

Micotossine su mais: un biennio di esperienze in Friuli Venezia Giulia

Giorgio Barbiani

Servizio fitosanitario e chimico, ricerca, sperimentazione e assistenza tecnica

Sempre più evidente risulta l'impatto negativo della problematica "micotossine" sulla coltura del mais nella Pianura Padana e in particolare in Friuli Venezia Giulia. Le cause vanno ricercate nei cambiamenti climatici in atto e nell'imposizione, da parte dell'Unione Europea, di bassi valori massimi ammissibili di micotossine.

Negli ultimi 20 anni si è registrata, nella maggioranza dei casi, una costante presenza di *fumonisine*, con valori in genere non adatti all'alimentazione umana; mentre in annate con estati molto calde e siccitose, come nel 2003, 2012 e 2013, si sono rilevati grossi problemi di *afatossine* sia sulla granella che nel latte e nei prodotti caseari. Infine, l'annata 2014 si è particolarmente contraddistinta per la presenza di limiti fuori della norma per *deossinivalenolo* e *zearalenone*.

Già dagli anni Novanta ERSa effettua dei monitoraggi, negli essiccatoi della Regione, relativamente alla presenza delle principali micotossine nella granella di mais. Successivamente sono state imposte diverse prove agronomiche (epoche di semina, classi di maturità, investimento, concimazione, trattamenti, irrigazione, epoche di raccolta) allo scopo di mettere a disposizione di essiccatoi e agricoltori specifiche indicazioni atte a ridurre la presenza di queste micotossine. Negli ultimi anni, dopo aver valutato le varie tecniche agronomiche, si è passati a considerare

la suscettibilità degli ibridi commerciali, presenti nelle prove varietali, nei confronti delle principali micotossine (*fumonisine*, *afatossine*, *deossinivalenolo* e *zearalenone*).

Andamento climatico

L'annata maidicola 2014 è stata caratterizzata da temperature estive al di sotto della media degli ultimi 10 anni e da piovosità nei mesi di giugno, luglio e agosto superiore alla media, con conseguenti ottime performance produttive. Nel 2015 invece l'annata ha evidenziato un percorso abbastanza normale dal punto di vista meteorico ma con temperature al di sopra della media nei mesi di luglio e agosto.

Annata 2014

Materiali e Metodi

In quest'annata si è proceduto ad analizzare 21 ibridi di classe FAO 2-3-400, a Castions di Strada e Palazzolo dello Stella, e 54 ibridi di classe FAO 5-6-700 a Castions di Strada, Palazzolo dello Stella e S. Vito al Tagliamento. In ogni località sono state raccolte, poco prima della trebbiatura, 15 spighe di ogni ibrido per un totale di 204 campioni. Le spighe sono state successivamente essiccate ad una temperatura di 70 °C per portarle ad un'umidità inferiore al 13%; di seguito sono state sgranate e setacciate e poi macinate per le analisi di laboratorio. Si è passati quindi a sviluppare i parametri medi generali e in particolare le epoche di semina e raccolta, i tipi di granella e le classi di maturità FAO.

Le epoche di semina, delle tre località dove erano in prova gli ibridi medio tardivi, sono state effettuate nelle seguenti date: 28/3 a Castions

di Strada, 03/04 a Palazzolo dello Stella e 08/04 a S. Vito al Tagliamento. Le raccolte sono iniziate il 09/09 a Castions di Strada per poi proseguire il 26/9 a Palazzolo dello Stella e finire il giorno 08/10 a S. Vito al Tagliamento. Successivamente si è passati a valutare la resistenza alle micotossine in relazione al tipo di granella suddividendo visivamente le granelle degli ibridi in 3 gruppi: farinose, farinose-semivitre e semivitre-vitree.

Infine si sono valutate le medie delle classi di maturità FAO a partire dai 300 arrivando fino ai 700.

Risultati

Analizzando le medie dei risultati in relazione alle condizioni climatiche, dalle analisi sulle granelle degli ibridi raccolti si è evidenziata una forte presenza di *deossinivalenolo* (DON) e di *zearalenone*, con valori che hanno superato di gran lunga i limiti di legge imposti per queste micotossine. Per quanto riguarda *fumonisine* e *aflettossine* le prime sono rimaste nei limiti della norma, con granelle di buona qualità per l'alimentazione zootecnica, mentre per le seconde, salvo qualche raro caso, non si è evidenziata la loro presenza.

Valutando il comportamento dei singoli ibridi si sono notate delle differenze interessanti rispetto le micotossine presenti (DON e ZEA), anche se non supportate da risultanze statistiche a causa dell'elevato CV% (coefficiente di variabilità) dovuto soprattutto alla variabilità nei campionamenti, alle diverse località ed epoche di semina, ai vari terreni e microclimi.

