

● UNO STRUMENTO UTILE PER QUALIFICARE LA GRANELLA

Mais, analisi delle aflatossine con la Regola del cinque

di **Cristiano Concaro,**
Davide Di Benedetto,
Roberto Capurro

La filiera italiana del mais ha subito, in particolare nell'ultimo decennio, profondi mutamenti lungo tutto il suo percorso. Tali cambiamenti hanno riguardato, in misura importante, il calo delle superfici investite e, conseguentemente, le dinamiche riguardanti i flussi di mercato di questo cereale.

Il cambiamento climatico, la grande variabilità degli ambienti di coltivazione, i limiti stringenti della normativa riguardante i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari (regolamento CE 1881/2006), assieme a una frammentazione tipica del nostro tessuto agricolo, hanno alquanto condizionato le scelte a tutti i livelli della filiera.

Parallelamente, **la presenza di una normativa inerente al campionamento e all'analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari (regolamento CE 401/2006), necessariamente articolata e quanto mai complessa, ha rappresentato un ulteriore ostacolo nel percorso di una qualificazione della merce, certa e condivisa.**

Ritenendo il regolamento CE 401/2006 di difficile applicazione nella gran parte delle realtà operanti lungo la filiera maicicola italiana e nell'intento di armonizzare un'innumerabile serie di metodi self-made che ogni operatore ha dovuto necessariamente adottare al proprio interno, abbiamo deciso di creare un protocollo di campionamento e preparazione del campione che fosse rigoroso e, nel contempo, facilmente applicabile.

Questa necessità è figlia di una serie di situazioni legate tanto agli aspetti normativi quanto alle consuetudini, nonché alle prescrizioni operative, legate alla gestione del prodotto «mais»; prima ancora, però, a incidere in maggior misura nella ricerca di una procedura chiara e semplice è la natu-



IN BREVE: La Regola del cinque è uno strumento di qualificazione del mais, relativamente al parametro aflatossine, di facile ed efficiente applicazione che, per unità di consegna fino a 30 T, prevede il prelievo di almeno 5 campioni elementari a formare un campione finale di almeno 5 kg, integralmente macinato, dal quale prelevare almeno 5 aliquote per costituire il quantitativo da sottoporre ad analisi. La sua applicazione permette di migliorare le criticità di un sistema di analisi complicato che prevede un campione di laboratorio convenzionalmente costituito (0,5-1 kg) altamente insufficiente e certamente inadatto alla ricerca dell'aflatossina.

ra stessa del contaminante ricercato. **L'aflatossina B1, metabolita secondario di *Aspergillus flavus* e di *Aspergillus parasiticus*** (Campbell e White, 1995; Wagacha e Muthomi, 2008), è **caratterizzata da un'estrema variabilità relativamente alla sua distribuzione in campo e, di conseguenza, all'interno della massa da campionare.** Tutto ciò ha un peso importante nella gestione, e qualificazione, del prodotto in fase di ricezione presso i centri di stoccaggio, maggiormente trattandosi di mais da sottoporre ad essiccazione. I tempi, gli strumenti, la disponibilità di informa-

zioni agronomiche sulla fase di campo, assieme a questioni organizzative ed economiche, fanno di questa fase operativa uno snodo cruciale.

È bene, quindi, ricordare che, **ai fini della corretta valutazione di una partita di mais, l'analisi del contaminante fungino rappresenta solamente l'ultimo passaggio;** nel caso in cui sia praticabile e nel tentativo di evitare errori insiti nella valutazione delle aflatossine del mais, sarebbe opportuno adottare un iter che, partendo dal monitoraggio in campo (Capurro et al., 2012) e passando anche tramite l'osser-



Com'è stata impostata la sperimentazione

Questo studio articola il proprio percorso tra le seguenti fasi:

- campionamento;
- osservazione;
- preparazione del quantitativo da saggiare;
- analisi.

Gli step sopra citati vengono affrontati secondo un protocollo denominato, d'ora in poi, «**Regola dei cinque**» (tesi A1, B1), finalizzato a semplificare la normativa di riferimento, mantenendone il rigore scientifico. Accanto a questo, è stata strutturata una tesi parallela «testimone» (tesi A2, B2), a scopo di confronto e validazione del metodo.

Operativamente, sono stati sottoposti alla sperimentazione due lotti di mais nazionale in granella (A e B), rappresentati da ciò che commercialmente si identifica, con maggior frequenza, con l'unità di consegna, ovvero un autotreno da circa 30 tonnellate. In entrambi i casi, il lavoro si è svolto come di seguito dettagliato.

