

Ricerca e sperimentazione sulla presenza di fumonisine nella frutta veneta destinata all'alimentazione dell'infanzia



Deliberazione della giunta regionale del Veneto n. 1612 del 19.11.2021

Progetto: *“Ricerca e sperimentazione sulla ricerca di fumonisine nella frutta veneta destinata all’alimentazione dell’infanzia”*

Pubblicazione a cura di Michele Giannini⁽¹⁾, Alberto Sartori⁽¹⁾ e Gloria Falasco⁽¹⁾

⁽¹⁾ Agenzia veneta per l’innovazione nel settore primario - Veneto Agricoltura

Autore:

Paola Battilani⁽²⁾, Marco Camardo Leggieri⁽²⁾, Chiara Dall’Asta⁽³⁾, Laura Carbonell-Rozas⁽³⁾

⁽²⁾ Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali Sostenibili; Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

⁽³⁾ Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma, Viale delle Scienze 27/A, Parma

Realizzazione grafica:

Federica Mazzuccato

Pubblicazione edita da:

Agenzia Veneta per l’Innovazione nel Settore Primario - Veneto Agricoltura

Viale dell’Università, 14 - 35020 Legnaro (PD)

Tel. 049 8293711 - Fax 049 8293815

e-mail: ricerca@venetoagricoltura.org

www.venetoagricoltura.org

È consentita la riproduzione di testi, tabelle, grafici ecc. previa autorizzazione da parte di Veneto Agricoltura, citando gli estremi della pubblicazione.

Finito di stampare nel mese di febbraio 2023

ISBN 978-88-6337-283-0

Indice

1. Introduzione	pag.	5
2. Obiettivo dello studio	»	6
3. Isolamento e identificazione fungina da mele e puree	»	7
3.1 Materiali e metodi	»	7
3.1.1 Raccolta campioni di mele	»	7
3.1.2 Isolamento funghi	»	8
3.2 Risultati	»	12
4. Analisi Polymerase Chain Reaction (PCR)	»	12
4.1 Materiali e metodi	»	12
4.1.1 Raccolta campioni	»	13
4.1.2 Risultati PCR da frammenti di mela	»	13
4.1.3 Considerazioni	»	13
4.1.4 Risultati PCR da puree	»	13
4.2 Isolamento funghi	»	13
4.2.1 Raccolta campioni	»	13
4.2.2 Isolamento funghi	»	13
4.3 Risultati	»	13
5. Isolamento e identificazione fungina da frammenti di mela	»	14
5.1 Materiali e metodi	»	14
5.1.1 Raccolta campioni	»	14
5.1.2 Disinfezione	»	14
5.1.3 Isolamento funghi	»	14
5.2 Risultati	»	14
6. Colture monosporiche	»	15
6.1 Materiali e metodi	»	15
6.1.1 Analisi PCR	»	15
6.1.2 Colture monosporiche	»	15
6.2 Risultati	»	15
6.2.1 Analisi PCR	»	15
7. Inoculo artificiale su puree di mela	»	17
7.1 Materiali e metodi	»	17
7.1.1 Campioni di purea	»	17
7.1.2 Preparazione degli inoculi	»	17
7.1.3 Inoculo	»	17
7.2 Risultati	»	19

8. Determinazione mediante LC-MS/MS di micotossine	pag. 21
8.1 Sviluppo del metodo analitico	» 21
8.1.1 Reagenti e strumentazione	» 21
8.1.2 Preparazione del campione	» 21
9. Contenuto di micotossine in mele e puree	» 22
9.1 Mele da campo	» 22
9.2 Mele in Tank e puree finali.....	» 25
10. Produzione di micotossine in puree inoculate	» 27
11. Considerazioni	» 29
12. Bibliografia	» 31

Leggenda delle abbreviazioni usate nel testo per le micotossine

AFs	Aflatossine
AFB1	Aflatossina B1
AFB2	Aflatossina B2
AFG1	Aflatossina G1
AFG2	Aflatossina G2
AME	Alternariolo monometil-etere
AOH	Alternariolo
FB1	Fumonisina B1
FB2	Fumonisina B2
FB3	Fumonisina B3
FB4	Fumonisina B4
TEN	Tentossina
PAT	Patulina

Leggenda di altre abbreviazioni usate nel testo

aw	Attività dell'acqua
UFC	Unità Formanti Colonie (per grammo o per ml)
MRL	Massimi limiti di residuo ammesso
LOD	Limite di rilevazione
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry (Cromatografia liquida con spettrometro di massa)
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia liquida a ultra alta prestazione)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reazione di polimerasi a catena)

1. Introduzione

Questo studio nasce dall'esigenza di comprendere l'origine delle recenti segnalazioni di contaminazioni da fumonisine nelle puree di mele al fine di individuare strumenti per la prevenzione di questa problematica nella filiera.

Fusarium verticillioides e *F. proliferatum* sono noti produttori di fumonisine, ma in particolare *F. proliferatum* è un fungo patogeno che può infettare numerose colture e può essere presente anche nel suolo (Wu et al. 2019).

Le fumonisine sono metaboliti secondari tossici che causano una grande varietà di effetti sugli animali e sull'uomo. La loro struttura è molto simile alla sfinganina per cui, una volta ingerite, sono in grado di compromettere il metabolismo degli sfingolipidi, i quali sono importanti costituenti delle membrane biologiche. Si ha inoltre il sospetto che queste micotossine siano in grado di indurre alcune malattie del sistema nervoso (Williams et al. 2007).

Sino ad oggi sono state identificate quattro differenti serie di fumonisine (A, B, C e P), ma solo quelle di una serie, la B, sono le più studiate in quanto più diffuse negli alimenti. In quest'ultimo gruppo fanno parte le FB1, FB2, FB3 e FB4.

Nel 1993, la FB1 è stata inclusa nella classe 2B da IARC (International Agency for Research on Cancer) a causa del suo possibile effetto cancerogeno per l'uomo.

Nel 2007, la Commissione Europea ha definito le soglie per il contenuto di FB1 + FB2 in alcuni alimenti, in particolare mais e derivati (Regolamento della Commissione Europea 1126/2007). È stata definita una soglia per alimenti a base di mais e baby food pari a 200µg/kg, valore riferito alla sostanza secca da calcolare secondo il regolamento EC n. 401/2006.

F. proliferatum è citato in letteratura in quanto può colpire i meli e di conseguenza anche i frutti (Cheng et al. 2019), ma l'incidenza di questo patogeno in questa matrice alimentare non è ancora stata studiata.

2.

Obiettivo dello studio

Il presente studio si pone i seguenti obiettivi:

- Individuare il fungo responsabile della produzione di fumonisine nelle mele.
- Individuare i punti critici nella filiera di produzione di trasformati di mele.
- Analizzare le condizioni meteorologiche delle zone di produzione dove eventualmente siano stati riscontrati problemi di lotti contaminati.
- Definire le condizioni ecologiche di maggiore rischio di produzione di micotossine nelle mele.

Lo studio prevede quindi la raccolta di mele di 2 varietà di rilievo, Golden e Imperatore, a maturazione in campo e il successivo campionamento prima e dopo la lavorazione per ottenere le puree. Inoltre, sono previste prove di inoculo artificiale per studiare le condizioni ecologiche ottimali per la crescita dei funghi e per la produzione di micotossine.

3. Isolamento e identificazione fungina da mele e puree

3.1 Materiali e metodi

3.1.1 Raccolta campioni di mele

Produzione primaria. Sono state raccolte mele delle varietà Golden delicious e Imperatore e conferite all'Università. I campioni di mele, provenienti da 4 differenti aziende (**Tabella 1**), sono stati divisi in 4 repliche, ognuna composta da 5 frutti, e sono stati ridotti in purea utilizzando il frullatore Moulinex blendforce glass.

Cliente	Varietà	Località	Azienda	Trattamento	Provenienza
Lungadige	Golden	Bevilacqua	8027	Non trattato con <i>Aureobasidium pullulans</i>	Campagna
Lungadige	Golden	Legnago	8044	Non trattato con <i>Aureobasidium pullulans</i>	Magazzino
Lungadige	Golden	Ronco all'Adige	8052	Non trattato con <i>Aureobasidium pullulans</i>	Campagna
Lungadige	Golden	Ronco all'Adige	8054	Trattato con <i>Aureobasidium pullulans</i>	Magazzino
Lungadige	Imperatore	Bevilacqua	8027	Non trattato con <i>Aureobasidium pullulans</i>	Campagna
Lungadige	Imperatore	Legnago	8044	Non trattato con <i>Aureobasidium pullulans</i>	Magazzino
Lungadige	Imperatore	Ronco all'Adige	8034	Non trattato con <i>Aureobasidium pullulans</i>	Magazzino
Lungadige	Imperatore	Bevilacqua	8014	Trattato con <i>Aureobasidium pullulans</i>	Campagna

Tabella 1. Campioni di mele consegnati presso l'Università.

Prodotto lavorato. Sono stati conferiti campioni di purea di mela provenienti dalla lavorazione e le mele tal quale utilizzate nei diversi Tank da cui sono state ottenute le corrispettive puree. Per questi campioni le due varietà di mela, Golden ed Imperatore, sono state lavorate insieme.

I campioni pervenuti corrispondono a:

- lavorazione del 11 ottobre 2021 ottenuti dai Tank 65-66-54-56-52 (in ordine temporale di riempimento).
- lavorazione del 12 ottobre 2021 ottenuti dai Tank 70-63-58-50-51-72 (in ordine temporale di riempimento).

I campioni del tal quale sono stati realizzati in un periodo di tempo pari a 1:15 minuti che corrisponde al periodo di riempimento del Tank.

La purea è stata consegnata congelata mentre le mele sono state conferite intere e ridotte in purea prima dell'analisi, come descritto in precedenza. Sono state considerate 4 repliche per tesi, ciascuna composta da 5 frutti.

3.1.2 Isolamento funghi

Al fine di quantificare i funghi presenti nei diversi campioni, sono state eseguite le diluizioni seriali su tutti i campioni raccolti.

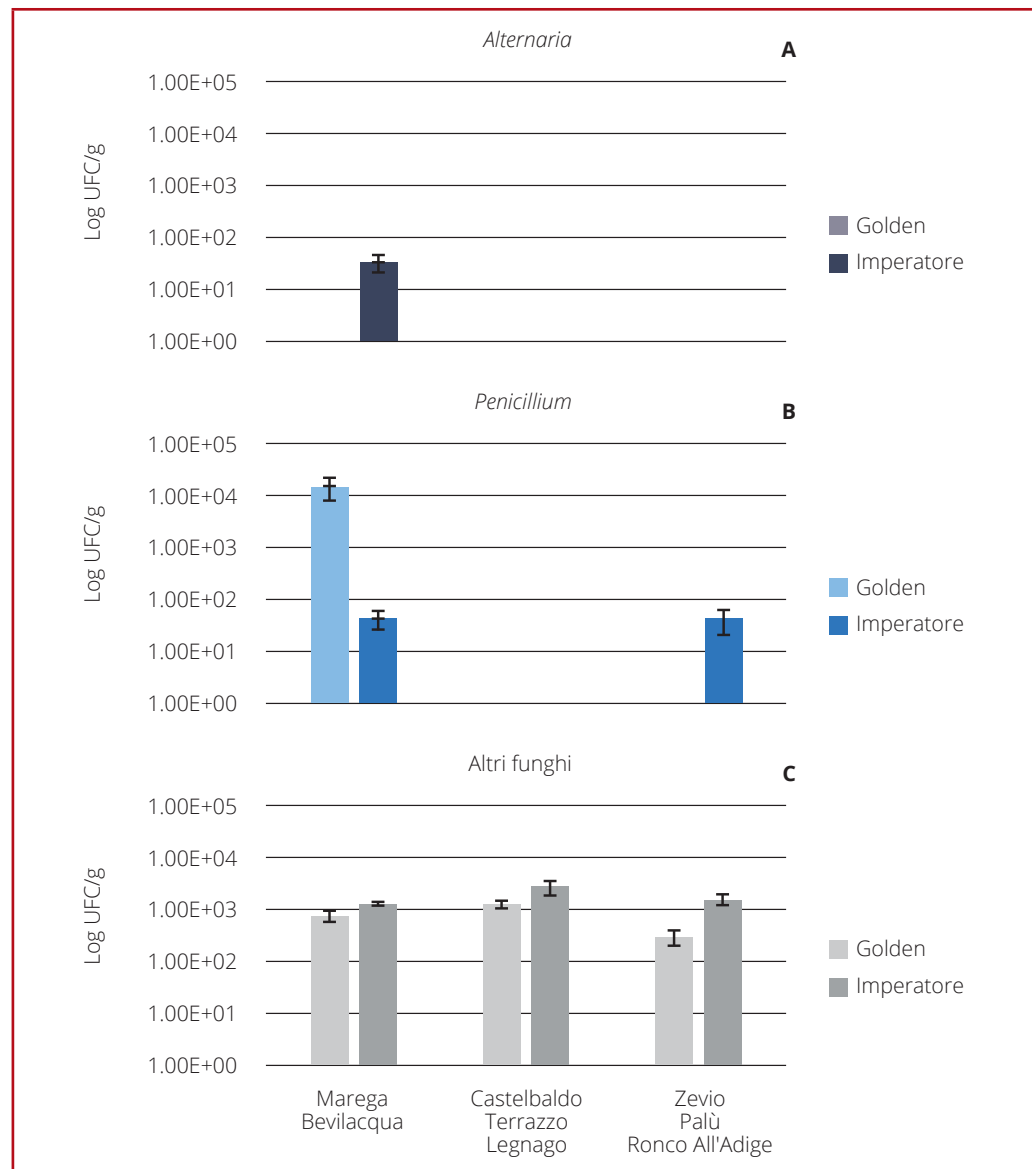
Le diluizioni, eseguite in triplo, sono state piastrate su terreno Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC, 31,5 g/L DRBC, 1 mL cloramfenicolo, 1 L acqua bidistillata). Le piastre sono state poi incubate in termostato a 25°C per 5 giorni.

