

AFLATOSSINA B1 NEL MAIS: VERIFICA DIRETTA DELLA CONTAMINAZIONE ATTRAVERSO UN SISTEMA AUTOMATICO COMPUTERIZZATO BASATO SULLA FLUORESCENZA DELLA GRANELLA

AFLATOXIN B1 IN CORN: DIRECT VERIFICATION OF CONTAMINATION THROUGH AN AUTOMATIC COMPUTERIZED SYSTEM BASED ON THE FLUORESCENCE

Vallone L.¹, Ciminaghi A.², Vinjahu G.², Dragoni I.¹

(¹) Dipartimento VSA - Università di Milano; (²) Star Econtronics, Milano

SUMMARY

“Aflaflesh” is a computer based instrument, designed combining a visual data acquisition system with a sophisticated software of acquisition and analysis of images. This system allows you to check on a representative sample (5/10 kg) contamination of corn by AFB₁, using fluorescence under UV light when the grain is contaminated. To optimize the use of this control equipment were analyzed in two phases, a total of 80 samples comparing the results obtained by chemical analysis (Hplc) to those obtained using “Aflaflesh”. Initially the study was set to correlate the number of contaminated grains to the ppb read by the official method, Hplc; the second step was to correlate ppb values to the number of pixel of contaminated surface of the grains read by the “Aflaflesh” instrument. The apparatus was then calibrated through a statistical analysis of the results obtained, to allow a direct reading of the AFB₁ concentrations in a short period of time (15 min) without the assistance of specialized personnel.

Key words

Corn, aflatoxins, fluorescence, UV

INTRODUZIONE

Le aflatossine sono micotossine prodotte principalmente da ceppi fungini appartenenti alla specie *Aspergillus flavus*, un fungo a diffusione ubiquitaria che può contaminare diversi alimenti destinati all'alimentazione umana ed animale fra i quali i più colpiti sono i cereali (mais, grano, soia, sorgo), i semi oleaginosi, la frutta secca e le spezie. Le condizioni ottimali per la crescita del micelio fungino sono rappresentate da una temperatura compresa tra i 36 e 38°C, da un umidità del substrato del 30% e da una umidità ambientale dell'85%, mentre la maggior produzione di tossine avviene tra 24 e 30°C. Molti altri funghi sono potenzialmente produttori di aflatossine; tra questi si segnalano: *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus wentii*, *Penicillium frequentans*, *Penicillium citrinum*.

Sono conosciute quattro differenti molecole di

aflatossine: B₁, B₂, G₁, G₂. Alla luce ultravioletta, i quattro composti sono distinguibili dal colore della loro fluorescenza blu (Blue) e verde (Green) (1; 2; 3; 4; 5; 6; 7). L'aflatossina B₁ è il più potente agente cancerogeno a tropismo epatico fino ad oggi conosciuto, classificato dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro appartenente alla Classe I (8). La legislazione europea ha fissato un limite massimo di contaminazione dei prodotti zootecnici da AFB₁ pari a 20 ppb, con limiti inferiori nei mangimi di animali da reddito (5 ppb per i prodotti destinati alle bovine da latte).

La presenza di aflatossine nei cereali, prodotte da ceppi fungini presenti sia nella fase primaria di coltivazione delle piante in campo sia durante lo stoccaggio post-raccolta delle cariossidi, rappresenta un problema sanitario di difficile soluzione in quanto da ascrivere a molti fattori concomitanti che vanno dal potenziale tossinogenico dei ceppi conta-

minanti, fino alle modalità di coltivazione/stoccaggio, che riguardano i prodotti. I controlli analitici delle materie prime, indispensabili per un corretto accertamento e conseguente segregazione di eventuali partite contaminate da aflatoxine, fanno riferimento alle normative comunitarie in vigore dal 1° gennaio 2006 ai sensi dei regolamenti CE 178/2002 (9), 852, 853 e 854 del 2004 (10) e 183/2005 (11).

In questo lavoro ci si è posti l'obiettivo di accertare la corrispondenza tra fluorescenza della granella di mais sottoposta a radiazioni UV e la sua contaminazione da aflatoxine e di creare un sistema di controllo automatico computerizzato.

MATERIALI E METODI

La ricerca si è svolta in due fasi successive.