CAMPIONAMENTO

Per ogni unità di consegna, fino a 30 t circa, costituire il **campione globale** (CG) prelevando almeno 5 **campioni elementari** (CE), distribuiti, nel modo più rappresentativo possibile, all'interno della massa. Da questo, previa omogeneizzazione della granella, costituire un **campione finale** (CF) di almeno 5 kg, coincidente con il **campione di laboratorio** (CL).

OSSERVAZIONE

Dopo aver omogeneizzato la granella del **campione globale**, effettuare almeno 5 osservazioni accurate alla lampada di Wood (ad esempio Monitox 500 - Isoelectric), annotando tutte le precise risultanze delle osservazioni. Questo consente, una volta calibrato il metodo associando osservazioni e risultati analitici, di avere un'idea preliminare dello stato sanitario della granella.

PREPARAZIONE DEL QUANTITATIVO DA SAGGIARE

Per la preparazione del **quantitativo da saggiare** (QS), macinare integralmente i 5 kg del **campione di laboratorio**, omogeneizzare accuratamente e prelevare la farina in almeno 5 punti del campione, fino alla costituzione del quantitativo previsto dallo standard analitico utilizzato.

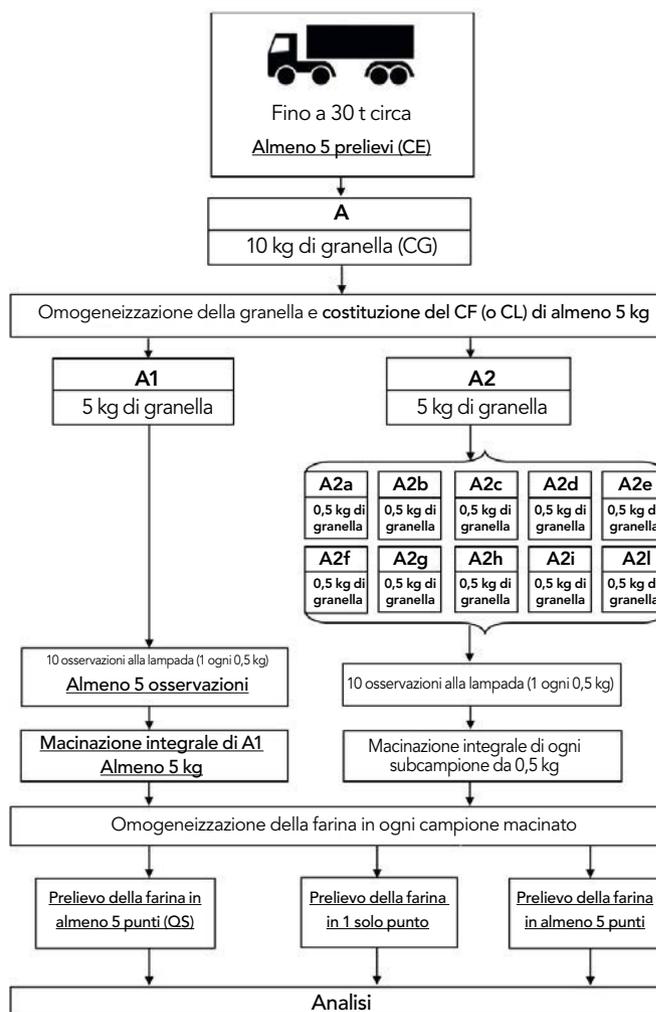
ANALISI

Le analisi chimiche sono state svolte dal laboratorio Cadir Lab, secondo la metodica interna accreditata identificata con il codice MIP 55 R08 2020.

Nel caso dei due lotti in questione, A e B, si è operato secondo lo schema riportato in *figura 1* (relativo al lotto A). Il percorso della tesi A1, rappresenta il protocollo Regola del cinque, mentre A2 è la tesi di confronto. Stesso principio è stato applicato al lotto B.

Limitatamente al lotto A, è stato effettuato il prelievo in 5 punti anche sui subcampioni da 0,5 kg della tesi A2, per la costituzione del quantitativo da saggiare come indicato in *figura A*; tutto ciò al fine di valutare il peso di questo singolo passaggio sulla distribuzione finale dei risultati ana-

FIGURA A - Diagramma sperimentale Regola del cinque (A1) e tesi di confronto (A2)



litici, rispetto al singolo prelievo. I dati ottenuti sono stati oggetto di valutazione per lo studio e la validazione del protocollo.