3.2 Risultati

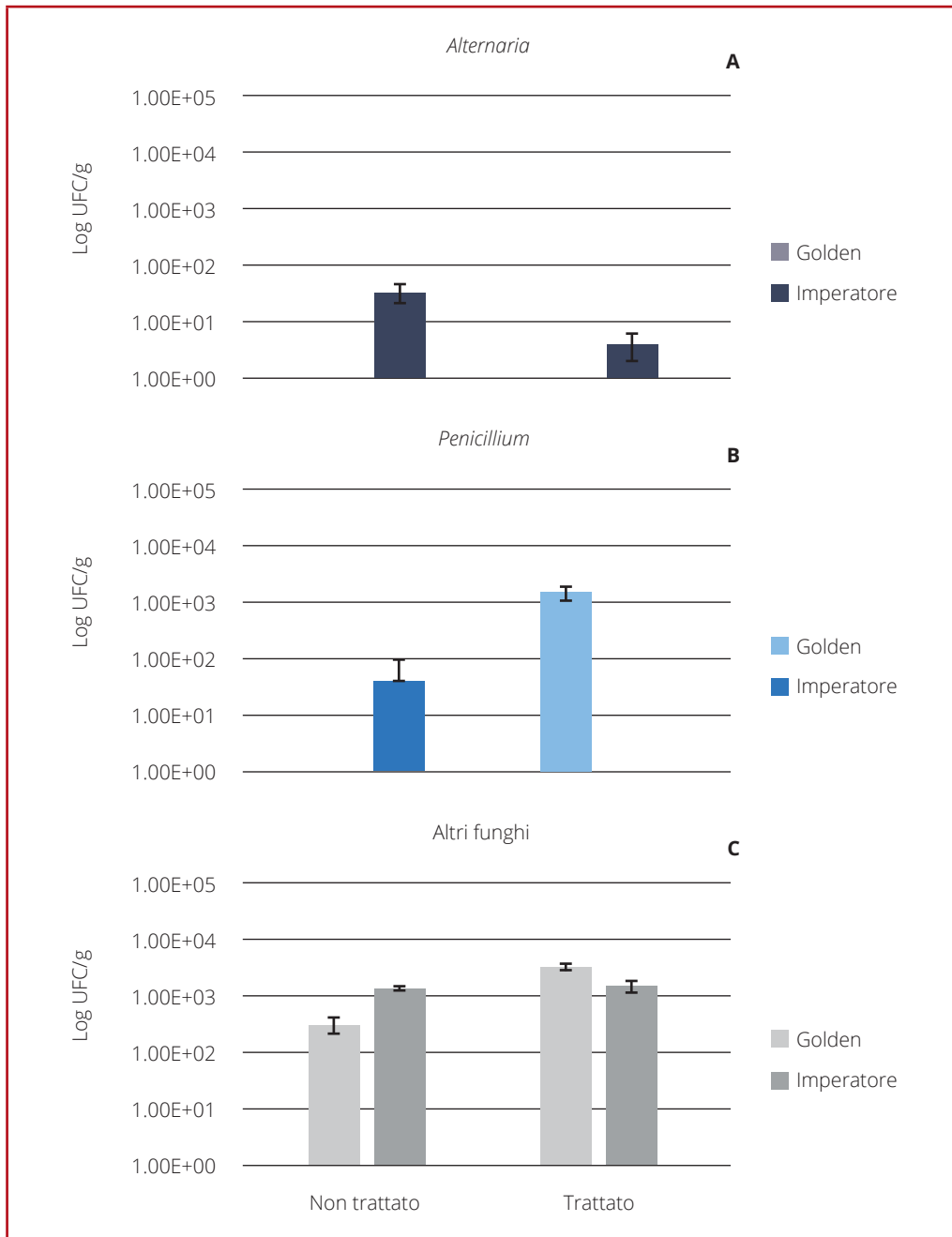
Prendendo in considerazione il primo gruppo di campioni ovvero quello con mele suddivise per varietà (Golden ed Imperatore), località (Marega-Bevilacqua, Castelbaldo-Terrazzo-Legnago e Zevio-Palù-Ronco All'Adige) e tipologia di trattamento (trattato o meno con *Aureobasidium pullulans*) i risultati, espressi in Log UFC/g, sono riportati di seguito. In particolare, oltre alla conta totale, ovvero alla conta di tutte le colonie fungine sviluppatesi, sono state contate le colonie dei funghi di maggiore interesse in quanto potenzialmente produttori di micotossine: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*.

Esaminando le due varietà nelle tre località il genere fungino *Alternaria* è stato riscontrato nella sola località Bevilacqua e nelle sole mele delle varietà Imperatore (**Figura 1 A**). *Penicillium*, al contrario, è stato individuato con un'incidenza più alta nelle mele Golden coltivate nella zona di Bevilacqua seguite dalle Imperatore di Ronco All'Adige e di Bevilacqua (**Figura 1 B**). Nella località di Legnano non è mai stato individuato *Penicillium*. Infine, valutando la crescita degli altri generi fungini, si evince che essa è maggiore nelle mele Imperatore rispetto a Golden in tutte e tre le località esaminate (**Figura 1 C**). I funghi dei generi *Aspergillus* e *Fusarium* non sono mai stati isolati.

Figura 1. Incidenza di *Alternaria* (A), *Penicillium* (B), altri funghi (C), nelle località di Marega-Bevilacqua, Castelbaldo-Terrazzo-Legnago e Zevio-Palù-Ronco All'Adige e nelle due varietà analizzate.



Dai dati ottenuti considerando le due tipologie di trattamento eseguite sulle due varietà di mele si evince che *Alternaria* (**Figura 2 A**) risulta essere ancora presente solo nelle Imperatore, ma con una crescita maggiore in quelle non trattate con *A. pullulans* rispetto alle altre. *Penicillium* è stato riscontrato nelle Imperatore non trattate e, con un'incidenza più alta, nelle Golden trattate (**Figura 2 B**). In ultimo, gli altri funghi sono stati individuati in entrambe le tipologie di trattamento ma con una crescita più intensa rispettivamente nelle Imperatore non trattate e nelle Golden trattate con *A. pullulans* (**Figura 2 C**).

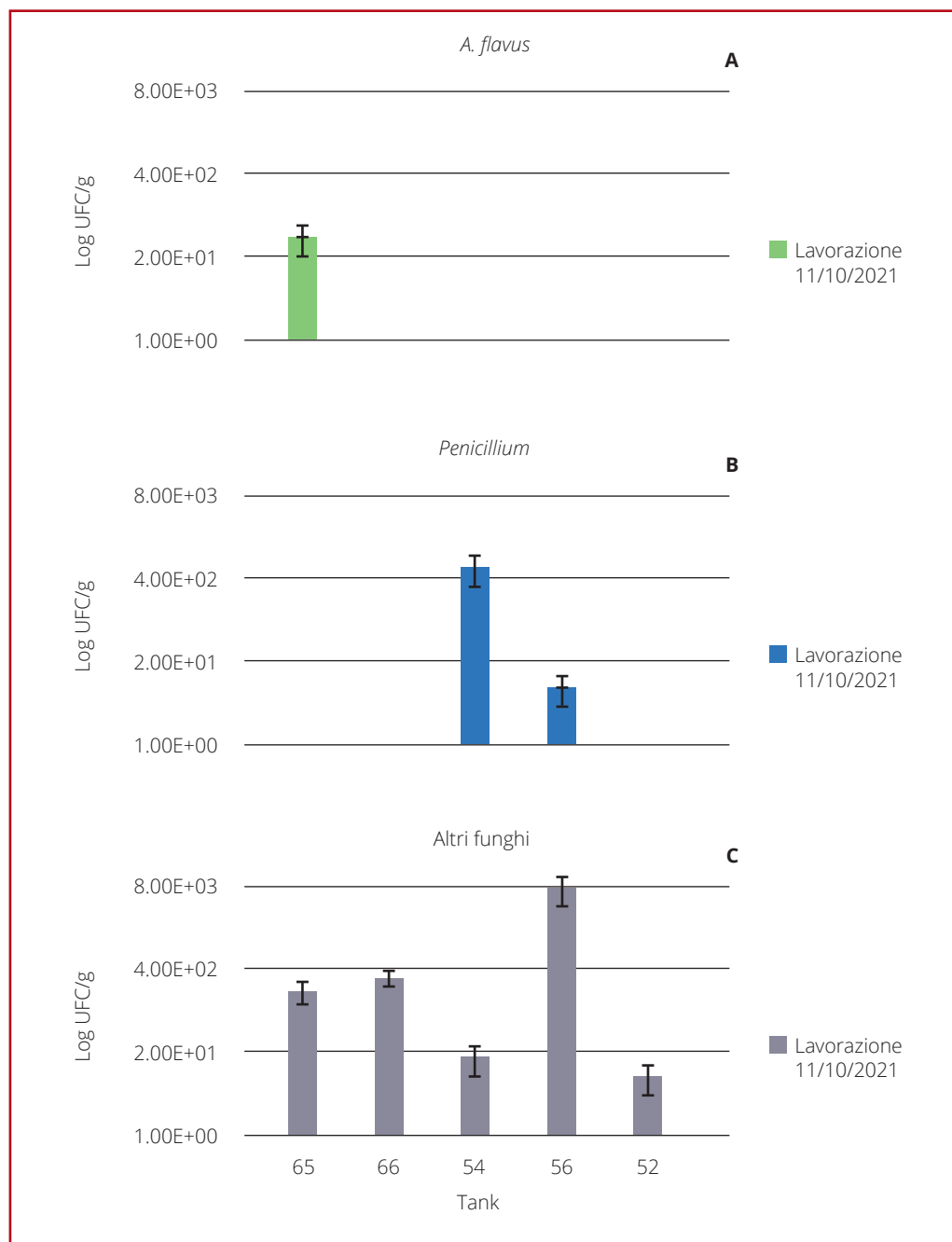


Di seguito, invece, sono riportati i dati di crescita fungina relativi ai campioni di mele tal quale e di purea ottenuti in due differenti giorni di lavorazioni.

Lavorazione 11 ottobre 2021:

A. flavus è stato determinato solo nel Tank 65 (**Figura 3 A**) mentre *Penicillium* nel Tank 54 e 56 (**Figura 3 B**) con una presenza maggiore nel primo Tank. Gli altri funghi sono stati individuati in tutti i Tank della giornata con un'incidenza nettamente più alta nel Tank 56 (**Figura 3 C**).

Figura 3. Incidenza di *A. flavus* (A), *Penicillium* (B) e altri funghi (C) nei cinque Tank della lavorazione 11 ottobre 2021.



