



# RAPPORTI ISTISAN 16|28

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**V Congresso nazionale**

## **Le micotossine nella filiera agro-alimentare**

Istituto Superiore di Sanità  
Roma, 28-30 settembre 2015

**ATTI**

A cura di C. Brera, B. De Santis, F. Debegnach,  
E. Gregori e M.C. Barea Toscan



EPIDEMIOLOGIA  
E SANITÀ PUBBLICA

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**V Congresso nazionale  
Le micotossine nella filiera agro-alimentare**

**Istituto Superiore di Sanità  
Roma, 28-30 settembre 2015**

**ATTI**

A cura di  
Carlo Brera, Barbara De Santis, Francesca Debegnach,  
Emanuela Gregori e Maria Cristina Barea Toscan  
*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN  
16/28**

Istituto Superiore di Sanità

**V Congresso Nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 28-30 settembre 2015. Atti.**

A cura di Carlo Brera, Barbara De Santis, Francesca Debegnach, Emanuela Gregori e Maria Cristina Barea Toscan  
2016, vi, 137 p. Rapporti ISTISAN 16/28

Il Congresso è giunto alla sua quinta edizione e ciò è stato possibile grazie al forte interesse mostrato dai partecipanti nelle precedenti edizioni. In questa edizione sono stati toccati argomenti per i quali necessita ancora un forte intervento in quanto rappresentano un reale rischio per la salute pubblica ed animale. Ad esempio, il primo di questi argomenti risiede nella reale impossibilità di correlare in modo univoco, specie nei Paesi industrializzati, il ruolo eziologico delle micotossine con alcune patologie ricorrenti nell'uomo e negli animali. Inoltre, data la forte associazione tra micotossine e condizioni climatiche è stato dato ampio spazio alla presentazione delle più promettenti e moderne soluzioni legate alle attività preventive e di controllo che sono state nel tempo acquisite e poi affinate dai vari comparti agro-alimentari per minimizzare il fenomeno. Infine, come tradizione, l'ultima giornata è stata dedicata alla diagnostica a cui, in ultima analisi, sono demandate le verifiche dell'efficacia delle azioni di autocontrollo e controllo ufficiale. Il Congresso, la cui prima edizione risale al 2004, è stato sempre organizzato presso l'Istituto Superiore di Sanità con frequenza media biennale. Tale evento scientifico costituisce un momento di incontro sia dei principali gruppi di ricerca che operano in ambito nazionale sia de, infine, della più qualificata rappresentanza degli organi deputati al controllo ufficiale dei prodotti alimentari e degli alimenti zootecnici.

*Parole chiave:* Micotossine; Analisi del rischio; Valutazione della esposizione; Analisi; Campionamento

Istituto Superiore di Sanità

**5<sup>th</sup> National Congress. Mycotoxins in agri-food chain. Istituto Superiore di Sanità. Rome, September 28-30 2015. Proceedings.**

Edited by Carlo Brera, Barbara De Santis, Francesca Debegnach, Emanuela Gregori and Maria Cristina Barea Toscan  
2015, vi, 137 p. Rapporti ISTISAN 15/28 (in Italian)

The 5<sup>th</sup> edition of the National Congress on Mycotoxins in Food Chain dealt with the most relevant issues related to the burden that these toxic compounds represent for animal and human health. The first issue regarded the still not fully understood relationship between human and animal pathologies and mycotoxins intake with diet. The second issue entailed all the preventive and corrective activities undertaken by food/feed business operator and Competent Authority within self-control and official control systems, respectively. The third issue will give the opportunity to the speakers to present an updated information on the new diagnostic scenarios and on the possible developments of new diagnostic platforms aimed at giving an answer to the main demand raised by the industry, i.e. fast and reliable analytical response for guaranteeing food/feed safety as much as possible. Since 2004 the National Congress has been held at the Istituto Superiore di Sanità (the National Institute of Health in Italy) with a two-year frequency on average. This scientific event is an opportunity of debate for researchers and stakeholders on the impact of mycotoxins on economics, agriculture, industry, safety and legislation.

