



# L'aflatossina non frena il biogas

[ DI GIULIANA D'IMPORZANO\*, FABRIZIO ADANI\*, SILVIA SALATI\*, LUCA CHIESA\*\*, ELENA PASSERÒ\*\* ]

**L**e aflatossine sono metaboliti secondari tossici per gli animali superiori prodotti da muffe che colonizzano gli alimenti. Le aflatossine (AF) sono uno specifico gruppo di micotossine prodotte da ceppi di *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, con una tossicità molto spiccata. Le AF, che vengono riscontrate negli alimenti di origine vegetale, sono quattro: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>; le forme B sono prodotte sia da *A. flavus* che da *A. parasiticus*, mentre le forme G sono prodotte solo dal secondo.

Nella maggior parte dei casi, la AFB<sub>1</sub> è quella presente in maggior quantità e sulla quale è stato focalizzato l'interesse dei ricercatori per via della sua elevata tossicità acuta e cronica e per l'attività cancerogena che esplica sugli animali, oltre che per i potenziali effetti sull'uomo. A seguito delle eccezionali condizioni meteorologiche dell'annata 2012 (alte temperature e scarsissime precipitazioni) la presenza di aflatossine è risultata talvolta elevata nei mais raccolti. Si stima che circa il 30% del mais coltivato nel 2012 non sarebbe utilizzabile ai fini alimentari e deve trovare una sua collocazione alternativa. Appare altamente opportuno "allontanarlo" da ogni possibile canale di utilizzazione per uso alimentare umano e animale (per i quali sono posti i limiti di presenza). Una soluzione a ciò è quella di destinare il mais "aflatossinato" al biogas. Le domande alle quali dare una seppur iniziale e parziale risposta, sono semplici:

- introdurre mais con elevati livelli di aflatossina nei digestori per la produzione di biogas danneggia la produzione?
- la digestione anaerobica è in grado di ridurre le aflatossine contenute nel mix a seguito dei processi degradativi?

Il lavoro di "approfondimento scientifico" è stato promosso da Regione Lombardia - DG Agricoltura per inquadrare opportuna-

Con la digestione anaerobica

si degrada al 52%.

I dati della prima sperimentazione

italiana su mais contaminato

mente il problema sotto i profili della tutela della salute pubblica e dell'ambiente. È evidente che il lavoro non è esaustivo, visti i tempi stretti richiesti per dare una prima indicazione, ma di fondamentale importanza per affrontare con cognizione un'emergenza da gestire.

## [ LA SPERIMENTAZIONE CONDOTTA

Le indagini scientifiche sono state condotte a livello di **laboratorio**, al fine di poter impostare in condizioni operative controllate e standardizzate

prove di digestione anaerobica con mais "aflatossinato" e prove di **pieno campo** per confermare, in condizioni operative reali, i risultati delle prove di laboratorio.

I materiali usati per la sperimentazione fanno riferimento a granella, spezzato e pulitura di mais (scarto ottenuto dalla "selezione/pulitura" della granella da polveri e materiale spezzato) con presenza di aflatossine. I campioni sono stati prelevati da centri di stoccaggio siti in Lombardia.

## [ PROVE IN LABORATORIO

Il disegno sperimentale ha previsto 6 tesi con 4 repliche di digestione anaerobica in batch (sistema discontinuo) (tab. 1): granella di mais fortemente contaminata (tesi 1), spezzato di mais contaminato (tesi 2) e pulitura di mais contaminata (tesi 3), posti a confronto con granella "non contaminata" (tesi controllo). Il mix di partenza era rappresentato dalle matrici sotto riportate aggiunte di digestato da refluo zootecnico in condizioni metanogene stabili.

Sfruttando le possibilità offerte dalla ricerca di laboratorio, sono state aumentate significativamente le concentrazioni di aflatossina nelle prove di digestione anaerobica in batch, a seguito dell'aggiunta di aflatossina standard - AFB<sub>1</sub> - estratta e standardizzata - a dosi più

**TAB. 1 - CONTENUTO DI AFLATOSSINA AFB<sub>1</sub> NEI MATERIALI TESTATI**

MATERIALE	CONCENTRAZIONE AFB <sub>1</sub> (μG/KG)
Granella (I)	84,1
Spezzato di mais	9,56
Pulitura di mais	0,79
Granella non contaminata (controllo) (II)	0,72

elevate (~20x; 132x e 200x) di quelle ritrovabili nelle tesi alimentate con mais e derivati contaminati naturalmente (tesi 4, 5 e 6). Con queste tesi si sono volute verificare situazioni di forte contaminazione e di (improbabile) sostituzione totale del mix utilizzato dal digestore con mais con aflatoossina.