Lavorazione 12 ottobre 2021:

il genere *Alternaria* risulta presente solamente nel Tank 51 (**Figura 4 A**). *A. flavus* è stato determinato nei Tank 50, 51 e 72 con un'incidenza maggiore nel secondo (**Figura 4 B**). *Fusarium* è stato individuato nel solo Tank 72 (**Figura 4 C**), mentre *Penicillium* pare mostrare una crescita nel tempo (**Figura 4 D**); infatti la sua incidenza aumenta passando dal Tank 50 a quello 72 lavorati in sequenza. Infine, gli altri funghi sono stati individuati in tutti i Tank della giornata, ad eccezione del 72, e la maggiore presenza è stata registrata nel Tank 70 (**Figura 4 E**).

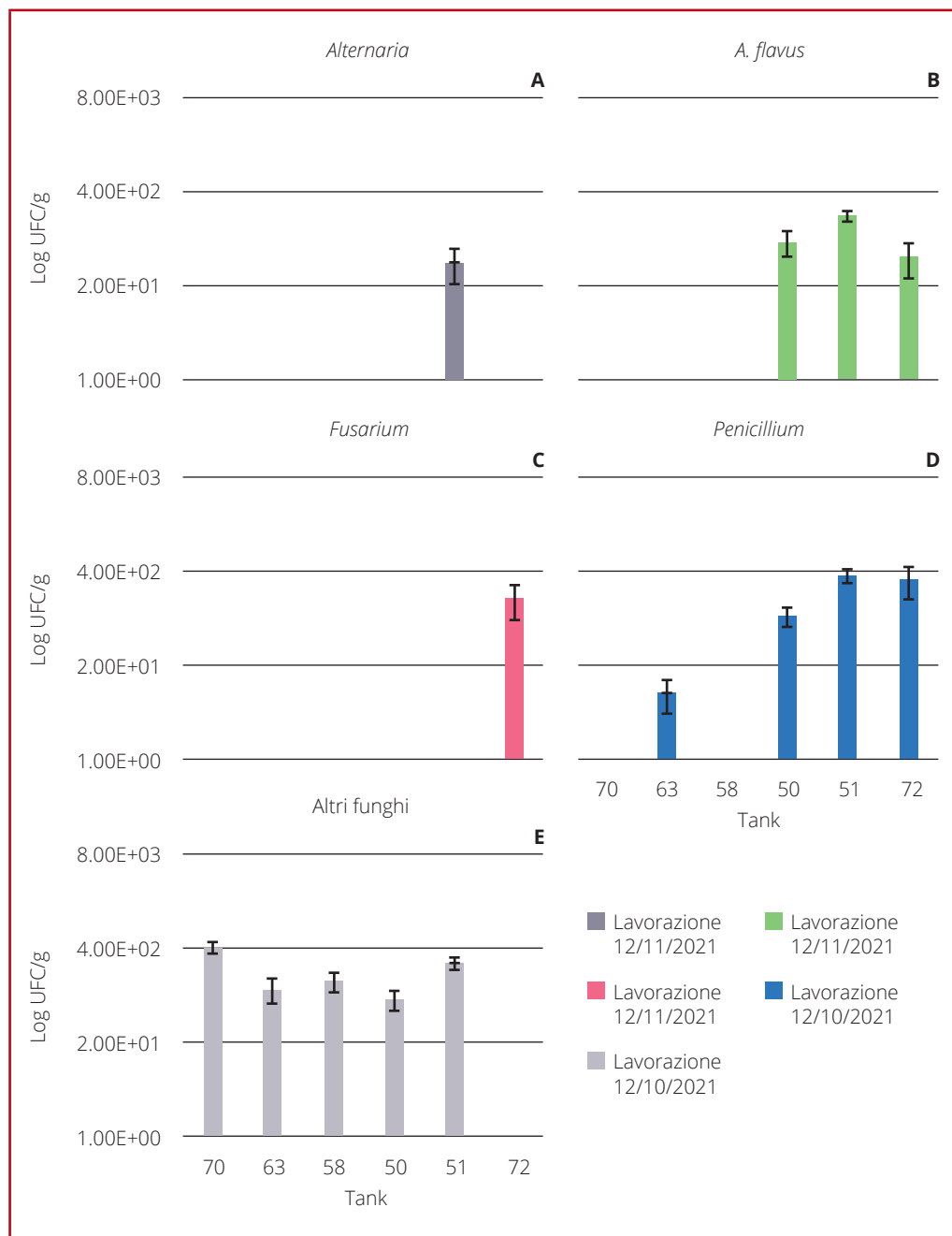


Figura 4. Incidenza di *Alternaria* (A), *A. flavus* (B), *Fusarium* (C), *Penicillium* (D) e altri funghi (E) nei sei Tank della lavorazione 12 ottobre 2021.

Per quanto riguarda i campioni di purea in nessuno di essi è stata riscontrata crescita fungina.

4.

Analisi Polymerase Chain Reaction (PCR)

L'obiettivo di questa analisi è quello di individuare e localizzare *Fusarium proliferatum* in differenti porzioni di mela.

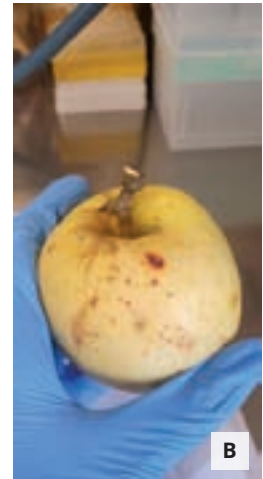
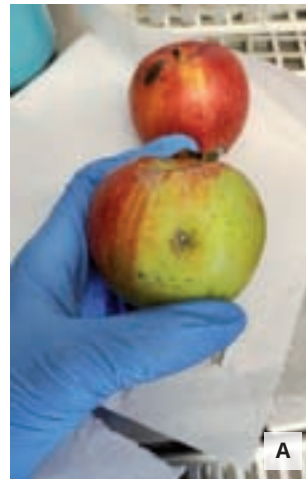
4.1 Materiali e metodi

4.1.1 Raccolta campioni

Sono stati selezionati due frutti per ogni varietà con sintomi superficiali differenti per eseguire un'analisi PCR.

Dalla parte interna dei frutti sono stati prelevati 8 frammenti: 4 in corrispondenza dell'estremità calicina e 4 dell'estremità del picciolo. Sono state poi asportate porzioni di parte esterna, considerando le lenticelle sane e le lenticelle che presentavano sintomi (dividendo i sintomi in tipo 1 e tipo 2, **Figura 5, 6**).

**Figura 5. A. Sintomi tipo 1 Imperatore
B. Sintomi tipo 1 Golden.**



**Figura 6. A. Sintomi tipo 2 Imperatore
A. Sintomi tipo 2 Golden.**



4.1.2 Risultati PCR da frammenti di mela

F. proliferatum è stato individuato nella varietà Imperatore, in particolare nei frammenti prelevati dall'emisfero calicino, dal picciolo e dalle lenticelle che presentavano il sintomo 2 (**Figura 6**).

4.1.3 Considerazioni

Vista la presenza di *F. proliferatum* in alcuni frammenti di frutto si è deciso di approfondire le analisi sottoponendo a test PCR anche i campioni di purea ottenuti dalle mele precedentemente utilizzate ed analizzate.

4.1.4 Risultati PCR da puree

In entrambe le puree, ovvero sia in quella ottenuta dalle mele della varietà Imperatore che in quella prodotta con le Golden, è stato individuato *F. proliferatum*. Si è deciso quindi di effettuare altri isolamenti fungini da frammenti di mela.

4.2 Isolamento funghi

4.2.1 Raccolta campioni

È stata utilizzata la mela positiva al test PCR per presenza di *F. proliferatum*.

4.2.2 Isolamento funghi

Sono stati prelevati dei frammenti in corrispondenza dell'estremità calicina, del picciolo e della parte esterna, in particolare le lenticelle. I campionamenti sono stati eseguiti considerando tre repliche per ciascuna porzione.

I frammenti sono stati poi piastrati su Water Agar (WA, 15 g/L agar; 1 L acqua bidistillata) e posti ad incubare a 25°C per 4/5 giorni.

Una volta sviluppatasi, i funghi, sono stati fatti nuovi prelievi, piastrati su Potato Dextrose Agar (PDA: 42 g/L Potato Dextrose Agar, 1 L acqua bidistillata) e lasciati ad incubare a 25°C per 7 giorni.

4.3 Risultati

I generi fungini isolati dai diversi frammenti di mela sono riportati di seguito:

- Da lenticelle esterne: *Cladosporium*.
- Da picciolo: *Aspergillus* sezione *nigri* e *Cladosporium*.
- Da emisfero calicino: *Alternaria*, *Epicoccum*, *Stemphylium*.

5. Isolamento e identificazione fungina da frammenti di mela

5.1 Materiali e metodi

5.1.1 Raccolta campioni

Sono state selezionate due/tre mele per ogni varietà (Golden ed Imperatore) dai campioni provenienti dal campo. Da questi frutti sono stati prelevati dei frammenti in corrispondenza dell'estremità calicina, del picciolo e delle lenticelle che presentavano lesioni esterne.

5.1.2 Disinfezione

Prima della posa su piastra è stata eseguita una disinfezione superficiale dei frutti. Questa operazione è stata realizzata ponendo le mele sotto flusso di acqua corrente per circa 10 minuti al termine dei quali i frutti sono stati immersi in una soluzione di ipoclorito di sodio (NaClO) allo 0,5% per circa 30 secondi e successivamente risciacquati in acqua bidistillata per altri 30 secondi.

Le mele sono poi state lasciate ad asciugare sotto cappa per qualche minuto.

Questa procedura è stata ripetuta due volte: nel primo caso sono state utilizzate entrambe le varietà prese in esame e corrispondenti ai campioni del campo, mentre nel secondo sono state impiegate solamente le Imperatore provenienti dai Tank di lavorazione.

5.1.3 Isolamento funghi

I frammenti sono stati posizionati su Water Agar (WA, 15 g/L agar; 1 L acqua bidistillata) ed incubati a 25°C per 4/5 giorni.

Dopo lo sviluppo delle colonie fungine sono stati fatti dei nuovi prelievi in cui ogni singola colonia è stata piastrata su Potato Dextrose Agar (PDA: 42 g/L Potato Dextrose Agar, 1 L acqua bidistillata) e lasciata ad incubare a 25°C per circa 7 giorni.

5.2 Risultati

Per quanto riguarda la prima prova ovvero quella in cui sono state analizzate entrambe le varietà di mele provenienti dal campo sono stati isolati i seguenti generi fungini:

- Varietà Golden:
 - Da lenticelle esterne: *Alternaria* ed *Epicoccum*.
 - Da picciolo: *Alternaria*, *Fusarium* e *Monilia*.
 - Da emisfero calicino: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Penicillium* e *Phomopsis*.
- Varietà Imperatore:
 - Da lenticelle esterne: *Alternaria* e *Cladosporium*.
 - Da picciolo: *Alternaria* e *Cladosporium*.
 - Da emisfero calicino: nessun fungo in quanto non sono cresciute colonie su Water Agar.

Dalle Imperatore provenienti dai Tank di lavorazione, invece, sono stati identificati i generi fungini riportati di seguito:

- Da lenticelle esterne: nessun fungo in quanto non sono cresciute colonie su Water Agar.
- Da picciolo: *Epicoccum*, *Penicillium* e *Fusarium*.
- Da emisfero calicino: *Fusarium*.

6.

Colture monosporiche

6.1 Materiali e metodi

6.1.1 Analisi PCR

Sono state raccolte tutte le piastre contenenti il genere *Fusarium* precedentemente isolato e, su di esse, è stata eseguita l'analisi PCR con lo scopo di identificare il fungo a livello di specie.

I ceppi ricercati sono stati: *F. proliferatum*, *F. verticillioides* e *F. subglutinans* riconosciuti come produttori di fumonisine.

6.1.2 Colture monosporiche

Lo scopo di questo processo è quello di purificare le piastre "miste" di *Fusarium* in modo tale da ottenere i ceppi puri.

