

III Congresso Nazionale
LE MICOTOSSINE LUNGO LA FILIERA AGRO-ALIMENTARE E
ZOOTECNICA
28-30 Settembre 2009

**Valutazione comparativa dell'incidenza di micotossine fra
le pratiche di produzione di mais
convenzionale, biologico e biotecnologico**

Barbara De Santis, Carlo Brera, Francesca De Begnach, Elena Pannunzi,
Emanuela Gregori, Clara Berdini, Marina Miraglia

**Istituto Superiore di Sanità
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
Reparto OGM e Xenobiotici di Origine Fungina**

barbara.desantis@iss.it

DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE





Safe Foods

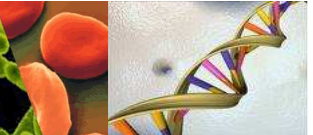
Promoting Food Safety Through a New Integrated Risk
Analysis Approach for Foods

(Contract number: Food-CT-2004-506446)
www.safefoods.nl



Sixth Framework Programme

DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE

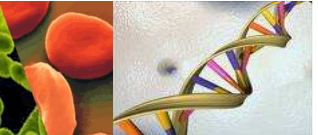
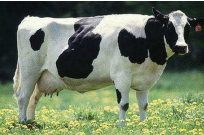




- Nuovo approccio olistico per l'analisi del rischio
- Alimento come fonte di rischi/benefici
- Valutazione dei costi legati alla produzione e al consumo degli alimenti



DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE

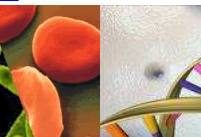
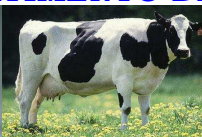


WP1: Valutazione comparativa della sicurezza alimentare fra le pratiche di coltivazione convenzionale, biologico e GM

Scopo:

- Sviluppare una valutazione comparativa della sicurezza alimentare di alimenti ottenuti da diverse pratiche agricole con l'ausilio delle moderne tecniche di profiling (-omics) e dei nuovi principi qualitativi e quantitativi di rischio beneficio (nutrizionali ed economici)
- Mais e patata prodotti in diverse località della Germania/Polonia secondo le pratiche convenzionali, biologiche e con varietà GM saranno usati per lo studio comparativo. Saranno anche raccolti in un database i dati per evidenziare l'entità della variazione composizionale a cui il consumatore potrebbe essere esposto.
- L'analisi delle principali micotossine per valutare dell'incidenza di tali tossine nelle diverse pratiche agricole

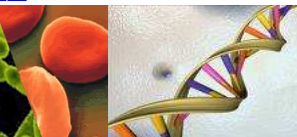
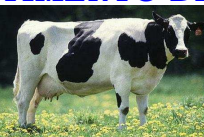
DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE



Partecipanti:

- **Analisi Transcrittomica (analisi dell'intero mRNA)**
RIKILT (Paesi Bassi)
- **Analisi Proteomica: (analisi della totalità delle proteine espresse)**
Univ. Kuopio (FIN)
- **Analisi Metabolomica (analisi dei metaboliti)**
Scott. Crop Res. Inst. (UK), Techn. Univ. Munich (DE), Counc. Sci. Ind. Res (SA)
- **Analisi Micotossine**
Istit Sup Sanità (Italia)
- **Analisi composizionale, Patologia**
IHAR (Plant Breed. Accl. Inst.; PL)
- **Analisi statistica:**
BIOSS Biomath. Stat. Scot. Res. (UK)

DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE



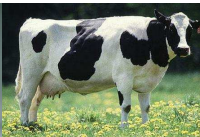
MATERIALE

ANALISI MICOTOSSINE ANNI 2004-2006

- prodotto: **MAIS**
- micotossine:
 - **afatossine**
 - **ocratossina A**
 - **zearaleone**
 - **fumonisine**
 - **deossinivalenolo**

