie è stata specificamente valutata per *A. carbonarius* e *A. niger* impiegando vari substrati colturali. Le basse temperature (10 °C) hanno rallentato sia la germinazione conidica che lo sviluppo micelico di entrambe le specie. *A. carbonarius* ha mostrato il massimo vigore vegetativo a temperature inferiori (20-30 °C) rispetto ad *A. niger* (30-35 °C), risultando pertanto la specie meno termofila. L'esposizione di conidi di *A. carbonarius* a 40 °C per 24-28 ore ha determinato una discreta riduzione della vitalità (20%) che è stata completamente compromessa dopo 72 ore (Pollastro et al., dati non pubblicati).

Uno studio su *A. niger* ha mostrato che diversi ceppi sono in grado di produrre quantitativi notevoli di conidi, $1-2 \cdot 10^6$ conidi cm^{-2} con a_w pari a 0.93-0.97 (R.H.=93-97%) a 30-35 °C (Parra et al., 2004); quindi, il potenziale inoculo di questi funghi può essere molto abbondante. Inoltre, la germinazione delle spore, almeno per *A. carbonarius* può essere molto rapida, avvenendo in meno di 24 ore con a_w pari a 0.90-0.99 a 25-35°C.

Le capacità sporigene di *A. niger* e *A. carbonarius* sono state confrontate quantificando i conidi prodotti per unità di superficie (cm^2) di substrato di coltura (PDA). *A. niger* ha prodotto in media $2,4 \cdot 10^6$ conidi cm^{-2} , 3-4 volte più rispetto ad *A. carbonarius* ($5,8 \cdot 10^5$ conidi cm^{-2}). La maggiore capacità sporigena di *A. niger*, più della termofilia, potrebbe essere la causa della maggiore diffusione e abbondanza del micete nei vigneti (Pollastro et al., dati non pubblicati).

L' a_w ottimale per la crescita sembra essere 0.98, valore molto simile a quello dell'uva in campo. Quindi, le condizioni di campo sono favorevoli alla crescita di questi funghi. Il tasso di crescita degli aspergilli neri dipende dall'isolato considerato e in particolare dal gruppo di appartenenza, ovvero *A. carbonarius*, *A. niger* "aggregate" e uniseriati; *A. niger* "aggregate" è risultato il fungo con crescita più veloce e *A. carbonarius* il più lento (Mitchell et al., 2003, 2004; Belli et al., 2004a).

A. carbonarius ha mostrato una crescita ottimale a 0.98-0.99 a_w , mentre uniseriati e *A. niger* "aggregate" non hanno mostrato differenze nell'intervallo 0.90-0.995 (Mitchell et al., 2003; Belli et al., 2004b, 2005a). Le condizioni ecologiche che favoriscono la crescita, e di conseguenza l'alta incidenza, sono differenti da quelle che consentono la massima produzione di OTA. In particolare, la produzione di OTA da parte di isolati di *A. carbonarius* da uva di differente provenienza geografica si verifica nell'intervallo 0.92-0.99 a_w , con accumulo massimo tra 0.95 e 0.99, in funzione dell'isolato (Mitchell et al., 2004; Belli et al., 2004a, 2005a). Riguardo alla temperatura, la massima

produzione di OTA è stata osservata a 20 °C, seguita da 15 °C, mentre valori decisamente inferiori sono stati prodotti nell'intervallo 30-37 °C (Mitchell et al., 2004; Bellí et al., 2005; Pollastro et al., dati non pubblicati).

In un altro studio, la crescita di isolati di diversa origine geografica ha mostrato differenze in relazione alle condizioni di a_w . Solo alcuni isolati sono cresciuti a 0.88 a_w , e nessuno a 0.85 a_w . La crescita è stata influenzata anche dall'interazione fra pH e a_w , migliore a pH 4.5 e 7 che a pH 2.8. Al contrario, la produzione di OTA è risultata ottimale a 15-20 °C nell'intervallo 0.99-0.95 a_w . Anche l'effetto del pH sull'OTA è stato differente rispetto alla crescita, con i valori maggiori di OTA rilevati a pH 2.8 e 7 rispetto a pH 4.5 (Mitchell et al., 2005). *A. carbonarius* è comunque in grado di produrre OTA in un ampio intervallo di pH, da 2 a 10, sia a 15 che a 30 °C (Esteban et al., 2005)

Dinamica delle popolazioni fungine in campo

Indagini condotte in Australia negli anni 2000-2002, al fine di valutare la conservazione dell'inoculo di questi funghi, ne hanno evidenziato una diffusa presenza nel terreno dei vigneti, con concentrazioni maggiori nei primi centimetri e decrescenti verso gli strati più profondi. La concentrazione di conidi vitali è risultata minore sui residui di potatura o le vecchie porzioni di ritidoma rispetto al terreno, e assente su altre parti vegetali verdi o senescenti presenti sia sulla pianta che sul suolo. Le spore sono state frequentemente rinvenute nell'aria dei vigneti, almeno fino a 100 cm di altezza (Kazi et al., 2003; Frisullo et al., comunicazione personale).

Indagini simili non sono disponibili per altre aree geografiche. In Europa, e in alcune regioni dell'Italia meridionale sono stati eseguiti monitoraggi su grappoli in diverse fasi fenologiche, in varie località, in vigneti gestiti secondo le usuali pratiche di ciascuna zona considerata, inclusi i programmi di protezione da malattie fungine e fitofagi. Queste indagini hanno evidenziato la presenza di *Aspergillus* Sezione *Nigri* sui grappoli già all'allegagione. L'incidenza di acini colonizzati è aumentata progressivamente fino a inizio invaiatura e, in diversi paesi, è cresciuta ulteriormente fino alla maturazione. I funghi sono stati isolati frequentemente anche da bacche asintomatiche. Nell'Italia meridionale, *A. carbonarius*, in particolare, è stato rinvenuto solo sporadicamente fino all'invaiatura, fase in cui la popolazione del fungo incrementa progressivamente fino alla vendemmia.

Contrariamente a quanto ipotizzabile, non è ancora stata dimostrata de-

finitivamente una significativa influenza dell'altezza dei grappoli rispetto al terreno sulla presenza di tali miceti, almeno sulla base di un monitoraggio eseguito in Italia nel 1999-2000 (Battilani et al., 2003b). Indagini successive svolte sull'intero territorio nazionale hanno di contro evidenziato una maggiore contaminazione dei grappoli posti vicino al terreno e di quelli esposti alla diretta insolazione rispetto a quelli più lontani dal suolo e maggiormente protetti dall'irraggiamento solare, come nei vigneti sistemati a pergola (Borgo, 2004). Sul grappolo, invece, tali miceti sembrano colonizzare in modo più abbondante le bacche rispetto al rachide (Battilani et al., 2003b).

Mappe di incidenza dei funghi ocratossigeni e dell'andamento meteorologico

L'incidenza di bacche infette da *A. Sezione Nigri* è significativamente correlata alla localizzazione geografica dei vigneti, almeno a livello europeo. Una correlazione positiva è stata trovata con la longitudine, a indicare che l'incidenza aumenta da ovest a est, mentre la correlazione con la latitudine è risultata negativa, quindi con gradiente positivo da nord a sud. Questa tendenza è stata confermata negli anni, anche se marcate differenze nel livello di incidenza sono state riscontrate da un anno all'altro. Una mappa previsionale ottenuta dall'elaborazione geostatistica dei dati relativi agli *Aspergillus* Sezione *Nigri* presenti a maturazione nel 2001, ha evidenziato un'incidenza superiore al 50% nel sud della Spagna e del Portogallo e in Israele, tra 10 e 25% nel centro-nord Italia, mentre nel restante territorio è stata tra 25 e 50%. Nel 2002, l'incidenza dei funghi è stata minore su tutto il territorio, con valori superiori al 50% solo in Israele. Il 2003 è stato decisamente l'anno con maggiore presenza di *Aspergillus* Sezione *Nigri*, con picchi superiori all'85% in Israele e nel sud della Francia. La mappa previsionale per *A. carbonarius*, elaborata solo per il 2003, ha mostrato un andamento molto simile a quello ottenuto per la Sezione *Nigri*, anche se con un'incidenza inferiore. La maggiore presenza è stata tra 20 e 40%, prevista per il sud della Francia, gran parte della Grecia e Israele (Battilani et al., 2005a).

L'andamento meteorologico influenza la dinamica degli aspergilli neri, come dimostrano le notevoli differenze osservate nel triennio 2001-2003. Il periodo di maggiore interesse è il mese di agosto, che coincide con la fase di maturazione dell'uva in tutti i paesi monitorati, ad eccezione di Israele. Nel periodo considerato, la temperatura di agosto è stata molto variabile, bassa nel 2002, alta nel 2003 e più tipica dell'area geografica considerata nel 2001. Anche le piogge sono state variabili, con il 2002 come anno più piovoso e il

2003 decisamente arido. Ciò sembra indicare che le annate più calde e secche favoriscono la maggiore presenza di *Aspergillus* Sezione *Nigri* (Battilani et al., 2005).

Sulla base di queste informazioni, possono essere individuate aree in cui l'incidenza dei funghi tossigeni è bassa e ciò è in relazione al livello di contaminazione da OTA (Battilani et al., dati non pubblicati). Quindi, vi sono aree in cui l'OTA non è un problema; nelle aree in cui il rischio di presenza della tossina esiste, il livello di rischio è influenzato in primo luogo dall'andamento meteorologico.

PREVENZIONE DELLA CONTAMINAZIONE

Campionamento

La bontà del campionamento è essenziale per l'attendibilità del risultato analitico nelle determinazioni dei funghi ocratossigeni e dell'OTA. A riguardo è da porre in evidenza la differenza esistente fra il campionamento dell'uva in campo e quello su mosti e vini.

Nel vigneto la contaminazione dei grappoli, come per la generalità delle micotossine, è eterogenea e puntiforme. È stato stimato che a causa della distribuzione a macchia di leopardo della contaminazione da micotossine (1-3% della massa totale) l'errore associato al campionamento può essere anche del 90%. Ciò impone l'adozione di idonei protocolli di campionamento, in particolare quando l'obiettivo è quello di prevedere il rischio di contaminazione per attuare interventi correttivi.

Ai fini della rappresentatività del campione è necessario che il numero di campioni elementari sia alto, che siano opportunamente individuati i punti di campionamento, che il campione globale sia di dimensioni adeguate e che lo stesso sia opportunamente preparato prima del prelievo del campione analitico. Ogni campione, inoltre, deve avere la stessa probabilità di essere scelto, questo è più facile quando si deve campionare una massa liquida, specie se in movimento. Infine, tutte le operazioni di campionamento devono essere condotte in condizioni idonee a garantire la sicurezza degli operatori e la protezione del campione da contaminazioni esterne.

I metodi per il prelievo di campioni destinati alla verifica della contaminazione da micotossine sono riportati nelle Direttive 98/53/CE del 16.7.1998, 2002/26/CE del 13.3.2002, 2004/43/CE del 13.4.2004 e 2005/5/CE del 26.1.2005. In particolare, la Direttiva 98/53/CE definisce il campionamento

PESO DELLA PARTITA (T)	PESO SOTTOPARTITE (T)	CAMPIONI ELEMENTARI* (N.)	CAMPIONE GLOBALE (Kg)
≤ 0,1	-	10	1
> 0,1 e ≤ 0,2	-	15	1,5
> 0,2 e ≤ 0,5	-	20	2
> 0,5 e ≤ 1,0	-	30	3
> 1,0 e ≤ 2,0	-	40	4
> 2,0 e ≤ 5,0	-	60	6
> 5,0 e ≤ 10,0	-	80	8
> 10,0 e ≤ 15,0	-	100	10
= 15	15-30	100	10

Tab. 1 *Suddivisione delle partite in sottopartite in funzione del prodotto e del peso della partita*
* Peso del campione elementare pari a 100 g.

rappresentativo e i criteri che rendono confrontabili le analisi; le successive direttive, invece, stabiliscono in base al prodotto e al peso della partita, il numero o il peso delle sottopartite, il numero di campioni elementari, il loro peso e il peso conseguente del campione globale, nonché il numero di campioni analitici.

Il Ministero della Salute, con il D.M. del 31.5.2003, ha recepito la direttiva 2002/26/CE relativa ai metodi di campionamento e analisi per il controllo ufficiale del tenore di OTA in partite di cereali e uve secche definendo, nell'allegato I, le sottopartite e il numero e il peso di campioni elementari nonché il numero di campioni elementari da prelevare in funzione del peso della partita (tab. 1).

I metodi di campionamento per il vino e per il succo d'uva, invece, per i quali è supposta una contaminazione omogenea, sono definiti dalla Direttiva 2005/5/CE. Tale Direttiva, in corso di recepimento, nell'allegato I, al punto 4.6 bis, definisce il peso del campione globale (almeno 1 kg, salvo i casi in cui ciò non risulti possibile, ad esempio una bottiglia), il numero minimo di

FORMA DI COMMERCIALIZZAZIONE	DIMENSIONI DELLA PARTITA (IN LITRI)	N. MINIMO DI CAMPIONI ELEMENTARI
Sfuso (succo d'uva, vino)	--	3
Bottiglie/confezioni di succo d'uva	50	3
Bottiglie/confezioni di succo d'uva	50-500	5
Bottiglie/confezioni di succo d'uva	> 500	10
Bottiglie/confezioni di vino	50	1
Bottiglie/confezioni di vino	50-500	2
Bottiglie/confezioni di vino	> 500	3

Tab. 2 *Numero minimo di campioni elementari da prelevare da una partita*

campioni elementari da prelevare e il relativo peso (tab. 2).

Nulla è, invece, definito circa il campionamento dell'uva in campo. Questo potrebbe essere un importante punto di controllo del processo produttivo, in particolare se si vuole prevedere già nella fase di campo il rischio di contaminazione da OTA nel vino. In uno degli studi svolti a proposito, nonostante la variabilità osservata sia tra i grappoli che tra le piante, buoni risultati sono stati ottenuti campionando un grappolo per pianta, in una posizione predefinita, da almeno 10 viti scelte sulle diagonali del vigneto (Battilani et al., 2006b). Altre indagini hanno evidenziato che le dimensioni dei campioni sono più importanti rispetto alle metodologie di campionamento. L'analisi di campioni di frazioni di grappolo di piccole dimensioni (2-2,5 kg) portano a sottostimare il livello di contaminazione; campioni di grappoli di circa 10 kg portano a un'ampia variabilità fra i dati ottenuti da campioni replicati, mentre questa si attenua, migliorando la replicabilità dei risultati, con campioni di grappoli di 30-50 kg. Varie metodiche di campionamento, quali il prelevamento di grappoli da 5 gruppi di 10 piante posti sulle diagonali del vigneto, lungo i filari o lungo percorsi a W non hanno mostrato differenze apprezzabili (Pollastro et al., dati non pubblicati).

L'attività di ricerca attualmente in corso mira proprio ad affinare le procedure di campionamento in campo, al fine di consentire una nuova e più idonea organizzazione della filiera per attuare possibili strategie di intervento, identificare le partite a rischio, coordinare opportunamente conferimenti e trasformazione, nonché applicare metodi diagnostici per la rilevazione quantitativa di funghi ocratossigeni sulle uve.

Tecniche diagnostiche

Aspergillus carbonarius è il principale responsabile della contaminazione da OTA nel vino. La rilevazione e la quantificazione del fungo, sui grappoli già nel vigneto o nel mosto, è utile per prevedere il rischio di contaminazione da OTA nel vino e mettere in atto idonee misure di prevenzione. Purtroppo, ispezioni visive dei grappoli non sono sufficienti, poiché i sintomi causati da *A. carbonarius* non sono distinguibili a occhio nudo da quelli causati da *A. niger*, la specie più abbondante nel vigneto, o da altre specie della Sezione *Nigri*.

La rilevazione quantitativa dei funghi tossigeni è tradizionalmente effettuata mediante la tecnica della distribuzione di diluizioni seriali su substrati selettivi o semiselettivi (Pitt e Hocking, 1997). Frequentemente, la mancanza

di idonei substrati selettivi, come si verifica per *A. carbonarius*, rende il metodo molto laborioso, costoso e lungo poiché personale competente in tassonomia fungina deve identificare singole colonie mediante osservazioni al microscopio. Inoltre, l'abbondante presenza di *A. niger* sui terreni di coltura tende a inibire lo sviluppo di *A. carbonarius* (Pollastro et al., 2005b), come riportato anche per altre specie tossigene (Paster et al., 1992), portando a sottostimarne la popolazione. Recentemente, è stato messo a punto e validato un terreno semi-selettivo, Malt Extract Agar addizionato di antibiotici (chloramphenicol e chlortetracycline) e fungicidi (dichloran e boscalid) (MEA-B), che limita lo sviluppo di batteri, lieviti e funghi filamentosi e consente la quantificazione di *A. carbonarius* entro 3 giorni con il semplice conteggio delle colonie sviluppatesi (Pollastro et al., 2006).

Le indagini sui marcatori molecolari hanno anche consentito di sviluppare tecniche diagnostiche basate sulla reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Il DNA di *A. carbonarius* e di altri rappresentanti del gruppo *Nigri* (*A. niger* e *A. aculeatus*) ottenuti da vigneti dell'Italia meridionale è stato amplificato utilizzando decameri casuali come innesco della reazione. Sono stati così individuati marcatori RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) specie-specifici che sono stati clonati e sequenziati. In base alle sequenze derivate sono stati disegnati primer SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) che si sono dimostrati selettivi per *A. carbonarius* non dando luogo a prodotti di amplificazione col DNA di altri microrganismi frequentemente associati alla vite (*Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Botryotinia*, *Cladosporium*, *Eutypa*, *Fomitiporia*, *Penicillium*, *Phaeoacremonium*, *Phaeomoniella*, *Phomopsis*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Erysiphe*) (Pollastro et al., 2003). Indipendentemente, anche Perrone et al. (2004) hanno disegnato primer specifici per rilevare *A. japonicus* e *A. carbonarius* che sono risultati dotati di elevata specificità e sensibilità.

Il primer SCAR OPA3₅₁₉C di Pollastro et al. (2003) è stato quindi modificato in primer Scorpion idoneo ad amplificare un frammento di circa 100-bp al fine di rilevare la fluorescenza emessa dal fluoroforo FAM in PCR in tempo reale. Il protocollo è stato sviluppato per evidenziare propaguli di *A. carbonarius* in sospensioni di lavaggio delle bacche o in mosti utilizzando un protocollo di estrazione basato sul tampone CTAB e purificazione su colonnine di Sepharose. Il protocollo consente la rilevazione selettiva e quantitativa di circa 4 ng di DNA di *A. carbonarius* (corrispondente a $0,8 \cdot 10^3$ conidi) nella miscela di reazione. La procedura è stata validata su campioni di sospensioni di lavaggio delle bacche e mo-

sti inoculati artificialmente o contaminati naturalmente da *A. carbonarius* (Pollastro et al., 2005c).

Analogamente, Mulè et al. (2005) hanno sviluppato un saggio TaqMan real-time PCR trovando una buona correlazione ($R^2 = 0.92$) tra contenuto di DNA di *A. carbonarius* e concentrazione di OTA in campioni di uva naturalmente contaminati.

Al momento, i pochi esempi di approcci molecolari seguiti per i funghi ocratossigeni dell'uva sono basati sull'identificazione di frammenti di DNA specie-specifici, mentre poco è stato fatto riguardo ai geni coinvolti nella biosintesi dell'OTA, essenzialmente per le scarse informazioni disponibili sull'argomento. Alcuni studi in corso indicano una polichetide sintetasi (*pks*) come principale enzima responsabile della sintesi di OTA in *A. carbonarius*. Studi sulla caratterizzazione di geni *pks* hanno permesso di disegnare primer specifici che hanno fornito risultati incoraggianti (Atoui, 2005).

Influenza delle tecniche colturali

Tutti i lavori riguardanti monitoraggi degli *Aspergillus* Sezione *Nigri* come potenziali produttori di OTA confermano la rilevanza della localizzazione geografica del vigneto e delle condizioni meteorologiche. Di conseguenza, i sistemi colturali utilizzati e il clima del particolare areale possono svolgere un ruolo importante nella contaminazione da OTA.

In studi svolti in Italia a partire dagli anni 1999-2000, è stato osservato che vigneti localizzati nella medesima azienda e gestiti con pratiche colturali simili, possono mostrare notevoli differenze nel livello di contaminazione da OTA. Ad esempio, nel 1999 la tossina è risultata praticamente assente in 'Malvasia nera', ma è stata rilevata in 'Negroamaro', sia con allevamento a cordone doppio speronato che ad alberello, ma con concentrazioni più elevate nel secondo, che presenta grappoli più vicini al terreno. Due vigneti di 'Sangiovese', situati rispettivamente nel nord e sud Italia, hanno prodotto nel 1999, grappoli con assenza di OTA il primo e con un livello medio di $1,78 \mu\text{g kg}^{-1}$ nel secondo. La differenza più significativa è comunque stata osservata fra gli anni. Infatti, i medesimi vigneti, gestiti seguendo le stesse pratiche colturali, hanno mostrato contaminazioni rilevanti nel 1999 e assenti nel 2000. Questo rende quindi difficile individuare un ruolo chiaro dei fattori colturali, anche in relazione alla frequente associazione tra una particolare varietà e una forma di allevamento, soprattutto nei vigneti più vecchi (Battilani et al., 2003b).

I vitigni hanno suscettibilità differente; ciò è stato dimostrato da prove *in vitro*, ma anche in campo sono emerse alcune indicazioni, come pure riguardo all'influenza della forma di allevamento (Battilani et al., 2004).

Protezione dai marciumi del grappolo e dai fattori predisponenti

Vari gruppi di ricerca hanno eseguito osservazioni sull'attività di fungicidi verso la crescita micelica e/o la germinazione conidia di *A. carbonarius* e *A. niger*, nonché verso la produzione di OTA (Battilani et al., 2003c; Drouillard et al., 2003; Zerbetto et al., 2004; Pollastro et al., 2005a). I numerosi fungicidi saggianti sono stati selezionati per lo più fra quelli comunemente impiegati per la protezione del vigneto da malattie fungine (ad es., azoxystrobin, benomyl, boscalid, cyprodinil, cyprodinil+fludioxonil, dichlofluanid, fenhexamid, folpet, fludioxonil, iprodione, penconazole, pyrimethanil, tebuconazole, trifloxistrobin, vinclozolin e quinoxyfen).

