

Contaminazione da specie di *Aspergillus* e *Penicillium* lungo la filiera di produzione della castagna in Italia

Simona Prencipe^{1,2}, Ilenia Siciliano², Maria Lodovica Gullino^{1,2}, Angelo Garibaldi², Davide Spadaro^{1,2}

¹Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali ed Alimentari DISAFA, Università di Torino

²Centro di Competenza per l'Innovazione in Campo Agro-ambientale AGROINNOVA, Università di Torino

Introduzione

Il castagno europeo (*Castanea sativa* Mill.) conta una produzione annua di circa 170.000 t in Europa. L'Italia è il principale paese produttore europeo, con un'area coltivata di 46.000 ha e una produzione di 43.000 t/anno (Livre Blanc Châtaigne, 2014). Quasi il 20% della produzione totale viene utilizzato per produrre farina di castagne, castagne secche e marron glacé.

Molti studi riportano la contaminazione di castagne e prodotti derivati da funghi micotossigeni appartenenti al genere *Penicillium* e *Aspergillus* e da micotossine da essi prodotte (Bertuzzi *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2013). Del genere *Aspergillus* la sezione *Flavi* (ASF) risulta quella maggiormente presente su castagna, e le specie appartenenti a questo genere sono in grado di produrre aflatossine. Le micotossine sono metaboliti secondari prodotti dai funghi con effetto tossico, mutageno e cancerogeno (Milicevic *et al.*, 2010). A causa del loro effetto cronico o cumulativo sulla salute umana sono stati stabiliti dei limiti con il regolamento No. 165/2010 CE. Per le castagne e derivati tale regolamento considera la sola presenza di aflatossine, anche se diversi studi riportano contaminazioni da micotossine prodotte da specie di *Penicillium* spp. (Overy *et al.*, 2003; Donis-Gonzales *et al.* 2009).

Le specie appartenenti a questi generi sono difficili da identificare utilizzando i tradizionali metodi di identificazione e necessitano di un approccio multidisciplinare per una corretta classificazione (Samson *et al.* 2014).

La conoscenza delle specie presenti e del loro potenziale micotossigeno risulta quindi di cruciale importanza per garantire la sicurezza dei consumatori e per elaborare procedure standardizzate per la produzione di castagne e derivati. Il presente studio ha quindi caratterizzato, attraverso un approccio biologico, molecolare e chimico, diversi ceppi di ASF e

Penicillium spp. isolati in campo e lungo la filiera di produzione della farina di castagne.

Materiali e metodi

Ceppi fungini

I ceppi di ASF e *Penicillium* spp. sono stati isolati da castagne fresche raccolte ad ottobre 2015 in diversi siti della provincia di Cuneo (Piemonte). Ulteriori ceppi sono stati isolati durante le fasi di lavorazione della farina di castagne (castagne secche, castagne secche dopo la cernita, granulato di castagne, granulato di castagne tostato e farina di castagne), da lotti con differente origine (Italia, Albania e Spagna). È stato inoltre considerato un campione commerciale di farina di castagne, conservato per 6 mesi, ed effettuato un campionamento all'interno degli ambienti di lavorazione. Sono stati selezionati 58 e 124 isolati, rispettivamente di ASF e *Penicillium*, per la successiva caratterizzazione.

Identificazione morfologica e molecolare

L'identificazione morfologica è avvenuta seguendo quanto riportato in Visagie *et al.* (2014) e Samson *et al.* (2004). Gli isolati sono stati inoculati in 3 punti in 3 terreni (YES agar, CYA agar e MEA), e osservati dopo 7 giorni di incubazione al buio. Il DNA è stato estratto dalle colture monoconidiche e l'assegnazione delle specie è avvenuta amplificando tre marcatori molecolari: la regione ITS, il gene della beta tubulina e il gene della calmodulina. Le sequenze ottenute sono state confrontate con le specie di *Penicillium* attualmente accettate e riportate dalla International Commission of *Penicillium* and *Aspergillus* (ICPA). Successivamente è stata condotta l'analisi filogenetica.

Saggio di patogenicità in vivo

I ceppi sono stati inoculati su castagne e incubati per 7 giorni a temperatura ambiente. Ai sintomi osser-

vati sono state assegnati degli indici di malattia utilizzando una scala da 0 a 100: non patogeno (NP) = nessun sintomo; poco virulento (PV) = 1-30% di area colpita; mediamente virulento (MV) = 31-50% di area colpita; altamente virulento (HV) = 51-100% di area colpita.