Annata 2015

Materiali e Metodi

Nel 2015 erano in prova 21 ibridi precoci e 56 ibridi medio-tardivi. Gli ibridi precoci sono stati seminati nelle località non irrigue di Basiliano e Palazzolo dello Stella, mentre nelle località di Pradamano, Palazzolo dello Stella e S. Vito al Tagliamento si sono confrontati gli ibridi medio-tardivi, in regime irriguo.

Per le analisi sono stati raccolti un totale di 266 campioni di granella:

- una ripetizione per località degli ibridi precoci (42)
- due ripetizioni per località per le classi me-

dio-tardive (224) nelle località di Pradamano e S. Vito al Tagliamento.

Il campionamento e la preparazione dei campioni da analizzare sono stati eseguiti con le stesse modalità dell'anno precedente.

Risultati

Il 2015 finalmente è stata un'annata "normale", con analisi che hanno evidenziato la sola presenza fuori dai limiti di legge per l'alimentazione umana delle *fumonisine*, mentre per le altre micotossine si sono avuti, nella gran parte dei casi, dati entro i limiti regolamentari.

Anche nel 2015, nonostante si siano ridotte le località analizzate e aumentate le ripetizioni, i dati statistici non hanno confermato i comportamenti evidenziati dai singoli ibridi a causa degli elevati coefficienti di variabilità.

Considerazioni finali

2014

Epoca di semina

Nel 2014 si è avuta la conferma dell'importanza dei momenti di semina e raccolta, dove si sono anticipate entrambe le operazioni si sono riscontrati più bassi livelli di DON e ZEA (Castions di Strada), come si evidenzia dal Grafico 1.

Tipo di granella

La presenza delle due micotossine è apparsa chiaramente legata al tipo di granella, infatti i tipi semivitrei o vitrei presentano livelli di contaminazione minori rispetto ai tipi farinosi (Graf. 2 e 3), in tutte le classi di maturità testate.

Classi di maturità

Si evidenzia un aumento progressivo della contaminazione, dalle classi precoci alle più tardive (classe FAO 700), come si osserva nel Grafico 4. Chiaramente gli ibridi più interessanti per le zone non irrigue sono i precoci, che avendo un ciclo colturale più corto riescono, in generale, ad avere livelli di contaminazione molto bassi. Nelle altre classi di maturità, seminate soprattutto nelle zone irrigue, si distinguono per bassi dati di presenza di DON e ZEA gli ibridi 500 e 600. Nel 2014 la classe più tardiva (700), a causa delle condizioni climatiche particolarmente piovose, è risultata quella con i livelli più alti di contaminazione. Questo fatto ne sconsiglia il

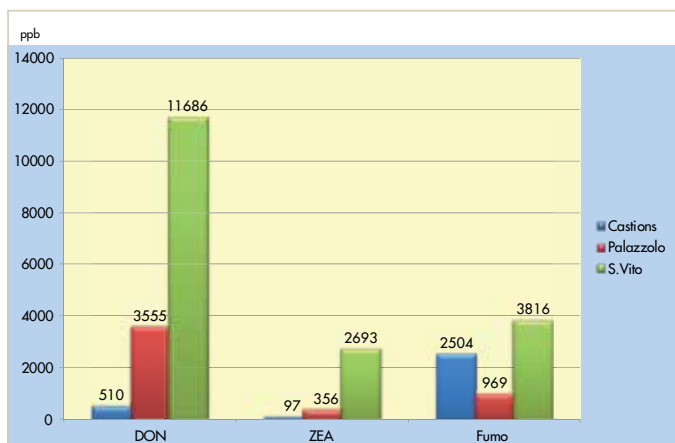


Grafico 1: Interazione località – micotossine (2014).

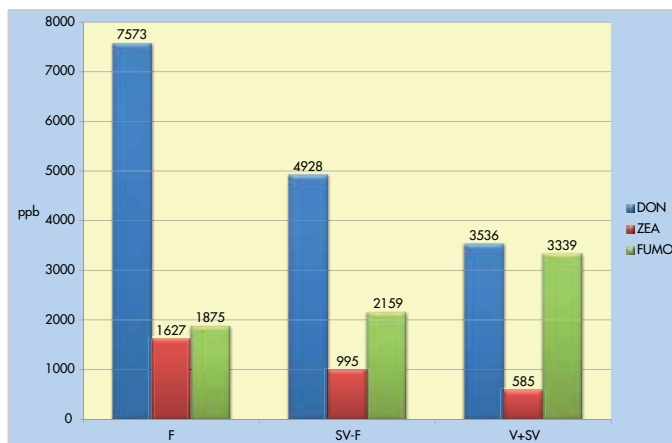


Grafico 2: Interazione micotossine – tipo di granella medio/tardivi (2014).

