

INDAGINE NELL'AMBITO DI UN PROGETTO FINANZIATO DALLA REGIONE PIEMONTE

Contaminazione da micotossine negli insilati di mais

Gli insilati di mais in alcune condizioni (vaste aree soggette a deterioramento aerobico) possono essere a rischio per quanto riguarda la contaminazione da zearalenone e, in misura minore, da aflatossina B₁. Elevati quantitativi di questo foraggio utilizzati nella razione possono determinare ingestioni giornaliere di micotossine estremamente pericolose per la salute dell'animale

Giorgio Borreani, Ernesto Tabacco, Laura Cavallarin

Il deterioramento degli alimenti a uso zootecnico causato dai funghi filamentosi determina una perdita di elementi nutritivi e di energia, nonché il rischio di contaminazione con micotossine. Le micotossine sono metaboliti secondari caratterizzati da basso peso molecolare e struttura chimica molto variabile. Le intossicazioni alimentari causate dalle micotossine sono rappresentate da diverse affezioni croniche e acute che colpiscono gli animali e, direttamente o indirettamente, anche l'uomo. L'impiego di alimenti contenenti micotossine può pregiudicare non solo la salute degli animali con conseguenti perdite economiche, ma anche quella umana, attraverso il *carry-over* lungo la catena alimentare, cioè il trasferimento delle micotossine ingerite dall'animale nei prodotti (carne e latte) destinati all'alimentazione umana (Veldman *et al.*, 1992; Caggioni e Pietri, 1999).

Poiché i metodi di detossificazione dei prodotti contaminati sono tecnicamente difficili da applicare ed economicamente molto onerosi (Piva *et al.*, 1995), occorre porre particolare attenzione alla prevenzione della crescita dei funghi, che rappresentano il punto di partenza della formazione delle micotossine.

Il mais da granella e, soprattutto, il trinciato integrale costituiscono un'importante fonte di energia e la base della razione per i bovini da latte e da carne nella Pianura Padana. È noto che questa coltura può essere soggetta, sia nella fase di campo che in quella di stoccaggio, ad attacchi e colonizzazione da parte di funghi e muffe in grado di alterarne lo stato di conservazione e, in molti casi, di produrre micotossine. Per quanto riguarda la granella esistono molti lavori scientifici e indicazioni bibliografiche in letteratura sia nazionale che internazionale che forniscono un quadro esauriente sulle

specie di funghi produttori di micotossine (Miller, 1994; Sweeney e Dobson, 1998), sui livelli di contaminazione in campo e in magazzino (Doko *et al.*, 1995; Doko e Visconti, 1993; Pietri e Piva, 2000; Widstrom, 1996) e sui danni associati all'ingestione di prodotti contaminati da parte dell'uomo e degli animali (D'Mello *et al.*, 1999; Hussein e Brasel, 2001; Yannikouris e Jouany, 2002).

Meno investigato risulta essere il campo relativo agli insilati di mais per quanto riguarda i livelli di contaminazione e l'eventuale riduzione o aumento di micotossine durante il periodo di conservazione e soprattutto dopo l'apertura del silo.

Le micotossine più diffuse

Sebbene nel mondo siano state isolate e caratterizzate chimicamente più di 400 molecole comunemente chiamate micotossine, 5 di queste sono particolarmente importanti in agricoltura: il gruppo delle aflatossine, le fumonisine, lo zearalenone, il deossinivalenolo e l'ocratossina A. I deuteromiceti appartenenti al genere *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* sono considerati i più importanti produttori di micotossine degli alimenti a uso umano e animale. I *Fusarium* sono comuni saprofiti e patogeni delle piante, per cui sono ricorrenti in campo, mentre gli *Aspergillus* e i *Penicillium* si sviluppano prevalentemente nelle fasi di conservazione, per la loro elevata capacità di crescere su substrati caratterizzati da bassa umidità (Lacey, 1989).

Le aflatossine rappresentano la famiglia più nota e studiata di micotossine, con oltre 5.000 lavori di ricerca pubblicati. Sono prodotte da *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, specie presenti nel suolo, nei tessuti vegetali in disfacimento, nei foraggi e nelle granaglie stoccate. Questi funghi, in condizioni ottimali di temperatura e umidità, possono anche invadere le colture in campo determinando il marciume apicale della spiga del mais. Il fungo colonizza soprattutto il mais e i semi di cotone, in condizioni climatiche di alta temperatura e umidità o in seguito a danni procurati da altri parassiti, dalla grandine o da stress idri-



Tabella 1 - Valori ottimali dei fattori ambientali che condizionano lo sviluppo dei funghi filamentosi

	Minimo	Ottimo	Massimo
Attività dell'acqua (a_w)	0,65	0,80-0,95	0,99
Temperatura (°C)	-3,0	20-35	60
pH	2,0	4,5-6,5	8,0
Ossigeno (%)	0,14	> 2,0	-
Anidride carbonica (%)	-	< 10,0	> 15,0

Fonte: Oldenburg, 1991.

co. L'aflatossina B₁ (AFB₁), classificata come contaminante cancerogeno per l'uomo, se ingerita da animali in lattazione passa nel latte come suo metabolita, l'aflatossina M₁ (AFM₁), classificato come possibile cancerogeno. I limiti europei di contenuto di AFM₁ nel latte sono di 50 ppt (ng/kg). Il tasso di passaggio di AFB₁ dai foraggi e concentrati nel latte dipende da vari fattori tra cui il livello produttivo dell'animale (maggiore è la produttività, maggiore è il tasso di passaggio) e lo stadio di lattazione. Secondo studi olandesi (Veldman *et al.*, 1992) l'ingestione di AFB₁ non dovrebbe eccedere i 40 µg per capo per giorno per non superare i limiti critici di AFM₁ nel latte. In Italia il decreto n. 241 dell'11 maggio 1998, relativo a sostanze e prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali, pone a 5 ppb il limite massimo di AFB₁ nei mangimi completi destinati all'alimentazione delle vacche da latte.

Gli animali giovani sono particolarmente sensibili a intossicazioni con aflatossine, ma anche negli adulti queste tossine possono causare danni epatici, riduzione delle performance riproduttive e della produzione di latte o uova, morte degli embrioni e depressione del sistema immunitario, anche in caso di ingestioni giornaliere molto basse.