Delle diluizioni seriali sono state effettuate sulle piastre di *Fusarium* precedentemente sottoposte a PCR. Per questo step è stato utilizzato il terreno Water Agar (WA, 15 g/L agar; 1 L acqua bidistillata) e le piastre sono state poste in termostato a 25°C per circa 48 ore dopodiché le colonie cresciute sono state trasferite su Potato Dextrose Agar (PDA: 42 g/L Potato Dextrose Agar, 1 L acqua bidistillata) ed incubate a 25°C per 7 giorni.

Questa operazione è stata ripetuta tre volte.

6.2 Risultati

6.2.1 Analisi PCR

In **Tabella 2** sono riportati i risultati emersi dall'analisi PCR.

Sono state esaminate 10 piastre contenenti *Fusarium* di cui 4 provenienti dalla varietà Imperatore, 5 da Golden ed una da mix Imperatore-Golden (nello specifico dal Tank 51 relativo alla lavorazione del 12/10/2021).

Come si può vedere in **Tabella 2** i *Fusarium* sottoposti ad analisi sono stati isolati da parti di mela (sezione **4**) oppure dalle puree utilizzate nelle diluizioni seriali (sezione **2**). Nel primo caso *Fusarium* è stato individuato nella parte di frutto corrispondente all'emisfero calicino oppure al picciolo.

F. proliferatum è stato determinato in tutte le piastre analizzate mentre *F. verticillioides* solamente nella varietà Golden e nel mix Imperatore-Golden; in un solo campione, nella porzione del picciolo delle Imperatore, è stata individuata la presenza di *F. subglutinans*.

Tabella 2. Risultati analisi PCR eseguita sul genere *Fusarium*; viene riportata la varietà, il prodotto ed il sito di campionamento dell'isolato.

Varietà	Prodotto	Campionamento	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Fusarium subglutinans</i>
Imperatore	Frutto	Emisfero calicino	X		
Imperatore	Frutto	Emisfero calicino	X		
Imperatore	Frutto	Picciolo	X		
Imperatore	Frutto	Picciolo	X		X
Golden	Purea	Isolamento da piastra	X	X	
Mix Imperatore-Golden	Purea	Isolamento da piastra	X	X	
Golden	Purea	Isolamento da piastra	X	X	
Golden	Frutto	Picciolo	X	X	
Golden	Purea	Isolamento da piastra	X	X	
Golden	Purea	Isolamento da piastra	X	X	

7. Inoculo artificiale su puree di mela

7.1 Materiali e metodi

7.1.1 Campioni di purea

Sono stati selezionati i campioni di purea di mele Golden ed Imperatore relativi alla produzione primaria utilizzati precedentemente per l'identificazione e quantificazione fungina.

Le puree, relative alle tre differenti località, sono state miscelate ed omogeneizzate e successivamente scaldate, in un bagnetto termico, ad una temperatura di 80°C per 30 minuti e poi lasciate a raffreddare per altri 30 minuti; questo processo è stato ripetuto 2 volte al fine di ridurre il quantitativo di contaminanti naturalmente presenti nei campioni e, al contempo, mantenere inalterati i principi nutritivi in essi contenuti.

7.1.2 Preparazione degli inoculi

Sono stati preparati tre inoculi:

- *Fusarium proliferatum* isolato da frammenti di mela analizzati precedentemente (sezione 5).
- *Fusarium proliferatum* MPVPG29 isolato da aglio.
- *Aspergillus flavus* A2092 produttore di aflatossine.

I ceppi sono stati inoculati su Potato Dextrose Agar (PDA: 42g/L Potato Dextrose Agar, 1L acqua bidistillata) ed incubati a 25°C per 7 giorni. L'inoculo è stato prodotto raggiungendo la concentrazione di 10⁵ UFC/mL per ogni ceppo utilizzato.

7.1.3 Inoculo

Per entrambi i campioni è stata determinata l'attività dell'acqua; la misurazione è stata ripetuta tre volte per ogni varietà esaminata.

10mL di purea sono stati versati su piastre Petri (Ø 6 cm) ed inoculate, al centro, con 1 ml di inoculo (**Figura 7, 8**): un ceppo per ogni piastra. Le piastre sono poi state incubate in termostati a 5°C, 15°C, 20°C e 25°C per 14 giorni per quelle inoculate con *A. flavus* e per 21 giorni per quelle inoculate con *F. proliferatum*.

A 7, 14 e 21 giorni, per ogni piastra, è stato inoltre misurato il diametro della colonia al fine di quantificarne lo sviluppo sulla purea di mela.

Infine, i campioni congelati sono stati inviati all'Università di Parma per essere sottoposti alle analisi delle micotossine.

Figura 7. Crescita di *F. proliferatum* mele, *F. proliferatum* aglio e *A. flavus* nelle puree della varietà Golden dopo 14 giorni di incubazione a 5°C (A), 15°C (B), 20°C (C) e 25°C (D).

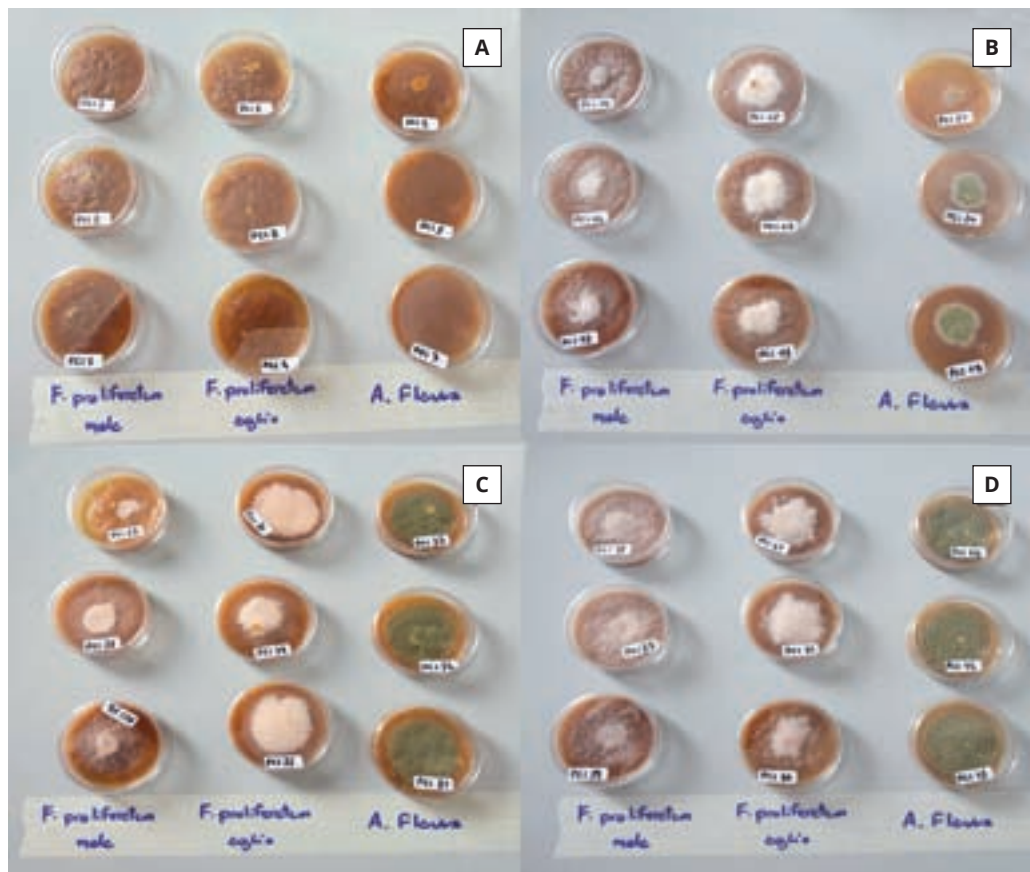
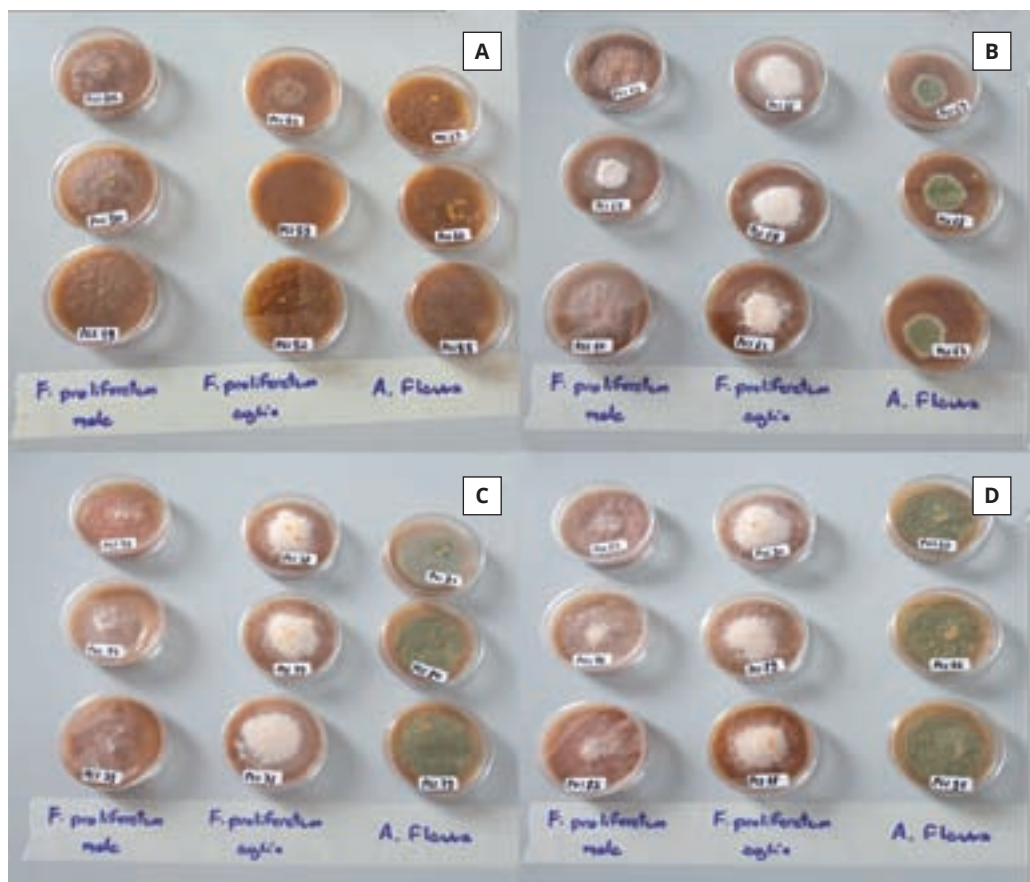


Figura 8. Crescita di *F. proliferatum* mele, *F. proliferatum* aglio e *A. flavus* nelle puree della varietà Imperatore dopo 14 giorni di incubazione a 5°C (A), 15°C (B), 20°C (C) e 25°C (D).



7.2 Risultati

L'attività dell'acqua (aw) è riportata in **Tabella 3**. La varietà Golden presenta un'attività compresa tra 0.982 e 0.999 mentre le mele Imperatore valori tra 0.991 e 0.993. Le temperature di misurazione sono pressoché le stesse per entrambe le varietà.

Varietà	aw	T(°C)
Golden	0.999	22.1
Golden	0.995	22.3
Golden	0.982	22.3
Imperatore	0.991	22.9
Imperatore	0.992	22.0
Imperatore	0.993	22.4

Tabella 3. Attività dell'acqua misurata sulle puree di mela prima dell'inoculo artificiale.

In **Tabella 4** sono riportati i diametri relativi alle colonie cresciute sulle puree inoculate; i dati sono espressi come medie dei tre replicati.

Come si deduce da **Tabella 4** alla temperatura di 5°C e nei controlli di entrambe le varietà non è stata riscontrata crescita fungina.

Prendendo in considerazione differenze a livello varietale emerge che *F. proliferatum* (proveniente sia da mele che da aglio) ha una crescita più marcata a 25°C e nello specifico nelle mele Imperatore raggiunge i 6 cm di diametro già dopo 14 giorni di incubazione per entrambi gli inoculi.

A. flavus non sembra mostrare particolari differenze al livello varietale: sia nelle Golden che nelle Imperatore raggiunge la massima estensione a 20°C e 25°C mentre a 15°C è stato misurato un diametro medio rispettivamente di 2.00 cm e di 2.40 cm dopo 14 giorni di incubazione.