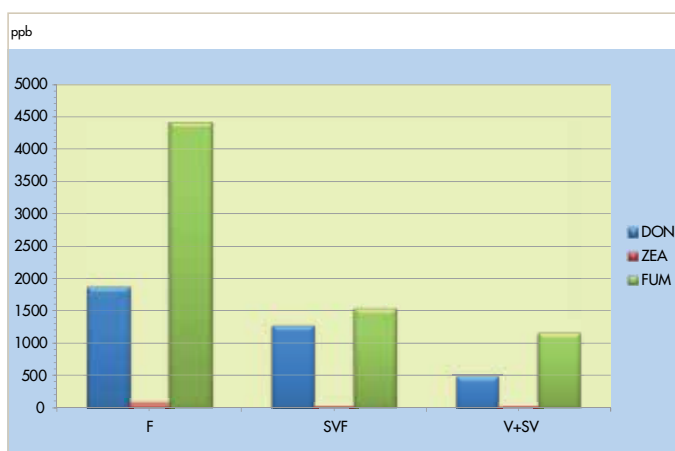


Grafico 3: Interazione micotossine – tipo di granella precoci (2014).

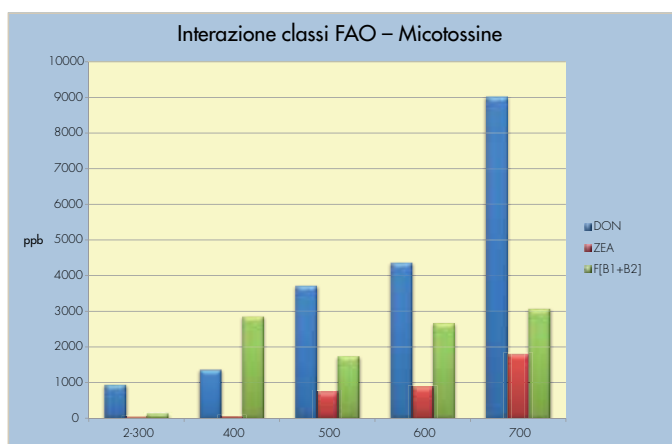


Grafico 4: Interazione classi FAO – micotossine.

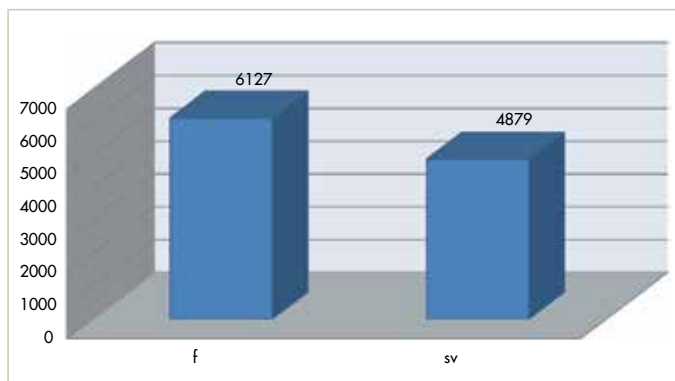


Grafico 5: Analisi *fumonisine* biennio 2014-15.

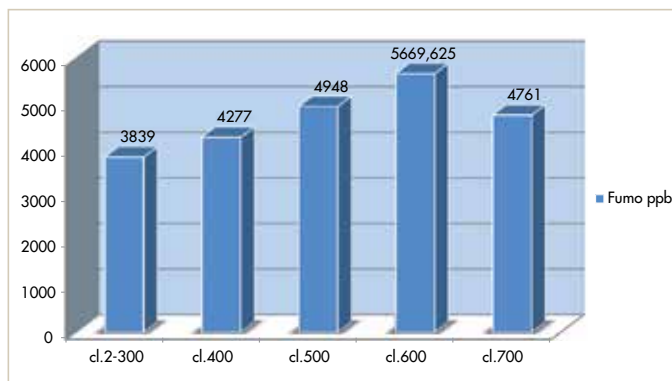


Grafico 6: Classi di maturità biennio 2014-15.

suo uso per la produzione di granella indirizzata eventualmente solo per la produzione di trinciato integrale.

Infine da sottolineare il comportamento, rispetto alle variabili analizzate, delle *fumonisine* che hanno seguito in modo meno chiaro i risultati analitici delle altre micotossine.