Le fumonisine, lo zearalenone e il deossinivalenolo sono le tossine più comuni prodotte da varie specie del fungo *Fusarium*. Il genere *Fusarium* è assai diffuso e ubiquitario nel suolo, in tessuti vegetali morti e spesso infetta le colture in campo.

Le fumonisine sono micotossine di recente scoperta (Bezuidenhout *et al.*, 1988), possono causare danni al fegato e ai reni, diminuzione dell'accrescimento giornaliero degli animali e sono precursori di metaboliti cancerogeni. Sono prodotte da *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* e altre specie meno comuni. Ci sono almeno tre molecole diverse di fumonisine: la fumonisina B₁ (FB₁), più tossica e normalmente presente in concentrazioni maggiori, la fumonisina B₂ e la fumonisina B₃. Pur non esistendo nor-

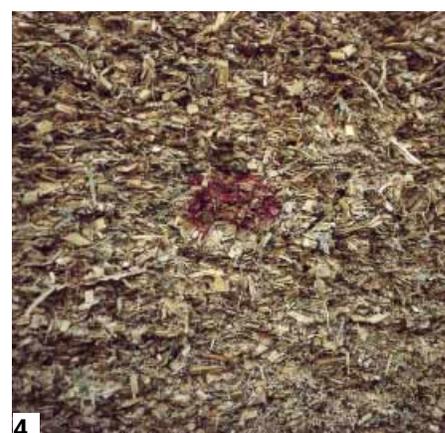


Foto 1, 2, 3 e 4 - Le tipologie di funghi filamentosi presenti nelle aree periferiche degli insilati di mais soggette a deterioramento aerobico sono diverse e appartengono prevalentemente ai generi *Penicillium*, *Mucor*, *Monascus*, *Aspergillus*, *Byssoschlamys*, *Fusarium*, *Geotrichum*

native comunitarie che fissino le concentrazioni massime di FB₁ negli alimenti per animali in produzione zootecnica, si deve rilevare che i livelli massimi di fumonisine totali nel mais raccomandati dalla «Food and drug administration» (FDA) statunitense sono fissati in 5 ppm per i cavalli, 20 ppm per i suini e 60 ppm per i bovini.

Lo zearalenone si accumula soprattutto nelle foglie alla base della pianta ed è prodotto da *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum*. Lo zearalenone è un estrogeno non steroideo ad attività anabolica che, ad alte concentrazioni, può causare sconvolgimento delle attività ormonali legate alla riproduzione, portando a ipofertilità e iperestrismo, soprattutto nei suini. Attualmente non esistono norme nazionali o europee che indichino i valori massimi ammissibili per lo zearalenone negli alimenti per uso umano e nei mangimi per uso zootecnico. Tra gli Stati europei, solo la Francia e l'Austria pongono un limite di 200 e 60 ppb per gli alimenti a uso umano. Nel 1999 il Governo italiano ha proposto un valore di tolleranza di 100 ppb come limite degli alimenti per l'uomo. L'Isti-

tuto superiore di sanità (Laboratorio di alimenti - Reparto chimica dei cereali) suggerisce di considerare tra 300 e 500 ppb il contenuto massimo ammissibile per lo zearalenone presente nei cereali a uso zootecnico.

Nei mais aziendali in condizioni climatiche fredde e umide, più favorevoli allo sviluppo delle specie di *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum*, prevale la contaminazione con zearalenone, mentre nelle annate più calde e secche, maggiormente favorevoli a *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, si verifica una più alta presenza di fumonisina B₁ (Pietri e Piva, 2000).

Il deossinivalenolo (DON), anche noto come vomitossina, prodotto principalmente da *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum*, causa riduzione dell'ingestione volontaria, dell'accrescimento giornaliero nei suini e problemi relativi alla performance riproduttiva e al sistema immunitario in varie altre specie.

Esistono altre micotossine che si accumulano specificamente durante la fase di conservazione dei prodotti, come l'ocratossina A, prodotta dal gene-

UNITÀ DI MISURA

L'importanza di quantificare le micotossine

Le micotossine sono molecole a elevata attività biologica (cancerogena, mutagena e immunodepressiva), con alta stabilità e tendenza all'accumulo nei tessuti (epatici, ecc.), in grado di causare problemi alla salute anche in concentrazioni molto basse. Per questo motivo diventa indispensabile disporre di metodi di

determinazione molto sensibili, cioè in grado di quantificare il contenuto in micotossine a livello di pochi ng/kg.

Vengono qui riportate le unità di misura comunemente adottate in letteratura e nei referti dei laboratori di analisi per esprimere la concentrazione di queste molecole.

Unità di misura

ppm	parti per milione	= mg/kg	= µg/g	= 1/1.000.000
ppb	parti per bilione o miliardo	= µg/kg	= ng/g	= 1/1.000.000.000
ppt	parti per trilione	= ng/kg		= 1/1.000 miliardi

re *Penicillium* durante lo stoccaggio della granella di mais e altri alimenti. Questa tossina provoca principalmente danni ai tessuti renali, anche se i ruminanti in realtà tollerano livelli relativamente alti di ocratossina A. Inoltre esiste la possibilità del trasferimento della tossina alle carni e ad altri prodotti della filiera.

Negli insilati si ritrova molto spesso il *Penicillium roqueforti*, che è una specie acidofila e microaerofila in grado di produrre la roquefortina C, una tossina con proprietà neurotossiche (Auerbach *et al.*, 1998).

Le micotossine negli insilati

L'insilamento dovrebbe essere, in linea di principio, il metodo ideale per preservare i foraggi dalla contaminazione con micotossine, poiché previene che la coltura raccolta venga conservata in condizioni di anaerobiosi e pH basso, incompatibili con lo sviluppo dei funghi filamentosi. Tali condizioni, associate a insilati di buona qualità sono sfavorevoli allo sviluppo della maggior parte dei funghi e, in alcuni casi, tendono a ridurre il livello di micotossine già presenti all'insilamento (Scudamore e Livesey, 1998).