Per quanto riguarda differenze tra tipologia di inoculo ovvero *F. proliferatum* isolato da mele o da aglio emerge che nella varietà Golden la crescita è identica a 15°C per entrambi gli inoculi (Ø 4.07 cm), a 20°C risulta essere maggiore in quello isolato da aglio e, a 25°C, solo *F. proliferatum* proveniente da mele raggiunge il diametro massimo.

Nella varietà Imperatore la crescita appare leggermente maggiore nelle piastre inoculate con *F. proliferatum* da aglio a 15°C (3.70 cm vs 4.00 cm) mentre sia a 20°C che a 25°C le colonie raggiungono i 6 cm di diametro e, alla seconda temperatura, già dopo 14 giorni di incubazione.

Tabella 4.
Dimensione
diametri relativi
agli inoculi di *F.*
***proliferatum* isolato**
da mele ed aglio e di
***A. flavus* (i dati sono**
espressi come medie
di tre replicati).

Varietà	Inoculo	Temperatura	Tempo di incubazione	Diametro 7g (cm)	Diametro 14g (cm)	Diametro 21g (cm)
Golden	<i>F. proliferatum</i> mele	5°C	21 giorni	0.00	0.00	0.00
Golden	<i>F. proliferatum</i> mele	15°C	21 giorni	1.17	1.93	4.07
Golden	<i>F. proliferatum</i> mele	20°C	21 giorni	1.67	3.30	4.53
Golden	<i>F. proliferatum</i> mele	25°C	21 giorni	3.27	6.00	6.00
Golden	<i>F. proliferatum</i> aglio	5°C	21 giorni	0.00	0.00	0.00
Golden	<i>F. proliferatum</i> aglio	15°C	21 giorni	2.17	2.87	4.07
Golden	<i>F. proliferatum</i> aglio	20°C	21 giorni	3.33	3.63	5.07
Golden	<i>F. proliferatum</i> aglio	25°C	21 giorni	3.67	4.33	5.17
Golden	<i>A. flavus</i>	5°C	14 giorni	0.00	0.00	
Golden	<i>A. flavus</i>	15°C	14 giorni	0.83	2.00	
Golden	<i>A. flavus</i>	20°C	14 giorni	3.10	6.00	
Golden	<i>A. flavus</i>	25°C	14 giorni	4.53	6.00	
Golden	Controllo	5°C	21 giorni	0.00	0.00	0.00
Golden	Controllo	15°C	21 giorni	0.00	0.00	0.00
Golden	Controllo	20°C	21 giorni	0.00	0.00	0.00
Golden	Controllo	25°C	21 giorni	0.00	0.00	0.00
Imperatore	<i>F. proliferatum</i> mele	5°C	21 giorni	0.00	0.00	0.00
Imperatore	<i>F. proliferatum</i> mele	15°C	21 giorni	1.57	3.27	3.70
Imperatore	<i>F. proliferatum</i> mele	20°C	21 giorni	3.00	4.07	6.00
Imperatore	<i>F. proliferatum</i> mele	25°C	21 giorni	3.83	6.00	6.00
Imperatore	<i>F. proliferatum</i> aglio	5°C	21 giorni	0.00	0.00	0.00
Imperatore	<i>F. proliferatum</i> aglio	15°C	21 giorni	2.27	2.93	4.00
Imperatore	<i>F. proliferatum</i> aglio	20°C	21 giorni	3.00	3.67	6.00
Imperatore	<i>F. proliferatum</i> aglio	25°C	21 giorni	2.83	6.00	6.00
Imperatore	<i>A. flavus</i>	5°C	14 giorni	0.00	0.00	
Imperatore	<i>A. flavus</i>	15°C	14 giorni	1.10	2.40	
Imperatore	<i>A. flavus</i>	20°C	14 giorni	3.00	6.00	
Imperatore	<i>A. flavus</i>	25°C	14 giorni	4.33	6.00	
Imperatore	Controllo	5°C	21 giorni	0.00	0.00	0.00
Imperatore	Controllo	15°C	21 giorni	0.00	0.00	0.00
Imperatore	Controllo	20°C	21 giorni	0.00	0.00	0.00
Imperatore	Controllo	25°C	21 giorni	0.00	0.00	0.00

8.

Determinazione mediante LC-MS/MS di micotossine

8.1 Sviluppo del metodo analitico

8.1.1 Reagenti e strumentazione

Gli standard analitici di Aflatossine (AFs) e Patulina (PAT) sono stati ottenuti da Fermentek Ltd, mentre gli standard analitici delle micotossine da *Alternaria* (Alternariolo - AOH; Alternariolo monometil-etere - AME) sono ottenuti da Biopure. Il metanolo è stato acquistato da VWR International e l'acetonitrile da Sharlab. Il Methyl tert-butyl ether e l'acido acetico sono stati acquistati da Sigma-Aldrich.

L'analisi è stata effettuata su uno strumento UHPLC Dionex Ultimate 3000 accoppiato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (TSQ Vantage; Thermo Fisher Scientific Inc., San Jose, CA, USA) dotato di una sorgente elettrospray (ESI). La separazione cromatografica è stata ottenuta con una colonna SunShell C₁₈ (Chromanik Technologies Inc. Osaka, Japan) con dimensioni 2.1 × 100 mm, 2.6 μm.

Come fase mobile, sono state utilizzate acqua ultrapure allo 0.2% di acido acetico e 5 mM in ammonio acetate come solvente A e metanolo al 0.2% di acido acetico come solvente B. Il flusso è stato settato a 0.4 mL min⁻¹ in gradiente. Il profilo del gradiente di eluizione è stato il seguente: 0 - 1 min 5% B; 1 - 8 min 5-90% B; 8 - 11 min 90% B; 11 - 13 min 90-5% B e 13 - 18 min 5%. La Colonna è stata posta ad una temperatura di 40°C. Il volume di iniezione è stato pari a 3 μL. L'ordine di eluizione è il seguente: PAT > AFG2 > AFG1 > AFB2 > AFB1 > FB1 > AOH > Tentossina (TEN) > FB2 > AME. I limiti di rivelazione (LOD) sono stati ottenuti nel range 0.007 μg kg⁻¹ per AFB2 e 1.216 μg kg⁻¹ per PAT.

I dati sono stati processati mediante Thermo Xcalibur Roadmap Software e Tibco Statistica package.

8.1.2 Preparazione del campione

La purea di mela è stata omogeneizzata, ed è stato prelevato 1 g di campione in un tubo falcon da 15 mL. Sono stati quindi aggiunti 4 mL di metanolo e agitato al vortex per 10 s. Il tubo è stato quindi posto allo shaker orizzontale per 10 min a 230 strokes/min, e successivamente centrifugato per 10 min a 10000 rpm. Dopodiché, 1 mL di fase organica è stata trasferita in una vial di vetro e portata a secco sotto flusso di azoto. Il residuo è stato ricostituito in 250 μL di metanolo/acqua (75:25 v/v) e portato al vortex per 10 s. Il volume totale è stato trasferito in una vial da 400 μL vial. Lo schema di estrazione è riportato in **Figura 9**.

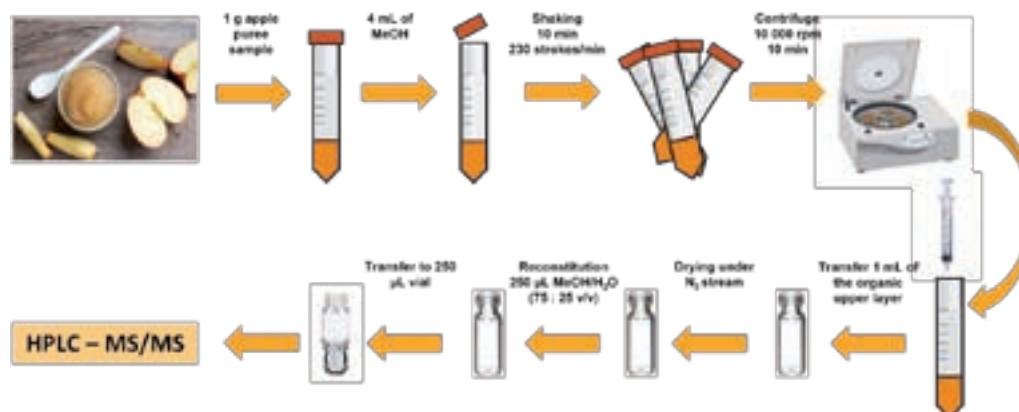


Figura 9. Schema di preparazione del campione.

9. Contenuto di micotossine in mele e puree

9.1 Mele da campo

Come primo step dello studio, è stata analizzata la presenza di micotossine nelle mele conferite dal committente e raccolte in campo. Di seguito, in **Tabella 5**, sono riportati i risultati ottenuti e le caratteristiche delle mele analizzate.

In generale, si può notare come la contaminazione da PAT ricorra in modo frequente e a concentrazioni anche al di sopra del MRL. Si nota una prevalenza nelle mele di varietà Golden. Allo stesso modo, la presenza di micotossine da *Alternaria*, principalmente AOH e AME, è frequente in tutte le condizioni considerate. Infine, si nota una non trascurabile incidenza di aflatossine, in particolare AFB1. Non è invece segnalata la presenza di fumonisine.

I dati così ottenuti sono stati quindi sottoposti ad analisi ANOVA multifattoriale mediante software Tibsco Statistica. Nessuno dei fattori considerati è risultato significativo per tutte le variabili, probabilmente a causa della bassa numerosità e dell'elevata variabilità di campo.

Mediante analisi ANOVA one-way è stato però possibile individuare differenze significative fra alcune classi che verranno di seguito discusse.

In particolare, l'analisi statistica ha mostrato una differenza significativa della presenza di PAT in mele di diversa varietà ($p = 0.0012$), mentre non si sono osservate differenze significative per quanto riguarda la presenza di aflatossine e micotossine da *Alternaria*.

Tabella 5.
Concentrazione di micotossine rilevate in mele da campo (i dati sono espressi come medie di tre replicati).

Varietà	Zona	Trattamento	Provenienza	Concentrazione ($\mu\text{g kg}^{-1}$)									
				PAT	AFG2	AFG1	AFB2	AFB1	AOH	FB1	TEN	FB2	AME
Golden	Bevilacqua	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Campagna	50.47	3.27	<LOD	3.03	1.92	<LOD	<LOD	0.95	<LOD	<LOD
Golden	Bevilacqua	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Campagna	30.26	12.71	<LOD	2.66	2.15	<LOD	<LOD	1.05	<LOD	<LOD
Golden	Bevilacqua	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Campagna	22.56	6.82	<LOD	2.15	2.02	<LOD	<LOD	0.13	<LOD	<LOD
Golden	Bevilacqua	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Campagna	29.29	1.99	<LOD	1.43	2.25	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Golden	Legnago	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Magazzino	54.80	2.32	<LOD	1.87	3.23	<LOD	<LOD	1.65	<LOD	<LOD
Golden	Legnago	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Magazzino	36.70	5.93	<LOD	2.19	2.02	1.58	<LOD	0.91	<LOD	<LOD
Golden	Legnago	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Magazzino	12.45	5.02	<LOD	1.93	2.07	<LOD	<LOD	0.20	<LOD	<LOD
Golden	Legnago	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Magazzino	37.67	1.76	<LOD	1.54	2.39	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Golden	Ronco All'Adige	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Campagna	46.42	3.55	<LOD	1.37	1.93	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Golden	Ronco All'Adige	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Campagna	25.64	3.58	<LOD	1.47	1.89	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Golden	Ronco All'Adige	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Campagna	18.03	<LOD	<LOD	1.22	1.95	<LOD	<LOD	0.44	<LOD	<LOD
Golden	Ronco All'Adige	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Campagna	20.06	<LOD	<LOD	1.34	2.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Golden	Ronco All'Adige	Trattato con <i>A. pullulans</i>	Magazzino	<LOD	<LOD	<LOD	1.89	2.07	<LOD	<LOD	0.34	<LOD	<LOD

AFB1: Aflatossina B1; AFB2: Aflatossina B2; AFG1: Aflatossina G1; AFG2: Aflatossina G2; AOH: Alternariolo; FB1: Fumonisinina B1; FB2: Fumonisinina B2; TEN: Tentossina; AME: Alternariolo monometil-etere; PAT: Patulina

