

## MONITORAGGIO DEL RISCHIO MICOTOSSINE IN CAMPO SU MAIS: UNO STRUMENTO PER LA FILIERA

R. CAPURRO<sup>1</sup>, P. RENDINA<sup>1</sup>, E. COSTA<sup>2</sup>, D. MASSAROTTO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Sata srl - Str. Alessandria, 13, 15044 Quargnetto (AL)

<sup>2</sup>A.I.R.E.S. - Via Venier, 55 31100 Treviso

<sup>2</sup>GLM – Gruppo di Lavoro Micotossine info@glmicotossine.it

<sup>3</sup>Cadirlab srl - Str. Alessandria, 13, 15044 Quargnetto (AL)  
r.capurro@satasrl.it

### RIASSUNTO

L'obiettivo di questo lavoro è stato di provare ad utilizzare sul territorio piemontese la metodologia di monitoraggio di campo sviluppata da A.I.R.E.S. nell'areale Nord-Est. Questo permette di fornire alla filiera maidicola locale uno strumento di campo per quantificare l'infezione da funghi della spiga sui lotti di mais e comunicare le opportune misure di gestione della granella, per prevenire la contaminazione da micotossine. Per tale lavoro, sono stati individuati 7 appezzamenti distribuiti nelle province di Alessandria, Novara e Vercelli in cui è stata rilevata l'incidenza e la severità di attacco sulle spighe dai principali funghi patogeni (*Aspergillus* spp, *Fusarium* spp e *Penicillium* spp) nelle fasi di maturazione cerosa e di maturazione completa. Da questa prima prova è emerso che l'indice di attacco (incidenza x severità) è un metodo chiaro per esprimere e quantificare il grado di infezione del campo e può essere utilizzato per comunicare la situazione agli operatori della filiera. In parallelo all'attività di monitoraggio, al momento della raccolta sono stati prelevati in ogni campo 2 campioni, che sono stati suddivisi ciascuno in 6 aliquote per la successiva analisi chimica "multitossina" presso il laboratorio Cadir Lab S.r.l. Dai risultati delle analisi è emerso che non ci sono corrispondenze tra il dato rilevato in campo e il risultato analitico, che rimane l'unico metodo certo nell'attività di screening. Lo studio verrà continuato da Sata nei prossimi anni per validare la metodologia.

**Parole chiave:** campionamento, analisi chimiche, prevenzione

### SUMMARY

#### MONITORING MYCOTOXIN RISK IN FIELD ON MAIZE: A TOOL FOR THE SUPPLY CHAIN

This study aimed at testing and using the field monitoring methodology, implemented by A.I.R.E.S. in Piedmont. This makes it possible to provide a field toolkit to the local maize supply-chain to quantify ear rot infections in field and inform farmers about the suitable measures to prevent mycotoxin contamination. Seven fields were selected in the provinces of Alessandria, Novara and Vercelli. For each field, incidence and severity of ear rot linked to the most important pathogens (*Aspergillus* spp, *Fusarium* spp and *Penicillium* spp) were assessed during the crop stage of early dough and fully ripe (before harvest). This first trial showed that the attack index (incidence x severity) is a clear method to express and quantify the degree of infection of the field and it can be used to communicate the situation to the supply-chain operators. Following the monitoring activity, during harvest, 2 samples were taken for each field and they were divided into 6 sub-samples for the chemical analysis of mycotoxin quantification by Cadir Lab S.r.l. The results obtained showed that there is no relationship between the index assessed in the field and the analytic results, the latter being the only reliable proof of the screening activity. The study will be continued by Sata during in the next years to locally validate the methodology.