A. carbonarius ha generalmente mostrato una minore sensibilità ai fungicidi rispetto ad *A. niger*. Per quanto concerne *A. carbonarius*, anilinoipirimidine, triazoli e fludioxonil sono stati i fungicidi più efficaci nell'inibire tanto la germinazione conidica che la crescita delle colonie. I dicarbosimidici hanno mostrato elevata attività nei confronti della crescita micelica, ma non nell'inibizione della germinazione. Fenexhamid e quinoxyfen hanno mostrato la minore attività biologica verso entrambe le specie fungine.

Nel periodo 1999-2004 sono state eseguite prove mirate a valutare l'efficacia di diversi programmi di intervento verso gli agenti di marciumi secondari del grappolo, con particolare riferimento ai funghi produttori di OTA. Le prove sono state condotte su 'Primitivo', 'Negroamaro', 'Aglianico', 'Montepulciano' e 'Gaglioppo', allevati prevalentemente a contropalliera o alberello.

Ciascun vigneto è stato suddiviso, in base alle dimensioni, in parcelle di 1.500-5.000 m² che sono state sottoposte ai trattamenti con diversi fungicidi, selezionati fra quelli che *in vitro* avevano mostrato maggiore attività nei confronti di *A. niger* e *A. carbonarius*. Questi sono stati applicati in accordo al programma di protezione antibotritico, in corrispondenza delle fasi fenologiche di pre-chiusura del grappolo (B) e invaiatura (C) e, con la sola eccezione di 'Primitivo' (vitigno a maturazione precoce), alla fine di agosto (D), con le irroratrici aziendali impiegando volumi di distribuzione compresi tra 600 e 1.000 l ha⁻¹. In particolare, sono stati saggianti in modo più esteso: cyprodinil+fludioxonil (37,5+25%; Switch, Syngenta Crop Protection; 800 g ha⁻¹), pyrimethanil (37,4%; Scala, Basf Agro; 2.000 g ha⁻¹) e

iprodione (50%; Rovral, Basf Agro, 1.500 g ha⁻¹), sia impiegati per l'intero programma di protezione sia in alternanza fra loro, valutando anche il ruolo dei trattamenti eseguiti nelle diverse fasi fenologiche. Al momento della vendemmia aziendale, in ciascuna parcella sono stati raccolti campioni di uva che sono stati sottoposti a rilevazioni, microvinificazioni e analisi micologiche e chimiche.

Tutti i programmi di protezione hanno permesso importanti riduzioni dei sintomi di muffa grigia rispetto al testimone non trattato; in particolare, tale riduzione è stata rilevata su 'Aglanico', 'Gaglioppo', 'Montepulciano' e 'Negroamaro'. Il trattamento in pre-chiusura del grappolo (B), poi, ha mostrato di contribuire alla protezione dell'uva più di quello eseguito all'invaiaatura (C), mentre ha mostrato un ruolo meno importante rispetto al trattamento eseguito nell'ultima decade di agosto (D). Come atteso, modestissima o nulla è stata l'efficacia dei vari programmi di protezione nei confronti del marciume acido. Non è stato invece possibile apprezzare l'efficacia dei trattamenti verso i marciumi da *Penicillium* sp. a causa della loro sporadicità in campo. I migliori programmi di intervento hanno permesso un livello di protezione medio dal marciume secondario dovuto ad *Aspergillus* sp. di circa il 50%.

Rispetto alla contaminazione fungina dei mosti, i programmi di intervento hanno mostrato di contenere *Aspergillus* sp., mentre hanno influenzato poco o nulla *Penicillium* sp.. I trattamenti saggiati hanno ridotto di oltre il 30% il numero di UFC di *A. niger* e di anche il 50% quelli di *A. carbonarius*.

In accordo a quanto osservato in termini di contaminazione fungina, i programmi di protezione hanno mediamente ridotto di circa il 50% il livello di contaminazione da OTA sia su 'Primitivo' che su 'Negroamaro'. In generale, una maggiore efficacia dei programmi di intervento è stata rilevata in corrispondenza dei più elevati livelli di contaminazione da OTA nei mosti delle tesi non trattate e dove la distribuzione dei fungicidi nel vigneto è stata più accurata.

Simulazioni di vendemmia ritardate di circa due settimane rispetto alla norma hanno evidenziato notevoli incrementi sia della contaminazione fungina sia di quella da OTA nei mosti.

L'efficacia di cyprodinil+fludioxonil nel contenere i marciumi e la presenza di funghi ocratossigeni, specialmente in condizioni di presenza medio-bassa di aspergilli, è stata confermata anche in Grecia su uve destinate all'appassimento (Tjamos et al., 2004) e in Spagna (Minguez et al., 2004). I trattamenti a base di carbendazim e cyprodinil non sono invece risultati efficaci (Tjamos et al., 2004)

Le prove condotte in Spagna hanno anche evidenziato che la maggiore contaminazione da OTA si verificano in caso di scarsa protezione delle piante; in particolare, la maggiore incidenza di aspergilli e il maggiore contenuto di OTA sono stati osservati in corrispondenza di forti attacchi di *Lobesia botrana*, il cui ruolo rilevante è stato confermato anche da Cozzi et al. (2005). I livelli minori di OTA sono stati riscontrati nelle aree ove sono più frequentemente gestite secondo le buone pratiche colturali suggerite a livello regionale, con una idonea protezione del vigneto da oidio, peronospora e tignoletta (Minguez et al., 2004).

Punti critici nel processo di produzione

Alla luce di quanto emerso dalle ricerche fin qui condotte, la presenza di OTA nell'uva e nei suoi derivati, in particolare il vino, è un problema che interessa il sud Europa e non solo l'Italia. Sono state acquisite alcune certezze sulle condizioni di rischio, legate all'andamento meteorologico, elemento non modificabile, ma anche alle tecniche colturali. Tra queste, la difesa del vigneto dalle avversità biotiche svolge certamente un ruolo dominante. Anche la produzione integrata deve essere vista con occhio diverso; il contenimento degli interventi chimici è certamente da perseguire, ma con attenzione alla problematica micotossine. Un aiuto in questo senso potrà arrivare dall'impiego di agenti di biocontrollo che hanno fornito risultati preliminari incoraggianti (Tjamos et al., 2005). Particolare attenzione dovrà essere fatta nelle aree a maggiore rischio.

Alcuni controlli in campo, a partire dall'invasatura, potrebbero essere utili per definire il livello di rischio, quali il controllo dello stato sanitario delle bacche e la presenza di aspergilli, in particolare *A. carbonarius*. Solo in prossimità della vendemmia è opportuno anche un controllo della contaminazione da OTA.

È comunque da considerare che il rischio di contaminazione del vino da OTA dipende da molteplici fattori. Oltre alle pratiche colturali e alla protezione della vite, è necessario considerare la scelta dei vitigni e dei cloni. I cloni più produttivi e con grappoli più compatti, infatti, sono particolarmente esposti al rischio di contaminazione.

Sono poi da considerare le modalità di vendemmia e di conferimento dell'uva alla cantina. La vendemmia meccanica è probabilmente favorevole rispetto a quella manuale per la rapidità dell'operazione. Il trasporto delle uve in cassette è certamente da preferire a quello in cassoni al fine di evitare i fenomeni di schiacciamento degli acini e l'avvio di fenomeni fermentativi.

TRASFORMAZIONE ENOLOGICA

Evoluzione della concentrazione dell'OTA durante la trasformazione

Sono state eseguite microvinificazioni sia in rosso che in bianco di uve di 'Primitivo' e 'Negroamaro'. Le analisi eseguite sui campioni di mosto prelevati dopo la pigia-diraspatura per la vinificazione in rosso o dopo la pigia-diraspatura e la torchiatura per la vinificazione in bianco hanno permesso di accertare una marcata riduzione della carica complessiva di *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. nei campioni microvinificati in bianco. In particolare, per *A. carbonarius* tale riduzione è stata compresa fra il 65 e il 100%. A tale riduzione di propaguli fungini è corrisposta una pressoché analoga riduzione del contenuto di OTA.

Osservazioni eseguite durante il processo di vinificazione in rosso hanno evidenziato un consistente e progressivo incremento della concentrazione di OTA nel corso della fermentazione con macerazione; a seguito dei travasi, invece, ne è stata rilevata una significativa riduzione. A causa di tali fluttuazioni, la concentrazione di OTA nel vino è stata generalmente molto simile a quella inizialmente rilevata nel mosto appena pigiato (Pollastro et al., dati non pubblicati).

Possibili interventi correttivi su mosti e vini

Le informazioni attualmente disponibili chiariscono, in parte, il destino dell'OTA durante la vinificazione, mettendo in luce che la tossina non è prodotta durante la vinificazione e che le fasi della fermentazione alcolica e malo-lattica riducono il livello di OTA con un meccanismo non ancora completamente chiarito, ma probabilmente dovuto ad adsorbimento e in parte a degradazione operata dai microrganismi coinvolti (Grazioli et al., 2005; Garcia Moruno et al., 2005). Gli stadi della lavorazione portano complessivamente a una riduzione del livello di OTA nei vini, ma non sempre questo è sufficiente a raggiungere nel prodotto finito un tenore di OTA inferiore ai 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$, livello massimo fissato dalla vigente legislazione.

Di conseguenza, le strategie preventive devono essere supportate da metodi curativi e correttivi ai fini di ridurre la micotossina nei prodotti contaminati. A tale scopo diversi studi hanno focalizzato l'attenzione sull'uso di coadiuvanti tecnologici che agiscono per adsorbimento.

Rousseau e Blateyron (2002) hanno dimostrato che nessuna delle sostanze chiarificanti comunemente utilizzate in enologia (gel di silice, gelatina, tan-

nino, bentonite) porta a una riduzione rilevante del tenore di OTA in quei vini che per natura ne sono ricchi. Gelatina, bentonite, gel di silice e tannini riducono il livello di OTA dal 7% al 14%. La filtrazione migliora lievemente la situazione, permettendo una riduzione fino al 26%.

Dumeau e Trione (2000) hanno evidenziato la capacità di alcuni coadiuvanti a base di carbone vegetale nel ridurre l'OTA nei vini rossi; una riduzione dell'OTA fino al 91% è stata raggiunta ma abbinata a un calo di intensità colorante del 15% e dell'indice di polifenoli dell'8%. Infatti, è noto che il carbone ha un'alta affinità per gli antociani e i polifenoli del vino (Castellari et al., 2001).

Silva et al. (2003) hanno saggiato diversi coadiuvanti chimici per valutare la loro capacità di ridurre l'OTA nel vino. Coadiuvanti a base di carbone, caseinato di potassio e pareti cellulari di lievito, singolarmente o in miscela, sono stati sperimentati su vini rossi da 'Negroamaro' e 'Primitivo'. La riduzione di OTA dopo 72 ore (tempo di massima riduzione) varia dal 70 al 90% per i carboni addizionati nella quantità di 30 g hl⁻¹. La miscela caseinato di potassio-carbone è poco efficace nel ridurre la micotossina se usata in basse quantità (0,05 g l⁻¹), mentre livelli pari a 0,5 g l⁻¹ riducono la concentrazione di OTA dell'89%. Le pareti cellulari di lievito portano una riduzione del 12% e del 30% quando usate in concentrazione di 0,5 e 1 g l⁻¹, rispettivamente. Altre sperimentazioni degli stessi ricercatori, svolte con prodotti a base di carbone, hanno mostrato che l'entità di riduzione del contenuto di OTA dipende dal livello di contaminazione iniziale e dalla quantità di adsorbente utilizzato; ad esempio l'aggiunta di 30 g hl⁻¹ di carbone causa una riduzione del 90% nel tenore in OTA, mentre l'aggiunta di 50 g hl⁻¹ porta a una diminuzione di circa il 98%. Anche in questo caso si riscontra una diminuzione dell'intensità colorante (dovuta all'adsorbimento degli antociani da parte dei preparati utilizzati).

Dal punto di vista applicativo le possibilità di interventi correttivi durante la vinificazione si basano sull'uso di coadiuvanti contenenti carbone vegetale che agiscono prevalentemente per adsorbimento. Essi, pur rappresentando un valido strumento di controllo del tenore di OTA nei mosti e soprattutto nei mosti bianchi, necessitano di molta attenzione nel caso dei vini e in particolare dei vini rossi. Se tale adsorbente è utilizzato a basse concentrazioni i risultati sperimentali indicano che il trattamento non determina modifiche sostanziali del profilo polifenolico e del colore dei vini rossi. I risultati sperimentali indicano che il trattamento di vini rossi con carbone decolorante nella quantità di 10 g hl⁻¹ riduce l'OTA in percentuale significativa ed è compatibile con la qualità complessiva del prodotto finito.

A tutt'oggi il trattamento con carbone è un mezzo permesso dalla normativa vigente ed efficace nell'abbattimento della contaminazione nel caso dei mosti bianchi. Per i vini rossi l'utilizzo di basse dosi di carbone (massimo 10 g hl⁻¹), non consentito dall'attuale normativa, potrebbe rappresentare un trattamento di semplice utilizzazione ed efficace nel produrre un vino con basso rischio di contaminazione.

Esiste anche la possibilità di impiegare metodi biologici per ridurre il livello di micotossine, anche se le informazioni relativamente al settore enologico sono scarse ed effettuate, per lo più, su piccola scala. Silva et al. (2003) hanno saggiato diversi ceppi di *Lactobacillus plantarum* e *Oenococcus oeni* per valutare la loro capacità di riduzione dell'OTA nel vino.

La maggiore attività è stata mostrata dai ceppi V16 e V22 (*L. plantarum*) che hanno permesso una riduzione del 50 e del 55%, rispettivamente. Per quanto riguarda *O. oeni*, la massima degradazione (45,9%) è stata ottenuta col ceppo R1101.

Grazioli (2003) ha approfondito la degradazione dell'OTA per mezzo di *L. plantarum* in vino. La riduzione dell'OTA dipende dalla concentrazione iniziale di tossina nel vino: dopo 30 giorni di contatto, l'OTA è diminuita dell'85%, quando l'OTA era in quantità di 0,2 µg l⁻¹ nel vino di partenza, del 70% con 1 µg l⁻¹ e del 57% con 20 µg l⁻¹.

Bejaoui et al. (2003) hanno valutato microrganismi isolati dall'uva e microrganismi comunemente usati nel processo di vinificazione (lieviti e batteri lattici) per verificarne la capacità di degradare l'OTA in succo d'uva sintetico. La percentuale di degradazione è stata tra il 10 e il 99%, tra il 40 e il 99% e tra l'80 e il 99% per *A. carbonarius*, *A. japonicus* e *A. niger*, rispettivamente. Per *O. oeni*, la riduzione dell'OTA è stata del 21-27% dopo 10 giorni di incubazione. Nel caso di *Saccharomyces cerevisiae*, la percentuale di riduzione dell'OTA è stata intorno al 40%.

CONCLUSIONI

La recentissima pubblicazione del Regolamento (CE) N. 123/2005, che fissa in 2,0 µg kg⁻¹ il limite massimo tollerabile di OTA nei vini e in altri prodotti derivati dall'uva, impone che l'intera filiera viticola-enologica adotti immediatamente idonee strategie di prevenzione della contaminazione al fine di non vanificare gli importanti sforzi compiuti nel migliorare la qualità dei vini italiani e nel valorizzarne l'immagine di tipicità e qualità conquistata nei mercati nazionali e internazionali.

Già alcuni anni addietro, il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, aveva avvertito l'importanza dell'argomento e col D.M. 7.4.2000 aveva dettato le "Linee guida nella produzione vitivinicola per la prevenzione della potenziale contaminazione da micotossine". Le linee guida però, a causa delle limitate informazioni disponibili all'epoca, si limitavano a raccomandare alcune norme comportamentali e precauzioni abbastanza generiche.

Numerosi Enti di ricerca hanno sentito la responsabilità di affrontare l'argomento, pur nella cronica carenza di risorse finanziarie. Grazie alle ricerche condotte, è oggi noto che la contaminazione da OTA dei vini trova origine nel vigneto e che il principale, se non esclusivo, responsabile è *A. carbonarius*. I risultati delle ricerche sino a oggi svolte hanno permesso di accertare che alcuni fungicidi normalmente impiegati su vite con funzione antibotritica (anilino-pirimidine in primo luogo) consentono di ridurre in modo consistente la colonizzazione dell'uva da *A. carbonarius* e la conseguente contaminazione da OTA del vino. I trattamenti fungicidi da soli però non possono costituire la soluzione a un problema che trova origine nell'interazione di molti fattori predisponenti. È indispensabile operare in maniera organica sin dall'impianto del vigneto, con l'impiego di cloni con grappoli non troppo compatti e quindi meno suscettibili alla contaminazione, di sestri di impianto e sistemi di allevamento che pur nel rispetto della tipicità del vino non determinino microclimi favorevoli all'insediamento dei miceti coinvolti nella contaminazione. La gestione agronomica del vigneto deve poi mirare a prevenire la contaminazione dell'uva mediante il controllo dei fattori predisponenti in campo (eccessi vegetativi e produttivi, compattezza dei grappoli, lesioni, efficace protezione da tignoletta e oidio, ecc.). Il momento della vendemmia, le modalità di raccolta e il trasporto delle uve possono poi costituire ulteriori punti critici della filiera soprattutto nei numerosi contesti in cui la conduzione è di tipo "familiare". Sono noti alcuni interventi correttivi che possono essere adottati in cantina. È però certo che lo sforzo più importante deve essere quello di prevenire la contaminazione in campo: per far un buon vino è necessaria un'uva buona anche in questo contesto.

Metodi affidabili e ripetibili per la determinazione analitica dell'OTA in mosti e vini sono disponibili. Restano però da affinare le procedure di campionamento in campo, difficoltose e critiche, e il completamento dello sviluppo e validazione di metodi di diagnosi precoce. Ad esempio, sono disponibili diagnostici molecolari per *A. carbonarius*, anche per valutazioni quantitative, che devono però essere validati nelle reali condizioni operative.

Il limite massimo tollerabile di OTA nei vini di $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ costituisce una difficoltà in più per gli operatori della filiera che però non è impossibile da

gestire. I produttori e i trasformatori devono darsi una nuova organizzazione per identificare, possibilmente già in campo, le partite a rischio, coordinare opportunamente i conferimenti e la trasformazione. È necessario, inoltre, che ciascuno faccia la propria parte intensificando la collaborazione fra ricerca pubblica, ricerca privata e mondo operativo, al fine di migliorare le conoscenze e trasferirle all'applicazione pratica.

RINGRAZIAMENTI

Le ricerche svolte dall'Università di Piacenza sono state parzialmente finanziate dalla Commissione Europea nell'ambito del V Programma quadro, contratto n. QLK1-2001-01761 "WINE-OCHRA RISK – Risk assessment and integrated ochratoxin A (OTA) management in grapes and wine".

Le ricerche svolte dall'Università degli Studi di Bari sono state parzialmente finanziate dal Ministero per le Politiche Agricole e Forestali, progetto "Studio delle cause che portano alla presenza di contaminanti micotici nelle uve e nei vini", dalla Regione Puglia, progetto "Individuazione dei momenti critici della filiera viticolo-enologica" – Programma regionale "Agricoltura e Qualità", dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca, progetto FAR n. 12818 "SIVINA – Individuazione di metodologie innovative prontamente trasferibili per migliorare la sicurezza dei vini rossi di qualità del Salento" e da Società private (BASF Agro S.p.A., Bayer CropScience S.r.l.; Intrachem Bio Italia S.p.A., Makhateshim-Agan Italia e Syngenta Crop Protection S.p.A.).

Un sentito ringraziamento è rivolto ai numerosi operatori del comparto viticolo-enologico che hanno collaborato con piena disponibilità e interesse allo svolgimento delle attività.

BIBLIOGRAFIA

- ABARCA M.L., BRAGULAT M.R., CASTELLÀ G., CABÁNES F.J. (1994): *Ochratoxin A production by strains of Aspergillus niger var. niger*, «Applied and Environmental Microbiology», 60, pp. 2650-2652.
- ABARCA M.L., ACCENSI F., CANO J., CABÁNES F.J. (2004): *Taxonomy and significance of black aspergilli*, «Antonie van Leeuwenhoek», 86, pp. 33-49.
- ACCENSI F., CANO J., FIGUERA F., ABARCA M.L., CABAÑES F. L. (1999): *New PCR method to differentiate species in the Aspergillus niger aggregate*, «FEMS Microbiology», 180, pp. 191-196.
- ANDERSON R., BUCHI G., KOBBE B., DEMAINE A.L. (1977): *Secalonic acid D and F are toxic metabolites of Aspergillus aculeatus*, «Journal of Organic Chemistry», 42, pp. 352-353.
- AL-MUSALLAM A. (1980): *Revision of the black Aspergillus species*. Ph.D. Thesis, Rijksuniversiteit Utrecht, Utrecht.
- ATOUI A., MATHIEU F., LEBRIHI A. (2005): *Characterization of some pks genes in Aspergillus carbonarius and their use in fungi detection and quantification in grapes*, in *Book*

- of Abstracts "International Workshop – Ochratoxin A in grapes and wine: prevention and control", pp. 25.
- BATTILANI P., PIETRI A. (2002): *Ochratoxin A in grapes and wine*, «European Journal of Plant Pathology», 108, pp. 639-643.
- BATTILANI P., PIETRI A., PASCALE M. (2002): *Funghi tossigeni e micotossine nella filiera viti-vinicola*, «Informatore fitopatologico», 52, pp. 23-27.
- BATTILANI P., PIETRI A., BERTUZZI T., LANGUASCO L., GIORNI P., KOZAKIEWICZ Z. (2003a): *Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy*, «Journal of Food Protection», 66, pp. 633-636.
- BATTILANI P., GIORNI P., PIETRI A. (2003b): *Epidemiology of toxin producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape*, «European Journal of Plant Pathology», 109, pp. 715-722.
- BATTILANI P., PIETRI A., BERTUZZI T., FORMENTI S., BARBANO C., LANGUASCO L. (2003c): *Effect of fungicides on ochratoxin producing black aspergilli*, «Journal of Plant Pathology», 85, (special issue), pp. 285 (Riassunto).
- BATTILANI P., LOGRIECO A., GIORNI P., COZZI G., BERTUZZI T., PIETRI A. (2004): *Ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius on some grape varieties grown in Italy*, «Journal of the Science of Food and Agriculture», 84, pp. 1736-1740.
- BATTILANI P., BARBANO C., MARIN S., SANCHIS V., KOZAKIEWICZ Z., MAGAN N. (2006a): *Mapping of Aspergillus Section Nigri in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis*, «International Journal of Food Microbiology», in stampa.
- BATTILANI P., BARBANO C., ROSSI V., BERTUZZI T., PIETRI A. (2006b): *Spatial distribution of ochratoxin A in vineyard and sampling design to assess must contamination*, «Journal of Food Protection», 69 (4), in stampa.
- BAU M., CASTELLÀ G., BRAGULAT M.R., CABAÑES F.J. (2005): *RFLP characterization of Aspergillus niger aggregate species from grapes from Europe and Israel*, «International Journal of Food Microbiology», in stampa.
- BEJAOUI H., MATHIEU F., TAILLANDIER P., LEBRIHI A. (2003): *Ochratoxin A removal by microorganisms isolated from grape or used in winemaking process*, in *Oenologie 2003-7^o Symposium international d'Oenologie*, Editions TEC & DOC, Paris, pp. 685-687.
- BELLÍ N., MARÍN S., SANCHIS V., RAMOS A.J. (2004a): *Influence of water activity and temperature on growth of isolates of Aspergillus section Nigri obtained from grapes*, «International Journal of Food Microbiology», 96, pp. 19-27.
- BELLÍ N., RAMOS A.J., SANCHIS V., MARIN S. (2004b): *Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by Aspergillus section Nigri strains isolated from grapes*, «Letters in Applied Microbiology», 38, pp. 72-77.
- BELLÍ N., RAMOS A.J., CORONAS I., SANCHIS V., MARÍN S. (2005): *Aspergillus carbonarius growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors*, «Journal of Applied Microbiology», 98, pp. 839-844.
- BETINA V. (1985): *Thin-layer chromatography of mycotoxins*. «Journal of Chromatography», 334, 211-276.
- BISIACH M., MINERVINI G., SALOMONE M.C. (1981): *Ricerche sperimentali sul marciume acido del grappolo e sui suoi rapporti con la muffa grigia*, «Notiziario delle Malattie delle Piante», 102, pp. 61-79.
- BISIACH M. (1982): *Il marciume acido del grappolo*, «Terra e Vita», 23 (3), pp. 47-49.
- BISIACH M., RUI D., PIZZOLI L., ZERBETTO F., TORRESIN G.C., MINERVINI G., CARRARO S. (1985): *Aggiornamento sul marciume acido della vite*, in *Atti Convegno Problemi attuali di Patologia viticola*, Vicenza 24 maggio 1985, pp. 27-45.