*Keywords:* Mycotoxins; Risk analysis; Exposure assessment; Analysis; Sampling

Per informazioni su questo documento scrivere a: [carlo.brera@iss.it](mailto:carlo.brera@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Brera C, De Santis B, Debegnach F, Gregori E, Barea Toscan MC (Ed.). *V Congresso Nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 28-30 settembre 2015. Atti.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2016. (Rapporti ISTISAN 16/28).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro e Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



<b>Fusarium spp. nel grano: SPME-GC-MS della componente volatile per l'individuazione di indicatori d'infezione</b>	
<i>Francesca Lupi, Carmen Palermo, Maurizio Quinto, Donatella Nardiello, Annalisa Mentana, Antonio Moretti, Salvatore Frisullo, Diego Centonze</i> .....	100
<b>Effetto del trattamento con ozono sulla contaminazione da funghi e micotossine in cariossidi di frumento</b>	
<i>Michelangelo Pascale, Giuseppe Panzarini, Salvatore Cervellieri, Cristina Prisciantelli, Vincenzo Lippolis, Vanda Ventura, Filomena Epifani, Giancarlo Perrone</i> .....	105
<b>Proposte di linee guida per il controllo delle micotossine nei cereali</b>	
<i>Amedeo Reyneri, Giampaolo Bruno, Carlotta Balconi, Maria Grazia D'Egidio, Sabrina Locatelli</i> .....	109
<b>Uso di farine contaminate a fini energetici (biogas): risultati di test in continuo in impianto pilota</b>	
<i>Lorella Rossi, Mariangela Soldano, Sergio Piccinini, Amedeo Pietri</i> .....	113
<b>Biodegradazione di ocratossina A da parte di <i>Trichoderma reesei</i></b>	
<i>Priscila Tessmer Scaglioni, Larine Kupski, Eliana Badiale Furlong</i> .....	117
<b>Inibizione della produzione di tricoteceni usando composti fenolici di <i>Spirulina sp</i></b>	
<i>Priscila Tessmer Scaglioni, Fernanda Arnhold Pagnussatt, Eliana Badiale-Furlong</i> .....	120
<b>Effetto dell'agrotecnica sulle micotossine nuove ed emergenti nel frumento</b>	
<i>Valentina Scarpino, Massimo Blandino, Federico Marinaccio, Amedeo Reyneri, Michael Sulyok</i> .....	124
<b>Micotossine nuove ed emergenti nel mais: diffusione e influenza dell'agrotecnica</b>	
<i>Valentina Scarpino, Massimo Blandino, Amedeo Reyneri, Giulio Testa, Michael Sulyok</i> .....	128
<b>Valutazione della contaminazione da aflatoossina B<sub>1</sub> in mangimi della Puglia e Basilicata dal 2010 al 2014</b>	
<i>Valeria Vita, Maria Teresa Clausi, Cinzia Franchino, Rita De Pace</i> .....	132

## MICOTOSSINE NUOVE ED EMERGENTI NEL MAIS: DIFFUSIONE E INFLUENZA DELL'AGROTECNICA

Valentina Scarpino (a), Massimo Blandino (a), Amedeo Reyneri (a), Giulio Testa (a), Michael Sulyok (b)  
(a) Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Grugliasco, Italia  
(b) Center for Analytical Chemistry, Department for Agrobiotechnology (IFA-Tulln), Tulln, Austria

### Introduzione

Recentemente è stata rivolta una crescente attenzione alle micotossine cosiddette nuove ed emergenti; queste sono metaboliti secondari, non ancora normati a livello internazionale, ma su cui è in corso un intenso esame per valutarne la diffusione e le implicazioni sanitarie.

Oggi, non sono ancora note informazioni circa il ruolo dell'ambiente e delle pratiche colturali sui tali micotossine.

La piralide del mais (*Ostrinia nubilalis*), svolge un ruolo molto importante nel promuovere le infezioni da *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum* (1). Tra le pratiche colturali comunemente adottate per ridurre la contaminazione dalle principali micotossine su mais, il controllo della piralide è una delle più importanti nel contenere le infezioni da *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum* (sezione *Liseola*), e la conseguente contaminazione da fumonisine (FUM) della granella di mais.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di fornire nuove informazioni in grado di migliorare la conoscenza di tali micotossine valutandone la diffusione ed esaminando il ruolo dell'ambiente e dell'agrotecnica sulla loro contaminazione negli areali maidicoli del Nord-Italia.