Spunti importanti di riflessione sull'impostazione del piano di campionamento sono altresì offerti da un interessante strumento, disponibile sul sito della Fao (Food and agriculture organization delle Nazioni Unite), denominato Mycotoxin Sampling Tool (Fao, 2014); questo permette, inserendo differenti valori nei campi preimpostati, di osservare la varianza associata a ogni scelta e, ancor meglio, di confrontare diversi piani di campionamento, visualizzandone i risultati nello stesso grafico. La Fao definisce così, testualmente, il sopra citato strumento: «Questo strumento di campionamento delle micotossine fornisce supporto nell'analisi delle prestazioni dei piani di campionamento e nella determinazione del piano di campionamento delle micotossine più appropriato per ridurre al minimo il rischio di errata classificazione dei lotti».

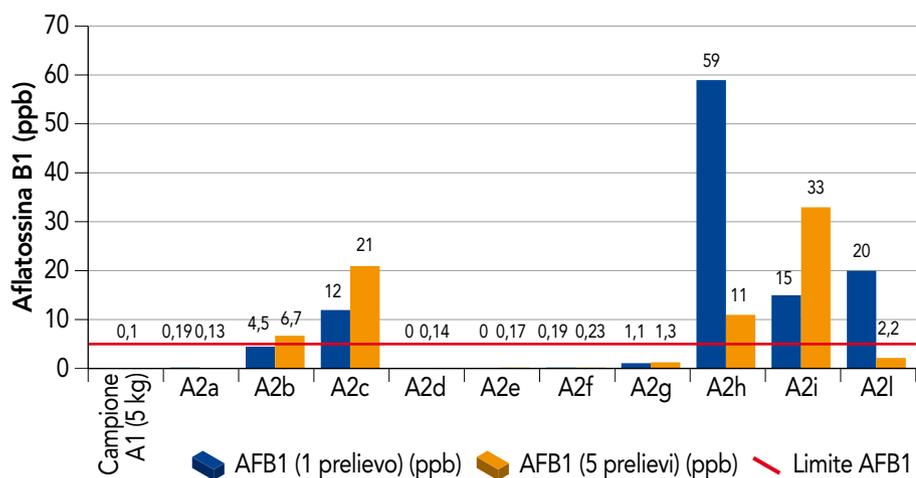
TABELLA 1 - Risultati analitici del contenuto di aflatoxine (AFB1) nel mais nel campione A (1)

| | Campione A1 (5 kg) | Campioni A2 (10 x 0,5 kg) | | | | | | | | | | Media A2 | Varianza A2 | Dev. std. A2 |
|-------------------------|--------------------|---------------------------|-----|-----|------|------|------|-----|-----|-----|-----|----------|-------------|--------------|
| | | A2a | A2b | A2c | A2d | A2e | A2f | A2g | A2h | A2i | A2l | | | |
| AFB1 (1 prelievo) (ppb) | – | 0,19 | 4,5 | 12 | 0 | 0 | 0,19 | 1,1 | 59 | 15 | 20 | 11,2 | 335,29 | 18,31 |
| AFB1 (5 prelievi) (ppb) | 0,1 | 0,13 | 6,7 | 21 | 0,14 | 0,17 | 0,23 | 1,3 | 11 | 33 | 2,2 | 7,59 | 125,21 | 11,19 |

Il valore soglia delle aflatoxine è di 5 ppb. – = rilievo non previsto

(1) A1 = Regola del cinque; A2 = tesi di confronto testimone.

GRAFICO 1 - Analisi del contenuto di aflatoxina B1 nel lotto A



Nel grafico si può notare l'estrema variabilità del contenuto di AFB1 nei campioni da 0,5 kg (sia con 1 prelievo della farina sia con 5), condizionata in maggior misura dal volume ridotto del campione finale stesso.

vazione del campione alla lampada di Wood, aggiungesse informazioni ed elementi utili alla più chiara e sicura definizione del lotto in esame. Per questo motivo, ed essendo ad ogni passaggio associata una certa variabilità e un conseguente margine d'errore, allo schema di indagine classico «campionamento – preparazione del campione – analisi» sarebbe consigliabile sostituire con «monitoraggio – campionamento – osservazione – preparazione del campione – analisi».

Più nel dettaglio, **la fase di monitoraggio, che richiede un background agronomico oltre che una buona esperienza pratica, può rivelare indicazioni importanti inerenti alla sanità della coltura e, di conseguenza, aggiungere elementi essenziali alla valutazione della partita.**

Allo stesso modo, **l'osservazione del campione alla lampada di Wood, se opportunamente impostata e calibrata, associandola di volta in volta al valore analitico, aggiunge un dettaglio di grande importanza e utilità nel percorso della corretta e più rapida qualificazione della merce.**

In sintesi, e vista la natura del contaminante ricercato, oltre che del substrato, più numerosi sono gli aspetti approfonditi, maggiore è la probabilità di una corretta valutazione.