Le condizioni ottimali ed estreme per la crescita dei funghi produttori di micotossine sono riportate in *tabella 1* (Lacey, 1989; Oldenburg, 1991). Per quanto riguarda il pH, i valori ottimali di crescita dei funghi oscillano tra 4,5 e 6,5, con minimi accertati che si avvicinano a 2. Per la temperatura l'intervallo di crescita varia da alcuni gradi sotto lo zero a 60 °C, con valori ottimali compresi tra 20 e 35 °C. Ne consegue che i fattori che possono essere sfruttati per il controllo della crescita

dei funghi nei foraggi conservati risultano essere l'anaerobiosi o l'essiccazione spinta, per avere un'attività dell'acqua (*water activity*) minore di 0,65 (corrispondente a umidità inferiore al 14%). Poiché l'insilato di mais è caratterizzato da valori di umidità compresi tra il 72 e il 60%, solamente la sinergia tra anaerobiosi e pH consente di inibire lo sviluppo di questi microrganismi, e di conseguenza il rischio di contaminazione con micotossine.

Il silo aziendale è potenzialmente soggetto a deterioramento aerobico prevalentemente nelle aree periferiche, come riportato da Borreani *et al.* (2002) su questa rivista. I funghi filamentosi si sviluppano in grande quantità quando l'insilato permane a contatto con l'aria (e quindi con l'ossigeno) per lungo tempo. La protezione dall'infiltrazione dell'aria durante lo stoccaggio e la corretta gestione della trincea durante la fase di utilizzo permettono di evitare i fenomeni di deterioramento aerobico e di inibire lo sviluppo dei microrganismi produttori di micotossine.

Su un gruppo di 20 aziende zootecniche in provincia di Cuneo, conferenti il latte a uno stesso caseificio, è stata condotta un'indagine sulla presenza di micotossine nell'insilato di mais. L'indagine è stata svolta nelle campagne agrarie 2000-2001 e 2001-2002 nell'ambito di un progetto finanziato dalla Regione Piemonte riguardante l'influenza del deterioramento aerobico degli insilati di mais sulla qualità chimica e microbiologica del latte e la successiva caseificazione a Grana Padano.

L'indagine aveva come obiettivi:

- determinare la presenza e il livello di contaminazione di aflatoxina B₁, zeara-

lenone e fumonisina B₁ nel trinciato integrale di mais alla raccolta e nei relativi insilati durante la fase di consumo;

- verificare eventuali variazioni nel grado di contaminazione degli insilati rispetto al prodotto in entrata e individuare le possibili differenze di contaminazione in relazione allo stato di conservazione dell'insilato e alla presenza o meno di deterioramento aerobico;

- identificare alcuni parametri legati alla gestione agronomica atti a ridurre il contenuto di micotossine del foraggio in entrata nel silo.

In ogni azienda il campione di trinciato all'insilamento da sottoporre ad analisi è stato ottenuto da prelievi successivi effettuati ogni 2 o 3 rimorchi al momento dello scarico nel silo.

In totale sono risultati disponibili per le analisi 96 campioni di trinciato alla raccolta e i relativi insilati (73 tra trincee e cumuli) campionati nelle zone centrali e periferiche per un totale di 159 prelievi.

I campioni analizzati provenivano da 50 trincee di cui 25 a consumo estivo e 25 invernale e 23 cumuli di cui 16 invernali e 7 estivi. I mais campionati sono stati seminati in prima epoca (dal 25 marzo), dopo loglio italoico (dal 10 maggio) e dopo orzo (dal 1° giugno) e sono stati raccolti dal 23 agosto al 29 settembre per la prima epoca e dal 12 settembre al 30 ottobre per i secondi raccolti. Gli ibridi rappresentati sono stati 34, appartenenti alle classi FAO 500, 600 e 700. Il contenuto in sostanza secca degli insilati è variato dal 25,5 al 41,4%, con pH nelle zone centrali da 3,4 a 3,9.

La determinazione delle micotossine è stata realizzata mediante saggio immunoenzimatico ELISA. Per l'estrazione delle micotossine dai campioni di insilati, caratterizzati da bassi valori di pH, è stato utilizzato un protocollo specifico messo a punto nel corso di questa sperimentazione. Tutte le determinazioni analitiche sono state svolte in doppio.

Le unità di misura in cui sono espresse le concentrazioni dell'aflatoxina B₁ e dello zearalenone sono parti per bilione (ppb), corrispondenti alla concentrazione (g/kg di sostanza secca, mentre la fumonisina B₁ è espressa in parti per milione (ppm), corrispondente alla concentrazione di µg/kg di sostanza secca (vedi riquadro soprastante). I valori medi riportati nelle tabelle che seguono sono stati calcolati come media geometrica, cioè come media dei corrispondenti valori del logaritmo in base 10 più 1. I valori medi così ottenuti sono stati riportati all'unità di misura originale applicando l'antilogaritmo e sottraendo 1.

Tabella 2 - Temperatura media e pioggia cumulata mensile nel periodo colturale dei due anni di prova (*)

	2000		2001	
	temperatura (°C)	pioggia (mm)	temperatura (°C)	pioggia (mm)
Aprile	11,6	171	11,1	10
Maggio	17,9	109	17,9	183
Giugno	21,1	91	20,1	8
Luglio	20,5	35	22,3	25
Agosto	21,8	69	22,8	36
Settembre	17,7	168	14,7	37
Ottobre	12,4	148	14,4	45

(*) Pianura Padana occidentale - Carmagnola (Torino).

Tabella 5 - Contenuto in zearalenone ($\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.) (*)

	Media	Massimo	Minimo
2000			
Foraggio alla raccolta	26,3	503,1	0,5
Insilato - zona centrale	44,5	833,0	1,8
Insilato - zona periferica	34,5	1.481,3	0,9
2001			
Foraggio alla raccolta	12,6	273,7	0
Insilato - zona centrale	19,7	257,1	0
Insilato - zona periferica	15,2	461,6	0

(*) Nel foraggio alla raccolta, nell'insilato perfettamente conservato (zona centrale) e nell'insilato a rischio di deterioramento aerobico (zone periferiche, angoli e «cappello»).

Contaminazione da micotossine del trinciato integrale di mais alla raccolta e nel silo

I due anni considerati nell'indagine sono risultati diversificati per quanto riguarda la piovosità nel periodo tardo estivo-autunnale (da metà settembre a fine ottobre) (tabella 2). Il 2000 è stato caratterizzato da piogge abbondanti (circa 300 mm), mentre il 2001 è risultato più asciutto (circa 80 mm).