### Materiali e metodi

A tale scopo sono state condotte due sperimentazioni nel corso del quinquennio 2008-2012 in cui sono state confrontate l'infestazione naturale della piralide rispetto alla protezione dall'infestazione, ottenuta rispettivamente con una rete entomologica o con l'applicazione di un insetticida piretroide sulle micotossine emergenti. Inoltre, nel corso del triennio 2011-2013 è stato valutato l'effetto della densità colturale su tali micotossine ponendo a confronto 2 investimenti. Infine, nel biennio 2012-2013 è stato esaminato l'effetto della concimazione azotata confrontando livelli di azoto crescenti: 0, 100, 200, 300 e 400 kg di azoto/ha.

### Estrazione e *clean-up*

Durante la fase estrattiva 5 g di sfarinato di mais sono stati estratti con 20 mL di CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH 79:20:1 (v/v/v) e posti in agitazione in un agitatore orbitale per 90 min. Il surnatante è stato successivamente diluito 1:1 con una soluzione di CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH 20:79:1 (v/v/v) e sottoposto ad analisi UPLC-MS/MS (*Ultra Performance Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometer*) multi-micotossina.

## Analisi UPLC-MS/MS Multi-micotossina

I campioni estratti sono stati analizzati con un metodo multitossina mediante l'impiego di un sistema LC-MS/MS (*Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrography*) ibrido Qtrap 5500 equipaggiato con una sorgente di ionizzazione *Electrospray ionization* (ESI) e un sistema UPLC, in grado di quantificare simultaneamente 295 diversi metaboliti batterici e fungini, tra cui le micotossine emergenti (2).

## Risultati e discussione

Il controllo dell'infestazione da piralide condotto nella prima sperimentazione nel corso del triennio 2008-2010 ha ridotto significativamente gli attacchi di piralide nonché la conseguente presenza di ammuffimenti sulle spighe, sia come numero di spighe colpite sia come estensione.

In seguito all'analisi con il metodo UPLC-MS/MS multi-micotossina, 13 delle micotossine più abbondanti sono state rilevate, tra cui: fumonisine (FUMs), moniliformina (MON), fusaproliferina (FUS), bikaverina (BIK), acido fusarico (FA), beauvericina (BEA), equisetina (EQU), aurofusarina (AUR), deossinivalenolo (DON), deossinivalenolo-3-glucoside (DON-3-G), zearalenone (ZEA), culmorina (CULM) e butenolide (BUT). I risultati ottenuti dalla prima sperimentazione hanno mostrato che in tutti gli anni presi in considerazione, l'attività trofica della piralide ha favorito significativamente la contaminazione da micotossine prodotte da *Fusarium* spp. della sezione *Liseola* ma non da quelle prodotte da *Fusarium* spp. della sezione *Discolor* e *Roseum* (Figura 1) (3).