- BORGIO M., 2004. *Ricerca e sperimentazione su aspetti viticoli: primi risultati su attività fitopatologiche*, in *Atti del seminario "Studio sulle cause che portano alla presenza di contaminanti micotici nelle uve e nei vini. Risultati di un biennio di ricerca"*, Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, Roma 27 aprile 2004, pp. 26-40.
- BURDASPAL P.A., LEGARDA T.M. (1999): *Ochratoxina A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en España y en otros países europeos*, «Alimentaria», 299, pp. 107-113.
- CASTELLA G., LARSEN T.O., CABANES J., SCHMIDT H., ALBORESI A., NIESSEN L., FARBER P., GEISEN R. (2002): *Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus Penicillium*, «Systematic and Applied Microbiology», 25, pp. 74-83.
- CASTELLARI M., VERSARI A., FAGIANI A., PARPINELLO G.P., GALASSI S. (2001): *Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents*, «Journal of Agriculture and Food Chemistry», 49, pp. 3917-3921.
- CHELKOWSKI J., SAMSON R.A., WIEWIORSKA M., GOLINSKI P. (1987). *Ochratoxin A formation by isolated strains of the conidial stage of Aspergillus glaucus Link ex Grey (= Erotium herbariorum Wiggers Link ex Grey) from cereal grains*, «Die Nahrung», 31, pp. 267-270.
- CIEGLER A. (1972): *Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the Aspergillus ochraceus group*. «Canadian Journal of Microbiology», 18, pp. 631-636.
- CIEGLER A., FENNEL D.I., SANSING G.A., DETROY R.W., BENNETT G.A. (1973). *Mycotoxin producing strains of Penicillium viridicatum: classification into subgroups*. «Systematic and Applied Microbiology», 26, pp. 271-278.
- COZZI G., PASCALE M., PERRONE G., VISCONTI A., LOGRIECO A. (2005): *Effect of Lobesia botrana damages on black aspergilli rot and ochratoxin A content in grapes*. «International Journal of Food Microbiology», in stampa.
- DALCERO A., MAGNOLI C., HALLAK C., CHIACCHIERA S.M., PALCIO G., ROSA C.A.R. (2002): *Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by Aspergillus section Nigri in Argentina*. «Food Additives and Contaminants», 19, pp. 1065-1072.
- DROUILLARD J.B., SAGE L., PLADEAU V., DUBERNET M. (2003): *Ochratoxine A dans les vins: un partenariat filière pour des solutions pratiques au vignoble*, «Phytoma», 565, pp. 30-35.
- DUMEAU F., TRIONE D. (2000): *Influence de différents traitements sur la concentration en ochratoxine A des vins rouges*. «La Revue des Œnologues», 95, pp. 37-38.
- DYER S.K., MCCAMMON S. (1994): *Detection of toxigenic isolates of Aspergillus flavus and related species on coconut cream agar*. «Journal of Applied Bacteriology», 76, pp. 75-78.
- EL-BANNA A., PITT J.I., LEISTNER L. (1987): *Production of mycotoxins by Penicillium species*. «Systematic and Applied Microbiology», 10, pp. 42-46.
- ESTEBAN A, ABARCA M.L, BRAGULAT M.R., CABANES F.J. (2005): *Influence of pH and incubation time on ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius in culture media*. «Journal of Food protection», 68, pp. 1435-1440.
- FREGONI M., IACONO F., ZAMBONI M. (1985): *Influenza della Botrytis cinerea sulle caratteristiche fisico-chimiche dell'uva. Individuazione di parametri discriminanti i diversi gradi di infezione: prime esperienze italiane con apparecchiature automatizzate*, «Vignevini», 12 (10), pp. 19-25.
- FRISVAD J.C., FILTENBORG O. (1989): *Terverticillate Penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production*, «Mycologia», 81, pp. 836-861.
- FRISVAD J.C., SAMSON O. (1991): *Mycotoxins produced by species of Penicillium and Aspergillus occurring in cereals*, in *Cereal Grain: Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*, a cura di J. Chelkowski, Amsterdam, Elsevier, pp. 441-476.

- GAIA P., TARANTOLA C., BARBERO L. (1978): *Conseguenze enologiche e microbiologiche nella difesa antibotritica in viticoltura*, «Annali Istituto Sperimentale Enologia», 9, pp. 237-257.
- GARCIA MORUNO E., SANLORENZO C., BECCACCINO B., DI STEFANO R. (2005): *Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine*, «American Journal of Enology and Viticulture», 56, pp.73-76.
- GRAZIOLI B. (2003): *Study of processes suitable for reducing ochratoxin A in wine*, in *Atti 8° Workshop in "Food Science and Technology"*, Soriano nel Cimino (TV), pp. 349-351.
- GRAZIOLI B., FUMI M.D., SILVA A. (2005): *The role of grape processing on OTA content in Italian must and wine*, «International Journal of Food Microbiology», in stampa.
- GUERZONI M.E., ZIRONI R., RIVA M., GIUDICI P. (1979): *Problemi enologici conseguenti ai trattamenti antibotritici*, in *Atti incontro "La muffa grigia della vite"*, Asti 23 novembre 1979.
- GUERZONI M.E., MARCHETTI R., 1982. *Microflora associata al marciume acido della vite e modificazioni indotte dalla malattia sulla composizione di uve e mosti*. «La Difesa delle Piante», 4, pp. 231-246.
- HESSELTINE C.W., VANDEGRAFT E.E., FENNEL D.I., SMITH M.L., SHOTWELL O.L., 1972. *Aspergilli as ochratoxin producers*. «Mycologia», 64, pp. 539-550.
- IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER) (1993): *Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*, in *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Vol. 56, Lyon, France.
- KAZI B.A., EMMETT R.W., CLARKE K., NANCARROW N. (2003): *Black Aspergillus moulds in Australian vineyards*, in *Proc International Congress of Plant Protection, New Zeland*, February 2003, pp. 119 (riassunto).
- KOZAKIEWICZ Z. (1989): *Aspergillus species on stored products*, «Mycological Papers», 161, pp. 1-188.
- KROGH P., HALD B., PEDERSEN E.J. (1973): *Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy*, «Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B]», 81(6), pp. 689-95.
- KUSTERS-VAN SOMMEREN M. A., SAMSON R. A., VISSER J. (1991): *The use of RFLP analysis in classification of the black Aspergilli: reinterpretation of Aspergillus niger aggregate*, «Current Genetics», 19, pp. 21-26.
- LUND F., FRISVAD J.C. (2003): *Penicillium verrucosum in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A*, «Journal of Applied Microbiology», 95, 1117-1123.
- MAJERUS P., OTTENEDER H. (1996): *Detection and occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice*, «Dtsch. Lebensm.-Rundsch. », 92, pp. 388-390.
- MÉGNÉNEAU B., DEBETS F., HOEKSTRA R.F. (1993): *Genetic variability and relatedness in the complex group of black Aspergillus based on random amplification of polymorphic DNA*, «Current Genetics», 23, pp. 323-329.
- MINGUEZ S, CANTUS J.M., PONS A, MARGOT P, CABANES F.X., MASQUE C. ACCENSI F., ELORDUY X., GIRALT L.L., VILAVELLA M., RICO S., DOMINGO C., BLASCO M., CAPDEVILA J. (2004): *Influence of the fungus control strategy in the vineyard on the presence of Ochratoxin A in the wine*, «Bulletin de l'OIV», 77, pp. 821-831.
- MITCHELL D., ALDRED D., MAGAN N. (2003): *Impact of ecological factors on growth and ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius from different regions of Europe*, «Aspects of Applied Biology», 68, pp. 109-116.
- MITCHELL D., PARRA R., ALDRED D., MAGAN N. (2004): *Water and temperature relations*

- of growth and ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius strains from grapes in Europe and Israel*, «Journal of Applied Microbiology», 97, pp. 439-445.
- MITCHELL D., BELLI N., MARIN S., ALDRED D., SANCHIS V., MAGAN N. (2005): *Water relations of germination, growth and ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius from wine and table grapes from the northern Mediterranean basin*, «International Journal of Food Microbiology», in stampa.
- MOSSEREAY R. (1934): *Les Aspergillus de la section "Niger" Thom and Church*, «La Cellule», 43, pp. 203-285.
- OTTENEDER H., MAJERUS P. (2000): *Occurrence of ochratoxin A in wines: influence of the type of wine and its geographical origin*, «Food Additives and Contaminants», 17, pp. 793-798.
- PALLOTTA U., PIVA A., RAGAINI A., ARFELLI G. (1995): *Influenza di Botrytis cinerea sulla composizione di uve cv. Trebbiano r., Albana e Sangiovese*, «Rivista di Viticoltura ed Enologia», 3, pp. 27-36.
- PARENICOVÁ L., BENEN J.A.E., SAMSON R.A., VISSER J. (1997): *Evaluation of RFLP analysis of the classification of the selected black Aspergilli*, «Mycological Research», 101, pp. 810-814.
- PARRA R., MAGAN N. (2004): *Modelling the effect of temperature and water activity on growth of Aspergillus niger strains and applications for food spoilage moulds*, «Journal of Applied Microbiology», 97, pp. 429-438.
- PASTER N., PUSHINSKY A., MENASHEROV M., CHET H. (1992): *Inibitory effect of Aspergillus niger on the growth of Aspergillus ochraceus and Aspergillus flavus, and on aflatoxin formation*, «Journal of the Science of Food and Agriculture», 58, pp. 589-591.
- PAUL P., THURM V. (1979): *Hygienic significance of sterigmatocystin in vegetable foods. 2. Production of sterigmatocystin by Aspergillus versicolor*, «Nahrung», 23 (2), pp. 117-120.
- PERRONE G., SUSCA A., STEA G., MULÈ G. (2004): *PCR assay for identification of Aspergillus carbonarius and Aspergillus japonicus from grapes in Europe*, «European Journal of Plant Pathology», 110, pp. 641-649.
- PERRONE G., SUSCA A., EPIFANI F., MULÈ G. (2005): *AFLP characterization of Southern Europe population of Aspergillus sect. Nigri from grapes*, «International Journal of Food Microbiology», in stampa.
- PETERSON S.W. (2000). *Phylogenetic relationships in Aspergillus based on rDNA sequence analysis*, in *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*, a cura di R.A. Samson, J.I. Pitt, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 323-355.
- PIETRI, A., BERTUZZI T., PALLARONI L., PIVA G. (2001): *Occurrence of ochratoxin A in Italian wines*, «Foods Additives and Contaminants», 18, pp. 647-654.
- PITT J.I. (1987): *Penicillium viridicatum, Penicillium verrucosum and production of ochratoxin A*, «Applied and Environmental Microbiology», 53, pp. 266-269.
- PITT J.I., HOCKING A.S. (1997): *Fungi and food spoliage*, II Edizione, Blackie Academic and Professional, London, UK.
- POLLASTRO S., DONGIOVANNI C., ABBATECOLA A., TAURO G., NATALE P., PASCALE M., VISCONTI A., FARETRA F. (2003). *Wine contamination by ochratoxin A in South Italy: causes and preventive actions*, «Journal of Plant Pathology», 85, pp. 281 (riassunto).
- POLLASTRO S., DONGIOVANNI C., DE MICCOLIS ANGELINI R.M., ABBATECOLA A., NATALE P., DE GUIDO M.A., FARETRA F. (2005): *Marciumi dell'uva e contaminazione del vino da ocratossina A*, «Informatore fitopatologico», 55 (4), pp. 15-21.

- POLLASTRO S., DE MICCOLIS ANGELINI R.M., FARETRA F. (2006): *A new semi-selective medium for the ochratoxigenic fungus Aspergillus carbonarius*, «Journal of Plant Pathology», 88, pp. 107-112.
- POLLASTRO S., DE MICCOLIS ANGELINI R.M., ABBATECOLA A., DE GUIDO M.A., FARETRA F. (2005c). Real-Time PCR for quantitative detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes and must, in corso di stampa.
- RAPER K.B., FENNELL D.I. (1965): *The genus Aspergillus*, Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- RIZZO A., ESKOLA M., ATROSHI F. (2002): *Ochratoxin A in cereals, foodstuffs and human plasma*. «European Journal of Plant Pathology», 108, pp. 631-637.
- ROUSSEAU J., BLAYTERON L. (2002): *Ochratoxin A dans les vins: pas de solution curative sur vin, priorité à la maîtrise sanitaire au vignoble*, «La Revue des Œnologues», 104, pp. 14-16.
- SAMSON R.A., HOUBRAKEN J.A.M.P., KUIJPERS A.F.A., FRANK M., FRISVAD J.C. (2004): *New species of Aspergillus section Nigri*, «Studies in Mycology», 50, pp. 45-61.
- SCUDAMORE K.A., CLARKE J.H., HETMANSKY M.T. (1993): *Isolation of Penicillium strains producing ochratoxin A, citrinin, xanthomegnin, viomellein and vioxanthin from stored cereal grains*, «Letters in Applied Microbiology», 17, pp. 82-87.
- SERRA S., MADDAU L., FRANCESCHINI A. (2004): *Ochratoxin A and producing fungi in Sardinian vineyards*, «Journal of Plant Pathology», 86, pp. 304 (riassunto).
- SILVA A., GALLI R., GRAZIOLI B., FUMI M.D. (2003): *Metodi di riduzione di residui di ocratoxina A nei vini*, «Industria Bevande», 32, pp. 467-472.
- SPOTTI E., CACCHIONI C., COLLA F., BEATRISTOTTI M., ZANARDI S. (1999): *Growth of Penicillium verrucosum in model systems based on raw ripened meat products: ochratoxin A determination and control*, «Industria conserve», 74, pp. 113-123.
- SCHUSTER E., DUNN-COLEMAN N., FRISVAD J.C., VAN DIJCK P.W. (2002): *On the safety of Aspergillus niger – a review*, «Applied Microbiology Biotechnology», 59, pp. 426-435.
- TÈREN J., VARGA J., HAMARI Z., RINYU E. KEVEI F. (1996): *Immunochemical detection of ochratoxin A in black Aspergillus strain*, «Mycopathologia», 134, pp. 171-176.
- TJAMOS S.E., ANTONIOU P.P., KAZANTZIDOU A., ANTONOPOULOS D.F., PAPAGEORGIOU I., TJAMOS E.C. (2004): *Aspergillus niger and Aspergillus carbonarius in Corinth raisin and wine-producing vineyards in Greece: population composition, ochratoxin A production and chemical control*, «Journal of Phytopathology», 152, pp. 250-255.
- TJAMOS S.E., DIMAKOPOULOU M., ANTONIOU P.P., TJAMOS E.C. (2005): *Chemical and biological control of sour rot caused by black aspergilli in different farming systems and grapevine varieties in Greece*, in *Book of abstracts "International workshop: Ochratoxin A in grapes and wine: prevention and control"*, Marsala, Sicily, pp. 15.
- UENO Y., KAWAKURA O., SUGIURA Y., HORIGUCHI K., NAKAJIMA M., YAMAMOTO K., SATO S. (1991): *Use of monoclonal antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi*, in: *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumors*, a cura di M. Castagnero, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky, H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lione, Francia, pp. 71-75.
- VAN DER MERWE K.J., STEYN P.S., FOURIE L. (1965a): *Ochratoxins A, a toxic metabolite produced by Aspergillus ochraceus Wilh.*, «Nature», 205, pp. 1112-1113.
- VAN DER MERWE K.J., STEYN P.S., FOURIE L. (1965b): *Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B and C, metabolites of Aspergillus ochraceus Wilh.*, «Journal of the Chemical Society», pp. 7083-7088.

- VARGA J., KEVEI F., FEKETE C., COENEN A., KOZAKIEWICZ Z., CROFT J.H. (1993): *Restriction fragment length polymorphisms in the mitochondrial DNAs of the Aspergillus niger aggregate*, «Mycological Research», 97, pp. 1207-1212.
- VARGA J., KEVEI E., RINYU E., TÉREN J., KOZAKIEWICZ Z. (1996): *Ochratoxin production by Aspergillus species*, «Applied and Environmental Microbiology», 62, pp. 4461-4464.
- VERCESI A., ZERBETTO F., BISIACH M., LOCCI R. (1986): *On the grouping of yeasts associated with grapevine sour rot by numerical methods*, «Annali di Microbiologia», 36, pp. 23-34.
- VERCESI A., MOGICATO M., TOFFOLATTI S., MASI G., SAVINO M., BORGO M. (2004): *Effetto di diverse strategie antibiotriche sulla presenza di Aspergillus spp. e Penicillium spp. su uve in Puglia*, in *Atti delle Giornate Fitopatologiche*, Vol. 2, pp. 235-242.
- VISCONTI A., PASCALE M., CENTONZE G. (1999): *Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high performance liquid chromatography*, «Journal of Chromatography», 864, pp. 89-101.
- VRIES R.P. DE, BURGERS K., VAN DE VONDERVOORT P.J.I., FRISVAD J.C., SAMSON R.A., VISSER J. (2004): *A new black Aspergillus species, A. vadensis, is a promising host for homologous and heterologous protein production*, «Applied and Environmental Microbiology», 70, 3954-3959.
- WARDAN R. (2001): *Wine contamination by ochratoxin A*, Thesis of Master of Science in Integrated Pest Management of Mediterranean Fruit Crops, CIHEAM/IAM Bari, pp. 64.
- WELLS J.M., COLE R.J., KIRKSEY J.W. (1975): *Emodin, a toxic metabolite of Aspergillus wentii isolated from weevil-damaged chestnuts*, «Systematic and Applied Microbiology», 30, pp. 26-28.
- ZERBETTO F., MAININI A., TOFFOLATTI S., POGLIANA M., VERCESI A. (2004): *Attività di fungicidi comunemente utilizzati in vigneto su specie di Aspergillus gruppo Nigri*, in: *Atti delle Giornate Fitopatologiche*, Vol. 2, 243-250.
- ZIMMERLI B., DICK R. (1996): *Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment*, «Food Additives and Contaminants», 13, pp. 655-668.
- ZIRONI R., RIPONI C., FERRARINI R., AMATI A. (1982): *Effetti del "marciume acido" sui costituenti delle uve e sulle caratteristiche dei mosti e dei vini*, «Vignevini», 10, pp. 39-46.
- ZIRONI R., RIPONI C., FERRARINI R., AMATO A. (1983): *Osservazione sullo sviluppo del "marciume acido" durante l'appassimento delle uve*, «Vignevini», 11, pp. 35-40.

Micotossine: aspetti tossicologici

INTRODUZIONE

Le micotossine rappresentano un gruppo strutturalmente eterogeneo di composti prodotti dal metabolismo secondario dei miceti, che possono ritrovarsi in diverse piante alimentari o in prodotti provenienti da animali che hanno consumato mangime contaminato (Wu, 2005).

L'interesse odierno per le micotossicosi deriva da una serie di evidenze scientifiche che hanno dimostrato la significativa associazione tra il consumo di alimenti contaminati da micotossine e gravi effetti tossici per la salute umana (Fung e Clark, 2004). Nella tabella 1 sono riportate le micotossine più frequenti e i loro principali effetti tossici.

MECCANISMI DI TOSSICITÀ DELLE MICOTOSSINE

Le micotossine, pur risalendo a tempi remoti, sono state scientificamente oggetto di studio solo a partire del 1850, quando si è dimostrata l'associazione tra l'ingestione di segale contaminata con sclerozi di *Claviceps purpurea* e la comparsa di casi di ergotismo. La sindrome, endemica in alcune regioni dell'Europa come Francia e Germania, è stata definita Ergotismo epidemico, distinto in due forme: *Ergotismo Gangrenoso* ed *Ergotismo Convulsivo o Spasmodico*.

La sindrome gangrenosa ha caratterizzato le epidemie medievali (fuoco di S. Antonio) ed è dovuta alla contrazione della parete dei medi e piccoli vasi

* Dipartimento di Farmacologia, Università degli Studi di Bologna

MICOTOSSINE	EFFETTO TOSSICO	PRODOTTO CONTAMINATO
Patulina	Epatiti (carcinogenesi)	Frutta e derivati
Acido penicillico	Epatiti (carcinogenesi)	Mais e altri cereali, legumi
Sterigmatocistina	Epatiti (carcinogenesi)	Cereali, caffè crudo
Roquefortina	Disturbi nervosi	Formaggi erborinati
Pretossina	Mutagenesi	Formaggi erborinati
Acido tenuazonico	Citotossicità	Pomodoro, frutta e relative conserve alimentari, girasole
Rubratossine	Epatiti, emorragie	Cereali, legumi
Aflatossine – B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Epatiti, nefriti	Arachidi ed altri legumi, mais ed altri cereali, noci e mandorle diverse, semi oleosi, frutta secca
– M ₁ , M ₂	Derivati del metabolismo animale di B ₁ e B ₂	Latte e derivati
Zearalenoni	Iperestrismo	Mais ed altri cereali
– Zearalenone	Ipo fertilità	
Ocratossine	Nefriti	Orzo, mais ed altri cereali
– A.B	Epatiti	Pane, pasta e prodotti da forno
Tricoteceni	Dermatiti, emorragie	Mais, orzo ed altri cereali
– Tossina T-2	Leucopenia, vomito	
– Deossinivalenolo	Disturbi nervosi	
– Diacetossiscirpenolo	Cardiopatie, inappetenza	
Fusarina	Mutagenesi, carcinogenesi	Mais
Moniliformina	Citotossicità	Mais
Alcaloidi di Claviceps	Ergotismo	Cereali
Piperazine, Chetomine	Citotossicità	Mais ed altri derivati
Citrinina	Epatiti, nefriti	Cereali
Viomelleina	Nefriti	Orzo ed altri cereali
Acido ciclopiazonico	Astenia, paralisi	Cereali, formaggi, arachidi

Tab. 1 *Esempi di micotossine contaminanti gli alimenti per l'uomo e i loro effetti tossici*

arteriosi, che, riducendo l'apporto nutritivo del sangue ai tessuti, determina necrosi. La persona colpita avvertiva sensazioni di freddo alternate a violenti dolori urenti a un piede, a una gamba, più raramente a un braccio, che si infiammava in forma sempre più grave. Ne seguiva una gangrena secca con perdita indolore dei tessuti che dalle unghie poteva giungere all'intero arto; con il procedere della malattia si sviluppava una gangrena viscerale che portava a morte entro breve tempo. L'Ergotismo Convulsivo o Spasmodico è caratterizzato dalla sintomatologia neuromuscolare, che si manifesta con spasmi dolorosi della muscolatura volontaria, convulsioni e, nei casi più gravi, encefalopatia focale e diffusa. Circa il 10-20% dei colpiti muore dopo un breve periodo di atroci sofferenze e molti dei sopravvissuti vanno incontro a

demenza. Le frequenze delle epidemie di ergotismo e la conseguente gravità sociale della malattia si ridussero solo quando il grano cominciò a rimpiazzare la segale come alimento anche per le classi più disagiate; successivamente si ebbero ulteriori miglioramenti per lo sviluppo in agricoltura di tecniche più avanzate di aratura e procedure di drenaggio più profonde ed efficaci.

Le micotossine a oggi considerate più importanti dal punto di vista tossicologico e socio-sanitario sono le aflatossine, le ocratossine, i tricoteceni e le fumonisine (Wu, 2004).

Aflatossine

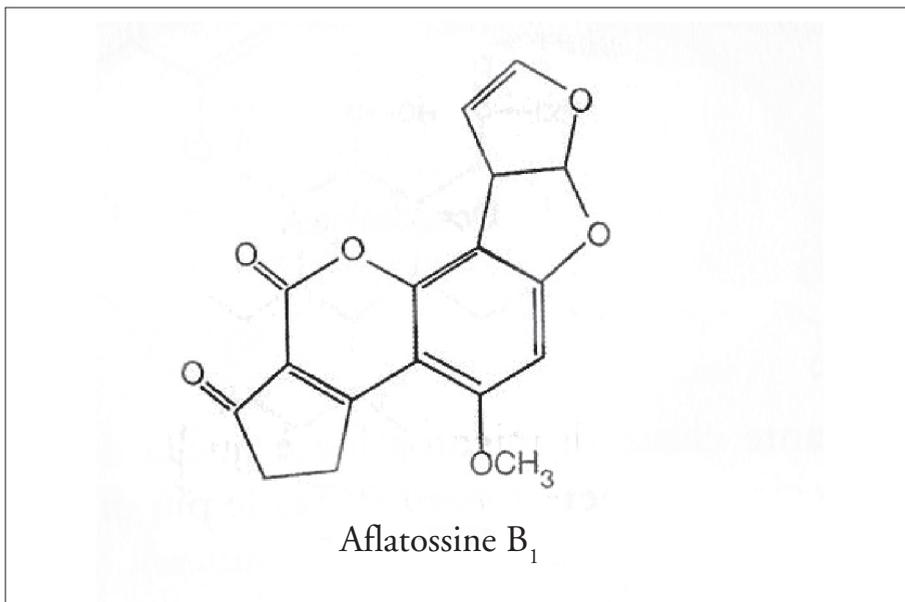
Le aflatossine sono prodotte essenzialmente da due specie di *Aspergillus*: *A. parasiticus* (tipico delle aree tropicali e subtropicali) e *A. flavus* (ubiquitario).

Le aflatossine possono trovarsi in vari alimenti e prodotti da essi derivati tra cui i cereali (mais, miglio), frutta secca (arachidi, pistacchi, mandorle, noci), olii di semi. Il metabolita idrossilato dell'aflatossina B₁ (aflatossina M₁) può essere presente nel latte di animali alimentati con mangimi contaminati.

Le aflatossine sono sostanze dotate di elevata tossicità sia acuta che cronica. L'elevata attività biologica e l'ampio spettro di azione delle aflatossine derivano dalla loro capacità di legarsi con gli acidi nucleici e con le proteine, determinando effetti deleteri sulla sintesi proteica e sull'integrità cellulare (Williams et al., 2004).

Gli effetti tossici acuti delle aflatossine si deducono da studi nel modello animale o da intossicazioni accidentali, che purtroppo si sono verificate in seguito a ingestione di alimenti altamente contaminati. Le aflatossicosi acute si manifestano con ittero, febbre, edema degli arti inferiori ed effetti gastroenterici e nei casi più gravi morte.

La cancerogenicità delle aflatossine rappresenta l'effetto cronico maggiormente indagato in modelli sperimentali e in studi epidemiologici. Nelle prove *in vivo* la micotossina più attiva è l'aflatossina B₁ (fig. 1), mentre più moderata è l'attività cancerogena delle altre aflatossine che viene stimata nel seguente ordine crescente: B₁>M₁>G₁>B₂>G₂. Somministrata per via orale l'aflatossina B₁ causa la comparsa di tumori nel fegato di diversi animali (es: ratto, topo, tacchino, anatroccolo, tacchino, trota, scimmia). L'aflatossina causa l'insorgenza di tumori anche in altri organi come cistifellea, colon, retto, stomaco, pancreas e polmoni. Inoltre, la somministrazione di aflatossina B₁ nei roditori durante la gravidanza o la lattazione causa nella progenie del ratto la comparsa di carcinomi in diversi organi (Williams et al., 2004).

Fig. 1 *Struttura chimica*

Gli studi epidemiologici, condotti nelle aree geografiche a rischio (Uganda, Kenya, Sudafrica, centro Asia), hanno indicato una significativa correlazione tra l'incidenza dei tumori del fegato (epatocarcinoma) e l'ingestione di aflatoxine con la dieta. Sulla base delle numerose prove di cancerogenicità delle aflatoxine B₁ e B₂, l'International Agency for Research on Cancer (IARC) ha inserito l'aflatoxina B₁ nel gruppo 1 e cioè tra le sostanze sicuramente cancerogene per l'uomo (tab. 2). Per quanto riguarda il metabolita, aflatoxina M₁, gli studi sull'uomo sono insufficienti e gli effetti cancerogeni sono stati dimostrati soltanto in alcuni modelli animali (ratto e trota), e di conseguenza la IARC ha classificato questa micotossina nel gruppo 2B, che comprende le sostanze cancerogene per gli animali (www.iarc.it).

L'attività cancerogena dell'aflatoxina B₁ è riconducibile al suo processo di biotrasformazione che, mediante l'attivazione del complesso enzimatico del citocromo P450, porta alla formazione di residui epossidici (-eso-8,9-epossido). I residui epossidici si legano con legami covalenti al DNA formando addotti stabili con le basi puriniche e pirimidiniche e, di conseguenza, possono generare mutazioni geniche. Gli effetti genotossici delle aflatoxine, e in particolare della B₁, sono stati osservati in sistemi sperimentali *in vitro* e *in vivo*, e inoltre i principali addotti formati dalle aflatoxine (aflatoxina B₁-N7gua-

GRUPPO 1	Cancerogeno accertato per l'uomo: vi è evidenza di cancerogenicità per l'uomo in studi epidemiologici adeguati che escludono il ruolo del caso, del confondimento e della distorsione dello studio
GRUPPO 2A	Probabile cancerogeno per l'uomo sulla base di evidenza limitata in studi epidemiologici e di evidenza sufficiente nei piccoli roditori
GRUPPO 2B	Possibile cancerogeno per l'uomo sulla base di evidenza limitata nell'uomo e di evidenza non sufficiente nell'animale oppure di evidenza inadeguata nell'uomo
GRUPPO 3	Non classificabile (evidenza inadeguata)
GRUPPO 4	Probabile non cancerogeno per l'uomo sulla base di evidenza che suggerisce l'assenza di cancerogenicità nel roditore e nell'uomo e, in certi casi, sulla base dell'evidenza che suggerisce l'assenza di cancerogenicità nel roditore e l'inadeguatezza o la mancanza del dato sull'uomo, in presenza di altri dati rilevanti

Tab. 2 *Classificazione di cancerogenicità secondo la IARC*

nina) sono stati ritrovati sia nel sangue che nelle urine delle persone esposte ad aflatossine. Le indagini molecolari hanno dimostrato che i tumori epatici indotti dalle aflatossine sono associati alla comparsa di mutazioni puntiformi (delezioni) nel gene P53 (tumore soppressore) o in oncogeni.

Le indagini epidemiologiche indicano una associazione positiva tra l'esposizione ad aflatossine, l'incidenza di epatite B e il rischio di epatocarcinoma. Non sono ancora del tutto chiari i meccanismi molecolari e cellulari che regolano questa associazione; è stata considerata la possibilità che l'inserimento del DNA virale nel genoma dei soggetti esposti alle aflatossine possa interessare il gene P53, bersaglio dell'attività genotossica di queste micotossine.

Negli ultimi anni è stato proposto che l'esposizione ad aflatossine possa concorrere all'insorgenza di alcune gravi patologie degenerative dell'infanzia come la *cirrosi infantile dell'India*, la *sindrome di Reye* e l'*epatopatia infantile dell'Africa (kwashiorkor)*. Le indicazioni che le aflatossine rappresentino una causa eziologica per queste malattie deriva da una serie di osservazioni: la distribuzione geografica e stagionale delle malattie coincide con quella delle contaminazioni alimentari e delle aflatossicosi negli allevamenti nelle aree tropicali e subtropicali dell'Asia e dell'Africa; la presenza di residui di aflatossine in concentrazioni più alte nel siero e nelle urine nei bambini affetti dalle patologie rispetto a quelli sani; il ritrovamento di residui di aflatossina B₁ in biopsie epatiche di bambini e ragazzi deceduti per queste patologie (Bottalico, 2004; Williams et al., 2004).

Recentemente una serie di studi condotti *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato gli effetti immunotossici delle aflatossine. In particolare, è stato riportato che le aflatossine alterano l'attività dei macrofagi e delle cellule *natural killer* e inibiscono la produzione delle interleuchine. L'insieme di questi effetti

biologici può determinare la soppressione della risposta immunitaria, come ben evidenziato in alcuni modelli animali. L'attività immunosoppressiva delle aflatossine è stata chiamata in causa quale fattore responsabile di una maggiore incidenza di malattie respiratorie letali, tra la popolazione giovanile delle aree geografiche particolarmente esposta alle aflatossine. Queste prime evidenze sono di grande interesse socio-sanitario e alcuni studi epidemiologici sono tuttora in corso per chiarire il meccanismo d'azione delle aflatossine nelle patologie immunosoppressive nell'uomo (Wild e Turner, 2002).

Gli studi sperimentali *in vivo* hanno inoltre ben documentato gli effetti embriotossici e teratogeni delle aflatossine, in particolare è stato osservato che l'aflatossina B₁ causa nella progenie del ratto riduzione dell'attività motoria e degenerazione della massa encefalica, riduzione di peso corporeo e malformazione di organi esterni e interni. Malformazioni fetali osservabili a carico del diaframma e dei reni sono state riportate anche per l'aflatossina G₁.

Ocratossine

Le ocratossine sono prodotte da specie di *Aspergillus*, in particolare *A. ochraceus*, e di *Penicillium* (principalmente *P. verrucosum*). L'ocratossina A è la micotossina principale e si trova in alimenti di origine vegetale (cereali, legumi, caffè, uva e vino) e nei prodotti di origine zootecnica provenienti da animali alimentati con mangimi contaminati (Bottalico, 2004).

L'ocratossina A (fig. 2) esplica la sua tossicità a carico del rene, ma in relazione alla dose e alla specie animale può causare immunotossicità ed epatotos-

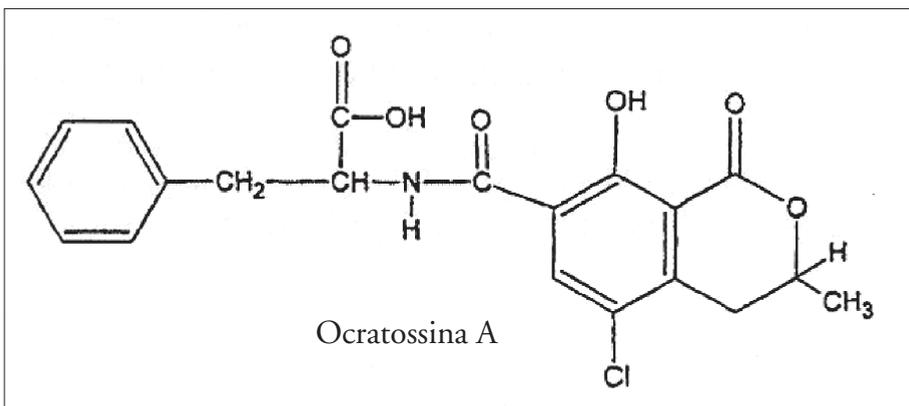


Fig. 2 *Struttura chimica*

sicità. È stato dimostrato in diversi sistemi sperimentali che l'attività tossica è riconducibile alla capacità di questa micotossina di inibire la sintesi proteica, soprattutto nelle cellule renali (Creppy et al., 2004).

L'esposizione alimentare a ocratossina A causa nell'uomo la *nefropatia endemica dei Balcani*, una malattia renale che è stata segnalata a partire dagli anni '50 nella zona geografica dei Balcani, che è caratterizzata da alterazioni funzionali e degenerazione dei tubuli prossimali (Fung e Clark, 2004).

La tossicità dell'ocratossina rappresenta un grave problema veterinario poiché può causare effetti nefrotossici, soprattutto negli animali monogastrici (suini e specie aviarie) alimentati con mangimi a base di cereali contaminati. La nefropatia micotossica dei suini è stata segnalata in diverse aree geografiche (Norvegia, Svezia, Irlanda, Ungheria, USA, Canada) ed è caratterizzata da degenerazione dei tubuli prossimali, atrofia dell'epitelio tubulare e da fibrosi interstiziale; inoltre si possono manifestare anche effetti epatotossici e ritardi nella crescita e nello sviluppo sessuale dei giovani animali. La nefropatia micotossica aviaria colpisce diverse specie aviarie e in particolare gallina e tacchino. La patologia si manifesta con una riduzione della produzione delle uova, nefriti associate a elevata mortalità. Gli animali poligastrici (bovini e ovini) sono più resistenti agli effetti tossici indotti dall'ocratossina A poiché la micotossina è inattivata dalla flora batterica presente nell'apparato gastroenterico dei ruminanti.

Gli studi di cancerogenesi condotti sui roditori hanno mostrato che l'ocratossina A provoca l'aumento dell'incidenza di adenomi e carcinomi renali nel ratto e nel topo e di tumori epatici nel topo. Sulla base di queste evidenze la IARC ha inserito ocratossina A tra le sostanze del gruppo 2B, possibili cancerogeni per l'uomo (www.iarc.fr).

Sperimentazioni condotte con diversi modelli animali (roditori, pulcini, scimmia) hanno dimostrato che l'ocratossina A induce effetti teratogeni e fetotossici.

Tricoteceni

I tricoteceni rappresentano un ampio gruppo di sesquiterpeni tutti caratterizzati dal nucleo tricotecenoico, prodotti da diversi generi di funghi, tra cui *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma* e *Cephalosporium*, che si sviluppano soprattutto nei cereali. Sulla base del gruppo funzionale in posizione C-8 della loro molecola, i tricoteceni vengono suddivisi in due classi: i tricoteceni di tipo A sono caratterizzati dalla presenza in C-8 di un gruppo non chetonico,

e la tossina T-2 è il rappresentante principale; i tricoteceni di tipo B presentano un gruppo carbonilico in posizione C-8 e comprendono il deossivalenolo (vomitotossina) e i suoi derivati (fig. 3).

I tricoteceni presentano un'ampia attività biologica e la tossina T-2 è il composto dotato di maggiore tossicità acuta e cronica. (Bottalico, 2004; Fung e Clark, 2004). La tossina T-2 altera diverse funzioni cellulari: inibizione della sintesi proteica e degli acidi nucleici, inibizione della divisione cellulare, alterazione della struttura e funzionalità della membrana cellulare. L'insieme di questi effetti citotossici interferisce con la funzionalità dei tessuti in attiva proliferazione e in particolare con quelli ematopoietici e linfopoietici con conseguente eritropenia, leucopenia, discrasie ematiche e immunosoppressione. Questi effetti sono responsabili della *Leucopenia tossica alimentare dell'uomo* (ATA), una micotossicosi che si è verificata più volte nell'Europa centrale, caratterizzata da una sintomatologia progressiva (nausea, vomito, emorragie gastrointestinali, laringiti e faringiti necrotiche, infezioni sistemiche) ed elevato tasso di mortalità (80% dei pazienti).

La tossina T-2 può causare anche altri effetti tossici quali dermatiti, stomatiti, fragilità capillare ed emorragie negli organi interni. Inoltre la tossina T-2 può alterare la funzionalità delle gonadi maschili e femminili con alterazione della gametogenesi.

La presenza della tossina T-2 e dei tricoteceni di classe A nei mangimi ha un ruolo importante anche in campo veterinario poiché può causare la sindrome emorragica in diverse specie di animali da allevamento. Questa micotossicosi si manifesta con diversi sintomi: dermatiti delle mucose dell'apparato gastroenterico, emorragie gastrointestinali, leucopenia e, nei casi più gravi, morte degli animali colpiti (Fung e Clark, 2004).

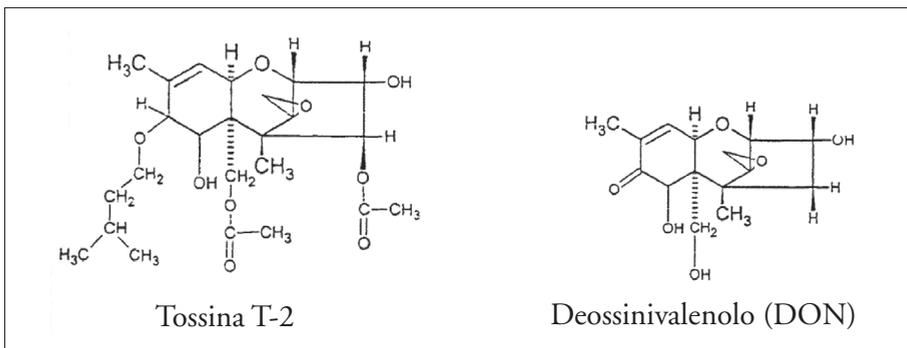


Fig. 3 *Struttura chimica*

I tricoteceni di tipo B, tra cui il deossinivalenolo (vomitotossina) è il principale, inducono gli stessi effetti della tossina T-2 come citotossicità, lesioni cutanee, leucopenia e immunosoppressione, che si manifestano però con una gravità inferiore. La capacità di questi composti di inibire la sintesi proteica e la sintesi degli acidi nucleici è responsabile del meccanismo molecolare e cellulare della loro tossicità. Inoltre, il deossinivalenolo causa degli effetti peculiari quali il rifiuto di assumere alimenti e attività emetica, che rappresentano i sintomi caratteristici della *Sindrome emetica* indotta dai tricoteceni. Episodi di questa micotossicosi sono stati segnalati in alcune popolazioni delle aree asiatiche (Cina, India, Giappone) e i soggetti colpiti manifestano nausea, vomito e forti reazioni gastrointestinali (Fung e Clark, 2004).

La sindrome emorragica ha un grande impatto sanitario ed economico nel campo zootecnico. Infatti in diverse aree geografiche (Europa, Asia, USA) questa micotossicosi si è manifestata negli allevamenti soprattutto di suini (la specie più sensibile), determinando negli animali colpiti rifiuto dei mangimi, nausea e vomito, con conseguente decremento delle produzioni zootecniche. (Bottalico, 2004).

In generale, le informazioni relative ai possibili effetti cancerogeni dei tricoteceni, ottenute dagli studi epidemiologici o dalle sperimentazioni *in vivo*, sono inadeguate o insufficienti, e pertanto la Commissione IARC ha incluso questa classe di composti nel gruppo 3 (www.iarc.fr).

Fumonisine

Le fumonisine sono micotossine prodotte da diversi funghi di campo tra cui il *Fusarium Verticillioides* e il *Fusarium proliferatum* che possono infettare il mais. La formazione delle fumonisine inizia generalmente durante la coltivazione del mais e può continuare nei cereali infetti nel corso delle operazioni della filiera produttiva (raccolta, stoccaggio, preparazioni alimentari) se permangono le condizioni favorevoli alla crescita del fungo e alla sintesi della micotossina (20-22% di contenuto di umidità dei prodotti, 22-27 °C di temperatura). La fumonisina B₁ (fig. 4) rappresenta il composto più comune e più tossico delle fumonisine che si ritrova con preoccupante frequenza nel mais, nei mangimi e negli alimenti a base di mais, in tutte le aree di coltivazione e/o di utilizzazione di questo cereale (www.efsa.eu.int). La fumonisina B₁ è un inibitore della sfingosina N-acetiltransferasi cellulare, un enzima necessario per la biosintesi degli sfingolipidi di membrana. L'inibizione di questo enzima provoca un accumulo di sfinganina e una deplezione di sfingolipidi comples-

VALUTAZIONE TOSSICOLOGICA E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI

Una adeguata valutazione dei potenziali effetti avversi associati all'alimentazione porta necessariamente a una corretta definizione di sicurezza e di rischio tossicologico (Hrelia e Cantelli Forti, 2001).

