

LA DIFESA ANTIPARASSITARIA NELLE INDUSTRIE ALIMENTARI E LA PROTEZIONE DEGLI ALIMENTI

ATTI DELL' 8° SIMPOSIO
a cura di P. CRAVEDI

Piacenza, 26-28 settembre 2007

Con il contributo
della Camera di Commercio, Industria,
Artigianato e Agricoltura di Piacenza



CHIRIOTTI EDITORI
Pinerolo – Italia

FUNGHI SECCHI E CONTAMINAZIONI ENTOMATICHE DI CAMPO: METODICHE DI ANALISI E PROSPETTIVE PER LA DEFINIZIONE DI LIVELLI IGIENICI DI ACCETTABILITÀ

¹Dipartimento MIPI, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 - Roma,
e-mail: michele.maroli@iss.it

INTRODUZIONE

Il largo consumo dei funghi secchi nel nostro paese ha fatto sì che spesso questa matrice alimentare fosse oggetto di attenzione da parte degli addetti preposti al controllo igienico delle derrate alimentari. In particolare i livelli di contaminazione entomatica “di campo” della matrice sono stati nell’ultima decade argomento di valutazione da parte di alcuni gruppi di studio (Borlenghi *et al.*, 2002; Locatelli *et al.*, 1994; 2005a; 2005b; Maroli *et al.*, 2002).

Sotto l’aspetto normativo, la legislazione italiana ha regolamentato la raccolta dei funghi epigei freschi definendo anche i vari aspetti della loro conservazione e commercializzazione [legge 23 agosto 1993 n. 352; DPR 14 luglio 1995 n. 376] ivi compresa la denominazione di vendita dei funghi porcini secchi [DM Industria 9 ottobre 1998 su GU 249 del 24 ottobre 1998]. Quest’ultimo decreto, da una parte ha posto dei limiti di accettabilità del numero di “tramiti”, le gallerie scavate da larve di Ditteri fungivori, presenti nei funghi secchi in commercio a seconda della categoria, dall’altra ha lasciato irrisolto il problema del numero delle larve di Ditteri fungivori eventualmente presenti. Di fatto, l’articolo 5 della legge n. 283 del 1962 vieta la vendita di merce “invasa da parassiti...”, senza indicare alcun limite

NORMATIVA	TOLLERANZA
USA: FDA 15 gr di funghi secchi 100 g funghi conservati e surgelati	20 larve < 2 mm oppure 5 larve > 2 mm Acari max 75
Canada: HPB 100 gr di funghi secchi, conservati e surgelati	10-20 larve < 2mm oppure 0-5 larve > 2 mm Acari: 20-75 n<10 buona qualità 10<n>20 o 0<n>5 qualità accettabile n> 20 o n>5 qualità inaccettabile

Tab. 1 - Limiti di tolleranza delle contaminazioni entomatiche previsti dalla normativa USA e Canadese.

Categoria funghi	Marca	Confezioni acquistate*	Confezione		Prezzo al Kg (€)
			Peso	Prezzo (€)	
Extra	A	2	50	4,90	98,00
"	B	2	50	6,99	139,00
"	C	2	50	5,49	109,00
Speciale	D	3	40	3,03	75,75
"	E	2	50	3,80	76,00
"	F	2	80	7,48	93,50
Commerciale	G	3	30	1,45	48,33
"	H	3	30	1,99	66,33
"	I	1	200	12,05	60,25
Conservati	L	1	1000	9,90	9,90
"	M	3	280	8,19	29,25
"	N	3	290	6,29	21,68

Tab. 2 - Campioni di funghi porcini analizzati: categoria, marca, numero confezioni, prezzo a confezione e al chilogrammo.

* Necessarie per costituire un campione di 90 g per 6 repliche di 15 g.

di tolleranza per i contaminanti entomatici. Al contrario, sia la legislazione americana (FDA, 1998) che quella canadese (Government of Canada, 1999) fissano dei limiti di accettabilità/tollerabilità relativi al numero di larve di Ditteri presenti nei funghi a seconda della grandezza delle stesse (Tab. 1). In questo contesto è da sottolineare che, in seguito a richiesta di parere da parte del Ministero della Salute, l'ISS nel 1995 aveva suggerito la fissazione di tolleranza per le larve di Micetofilidi a seconda delle categorie merceologiche come segue: categorie extra e speciale assenti in 0,1 g di prodotto; categoria commerciale: non più di 5 larve in 10 g di prodotto.