Le micotossine degli insilati di mais possono derivare sia dalla contaminazione della granella e degli stocchi che si verifica in campo, sia dallo sviluppo di funghi che si verifica durante la fase di conservazione. Per questo motivo è importante disporre delle analisi delle micotossine, oltre che dell'insilato al momento del consumo, anche del foraggio al momento dell'insilamento.

Nella tabella 3 sono riportati i valori di contaminazione da aflatoxina B₁ riscontrati nelle due annate nelle 20 aziende visitate. Il foraggio alla raccolta presentava un valore medio di 1,1 e 1,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s. rispettivamente nel 2000 e 2001, mentre nelle zone centrali degli insilati i valori medi sono stati di 2,2 e 1,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s. Le zone periferiche presentavano valori medi di 3,0 e 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s. Mentre nei valori del 2001 non si osservano sostanziali variazioni nel livello di contaminazione nelle diverse zone del silo rispetto ai trinciati verdi, nel 2000 gli insilati presentavano con-

Tabella 3 - Contenuto in aflatoxina B₁ ($\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.) (*)

	Media	Massimo	Minimo
2000			
Foraggio alla raccolta	1,1	3,5	0
Insilato - zona centrale	2,2	5,8	0
Insilato - zona periferica	3,0	4,9	1,0
2001			
Foraggio alla raccolta	1,6	3,6	0
Insilato - zona centrale	1,4	3,2	0
Insilato - zona periferica	1,5	3,0	0

(*) Nel foraggio alla raccolta, nell'insilato perfettamente conservato (zona centrale) e nell'insilato a rischio di deterioramento aerobico (zone periferiche, angoli e «cappello»).



1 - Le zone prossime alle pareti sono quelle più a rischio di deterioramento aerobico e possono essere sito di moltiplicazione di funghi produttori di micotossine.

2 - Quando l'insilato presenta zone ammuffite è fondamentale scartare le parti deteriorate, ricordandosi che le zone contaminate molte volte si approfondiscono su aree maggiori di quelle visibilmente alterate

Tabella 4 - Contenuto in fumonina B₁ (mg/kg s.s.) (*)

	Media	Massimo	Minimo
2000			
Foraggio alla raccolta	2,1	12,3	0
Insilato - zona centrale	2,5	13,7	0
Insilato - zona periferica	2,7	11,4	0,5
2001			
Foraggio alla raccolta	5,2	10,6	0
Insilato - zona centrale	4,2	17,0	1,5
Insilato - zona periferica	4,4	15,1	1,3

(*) Nel foraggio alla raccolta, nell'insilato perfettamente conservato (zona centrale) e nell'insilato a rischio di deterioramento aerobico (zone periferiche, angoli e «cappello»).



tenuti di AFB₁ mediamente superiori, con massimi osservati nelle zone centrali fino a 5,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s. Nel 2000 tutti i campioni prelevati nelle zone periferiche del silo contenevano almeno 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.

In un'indagine svolta nel Nord Italia su 533 campioni di granella di mais raccolti in cinque anni (1995-1999), Pietri e Piva (2000) riportano che l'AFB₁ era presente nel 43% dei campioni con un valore medio $1,7 \pm 10,2 \mu\text{g}/\text{kg}$ s.s., mentre l'8,5% dei campioni presentava valori superiori a 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s., con un valore massimo pari a 158 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s. Da un'indagine svolta a livello aziendale in Lombardia (Amodeo, 2001) risulta che i valori di AFB₁ nel silomais sono stati mediamente pari a 0,15 ppb sul tal quale (corrispondenti a circa 0,45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.) e solo in pochi casi sono stati osservati inquinamenti superiori a 1 ppb sul tal quale (circa 3,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.).

Dai nostri dati emerge che, oltre ad alcuni insilati con valori di aflatoxina prossimi o superiori ai valori massimi

ammisibili per legge negli alimenti per uso zootecnico (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.), il 15% dei silomais analizzati presentava un valore medio superiore a 4,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s. Tale valore determina, in razioni con almeno 25 kg di silomais tal quale/capo/giorno, una potenziale ingestione giornaliera nelle vacche ad alta produzione di oltre 40 μg per capo, che si traduce in un rischio di contaminazione da aflatoxina M₁ nel latte, superiore ai limiti consentiti (50 ng/kg). Amodeo (2001) suggerisce che l'inquinamento da AFB₁ nel silomais debba tendenzialmente rimanere sotto i 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s. (circa 0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di insilato tal quale).

Per quanto riguarda la fumonina B₁ i valori medi (tabella 4) determinati nel foraggio alla raccolta sono stati pari a 2,1 e 5,2 mg/kg s.s. rispettivamente per i due anni, comunque decisamente al di sotto dei 60 mg/kg s.s. (ppm) considerati pericolosi per i bovini. Negli insilati non sussiste evidenza di variazioni significative rispetto ai contenuti del foraggio alla raccolta, neanche nelle aree periferiche.

Grafico 1 - Contenuti di zearalenone ($\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.) nei trinciati di mais in relazione all'epoca di raccolta

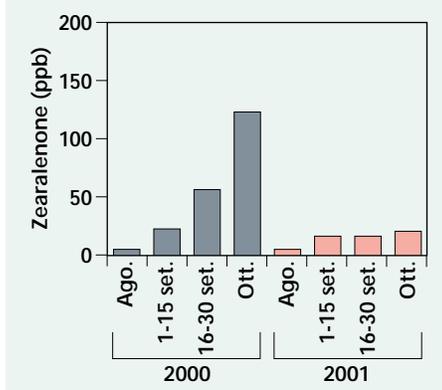


Grafico 2 - Contenuti di fumonisina B₁ (mg/kg s.s.) nei trinciati di mais in relazione all'epoca di raccolta