**Keywords:** sampling, chemical analysis, screening

## INTRODUZIONE

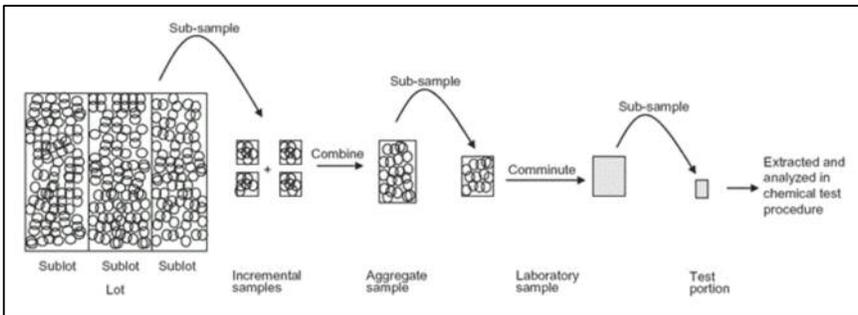
Nella filiera produttiva del mais la contaminazione da micotossine è divenuta negli ultimi anni una minaccia pressante, che rischia di compromettere le performance e le prospettive di un comparto produttivo che fino a qualche anno fa poteva soddisfare fino al 95% del fabbisogno nazionale. Dal 2000 al 2016 la superficie coltivata a mais nel nostro Paese è scesa drasticamente, da circa 1.000.000 a 700.000 ha. Questa disaffezione verso la coltura è riconducibile principalmente a tre fattori: i prezzi di mercato che rendono poco remunerativa la coltivazione, il cambiamento climatico con conseguente perdita produttiva e l'elevato rischio di contaminazione della granella da micotossine con conseguenti effetti di deprezzamento e difficoltà di commercializzazione (Battilani et al, 2016) (Casati, 2007). Di seguito si riportano i principali esempi di micotossine prodotte come metaboliti secondari dai principali funghi della spiga. Le fumonisine (B1, B2 and B3) sono prodotte da *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme* = *Gibberella fujikuroi*), *F. proliferatum*, e *F. nygamai*; il deossinivalenolo (DON), e lo zearalenone sono prodotti dal *Fusarium graminearum* (telomorfo *Gibberella zeae*) (Edward, 2004); l'aflatossina B1 da *Aspergillus flavus* e da *A. parasiticus* (Campbell e White, 1995) (Wagacha e Muthomi, 2008), l'Ocratossina A da *Penicillium verrucosum* e da *A. ochraceus* (CAST, 2003) e *A. westerdijkiae* (Frisvald et al., 2004).

Il problema della contaminazione della granella da micotossine è da considerarsi molto complesso poiché caratterizzato da diverse peculiarità che ne rendono problematica la gestione per tutta la filiera cerealicola. Di maggior rilevanza si identificano: (1) la distribuzione disomogenea, sia in campo (es. aree dove la coltura ha subito maggiori stress per minor capacità idrica del terreno, problemi di irrigazione, etc.) sia nella massa del prodotto (Willyerd, et al., 2016); (2) conseguente forte variabilità nel livello di contaminazione tra cariossidi della stessa partita; (3) la variabilità di distribuzione del contaminante rende problematica l'esecuzione di un campionamento rappresentativo (Pichler, 2013). Tra le principali fasi della filiera maidicola, il ricevimento della granella umida presso il centro di stoccaggio risulta essere il momento cruciale per la corretta gestione del rischio e, generalmente, presenta evidenti criticità (Whitaker, 2006): (1) il centro di stoccaggio non dispone di adeguate informazioni sulla storia agronomica e del potenziale rischio di contaminazione delle partite che riceve; (2) le tempistiche di gestione del prodotto umido sono stringenti e non consentono un adeguato controllo ("triage") delle partite in arrivo; (3) per motivazioni organizzative ed economiche non è possibile sottoporre a controllo analitico tutte le partite in ingresso.

Attualmente la contaminazione da micotossine di una partita viene stimata misurando la concentrazione in un campione rappresentativo di piccole dimensioni seguendo un protocollo definito. Il protocollo consiste nei seguenti tre passaggi come raffigurato nella (figura 1):

Campionamento: la fase di campionamento specifica come il campione sarà prelevato dal lotto, quindi il numero di campioni da testare e le dimensioni di ciascun campione. Si presume che il campione sia stato selezionato in modo casuale e sia rappresentativo del lotto. In genere molti campioni di piccole dimensioni vengono selezionati dal lotto e combinati per formare un campione aggregato. Preparazione del campione – Il campione viene macinato (totalmente o in quota a seconda delle dimensioni). Una quota della farina così ottenuta viene sottoposta al processo di estrazione dell'analita. Analisi strumentale - Nella fase analitica viene quantificata la concentrazione di micotossina attraverso l'uso di strumentazione specifica e metodiche certificate.