- Pratica agricola (convenzionale, biologico)
- GM/Isogenico
- IBRIDI di raccolta precoci, medi, tardivi

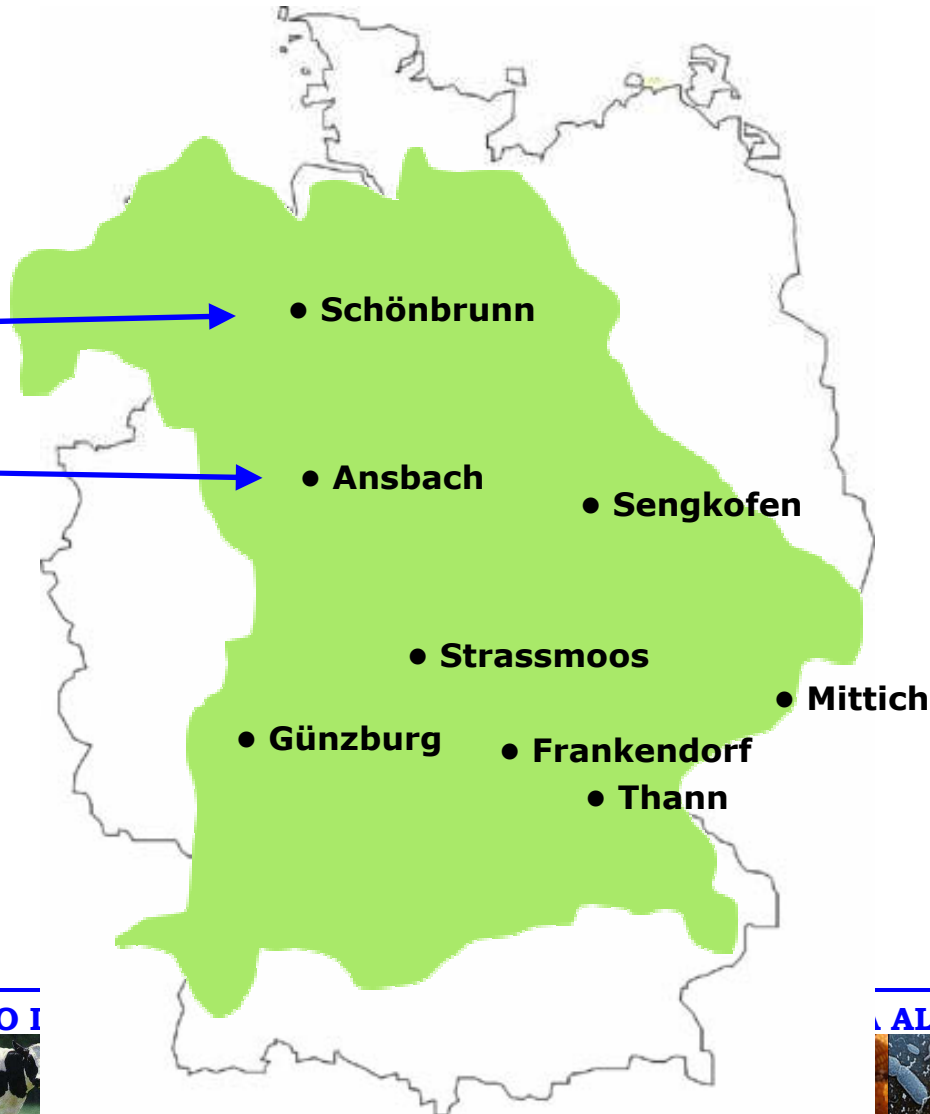
DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE



MATERIALE

MAIS - Mappa delle località nella regione della Bavaria

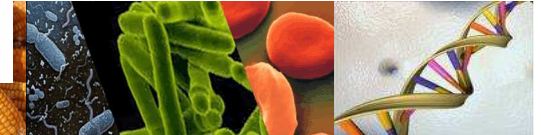
Coltivazioni biologiche



DIPARTIMENTO I



ALIMENTARE



MATERIALE

Germania: campioni di mais 2004/2005

Campioni convenzionali

Campioni GM

località

location

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
early harvest													
Tassilo	3	3	3										
Apostrof	3	3	3										
Spezi	3	3	3										
ES Shorty	3	3	3										
Auxxel	3	3	3										
Gomera EU	3	3	3										
Spider	3	3	3										
Companero	3	3	3										
medium harvest													
Amadeo	3	3		3	3	3	3	3	1	3		3	3
Expert	3	3		3	3	3	3	3	1	3		3	3
LG 3226/Lukas	3	3		3	3	3	3	3	1	3		3	3
Cardoso	3	3		3									
Campari	3	3		3									
Arobase	3	3		3									
Korneli	3	3		3									
PR39T84	3	3		3									
late harvest													
Flavi	3	3		3	3	3	3			3		3	3
Loretto	3	3		3									
Nexxos EU	3	3		3									
DK 287 EU	3	3		3									
Fangio	3	3		3									
Cornboy/DK313	3	3		3									
Pontos	3	3		3									
PR39F58	3	3		3									
organic													
Gavott												3	3
PR39R20												4	4
DK 231												4	4

	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
bt-derivate	1	6	3	1	3	3	1	1	2	2
isogenic line	1	6	3	1	3	3	1	1	2	2

varietà

← Influenza della località

- Per ciascuna varietà, e località: analisi di tre replicati (sacchetti di 1 kg)
- Oltre 1000 campioni in tre anni

REPUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE



influenza della varietà



MATERIALE

Germania, Frankendorf: campioni di mais 2006



METODI

**Analisi multi-micotossina HPLC-FL:
aflatossine, ocratossina A, zearalenone, fumonisina B₁
AOZF**

Validazione in house

- Repetibilità (SDR_r)
- Limite di quantificazione
- Recupero

DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE



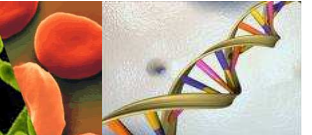
METODI

Analisi multi-micotossina HPLC-FL: aflatossine, ocratossina A, zearalenone, fumonisina B₁

Fasi del metodo: estrazione - rivelazione

- Macinazione
- Estrazione (MeOH:H₂O:AcCN)
- Filtrazione (1^a, carta da filtro)
- Diluzione
- Filtrazione (2^a, filtro a microfibra)
- Passaggio in IAC (disposte a torre AOZ + FUMOniprep)
- Eluizione
- Iniezione in HPLC
- Rivelazione fluorimetrica (previa derivatizzazione quando necessario)

DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE



METODI

Analisi multi-micotossina HPLC-FL: aflatossine, ocratossina A, zearalenone, fumonisina B₁

- **AFs: derivatizzazione post colonna (formazione del derivato con PBPB):**
 - fase mobile: MeOH:H₂O:AcCN (59:18:23)
 - λ_{Ex} 365nm / λ_{Em} 435nm
- **FB1: derivatizzazione pre colonna (con ortoftal-aldeide, OPA)**
 - fase mobile, pH=3,35: MeOH:NaH₂PO₄ (77:23)
 - λ_{Ex} 335 nm / λ_{Em} 440nm
- **ZEA:**
 - fase mobile : MeOH:H₂O:AcCN (8:46:46)
 - λ_{Ex} 274 nm / λ_{Em} 440nm
- **OTA:**
 - fase mobile : MeOH/H₂O 2% acidulata
 - λ_{Ex} 333 nm / λ_{Em} 460 nm

DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE



METODI

Analisi **deossinivalenolo** HPLC-UV:

Validato in house

- Repetibilità (SDR_r)
- Limite di quantificazione
- Recupero

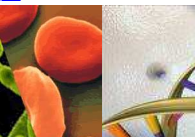
DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE



RISULTATI

	OTA	AFBs	ZEA	FB1	DON
Limite di Quantificazione LOQ	0.40 ppb	ppb B1 0.70 ppb B2 0.09 ppb G1 0.93 ppb G2 0.07	4 ppb	70 ppb	50 ppb
Recupero	92% ± 5%	95%±4% B1 91%±7% B2 87%±10% G1 70%±15% G2	89% ± 9%	90% ± 5%	85 ± 5%
SDR_r (Low Level)	7%	5% B1 11% B2 7% G1 19% G2	11%	10%	9%

DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE



RISULTATI premessa

- I campioni analizzati provenivano tutti da campi sperimentali coltivati in Germania.
- Si è profilato uno scenario positivo in termini di contaminazione da micotossine sia per l'assenza di *farming pressure* che per una idonea applicazione delle buone pratiche agricole.
- Aflatossine B₁, B₂, G₁, G₂ (AFLs), fumonisine (FB₁ and FB₂), ocratossina A (OTA) e zearalenone (ZEA) sono stati analizzati durante i tre anni di progetto (2004-2006); il deossinivalenolo (DON) è stato analizzato negli anni 2005-2006.

DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE



RISULTATI 2004

<u>Mycotossina</u>	<u>Convenzionale</u>	<u>Biologico</u>	<u>Isogenico</u>	<u>GM</u>
	Intervallo di contaminazione (ppb) positivi (%)	Intervallo di contaminazione (ppb) positivi (%)	Intervallo di contaminazione (ppb) positivi (%)	Intervallo di contaminazione (ppb) positivi (%)
Aflatossine Totali	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)
Ocratossina A	0.17 ÷ 11.8 (40%)	0.22 ÷ 0.80 (33%)	- (0%)	- (0%)
Zearalenone	4 ÷ 448 (49%)	- 0%)	4 ÷ 70 (20%)	- (0%)
Fumonisina B1	70 ÷ 688 (44%)	- (0%)	111 ÷ 629 (40%)	- (0%)



RISULTATI 2005

<u>Mycotossina</u>	<u>Convenzionale</u> Intervallo di contaminazione (ppb) positivi (%)	<u>Biologico</u> Intervallo di contaminazione (ppb) positivi (%)	<u>Isogenico</u> Intervallo di contaminazione (ppb) positivi (%)	<u>GM</u> Intervallo di contaminazione (ppb) positivi (%)
Aflatossine Totali	1.0 ÷ 2.5 (4%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)
Ocratossina A	0.17 ÷ 15.30 (53 %)	0.22 ÷ 4.80 (22%)	- (0%)	- (0%)
Zearalenone	4 ÷ 695 (49%)	- (0%)	4 ÷ 26 (7%)	- (0%)
Fumonisina B1	20 ÷ 547 (92%)	38 ÷ 43 (100%)	20 ÷ 474 (87%)	21 ÷ 142 (87%)
Deoxinivalenolo	50 ÷ 6000 (46%)	50 ÷ 190 (11%)	50 ÷ 850 (40%)	50 ÷ 3400 (40%)

RISULTATI 2006

<u>Mycotossina</u>	<u>Convenzionale</u> Intervallo di contaminazione (ppb) positivi (%)	<u>Biologico</u> Intervallo di contaminazione (ppb) positivi (%)
Aflatossine Totali	- (0 %)	- (0 %)
Ocratossina A	0.17 ÷ 1.00 (2 %)	- (0 %)
Zearalenone	25 ÷ 474 (17 %)	- (0 %)
Fumonisina B1	70 ÷ 2683 18/103 (17 %)	- (0 %)
Deoxinivalenolo	50 ÷ 4600 (69%)	50 ÷ 250 (66%)

DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE



CONCLUSIONI

➤ VARIABILI

Pratica agricola (convenzionale, biologico)

GM/Isogenico

Tempo di raccolta (IBRIDI precoci, medi, tardivi)