La sicurezza (*safety*) viene definita come la certezza pratica che l'uso di una sostanza in specifiche condizioni e modalità d'impiego non provoca un danno. La valutazione del rischio è la caratterizzazione scientifica e sistematica degli effetti avversi sulla salute che derivano dall'esposizione dell'uomo ad agenti o a situazioni dannose. La terminologia inglese più propriamente utilizza anche il termine *pericolo (hazard)*, volendo distinguere e precisare la possibilità che un danno derivi da una sostanza in condizioni specifiche. Il rischio tossicologico è il prodotto di un azzardo (evento pericoloso) per la probabilità che si verifichi. La probabilità è funzione dell'esposizione (fonte e via di esposizione) e della suscettibilità individuale (differenze nel metabolismo, nella risposta immunitaria, nell'assetto ormonale). Per l'identificazione e la quantificazione dell'azzardo derivante da sostanze potenzialmente tossiche vengono impiegati approcci sperimentali *in vitro* e *in vivo*, che complessivamente concorrono a una corretta valutazione del rischio: 1) relazione tra struttura chimica e attività biologica, 2) analisi *in vitro* e di breve durata; 3) studi nel modello animale; 4) studi epidemiologici. La valutazione del rischio deve essere quindi orientata alla identificazione del pericolo, alla sua quantificazione (dose-risposta), alla valutazione dell'esposizione e della suscettibilità individuale, alla caratterizzazione del rischio, all'analisi costi-benefici e infine a decisioni operative. Per quanto concerne i limiti di sicurezza, i risultati ottenuti dalla sperimentazione della tossicità di una sostanza servono per elaborare "dosi soglia" al fine di rimanere entro il margine di sicurezza all'atto di emanare norme d'uso nell'utilizzo delle sostanze e nei controlli successivi.

Una fase fondamentale della ricerca tossicologica riguarda la *gestione del rischio* che si riferisce all'insieme dei procedimenti scelti dalle agenzie per gestire il pericolo identificato nel corso del processo di valutazione del rischio. Gli esperti prendono in considerazione l'evidenza scientifica e le valutazioni del rischio dal punto di vista legislativo, economico, sociale e politico nel corso del processo di valutazione delle regole alternative e nella scelta delle opzioni. La *comunicazione del rischio* è la fase finale del trasferimento dell'informazione della valutazione del rischio ai responsabili pubblici (enti sanitari, politici, magistratura) e alla popolazione in generale.

La tematica dei rischi associati alla presenza di micotossine negli alimenti ha progressivamente assunto per le organizzazioni internazionali, l'Unione

Europea e gli enti nazionali importanza crescente, dimostrata dalle numerose normative e linee guida che sempre più frequentemente vengono emanate nel settore della sicurezza alimentare. Le organizzazioni internazionali maggiormente coinvolte nella valutazione, comunicazione e gestione del rischio rappresentato dalle micotossine sono: il *CODEX Alimentarius*, la *Food and Agriculture Organization* (FAO), la *World Health Organization* (WHO) e la *European Food Safety Agency* (Van Egmond, 2004).

Attualmente la caratterizzazione del pericolo, cioè la valutazione qualitativa e quantitativa della natura dell'effetto tossico, è stata sufficientemente sviluppata per le principali micotossine e un'accurata valutazione della delle micotossine sui vari organi e sistemi bersaglio è stata definita (tab. I; <http://www.mycotoxin-prevention.com>). Per quanto riguarda l'effetto cancerogeno, la IARC ha classificato l'aflatossina B₁ nel gruppo 1 (sicuramente cancerogena per l'uomo), mentre l'ocratossina A e l'aflatossina M₁ sono state classificate nel gruppo 2B (possibilmente cancerogene per l'uomo). La valutazione quantitativa della pericolosità delle micotossine è stata affidata al *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA) del WHO e della FAO e comprende per le sostanze non cancerogene la definizione del *Provisional Maximum Tolerable Weekly Intake* (PMTWI) o del *Provisional Maximum Tolerable Daily Intake* (PMTDI). Questi valori provvisori di assunzione massima giornaliera sono stabiliti sulla base del *No Observable Effect Level* (NOEL) e l'applicazione di un fattore di sicurezza pari a 100. Per le sostanze genotossiche, quali l'aflatossina B₁, il JECFA non assegna alcun valore di PMTWI o PMTDI perché si assume che tali sostanze possano esercitare un effetto tossico anche in piccole dosi e pertanto dovrebbero essere assenti. Tuttavia, nei casi in cui non sia possibile eliminare totalmente la presenza di una sostanza tossica dagli alimenti senza compromettere le riserve alimentari mondiali, il JECFA raccomanda un livello massimo di contaminazione definito come *As Low As Reasonably Achievable* (ALARA) cioè livello più basso conseguibile), come nel caso dell'aflatossina B₁.

Nell'ambito della gestione del rischio derivante dalla presenza di micotossine negli alimenti o nei mangimi, la definizione legale di limiti massimi ammissibili rappresenta uno degli aspetti di cruciale importanza per la garanzia della sicurezza alimentare e tutela della salute dell'uomo. È comunque necessario sottolineare che la gestione e la successiva comunicazione del rischio tossicologico sono processi complessi e articolati, in quanto le considerazioni di tipo sanitario si interfacciano con quelle relative alle ricadute economiche, politiche e sociali ed esigono una corretta diffusione delle informazioni per evitare gli "allarmismi alimentari".

BIBLIOGRAFIA

- BOTTALICO A. (2004): *Micotossine*, in *Chimica degli alimenti*, a cura di P. Cabras, A. Martelli, Piccin, Padova, pp. 649-686.
- CARRATÙ M.R., CUOMO V. (2003): *Meccanismi di citotossicità della Fumonisin B1*, in *Moderne sfide della Tossicologia*, a cura di G. Cantelli Forti, M.R. Carratù, Patron, Bologna, pp. 41-46.
- CETIN Y., BULLERMAN L.B. (2005): *Cytotoxicity of Fusarium mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay*, «Food Chem. Toxicol.», 43, pp. 755-764.
- CREPPY E.E., CHIARAPPA P., BAUDRIMONT I., BORRACCI P., MOUKHA S., CARRATÙ M.R. (2004): *Synergistic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity?*, «Toxicology», 201, pp. 115-123.
- FUNG F., CLARK R.F. (2004): *Health effects of mycotoxins: a toxicological overview*, «J. Toxicol.», 42, pp. 217-234.
- HRELIA P., CANTELLI FORTI G. (2001): *La Tossicologia per la qualità e la sicurezza alimentare*, Patron, Bologna.
- VAN EGMOND H.P. (2004): *Natural toxins: risks, regulations and the analytical situation in Europe*, «Anal. Bioanal. Chem. », 378, pp. 1152-1160.
- WILD C.P., TURNER P.C. (2002): *The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions*, «Mutagenesis», 17, pp. 471-481.
- WILLIAMS J.H., PHILLIPS T.D., JOLLY P.E., STILES J.K., JOLLY C.M., AGGARWAL D. (2004): *Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions*, «Am. J. Clin. Nutr.», 80, pp. 1106-1122.
- WU F. (2004): *Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards*, «Environmental Sci. & Technology», 38, pp. 4049-4055.

HARRY KUIPER*, MARINA MIRAGLIA**, BARBARA DE SANTIS**,
CARLO BRERA**

Principi innovativi per l'analisi del rischio negli alimenti: il caso delle micotossine

INTRODUZIONE

Nell'ultimo decennio il consumatore europeo è stato scosso in più occasioni da problemi verificatisi in relazione alla produzione alimentare, quali il caso della “mucca pazza” (BSE), la contaminazione da diossina nei mangimi e negli alimenti di origine animale e l'insorgenza di nuovi patogeni quali *E. coli* 0157. Si è inoltre manifestata una diffusa perplessità sull'uso degli OGM nella filiera alimentare e sul loro impatto ambientale. Pertanto, sebbene la produzione alimentare europea può essere considerata fra le più sicure a livello mondiale, i consumatori hanno sviluppato una sensazione di diffidenza e nutrono serie aspettative nei riguardi delle istituzioni preposte alla gestione del rischio alimentare.

La Commissione Europea ha pertanto preso in seria considerazione il problema di tale percezione negativa del consumatore nei riguardi della sicurezza degli alimenti e nel 2002 il Parlamento Europeo e il Consiglio Europeo hanno emanato il Regolamento (CE) N. 178/2002, che stabilisce nuove procedure in materia di sicurezza alimentare e ha instaurato l'EFSA (Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare). In questa nuova normativa sono chiaramente indicate le innovazioni sui criteri generali e sulle metodologie per assicurare la sicurezza d'uso nell'intera filiera alimentare, inclusa l'adozione del principio di precauzione nei casi in cui non vi sia evidenza sufficiente atta a garantire la sicurezza dei prodotti stessi.

* RIKILT – Institute of Food Safety, Wageningen, Netherlands

** Istituto Superiore di Sanità, Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e i Rischi Alimentari, Reparto OGM e Xenobiotici di Origine Fungina, Roma

L'ANALISI DEL RISCHIO: PRINCIPI CONSOLIDATI

L'analisi del rischio è giustamente considerata la base della garanzia per la sicurezza alimentare. L'approccio tradizionale per l'effettuazione dell'analisi del rischio, come enunciato già da alcuni decenni e tuttora largamente impiegato, può tuttavia non risultare adeguato alla rapida evoluzione della produzione alimentare e ai cambiamenti della società. Attualmente vi è infatti una crescente richiesta di maggiore trasparenza e di partecipazione di tutte le parti interessate, incluso il consumatore, alle procedure decisionali, anche per quanto riguarda l'introduzione di nuovi alimenti.

Secondo l'approccio tradizionale l'analisi del rischio è composta da tre elementi (valutazione, gestione e comunicazione del rischio) fra loro separati anche se in parte integrati. Le definizioni dei vari elementi dell'analisi del rischio sono state fornite in numerosi reports (FAO/WHO Export consultation, 1995, 1997, EU Scientific Steering Committee, primo e secondo report sulla armonizzazione delle procedure di valutazione del rischio, 2000, 2003).

La valutazione del rischio è definita come il processo di valutazione (inclusa l'identificazione dell'incertezza) della possibilità che un agente/evento nocivo (pericolo) colpisca l'animale o l'ambiente a seguito della esposizione sotto definite condizioni. La valutazione del rischio comprende anche la valutazione dell'entità di tale impatto. Ogni processo di valutazione del rischio è a sua volta composto da quattro elementi: identificazione e caratterizzazione del pericolo, valutazione dell'esposizione e caratterizzazione del rischio.

La gestione del rischio è il processo decisionale ponderato relativo alle possibili alternative politiche sulla base dei risultati della valutazione del rischio e, se necessario, della selezione e implementazione delle appropriate opzioni di controllo (incluse, laddove appropriate, le attività di monitoraggio e sorveglianza).

La comunicazione del rischio è lo scambio interattivo di informazioni e opinioni su tutto il processo di analisi del rischio. Questa fase dovrebbe essere interattiva cioè coinvolgere non soltanto coloro che effettuano la valutazione e la gestione del rischio, ma anche i consumatori e tutti le reali e potenziali categorie interessate all'argomento.

ASPETTI INNOVATIVI DELL'ANALISI DEL RISCHIO NELL'UNIONE EUROPEA

A partire dal 2000 l'Unione Europea si è orientata verso una visione più moderna dell'analisi del rischio, che dovrebbe essere considerato sempre più

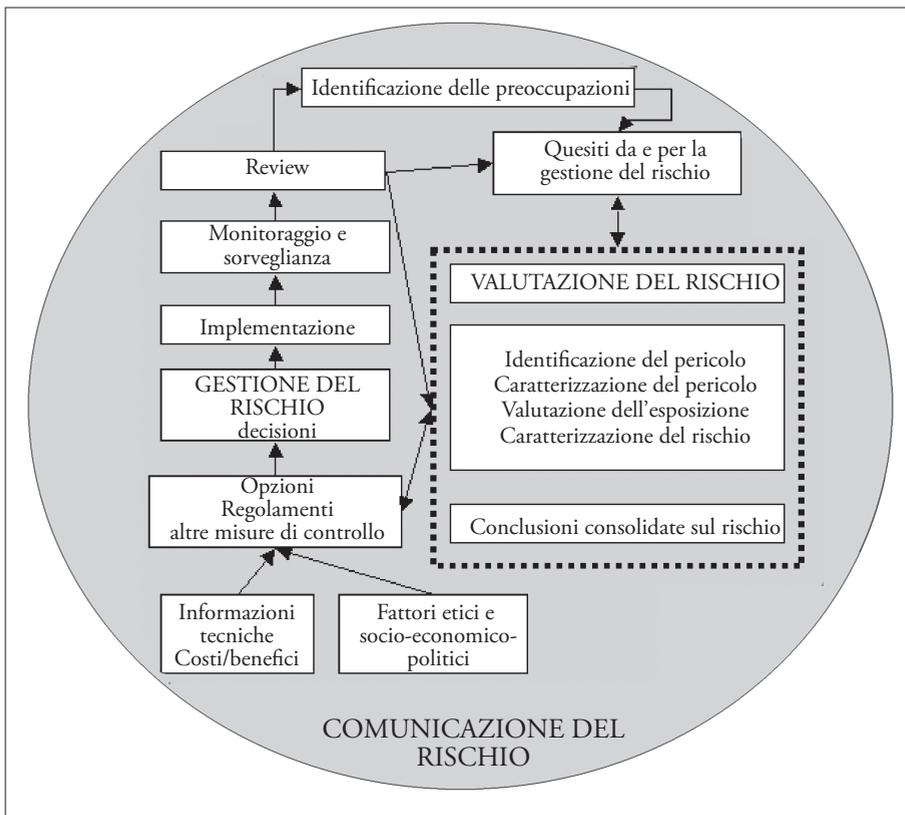


Fig. 1 Schema dell'analisi del rischio (EC, 2000)

un processo iterativo, cioè continuamente riesaminato e modificato laddove necessario, sulla base dei monitoraggi, della sorveglianza delle azioni già implementate e delle nuove acquisizioni. Lo schema dell'analisi del rischio, come riesaminata dall'EC nel 2000, è quello illustrato nella figura 1.

Inoltre lo Scientific Steering Committee della Commissione Europea ha sottolineato l'importanza di alcuni elementi innovativi dell'analisi del rischio quali il benessere animale, la sostenibilità, la qualità di vita, la percezione del rischio, considerazioni etiche e benefici sociali ed economici e ha iniziato il riesame delle procedure per la valutazione del rischio.

Come già indicato, il Regolamento (EC) n. 178/2002 ha sancito legalmente numerose innovazioni nella effettuazione dell'analisi del rischio fra le quali l'istituzione dell'Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA). L'EFSA rappresenta un'agenzia indipendente, cui è demandata la valutazione

scientifica del rischio e la comunicazione del rischio stesso, ma non la sua gestione. L'EFSA ha principalmente il compito di migliorare la qualità della valutazione del rischio, sviluppare i temi della sicurezza alimentare tenendo conto delle esigenze legali, rispondere ai quesiti posti dalla Commissione, dal Parlamento Europeo o dagli stati membri e può, di sua iniziativa, sviluppare argomenti scientifici di rilievo. L'EFSA non fa parte della Commissione Europea, non rende conto del suo operato alla Commissione stessa ed è controllata dal Management Board che agisce in maniera indipendente e non come rappresentante degli stati membri.

Fra gli elementi innovativi del Regolamento 178/2002 si colloca inoltre il principio che, per promuovere la coerenza tra valutazione, gestione e comunicazione del rischio, ci deve essere una stretta collaborazione tra coloro che effettuano la valutazione e la gestione del rischio stesso. Viene inoltre riconosciuto che la valutazione del rischio su base strettamente scientifica talvolta non è in grado di fornire tutte le informazioni necessarie per la gestione del rischio e che altri fattori devono essere tenuti in considerazione, quali quelli sociali, economici, tradizionali, etici, ambientali così come quelli relativi alla fattibilità dei controlli.

SVILUPPO DI UN NUOVO APPROCCIO INTEGRATO DI ANALISI DEL RISCHIO PER GLI ALIMENTI: IL PROGETTO SAFEFOODS

Come sopra indicato il nuovo approccio metodologico all'analisi del rischio comporta la considerazione di numerosi aspetti e metodologie innovative: per sviluppare molti di questi nuovi approcci è stato recentemente finanziato dall'UE il Progetto Integrato SAFEFOODS ("Promoting Food Safety through a New Integrated Risk Analysis Approach for Foods" www.safefoods.com).

Il progetto SAFEFOODS è mirato al miglioramento delle metodologie per la valutazione della sicurezza d'uso e delle opzioni di gestione del rischio per gli alimenti ottenuti con differenti sistemi produttivi (*high* e *low inputs*) e con differenti tecniche di *breeding* (tradizionale, molecolare e tramite modificazione genetica). Nel progetto verranno studiati i) l'applicabilità di nuovi metodi di *profiling* per l'identificazione dei rischi nella filiera alimentare; ii) le metodologie per l'inclusione della percezione del consumatore nell'analisi del rischio; iii) le metodologie per una efficace comunicazione del rischio; iv) nuove strategie di gestione del rischio che tengano in considerazione anche le conseguenze sociali ed economiche.

ELEMENTI DEL NUOVO APPROCCIO INTEGRATO PER L'ANALISI DEL RISCHIO
QUALE SVILUPPATO DAL PROGETTO SAFEFOODS*Il rischio è molto più che un numero*

Il rischio non deve essere considerato soltanto un numero che esprime se e quanto un potenziale pericolo possa avere un impatto sulla salute dell'uomo o degli animali; devono infatti essere presi in considerazione anche fattori di carattere psicologico e sociale che possono influenzare la qualità della vita, in un contesto molto più ampio (benessere animale, sostenibilità, aspetti etici e impatto economico).

Nuovi approcci metodologici per l'identificazione proattiva dei rischi

Il progetto SAFEFOODS studierà le metodologie per l'identificazione proattiva dei rischi emergenti. Nella messa a punto di tale sistema di allerta verranno studiati rischi microbiologici e rischi chimici, incluse le micotossine. La base per tale sistema di allerta anticipato sarà una piattaforma elettronica dove strutture governative, ricercatori e organizzazioni di varia natura potranno scambiare informazioni e allerta.

Nuove metodologie analitiche e genomiche per la valutazione del rischio

La disponibilità di dati sul genoma dell'uomo, del ratto, del topo e di molti altri organismi, così come lo sviluppo di nuove tecnologie quali la genomica, il *profiling* dell'espressione genica, la proteomica e la metabolomica stanno cambiando in maniera radicale gli schemi degli studi tossicologici e questo avrà un profondo impatto sulle metodologie per la valutazione del rischio.

Questo moderno approccio può fornire importanti informazioni su:

- Il meccanismo di tossicità dei composti
- L'esistenza di una soglia di tossicità per l'effetto tossico
- I biomarcatori di esposizione e di effetto
- L'effetto della esposizione a miscele di più sostanze chimiche
- La comprensione delle differenze interspecie e le conseguenze per l'estrapolazione
- L'identificazione e la quantificazione di gruppi di popolazione vulnerabili e della suscettibilità individuale alle malattie.

Inoltre queste nuove tecniche saranno utilizzate per comprendere con maggiore profondità le differenze esistenti fra alimenti ottenuti con differenti tecnologie e tecniche di *breeding*.

Margini di sicurezza e valutazione dell'esposizione

SAFEFOODS studierà le potenzialità delle più moderne metodologie per la valutazione dell'esposizione, con particolare riferimento all'approccio probabilistico. Con questa metodologia si individuano gli intervalli dei valori plausibili di esposizione da parte dell'uomo e gli intervalli delle dosi che possono provocare un effetto avverso. Questa metodologia sta andando a sostituire quella deterministica che si avvale di dati puntiformi. Tramite l'approccio probabilistico si può individuare la probabilità che un individuo scelto a caso ha di essere esposto a una dose tale da causare un particolare effetto sulla salute. Con questo approccio probabilistico della valutazione del rischio possono essere quantificate le incertezze riferibili ai dati di consumo, ai livelli di contaminazione, alla dose-risposta negli animali e alle variazioni inter- e intraspecie.

Percezione del rischio

Il nuovo approccio per l'analisi del rischio comprende anche la valutazione delle attitudini dei vari soggetti interessati. A questo fine gruppi costituiti da consumatori, sia soggetti interessati alla valutazione e alla gestione del rischio che scienziati provenienti da differenti paesi, studieranno i vari aspetti connessi alla percezione del rischio e alla sua gestione.

La valutazione dell'incertezza nell'analisi del rischio

Un ulteriore elemento innovativo nel nuovo approccio per l'analisi del rischio è rappresentato dalla riconosciuta necessità di valutare le incertezze collegate a ogni elemento del processo.

L'ANALISI DEL RISCHIO PER LE MICOTOSSINE

L'analisi del rischio indirizzata alle micotossine riveste una valenza prioritaria non solo nel panorama della sicurezza alimentare (*food safety*), ma anche della assicurazione di razioni alimentari adeguate a livello mondiale (*food security*).

Infatti, oltre alle implicazioni sanitarie, economiche, politiche, riferibili a questo tipo di contaminazione si devono prendere in considerazione aspetti di carattere etico in quanto i paesi in cui viene maggiormente sentito il problema della assicurazione di disponibilità di cibo per tutti sono quelli in cui, a causa delle condizioni igieniche e climatico-ambientali, le derrate alimentari sono maggiormente contaminate da micotossine. Pertanto questo tipo

di contaminazione attualmente è vista in maniera prioritaria non solo dalle autorità governative, dalla comunità scientifica e dal settore produttivo, ma anche dalle organizzazioni internazionali quali la FAO, il CODEX e il WTO. Per contro, a tale riguardo rimangono ancora piuttosto scarse la conoscenza e la consapevolezza del consumatore relativamente a questa classe di contaminanti. Questa informazione sarebbe stata invece necessaria nella recente diatriba relativa alle produzioni biologiche e biotecnologiche, in cui l'impatto della contaminazione da micotossine nelle varie tipologie di tecniche colturali dovrebbe essere preso in attenta considerazione.

Nei paragrafi che seguono si vuole dare una panoramica dello stato corrente dei vari elementi dell'analisi del rischio da micotossine e delle prospettive future, alla luce di quanto esposto per l'analisi del rischio in generale.

Valutazione del rischio da micotossine

La valutazione del rischio è stata effettuata con ragionevole scientificità per molte micotossine, anche se le ricerche epidemiologiche a riguardo, peraltro di difficile attuazione, sono molto carenti.

La caratterizzazione del pericolo da micotossine riguarda l'effetto che queste sostanze possono esercitare sull'uomo e sugli animali. La vasta gamma di effetti nocivi (genotossico, cancerogeno, epatotossico, nefrotossico, immunotossico, ecc.) è trattata esaurientemente in altra parte di questa monografia. Di rilievo è il recente coinvolgimento dell'EFSA (European Food Safety Agency) nel settore della caratterizzazione del pericolo di alcune micotossine.