La prima fase si è sviluppata attraverso uno studio preliminare che aveva come obiettivo quello di studiare la relazione tra fluorescenza della granella di mais sottoposta a radiazioni UV e presenza di AFB₁ nei campioni esaminati. A tale scopo, è stata utilizzata un'apparecchiatura sperimentale (prototipo) messa a punto presso il Consorzio Agrario di Milano e Lodi, munita di lampada di Wood. Personale opportunamente addestrato ha effettuato il conteggio manuale di cariossidi fluorescenti appartenenti a n. 45 campioni di mais del peso di 10 kg/cd, provenienti da 69 lotti differenti (pari a 18.582,64 q.li di mais). Sono quindi state effettuate analisi chimiche (Hplc) per la ricerca di aflatoxina B₁ sui campioni "tal quale" (50 gr di 10 kg).

Successivamente le analisi sono state ripetute su 6 sottocampioni creati esclusivamente con granella fluorescente per calcolare il valore medio di contaminazione dell'unità fluorescente (UF), portando, quando necessario, il peso del campione a 50 gr con granella non contaminata. Sono stati anche analizzati 2 campioni di mais che non presentavano unità fluorescenti.

Calcolo della contaminazione media dell'UF

È stato ipotizzato un "modello sperimentale" (tabella n. 1) che utilizza il materiale fluorescente se-

lezionato per poter identificare il valore medio di contaminazione da AFB₁ dell'unità fluorescente.

Per calcolare il valore medio di contaminazione dell'UF in mg si è rapportato il valore di contaminazione del materiale fluorescente espresso in µg/kg al peso reale del campione (50 g) e quindi diviso per il N° di unità fluorescenti componenti il campione di 50 gr.

Moltiplicando questo valore medio per il numero di UF effettivamente presenti nei campioni da 10 kg, abbiamo definito il valore della contaminazione in µg/kg di 45 campioni di cui si conosceva il N° di UF e la contaminazione determinata in Hplc.

È stata effettuata, infine, un'analisi statistica per mettere in evidenza eventuali relazioni tra tutti i risultati ottenuti. Partendo dai dati in nostro possesso, sono stati calcolati, con test di regressione multipla, i coefficienti per mettere in correlazione le concentrazioni di AFB₁ rilevate sui campioni tal quali (Hplc) e le concentrazioni stimate attraverso il numero di unità fluorescenti presenti negli stessi campioni.

La seconda fase ha visto la progettazione di un sistema automatico computerizzato in grado di calcolare la concentrazione di AFB₁ tramite la misura dell'area di emissione di luce fluorescente da parte delle cariossidi di mais sottoposte a radiazioni U.V.

Per la visualizzazione delle cariossidi di mais fluorescenti è stata utilizzata l'apparecchiatura sperimentale "Aflaflesh", progettata applicando un sistema di acquisizione e analisi di immagini così concepito:

1. una telecamera digitale ad alta sensibilità viene installata nella parte superiore di un tunnel di transito del mais e visualizza il passaggio del medesimo sotto la luce UV emessa da due tubi di Wood. La telecamera è gestita da un PC che comanda l'acquisizione di una immagine dopo l'altra conteggiando gli impulsi di un encoder.
2. l'encoder, calettato sull'albero del motore che trascina il nastro trasportatore, emette un impulso per ogni rotazione di 0,1 gradi. Un'opportuna calibrazione consente di effettuare l'acquisizione di una immagine dietro l'altra con la cer-

Tabella n. 1: schema del "modello sperimentale" per il calcolo della contaminazione media della UF.

N° UF/50 gr	AFB ₁ µg/kg (HPLC)	AFB ₁ µg/UF
1023	1512,00	0,07
1034	797,30	0,03
1035	790,00	0,03
544	703,00	0,06
309	755,00	0,12
504	681,00	0,06

tezza che nessuna cariosside venga persa o conteggiata due volte.

- il computer nel contempo determina anche, tramite uno specifico e raffinato software, le aree che emettono luce fluorescente, manifestazione della presenza di Aflatossina B₁. Poiché il programma analizza separatamente le emissioni fondamentali (rosso, verde e blu), sono stati predisposti algoritmi che evitino il conteggio di tratti di superficie che emettano contemporaneamente in più bande (ad esempio la luce bianca contiene contemporaneamente le tre radiazioni di colore) per evitare falsi conteggi.
- quando l'intero campione è transitato, il software effettua la somma delle acquisizioni fatte, immagine per immagine, e indica in una apposita tabella il numero di fotografie processate, il numero totale delle cariossidi fluorescenti e l'area interessata dalla contaminazione da AFB₁.