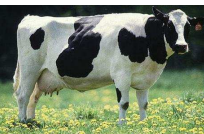
Varietà



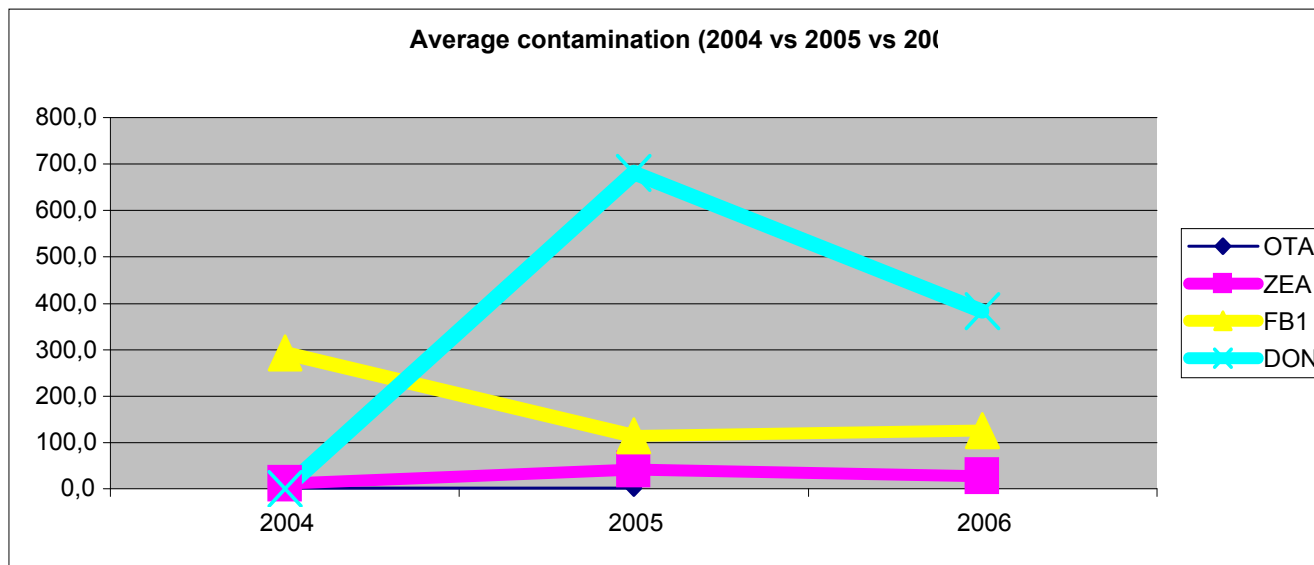
➤ ANALISI STATISTICA (Multiple Correspondence Analysis e Cluster analysis)

Realizzata su due set di dati analitici opportunamente selezionati

- **Database 1**, per il confronto biologico vs convenzionale
- • **Database 2**, per il confronto fra le varietà GM/isogenic