La caratterizzazione del rischio, come già indicato per l'analisi del rischio in generale, implica sia la valutazione della incidenza di contaminazione, sia la valutazione dell'esposizione come sopra evidenziato.

Per quanto riguarda la valutazione dell'incidenza di contaminazione numerosi monitoraggi e *surveillance* specifiche sono stati eseguiti in numerosi paesi europei. In Italia sono disponibili studi eseguiti da alcuni singoli gruppi di ricerca, mentre a livello governativo sono stati promossi solo pochi studi quali la recente approfondita indagine per valutare l'entità della contaminazione da ocratossina A nel vino. A livello europeo numerosi programmi coordinati sono stati promossi dalla UE per valutare la presenza di alcune micotossine in determinate derrate alimentari di particolare rilievo. Il programma coordinato dell'UE implica l'obbligo da parte degli

stati membri di eseguire una indagine conoscitiva (*surveillance*) per valutare in dettaglio la presenza di determinati contaminanti in alcuni alimenti suscettibili a quel contaminante o particolarmente importanti per la salute pubblica, quali gli alimenti per l'infanzia. Queste indagini hanno in genere lo scopo di avere elementi per la definizione di limiti di legge o per la predisposizione di idonei controlli. I programmi coordinati finora effettuati riguardano le aflatossine nelle spezie (2004), alcune micotossine (aflatossina B₁, ocratossina A, zearalenone, deossinivalenolo e fumonisine) nei mangimi (2002 e 2004), le aflatossine in arachidi e pistacchi (1998) e l'ocratossina A in tutti i tipi di caffè (1999).

Va rilevato che il recente ingresso nell'UE di nuovi paesi membri renderebbe indispensabile l'acquisizione di dati sulla situazione della contaminazione da micotossine in tali paesi, le cui derrate possono ora entrare in libera circolazione in tutta l'Europa. Nell'ambito del progetto SAFEFOODS sopradescritto (<http://www.safefoods.nl/>) verrà effettuato il confronto della contaminazione da micotossine nelle tre principali modalità di produzione (convenzionale, *low input* e *high input*).

La valutazione dell'esposizione come già detto si effettua con varie metodologie utilizzando i dati dei consumi alimentari e quelli di incidenza di contaminazione. A livello europeo la valutazione dell'esposizione per alcune micotossine (aflatossine, ocratossina, fusariotossine e patulina) è stata effettuata con lo strumento delle *SCOOP tasks* promosse e finanziate dalla UE per valutare l'esposizione della popolazione europea a varie categorie di contaminanti. Le *tasks* sopraindicate sono state sviluppate con un approccio metodologico deterministico, mentre nell'ambito del progetto SAFEFOODS verrà effettuata la valutazione del rischio da micotossine con una metodologia probabilistica sopra descritta, con particolare riferimento al Metodo Montecarlo.

Gestione del rischio da micotossine

In Europa e in Italia la gestione del rischio da micotossine risulta, per alcune parti, molto ben sviluppata: in particolare è stato messo a punto un pacchetto normativo piuttosto robusto e completo, relativo soprattutto alla definizione di limiti massimi ammissibili in numerose derrate alimentari e nei mangimi, alla definizione di metodi per il campionamento e a requisiti per i metodi di analisi. Di rilievo anche le recenti decisioni per il controllo dell'importazione per alcuni paesi importatori e per alcune derrate.

Definizione di limiti massimi ammissibili: la normativa sulle micotossine

in Europa e in Italia

A partire dal 1976, anno in cui sono stati definiti limiti massimi per le aflatossine nei mangimi, sono stati emanati, sia a livello nazionale che comunitario, provvedimenti legislativi relativi ai livelli massimi ammissibili per le più importanti micotossine in molte matrici alimentari, oltre a provvedimenti legislativi relativi ai metodi per il campionamento, ai requisiti per l'analisi, alle condizioni per l'importazione e ai programmi coordinati da eseguire nell'ambito del controllo ufficiale.

A partire dal 1998 l'UE ha iniziato il processo sistematico di definizione di limiti massimi ammissibili per le micotossine negli alimenti, e attualmente il pacchetto normativo risulta notevolmente sviluppato anche se non ancora completato.

Vengono di seguito riportati i dettagli della normativa comunitaria attualmente in vigore e vengono forniti alcuni cenni relativi a quella in preparazione.

I *cereali* sono attualmente oggetto di una normativa dettagliata per le aflatossine (AFs), per l'ocratossina A e per alcune fusariotossine (tab. 1). Di rilievo la differenziazione dei limiti per le aflatossine nel mais tra prodotto non destinato al consumo umano diretto (da sottoporre a cernita o ad altri trattamenti fisici) e prodotto destinato al consumo umano diretto. Questa differenziazione è stata resa possibile dalla disponibilità di dati relativi all'effetto del processo tecnologico sui livelli di tossina contenuti nella materia prima; per le aflatossine in altri cereali, a causa della carenza di dati analoghi, non è stato possibile effettuare una simile differenziazione, con grave danno per il settore della trasformazione. Limiti differenziati sono anche in vigore per l'ocratossina A e per le fusariotossine (tab. 1), per le quali esistono informazioni sull'effetto del processo tecnologico. Come riportato nella tabella, per alcune derrate alimentari e per alcune fusariotossine, i limiti dovrebbero entrare in vigore a partire dall'1 luglio 2007, per permettere al settore produttivo di adeguarsi ai limiti stessi. Va inoltre rilevato che per le aflatossine e l'ocratossina A non viene specificato in quale stadio della produzione debba essere applicato il limite sulla materia prima. Ciò può creare notevoli inconvenienti al settore produttivo in quanto è noto che alcune operazioni di pulitura della materia prima possono diminuire il livello di contaminazione. Per le fumonisine invece è stato specificato che il limite sul prodotto non processato si applica ai cereali commercializzati per il *first stage processing*. Più precisamente per *first stage processing* si intende ogni trattamento fisico o termico diverso dall'essiccamento; ad esempio la svecchiatura con ventilazione è considerata *first stage*

processing al contrario di pulizia, cernita ed essiccamento, purché non venga esercitata sulla granella alcuna azione fisica. Nonostante queste precisazioni tuttavia la complessità e la continua evoluzione dei processi tecnologici di lavorazione dal campo alla molitura rendono di difficile individuazione il punto della filiera cerealicola a cui debba essere applicato il limite fissato per la derrata non processata.

Anche la *frutta secca* e le *spezie* sono matrici soggette alla indicazione di limiti massimi tollerabili per le aflatossine (tab. 1). Anche in questo caso per le arachidi è stato fissato un limite differenziato tra prodotto da sottoporre a cernita o altri trattamenti fisici e prodotto destinato al consumo umano diretto o da impiegare quale ingrediente alimentare.

I *prodotti derivati dalla vite* sono da tempo oggetto di discussione per la definizione di limiti relativamente alla contaminazione da ocratossina A. I primi prodotti a essere oggetto di limiti massimi ammissibili sono stati i frutti essiccati della vite (Reg. 472/2002, Reg. 123/2005). Più recentemente sono stati fissati limiti per il vino e altre bevande a base di mosto d'uva e per il succo d'uva (Reg. 123/2005) (tab. 1).

Nel 2004 sono stati fissati limiti massimi negli *alimenti per l'infanzia* per l'aflatossina B₁ (AFB₁), l'aflatossina M₁ (AFM₁) e l'ocratossina A (tab. 1).

Per quanto riguarda il *caffè*, il Reg. 123/2005 stabilisce limiti massimi ammissibili esclusivamente per il caffè torrefatto e solubile, e solo nei prossimi anni la stessa tossina dovrebbe essere regolamentata anche nel caffè verde. Analogamente nel prossimo futuro saranno stabiliti limiti massimi per birra, cacao e spezie.

I *succhi di frutta*, con particolare riferimento ai prodotti a base di mela, sono regolamentati dal Reg. 1425/2003, che fissa i livelli massimi tollerabili per la patulina. Nei prodotti per l'infanzia sono previsti valori di cinque volte inferiori a quelli stabiliti per i prodotti destinati alla popolazione adulta (tab. 1).

I livelli massimi ammissibili per l'aflatossina M₁ nei *prodotti lattiero-caseari* sono stati regolamentati a livello europeo con il Reg. 466/2001 (tab. 1). Tuttavia secondo questa normativa l'unico prodotto che può essere effettivamente sottoposto a controllo è il latte per il quale l'aflatossina M₁ non può superare il valore di 0,05 µg/Kg. Per i prodotti lattiero-caseari viene solo indicato che devono essere ottenuti da latte con valori di AFM₁ nei limiti sopraindicati. Non è stato possibile fissare limiti specifici per i vari prodotti derivati dal latte a causa della mancanza di informazioni sui fattori di conversione latte-prodotto derivato. In Italia, a causa dell'*outbreak* di contaminazione da AFB₁ nel mais verificatosi nel 2003 e della conseguente presenza di AFM₁ nel latte, è stato necessario definire quale fosse il valore della tossina nei

formaggi a pasta dura e a lunga stagionatura (tipo grana) prodotti a partire da latte contaminato a 0,05 µg/Kg. Sulla base del fattore di conversione trovato sperimentalmente è stato possibile stabilire un limite massimo temporaneo di 0,45 µg/Kg per questa categoria di formaggi.

Per quanto riguarda il *settore mangimistico*, la Direttiva 1999/29/CE, recepita in Italia con il DM 23 dicembre 2002 n. 317, stabilisce limiti massimi ammissibili per l'AFB₁ nelle varie categorie di mangimi (tab. 2). È ancora in fase di studio a livello comunitario la normativa relativa ai limiti massimi

MATRICE	LIMITE DI LEGGE	RIFERIMENTO ALLA NORMATIVA
Aflatossine totali		
Cereali e derivati (escluso il granoturco) destinati al consumo diretto/cernita o trattamenti	4 µg/Kg	Reg. 2174/2003 (modifica i Reg. 466/2001 e 257/2002)
Mais non destinato al consumo diretto e da sottoporre a cernita/trattamenti fisici	10 µg/Kg	
Mais destinato al consumo diretto	2 µg/Kg	
Arachidi non destinate al consumo diretto	15 µg/Kg	
Altra frutta secca non destinata al consumo diretto	10 µg/Kg	
Frutta secca destinata al consumo diretto	4 µg/Kg	
Peperoncini rossi, pepe di Caienna, paprica, pepe nero e bianco, noce moscata, zenzero, curcuma	10 µg/Kg	
Aflatossina B ₁		
Cereali e derivati (escluso il granoturco) destinati al consumo diretto/cernita o trattamenti	2 µg/Kg	Reg. 2174/2003 (modifica i Reg. 466/2001 e 257/2002)
Mais non destinato al consumo diretto e da sottoporre a cernita/trattamenti fisici	5 µg/Kg	
Mais destinato al consumo diretto	4 µg/Kg	
Arachidi non destinate al consumo diretto	8 µg/Kg	
Altra frutta secca non destinata al consumo diretto	5 µg/Kg	
Frutta secca destinata al consumo diretto	2 µg/Kg	
Peperoncini rossi, pepe di Caienna, paprica, pepe nero e bianco, noce moscata, zenzero, curcuma	5 µg/Kg	
Alimenti per l'infanzia e alimenti a base di cereali destinati a lattanti e prima infanzia	0.10 µg/Kg	Reg. 683/2004
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati ai lattanti	0.10 µg/Kg	
Materie prime per mangimi, a eccezione di: arachidi, copra, palmisti, semi di cotone, babassu, granoturco e loro derivati	0,05 mg/Kg 0,02 mg/Kg	Direttiva 1999/29/CE
Mangimi completi per bovini, ovini e caprini, a eccezione di: - animali da latte; - vitelli, agnelli e capretti	0,05 mg/Kg 0,005 mg/Kg 0,01 mg/Kg	
Mangimi completi per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,02 mg/Kg	
Altri mangimi completi	0,01 mg/Kg	

MATRICE	LIMITE DI LEGGE	RIFERIMENTO ALLA NORMATIVA
Mangimi complementari per bovini, ovini e caprini (a eccezione dei mangimi complementari per gli animali da latte, vitelli, agnelli e capretti)	0,05 mg/Kg	
Mangimi complementari per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,03 mg/Kg	
Altri mangimi complementari	0,005 mg/Kg	
Materie prime per mangimi: arachidi, copra, palmisti, semi di cotone, babassu, granturco e loro derivati	0,2 mg/Kg	
Aflatossina M ₁		
Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento, compreso il latte per lattanti e il latte per lo svezzamento	0.025 µg/Kg	Reg. 683/2004
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati ai lattanti	0.025 µg/Kg	
Latte crudo, latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte e latte trattato UHT	0.05 µg/Kg	Reg. 2174/2003
Patulina		
Succhi di frutta (mela) e ingredienti a base di succo di mela in altre bevande	50 µg/Kg	Reg. 1425/2003 (modifica il Reg. 466/2001)
Sidro, bevande fermentate derivati da succo di mela	50 µg/Kg	
Composta e purea di mele	25 µg/Kg	
Succhi di mela e altra frutta per l'infanzia	10 µg/Kg	
Ocratossina A		
Cereali grezzi	5 µg/Kg	Reg. 123/2005
Prodotti derivati dai cereali (cereali destinati al consumo diretto)	3 µg/Kg	
Frutti essiccati della vite (uva passa di Corinto, uva passa, uva sultanina)	10 µg/Kg	
Caffè torrefatto a eccezione del caffè solubile	5 µg/Kg	
Caffè solubile	10 µg/Kg	
Vino e altre bevande a base di mosto d'uva (esclusi i vini liquorosi e con un grado alcolico >15% vol.)	2 µg/Kg	
Succo d'uva	2 µg/Kg	
Alimenti per bambini e alimenti a base di cereali per lattanti e bambini	0.50 µg/Kg (su materia secca)	
Alimenti dietetici destinati a fini medici speciali, soprattutto all'alimentazione per lattanti	0.50 µg/Kg (su materia secca)	
Alimenti per l'infanzia e alimenti a base di cereali destinati a lattanti e prima infanzia	0.50 µg/Kg	Reg. 683/2004
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati ai lattanti	0.50 µg/Kg	
Cereali grezzi	5 µg/Kg	Reg. 472/2002
Frutti essiccati della vite (uva passa di Corinto, uva passa, uva sultanina)	10 µg/Kg	
Prodotti derivati dai cereali (cereali destinati al consumo diretto)	3 µg/Kg	

MATRICE	LIMITE DI LEGGE	RIFERIMENTO ALLA NORMATIVA
Fumonisin		
Farina di mais	1000 µg/Kg	N° DGVA-IV/32663 P/ I.2.b.d del 27/10/2004
Fumonisine B ₁ + B ₂		
Mais non trasformato	2000 µg/Kg	Reg. 856/2005
Farina di mais	1000 µg/Kg	
Mais per corn flakes	1000 µg/Kg	
Prodotti finiti derivanti dal mais	400 µg/Kg	
Alimenti per l'infanzia derivanti dal mais	200 µg/Kg	
Zearalenone		
Cereali non processati	100 µg/Kg	Reg. 856/2005
Mais non trasformato	200 µg/Kg*	
Ingredienti derivanti dai cereali	75 µg/Kg	
Farina di mais, mais per corn flakes	200 µg/Kg*	
Pane, biscotti, pizza, prima colazione, polenta, pop corn	50 µg/Kg*	
Alimenti per l'infanzia	20 µg/Kg*	
Deossinivalenolo		
Cereali non processati	1250 µg/Kg	Reg. 856/2005
Grano duro non trasformato	1750 µg/Kg	
Mais non trasformato	1750 µg/Kg*	
Ingredienti derivanti dai cereali	750 µg/Kg	
Pasta	750 µg/Kg	
Pane, biscotti, pizza, prima colazione	500 µg/Kg	
Alimenti per l'infanzia	200 µg/Kg	
* Livelli applicabili dall'1 luglio 2007 salvo modifiche entro tale termine, in base al Progetto di Regolamento (CE) della Commissione Europea, modifica del Regolamento (CE) n. 466/2001 per quanto riguarda le <i>Fusarium</i> -tossine.		

Tab. 1 *Limiti di legge in vigore a livello comunitario per le aflatossine, per l'ocratossina A, per la patulina e per le fusariotossine negli alimenti*

ammissibili per lo zearalenone e il deossinivalenolo.

A livello italiano la Circolare 10 del 9 giugno 1999 aveva fissato un numero considerevole di limiti per le più importanti micotossine nelle principali matrici alimentari a rischio, con valori più restrittivi per gli alimenti per l'infanzia. Molti dei valori contenuti nella Circolare citata sono stati quelli successivamente adottati dall'UE. La tabella 3 elenca i limiti attualmente in vigore in Italia per le matrici alimentari e per le micotossine per le quali la normativa europea è ancora in corso di definizione.

La normativa a supporto del controllo ufficiale

Aflatossina B ₁		
Materie prime per mangimi, a eccezione di: arachidi, copra, palmisti, semi di cotone, babassu, granturco e loro derivati	0,05 mg/Kg	Direttiva 1999/29/CE
Mangimi completi per bovini, ovini e caprini, a eccezione di:	0,05 mg/Kg	
- animali da latte;	0,005 mg/Kg	
- vitelli, agnelli e capretti	0,01 mg/Kg	
Mangimi completi per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,02 mg/Kg	
Altri mangimi completi	0,01 mg/Kg	
Mangimi complementari per bovini, ovini e caprini (a eccezione dei mangimi complementari per gli animali da latte, vitelli, agnelli e capretti)	0,05 mg/Kg	
Mangimi complementari per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,03 mg/Kg	
Altri mangimi complementari	0,005 mg/Kg	
Materie prime per mangimi: arachidi, copra, palmisti, semi di cotone, babassu, granturco e loro derivati	0,2 mg/Kg	
Materie prime per mangimi, a eccezione di: arachidi, copra, palmisti, semi di cotone, babassu, granturco e loro derivati	0,05 mg/Kg	
	0,02 mg/Kg	

Tab. 2 *Limiti di legge in vigore a livello comunitario per le aflatossine negli alimenti per animali*

Fra le normative europee a supporto del controllo ufficiale, quelle relative al campionamento risultano particolarmente importanti. Le micotossine sono infatti distribuite in maniera estremamente disomogenea all'interno di una derrata in massa. Solo poche unità infatti sono contaminate a livelli molto elevati, al punto da contaminare a livelli considerevoli l'intera partita, dopo la sua successiva macinazione e omogeneizzazione. Pertanto nel caso si voglia stabilire lo stato di contaminazione di una partita in grani (cereali, frutta secca, spezie, semi oleaginosi) è necessario prelevare un numero considerevole di campioni elementari dall'intera partita, riunirli in un campione aggregato che, una volta opportunamente trattato, fornirà il campione da destinare all'analisi di laboratorio. L'errore che si commette nel prelievo del campione per l'analisi è molto più rilevante dell'errore che si commette nell'analisi. La realizzazione di un campionamento corretto è piuttosto complessa e costosa e la necessità di un buon campionamento non è stata, soprattutto negli anni passati, ben compresa. È pertanto presumibile che molti dei dati disponibili di incidenza di contaminazione, e conseguentemente di esposizione, siano sottostimati.

Fra le normative di maggiore efficacia emanate dall'UE a supporto del controllo ufficiale si collocano numerose decisioni che indicano, per alcune tipologie

MATRICE	AFLATOSSINE TOTALI	AFLATOSSINA B ₁	ZEARALENONE	OCRATOSSINA
Cereali	-	-	100 µg/Kg	-
Caffè crudo	-	-	-	8 µg/Kg
Caffè tostato e caffè solubile	-	-	-	4 µg/Kg
Cacao e prodotti derivati: prodotti a base di cacao in polvere	-	-	-	2 µg/Kg
Cacao e prodotti derivati: prodotti a base di cioccolato	-	-	-	0,5 µg/Kg Circolare 28 novembre 2003, n.6 Ministero della Salute
Birra	-	-	-	0,2 µg/Kg
Alimenti per l'infanzia	0,1 µg/Kg	-	20 µg/Kg	-
Piante infusionali	10 µg/Kg	5 µg/Kg	-	-
Prodotti carni				1 µg/Kg

Tab. 3 *Limiti per le micotossine negli alimenti attualmente in vigore in Italia (Circolare 9 giugno 1999 n. 10). I limiti indicati devono essere considerati aggiuntivi a quelli in vigore a livello comunitario*

di frutta secca (principalmente pistacchi, arachidi, fichi e nocciole), quale percentuale delle partite provenienti da Turchia, Cina e Iran devono essere controllate prima dell'importazione. Il provvedimento è particolarmente restrittivo per i pistacchi provenienti dall'Iran (100% delle partite), e indica per ciascun paese quali sono i porti nei quali può avvenire la nazionalizzazione del prodotto.

Infine possono essere considerate parte della normativa a supporto del controllo ufficiale le raccomandazioni relative ai programmi coordinati da svolgere per raccogliere informazioni utili sulla contaminazione di alimenti e mangimi.

Le attività preventive nell'ambito della gestione del rischio

Per la contaminazione da micotossine la prevenzione rappresenta uno dei momenti più efficaci nella gestione del rischio e individua il momento di maggiore interazione tra gestione e comunicazione del rischio. Autorità governative, ricercatori e *stakeholders* dovrebbero confrontarsi e interagire fra

loro per contribuire a mettere in atto strategie preventive.

La prevenzione pre-raccolto è giustamente considerata la migliore strategia per controllare il problema, anche se un sistema integrato di prevenzione deve focalizzarsi anche sulle fasi di raccolto, lavorazione e distribuzione.

Per quanto riguarda la prevenzione in campo si è sviluppata negli ultimi decenni una vasta bibliografia riguardante tecniche più o meno largamente applicabili che includono la selezione di ibridi resistenti, l'impiego di pesticidi idonei, la rotazione dei raccolti, ecc. L'attacco degli insetti è riconosciuto come uno dei fattori che maggiormente favoriscono l'attacco fungino in campo. A tale riguardo sono riportati in letteratura lavori che indicano come il mais biotecnologico resistente all'attacco di alcuni insetti abbia livelli di fumonisine inferiori a quelli riscontrati nelle varietà convenzionali.

Le autorità governative hanno iniziato a emanare linee guida per la prevenzione in campo quali, a livello nazionale, le linee guida nella produzione vitivinicola per la prevenzione della potenziale contaminazione da micotossine (Decreto 7 aprile 2000) e, a livello europeo, la prossima emanazione di codici di pratica per la prevenzione di alcune micotossine (ocratossina A, zearalenone, fumonisine e tricoteceni).