Il processo di digestione anaerobica in batch è stato condotto per 60 giorni rilevando la produzione di biogas, la concentrazione di metano nel gas (%v/v). Dopo 20, 40 e 60 giorni dall'inizio del processo è stata determinata la concentrazione di AFB<sub>1</sub> nel mezzo da compararsi con il valore del mix di partenza.

### MONITORAGGIO IN PIENO CAMPO

Con riferimento agli approfondimenti scientifici di pieno campo, sono state condotte due campagne di campionamento in un impianto di digestione anaerobica della potenza di 700 kW che integrava l'alimentazione del digestore con granella aflatoxinata. Tale integrazione era operativa da almeno 2 mesi, tale per cui si poteva assumere una situazione di alimentazione stabile e affidabile. L'impianto considerato aveva un tempo medio di ritenzione idraulica del mix di alimentazione pari a 30-35 giorni e un apporto di granella con AFB<sub>1</sub> nel mix pari al 6,7% in peso. I campionamenti e le analisi hanno coinvolto i materiali in ingresso e il digestato in uscita oltre alla raccolta di dati utili per la realizzazione dei bilanci di massa.

La determinazione di AFB<sub>1</sub> per entrambe le sperimentazioni condotte è stata eseguita con metodica analitica sviluppata *ad hoc* per la matrice "digestato" adattando i riferimenti bibliografici esistenti (Song *et al.*, 2012, Kokkonen *et al.*, 2005) ed è in fase di pubblicazione. In sintesi i passaggi sono stati: estrazione liquido-liquido, colonnina di immunoaffinità, Aflatest WB, lettura con HPLC - fluorimetro e HPLC MS come metodo di conferma.

### RISULTATI IN LABORATORIO

La granella contaminata ha mostrato un elevato livello di aflatoossina AFB<sub>1</sub>, mentre il materiale denominato spezzato di mais ha evidenziato un livello di un ordine di grandezza inferiore. Il materiale denominato "pulitura di mais", ottenuto come scarto da processi di selezione per diminuire il contenuto di contaminazione presente nel materiale, non ha mostrato una contaminazione significativa come inizialmente ipotizzato nella fase di progetto del lavoro (provenendo da diverse partite trattate) (tab. 1).

In tabella 2, sono riportati i dati riassuntivi delle prove di digestione anaerobica in batch con i valori di concentrazione di AFB<sub>1</sub> verificati nei diversi tempi della prova.

I risultati mettono in evidenza come le tesi con granella contami-

**TAB. 2 - CONCENTRAZIONE DI AFLATOSSINA AFB<sub>1</sub> NEL MEZZO DURANTE LE PROVE DI INCUBAZIONE ANAEROBICA**

MATERIALE	TEMPO (GIORNI)	CONC. AFB <sub>1</sub> CALCOLATA μG/KG	CONC. AFB <sub>1</sub> VERIFICATA μG/KG	BIOGAS NL/KG SS	BIOMETANO (% BIOGAS)
Granella di mais (I) TESI 1	T=0	0,87	0,54±0,090	599±19a	61,3±0,9
	T=20		0,38±0,015		
	T=40		0,37±0,001		
	T=60		0,17±0,013		
Spezzato di mais TESI 2	T=0	0,10	0,12±0,007	543±90	60,9±0,9
	T=20		0,07±0,008		
	T=40		0		
	T=60		0		
Pulitura di mais TESI 3	T=0	0,01	0	550±50	60,6±1.2
	T=20		0		
	T=40		0		
	T=60		0		
Granella di mais NON contaminata (II) - CONTROLLO	T=0	0,01	0	614±2a	59,6±0.8
	T=20		0		
	T=40		0		
	T=60		0		

\*\*a valori in colonna seguiti da lettere uguali corrispondono valori statisticamente uguali p<0.05  
Le tesi due e tre non sono state confrontate con il controllo in quanto materiali differenti dalla granella (spezzato e pulitura)

nata presenti produzioni di biogas simile a quelle della tesi con granella non contaminata, a indicare che la presenza di aflatoossina, almeno nelle condizioni operative adottate, non influenza in modo negativo la produzione di biogas. Anche le concentrazioni di metano nel biogas sono sostanzialmente identiche.