In uno dei lavori precedentemente citati (Maroli *et al.*, 2002) è stato evidenziato che il livello d'infestazione da parte di larve di Micetofilidi e Muscidi nei funghi porcini secchi era di gran lunga superiore ad un qualsiasi ragionevole livello di tolleranza; mediamente i valori di infestazione erano maggiori di 50 larve/10 g di prodotto. Si può argomentare che tale livello potrebbe essere dovuto ad una sola fetta di fungo infestata da un gran numero di larve di insetto, essendo le rimanenti non contaminate. Ciò porterebbe ad ipotizzare che 10 g potrebbero costituire un campione non rappresentativo della matrice alimentare in questione. Difatti nello studio riportato il protocollo della metodica introdotta prevedeva la ricerca delle larve di insetto in un solo campione di 10 g di fungo in seguito a re-idratazione completa.

Nel presente studio, che ha incluso le tre categorie di funghi porcini secchi in commercio in Italia, "extra", "speciali" e "commerciali", si è voluto valutare, non solo il numero medio di larve presenti in un campione altamente rappresentativo, 15¹ g di fungo secco per 6 repliche (totale = 90 g), ma determinare anche la frazione della matrice infestata, espressa in percentuale peso in seguito a re-idratazione.

¹ In conformità anche a quanto previsto dalla U.S. Food and Drug Administration.

MATERIALI E METODI

I CAMPIONI ANALIZZATI

I campioni di funghi porcini analizzati nel presente studio sono stati acquistati presso 8 differenti punti vendita della città di Roma. Per ciascuna categoria sono state prese in considerazione tre marche diverse. Nella Tabella 2 sono riportate le confezioni necessarie per la costituzione del campione di 90 g, il prezzo a confezione ed al Kg. Per confronto sono state analizzate anche tre marche di funghi porcini conservati (Tab. 2).

Categoria Marche	Media grammi in 6 repliche ^(a)	Media grammi "difettosi"		Larve (Micetofilidi/Muscidi)	
		Con tramiti (%)	Con larve (%)	Numero	>2 mm
Extra					
A	52,0±1,1	14,8 (28,5)	36,0 (69,2)	122,5±31,5	81,0±34,4
B	53,5±2,8	6,7 (12,5)	20,5 (38,3)	190,8±97,8	40,3±11,3
C	54,0±5,7	6,3 (11,7)	24,3 (45,0)	71,7±43,0	27,8±16,1
Speciali					
D	53,0±2,4	14,2 (26,8)	25,3 (47,7)	88,3±27,6	42,3±22,7
E	56,3±2,2	6,0 (10,6)	28,3 (50,3)	339,2±151,5	41,7±32,0
F	57,0±3,9	6,2 (10,9)	29,2 (51,2)	662,2±373,7	108,8±87,8
Commerciali					
G	54,0±3,7	13,2 (24,4)	28,2 (52,2)	94,5±32,2	62,2±31,1
H	55,2±5,4	4,8 (8,7)	33,7 (61,0)	548,8±235,4	227,8±52,7
I	62,3±3,8	15,5 (24,9)	43,2 (69,3)	273,0±297,0	222,8±271,0
Conservati^b					
L	96,0±8,9	14,8 (15,4)	73,6 (76,7)	37,6±16,1	29,8±19,0
M	100,0±0,0	1,5 (1,5)	71,2 (71,2)	570,5±109,9	370,2±99,6
N	100,0±0,0	5,5 (5,5)	14,7 (14,7)	11,7±11,1	8,0±7,6

Tab. 3 - Media grammi con tramiti di larve, con larve e numero di larve in tre marche di funghi: (i) secchi (extra, speciale e commerciale) e (ii) conservati; A-N, marche.

^a Corrispondenti a 15 g dopo reidratazione per i funghi secchi e 100 g di funghi conservati dopo sgocciolamento.