Anche il *Codex Alimentarius* ha lavorato molto nell'ambito della prevenzione da micotossine pubblicando codici di corrette pratiche agricole per la prevenzione della contaminazione da patulina, da ocratossina A e da alcune fusariotossine, per le noci del Brasile e per le arachidi.

Particolarmente attiva e strutturata continua a essere l'attività di ricerca sulla prevenzione. Il *Mycotoxin Cluster*, a livello europeo e a livello nazionale, il progetto AFLARID ne costituiscono esempi di rilievo. Il progetto AFLARID, originato dall'*outbreak* di contaminazione da aflatossine nel mais nel 2003, sta sviluppando importanti temi di prevenzione e acquisendo informazioni di rilievo per la filiera maidicola e lattiero-casearia. Importante *output* di questo progetto è la costituzione di un osservatorio per le micotossine il cui obiettivo è la predizione della contaminazione sulla base di informazioni geografiche, atmosferiche e ambientali.

La prevenzione all'atto della raccolta si effettua principalmente controllando l'attività dell'acqua (A_w) e il danno meccanico alle granaglie.

Nelle fasi successive al raccolto le tecniche attualmente autorizzate in Europa si riferiscono essenzialmente alla cernita.

Una visione più moderna e prospettica della prevenzione dei rischi alimentari, peraltro sancita nel Regolamento 178/2002, è quella basata sulla identificazione dei rischi emergenti e riemergenti. Un progetto del VI Programma Quadro, PERIAPT (<http://www.periapt.net/>), conclusosi recentemente, ha

studiato le strategie per l'individuazione di tali rischi individuando nell'*host environment* la chiave per poter prevedere insorgenza di rischi imprevisti. Lo studio dell'*host environment* prevede l'analisi di tutte le possibili fonti di rischio che possono provenire da cambiamenti nei più svariati settori dell'attività umana e dalle diverse aree disciplinari. Cambiamenti nell'ambiente, nella demografia, nella tecnologia, nell'assetto socioeconomico, ecc. possono creare le condizioni per l'insorgenza di nuovi rischi nel settore alimentare. Nell'ambito di tale settore è stato affrontato come caso studio la problematica delle micotossine e la figura 2 schematizza le diverse fonti di rischio per questa tipologia di contaminanti.

Comunicazione del rischio da micotossine

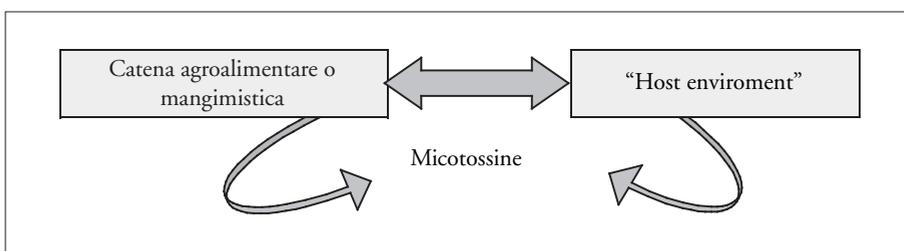


Fig. 2 *Approccio olistico per l'identificazione di rischi emergenti derivanti dalla presenza di micotossine in alimenti e mangimi*

In termini generali per comunicazione del rischio si intende il processo interattivo di scambio di informazioni tra chi valuta e gestisce il rischio e tutte le altre parti interessate al problema in esame. Molto spesso tuttavia nella comunicazione del rischio viene enfatizzata l'importanza del dialogo e della informazione del consumatore a scapito della comunicazione con le altre parti interessate quali ad esempio gli operatori del settore. Per quanto riguarda le micotossine, se l'importanza del dialogo con il consumatore è eticamente corretta e indispensabile, il principio della assicurazione della sicurezza d'uso tramite il percorso *from farm to fork* e viceversa può essere proficuo soprattutto tramite il dialogo interattivo tra autorità governative, ricerca e settore produttivo. Tra questi tre settori è indispensabile che ci sia un processo di azione e reazione attuato attraverso lo scambio delle conoscenze acquisite e le opzioni conseguentemente adottate. Per le micotossine, come in altri casi, questo processo di interazione vede il suo punto di partenza con la definizione di limiti massimi ammissibili, che hanno rappresentato la molla per le azioni

preventive da parte del settore produttivo. Attualmente il settore produttivo, sia a livello comunitario che nazionale, sta reagendo a questi provvedimenti in maniera positiva e proattiva, nonostante non siano pervenute sollecitazioni particolari a riguardo da parte dei consumatori.

BIBLIOGRAFIA

- BRERA C., CATANO C., DE SANTIS B., MIRAGLIA M., *Effect of Industrial Processing on the Distribution of Aflatoxins and Zearalenone in Corn Milling*, dati non pubblicati.
- BRERA C., DEBEGNACH F., GROSSI S., MIRAGLIA M. (2004): *Effect of Industrial Processing on the Distribution of Fumonisin B1 in Dry Milling Corn Fractions*, «Journal of Food Protection», 67, 6, pp. 1261-1266.
- CARDWELL K.F., DESJARDINS A., HENRY S.H., MUNKVOLD G., ROBENS J. (2001): *Mycotoxins: The Cost of Achieving Food Security and Food Quality*, «Feature Story», August, (<http://www.apsnet.org/online/feature/mycotoxin/>).
- Circolare 9 giugno 1999, n. 10, *Direttive in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi*, «Gazzetta Ufficiale» 135 del 11-06-1999.
- COMMISSION REGULATION (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A.
- Direttiva 1999/29/CE del Consiglio del 22 aprile 1999, relativa alle sostanze e ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali, «Gazzetta Ufficiale» L 115 del 04/05/1999, pp. 32-46.
- Direttiva 98/53/CE della Commissione del 16 luglio 1998 che fissa metodi per il prelievo di campioni e metodi d'analisi per il controllo ufficiale dei tenori massimi di taluni contaminanti nei prodotti alimentari, «Gazzetta Ufficiale» L 201 del 17/07/1998 pp. 93-101.
- Decreto 7 aprile 2000, *Linee guida nella produzione vitivinicola per la prevenzione della potenziale contaminazione da micotossine*, «Gazzetta Ufficiale» 97 del 27-4-2000
- FAO/WHO *Food Standards Programme Codex Committee On Food Additives And Contaminants*, Thirty-Fifth Session, Arusha, Tanzania, 17-21 March 2003. Comments Submitted on the Draft Code of Practice for the Reduction of Patulin Contamination in Apple Juice and Apple Juice Ingredients in other Beverages (ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac35/fa03_20e.pdf).
- FAO/WHO *Food Standards Programme Codex Committee on Food Additives and Contaminants* Thirty-Fifth Session, Arusha, Tanzania, 17-21 March 2003. Comments Submitted on the Draft Code of Practice for the Prevention (Reduction) of Mycotoxin Contamination in Cereals, Including Annexes on Ochratoxin A, Zearalenone, Fumonisin and Tricothecenes (ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac35/fa03_22e.pdf).
- FAO/WHO *Food Standards Programme Codex Committee on Food Additives and Contaminants*, Thirty-Fifth Session, Arusha, Tanzania, 17-21 March 2003. Proposed Draft Code of Practice for the Reduction of Aflatoxin Contamination in Tree Nuts (ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac35/fa03_24e.pdf).
- FAO/WHO *Food Standards Programme Codex Committee on Food Additives and Contaminants*, Thirty-Fifth Session, Arusha, Tanzania, 17-21 March 2003. Discussion Paper

- on the Development of a Code of Practice for the Reduction of Aflatoxin Contamination in Peanuts (<ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac35/fa0325ae.pdf>).
- EUROPEAN COMMISSION (2004): *Genetically modified crops in the EU: food safety assessment, regulation, and public concerns, Overarching report ENTRANSFOOD, the European Network on safety assessment of genetically modified food crops*, Ariane Konig, Gijs Kleter, Walter Hammes, Ib Knussen and Harry Kuiper.
- FAO/WHO (1995): *Application of risk analysis to food standard issue*, Geneve.
- GAREIS, M., SCHOTHORST, R.C., VIDNES, A., BERGSTEN, C., PAULSEN, B., BRERA, C., MIRAGLIA, M. (2003): *Collection of Occurrence Data of Fusarium Toxins in Food and Assessment of Dietary Intake by the Population of EU Member States. Report of Experts Participating in SCOOP Task 3.2.10* (<http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210.pdf>).
- MAJERUS, P., KAPP, K. (2002): *Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU member states, March 2002* (http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/index_en.html).
- MINISTERO DELLA SALUTE, Circolare 28 novembre 2003, n. 6, *Valori massimi ammissibili di ocratossina A nel cacao*, «Gazzetta Ufficiale» 286 del 10-12-2003.
- MINISTERO DELLA SALUTE, Decreto 23 dicembre 2002, n.317, *Regolamento interministeriale recante norme di attuazione della direttiva 1999/29/CE, relativa alle sostanze e ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali*, «Gazzetta Ufficiale» 155 del 7-7-2003.
- MINISTERO DELLA SALUTE. D.G.V.A./IX/25664/E.5.B.B.2/P del 24.08.2004. *Metodi di campionamento e di analisi per la ricerca di aflatoxine nei formaggi*.
- MIRAGLIA, M., BRERA, C. (2002): *Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States, January 2002* (http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/index_en.html).
- Progetto di Regolamento (CE) della Commissione Europea, modifica del Regolamento (CE) n. 466/2001 per quanto riguarda le Fusarium-tossine, Bruxelles SANCO/0006/2004 – rev. 6 – aggiornato.
- Raccomandazione della Commissione del 2 febbraio 1998 relativa a un programma coordinato per il controllo ufficiale dei prodotti alimentari per il 1998.
- Raccomandazione della Commissione del 22 dicembre 1998 relativa a un programma coordinato di controllo ufficiale dei prodotti alimentari per il 1999.
- Raccomandazione della Commissione del 19 dicembre 2003 relativa a un programma coordinato di controlli ufficiali dei prodotti alimentari per il 2004 in spezie, erbe e condimenti vegetali.
- Raccomandazione della Commissione del 17 febbraio 2004 sul programma coordinato d'ispezione nel settore dell'alimentazione animale per l'anno 2004, (aflatoxina B1, ocratossina A, zearalenone, deossinivalenolo e fumonisine) nei mangimi.
- Regolamento (CE) N. 466/2001 della Commissione dell'8 marzo 2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari, «Gazzetta Ufficiale» L 077 del 16/03/2001, pp. 1-13.
- Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. «Gazzetta Ufficiale» L 031 del 01/02/2002, pp. 1-24.
- Regolamento (CE) n. 472/2002 della Commissione, del 12 marzo 2002, che modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti

presenti nelle derrate alimentari, «Gazzetta Ufficiale» L 075 del 16/03/2002, pp. 18-20.

Regolamento (CE) n. 1425/2003 della Commissione, dell'11 agosto 2003, recante modifica del regolamento (CE) n. 466/2001 per quanto riguarda la patulina, «Gazzetta Ufficiale» L 203 del 12/08/2003, pp. 1-3.

Regolamento (CE) n. 683/2004 della Commissione, del 13 aprile 2004, che modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 per quanto riguarda le aflatossine e l'ocratossina A negli alimenti per lattanti e prima infanzia, «Gazzetta Ufficiale» L 106 del 15/04/2004, pp. 3-5.

SCUDAMORE, K.A., BANKS, J.N.; GUY, R.C.E. (2004): *Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grain during extrusion*, «Food Additives & Contaminants», 21 (5), pp. 488-497.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Sig.ra Viviana Renzi per l'assistenza tecnico-editoriale nella stesura di questo lavoro.

Punto di vista di un'industria alimentare

INTRODUZIONE

La qualità dell'alimentazione umana è un tema che si è più volte riproposto nel corso degli ultimi decenni e che sempre più è stato posto al centro degli interessi del consumatore italiano ed europeo. La consapevolezza che una migliore qualità del cibo porta a un aumento del benessere psicofisico ha spinto il consumatore a richiedere al mondo produttivo industriale e agricolo standard sempre più elevati in termini di salubrità e di controllo delle filiere, rendendo visibile la provenienza delle materie prime utilizzate.

In questo panorama il mondo dell'industria alimentare per l'infanzia ha spesso rappresentato una nicchia di eccellenza, dovendo approntare strategie adeguate per garantire il rispetto delle normative del settore specifico, normative estremamente più restrittive rispetto alle produzioni convenzionali. Infatti il bambino, rispetto all'adulto, è esposto a un maggiore rischio tossicologico per:

- l'immatunità dei meccanismi di disintossicazione enzimatica
- la funzionalità ancora incompleta degli organi escretori
- i bassi livelli delle proteine plasmatiche capaci di legare le sostanze tossiche
- l'incompleto sviluppo delle barriere fisiologiche
- la vulnerabilità generale dei tessuti a rapida crescita, particolarmente importante a livello del sistema nervoso (le cellule a rapida moltiplicazione incorporano più in fretta le sostanze tossiche)
- la maggiore superficie corporea rispetto alla massa (cioè con maggiore *intake* di energia necessario per unità di peso)

* Oasis agronomy manager, Plasmon Dietetici Alimentari, Milano

- una sproporzione tra la razione alimentare ingerita e il peso corporeo (il bambino può mangiare razioni simili all'adulto esponendosi ovviamente a un maggiore carico di contaminanti).

Produrre alimenti per l'infanzia in grado di rispettare le corrette esigenze dello specifico target di riferimento significa compiere un attento lavoro lungo tutta la filiera affinché, fin dalle materie prime, si possano attuare le adeguate strategie di prevenzione della presenza e dello sviluppo dei contaminanti derivanti dall'ambiente naturale.

IL QUADRO NORMATIVO

I prodotti per l'infanzia, nell'ultimo decennio, sono stati oggetto di numerose modifiche normative, in particolare per quanto riguarda il contenuto in contaminanti.

Una delle principali leggi è sicuramente la direttiva 1999/50/CE (specifica per i lattici; 1999/39/CE per i prodotti per lo svezzamento), in cui l'Unione Europea ha definito il contenuto massimo di 0,01 mg/kg per i residui di singoli antiparassitari che possono essere presenti nel prodotto finito pronto al consumo. Queste leggi sono state recentemente modificate dalle direttive 2003/13/UE e 2003/14/UE (recepite in Italia dal D.M. del 14-03-2005) in cui per la prima volta è stata definita una *black list*, cioè un elenco di principi attivi o loro metaboliti che, a causa della loro tossicità (che hanno cioè una dose giornaliera ammissibile inferiore a 0,0005 mg/kg di peso corporeo), non sono utilizzabili nelle coltivazioni destinate alla produzione di alimenti per lattanti. Inoltre, per alcuni antiparassitari specifici, sono state definite soglie di tolleranza inferiori a 0,01 mg/kg. Per la prima volta, quindi, la stessa Unione Europea ha di fatto introdotto il concetto di filiera nelle produzioni *babyfood* specificando che il controllo delle aziende produttrici deve essere di fatto in grado di risalire fino al campo, per verificare che ciò che è stato vietato non solo non sia presente come residuo, ma non sia stato neanche utilizzato (tab. 1).

Altra legge fondamentale relativa ai contaminanti è sicuramente il Regolamento 466/2001 che è stato ampiamente modificato negli ultimi anni (non ultimo il Regolamento sulle Fusarium-tossine appena uscito) sia in relazione alla definizione di limiti specifici per il mondo della produzione *babyfood* sia riguardo all'introduzione di livelli massimi per le micotossine (tab. 2).

Essendo molti di questi composti classificati dallo IARC come 1,2A e 2B, è comprensibile come i valori massimi nei prodotti per l'infanzia siano decisa-

ANTIPARASSITARI	UTILIZZABILE/NON UTILIZZABILE	LIMITE MASSIMO RESIDUO (a)
Disulfoton e metaboliti	Non utilizzabile	0,03 ppm
Fensulfothion e metaboliti	Non utilizzabile	0,03 ppm
Fentin, espresso in cationi di trifenilstagno	Non utilizzabile	0,03 ppm
Alossifop e metaboliti	Non utilizzabile	0,03 ppm
Eptacloro e trans-eptacloro eposside	Non utilizzabile	0,03 ppm
Esaclorobenzene	Non utilizzabile	0,03 ppm
Nitrofen	Non utilizzabile	0,03 ppm
Ometoato	Non utilizzabile	0,03 ppm
Terbufos e metaboliti	Non utilizzabile	0,03 ppm
Aldrin e dieldrin	Non utilizzabile	0,03 ppm
Endrin	Non utilizzabile	0,03 ppm
Cadusafos	Utilizzabile	0,06 ppm
Demeton-S-metile e metaboliti	Utilizzabile	0,06 ppm
Etoprofos	Utilizzabile	0,08 ppm
Fipronil e metaboliti	Utilizzabile	0,04 ppm
Propineb/Propilentiourea	Utilizzabile	0,06 ppm
(a) Residuo applicabile al prodotto pronto al consumo o ricostituito così come da indicazioni del produttore		

Tab. 1 *Antiparassitari normati come da Direttiva Europea 2003/13 CE e 2003/14 CE*

CONTAMINANTE	VALORE	NOTE
Nitrati	200 ppm	(a) (d)
Piombo	0,02 ppm	(a) (d)
Aflatossina B1	0,1 ppb	(a) (e)
Aflatossina M1	0,025 ppb	(a) (d)
Ocratossina A	0,5 ppb	(a) (e)
Patulina	10 ppb	(a) (e)
DON	200 ppb	(b) (e)
Zearalenone	20 ppb	(b) (e)
Fumonisine (FB1+FB2)	200 ppb	(c) (e)
(a) Limiti attualmente in vigore		
(b) Limiti in vigore da 1° luglio 2006		
(c) Limiti in vigore da 1° ottobre 2007		
(d) Valore applicabile al prodotto pronto al consumo o ricostituito così come da indicazioni del produttore		
(e) Valore applicabile alla materia secca		

Tab. 2 *Valori dei principali contaminanti normati per le produzioni babyfood (Alimenti per lattanti o di proseguimento secondo la Direttiva 91/321/CE; Alimenti a base di cereali per lattanti e bambini secondo la Direttiva 96/5/CE; reg 466/2001 e successive modifiche)*

mente più bassi (da 2 a 20 volte a seconda del tipo di micotossina) rispetto ai prodotti per adulto.

L'*issue* micotossine è estremamente difficile da affrontare, in quanto i funghi che le producono sono naturalmente presenti nel sistema ambientale delle coltivazioni da pieno campo. Non basta quindi, come ad esempio viene fatto per i pesticidi, definire i trattamenti e i principi attivi da utilizzare, o eliminare le fonti di contaminazione da deriva. Nel caso delle micotossine, per poter rispettare i livelli previsti dalle normative garantendo un'adeguata continuità di fornitura del prodotto e applicare correttamente i concetti di *quality assurance*, è necessario attuare specifici piani di prevenzione in funzione del contenimento del rischio. Il punto cruciale, quindi, soprattutto per le *Fusarium*-tossine, è sicuramente effettuare un "risk assessment" agronomico e conseguentemente realizzare tutte quelle buone pratiche di coltivazione adatte per le diverse tipologie di prodotto. L'applicazione di programmi specifici per il contenimento in campo dello sviluppo di questi funghi risponde pienamente alle esigenze dei diversi attori della filiera, in particolare:

- per l'agricoltore una corretta strategia di lotta consente un aumento delle rese per ettaro e la possibilità di valorizzare la propria produzione rispetto a una semplice *commodity* indifferenziata
- per il trasformatore la conoscenza della provenienza e della qualità della materia prima consente il rispetto dei requisiti cogenti e delle richieste provenienti dai clienti
- per l'industria alimentare la certezza dell'esistenza di una filiera targettizzata al contenimento delle micotossine consente di avere la garanzia di una continuità di fornitura durante tutta la campagna agricola
- per il consumatore finale la sicurezza che tutti i passaggi durante la trasformazione sono stati adeguatamente valutati, controllati e analizzati per garantire la salubrità del prodotto finale.

Tutto questo è possibile solo realizzando una complessa integrazione tra tutti questi attori, programmando adeguatamente le produzioni già prima della semina, monitorando l'andamento della coltura in campo e intervenendo durante la coltivazione e la raccolta laddove emergano specifiche criticità.

ESPERIENZE NELLA PREVENZIONE DEL RISCHIO MICOTOSSINE: IL FRUMENTO

Il frumento (sia tenero ma soprattutto duro) può essere soggetto in campo a notevoli attacchi di diverse specie di *Fusarium* che, nelle condizioni adatte, possono portare allo sviluppo di micotossine e in particolare di

deossinivalenolo (DON), oltre che contribuire al peggioramento delle rese e delle caratteristiche merceologiche (grana stremizzata-basso peso ettolitrico).

Uno dei fattori principali che favorisce lo sviluppo dei funghi, ma che non è attualmente controllabile dall'uomo, è sicuramente il clima. Piogge frequenti e clima caldo umido, soprattutto nel periodo che va dalla fioritura al raccolto, favoriscono l'insorgenza della malattia. Risulta quindi importante selezionare gli areali meno a rischio in cui la pressione della malattia potrebbe essere inferiore. Il clima italiano, soprattutto nell'area della Pianura Padana e nelle pianure del Centro Italia, sembrerebbe essere predisponente all'attacco fungino ma in maniera minore rispetto ad alcune zone a vocazione prettamente cerealicola come il Centro-Nord della Francia e la Germania. Studi epidemiologici mostrano invece come il Sud Italia sia invece soggetto a minori attacchi.

Non potendo agire sul fattore ambientale è quindi necessario intervenire sulla tecnica agronomica in ottica di minimizzazione del rischio, e in particolare attraverso:

- a) Selezione varietale: all'interno dell'ampio panorama varietale disponibile è necessario selezionare quelle varietà che presentano una maggiore tolleranza all'attacco fungino. Dati interessanti da questo punto di vista possono emergere effettuando specifici campi prova o anche attraverso i risultati dedotti dal circuito nazionale delle prove varietali. La selezione varietale deve essere preventivamente concordata tra agricoltore, mugnaio e industria in modo da potere conciliare esigenze di resa per ettaro, qualità reologiche e sanità della coltura. Esistono, ad esempio, alcune varietà francesi selezionate in ambienti estremamente difficili dal punto di vista degli attacchi fungini ma che sono poco adatte alla realtà italiana in termini di resa e di qualità panificatoria.
- b) Precessione colturale/Lavorazioni del terreno: una grossa influenza sul contenuto finale di micotossine è data sicuramente dalla coltura che ha preceduto il frumento. In particolare, la precessione mais-frumento senza interrimento degli stocchi e lavorazioni profonde del terreno è particolarmente rischiosa, in quanto lo stocco può fungere da potenziale inoculo per infezioni successive. Analoghe considerazioni possono valere per la precessione sorgo-mais, mentre sono ancora controversi i dati relativi all'influenza del ristoppio sul contenuto in *Fusarium*-tossine.
- c) Trattamenti fitosanitari: l'utilizzo di principi attivi specifici contro il *Fusarium* può aiutare a contenere l'infezione e quindi diminuire il contenuto di micotossine. In questo caso diventa però critico il periodo di

intervento, in quanto la finestra temporale per una reale efficacia del trattamento è estremamente ridotta (2-3 giorni precedenti o successivi alla fioritura). Inoltre, i principi attivi utilizzabili devono anche garantire un basso livello di residualità conformemente alle norme per il *babyfood*.