Con riferimento alla degradazione dell'aflatoossina, nella tesi con granella contaminata (tesi 1, tab. 2) si evidenzia un passaggio dalla concentrazione di 0,54 μg/kg (coerente con il livello di contaminazione del materiale di partenza) a 0,17 μg/kg di aflatoossina dopo 60 giorni di processo. I valori di deviazione standard (determinazione in triplo) sono molto contenuti e dimostrano l'affidabilità della misura e la robustezza della metodica di preparazione e determinazione.

Per la tesi spezzato di mais (tesi 2, tab. 2), a fronte di una presenza di contaminazione iniziale bassa, coerente con il contenuto iniziale di AFB<sub>1</sub> determinato nel materiale di partenza, mostra una diminuzione sensibile di aflatoossina nei primi 20 giorni di processo, fino a non essere più rilevabile dopo 40 e 60 giorni di incubazione anaerobica. Per il materiale denominato "di pulitura", a causa della bassa concentrazione iniziale di AFB<sub>1</sub>, non è stato possibile verificare la sua presenza nel reattore neanche a inizio prova (effetto diluizione con il digestato). Questi primi risultati suggeriscono che la presenza di aflatoossina non inibisce il processo di digestione anaerobica e anzi, si ottiene una degradazione/trasformazione dell'aflatoossina. Interessanti appaiono i risultati ottenuti nelle prove in cui si aggiungeva aflatoossina esogena. Nel dettaglio, le prove con granella addizionata con dosi crescenti di AFB<sub>1</sub>, tali da raggiungere nel digestore di

laboratorio concentrazioni di AFB<sub>1</sub> pari a 12-50-104 µg/kg, mostrano valori di produzione analoghi a quelli del controllo a conferma del fatto che anche elevate concentrazioni di aflatoxina non inibiscono il processo di digestione anaerobica. Con riferimento alla presenza di aflatoxina tutte le tesi testate con aggiunta crescente di contaminante (tesi 4,5 e 6) mostrano il medesimo trend di diminuzione della concentrazione dello stesso; da 10 a 1 µg/kg nella tesi 4, da 66 a 15 µg/kg nella tesi 5 e da 110 a 13 µg/kg nella tesi 6.

### [ MONITORAGGIO IN IMPIANTO

I risultati di pieno campo sono interessanti. Anche in presenza di granella con aflatoxina (AFB<sub>1</sub> = 59 µg/kg e 61 µg/kg per i due campionamenti rispettivamente), l'impianto ha continuato a mantenere performance di produzione di biogas in accordo con la tipologia di biomassa fornita, mantenendo una produzione specifica per unità di sostanza secca apportata pari a 680 NL/kg ss.

Allo stesso modo non si sono riscontrate nell'impianto instabilità di processo, come si verifica dai valori di pH, concentrazione di acidi grassi volatili (AGV) e rapporto AGV/alcalinità (tab. 4), ma anzi un'operatività ottimale per la produzione di biogas (Ahring *et al.*,

[ TAB. 4 - PRODUZIONE MEDIA DI BIOGAS E PARAMETRI DI UN IMPIANTO FULL SCALE

	TEMPO DI RITENZIONE MEDIO (GIORNI)	QUANTITÀ MEDIA DI BIOGAS PRODOTTA IN IMPIANTO NL/KG SS	PH DIGESTATO	AGV DIGESTATO (MG.ACETICO/L)	ALCALINITÀ TOTALE DIGESTATO (MG CACO <sub>3</sub> /L)	RAPPORTO AGV/ALCALINITÀ
Campionamento 1	30-35	680	8,28	1.281	17.001	0,12
Campionamento 2	30-35	680	8,31	1.554	15.571	0,10

