



# 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

## EFFETTO DELL'AGROTECNICA SULLE MICOTOSSINE NUOVE ED EMERGENTI NEL FRUMENTO

Valentina Scarpino (a), Massimo Blandino (a), Federico Marinaccio (a), Amedeo Reyneri (a), Michael Sulyok (b)

(a) Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Grugliasco, Italia

(b) Centre for Analytical Chemistry, Department for Agrobiotechnology (IFA-Tulln), Tulln, Austria

### Introduzione

La *Fusarium head blight* (FHB) è una delle principali malattie che colpiscono il frumento causando la contaminazione delle *Fusarium*-tossine, come il deossivalenolo (DON).

Sebbene oggi solo poche tossine, tra cui il DON, siano soggette a limiti legislativi e a regolare monitoraggio nell'ambito delle filiere produttive, queste rappresentano solo una parte delle circa 400 micotossine conosciute e identificate finora. Per questa ragione, le micotossine che non hanno ancora ricevuto una dettagliata attenzione scientifica sono comunemente indicate come "nuove" o "emergenti" (1).

Oggi, sono carenti informazioni sul ruolo della FHB nei riguardi di tali contaminanti, verso i quali è crescente l'attenzione dell'European Food Safety Agency (EFSA) in relazione al loro impatto sulla salute umana e animale.

L'obiettivo di questo studio è quello di valutare l'effetto dell'agrotecnica e in particolare dell'applicazione fungicida all'antesi per il controllo della FHB, delle lavorazioni del terreno e della suscettibilità varietale sulla contaminazione da micotossine emergenti nel frumento (Figura 1).

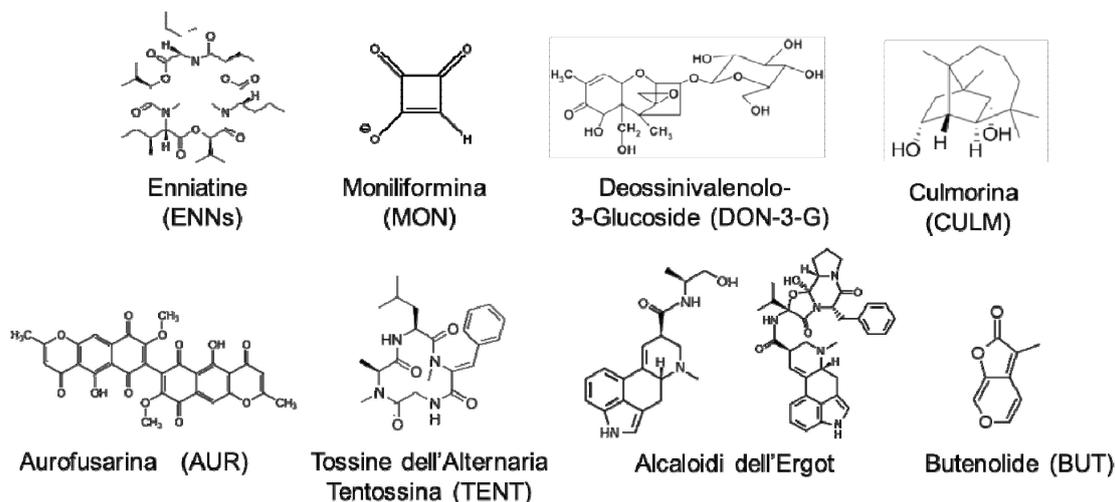


Figura 1. Micotossine emergenti nel frumento piemontese

## Materiali e metodi

A questo scopo 4 esperimenti (A, B, C e D) sono stati effettuati in 3 siti del Piemonte nel biennio 2010-2012. In tutti gli esperimenti, l'applicazione di diversi fungicidi azolici, è stata confrontata con un controllo non trattato. L'effetto della suscettibilità varietale è stato condotto ponendo a confronto 2 varietà a diversa suscettibilità (frumento tenero cv. Generale e frumento duro cv. Saragolla) nel triennio 2011-2013. Infine, è stata esaminata nel corso del biennio 2012-2013 l'influenza della lavorazione del terreno, confrontando la semina su sodo con pratiche di minima lavorazione e di semina su terreno arato.