Varietà	Zona	Trattamento	Provenienza	Concentrazione ($\mu\text{g kg}^{-1}$)									
				PAT	AFG2	AFG1	AFB2	AFB1	AOH	FB1	TEN	FB2	AME
Golden	Ronco All'Adige	Trattato con <i>A. pullulans</i>	Magazzino	<LOD	<LOD	<LOD	2.03	1.89	<LOD	<LOD	0.48	<LOD	<LOD
Golden	Ronco All'Adige	Trattato con <i>A. pullulans</i>	Magazzino	6.78	1.01	<LOD	2.22	1.97	18.51	<LOD	0.26	<LOD	1.40
Golden	Ronco All'Adige	Trattato con <i>A. pullulans</i>	Magazzino	<LOD	<LOD	<LOD	2.53	2.05	4.07	<LOD	0.64	<LOD	<LOD
Imperatore	Bevilacqua	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Campagna	<LOD	<LOD	1.55	2.03	3.52	1.42	<LOD	0.86	<LOD	<LOD
Imperatore	Bevilacqua	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Campagna	24.10	<LOD	<LOD	2.03	1.87	1.20	<LOD	0.16	<LOD	<LOD
Imperatore	Bevilacqua	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Campagna	<LOD	<LOD	<LOD	1.27	2.88	<LOD	<LOD	3.84	<LOD	<LOD
Imperatore	Bevilacqua	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Campagna	<LOD	<LOD	<LOD	2.75	1.81	1.78	<LOD	0.57	<LOD	<LOD
Imperatore	Legnago	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Magazzino	28.43	8.87	<LOD	2.59	1.88	19.26	<LOD	0.41	<LOD	2.26
Imperatore	Legnago	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Magazzino	<LOD	<LOD	<LOD	1.95	1.86	1.36	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Imperatore	Legnago	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Magazzino	60.76	1.00	<LOD	2.02	1.87	1.00	<LOD	0.17	<LOD	<LOD
Imperatore	Legnago	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Magazzino	<LOD	<LOD	<LOD	2.22	1.91	1.22	<LOD	0.18	<LOD	<LOD
Imperatore	Ronco All'Adige	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Magazzino	48.35	8.85	1.79	2.10	5.37	1.29	<LOD	1.40	<LOD	<LOD
Imperatore	Ronco All'Adige	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Magazzino	12.45	<LOD	<LOD	1.34	2.12	<LOD	<LOD	0.49	<LOD	<LOD
Imperatore	Ronco All'Adige	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Magazzino	14.28	7.19	2.01	1.91	5.34	1.91	<LOD	1.62	<LOD	0.10
Imperatore	Ronco All'Adige	NON Trattato con <i>A. pullulans</i>	Magazzino	<LOD	<LOD	<LOD	1.43	2.11	1.14	<LOD	0.28	<LOD	<LOD
Imperatore	Bevilacqua	Trattato con <i>A. pullulans</i>	Campagna	<LOD	<LOD	<LOD	1.11	2.38	1.34	<LOD	0.10	<LOD	<LOD
Imperatore	Bevilacqua	Trattato con <i>A. pullulans</i>	Campagna	22.17	4.94	1.30	1.74	5.37	1.73	<LOD	1.03	<LOD	<LOD
Imperatore	Bevilacqua	Trattato con <i>A. pullulans</i>	Campagna	8.80	0.70	<LOD	1.08	2.04	<LOD	<LOD	0.15	<LOD	<LOD
Imperatore	Bevilacqua	Trattato con <i>A. pullulans</i>	Campagna	<LOD	8.02	6.25	3.48	3.13	<LOD	<LOD	0.64	<LOD	<LOD

AFB1: Aflatossina B1; AFB2: Aflatossina B2; AFG1: Aflatossina G1; AFG2: Aflatossina G2; AOH: Alternariolo; FB1: Fumonisin B1; FB2: Fumonisin B2; TEN: Tentossina; AME: Alternariolo monometil-etero; PAT: Patulina

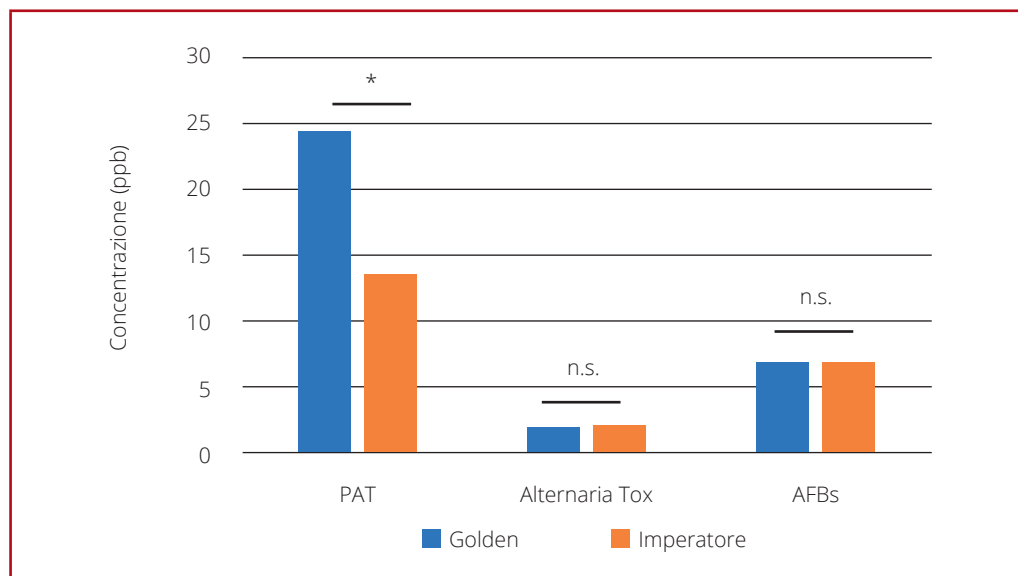
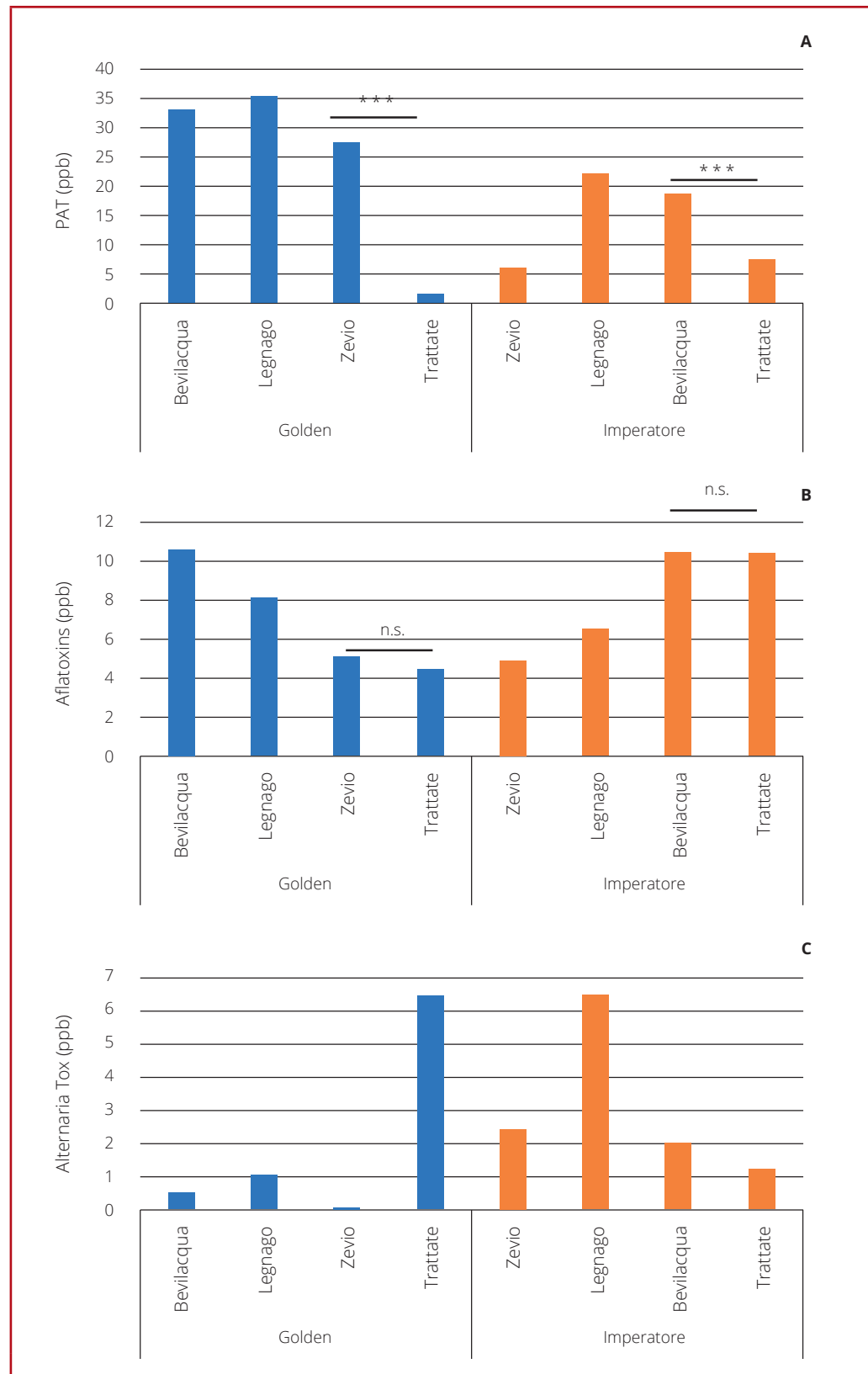


Figura 10. Presenza di micotossine: confronto fra mele var. Golden e var. Imperatore.

Sempre in relazione alla presenza di PAT è stato identificato un effetto significativo del trattamento con *A. pullulans* ($p = 0.0000$), come riportato in **Figura 11 A**. Nessun effetto significativo è stato invece osservato per quanto riguarda la presenza di aflatoxine (**Figura 11 B**) e micotossine da *Alternaria* (**Figura 11 C**), per le quali sembra prevalere una variabilità geografica.

Figura 11. Presenza di micotossine: confronto fra zone geografiche e presenza/assenza di trattamento con *A. pullulans*. A) patulina; B) aflatoxine; C) micotossine da *Alternaria*.



9.2 Mele in Tank e puree finali

Sono state quindi analizzate le mele in Tank e le puree ottenute dai diversi Tank, per verificare l'eventuale variazione durante il processo produttivo. I risultati sono riportati in **Tabella 6** e in **Tabella 7**.

È importante notare come non sia stata trovata la presenza di fumonisine nelle mele in Tank pre-processo (**Tabella 6**), coerentemente con quanto ritrovato dai prelievi di campo, mentre sia stata individuata presenza di fumonisine nelle puree finali (**Tabella 7**). Questo risultato richiede un successivo approfondimento, soprattutto legato alle condizioni di processo.

Tank	Replica	Concentrazione ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
		PAT	AFG2	AFG1	AFB2	AFB1	AOH	TEN	AME
65	1	135.25	10.96	4.11	4.15	7.41	1.67	0.82	<LOD
65	2	<LOD	1.20	<LOD	4.23	2.27	<LOD	0.26	<LOD
65	3	228.60	1.98	<LOD	5.15	2.55	<LOD	0.30	<LOD
65	4	<LOD	4.74	0.99	3.32	4.94	1.51	0.44	<LOD
66	1	83.57	1.68	0.82	3.28	2.37	1.05	0.08	<LOD
66	2	111.58	<LOD	<LOD	4.51	2.37	<LOD	0.55	<LOD
66	3	37.96	<LOD	1.45	4.29	2.35	<LOD	<LOD	<LOD
66	4	184.91	2.19	<LOD	4.20	2.07	<LOD	0.17	<LOD
54	1	<LOD	<LOD	<LOD	5.29	2.61	<LOD	0.19	<LOD
54	2	75.10	<LOD	<LOD	5.36	2.49	41.22	0.06	13.90
54	3	269.02	5.67	5.41	10.24	4.68	<LOD	0.37	1.10
54	4	<LOD	<LOD	<LOD	5.08	2.44	<LOD	1.00	<LOD
56	1	66.63	<LOD	<LOD	6.08	2.37	<LOD	0.06	<LOD
56	2	47.96	4.34	<LOD	6.20	2.37	<LOD	0.30	<LOD
56	3	<LOD	<LOD	<LOD	5.17	2.28	<LOD	0.07	<LOD
56	4	65.77	<LOD	<LOD	4.46	2.19	<LOD	0.09	<LOD
52	1	26.31	<LOD	<LOD	2.66	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
52	2	13.42	<LOD	<LOD	2.39	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
52	3	21.11	<LOD	<LOD	2.42	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
52	4	<LOD	<LOD	<LOD	2.58	<LOD	1.78	<LOD	<LOD
70	1	16.11	<LOD	<LOD	2.69	1.86	<LOD	<LOD	<LOD
70	2	<LOD	<LOD	<LOD	2.02	<LOD	<LOD	1.73	<LOD
70	3	19.29	<LOD	<LOD	2.22	<LOD	20.65	0.12	19.65
70	4	18.03	<LOD	<LOD	1.73	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
63	1	11.97	<LOD	5.97	2.58	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
63	2	6.87	<LOD	<LOD	2.59	<LOD	<LOD	3.09	<LOD
63	3	<LOD	<LOD	<LOD	2.15	<LOD	1.53	<LOD	<LOD
63	4	<LOD	<LOD	<LOD	2.20	1.83	<LOD	<LOD	<LOD
58	1	34.88	2.06	3.11	2.37	3.05	<LOD	0.23	<LOD
58	2	<LOD	<LOD	<LOD	2.77	1.94	<LOD	<LOD	<LOD
58	3	<LOD	<LOD	<LOD	2.20	2.00	<LOD	<LOD	<LOD
58	4	13.32	2.27	<LOD	2.31	3.24	<LOD	0.36	<LOD
50	1	44.02	<LOD	<LOD	2.57	1.90	<LOD	<LOD	<LOD
50	2	<LOD	<LOD	<LOD	2.01	2.00	<LOD	<LOD	<LOD
50	3	6.39	<LOD	<LOD	2.40	1.90	<LOD	<LOD	<LOD
50	4	14.76	<LOD	<LOD	2.32	1.95	<LOD	<LOD	<LOD
51	1	<LOD	<LOD	<LOD	2.20	1.84	<LOD	<LOD	<LOD
51	2	<LOD	<LOD	8.53	2.35	2.06	1.16	<LOD	<LOD
51	3	<LOD	<LOD	<LOD	1.19	1.92	<LOD	<LOD	<LOD
51	4	<LOD	<LOD	<LOD	1.70	2.02	<LOD	<LOD	<LOD
72	1	<LOD	0.98	7.33	1.39	2.78	<LOD	<LOD	<LOD
72	2	<LOD	<LOD	<LOD	2.78	2.99	<LOD	<LOD	<LOD
72	3	<LOD	<LOD	<LOD	1.39	2.06	<LOD	<LOD	<LOD
72	4	20.54	0.89	<LOD	1.30	3.21	<LOD	0.24	<LOD

Tabella 6.
Concentrazione di micotossine rilevate nelle mele in Tank (i dati sono espressi come medie di due replicati).

AFB1: Aflatossina B1; AFB2: Aflatossina B2; AFG1: Aflatossina G1; AFG2: Aflatossina G2; AOH: Alternariolo; FB1: Fumonisina B1; FB2: Fumonisina B2; TEN: Tentossina; AME: Alternariolo monometil-etere; PAT: Patulina

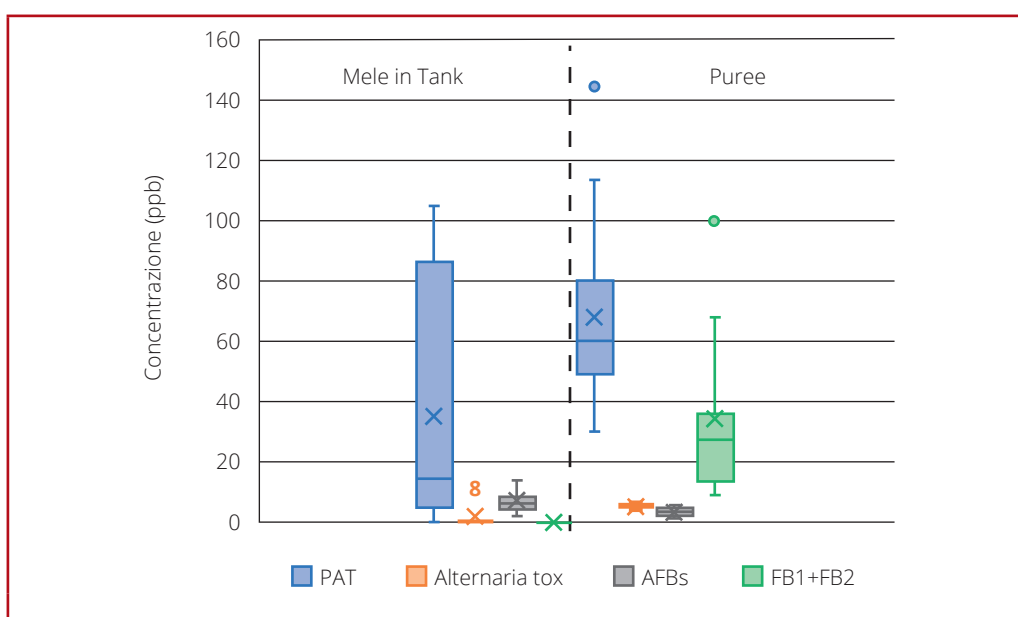
Tabella 7.
Concentrazione di
micotossine rilevate
nelle puree finali (i
dati sono espressi
come medie di due
replicati).

Tank	Prodotto	Concentrazione ($\mu\text{g kg}^{-1}$)									
		PAT	AFG2	AFB2	AFB1	AOH	FB1	TEN	FB2	AME	
65	Purea	113.02	2.36	1.59	2.77	2.30	16.66	0.30	2.65	0.34	
66	Purea	61.92	1.13	1.62	2.07	2.90	9.58	0.19	<LOD	0.56	
54	Purea	144.49	2.87	1.60	2.55	3.82	27.82	0.32	5.60	1.47	
56	Purea	61.58	2.50	1.97	2.40	2.53	26.96	0.21	3.91	0.76	
52	Purea	41.18	0.66	1.66	1.94	2.00	24.43	0.30	3.04	0.05	
70	Purea	53.98	1.89	1.98	2.30	1.38	9.96	0.26	2.05	<LOD	
63	Purea	80.11	1.35	1.98	2.18	1.49	11.87	0.38	1.64	<LOD	
58	Purea	49.07	0.97	2.01	1.94	3.35	33.81	0.97	2.49	1.16	
50	Purea	60.23	1.33	2.74	1.98	3.13	90.47	1.09	9.13	0.72	
51	Purea	30.79	1.12	2.12	1.97	2.75	19.74	0.45	2.25	0.65	
72	Purea	58.65	1.09	2.77	1.90	3.76	63.16	0.76	4.59	1.15	

AFB1: Aflatossina B1; AFB2: Aflatossina B2; AFG2: Aflatossina G2; AOH: Alternariolo; FB1: Fumonissina B1; FB2: Fumonissina B2; TEN: Tentossina; AME: Alternariolo monometil-etero; PAT: Patulina

Si ritiene infatti, sulla base di quanto noto in letteratura relativamente al comportamento delle fumonissine, che questo fenomeno possa essere ricondotto al mascheramento delle fumonissine stesse nelle fasi di pre-processo a causa di interazioni pH-dipendenti con la matrice. Tali interazioni potrebbero poi venire meno durante le fasi di processo, con conseguente liberazione delle fumonissine nel prodotto finale. I dati sono ulteriormente illustrati in **Figura 12**, dalla quale è possibile evincere come non ci siano variazioni significative indotte dal processo, ad esclusione della presenza di fumonissine sopra citata. L'unico effetto che è possibile apprezzare è una generale riduzione della dispersione dei dati, dovuta alla maggiore omogeneità del prodotto in analisi e quindi di una minore variabilità nel prelievo.

Figura 12. Confronto
mediante box plot
del contenuto di
micotossine nei
Tank presi in esame
pre- e post-processo.



10. Produzione di micotossine in puree inoculate

Gli inoculi artificiali descritti in sezione 6, sono stati analizzati per la presenza di micotossine. La metodologia utilizzata è la stessa descritta in sezione 8.1

I risultati ottenuti, riportati in **Tabella 8**, sono coerenti con gli inoculi effettuati e mostrano la capacità di *F. proliferatum* di produrre fumonisine a tutte le temperature considerate, con un maggior accumulo osservato a 25°C. La produzione è risultata maggiore nelle puree ottenute con mele di varietà Imperatore, rispetto alla purea ottenuta con mele di varietà Golden. Per quanto riguarda la produzione di aflatoSSine, *A. flavus* ha mostrato una scarsa capacità di produrre nelle condizioni di inoculo adottate ad eccezione di T = 20°C, ma con produzioni comunque di rilievo se comparate con i limiti di legge. Diversamente da quanto osservato per l'accumulo di fumonisine, la produzione di aflatoSSine è risultata maggiore nelle puree ottenute con mele di varietà Golden.

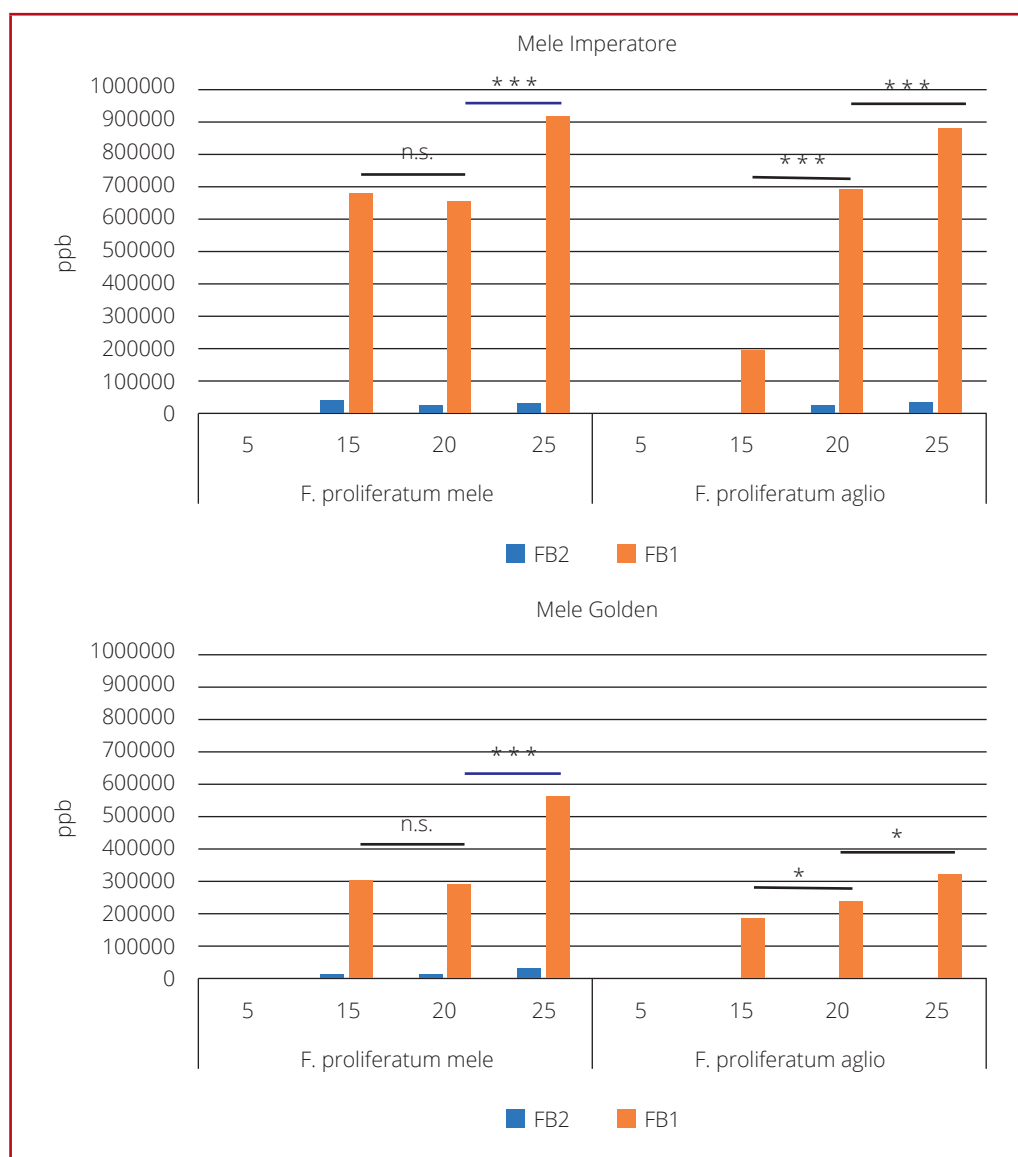


Figura 13. Produzione di fumonisine in puree di mela varietà Imperatore e Golden a seguito di inoculo con *F. proliferatum* isolato da mele oppure isolato da aglio.