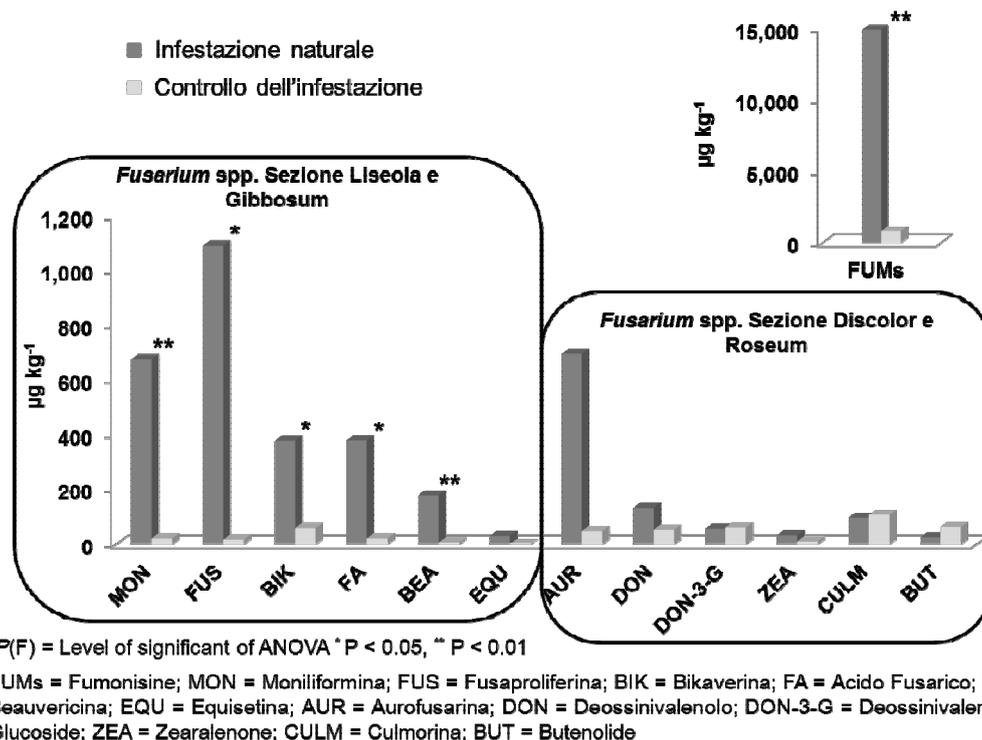


Figura 1. Effetto del controllo dell'infestazione da piralide sulla contaminazione da micotossine emergenti nel triennio 2008-2010

A conferma di tali risultati la seconda sperimentazione, condotta nel quadriennio 2009-2012, ha dimostrato l'efficacia dell'applicazione insetticida nel ridurre significativamente la contaminazione da micotossine prodotte da *Fusarium* spp. della sezione *Liseola* (Tabella 1). Al contrario l'infezione da specie *Fusarium* della sezione *Discolor*, ha registrato un aumento in seguito all'applicazione insetticida (Tabella 1) in particolar modo nelle campagne agrarie che predispongono ad una maggiore infezione di queste specie fungine, a causa della "flora inversion" (4) dovuta alle alterate condizioni di crescita.

**Tabella 1. Effetto dei trattamenti di difesa contro la piralide sulla contaminazione da micotossine emergenti su mais nel periodo 2009-2012 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )**

Sezione	Micotossina	Controllo non trattato	Applicazione insetticida
Sezione <i>Liseola</i> e <i>Gibbosum</i>	Fumonisine (FUMs)	6054	742
	Moniliformina (MON)	297	160
	Bikaverina (BIK)	721	161
	Beauvericina (BEA)	142	33
	Acido Fusarico (FA)	722	212
	Fusaproliferina (FUS)	578	300
	Fusarina C	295	38
	Equisetina (EQU)	20	14
Sezione <i>Discolor</i> e <i>Roseum</i>	Aurofusarina (AUR)	679	1800
	Deossinivalenolo (DON)	863	1544
	Deossinivalenolo-3-glucoside (DON-3-G)	440	536
	3-Acetil-Deossinivalenolo (3-ADON)	28	51
	15-Acetil-Deossinivalenolo (15-ADON)	91	162
	Butenolide (BUT)	139	203
	Culmorina (CULM)	835	1014
	Zearalenone (ZEA)	65	214
	Zearalenone-4-solfato (ZEA-4-S)	11	50

Densità di semina elevate, sempre più frequentemente adottate nei sistemi colturali, non hanno presentato per nessuna delle micotossine rilevate un significativo aumento delle concentrazioni sebbene il processo ultimo di maturazione sia stato rallentato.

Per quanto riguarda invece l'ultima sperimentazione condotta nel biennio 2012-2013 per valutare l'effetto della concimazione azotata sulla contaminazione da micotossine emergenti, un apporto di azoto di 200 kg/ha è risultato essere la miglior soluzione per la sicurezza sanitaria delle produzioni. Mediamente, nelle annate con condizioni meteorologiche predisponenti alla contaminazione da micotossine prodotte da *Fusarium* spp. della sezione *Liseola* le concentrazioni più elevate si sono evidenziate con carenze nutrizionali; invece, per quelle prodotte da *Fusarium* spp. delle sezioni *Discolor* e *Roseum* si è verificato un aumento ad elevati apporti di azoto (Figura 2).