[ TAB. 5 - IMPIANTO FULL SCALE: CONCENTRAZIONE DI AFB<sub>1</sub> NELLA MISCELA E NEL DIGESTATO

	TEMPO RITENZIONE MEDIO (GG)	CONC. AFB <sub>1</sub> MIX DI ALIMENTAZIONE µG/KG	CONC. AFB <sub>1</sub> NEL DIGESTATO µG/KG
Campionamento 1	30-35	3,89*	1,89*
Campionamento 2	30-35	4,03*	1,93*

\*è stato determinato un coefficiente di variazione inferiore al 12% per determinazione di AFB<sub>1</sub>

1995). Il processo biologico determina una riduzione del contenuto di aflatoxina nel digestato finale, come appare nelle due campagne di rilevamento effettuate.

Sulla base dei dati raccolti si stima una riduzione del contenuto totale di aflatoxina in impianto di scala reale del 52%. Il dato ottenuto è confortante e in linea con quanto ottenuto in laboratorio anche se in condizioni diverse, batch in laboratorio vs. sistema continuo in scala reale. Il dato di scala reale meriterebbe maggiori approfondimenti nel senso di un coinvolgimento di più impianti e di un numero maggiore di campagne di campionamento data la maggior difficoltà operativa.

### [ DA VERIFICARE LA VELOCITÀ DI DEGRADAZIONE

Il processo di digestione anaerobica non risente negativamente della presenza di materiale nel mix contaminato con aflatoxina anche a dosi elevate ottenute con l'aggiunta di composto esogeno.

Il processo di digestione anaerobica opera una riduzione del contenuto di aflatoxina B1 anche nel caso di dosi elevate del composto. Primi rilievi su un impianto di scala reale confortano i risultati di laboratorio e permettono di arrivare a un valore, da confermare, del 52% di riduzione della presenza di aflatoxina B1.

Resta da verificare, con ulteriori prove e indagini, la cinetica di degradazione e la possibile biotrasformazione della AFB<sub>1</sub> in altri metaboliti, quali ad esempio AFB<sub>2a</sub> (Megalla and Hafez, 1982, Megalla and Mohran, 1984) che risulta essere molto meno tossica di AFB<sub>1</sub>, e e/o AFM1. In quest'ultimo caso, tale trasformazione sembra verificarsi solo a carico del fegato (Wu *et al.*, 2009) e non per trasformazione microbica; tuttavia, considerando la complessità del consorzio microbico deputato alla biotrasformazione anaerobica ulteriori indagini sono da prevedersi.

Inutile aggiungere che servono più conoscenze ma ciò richiede investimenti in ricerca che potrebbero venire proprio da quel comparto che potrebbe beneficiare dell'uso del mais aflatoxinato. ■

\*Gruppo Ricicla DISAA - Università di Milano.

\*\*Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica.

[ TAB. 3 - PROVE DI INCUBAZIONE ANAEROBICA (SCENARIO AD ELEVATA CONCENTRAZIONE AFB<sub>1</sub>)

MATERIALE	TEMPO (GIORNI) T=60	CONC. AFB <sub>1</sub> CALCOLATA µG/KG	CONC. AFB <sub>1</sub> VERIFICATA µG/KG	BIOGAS NL/KG SS	BIOMETANO (% BIOGAS)
Granella di mais (II) con aggiunta AFB <sub>1</sub> TESI 4	T=0	12	10,3*	586±29a	59,9±0,8
	T=20		5,8		
	T=40		5,4		
	T=60		1,0		
Granella di mais (II) con aggiunta AFB <sub>1</sub> TESI 5	T=0	50	66,2*	617±45a	60,8±0,4
	T=20		24,4		
	T=40		13,1		
	T=60		18,4		
Granella di mais (II) con aggiunta AFB <sub>1</sub> TESI 6	T=0	104	110*	579±21	60,2±1,4
	T=20		54,9		
	T=40		28,8		
	T=60		13,8		
Granella di mais NON contaminata (II) - CONTROLLO	T=0	0,01	0	614±2a	59,6±0,8
	T=20		0		
	T=40		0		
	T=60		0		

Per le tesi 4, 5 e 6, è stato determinato un coefficiente di variazione inferiore al 12% per determinazione di AFB<sub>1</sub>