Figura 1. Diagramma dei vari step di campionamento del processo di analisi dei cereali (Tittlemier, et al., 2011)



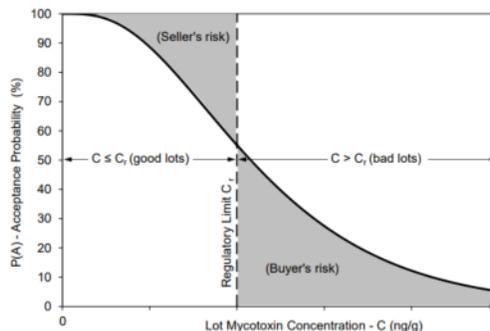
A ciascuna fase del processo analitico (campionamento, preparazione del campione e analisi) è associata una variabilità e un margine d'errore. Molti studi hanno dimostrato che il campionamento è generalmente la maggiore fonte di variabilità. Nel caso delle aflatoxine infatti, il 90% degli errori è dato da questo problema. Gli errori di campionamento sono riconducibili a due principali fattori: (1) la concentrazione di micotossine in un carico è generalmente molto bassa tant'è che viene misurata in parti per miliardo (ppb); (2) La distribuzione dell'infezione può essere presente soltanto in poche spighe o cariossidi mentre il resto del lotto presenta elevata salubrità (Pichler, 2013).

Se la procedura di campionamento non è eseguita in maniera rappresentativa su tutto il lotto si possono avere falsi negativi e falsi positivi, come rappresentato nella figura 2:

A) falso positivo, un lotto conforme (con livelli di micotossine inferiori al tenore massimo ammesso) risulta non conforme all'analisi (il risultato del test del campione è superiore al limite di accettazione/rifiuto). Questo tipo di errata classificazione viene definito anche "rischio del venditore".

2) falso negativo, un lotto non conforme (con livelli di micotossine superiori al livello massimo definito) risulta conforme all'analisi e quindi accettato. Questo tipo di errata classificazione viene definita "rischio dell'acquirente".

Figura 2. Andamento della curva OC che definisce le prestazioni e i rischi di un determinato processo analitico (Whitaker, 2006)



La frequenza con cui si verificano questi due errori di classificazione dipende principalmente dalle caratteristiche del prodotto che presenta singole unità di grandi dimensioni, di peso cinque o più volte maggiore rispetto al frumento. L'incertezza di misura gioca poi un ruolo importante

in relazione alla determinazione della conformità di campioni il cui livello di contaminazione viene misurato nei dintorni del tenore massimo ammesso e di fatto amplifica la dimensione del rischio dell'acquirente, cioè rischio che un campione realmente contaminato a livelli superiori ai limiti di legge venga considerato conforme in base all'esito analitico; infatti tutti gli esiti analitici compresi tra tenore massimo ammesso e tenore massimo + incertezza di misura vengono classificati "conformi tenendo conto dell'incertezza".

Visto l'insorgere dei due tipi di errori e l'importanza di un'attenta attività di monitoraggio per la prevenzione del problema e per migliorarne la gestione (FAO, 2014), alcuni studi e attività di ricerca applicata propongono alcune metodiche di monitoraggio sulla coltura in atto e indagini a scala di territorio per dare maggior supporto alla fase analitica di post-raccolta. Dallo studio del centro di consulenza dell'Università dell'Ohio (Paul, 2017) viene definita una procedura di campo per la quantificazione dell'incidenza e della severità dell'attacco da funghi patogeni della spiga come azione propedeutica prima di procedere all'analisi chimica. L'osservazione della presenza di muffe sulle spighe di mais non è un indicatore certo dell'effettivo contenuto di micotossine all'interno della granella ma può soltanto essere un indicatore di possibile contaminazione, che andrà quantificata con successiva analisi chimica.

Per quanto riguarda il Nord d'Italia, sono state finanziate alcune attività a livello della Regione Veneto e Lombardia per la definizione di un sistema di monitoraggio in campo dello sviluppo dei funghi patogeni e per lo studio dei fattori di rischio dello sviluppo delle micotossine in campo e nei centri di stoccaggio (A.I.R.E.S., 2005). Tali attività sono state proseguite ed approfondite negli anni successivi (Costa, 2015) dal Gruppo di Lavoro sulle Micotossine, e hanno permesso ad A.I.R.E.S. di validare tale metodologia a livello di territorio come sistema di allerta per ridurre il rischio di micotossine. Infatti, una volta valutate le condizioni meteo e la presenza di funghi patogeni in campo, si consiglia all'agricoltore di raccogliere appena possibile, senza attendere che l'umidità della granella si abbassi eccessivamente regolando la mietitrebbia in modo da lasciare in campo le parti più fini che sono quelle più contaminate da micotossine, facendo estrema attenzione a causare il minor danno meccanico possibile alla granella (Costa, 2015).