Il presente lavoro, esaminando sia le criticità legate alla micotossina oggetto di ricerca che del substrato «mais», oltre che le peculiarità del sistema commerciale, si pone l'ambizioso obiettivo di **sviluppare un protocollo che, unendo rigore e semplicità, possa costituire una base operativa su cui lavorare, a beneficio dell'intero comparto e della coltivazione del mais nazionale.**

Risultati sui due campioni testati

Dal confronto delle analisi chimiche effettuate sui due campioni testati, seppur limitandoci all'osservazione della riga corrispondente alla metodica con «1 prelievo» (all'interno delle tesi A2 e B2), si evince quanto i due lotti fossero significativamente differenti. Considerando il valore soglia di 5 ppb, nel caso del lotto A, i valori analitici dei

10 subcampioni appartenenti alla tesi A2 oscillano entro un intervallo molto ampio, che ricopre tutte le categorie commerciali in cui può ricadere la granella di mais. Invece, analizzando la tesi B2, si può notare una variabilità minima degli esiti, comunque ampiamente compresa entro i 5 ppb.

La variabilità riscontrata nel lotto A, ben evidente nel grafico 1, rappresenta di fatto una casistica molto frequente nell'ampio panorama della maiscoltura nazionale; in alcune zone climatiche più che in altre, il microclima di campo e la disomogeneità degli ambienti di coltivazione amplificano la distribuzione cosiddetta «a macchia di leopardo» del metabolita fungino, creando svariate difficoltà nel percorso di qualificazione dei lotti in questione.

Nel caso del lotto B, vista la minima variabilità riscontrata anche a livello di subcampioni, l'influenza della procedura utilizzata in fase di campionamento e preparazione del campione risulta quasi ininfluente ai fini della corretta qualificazione della partita in esame. Di tale uniformità si ha conferma anche osservando il grafico 2.

In dipendenza di tutte le questioni sopra enunciate, legate alla natura del metabolita, alla matrice e alla variabilità degli ambienti colturali, la distribuzione dei numeri più frequentemente rappresentata è assimilabile a quella del lotto A.

In futuro, al fine di approfondire ulteriormente il presente lavoro, sarebbe

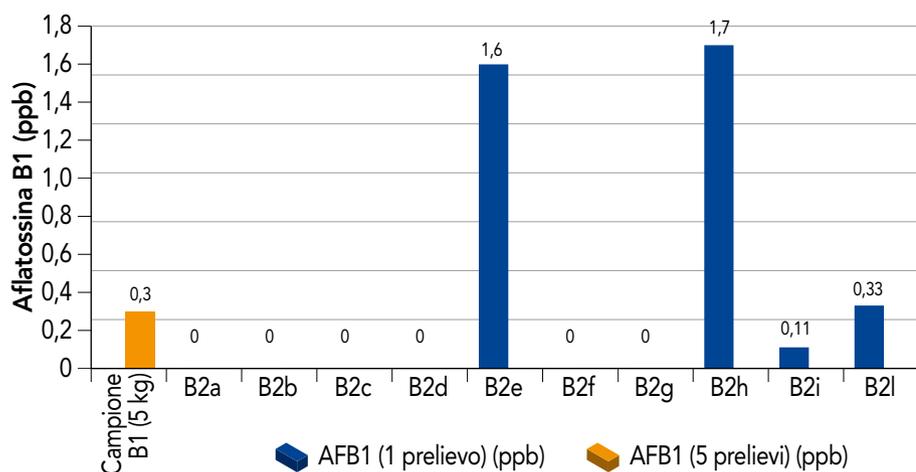


TABELLA2 - Risultati analitici del contenuto di aflatoxine (AFB1) nel mais nel campione B (1)

| | Campione B1 (5 kg) | Campioni B2 (10 x 0,5 kg) | | | | | | | | | | Media B2 | Varianza B2 | Dev. std. B2 |
|-------------------------|-----------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-------------|----------------|-----------------|
| | | B2a | B2b | B2c | B2d | B2e | B2f | B2g | B2h | B2i | B2l | | | |
| AFB1 (1 prelievo) (ppb) | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,6 | 0 | 0 | 1,7 | 0,11 | 0,33 | 0,37 | 0,46 | 0,68 |
| AFB1 (5 prelievi) (ppb) | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Il valore soglia delle aflatoxine è di 5 ppb. - = rilievo non previsto
(1) B1 = Regola del cinque; B2 = tesi di confronto testimone.