2015

Come si è detto nel 2015 si sono registrate condizioni meteo pressoché opposte rispetto

all'anno precedente; ciò ha favorito la presenza di *fumonisine* mentre le altre micotossine sono risultate pressoché assenti.

Classi di maturità

In riferimento alle classi di maturità si è avuto una conferma dei buoni dati del 2014 sui materiali precoci in ambiente non irriguo, mentre per i materiali medio tardivi si evidenzia una sostanziale eguaglianza dei comportamenti degli ibridi delle classi FAO 5-6-700.

Tipo di granella

Altra conferma è venuta dai tipi di granella, con dati più bassi di contaminazione sui tipi semivitrei-vitrei rispetto ai tipi farinosi (Graf. 5).

Epoche di semina

Non si sono avute differenze sostanziali tra le due località in riferimento al contenuto delle *fumonisine*, confermando una certa variabilità in funzione delle situazioni climatiche e dei vari fattori agronomici.

Biennio 2014-15

Le *fumonisine* sono state le uniche micotossine rilevate costantemente nel biennio 2014/15.

I dati del biennio sembrano indicare diversi comportamenti tra gli ibridi (Tab. 1) con differenze ridotte per quanto riguarda il valore medio in *fumonisina* al cambiare del tipo di granella, anche se i valori potenzialmente più interessanti si hanno i tra tipi semivitrei-vitrei (Graf. 5). Questi dati tuttavia hanno carattere solo indicativo in quanto non confermati dall'analisi statistica.

Nelle classi di maturità i dati degli ibridi medio tardivi sono simili fra di loro, mentre risultano migliori gli ibridi precoci in ambiente asciutto. Le conclusioni sui comportamenti degli ibridi (tipo di granella e classi FAO) del biennio indicano ancora il diverso andamento delle *fumonisine* rispetto a DON e ZEA. Da questi dati si partirà nel 2016 per ulteriori valutazioni sugli ibridi in prova.

| Ibrido | Classe | Tipo gr. | Fumo ppb |
|------------|--------|----------|----------|
| Ronaldinio | 200 | v | 840 |
| PR39F58 | 200 | v | 3694 |
| DKC4316 | 300 | sv | 2598 |
| Timic | 300 | sv- | 5418 |
| PR37N01 | 300 | sv | 6648 |

| Ibrido | Classe | Tipo gr. | Fumo ppb |
|-----------|--------|----------|----------|
| P0222 | 400 | sv | 1868 |
| DKC5401 | 400 | sv | 2369 |
| P0837 | 400 | sv | 2610 |
| DKC5530 | 400 | sv | 3087 |
| Aaphoteoz | 400 | f | 4529 |
| DKC5276 | 400 | f | 11198 |

| Ibrido | Classe | Tipo gr. | Fumo ppb |
|----------|--------|----------|----------|
| P1114 | 500 | sv | 1540 |
| DKC5830 | 500 | sv+ | 2089 |
| Kariokas | 500 | f | 4377 |
| DKC6340 | 500 | sv | 5613 |
| LG30.597 | 500 | sv | 5848 |
| Sismico | 500 | sv | 7147 |
| Kontigas | 500 | sv- | 8023 |

| Ibrido | Classe | Tipo gr. | Fumo ppb |
|----------|--------|----------|----------|
| PR32B10 | 600 | sv | 2505 |
| Antiss | 600 | sv | 2884 |
| P1517w | 600 | sv | 3454 |
| MAS75.A | 600 | sv | 4642 |
| P1547 | 600 | sv+ | 5026 |
| Hydro | 600 | sv- | 5415 |
| LG30.600 | 600 | sv- | 5917 |
| Alesis | 600 | f | 6188 |
| DKC6815 | 600 | sv- | 6781 |
| DKC6630 | 600 | sv | 7495 |
| DKC6728 | 600 | sv- | 7865 |
| Radioso | 600 | sv | 9867 |

| Ibrido | Classe | Tipo gr. | Fumo ppb |
|----------|--------|----------|----------|
| PR31N27 | 700 | sv+ | 1983 |
| Amman | 700 | sv | 2132 |
| MAS78.T | 700 | sv | 2696 |
| LG30.692 | 700 | sv | 3278 |
| KWS2572 | 700 | f | 4503 |
| P1921 | 700 | sv+ | 5577 |
| Reserve | 700 | sv- | 6081 |
| DKC6795 | 700 | sv+ | 6926 |
| P1758 | 700 | sv+ | 9675 |

Tabella 1: Analisi *fumonisine* ibridi in prova, biennio 2014/2015.