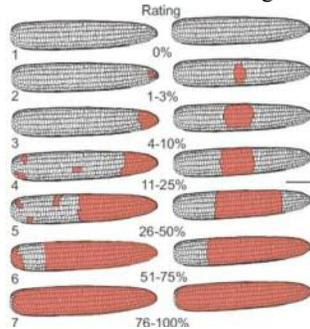
Per quanto riguarda il Piemonte e l'areale Nord-Ovest, non è al momento presente nessuna attività di questo genere sul quale si possa andare ad impostare la stessa rete di monitoraggio in campo a servizio della filiera locale. In questo contesto, Sata si propone di intraprendere il medesimo iter, iniziando a valutare la metodologia di monitoraggio di campo, supportandola con opportune analisi chimiche certificate, su aliquote di diverse dimensione per ridurre al minimo il margine di errore. Si precisa che questo primo lavoro ha lo scopo di introdurre l'argomento che sarà sviluppato negli anni successivi.

## MATERIALE E METODI

La metodologia di monitoraggio prevede l'esecuzione di due rilievi in pre-raccolta, rispettivamente a maturazione cerosa (BBCH 83-85) e a maturazione completa (BBCH 89) su un numero rappresentativo di campi presenti sul territorio di interesse. Per ogni rilievo si esegue un'osservazione di 100 spighe distribuite in 5 punti del campo, equamente distribuiti a seconda della sua morfologia e giacitura. Per i tre principali funghi patogeni, *Aspergillus* spp. *Fusarium* Spp. e *Penicillium* spp., si contano le spighe infette (incidenza) e si quantifica il danno per ogni spiga (severità) come indicato nella figura 3. L'osservazione è eseguita privando le spighe delle brattee, senza distaccarle dalla pianta. I dati ottenuti permettono di avere una preziosa indicazione sul rischio di infezione da funghi patogeni di un determinato appezzamento. Per questo caso studio, il lavoro è stato suddiviso in 5 step corrispondenti all'individuazione delle

aziende e appezzamenti (i), all'esecuzione dei rilievi in campo (ii), al campionamento e suddivisione aliquote (iii), alle analisi di laboratorio (iv) e al trattamento dei dati ottenuti (v).

Figura 3. Schema di quantificazione dell'infezione da funghi sulla spiga di mais (Paul, 2017)



**(i) Individuazione delle aziende e appezzamenti**

Per questa prima fase del lavoro sono state individuate 7 aziende agricole distribuite sul territorio piemontese, principalmente nelle province di Alessandria, Novara e Torino, nelle quali sono stati selezionati 7 appezzamenti coltivati con ibridi di mais da granella, possibilmente con diversa gestione dell'irrigazione. Si riporta di seguito la tabella (1) riepilogativa degli appezzamenti in cui è stato svolto il monitoraggio.

Tabella 1. Elenco delle caratteristiche agronomiche dei 7 campi localizzati nelle 3 province interessate dallo studio, con indicazione della classe FAO della coltura e della tecnica di irrigazione

Provincia	ID Appezzamento	Classe FAO Mais	Tecnica irrigazione
Torino	1	500	Rotolone
Novara	2; 3	600	Rotolone
	4; 5	500	Rotolone
Alessandria	6; 7	600	Ala gocciolante

**(ii) Esecuzione dei rilievi in campo**

I rilievi sono stati svolti secondo la metodica indicata, con la differenza che al secondo rilievo l'osservazione è stata svolta con un prelievo aggiuntivo di 30 spighe. Nella tabella 2, è stato riportato il numero di spighe visualizzate per calcolare l'incidenza dell'infezione da funghi e il tempo necessario per lo svolgimento del rilievo in un campo.

Tabella 2. Schema di rilievo svolto in campo

Numero rilievo	Momento di rilievo	Calcolo dell'incidenza di infezione	Tempo impiegato (minuti)
1	Maturazione latteo-cerosa	100 (non prelevate, solo sbrattate)	45
2	Maturazione completa	100 (non prelevate, solo sbrattate) + 30 spighe prelevate	75

### (iii) Campionamento e suddivisione aliquote

Durante la raccolta sono stati prelevati due campioni di 10 kg in modo rappresentativo da ogni campo. Dopo opportuna omogeneizzazione dei campioni, sono stati prelevate 3 aliquote da 2 kg e tre aliquote di 0,5 kg. Per motivi di logistica, non è stato possibile prelevare i campioni dal campo n° 1. In totale, per questo lavoro sono stati prelevati 12 campioni, che sono stati suddivisi in 36 aliquote da 2 kg e 36 aliquote da 0,5 kg, per un totale di 72.