### Estrazione e *clean-up*

Durante la fase estrattiva 5 g di sfarinato di frumento 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 Spectrography*) 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 ESI (*Electrospray ionization*) e un Sistema UPLC, in grado di quantificare simultaneamente 295 diversi metaboliti batterici e fungini, tra cui le micotossine emergenti (2).

## Risultati e discussione

In seguito all'applicazione del metodo UPLC-MS/MS multi-micotossina sono state rilevate circa 15 micotossine, tra cui: enniatine (ENN), aurofusarina (AUR), moniliformina (MON), tentossina (TENT), deossinivalenolo (DON), deossinivalenolo-3-glucoside (DON-3-G), culmorina (CULM), zearalenone (ZEA) e nivalenolo (NIV).

L'incidenza e la gravità della malattia, nonché la contaminazione da tali micotossine sono state significativamente ridotte in seguito all'applicazione fungicida in ogni esperimento (Figura 2) (3). Il trattamento fungicida ha ridotto significativamente il contenuto di DON, DON-3-G, CULM, ENNs, AUR, MON, TENT e EQU del 72%, 67%, 70%, 64%, 66%, 50%, 51% e 92%, rispettivamente, rispetto al controllo non trattato.

In tutti gli anni di sperimentazione, prendendo in considerazione tutte le micotossine rilevate, la varietà di frumento duro è risultata significativamente più contaminata (Figura 3). In media per ENN, MON, AUR, DON, DON-3-G, CULM, ZEA, NIV, EQU e BUT la varietà di frumento duro è risultata più contaminata del 75%, 79%, 97%, 66%, 74%, 67%, 94%, 86%, 83% e 93%, rispettivamente, rispetto alla varietà di frumento tenero.

Per tutte le tossine rilevate, l'aratura è risultata la miglior lavorazione per la sicurezza sanitaria a causa dell'interramento dei residui e della riduzione dell'inoculo (Tabella 1).

Nella campagna cerealicola del 2013 sono stati rilevati gli alcaloidi dell'ergot a concentrazioni comprese tra 6 e 943 µg kg<sup>-1</sup>, tra cui i più abbondanti sono risultati ergocristina

ed ergometrina. L'applicazione fungicida è risultata efficace anche nel contenere gli alcaloidi dell'ergot con un abbattimento medio del loro contenuto pari al 86%.

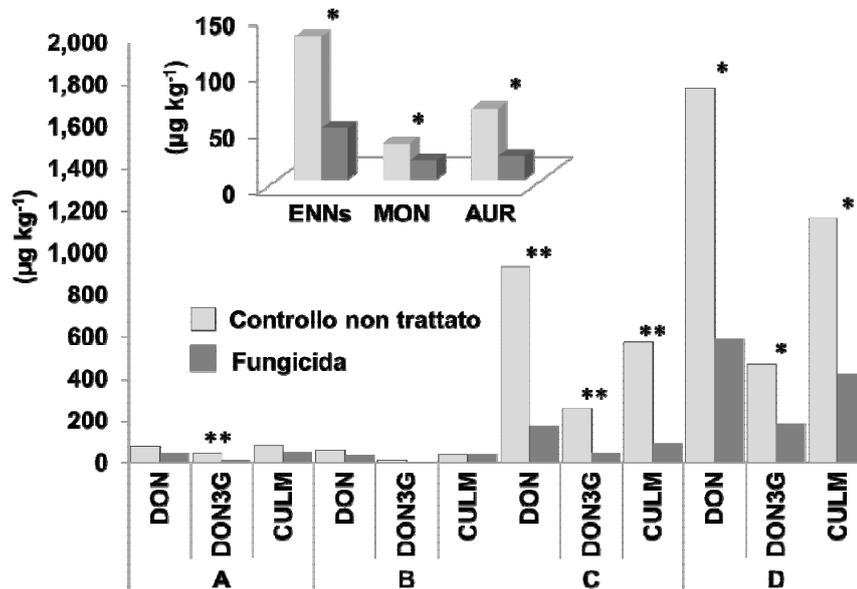


Figura 2. Effetto dell'applicazione fungicida sulla contaminazione da DON, DON-3-G, CULM, ENN, MON e AUR in 4 esperimenti (A, B, C, D)