GRAFICO 2 - Analisi del contenuto di aflatoxina B1 nel lotto B



Il valore soglia delle aflatoxine è di 5 ppb.

In questo caso, vista l'omogeneità del lotto, l'influenza dei parametri in osservazione (volume campione finale e numero di prelievi) sulla variabilità dei risultati, si riduce significativamente.

utile effettuare un numero maggiore di rilievi sul campione di riferimento del protocollo (5 kg) e sottoporre gli esiti ad analisi statistica.

Uno strumento fruibile dalla filiera mais

Il lavoro sperimentale svolto si pone l'obiettivo di imbastire un protocollo e stimolare riflessioni, relativamente alla fase più delicata nel percorso di qualificazione della granella di mais, per il parametro aflatoxine, ovvero il

campionamento e la preparazione del campione.

Consci che la fase di prelievo e formazione del campione sia già ben definita scientificamente, ma altrettanto consapevoli del fatto che buona parte degli operatori cerchi di snellire una metodica di difficile attuazione, **si è cercato di costituire una procedura che, basandosi sulle peculiarità di matrice e analita ricercato, riducesse al minimo il margine di errore.**

Dimensione del campione globale, quantitativo macinato e numero di prelievi a costituire il quantitativo da saggiare devono necessariamente rispettare le peculiarità sopra evidenziate.

La dimensioni delle cariossidi di mais e il peso 1.000 semi rendono il campione di laboratorio convenzionalmente costituito (0,5-1 kg) altamente insufficiente e certamente inadatto alla ricerca dell'aflatoxina B1; questo amplificato dalla natura e distribuzione del metabolita fungino e complicato da limiti di legge molto bassi in valore assoluto.

Lo schema trattato nel presente la-

voro si propone, operando su quanto esposto, di **migliorare le criticità di un sistema comunque complicato, ponendo l'accento sulla necessità di disporre di uno strumento semplice, realmente fruibile a tutti i livelli della filiera.**

Ben sapendo che nessun passaggio del percorso di valutazione del cereale possa ritenersi esente da errore, certamente compresa la fase di analisi (rispetto dei tempi, conservazione dei materiali, formazione del personale), si vuole ricordare l'importanza di unire più elementi di valutazione al fine di raggiungere il risultato il più veritiero possibile: il monitoraggio in campo e l'osservazione alla lampada, se correttamente eseguiti, uniscono anch'essi elementi di assoluto rilievo al quadro valutativo.

Lontani dalla pretesa di aver trovato una soluzione univoca, ma con l'intento di indurre ragionamenti e incoraggiare contributi funzionali al miglioramento della filiera maidicola nazionale, riteniamo importante continuare a lavorare, con buon senso e condivisione, per il progresso e lo sviluppo di un settore ancora strategico per la nostra agricoltura.

Cristiano Concaro
Davide Di Benedetto
Concaro srl - Cornale e Bastida (Pavia)
Roberto Capurro
Sata srl - Quargnento (Alessandria)



V Questo articolo è corredato di bibliografia/contenuti extra. Gli Abbonati potranno scaricare il contenuto completo dalla Banca Dati Articoli in formato PDF su: www.informatoreagrario.it/bdo

Mais, analisi delle aflatossine con la Regola del cinque

BIBLIOGRAFIA

D. Scarpa, M. Demartini, R. Capurro, T. Demaestri, 2012. Analisi dei residui di agrofarmaci: influenza del metodo di campionamento - Giornate fitopatologiche 2012

R. Capurro, P. Rendina, E. Costa, D. Massarotto, 2012. Monitoraggio del rischio micotossine su mais: uno strumento per la filiera - Giornate fitopatologiche 2012

FAO, 2014. FAO mycotoxin sampling tool. <http://www.fao.org/3/a-ml716e.pdf>

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

Wagacha J., Muthomi J., 2008. Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *Internal Journal of Food Microbiology*, 124, 1-12

L'INFORMATORE AGRARIO

www.informatoreagrario.it



Edizioni L'Informatore Agrario

Tutti i diritti riservati, a norma della Legge sul Diritto d'Autore e le sue successive modificazioni. Ogni utilizzo di quest'opera per usi diversi da quello personale e privato è tassativamente vietato. Edizioni L'Informatore Agrario S.r.l. non potrà comunque essere ritenuta responsabile per eventuali malfunzionamenti e/o danni di qualsiasi natura connessi all'uso dell'opera.