L'importanza del campionamento nelle analisi delle micotossine

Mauro De Paoli, Piera De Pauli, Lidia Vicentini

Una delle maggiori fonti di errore nell'analisi delle micotossine è legata al campionamento ovvero a tutte quelle procedure atte a garantire la rappresentatività del campione globale nell'aliquota destinata all'analisi.

La criticità di questa operazione di campionamento va ricercata nel tipo di contaminazione prodotta dalle micotossine. A differenza di altre contaminazioni di tipo *diffuso* come ad esempio i residui di prodotti fitosanitari, le micotossine presentano un tipo di contaminazione *puntiforme*. Le micotossine infatti, essendo il risultato di una infezione fungina, tendono a prodursi in aree irregolarmente distribuite o anche in singoli semi.

Ecco quindi la necessità di adottare piani di campionamento che obbligano ad osservare, dal prelievo del campione all'analisi finale, una serie di procedure tese a garantire la rappresentatività dell'intero lotto o partita.

Le modalità di campionamento condizionano in modo determinante l'incertezza delle successive procedure di controllo analitico, pertanto l'applicazione delle buone pratiche risulta uno strumento indispensabile affinché non sussistano contestabili vizi procedurali.

La materia relativa al campionamento e alle analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali è dettagliata nel Regolamento (CE) n. 152/2009, recentemente modificato dai Regolamenti (UE) n. 691/2013 e n. 51/2013.

Un campione prelevato senza rispettare le procedure di campionamento previste dalle norme o da codici di buone pratiche deve essere considerato NON idoneo all'analisi al fine del controllo ufficiale, non possedendo i requisiti minimi di qualità.

I requisiti fondamentali di un buon campionamento sono la rappresentatività e la praticabilità, attuabili attraverso diverse tipologie di campionamento: casuale, sistematico, a grappolo, stratificato, di carattere probabilistico e non probabilistico.

Con il presupposto che ogni campione elementare debba avere la stessa probabilità di essere scelto, per le micotossine

la tipologia di campionamento più idonea è quella di tipo casuale. In funzione poi della natura del materiale e delle modalità di stoccaggio si possono effettuare campionamenti statici o dinamici (Norma ISO 24333:2009).

Il campionamento statico prevede prelievi, con l'ausilio di opportune sonde, in punti diversi di una massa stoccata in sacchi o container, costituente il lotto/partita.

Il campionamento dinamico, invece, prevede prelievi a tempi diversi di una massa in movimento (prelievo manuale o con campionatori automatici dei campioni elementari dalla massa che scorre su nastri trasportatori).

Per le micotossine il campionamento dinamico è senz'altro quello che offre le maggiori garanzie di praticabilità, assicurando che le operazioni di campionamento siano sempre condotte in condizioni idonee per la sicurezza degli operatori ed evitando contaminazioni esterne del campione.

La formazione del campione finale da destinare all'analisi si ottiene necessariamente ricorrendo alla macinazione del campione globale raccolto e campionato, come precedentemente descritto. La fase di macinazione permette di ottenere una migliore attendibilità dei risultati di laboratorio in quanto consente di fornire una migliore precisione, ripetibilità ed esattezza delle analisi.

Il campione da sottoporre ad analisi, se in granella viene quindi prima macinato a secco (2 mm) in un mulino e successivamente, per ridurre la varianza associata alla scarsa omogeneità delle parti granulari dell'aliquota, si ricorre alla formazione di uno "*slurried sample*". Lo *slurry* si ottiene utilizzando un omogeneizzatore industriale, miscelando il campione macinato da sottoporre ad analisi con una pari quantità di acqua fino ad ottenimento di una pasta densa ed omogenea.

Lo *slurry* garantisce un elevato grado di omogeneità e una consistente diminuzione della variabilità nella fase di preparazione del campione (1,2). Una aliquota (10 g) del campione così prodotto viene successivamente destinata all'analisi chimica di laboratorio con tecniche LC-HRMS.

BIBLIOGRAFIA

- Spanjer, M. C., J. M. Scholten, S. Kastrup, U. Jorissen, T. F. Schatzki and N. Toyofuku. "Sample Comminution for Mycotoxin Analysis: Dry Milling or Slurry Mixing?" *Food Additives & Contaminants* 23, no. 1 (2006): 73-83.
- Lippolis, V., M. Pascale, S. Valenzano and A. Visconti. "Comparison of Slurry Mixing and Dry Milling in Laboratory Sample Preparation for Determination of Ochratoxin a and Deoxynivalenol in Wheat." *J AOAC Int* 95, no. 2 (2012): 452-8.