Tutte queste informazioni, una volta raccolte attraverso i quaderni di campagna, permettono di suddividere i diversi appezzamenti in varie classi di rischio in funzione delle quali si può:

- escludere i campi più a rischio
- imporre il trattamento fungicida su spiga sugli appezzamenti potenzialmente più soggetti ad attacchi fungini
- effettuare monitoraggi e visite ispettive correttamente targettizzate con valutatori adeguatamente formati e preparati
- campionare adeguatamente le aree che vanno soggette a controllo specifico
- suddividere gli stoccaggi per ottenere partite omogenee secondo le classi di rischio.

A valle di tutte queste attività deve essere però presente un'adeguata gestione sia della raccolta sia dello stoccaggio. In particolare, bisogna evitare la raccolta di prodotto eccessivamente umido e sporco; il grano prima dell'insilaggio deve anche essere prepulito per garantire una conservazione adeguata. Il monitoraggio della massa stoccata deve essere continuo per evitare che rialzi di temperatura o attacchi di insetti possano influenzare negativamente anche il contenuto in micotossine. La ricezione allo stoccaggio è inoltre il momento più adeguato in cui effettuare il campionamento in continuo, operazione estremamente critica che, se non effettuata correttamente, rischia di sfalsare i risultati analitici e dare indicazioni erranee sulla qualità della partita.

Infine, è necessario evidenziare come anche tutte le operazioni di vagliatura del grano prima della macinazione che avvengono in mulino possano aiutare a contenere la presenza di micotossine nelle semole o nelle farine; infatti, attraverso operazioni di pulizia, selezione e decorticazione spinta, il contenuto in DON può essere ridotto all'incirca fino al 50%, ma non totalmente eliminato. È doveroso sottolineare che la macinazione, non essendo altro che un processo fisico, non distrugge le micotossine ma non fa altro che "spostarle" dalla filiera alimentare umana a quella zootecnica (nei sottoprodotti della macinazione le micotossine tendono a concentrarsi dalle 3 alle 6 volte) con tutti i problemi che ne possono conseguire in termini di salubrità animale e *carry over* sui prodotti derivati.

La gestione di una filiera targettizzata al contenimento delle micotossine ovviamente genera degli extra-costi rispetto all'acquisto di una *commodity* indifferenziata sul mercato comune. Per le produzioni per l'infanzia però il controllo diretto delle fonti di approvvigionamento è una scelta obbligatoria, in quanto eventuali non conformità di prodotto (che con la normativa attuale porterebbero a un *recall* dal mercato) causerebbero un gravissimo danno di immagine del *brand* coinvolto, soprattutto in un segmento come il *babyfood* dove il prerequisito per ogni marchio che voglia essere protagonista è la sicurezza dei prodotti e delle materie prime. Episodi di questo genere, proprio perchè così pericolosi, devono essere prevenuti attraverso l'applicazione di concetti di sistema qualità a partire dal campo; non ci si può limitare a effettuare una o più analisi proprio perchè a volte le analisi non individuano tutti i rischi connessi alla materia prima utilizzata. Questo è ancora più vero nel caso delle micotossine, dove la distribuzione della contaminazione è estremamente randomizzata e il campionamento, per essere rappresentativo, deve essere svolto con estrema accuratezza. Inoltre, il controllo a monte della filiera e la condivisione delle regole, da applicare per l'inclusione della partita o dell'agricoltore nel programma di prevenzione, permettono di spostare i controlli dal prodotto finito alla materia prima (con indubbi vantaggi dal punto di vista dell'efficacia e della economicità) garantendo così una adeguata continuità di fornitura durante tutta la stagione agricola.

I principali costi per la gestione di una filiera così costruita sono:

- garanzia di un extra-reddito all'agricoltore a fronte della corretta applicazione del programma di prevenzione del rischio micotossine legato sia agli *input* tecnici (lavorazione del terreno-trattamento fungicida) sia alla registrazione cartacea/informatica delle operazioni colturali
- creazione di un *network* di tecnici specificamente istruiti per il monitoraggio e la verifica dei fattori di rischio delle micotossine in campo
- selezione di stoccaggi adeguati e dedicati a seconda della classe di rischio della materia prima
- analisi di validazione della materia prima e suo monitoraggio durante lo stoccaggio
- analisi di monitoraggio del prodotto finito.

Gli extra-costi, oltre a riflettersi sul prezzo del prodotto finito, garantiscono però un livello qualitativo non raggiungibile da una *commodity* indifferenziata, senza contare che, se si volesse controllare ogni partita di grano convenzionale per verificarne la rispondenza agli standard *babyfood*, i costi analitici salirebbero enormemente senza comunque avere certezze definitive sulla qualità del prodotto né sulla sua completa adeguatezza.

LE AREE DI CRITICITÀ

Se dal punto di vista della tecnica agronomica i parametri per un possibile contenimento in campo delle micotossine sono sostanzialmente conosciuti, esistono però punti aperti legati a problematiche specifiche.

1. *Selezione varietale.* È necessario che la selezione genetica proceda speditamente in modo tale da poter passare dall'utilizzo di varietà tolleranti allo sviluppo di varietà geneticamente resistenti allo sviluppo dei funghi micotossinogeni (esigenza ancor più importante nel mais rispetto al frumento). Inoltre, il carattere di tolleranza deve essere incluso come criterio di giudizio e valutazione per l'iscrizione nel registro delle sementi certificate. L'utilizzo di varietà *Fusarium*-tolleranti dovrebbe essere infine incluso come parametro di valutazione per l'assegnazione degli incentivi alla qualità (previsti dalla PAC), finora esclusivamente legati all'utilizzo di semente certificata e non OGM.
2. *Mappatura "climatica".* Un'adeguata valutazione dell'andamento meteorologico, targettizzato al rischio micotossine, permetterebbe di individuare microzone climaticamente uniformi utili a orientare le scelte colturali e diffondere su tutto il territorio nazionale un sistema omogeneo di allerta per attuare le migliori strategie di trattamento in campo.
3. *Rotazioni e avvicendamenti.* Dato che il controllo della precessione è sicuramente uno strumento molto importante per il contenimento delle micotossine, è necessario che l'azienda agricola abbia la possibilità di effettuare una rotazione delle colture efficace ma anche economicamente sostenibile. Da questo punto di vista è fondamentale che la riforma della PAC includa il criterio della rotazione all'interno delle condizionalità ecologiche e che si garantisca un adeguato sbocco commerciale a tutte le produzioni coinvolte nel piano colturale.
4. *Trattamenti antifungini.* La ricerca fitofarmaceutica deve puntare ad ampliare l'efficacia dei principi attivi presenti in commercio in modo tale da garantire l'efficacia preventiva ma anche curativa dei prodotti. Inoltre, è necessario che una adeguata gamma di trattamenti antifungini sia disponibile soprattutto per le colture come il mais, dove una efficace strategia di prodotti anticrittogamici completerebbe adeguatamente il trattamento anti-pirali-de che andrebbe incentivato e diffuso in tutte le aree a vocazione maidicola.
5. *Kit analitici.* A oggi in commercio sono presenti numerosi kit analitici che permettono, con una minima strumentazione di laboratorio, di verificare

la presenza di numerose tipologie di micotossine nelle derrate cerealicole. In prospettiva però è necessario che questi strumenti diventino più veloci (per essere efficace e utilizzabile durante la campagna di raccolta, il kit dovrebbe dare risultati in massimo 15-20 minuti) e più sensibili (a oggi pochi kit raggiungono i limiti richiesti per i prodotti *babyfood*). Infine, nell'ambito dei programmi qualità regionali e nazionali, sarebbe utile prevedere finanziamenti per le strutture di stoccaggio affinché si dotino della strumentazione adeguata per l'effettuazione di questo tipo di analisi.

6. *Stoccaggi*. Lo stoccaggio è sicuramente uno dei punti critici della filiera cerealicola. Ormai non è più possibile garantire il mantenimento della qualità delle derrate alimentari effettuando stoccaggi indifferenziati e incontrollati. È necessario che le strutture moderne, che vogliono rimanere competitive sul mercato, siano in grado di suddividere i raccolti per qualità merceologico-sanitaria e monitorare la loro qualità in entrata e durante l'annata agricola, applicando tutte le attività ed effettuando registrazioni compatibili con un sistema qualità certificato.
7. *Condivisione dati*. A oggi molti attori del sistema agro-alimentare italiano (sementieri, cooperative, stoccatore, industrie, enti e università), hanno concentrato le proprie attenzioni sul problema micotossine sviluppando disciplinari, effettuando analisi, valutando l'efficacia delle diverse tecniche coltivazione e trasformazione. Sarebbe necessario però che tutto questo *corpus* di nozioni fosse coordinato adeguatamente, magari creando una banca dati comune in modo tale da condividere conoscenze, metodi e risultati.

CONCLUSIONI

La prevenzione del rischio finalizzata alla diminuzione del contenuto di micotossine nelle derrate alimentari diventerà sempre più importante in tutte le filiere e in particolare nelle produzioni specifiche per il *babyfood*.

L'effettiva applicabilità dei modelli precedentemente descritti sarà intimamente legata alla reale efficacia in campo e all'aumento di redditività che essi dovranno necessariamente portare. Solo con la collaborazione di tutti gli attori della filiera e l'adeguato sostegno delle strutture pubbliche sarà così possibile differenziare la produzione cerealicola italiana dalle *commodities* "senza qualità definita", creando un effettivo valore aggiunto per l'agricoltore e aiutando le industrie alimentari a mantenere in Italia le fonti di approvvigionamento delle materie prime, così critiche per il raggiungimento della qualità richiesta

dal consumatore moderno.

RIASSUNTO

La qualità delle materie prime è da sempre un fattore critico nelle produzioni di alimenti per l'infanzia. I requisiti normativi che tali prodotti devono rispettare sono tali e tanti da rendere sostanzialmente impensabile poter acquistare le materie prime di partenza solamente definendone le caratteristiche attraverso un capitolato. Proprio la questione micotossine rende evidente come sia necessario lavorare lungo tutta la filiera, per poter verificare che fin dal campo siano rispettate tutte quelle condizioni di sanità e salubrità necessarie per un prodotto *babyfood*, attuando e sviluppando piani di valutazione del rischio micotossigeno. L'applicazione di tali schemi non solo permette di ottenere materie prime di elevata qualità ma anche di garantire elementi di differenziazione dalle *commodities* e quindi di generare extra-reddito.

ABSTRACT

Food quality has been always a major concern in consumer perspective, due to the increased knowledge that good food bring to a healthy life. Increasing requests for safe food has taken to major changes in the supply chain, forcing main industries to control adequately agricultural crop production and transformation. This is even more true for babyfood products, specifically designed for kids whose body is more at risk for higher contaminant consumption rather than adults.

This food category has been strongly ruled in the last decade, for many contaminants like pesticides, nitrates and mycotoxins. (reg. CE 466/2001 and amendments). Due to the very low limits, the mycotoxin issue must be analysed starting from the field, using all the quality assurance concepts in order to define an appropriate risk assessment targeted to prevent moulds development. These results can be achieved only through the collaboration of all actors involved in the supply chain. An example of risk analysis is given for winter wheat, stressing the importance of controlling the cultivation starting from the sowing. Extra costs are generated for these kind of step- by-step controlled supply chains, also because specific restriction are given to the farmers for pesticides treatments, choice of varieties, crop rotations. More issues have to be still investigated in deep, like kits for quick analyses, genetic research for resistant varieties, adequate facilities for storage.

Punto di vista di un imprenditore agricolo

Il mais per la produzione di granella secca è coltivato in Italia su 1.150.000 ettari e il raccolto supera i 10 milioni di tonnellate, per un valore alla produzione di oltre un miliardo e duecento cinquanta milioni di euro. È dunque il cereale più importante della nostra agricoltura ed è, da una parte alla base di molte filiere zootecniche (latte, carne, uova), e dall'altra un importante cereale per l'industria alimentare, che assorbe circa il 10% della produzione nazionale.

Le varie riforme della politica agricola comunitaria hanno via via eroso redditività a questa coltura e le attuali prospettive indicano che tale tendenza continuerà anche nei prossimi anni, tanto che, a seguito del disaccoppiamento, una parte delle superfici potrebbero restare incolte. In questo scenario è necessario ridurre i costi di produzione e valorizzare il prodotto indirizzandosi verso le filiere a più alto valore aggiunto come alcuni utilizzi alimentari che, sfruttando le caratteristiche del nostro mais, hanno buone potenzialità di crescita nel mercato comunitario.

In questo difficile contesto economico si inserisce un regolamento comunitario (856/2005) che regola la presenza negli alimenti di alcune micotossine prodotte nei cereali da funghi appartenenti al genere *Fusarium*, dette perciò *Fusarium*-tossine. Tale regolamento stabilisce dei valori sia per i prodotti finiti che per i cereali appena raccolti, che dovrebbero entrare in vigore il 1 luglio 2006. Per il mais non trasformato, a causa del quadro non ancora chiaro, non sono stati definiti dei limiti precisi, ma vengono individuati dei valori che entreranno in vigore il 1 luglio 2007, qualora non siano stati individuati nel frattempo dei

* *Presidente Associazione Italiana Maiscoltori*

** *Imprenditore agricolo, Treviso*

limiti specifici. A destare le maggiori preoccupazioni è la soglia prevista per le fumonisine: se tale soglia dovesse essere adottata così come proposta (2 ppm per il mais non lavorato), ben oltre la metà del mais italiano sarebbe escluso dall'uso per l'alimentazione umana. Tale livello appare oltretutto non necessario per garantire la salute dei consumatori. Questo è dimostrato sia da uno studio condotto a livello europeo (*SCOOP task 3.2.10 Collection of occurrence data on Fusarium toxins in food and assesment of dietary intake by the population of EU member States*), presentato a settembre 2003, sia da uno studio condotto dall'Istituto Superiore di Sanità e presentato al primo Congresso nazionale sulle micotossine nella filiera agro-alimentare, tenutosi a Roma il 29-30 novembre 2004. Dai dati presentati in questo secondo studio si vede come la principale fonte di fumonisine per la popolazione italiana sia la farina per polenta, che presenta un valore medio di 1.660 ppb contro un valore proposto dalla DG SANCO di 1.000 ppb. Da questo studio emerge però che, anche considerando il 95° percentile dell'area geografica più a rischio, della fascia di età più a rischio, nel periodo dell'anno più a rischio, si arriva a stimare una assunzione giornaliera di 0,7 µg/kg di peso corporeo, contro una dose tollerabile di assunzione giornaliera (TDI) di 2 µg/kg di peso corporeo, individuata sia dalla OMS sia dall'europeo Scientific Committee for Food.

Evidente risulta poi la disparità di trattamento riservata alle fumonisine, tossina più frequentemente riscontrata nel mais italiano, rispetto alle altre *Fusarium* tossine tipiche del grano e del mais del centro-nord Europa, come si può anche notare dalla seguente tabella.

La DG SANCO ammette che le fumonisine non rappresentano un pericolo neppure per le categorie più a rischio dei consumatori, tuttavia ritiene

	TDI µg/Kg DI PESO CORPO- REO	TDI IN µg PER UNA PERSONA DI 75 Kg	LIMITI PER I FINAL PRODUCTS PROPOSTI NELLA REV. 5 µg/Kg	QUANTITÀ DI F.P. DA AS- SUMERE PER RAGGIUNGERE LA TDI	
DON	1,0	75	pane	500	150 grammi
			pasta	750	100 grammi
ZEA	0,2	15	pane	50	300 grammi
FUMONISINE	2,0	150	alimenti destinati al consumo diretto	400	375 grammi

Tab. 1 *Tabella comparativa per le tre principali Fusarium-tossine, delle assunzioni giornaliere tollerabili (TDI), dei limiti proposti dalla Commissione Europea e delle quantità di prodotto finito ai limiti massimi di contaminazione proposti, che il consumatore dovrebbe ingerire per raggiungere la TDI*

utile escludere dalla filiera dell'alimentazione umana alcune partite di mais con valori eccezionalmente alti. Non si può che condividere tale principio, tuttavia il valore di 2.000 ppb, anziché escludere le partite eccezionalmente alte (sono riportati valori fino a 50.000 ppb), escluderà buona parte del nostro mais la cui contaminazione media oscilla tra 5.000 e 10.000 ppb.

Il maiscoltore italiano non ha, a oggi, strumenti tecnici-agronomici che gli garantiscono con ragionevole probabilità il raggiungimento della soglia proposta, né si può prevedere che la scienza e la sperimentazione in campo riescano a individuare entro il 2007 tali strumenti. A oggi il danno provocato dalla piralide pare essere uno dei fattori più correlati con la presenza di fumonisine. Le poche sperimentazioni, condotte in Italia sul mais bt prima che venissero bloccate, confermano tale dato con un abbattimento delle fumonisine nella media del triennio 1997-1999 di circa 6 volte nel mais bt. Tuttavia il livello medio di fumonisine resta superiore di circa il 50% rispetto al limite provvisorio di 2000 ppb, nonostante che il controllo della piralide sia quasi totale nel mais bt e certamente migliore di quello raggiungibile con un'applicazione dei normali insetticidi.

Le conseguenze economiche di tale regolamento potrebbero essere davvero pesanti su un comparto già in difficoltà: oltre a perdere il mercato dell'alimentare a più alto valore aggiunto, si andrebbero a destinare all'alimentazione animale un milione di tonnellate che causerebbero pesanti ripercussioni sul prezzo dei cereali a uso foraggiero; il tutto apparentemente senza motivate necessità di protezione del consumatore.

ABSTRACT

A Farmer's point of view

Corn is the most important crop in Italy, as it is grown on 1.150.000 hectares with a production of 10 million tons, for a value of 1.300.000 Euros. Italy produces roughly as much corn as it consumes (90% feed and 10% food). Recent evolution in the Common Agricultural Policy has dramatically shrunken the profitability of this crop. It is therefore important to decrease costs and to increase the value of productions by addressing them to higher value uses, such as the food industry. In this difficult economic context, an EU regulation (856/2005) was introduced last year. The regulation introduces maximum limits for *Fusarium*-toxins in cereals and derived products for food. Limits for maize and derived products are not set, but are proposed for July-October 2007. The proposed Fumonisin threshold does not appear necessary to guarantee the consumer's health. Moreover, it is extremely difficult to achieve the 2.000 ppbs level of Fumonisin with the current technical and agronomic tools available in Italy. As a result, the majority of the Italian corn production would be not marketable and the economic impact of the proposed measure could be devastating for the Italian corn based agriculture, without assuring any reasonable benefit to the consumer.

Considerazioni conclusive

Alla luce di quanto emerso dalla Giornata di studio sulle "Micotossine ed alimentazione umana e zootecnica" realizzata dall'Accademia dei Georgofili, con la collaborazione di autorevoli studiosi e attraverso un approfondito dibattito pubblico svoltosi il 9 novembre 2005, si sono evidenziate alcune considerazioni conclusive, qui di seguito riassunte.

1) Le micotossine, pure non essendo ancora percepite come pericolo dal consumatore, sono, da tempo, uno dei più importanti fattori di rischio per l'uomo e gli animali. La contaminazione da micotossine interessa prioritariamente le produzioni vegetali, ma attraverso queste ultime può interessare anche quelle animali, in particolare la filiera latte-formaggio e la carne, specie suina.

2) Poiché i funghi tossigeni sono ubiquitari nel terreno, la contaminazione dei prodotti vegetali agrari destinati all'alimentazione umana e animale può avvenire in fase di produzione e svilupparsi ulteriormente nelle fasi di post-raccolta.

3) La capacità dei funghi tossigeni di contaminare le piante in campo e produrre le tossine in quantità variabile è fortemente influenzata dai parametri climatici ambientali che, per altro influenzano anche i vegetali nel loro comportamento di risposta all'infezione fungina; da ciò deriva che i cambiamenti del clima in atto e ancora più quelli previsti possono contribuire a far diventare la contaminazione da micotossine dei prodotti agroalimentari un problema economico ed etico di crescente rilevanza.

4) La legislazione europea già in atto impone rigorosi controlli e limiti di tolleranza per alcune micotossine nelle diverse filiere alimentari che hanno già

dato luogo a severi interventi di distruzione di derrate alimentari con conseguenti crisi, sia a livello nazionale che internazionale, di comparti produttivi. Nuovi limiti per altre micotossine sono previsti da un recente regolamento comunitario. Alcuni di questi limiti, non ancora definitivamente fissati, se introdotti così come proposti, rischiano di creare una grave crisi nel settore produttivo che non ha oggi i mezzi tecnico-scientifici per adeguarvisi.

5) La prevenzione del rischio coinvolge tutta la filiera agroalimentare e impone una stretta collaborazione tra il coltivatore e/o allevatore, il trasformatore e l'utilizzatore finale.

6) Poiché la decontaminazione dei prodotti vegetali agrari, quando possibile, comporta considerevoli aumenti dei costi di produzione, la prevenzione della contaminazione diventa uno degli aspetti fondamentali che le strategie di protezione delle colture devono prevedere.

7) Si impone quindi l'impiego di tecniche agronomiche capaci di limitare il contenuto in micotossine delle derrate alimentari, la cui applicazione comporta però dei costi, a livello di coltivazione e di stoccaggio, che il mercato dovrà, almeno in parte coprire.

8) Spetta anche alle politiche agricole favorire gli opportuni programmi di contenimento, includendo le buone pratiche di coltivazione negli elementi di valutazione per l'erogazione dei contributi legati alla condizionalità ecologica della PAC.

9) Spetta agli organi competenti e al mondo dell'informazione scientifica, evitando però ingiustificati allarmismi, fornire all'opinione pubblica una corretta informazione sulla situazione e sui controlli in atto per prevenire i rischi.

10) Occorrono anche adeguati investimenti nella ricerca scientifica, finalizzati all'acquisizione di nuove conoscenze, che devono essere trasferite agli operatori delle filiere produttive, consentendo il controllo di un problema che viene considerato ai primi posti fra i rischi emergenti nel settore alimentare.

Finito di stampare
nel mese di maggio 2006
dalla Tipografia ABC
Sesto Fiorentino - Firenze