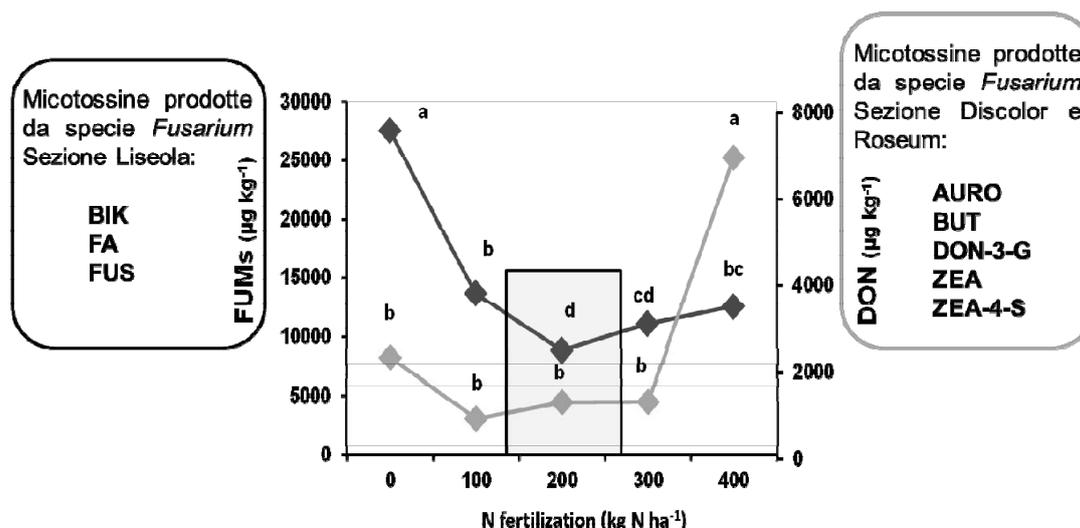


Figura 2. Effetto della concimazione azotata sulla contaminazione da micotossine emergenti su mais nel biennio 2012-2013

## Conclusioni

I risultati hanno mostrato che le comuni pratiche colturali adottate nelle zone temperate per controllare e ridurre il contenuto di FUMs sono risultate essere anche le più efficaci per il contenimento delle principali micotossine emergenti prodotte da *Fusarium* spp. della Sezione *Liseola*. Le condizioni metereologiche, purtroppo, data la complessità della popolazione fungina giocano un ruolo importante nel favorire specie fungine differenti a seconda dell'adattamento ecologiche delle diverse sezioni di appartenenza. Infatti, ad esempio, negli areali freschi e pedemontani è necessario prestare attenzione al rischio di accumulo del DON e di altre tossine prodotte da *Fusarium* della sezione *Discolor* e *Roseum*, che si è dimostrato essere ancora più favorito in seguito all'applicazione insetticida. In queste condizioni risulta pertanto importante prevedere altri interventi agronomici in grado di minimizzare la presenza di queste tossine quali l'impiego di semine tempestive, ibridi a ciclo medio-precoce ed evitare eccessivi apporti azotati con le concimazioni.

## Bibliografia

1. Sobek EA, Munkvold GP. European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. *J Econ Entomol* 1999;92:503-9.
2. Malachova A, Sulyok M, Beltran E, Berthiller F, Krska R. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography - tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all relevant mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A* 2014;1362:145-56.
3. Blandino M, Scarpino V, Vanara F, Sulyok M, Krska R, Reyneri A. The Role of the European Corn Borer (*Ostrinia Nubilalis*) on contamination of maize with thirteen *Fusarium* mycotoxins. *Food Addit Contam A* 2015;32(4):533-43.
4. Folcher L, Delos M, Marengue E, Jarry M, Weissenberger A, Eychenne N, Regnault-Roger C. Lower mycotoxin levels in Bt maize grain. *Agron Sustain Dev* 2010;30:711-9.