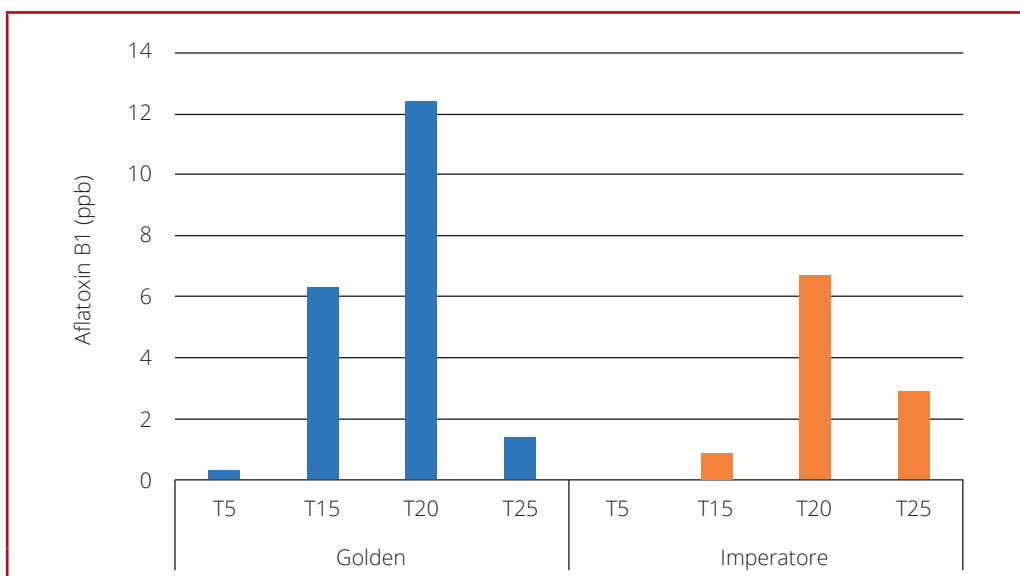
Tabella 8.
Concentrazione di micotossine rilevate nelle puree inoculate (i dati sono espressi come medie di tre replicati; LOD: 0.03 ppb for AFB1, 0.06 ppb per AFB2, 0.12 ppb for FB1 and 0.50 for FB2).

Varietà	Inoculo	Temperatura (°C)	Concentrazione (µg kg ⁻¹)			
			AFB1	AFB2	FB2	FB1
Imperatore	<i>F. proliferatum</i> mela	5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
		15	< LOD	< LOD	30326	678792
		20	< LOD	< LOD	32690	653072
		25	< LOD	< LOD	42607	916890
	<i>F. proliferatum</i> aglio	5	< LOD	< LOD	< LOD	74
		15	< LOD	< LOD	3952	195963
		20	< LOD	< LOD	22857	692778
		25	< LOD	< LOD	35062	880414
	<i>Aspergillus flavus</i>	5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
		15	0.9	< LOD	< LOD	< LOD
		20	6.7	< LOD	< LOD	< LOD
		25	2.9	< LOD	< LOD	< LOD
Golden	<i>F. proliferatum</i> mela	5	< LOD	< LOD	< LOD	15
		15	< LOD	< LOD	12996	302826
		20	< LOD	< LOD	12755	290096
		25	< LOD	< LOD	29808	562317
	<i>F. proliferatum</i> aglio	5	< LOD	< LOD	< LOD	35
		15	< LOD	< LOD	8418	190183
		20	< LOD	< LOD	5301	237455
		25	< LOD	< LOD	9263	321313
	<i>Aspergillus flavus</i>	5	0.3	0.2	< LOD	< LOD
		15	6.3	0.2	< LOD	< LOD
		20	12.4	0.3	< LOD	< LOD
		25	1.4	< LOD	< LOD	< LOD

AFB1: Aflatossina B1; AFB2: Aflatossina B2; FB1: Fumonissina B1; FB2: Fumonissina B2

Come si può notare dai risultati riportati in tabella, *F. proliferatum* è un fungo che si adatta molto bene al substrato in cui si viene a trovare e i 2 ceppi di origine molto diversa, mele e aglio, hanno prodotto quantità comparabili e molto elevate di fumonissine in 21 giorni, prediligendo la varietà Imperatore.

Figura 14.
Produzione di aflatossina B1 in puree di mela varietà Imperatore e Golden a seguito di inoculo con *A. flavus*.



Aspergillus flavus è stato incubato per 14 giorni, un tempo minore rispetto a *F. proliferatum* suggerito dallo sviluppo rapido delle colonie. La produzione di aflatossine è stata comunque rilevante e ha dimostrato la capacità del fungo di svilupparsi su questa matrice, anche se in forma di purea, che data la natura del fungo è presumibilmente meno favorevole rispetto al frutto intero, prediligendo la varietà Golden.

11. Considerazioni

Nelle mele campionate in campo sono stati isolati diversi generi fungini quali *Alternaria*, *Penicillium* tra quelli di interesse in quanto produttori di micotossine, ma non è stato individuato *Fusarium* in nessuna località e varietà esaminata. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che gli altri generi presenti in questi frutti sono più competitivi, e probabilmente più presenti di *Fusarium*. Questo rende probabilmente difficile l'isolamento del genere *Fusarium* con il metodo adottato, ovvero con la conta delle unità formanti colonia (UFC/g).

Fusarium, invece, è stato isolato in alcune parti di mela e, nello specifico, nella parte del picciolo e dell'emisfero calicino eseguendo isolamenti diretti dai frutti. Per identificare le specie presenti è stata applicata l'analisi PCR ed è emerso che *F. proliferatum* è presente in tutte le colonie esaminate e solo in alcuni casi vi è la copresenza di *F. verticillioides*.

Pertanto, questo lavoro ha permesso di confermare la presenza di *F. proliferatum* su mele e di ipotizzarne la responsabilità nella produzione di fumonisine.

Per quanto riguarda le analisi delle micotossine quelle rintracciate nelle mele da campo sono state:

- Patulina (PAT) con valori di concentrazione compresi tra 6.78 µg/kg e 60.76 µg/kg;
- Aflatossine B1 (1.81 µg/kg-5.37 µg/kg) e B2 (1.08 µg/kg-3.48 µg/kg); G1 (1.30 µg/kg-6.25 µg/kg); G2 (0.70 µg/kg-12.71 µg/kg);
- Tossine da *Alternaria* ovvero Alternariolo (AOH) con valori di concentrazione compresi tra 1.00 µg/kg e 19.26 µg/kg e Alternariolo monometil-etere (AME) con range di concentrazione tra 0.10 µg/kg e 2.26 µg/kg;
- Tentossina (TEN) con valori compresi tra 0.10 µg/kg e 3.84 µg/kg.

Per quasi tutte le micotossine soprariportate, ad eccezione di AFB1 e AFB2, sono stati individuati anche campioni con valori di concentrazioni molto bassi ovvero al di sotto del limite di determinazione.

L'analisi micotossine nelle mele provenienti dal campo ci mostra quindi la necessità di prestare attenzione in quanto si rilevano patulina e aflatossine anche a valori superiori al limite di legge. Inoltre, sono frequentemente presenti le tossine da *Alternaria* che sono oggetto di forte attenzione da parte della Commissione Europea. Non è mai stata rilevata presenza di fumonisine.

Riguardo al periodo post-raccolta, nelle mele tal quale, dopo conservazione e pronte per la lavorazione, sono stati isolati: *Alternaria*, *A. flavus*, *Fusarium*, *Penicillium*, oltre ad altri funghi non produttori di micotossine. Le micotossine che sono state individuate in questi frutti sono:

- PAT con valori di concentrazione compresi tra 6.39 µg/kg e 269.02 µg/kg;
- Aflatossine B1 (1.83 µg/kg-7.41 µg/kg) e B2 (1.19 µg/kg-10.24 µg/kg); G1 (0.82 µg/kg- 8.53 µg/kg); G2 (0.89 µg/kg-10.96 µg/kg);
- Micotossine da *Alternaria* ovvero AOH (1.05 µg/kg-41.22 µg/kg), AME (1.1 µg/kg-19.65 µg/kg);
- TEN con valori compresi tra 0.06 µg/kg e 3.09 µg/kg.

Per tutte le micotossine soprariportate sono stati individuati campioni con valori di concentrazioni al di sotto del limite di determinazione ad eccezione della AFB2 il cui quantitativo è sempre stato misurato.

Pertanto, la conservazione, anche se avvenuta a basse temperature, sembra permettere un aumento della contaminazione da micotossine, almeno sulla base dei campioni da noi analizzati. Le fumonisine non sono comunque mai state rilevate.

Prendendo in considerazione le puree relative ai Tank di lavorazione e quindi esaminate post-processo, non è stata riscontrata crescita fungina, come atteso, dato che sono state trattate termicamente. È stata però individuata la presenza di svariate micotossine e nello specifico:

- PAT con valori di concentrazione compresi tra 30.79 µg/kg e 144.9 µg/kg;
- Aflatossine B1 (1.9 µg/kg-2.77 µg/kg) e B2 (1.59 µg/kg-2.77 µg/kg); G2 (0.66 µg/kg-2.87 µg/kg);
- Tossine da *Alternaria*: AOH (1.38 µg/kg-3.82 µg/kg) e AME (0.05 µg/kg-1.47 µg/kg);
- TEN con valori compresi tra 0.19 µg/kg e 1.09 µg/kg;
- Fumonisine B1 (9.58 µg/kg-90.47 µg/kg) e B2 (3.91 µg/kg-9.13 µg/kg).

Anche in questo caso sono stati individuati campioni con valori di concentrazioni al di sotto del limite di determinazione.

Nelle analisi post processo i valori rilevati per le diverse micotossine sono comparabili a quelli pre-processo, con l'aggiunta delle fumonisine, mai rilevate in precedenza. La presenza di fumonisine solo nelle puree post-processo merita approfondimenti per comprenderne l'origine. Sembra di poter escludere che si tratti di produzione da parte del fungo in quanto il tempo intercorso dall'uscita dalla conservazione al processo dovrebbe essere breve. Quindi si ipotizza che il processo possa svolgere un ruolo nel rendere rilevabili sostanze che prima non lo erano. È quindi necessario chiarire ed approfondire le condizioni di processo.

Le prove svolte *in vitro* hanno fornito informazioni molto importanti sui funghi oggetto di studio, confermando la capacità di crescere e produrre tossine, anche in quantità molto rilevanti, nella matrice mela. Interessante il diverso comportamento riguardo alle varietà, in quanto *F. proliferatum* predilige la varietà Imperatore, mentre *A. flavus* la varietà Golden. Sarebbe quindi interessante approfondire questo aspetto, allargando anche lo studio ad altre varietà e considerando la possibile copresenza di specie fungine differenti, evento sempre più frequente nelle attuali condizioni climatiche con eventi estremi.

12. Bibliografia

- Williams, L., Glenn, A., Zimeri, A., Bacon, C., Smith, M., & Riley, R. (2007). Fumonisin disruption of ceramide biosynthesis in maize roots and the effects on. *J. Agric Food Chem.* 55, 2937-2946.
- Wu, Y., Li, T., Gong, L., Wang, Y., & Jiang, Y. (2019). Effects of different carbon sources on fumonisin production and FUM gene expression by *Fusarium proliferatum*.
- Yuan Cheng, W. Z., Yu, S., Zhou, Z., Zhang, X., Gao, Y., & Huai, W. (2019). *Fusarium* species in declining wild apple forests on the northern slope of the Tian Shan Mountains in north-western China. *Forest Pathology*.