### (iv) Analisi in laboratorio

Le analisi chimiche per la ricerca della contaminazione da micotossine sono state effettuate inizialmente su 4 aliquote per campo: per ogni campione, è stata prelevata una sola aliquota da 2 kg e una sola aliquota di 0,5 kg. Le analisi sono state svolte dal laboratorio Cadir Lab S.r.l., secondo la metodica Interna accreditata identificata con il codice “MIP 55 V05 2016 - DETERMINAZIONE MULTITOSSINA” che prevede l’uso per la fase di estrazione di colonne Mycospin e per la fase di determinazione l’utilizzo di cromatografia liquida con spettrometria di massa tandem. Nello specifico le analisi sono state condotte su UPLC Waters I-Class accoppiato con Xevo-TQS. Nella fase di preparazione del campione, per il campione da 2 kg, è stata macinata una massa pari ad 1 kg, dopo opportuna omogeneizzazione; per il campione da 0,5 kg, è stata macinata tutta la quantità presente. Per determinare la conformità dei campioni, sono stati presi in considerazione i valori indicati per il mais da granella nei regolamenti (Reg CE 1126/2007 del 28/09/2007; Reg CE 165/2010 del 26/02/2010). In caso le aliquote abbiano dato valori di micotossine al di sopra del limite di legge, sono state analizzate le restanti aliquote provenienti dallo stesso campione, al fine di avere un maggior dettaglio del dato analitico e confermare la “non conformità” rilevata. Questo procedimento di approfondimento delle analisi è stato eseguito al fine di confermare il dato analitico ottenuto e di ridurre la variabilità tipica della distribuzione delle micotossine nel mais. Per maggiore chiarezza, si riporta il diagramma di flusso del procedimento di rilievo e campionamento che è stato seguito per questo studio (figura 4).

Figura 4. Schema del procedimento di rilievo, campionamento e analisi dei dati



### (v) Trattamenti dei dati

Per comprendere al meglio i valori dei rilievi, è stato calcolato l’indice di attacco dal patogeno, ottenuto dalla moltiplicazione tra l’incidenza e la severità. Il valore indice ottenuto permette di confrontare facilmente la situazione in campo con il risultato delle analisi. Tale confronto ha lo

scopo di dare evidenza della eventuale corrispondenza tra la situazione osservata in campo e i risultati analitici ottenuti dalle analisi chimiche, che risultano necessarie per un corretto lavoro di screening a livello di territorio.

## RISULTATI

Si riportano nei paragrafi seguenti i risultati dei rilievi svolti in campo (i), i valori medi delle analisi chimiche svolti sulle aliquote dei campioni (ii) e l'analisi trasversale dei dati (iii).

### (i) Rilievi svolti in campo

Nelle tabelle (tabella 3 e 4) sono stati riassunti i risultati dei rilievi svolti in campo raggruppati secondo gli appezzamenti di provenienza. Nel primo rilievo effettuato (tabella 3), l'attacco da funghi patogeni è stato molto contenuto. È stato possibile rilevare soltanto l'attacco da *Aspergillus* spp per il quale si riportano valori di severità e di incidenza molto bassi. Questa dati sono confermati dalle condizioni climatiche molto calde e secche della stagione estiva del 2017, in cui sono state registrate temperature al di sopra della media e precipitazioni molto scarse.

Tabella 3. Risultati del primo rilievo effettuato nello stadio vegetativo BBCH 83-85 sulle 100 spighe in cui è stato possibile quantificare l'incidenza e la severità dell'infezione da *Aspergillus* spp.

Provincia	ID Appezzamento	Primo rilievo: maturazione cerosa	
		Incidenza infezione (%)	Severità sulle spighe infette (%)
TO	1	11	3,8
NO	2	2	2
	3	2	1
	4	8	2,6
	5	2	1
AL	6	2	1
	7	3	4

Nel secondo rilievo (tabella 4), l'attacco dei funghi patogeni è stato più importante e, oltre all'*Aspergillus* spp, sono stati osservati miceli di *Fusarium* spp e di *Penicillium* Spp. Le percentuali di incidenza e di severità riscontrate sono piuttosto diverse tra di loro, con prevalenza di *Fusarium*, che ha incidenza e severità maggior di zero per tutti i campioni analizzati. Tale aumento di valori è corrispondente all'abbassamento delle temperature e dalla presenza di fenomeni temporaleschi localizzati di fine stagione. Diversa è la situazione per l'*Aspergillus* spp, che a differenza de del primo rilievo, in alcuni appezzamenti risulta essere aumentato notevolmente.