Produzione di micotossine in vivo e in vitro

Le micotossine prodotte dai ceppi sono state estratte dalle castagne utilizzate per il test di patogenicità e per i ceppi di ASF è stato effettuato anche un saggio *in vitro*. Le micotossine prodotte *in vivo* sono state analizzate in HPLC-DAD (Agilent serie 1100). Gli standard di acido micofenolico (MPA), meleagrina (MEL), andrastina A (AndA), roquefortina C (RoqC), patulina (PAT), chaetoglobosina A (ChA), ciclopenina (CPN), ciclopemolo (CPL), viridicatina (VIR), viridicatolo (VOL), penitrem A (PenA), acido cilopiazonico (CPA), verrucina (VER), acido penicillico (PA), aflatoxina B1, B2, G1 e G2 sono stati utilizzati per l'identificazione degli analiti mediante il confronto dei tempi di ritenzione degli spettri UV. Le aflatoxine *in vitro* sono state analizzate in HPLC-MS/MS (Varian TQ 310-MS).

Risultati

Isolamento e identificazione delle specie

Sono stati isolati 110 ceppi di *Aspergillus* sezione *Flavi*: 66 dalle castagne fresche (53% di campioni positivi), 17 dalle castagne secche (19%), 5 dalle castagne secche dopo la cernita (8%), 17 dal granulato di castagne (14%), 12 dal granulato di castagne tostato (10%) e 69 dalla farina di castagne stoccata per 6 mesi. Il lotto italiano risulta il più contaminato con il 22% di campioni positivi. Sono stati isolati 124 ceppi di *Penicillium* spp.: 29 dalle castagne fresche, 32 da castagne secche e granulato di castagne, 41 dalla farina di castagne e 22 dalle aree di produzione aziendale. Dall'analisi molecolare i ceppi di ASF risultano appartenere alle specie: *A. flavus*, *A. oryzae* var *effusus*, *A. parasiticus*, *A. toxicarius* e *A. tamarii*. Tra le venti specie di *Penicillium* rinvenute, quelle maggiormente presenti sono *P. crustosum*, *P. bialowiezense*, *P. glabrum* e *P. expansum*. Tutti i ceppi hanno mostrato caratteristiche uniformi sui tre terreni in analisi, con la morfologia e il tasso di crescita simile a quanto riportato in letteratura.

Patogenicità

Il saggio di patogenicità su castagna ha diviso gli isolati di ASF in quattro categorie: il 21% dei ceppi è

risultato HV, il 28% MV, il 48% PV, e il 3% non patogeno. Mentre i ceppi appartenenti al genere *Penicillium* sono risultati per il 35% HV, il 22% MV, il 15% PV e il 28% non patogeni.

Produzione di micotossine

Dall'analisi *in vitro* solamente l'11,6% dei ceppi di *A. flavus* ha prodotto l'aflatoxina B1. Quando inoculati su castagna il 39,5% ha prodotto l'aflatoxina B1, mentre il 7% ha prodotto anche l'aflatoxina B2. Tutti i ceppi di *A. parasiticus* e *A. toxicarius* sono stati in grado di produrre le quattro aflatoxine sia *in vivo* che *in vitro*. Considerando le specie di *Penicillium*, i ceppi sono stati in grado di produrre *in vivo* 14 metaboliti secondari e il 59% è risultato positivo alla produzione di micotossine. Tutti gli isolati di *P. expansum* hanno prodotto la PAT, mentre alcuni hanno prodotto RoqC e ChA. Le ciclopenine e le viridicattine sono state prodotte dalla maggior parte degli isolati delle specie *P. crustosum*, *P. polonicum*, *P. solitum* e *P. discolor*. Alcuni isolati di *P. crustosum* hanno prodotto RoqC e PenA, mentre gli isolati di *P. polonicum* hanno prodotto VER. Un isolato di *P. viridicatum* ha prodotto PA e due ceppi di *P. commune* hanno prodotto CPA. *P. glandicola* ha prodotto MEL e AndA.

Discussione

Molti degli studi su castagne sono focalizzati sull'analisi dei prodotti commerciali o sulla presenza di funghi (Bertuzzi *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2012), ma l'analisi della presenza di specie micotossigene appartenenti al genere *Penicillium* e *Aspergillus* e il loro potenziale micotossigeno non è stata ampiamente approfondita.

In questo studio si evidenzia per la prima volta la presenza di differenti specie, molte delle quali ancora non segnalate come patogene su castagna, e il loro potenziale micotossigeno dal campo e lungo l'intera catena di produzione della farina di castagne. Le condizioni ambientali presenti in campo nell'ottobre 2015, caratterizzate da un'elevata umidità, hanno probabilmente favorito la suscettibilità delle castagne all'attacco fungino in pre-raccolta come riportato dal US Council for Agricultural Science and Technology (CAST, 2003). L'attuale catena di produzione della farina di castagne prevede due processi di iniziale smistamento e successiva tostatura, che sono in grado di ridurre la popolazione media fungina, in particolare per ASF (FAO/WHO, 2012). Come mostrato in questo studio, le pratiche attualmente adottate non sono sufficienti per eliminare la crescita delle specie micotossigene.