Di seguito viene descritta la procedura utilizzata per il campionamento della granella di mais:

- ogni campione è stato ottenuto tramite il prelievo (effettuando 10 carotaggi) di 5 kg di mais;
- i 5 kg sono stati processati 5 volte dallo strumento Aflaflesh in modo da ottenere un valore medio di fluorescenza;
- dai 5 kg, in seguito ad accurata miscelatura, è stato estratto un campione da 1 kg che è stato, a sua volta, valutato 5 volte dallo strumento ed accettato solo nel caso che il valore medio di fluorescenza (in pixel) non si discostasse dalla lettura dei 5 kg di uno scarto superiore al 5%;
- il campione da 1 kg è stato macinato ed omogeneizzato opportunamente e sono stati da questo ricavati due campioni da 50 g che sono stati analizzati in doppio (Hplc).

È stato effettuato quindi un calcolo della correlazione tra la lettura dello strumento e i risultati delle analisi chimiche effettuate sullo stesso campione. Il valore della contaminazione in Hplc viene utilizzato per creare una curva di calibrazione che metta in relazione la fluorescenza, espressa in pixel, che lo strumento "Aflaflesh" ha verificato sul campione da 5 kg, e la concentrazione di AFB₁ presente nei sottocampioni da 50 gr, misurata in Hplc. Sono stati testati 35 campioni dei quali 16 per verificare la taratura dei parametri ottici dello strumento e 19 per effettuare il controllo della concentrazione di AFB₁ in Hplc.

RISULTATI

PRIMA FASE. I campioni di granella tal quale analizzati presentano concentrazioni di Aflatossina B₁ variabili da 0.05 µg/kg a 432 µg/kg. Le analisi effettuate sui campioni (costituiti da sole UF) del modello sperimentale, hanno permesso di ipotizzare che la contaminazione media di un'unità fluorescente sia pari a 0,06 mg. I 2 campioni che non presentano unità fluorescenti non sono risultati contaminati da AFB₁. L'analisi statistica effettuata ha dimostrato che esiste una correlazione diretta tra la contaminazione da AFB₁ dei campioni di granella tal quale (Hplc) e la contaminazione stimata utilizzando il numero di unità fluorescenti selezionate, come evidenziato nella figura n. 1 di seguito riportata.

RISULTATI SECONDA FASE. Nella seconda fase della ricerca è stata effettuata l'analisi statistica per la creazione della curva di taratura dello strumento "Aflaflesh", utilizzando n. 19 campioni, valutati con l'uso dell'apparecchiatura e analizzati in Hplc. È stata ricavata una prima curva di taratura non forzata all'origine degli assi e con un R² = 0,7444 (Figura n. 2). La

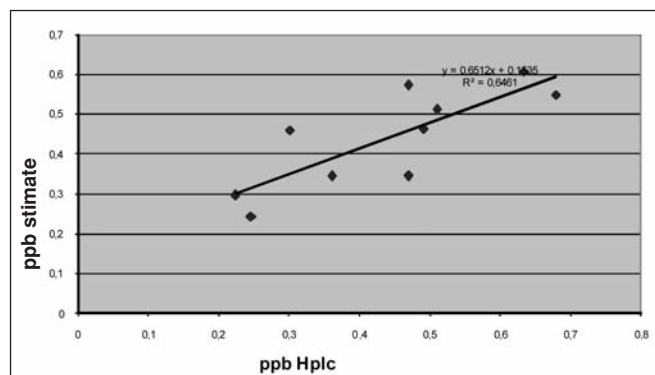


Figura n. 1: rappresentazione grafica della correlazione fra la contaminazione da AFB₁ dei campioni di granella tal quale (ppb HPLC) e la contaminazione stimata utilizzando il numero di unità fluorescenti selezionate (ppb stimate).

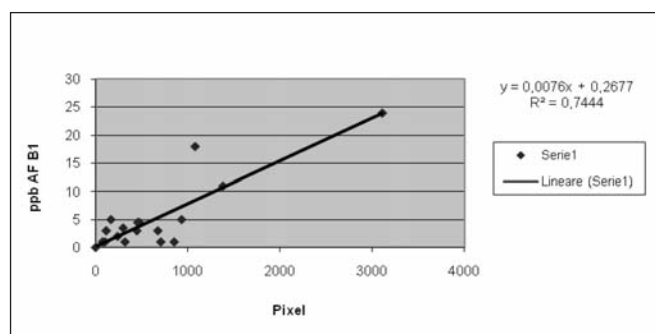


Figura n. 2: relazione tra il n. di pixel e la concentrazione (ppb) di AFB1 (Hplc).