Tabella 4. Rilievo sulle spighe osservate e prelevate al momento della raccolta (BBCH 89), in cui è stata rilevata l'incidenza e la severità dei 3 principali patogeni della spiga

Provincia	ID appezzamento	Attacco da <i>Fusarium</i> Spp		Attacco da <i>Aspergillus</i> Spp		Attacco da <i>Penicillium</i> Spp	
		Incidenza (%)	Severità (%)	Incidenza (%)	Severità (%)	Incidenza (%)	Severità (%)
NO	2	12	11,6	18	6,0	5	1,2
	3	30	14,4	0	0,0	0	0,0
	4	7	4,0	7	10,0	0	0,0
	5	7	17,5	17	7,8	3	3,0
AL	6	7	10,0	0	0,0	0	0,0
	7	3	3,0	0	0,0	0	0,0
Media		11	12,1	7	7,0	1	1,7

**(ii) Valori analisi chimiche sulle micotossine**

Per quanto riguarda i risultati delle analisi chimiche, riportiamo di seguito i valori medi delle analisi chimiche per ogni appezzamento da cui sono stati effettuati i rilievi durante la fase di maturazione.

Tabella 5. Valori medi di micotossine rilevati dall'analisi delle 4 aliquote dei campioni provenienti dagli appezzamenti in cui sono stati effettuati i rilievi ( $\mu\text{g/kg}$ ). L'asterisco (\*) indica i valori non conformi alla destinazione umana

Prov.	ID Appezzamento	Campione	Media di Fumonisinina totali	Media di Deossinivalenolo	Media di Aflatossine totali
NO	2	1	2272,50	10,0	0,08
		2	1903,00	47,0	0
		Media	2087,75	28,50	0,04
	3	1	7052,00*	0	0
		2	3545,00	83,0	0
		Media	5298,50*	41,50	0
	4	1	270,50	30,0	0
		2	425,50	0	0
		Media	348,00	15,0	0
	5	1	336,50	9,0	12,88*
		2	889,50	98,00	20,00*
		Media	613,00	53,50	16,44*
AL	6	1	857,50	0	0
		2	1210,50	0	0
		Media	1034,00	0	0
	7	1	86,00	0	0
		Media	321,50	0	0
Media totale			1617,12	23,08	2,74

Come osservato nei rilievi, la variabilità dei dati è piuttosto elevata. Confrontando i limiti di legge in vigore per la quantità di micotossine, si può affermare che per la presenza di aflatossine totali, soltanto il valore proveniente dall'appezzamento 5 non è risultato conforme. Questo è confermato anche dai valori di dettaglio dei singoli campioni che entrambi non sono risultati conformi a causa di valori di aflatossine totali al di sopra del limite di legge. Per le fumonisinine totali, soltanto il valore medio proveniente dall'appezzamento 3 non risulta essere conforme: infatti, dal dettaglio delle analisi, la media dei valori di analisi del campione 1 è molto al di sopra del limite mentre per il campione 2 i valori sono leggermente al di sotto del limite di legge". I valori di deossinivalenolo e di ocratossina A sono al di sotto dei limiti di legge e non hanno compromesso la conformità del campione analizzato.

Per comprendere meglio l'entità e le dinamiche dell'errore di campionamento dovuto a possibili focolai di infezione, è stata effettuata l'analisi sulle restanti aliquote nei campioni provenienti dagli appezzamenti 3 e 5, come illustrato nella tabella di seguito riportata.

Tabella 6. Valori medi di micotossine rilevati dall'analisi delle aliquote di approfondimento dei campioni 1 e 2 del campo 3 e dal campione 2 del campo 5, che risultavano non conformi alla prima analisi (vedi media di Fumonisine totali). Valori espressi in  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . L'asterisco (\*) indica i valori non conformi

ID Appezamento	Campione	Media di Fumonisine totali	Media di Deossinivalenolo	Peso aliquota di approfondimento	Media di Fumonisine totali	Media di Deossinivalenolo	Media di Aflatossine totali
3	1	7052,00*	0	0,5	23895,00*	0	0,55
				2	17476,50*	11,50	4,40
				Media	20685,75*	7,67	2,48
3	2	3545,00	0	0,5	1385,00	0	0
				2	1376,00	0	0
				Media	1380,50	0	0
5	2	889,50	20,00	0,5	3290,00	189,00	7,00
				2	6529,00*	399,50	8,85
				Media	5449,33*	329,33	8,23

Come si può osservare dalla tabella, i valori di micotossine sono cambiati considerevolmente rispetto alla situazione precedente, soprattutto per quanto riguarda le fumonisine, presumibilmente a causa di una conservazione non idonea dei campioni ( $>5^{\circ}\text{C}$  per tempi prolungati) oltre che per la variabilità tra campioni.