Le specie maggiormente isolate sono *P. crustosum*, *P. glabrum*, *P. bialowiezense* (57% degli isolati) e *A. flavus* (74%). Il nostro studio evidenzia inoltre un potenziale di virulenza degli isolati molto elevato con circa il 70% di ceppi virulenti per le specie di *Penicillium*, inclusi i ceppi isolati dall'ambiente di lavoro, e il 97% dei ceppi di ASF. Tali dati sono in accordo con quelli riportati da Louw & Korsten (2014).

Il 59% dei ceppi di *Penicillium* e circa il 40% degli ASF sono stati in grado di produrre almeno una micotossina su castagna, su un totale di 16 metaboliti secondari analizzati. Un numero inferiore di ceppi è stato in grado di produrre aflatoxine *in vitro*.

Va evidenziato che delle *Penicillium*-micotossine analizzate nessuna è regolamentata dalla legislazione Europea, mentre il limite stabilito per le aflatoxine sulle castagne e prodotti derivati è stabilito a 2 e 4 µg/kg, rispettivamente. The European Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF, 2011) ha riportato numerosi casi in Italia di contaminazioni in prodotti a base di castagna. I limiti stabiliti dalla commissione europea, che sono più bassi rispetto ad altra frutta secca, sono legati alla riduzione della commercializzazione dei prodotti a base di castagna. Per tali motivi, l'istituto nazionale in Europa ha proposto una modifica di tali limiti, e sta promuovendo e finanziando la ricerca con l'obiettivo di capire come e quando queste micotossine sono prodotte nelle castagne, e per prevenirne e controllarne la presenza.

Conclusioni

Il presente lavoro è stato il primo tentativo fatto per monitorare e caratterizzare i funghi micotossigeni lungo la catena di lavorazione della farina di castagne. I risultati ottenuti dal campionamento, l'analisi della patogenicità e del potenziale micotossigeno degli iso-

lati mostrano la potenziale contaminazione dell'intera catena di produzione della castagna, dal campo sino al prodotto finale. L'attuale ricerca evidenzia l'esigenza di sviluppare nuove linee guida per gestire il rischio di contaminazione da micotossine lungo la catena di produzione della farina di castagne.

Bibliografia

- BERTUZZI T, RASTELLI S, PIETRI A 2015. *Aspergillus* and *Penicillium* toxins in chestnuts and derived produced in Italy. *Food Cont* 50, 876-880
- CAST, 2003. *Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems*. Council for Agricultural Science and Technology, Iowa, USA. Printed in the United States of America. Task Force Report No. 139
- DONIS-GONZÁLEZ IR, GUYER DE, FULBRIGHT DW 2016. *Quantification and identification of microorganisms found on shell and kernel of fresh edible chestnuts in Michigan*. *J Sci Food Agric* 96, 4514-4522
- FAO/WHO 2012. ISSN 0259-2916. *Prevention and Reduction of Food and feed Contamination*, first ed. Rome.
- Livre Blanc Chataigne 2014. <http://issuu.com/areflh/docs/livre-blanc-chataigne-it#> (visitato 30.05.19)
- LOUW JP, KORSTEN L 2014. *Pathogenic Penicillium spp. on apples and pears*. *Plant Dis* 98, 590-598
- MILICEVIC D, SKRINJAR M, BALTIC T, 2010. *Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control*. *Toxins* 2, 572-592
- OVERY DP, SEIFERT KA, SAVARD ME, FRISVAD JC 2003. *Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts*. *Int J Food Microbiol* 88, 69-77
- RASFF (2011). http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1681_allegato.pdf (visitato 30.05.19).
- RODRIGUES P, VENÂNCIO A, LIMA N 2012. *Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins*. *Food Res Int* 48, 76-90
- RODRIGUES P, VENÂNCIO A, LIMA N 2013. *Incidence and diversity of the fungal genera *Aspergillus* and *Penicillium* in Portuguese almonds and chestnuts*. *Eu J Plant Pathol* 137, 197-209
- SAMSON RA, VISAGIE CM, HOUBRAKEN J 2014. *Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus**. *Stud Mycol* 78, 141-173
- VISAGIE CM, HOUBRAKEN J, FRISVAD JC HONG SB, KLAASSEN CHW *et al.* 2014. *Identification and nomenclature of the genus *Penicillium**. *Stud Mycol* 78, 343-371