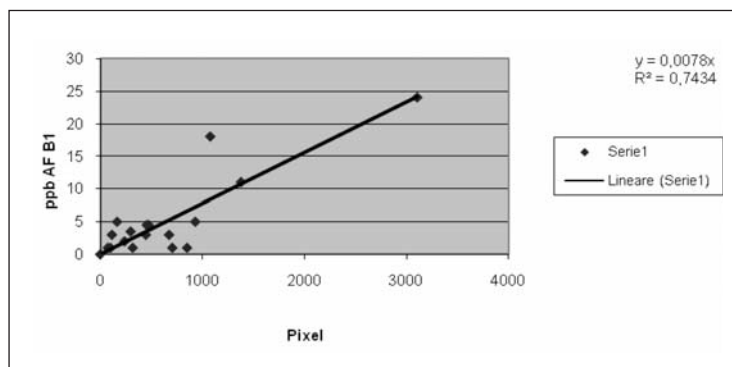


Figura n. 3: relazione tra il n. di pixel e la concentrazione (ppb) di AFB1 (Hplc), con intercetta pari a 0.

medesima curva con intercetta = 0 ha dato una equazione molto simile con $R^2 = 0,7434$. (Figura n. 3)

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti si evidenzia che la contaminazione da AFB₁ dei campioni di mais è direttamente proporzionale al numero di unità fluorescenti presenti (come evidenziato nella Figura n. 1 riportata nel testo). A partire da questo dato sperimentale, si è progettato il sistema automatico di controllo “Aflaflesh” che permette di trasformare direttamente il numero di pixel corrispondenti alla fluorescenza emanata dal campione in concentrazione prevedibile di AFB₁. Il vantaggio indubbio di tale metodica, che può essere ulteriormente perfezionata, è quello rappresentato dalla dimensione della massa da analizzare (5 kg) ben diversa da quella comunemente chiamata in causa dalle attuali tecniche di rilevamento (50 gr). Inoltre lo strumento utilizzato: è un apparecchio facile da usare, non richiede personale specializzato, il tempo previsto per un’analisi è di circa 10 min per 5 kg di campione, non richiede preparazione del campione né uso di reagenti, non è distruttivo (l’analisi può essere ripetuta sullo stesso campione con altre metodiche, Hplc, Elisa), rappresenta un sistema automatico di rilevazione quindi oggettivo e riproducibile. Tale sistema può essere sviluppato anche su altre matrici alimentari contaminate da aflatossine e può preludere a macchine selezionatrici di processo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Dragoni, I.; Cantoni, C.; Papa, A.; Vallone, L. (1997). “Muffe, Alimenti e micotossicosi”. Ed. Città Studi, Milano
- 2) Giorni, P.; Magan, N.; Pietri, A.; Bertuzzi, T.; Battilani, P. (2007). Studies on *Aspergillus section flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 330-8
- 3) Rojas-Duran, T.R.; Fente, C.A.; Vázquez, B.I.; Franco, C.M. (2007). Study of a room temperature phosphorescence phenomenon to allow the detection of aflatoxigenic strains in culture media. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 149-158
- 4) Zeringue, H.J.Jr; Shih, B.Y.; Maskos, K.; Grimm, D. (1999). Identification of the bright-greenish-yellow-fluorescence (BGY-F) compound on cotton lint associated with aflatoxin contamination in cottonseed. *Photochemistry*, 52, 1391-1397
- 5) Hara, S.; Fennel, D.I.; Hesseltine, C.W. (1974). Aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* detected by fluorescence of agar medium under ultraviolet light. *Applied Microbiology*, 27 (6), 1118-1123
- 6) Yabe, K.; Ando, M. Ito. Y.; Terakado, N. (1987). Simple method for screening aflatoxin-producing molds by UV photography. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (2), 230-234
- 7) Pitt, J.I (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, 56 (1), 184-192
- 8) IARC (1993) Some naturally occurrence substances. *Monograph 56*, Lyon, France: IARC
- 9) GU CE n. 31/1 del 01/02/2002
- 10) GU CE n. 139/1; 139/55; 139/206 del 30/04/2004
- 11) GU UE n. 35/1 del 08/02/2005