CONCLUSIONI

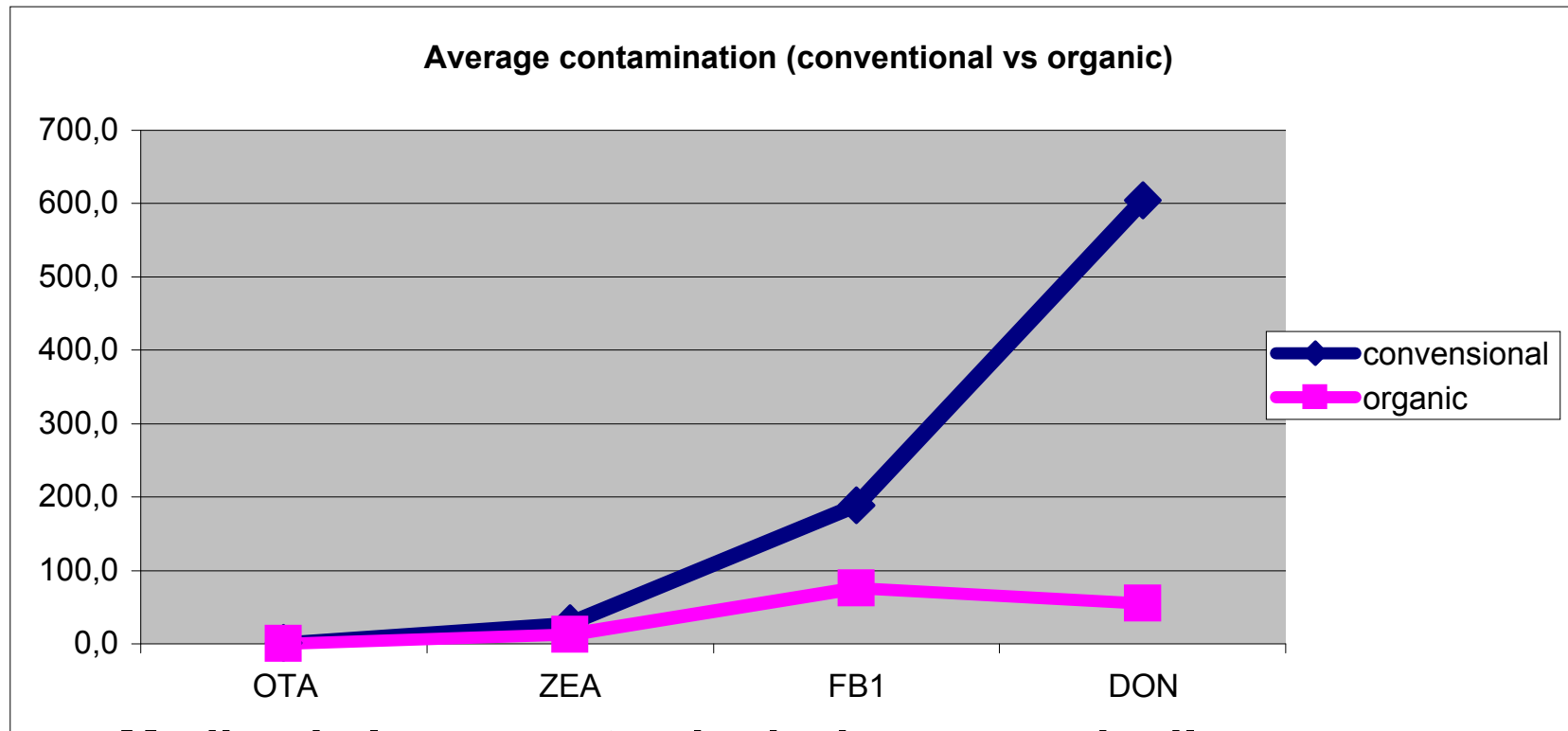


La sola micotossina che ha riportato livelli significativi di contaminazione è stata il deossinivalenolo, in particolare nell'anno 2005;

DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE



CONCLUSIONI

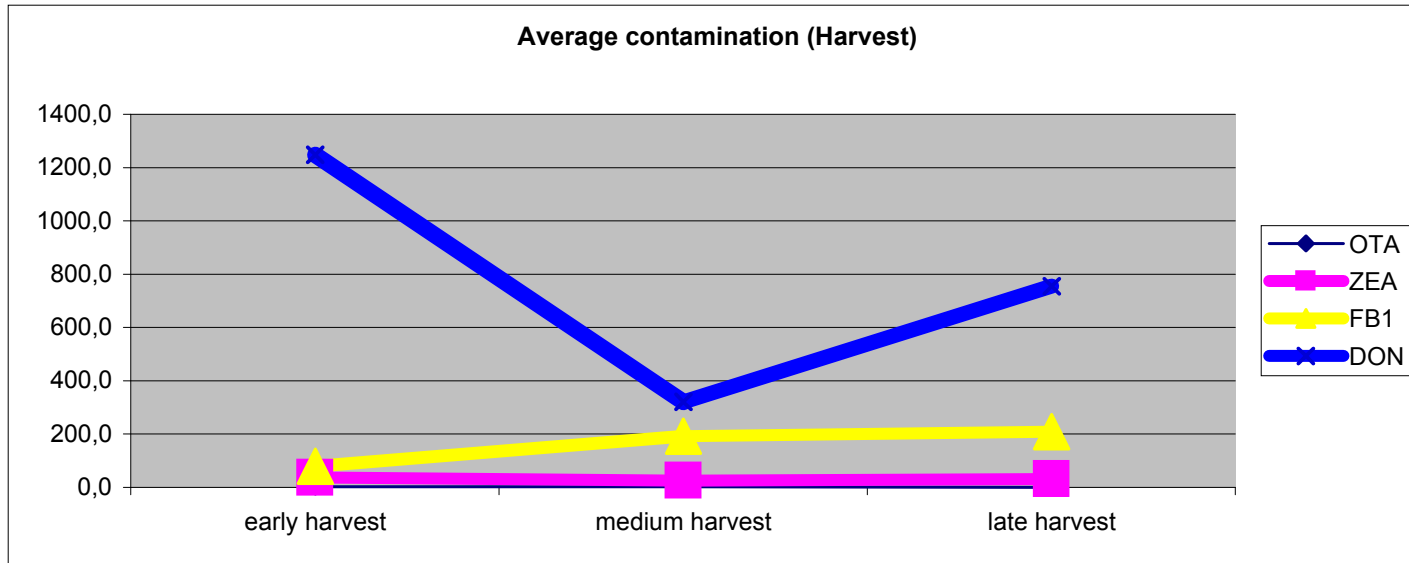


Mediando le concentrazioni, si osserva che il deossinivalenolo nella pratica agricola convenzionale ha registrato valori più alti

DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE

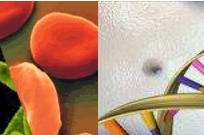
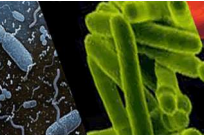


CONCLUSIONI



La valutazione degli ibridi precoci, medi e tardivi ha mostrato valori di contaminazione del DON superiori negli ibridi precoci e tardivi

DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE



CONCLUSIONI

RESULTATI GENERALI

- Durante i tre anni di analisi non si è riscontrata contaminazione da aflatossine.
- Alte contaminazioni di DON, OTA e ZEA si sono correlate con ibridi di raccolto precoce (Gomera and Shorty) nelle località Almesbach, Frankendorf and Strassmoos.
- Basse concentrazioni FB₁ and DON e alte contaminazioni di ZEA si sono correlate con pratiche agricole biologiche per ibridi di raccolto medio e tardivo (varietà Amadeo e Gavott) nelle località Günzburg and Scheyern.
- Negli anni 2004 e 2005 valori di contaminazione media di OTA, DON e ZEA si sono correlati con agricoltura convenzionale per ibridi di raccolto medio e tardivo (varietà: PR39F58, Campari, Lukas, Pontos), nelle località Ansbach, Euerhausen, Günzburg, Neuhof, Reith, Sengkofen and Thann.
- Negli anni 2004 e 2005, basse contaminazioni di OTA, DON e ZEA si sono correlate con pratiche agricole biologiche per varietà Flavi e Gavott, nelle località Ansbach e Schönbrunn.
- ➤ **Negli anni 2004 e 2005 a causa dei bassi valori di contaminazione non si è potuta evidenziare nessuna differenza nel confronto fra varietà GM (varietà Bt) e isogeniche.** —



RINGRAZIAMENTI

Dott.ssa Patrizia Secreti

Dott.ssa Cinzia Senatore

Dott.ssa Elena Pannunzi

Dott.ssa Clara Berdini

Dott.ssa Eleonora Palmaccio

Dott.ssa Emanuela Gregori

Dott.ssa Valentina Minardi

Dott.ssa Elisabetta Prantera

Dott. Carlo Brera

Dott.ssa Marina Miraglia

DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE