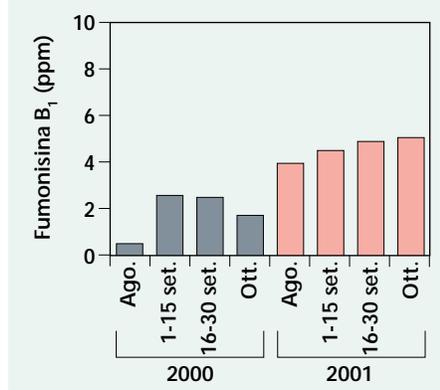
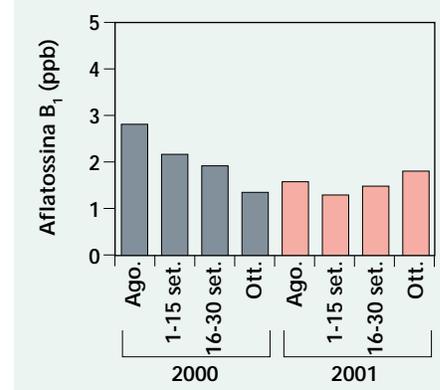


Grafico 3 - Contenuti di aflatoxina B₁ ($\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.) nei trinciati di mais in relazione all'epoca di raccolta



Pietri e Piva (2000) riportano che la FB₁ è risultata sempre presente in tutti i campioni analizzati e il suo contenuto nella granella di mais è variato da 0,06 a 51,7 mg/kg s.s., con un valore medio pari a 3,1 mg/kg s.s. Il 70% dei campioni presentava valori superiori a 1 mg/kg s.s., ma solo il 17% superiori a 5 mg/kg s.s.. Nel 1999 i campioni con valori superiori a 5 mg/kg s.s. sono saliti a oltre il 45%, soprattutto a causa delle condizioni climatiche calde e secche della stagione. Reyneri *et al.* (2001), in un'indagine in Piemonte sulla granella di mais, riportano contenuti in FB₁ variabili da 0,01 a 5,07 mg/kg s.s., con valori che nel 67% dei casi sono risultati inferiori a 1 mg/kg s.s. e soltanto nel 13% dei casi superiori a 2 mg/kg s.s.

In *tabella 5* sono riportati i valori medi relativi al contenuto in zearalenone. Per quanto riguarda i foraggi alla raccolta sono evidenti contaminazioni differenti tra i due anni con valori più elevati nel 2000. Per questa micotossina è importante rilevare l'elevata variabilità riscontrata nei campioni alla raccolta, con valori compresi tra 0,5 a 503,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s. nell'anno 2000 e tra 0 e 273,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s. nell'anno 2001. I maggiori valori riscontrati nel 2000 confermano la maggiore presenza di questa micotossina nelle annate più umide, più favorevoli allo sviluppo delle specie di *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum*.

Questa variabilità di contaminazione si amplia ulteriormente negli insilati soprattutto nelle aree periferiche fino a massimi di 1.481 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s., valore dalle 3 alle 5 volte superiore a quello considerato preoccupante per i bovini da latte. Da notare che circa il 10% degli insilati nelle aziende visitate presentava, anche nelle zone centrali, contenuti di zearalenone superiori a 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.

I valori medi riscontrati sono tuttavia inferiori a quelli osservati in Lombardia da Amodeo (2002), che riporta valori medi per la granella di mais intorno a 50 ppb (su 203 campioni) e per l'insilato di mais di circa 150 ppb (189 campioni). Pietri e Piva (2000) riportano un valore medio di zearalenone pari a 451 ppb, con oltre il 14% dei campioni oltre 1.000 ppb nell'annata più umida e molto piovosa, mentre in tutti gli altri anni in più del 95% dei casi la micotossina è risultata al di sotto dei livelli di rilevanza. Reyneri *et al.* (2001) hanno riportato per la granella di mais valori compresi tra 0 e 120 ppb (160 campioni), con valori al di sopra di 100 ppb soltanto nel 3% dei casi. I valori più bassi osservati per la granella confermano che la micotossina può essere più problematica negli insilati in quanto viene prodotta principalmente sullo stocco.

Gli elevati livelli di contaminazione osservati in alcuni casi sono sufficienti per ipotizzare la probabile presenza di problemi di salute in animali alimentati per periodi prolungati con questi insilati. Studi compiuti in Nuova Zelanda su vacche al pascolo hanno dimostrato l'elevata relazione tra contenuto di zearalenone nel sangue e bassa efficienza riproduttiva (Sprosen *et al.*, 1995). Diete contenenti mediamente 400 ppb di zearalenone determinavano negli animali un tasso di presenza della micotossina nel sangue pari a 1,14 ppb e un insuccesso nella fecondazione del 30%, anche dopo interventi ripetuti.

Benché alcuni studi americani (Mirocha *et al.*, 1981; Prelusky *et al.*, 1990) evidenzino il rischio di passaggio dello zearalenone nel latte, le quantità di questa micotossina o suoi metaboliti più tossici (α - e β -zearalenolo) generalmente non costituiscono un problema per la salute umana, in quanto il trasfe-

rimento nel latte può raggiungere un massimo dello 0,7% della quantità ingerita giornalmente dall'animale.

Contaminazione da micotossine in relazione all'epoca di raccolta

Tra i parametri che maggiormente influenzano il grado di contaminazione da micotossine di un insilato figurano il momento di raccolta e l'andamento climatico della stagione vegetativa. Nell'anno 2000, caratterizzato da elevata piovosità nei mesi di settembre e ottobre (*tabella 2*), si è osservato un aumento del contenuto di zearalenone del trinciato da valori inferiori a 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s. per gli ibridi raccolti entro il 15 settembre a valori superiori a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s. per quelli raccolti in ottobre (*grafico 1*). Nel 2001, con settembre e ottobre non piovosi, il contenuto di zearalenone è rimasto al di sotto dei 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s. durante tutto il periodo di raccolta del silomais. Anche in questo anno esiste comunque un'evidenza dell'aumento di zearalenone con l'epoca di raccolta; infatti il numero di campioni in cui lo zearalenone risultava assente (cioè sotto il livello di rilevanza) è passato dal 47% nelle raccolte a fine agosto al 28% in quelle a fine ottobre.

Studi condotti nel Wisconsin (Rankin e Grau, 2002) indicano che ritardare la raccolta dell'insilato di mais aumenta il rischio da micotossine (zearalenone, fumonisina e DON), per il crearsi di condizioni ottimali allo sviluppo dei *Fusarium*, quali l'elevata escursione termica tra il giorno e la notte (tra 7 e 24 °C) e l'invecchiamento dei tessuti della pianta dovuti alla maturazione.

Per la fumonisina B₁ e l'aflatoxina B₁ non ci sono evidenze di variazioni significative in relazione all'epoca di raccolta (*grafici 2 e 3*). Solo nel 2000 la contaminazione da AFB₁ mostra

Figura 1 - Contenuti di zearalenone ($\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.) (*)

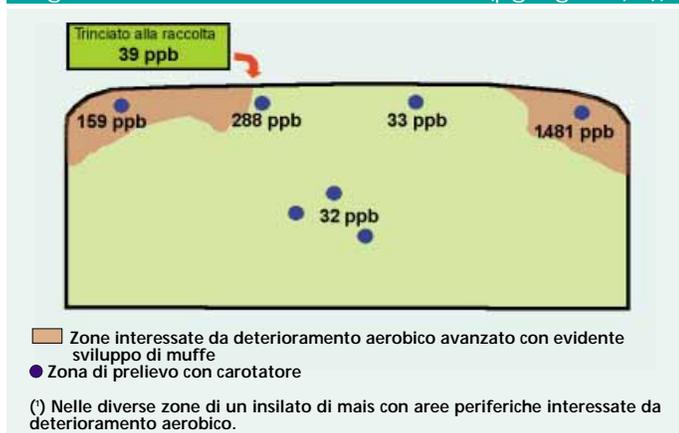


Figura 2 - Contenuti di alfatossina B₁ ($\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.) (*)

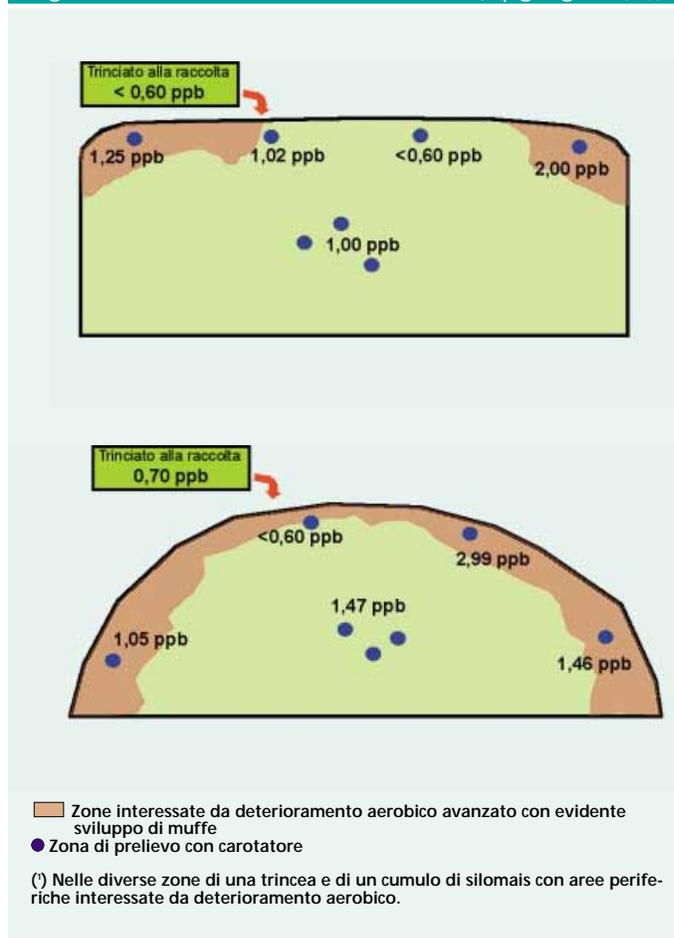
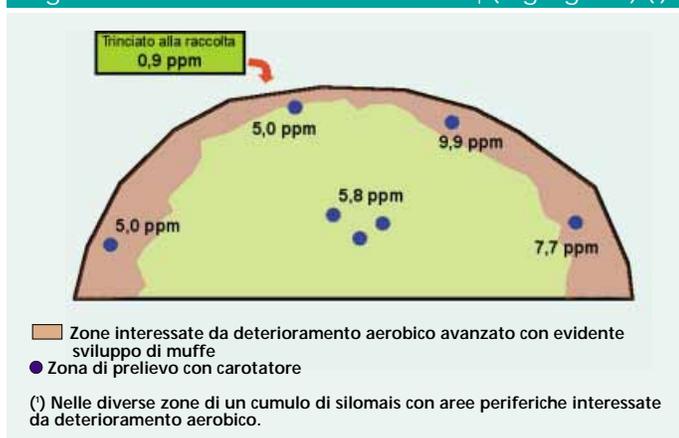


Figura 3 - Contenuti di fumonisina B₁ (mg/kg s.s.) (*)



una lieve tendenza alla diminuzione con l'avanzare della stagione. Maggiori contenuti di aflatoxina nei mais raccolti a fine agosto possono essere spiegati dal fatto che l'infezione del mais da *Aspergillus flavus* avviene attraverso le setole della pannocchia quando le temperature, incluse quelle notturne, sono alte e associate a stress idrici (Betrán e Isakeit, 2002). Questo significa che un mais che fiorisce e raggiunge l'antesi con condizioni ambientali di stress è più a rischio di contaminazione da aflatoxine. Un mais seminato dalla terza decade di maggio in avanti potrebbe avere meno probabilità di subire stress idrici associati a picchi di calore nella fase della fioritura: ciò spiegherebbe in parte, per l'anno 2000, i minori contenuti in aflatoxina dei mais raccolti più avanti nella stagione.

Va rilevato che dai nostri dati emerge che contaminazioni più alte si hanno con ibridi a ciclo lungo (FAO 700) seminati in seconda epoca. Mentre sembra che ibridi più precoci siano meno soggetti a contaminazioni. È evidente l'esigenza di scegliere con grande attenzione la classe dell'ibrido in relazione all'epoca

di semina, ricordando comunque che anche tra gli ibridi di una stessa classe esistono notevoli differenze di sensibilità allo sviluppo di micotossine, come evidenziato da molte ricerche italiane e straniere. A oggi però non si hanno dati sufficienti per fornire indicazioni complete relative agli ibridi in commercio delle diverse ditte sementiere.

Variazioni nel contenuto di micotossine in relazione al deterioramento aerobico degli insilati

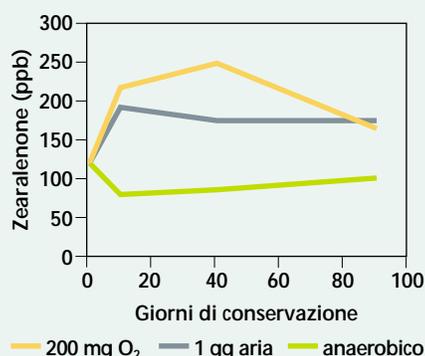
Al fine di evidenziare variazioni nel contenuto di micotossine causate da fenomeni di deterioramento aerobico degli insilati, in alcune delle aziende visitate sono stati prelevati campioni durante il consumo degli insilati in diverse aree del fronte di taglio.

Per quanto riguarda lo zearalenone si è potuto constatare un evidente aumento nel livello di contaminazione delle zone periferiche interessate da deterioramento aerobico (figura 1). In particolare viene riportato l'esempio di una trincea di mais di secondo raccolto consumata durante il perio-

do estivo con un avanzamento medio del fronte di circa 90 cm alla settimana. Nelle zone periferiche evidentemente deteriorate sono stati osservati valori fino a 40 volte superiori a quelli del foraggio in entrata, mentre nelle zone centrali e nelle aree non deteriorate i valori si sono mantenuti simili a quelli del trinciato alla raccolta. Elevati contenuti di zearalenone sono stati osservati anche in aree prossime a quelle con ammuffimenti evidenti. Queste zone, che solitamente non vengono scartate, erano interessate da forti innalzamenti termici (> 30 °C), indice di un'elevata attività microbica in atto.

Studi svolti in Germania su insilati di mais (Oldenburg, 1991) evidenziano come i livelli di zearalenone possano variare all'interno del silo (grafico 4). In particolare risulta molto influente il grado di anaerobiosi raggiunto. In insilati sigillati con cura immediatamente dopo il riempimento del silo non si registrano variazioni del contenuto di zearalenone (linea verde), mentre nel caso di ritardi nella chiusura, anche di un solo giorno (linea grigia), si verificano degli aumenti notevoli di questa micotossina. Se addirittura si analizza-

Grafico 4 - Variazione nella concentrazione di zearalenone ($\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s.) (*)



(*) Durante la conservazione di insilati di mais soggetti a diversi livelli di aerazione.
Fonte: modificato da Oldenburg, 1991.



Elevati quantitativi di insilato di mais utilizzati in razione (fino al 50% della sostanza secca ingerita) possono determinare ingestioni giornaliere di micotossine prossime o superiori ai livelli considerati critici per la salute dell'animale e per il trasferimento dell'aflatossina nel latte

no insilati in cui vengono infuse continuamente piccole dosi di ossigeno (pari a 200 mg O₂/kg s.s. per giorno), lo zearalenone tende ad aumentare ulteriormente (linea gialla). Quest'ultimo trattamento sperimentale, apparentemente non coerente con il principio dell'insilamento, in realtà è molto importante per comprendere cosa avviene nelle aree periferiche dei silo a contatto con il film plastico. Infatti è molto difficile in condizioni pratiche avere un ambiente completamente anaerobico nelle aree periferiche. Per questi motivi dobbiamo mettere in atto tutte le pratiche necessarie a prevenire il deterioramento aerobico, come già ampiamente discusso nei due lavori pubblicati l'anno scorso su questa rivista (Borreani *et al.*, 2002; Tabacco e Borreani, 2002).

Sebbene in ambienti subtropicali siano stati osservati contenuti in AFB₁ in insilati di mais prossimi a 5.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s. (Kalac e Woolford, 1982), in letteratura non ci sono indicazioni univoche sul possibile sviluppo di *Aspergillus flavus* negli insilati di mais.

In alcune situazioni aziendali si sono osservate lievi variazioni nel contenuto in AFB₁ tra il foraggio alla raccolta e quello prelevato nelle diverse zone del silo. In *figura 2* sono riportati a titolo di esempio due insilati di secondo raccolto trinciati all'inizio di ottobre e utilizzati nel periodo estivo: uno in trincea (descritta per lo zearalenone) e l'altro in cumulo, caratterizzato da scarsa compattazione e avanzamento medio settimanale di circa 67 cm. Si può osservare che il contenuto di AFB₁ è risultato simile o leggermente superiore rispetto a quello alla raccolta nelle diverse zone del silo, raggiungendo 2,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s. nella trincea e

2,99 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.s. nel cumulo.

Sui campioni prelevati dallo stesso cumulo descritto al paragrafo precedente, anche la fumonisina B₁ ha mostrato concentrazioni diversificate nelle diverse zone del silo (*figura 3*). Sia nelle aree centrali che in quelle periferiche i valori risultavano essere dalle 5 alle 10 volte superiori a quello del foraggio alla raccolta, benché sempre al di sotto dei limiti di pericolosità per i bovini.

Conclusioni

Dall'indagine effettuata nell'ambito del Progetto finanziato dalla Regione Piemonte emerge che gli insilati di mais in alcune condizioni possono essere a rischio per quanto riguarda la contaminazione da zearalenone e, in misura minore, da aflatossina B₁. Infatti gli elevati quantitativi di questo foraggio utilizzati in razione (fino al 50% della sostanza secca ingerita) possono determinare ingestioni giornaliere di micotossine prossime o superiori ai livelli considerati critici per la salute dell'animale. Le situazioni più problematiche sembrano essere quelle connesse a insilati che presentano estese aree soggette a deterioramento aerobico. È stato osservato che, a seguito di penetrazione di aria nel silo durante la conservazione o nelle fasi di consumo, si sono verificati aumenti considerevoli nel contenuto di zearalenone.

Poiché le contaminazioni che provengono dal campo in alcuni casi sono risultate problematiche, è assolutamente indispensabile prevenire l'ulteriore moltiplicazione nel silo, dei funghi tossigeni, adottando tutte le precauzioni atte a ridurre la penetrazione di aria nel silo, sia durante

la conservazione sia con una corretta gestione delle fasi di consumo. In ogni caso quando l'insilato presenta zone ammuffite è fondamentale scartare le parti deteriorate, ricordandosi che le zone contaminate molte volte si approfondiscono su aree maggiori di quelle visibilmente alterate.

Giorgio Borreani

Ernesto Tabacco

*Dipartimento di agronomia,
selvicoltura e gestione del territorio
Università di Torino*

E-mail: giorgio.borreani@unito.it

E-mail: ernesto.tabacco@unito.it

Laura Cavallarín

*Istituto di scienze delle produzioni
alimentari, Ispa - Cnr*

E-mail: laura.cavallarín@ispa.cnr.it

I risultati sono stati ottenuti nell'ambito del Progetto finanziato dall'Assessorato all'ambiente, qualità e agricoltura della Regione Piemonte (referente dott. Moreno Soster): «Il deterioramento aerobico degli insilati con particolare riferimento al silomais. Indagine sulla situazione aziendale territoriale, comprendente gli effetti sulla qualità degli insilati, del latte e dei prodotti caseari e le modalità di prevenzione».

Hanno collaborato al progetto: Giorgio Borreani e Ernesto Tabacco del Dipartimento di agronomia - Università di Torino; Roberto Arru e Daniele Giaccone dell'Associazione regionale produttori latte Piemonte; Pier Giorgio Peiretti, Laura Cavallarín, Sara Antoniazzi e Maria Eugenia Valente dell'Istituto di scienze delle produzioni alimentari del Cnr. Si ringraziano il Caseificio Quaglia Vincenzo snc e gli allevatori delle aziende coinvolte per la fattiva collaborazione.

La bibliografia verrà pubblicata negli estratti.

BIBLIOGRAFIA

- Amodeo P. (2001) - *Rischio di aflatosina nel latte: linee guida per la produzione e l'acquisto di alimenti zootecnici negli allevamenti da latte*. Regione Lombardia, Quaderni della Ricerca, pp. 24.
- Amodeo P. (2002) - *Inquinamento da micotossine: la situazione negli allevamenti da latte della Lombardia*. Large Animal Review, 8 (5): 21-26.
- Auerbach H., Oldenburg E., Weissbach F. (1998) - *Incidence of Penicillium roqueforti and roquefortine C in silages*. J. Sci. Food Agric., 76: 565-572.
- Bezuidenhout S.C., Gelderblom W.C.A., Gorst-Allman C.P., Horak R.M., Marasas W.F.O., Spiteller G., Vlegaar R. (1988) - *Structure elucidation of the fumonisin mycotoxins from Fusarium moniliforme*. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 743-745.
- Betrán J., Isakeit T. (2002) - *Aflatoxin contamination of early, intermediate, and late maturing maize hybrids*. Mycopathologia, 155: 86.
- Borreani G., Tabacco E., Colombari G. (2002) - *Influenza del deterioramento aerobico degli insilati sulla qualità dei prodotti caseari*. L'Informatore Agrario, 58 (11): 57-61.
- Caggioni C., Pietri A. (1999) - *Le aflatossine nel latte: dove nasce il problema e come prevenirlo*. L'Informatore Agrario, 55 (45): 45-50.
- D'Mello J.P.F., Placinta C.M., Macdonald A.M.C. (1999) - *Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity*. Anim. Feed Sci. Technol., 80: 183-205.
- Doko M.B., Visconti A. (1993) - *Fumonisin contamination of maize and maize-based foods in Italy. Occurrence and significance of mycotoxins*. In: Scudamore K.A. (ed.), Central Science Laboratories, UK, 21-23 April, Londra, 49-55.
- Doko M.B., Rapior S., Visconti A., Schjoth J.E. (1995) - *Incidence and levels of fumonisins contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa*. J. Agric. Food Chem., 43: 429-434.
- Hussein H.S., Brasel J.M. (2001) - *Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals*. Toxicology, 167: 101-134.
- Kalac P., Woolford M.K. (1982) - *A review of some aspects of possible associations between the feeding of silage and animal health*. Br. Vet. J., 138: 305-320.
- Lacey J. (1989) - *Pre-and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of food and other stored products*. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl., 67: 11S-25S.
- Miller J.D. (1994) - *Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research*. J. Stored Prod. Res., 31: 1-16.
- Mirocha C.J., Pathre S.V., Robison T.S. (1981) - *Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk*. Food Cosmet. Toxicol., 19: 25-30.
- Oldenburg E. (1991) - *Mycotoxins in conserved forage*. In: G. Pahlow, H. Honig (eds.), Proc. Conf. Forage Conservation towards 2000. Landbauforschung Völknerode, Sonderheft, 123: 191-205.
- Pietri A., Piva G. (2000) - *Occurrence and control of mycotoxins in maize grown in Italy*. In: G. Piva, F. Masoero (eds.), Food safety: Current situation and perspectives in the European Community. Proc. 6th Int. Feed Production Conf., 27-28 Nov. 2000, Piacenza, 226-236.
- Piva G., Galvano F., Pietri A., Piva A. (1995) - *Detoxification methods of aflatoxins*. A review. Nutr. Res., 15: 767-776.
- Prelusky D.B., Scott P.M., Trenholm H.L., Lawrence G.A. (1990) - *Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows*. J. Environ. Sci. Health, B25: 87-103.
- Rankin M., Grau C. (2002) - *Agronomic consideration for moulds and micotoxins in corn silage*. Focus on Forage, 4 (1): 1-4.
- Reyneri et al. (2001) - *Contenere le micotossine nella granella di mais*. L'Informatore Agrario, 57 (47): 35-39.
- Scudamore K.A., Livesey C.T., (1998) - *Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review*. J. Sci. Food Agric., 77: 1-17.
- Sprosen J. M., Towers N.R. (1995) - *Urinary zearalenone metabolite concentrations in herds with fertility problems*. In: «Toxinology and Food Safety». Toxinology and Food Safety Research Group, Ruakura Research Centre, Hamilton, New Zealand, pp. 45-46.
- Sweeney M.J., Dobson D.W. (1998) - *Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species*. Int. J. Food Microbiol., 43: 141-158.
- Tabacco E., Borreani G. (2002) - *Contrastare il deterioramento aerobico negli insilati di mais*. L'Informatore Agrario, 58 (15): 105-111.
- Veldman A., Meijs J.A.C., Borggreve G.J., Heeres-van der Tol J.J. (1992) - *Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk*. Animal Production, 55: 163-168.
- Widstrom N.W. (1996) - *The aflatoxin problem with corn grain*. Adv. in Agron., 56: 119-280.
- Yiannikouris A., Jouany J.P. (2002) - *Mycotoxins in feed and their fate in animals: a review*. Anim. Res., 51: 81-99.