### (iii) Analisi trasversale dei dati

Al fine di confrontare l'osservazione di campo con i risultati delle analisi, si riporta il sinottico dei risultati del secondo rilievo (tabella 7) in cui è stato calcolato l'indice di attacco, ottenuto dalla moltiplicazione dell'Incidenza per la Severità, sia per *Fusarium* spp sia per *Aspergillus* spp.

Tabella 7. Riassunto dei dati del secondo rilievo e delle medie ottenute dalle analisi chimiche. Gli asterischi (\*) e (\*\*) mettono in evidenza le situazioni critiche

Prov.	ID	<i>Fusarium</i> Spp			Attacco da <i>Aspergillus</i> Spp			Media di Fumonisine totali	Media di Aflatossine totali
		Incidenza	Severità	Incidenza x severità	Incidenza	Severità	Incidenza x severità		
NO	2	12	11,6	139,2*	18	6	108	2087,75*	0,04
	3	30	14,4	432*	0	0	0	5298,5 *	0
	4	7	4	28	7	10	70	348	0
	5	7	17,5	122,5	17	7,8	132,6**	613	16,44 **
AL	6	7	10	70	0	0	0	1034	0
	7	3	3	9	0	0	0	321,5	0

Si può chiaramente osservare che nella maggior parte dei casi, con valori di "indice di attacco" maggiori si ottengono valori di micotossine elevati. Tuttavia, la situazione è molto variabile e non si possono definire corrispondenze tra i due valori confrontati.

## DISCUSSIONE

L'obiettivo primario di questo lavoro è di sviluppare una rete di monitoraggio in campo per migliorare la gestione del rischio di contaminazione delle micotossine per la filiera maidicola del Nord-Ovest allo scopo di allertare agricoltori, terzisti e stoccatore affinché adottino le corrette misure di gestione della granella. Tali misure comprendono la scelta del

momento di raccolta, la velocità di trebbiatura e le modalità di stoccaggio del prodotto. Per questa prima prova, sono stati eseguiti due rilievi su alcuni appezzamenti a campione coltivati a mais da granella irrigato distribuiti nelle principali province di produzione del mais del Piemonte Orientale, Alessandria, Novara e Vercelli. Durante i rilievi è stata rilevata la presenza dei principali funghi patogeni sulle spighe (*Fusarium* spp, *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp.) a maturazione cerosa e a maturazione completa, quantificando l'incidenza dell'infezione (numero di spighe infette su spighe totali) e la severità dell'attacco fungino misurato in percentuale sulla spiga. Moltiplicando i dati di severità e di incidenza è stato ottenuto l'indice di attacco del patogeno che chiaramente illustra la situazione rilevata in campo ed è efficacemente comunicabile agli operatori della filiera. Tale prima esperienza ha permesso al gruppo di lavoro di provare e validare tecnicamente la metodica di rilievo in campo e quantificare i tempi necessari allo svolgimento dei rilievi su scala territoriale. Il lavoro è quindi da considerarsi di carattere esplorativo e da ampliare nelle prossime annate agrarie, con un numero maggiore di appezzamenti al fine di poter ottenere un maggior numero di dati, utilizzabili dalle filiere maidicole locali. In parallelo a questa attività di monitoraggio, attraverso alcuni casi pratici di campionamento frazionato della granella, è stata dimostrata la variabilità di risultati di più campioni prelevati all'interno di uno stesso appezzamento. Come riportato nella bibliografia (Pichler, 2013) (Tittlemier, et al., 2011) il campionamento di una partita per la ricerca di contaminazione da micotossine risulta essere la fase più delicata e la principale fonte di errore del processo di analisi. La variabilità che si può ottenere dall'analisi delle varie aliquote provenienti da uno stesso campione è utile ai professionisti del settore per comprendere come adottare misure di prevenzione al momento del campionamento e della preparazione del campione. Come già richiesto dalla legge europea in vigore per i prodotti alimentari (Reg CE 401/2006) e come dimostrato dalla bibliografia (Tittlemier, et al., 2011), la fase di prelievo e di formazione del campione è ben definita e validata scientificamente. Nonostante questo, la maggior parte degli operatori tende a non seguire queste indicazioni e preleva campioni di medio-grandi dimensioni (5-7 kg) per ovviare alla mancanza di tempo a disposizione. Sapendo che un campione di 5 kg può contenere un numero di circa 30.000 cariossidi di mais, una sola cariosside infetta presenterebbe quindi un'elevata influenza sul risultato finale di presenza di micotossine che sono misurate in parti per miliardo (ppb o  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Per ovviare a questa problematica, nella fase di preparazione del campione, si potrebbe prevedere la frantumazione delle cariossidi, prima di prelevare il sub-campione di dimensioni più ridotte (2 kg) da mandare in analisi, aumentando al massimo la rappresentatività come negli altri cereali come frumento e riso.