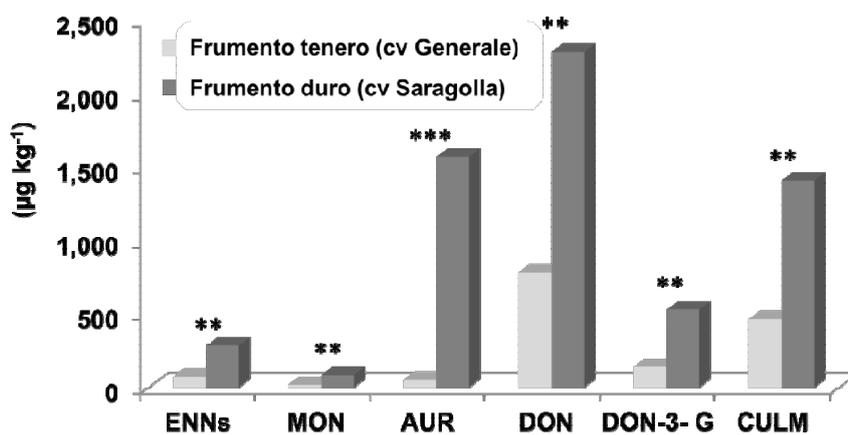


Figura 3. Effetto della suscettibilità della specie sulla contaminazione da DON, DON-3-G, CULM, ENN, MON e AUR

**Tabella 1. Effetto della lavorazione del terreno sulla contaminazione da micotossine nuove ed emergenti ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )**

Micotossina	2012			2013		
	Arato	Minima	Sodo	Arato	Minima	Sodo
ENN	198	419	505	16	25	16
MON	54	199	164	4,24	5,30	6,47
AUR	97	251	255	5,19	6,77	8,61
DON	1786	3609	3836	1024	1432	1339
DON-3-G	471	1008	1018	78	104	108
CULM	1172	2615	2521	664	879	929
ZEA	4,38	7,97	3,96	0,16	0,10	0,23
NIV	1,13	4,60	2,72	1,41	1,69	4,13
BUT	6	24	33	0,50	0,50	0,50
Alcaloidi dell'Ergot	0,71	0,71	0,71	38	20	1747
Acido Secalonico D	0,09	0,09	0,09	5,30	2,20	270
Infectopyrone	0,13	0,13	0,13	127	132	272
TENT	11	12	14	3,50	3,77	6,31

## Conclusioni

I risultati confermano la maggiore suscettibilità del frumento duro rispetto al tenero anche nei confronti delle principali micotossine nuove ed emergenti; riguardo l'agrotecnica l'aratura e l'applicazione del fungicida alla fioritura, comunemente impiegati per controllare la FHB e ridurre la contaminazione da DON, rappresentano la miglior soluzione per la sicurezza sanitaria del frumento anche sulla contaminazione di tali micotossine. Pertanto le buone pratiche per prevenire il DON (4), che prevedono strategie agronomiche integrate di mezzi preventivi e di controllo diretto, possono essere estese anche ad altre micotossine.

## Bibliografia

1. Streit E, Schwab C, Sulyok M, Naehrer K, Krska R, Schatzmayr G. Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients. *Toxins* 2013; 5(3):504-23.
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. Scarpino V, Reyneri A, Sulyok M, Krska R, Blandino M. Effect of fungicide application to control *Fusarium* head blight and 20 *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *World Mycotoxin Journal* 2015;8(4):499-510.
4. Blandino M, Haidukowski M, Pascale M, Plizzari L, Scudellari D, Reyneri A. Integrated strategies for the control of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. *Field Crop Res* 2012;133:139-49.