## CONCLUSIONI

Le risultanze del lavoro svolto offrono diversi spunti di ragionamento:

- un sistema di monitoraggio pre-raccolta, basato sull'osservazione visiva e quindi di facile esecuzione, può lo spunto per focalizzare l'attenzione di agricoltori e stoccatore, a scala territoriale o anche aziendale/di campo, sulla possibile contaminazione da micotossine. Questo monitoraggio potrebbe affiancare i dati forniti da modelli previsionali, es AFLA-maize, sia prendendo in carico anche il rischio fumonisine sia potendo fornire informazioni più precise a scala aziendale/di campo.
- il campionamento delle partite di mais per successive determinazioni del livello di contaminazione si conferma come fase di estrema criticità, potendo potenzialmente originare variabilità nei risultati dell'analisi decisamente maggiori rispetto a quanto può derivare dalla fase analitica. Pertanto è opportuno che nelle fasi del campionamento e preparazione del campione si seguano procedure tali da ridurre il margine di errore.

## LAVORI CITATI

- A.I.R.E.S., 2005. Micotossine. Nota informativa, 7 - 31 Ottobre 2005. Treviso: Italia.
- Campbell K. W., White D., 1995. Evaluation of corn genotypes for resistance to *Aspergillus* ear rot, kernel infection, and aflatoxin production. *Plant Disease*, 79:1039-1045.
- CAST, 2003. Mycotoxins, Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Council for Agricultural Science and Technology (CAST). Ames, Iowa: United States.
- Costa E., 2015. Problema micotossine/aflatossine dal campo alla prima trasformazione. Camposampiero (PD). GLM - Gruppo di lavoro micotossine.
- Edward S., 2004. Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology Letters*, 153:29-35.
- FAO, 2014. FAO mycotoxin sampling tool. <http://www.fao.org/3/a-ml716e.pdf>.
- Casati D., 2007. Mondo e mercato - Importanza e Diffusione. In: *Coltura & Coltura. Il mais: Mondo e mercato* (Angelini, R., Maggiore T., Ponti I. coord.). Art Servizi Editoriali Bologna. 392-423.
- Paul P., 2017. Corn ear rots: identification, quantification and testing for mycotoxins. <https://agcrops.osu.edu/newsletter/corn-newsletter/2016-32/corn-ear-rots-identification-quantification-and-testing>.
- Pichler E., 2013. Sampling for mycotoxins – do we care enough?. *Cereal Foods World*, 58(3):117-118.
- Reyneri A., Bruno G., D'Egidio M. G., Balconi C. (a cura di), 2015. Linee guida per il controllo delle micotossine nella granella di mais e di frumento. Ministero delle politiche agricole, alimentari e forestali – Dip.to delle politiche competitive, della qualità agroalimentare, ippiche e della pesca - *Piano cerealicolo nazionale, 2010*.
- Scarpa D., Capurro R., Benzi D., 2012. Analisi dei residui di agrofarmaci: influenza del metodo di campionamento. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 1, 545-554.
- Tittlemier S., Varga E., Scott P., Krska R., 2011. Sampling of cereals and cereal-based foods for the determination of ochratoxin A: an overview. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 28(6): 775-785.
- Wagacha J., Muthomi J., 2008. Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 1-12.
- Whitaker T., 2006. Sampling Foods for Mycotoxins. *Food Additives & Contaminants*, 23(1): 50-61.
- Willyerd K. T., Pierce A. P., Thomison P., 2016. *Gibberella* ear rot and mycotoxins in corn: sampling, testing, and storage. *Agriculture and Natural Resources*, PLPATH-CER-04.