^b Il numero delle larve reperite è riferito a 100 g del prodotto.

METODI DI ANALISI

I metodi di analisi utilizzati per la determinazione delle impurità entomatiche nei funghi fanno riferimento ad una procedura operativa standard validata presso l'ISS (Maroli *et al.*, 2002). Tale procedura è stata aggiornata ai fini del presente studio. In breve, l'attuale procedura rispetto alla precedente prevede: (i) il prelievo di 6 aliquote di 15 g dal campione o comunque fino ad esaurimento dello stesso; (ii) la pesa e conta dei pezzi di fungo dopo reidratazione; (iii) la misura delle larve su vetrino graduato; (iv) la conta del numero di larve < 2 mm e quelle ≥ 2 mm; (v) il calcolo della percentuale m/m dei pezzi (con larve e con tramiti di larve). In allegato si riporta la procedura per intero.

Marca	Acari*	Coleotteri	Collemboli	Ditteri**	Psocotteri	Uova di insetto	Frammenti di insetto	
							Capsule***	Vari
Secchi extra								
A	2	-	3	-	-	7	-	-
B	3	-	2	Larva (1)	-	8	4	Tibia (1)
C	6	-	-	-	-	5	1	
Secchi speciali								
D	2	Larva (2)	1	Adulto (1) Pupa (17)	-	62	-	Femore (1)
E	1	Larva (1)	2	Larva (6)	2	2	>5	-
F	2	Adulto (1)	6	-	-	-	>5	-
Secchi commerciali								
G	1		-	-	1	11	-	-
H	1	Larva (1)	4	-	-	-	>5	Zampa (1) Torace (1)
I	-	Larva (1)	1	-	-	4	-	-
Conservati								
L	-	-	142	-	-	-	-	-
M	-	Larva (2)	-	-	-	-	>5	-
N	-	-	3	-	-	-	-	-

Tab. 4 - Artropodi rinvenuti nei campioni di funghi esaminati, riportati per categoria e marca di funghi secchi e conservati.

* In prevalenza *Cryptostigmata*; ** *Phoridae*; *** *Capsule cefaliche di Mycetophilidae*.

RISULTATI

Nella Tabella 3 sono riportati: (i) i valori medi percentuali dei grammi di fungo “difettosi” con solo trame di larve e quelli dei grammi contenenti larve di insetto, (ii) il numero medio di larve di Micetofilidi/Muscidi e il numero medio di larve \geq di 2 mm osservati in tre marche di funghi secchi (extra, speciali e commerciali) ed in tre di funghi conservati. Considerando la percentuale media dei grammi difettosi contenente larve di insetto, i valori minimi e massimi (14,7% e il 76,7%) sono stati riscontrati in due marche di funghi “conservati”. Per i funghi secchi tali valori si sono mantenuti sempre superiori al 38%. L’analisi entomologica ha evidenziato valori medi di infestazione dovuta a larve di Micetofilidi e Muscidi compresi tra un minimo di $11,7 \pm 11,1$ in 100 g della categoria “conservati” ed un massimo di $662,2 \pm 373,7$ in 15 g della categoria “speciali”. Molte delle larve reperite superavano i 2 mm: il valore minimo ($8,0 \pm 7,6$) e massimo ($370,2 \pm 99,6$) sono stati evidenziati in due marche della categoria “conservati”.

In tutte le categorie di funghi esaminate, oltre a larve fungivore, sono stati rinve-

nuti altri artropodi infestanti; in particolare, è stata rilevata la presenza di : (i) Acari, in prevalenza Cryptostigmata; (ii) larve e adulti di Coleotteri; (iii) Collemboli; (iv) larve, pupe e adulti di Phoridae; (v) Psocotteri nonché (vi) frammenti e uova di insetto (Tab. 4).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il metodo di analisi utilizzato nel presente studio ha messo in evidenza che i livelli delle impurità entomatiche presenti nei funghi porcini in commercio in Italia sono ancora molto alti. L'elevato grado di infestazione del prodotto appare evidente dal gran numero di larve fungivore che in media sono presenti nelle

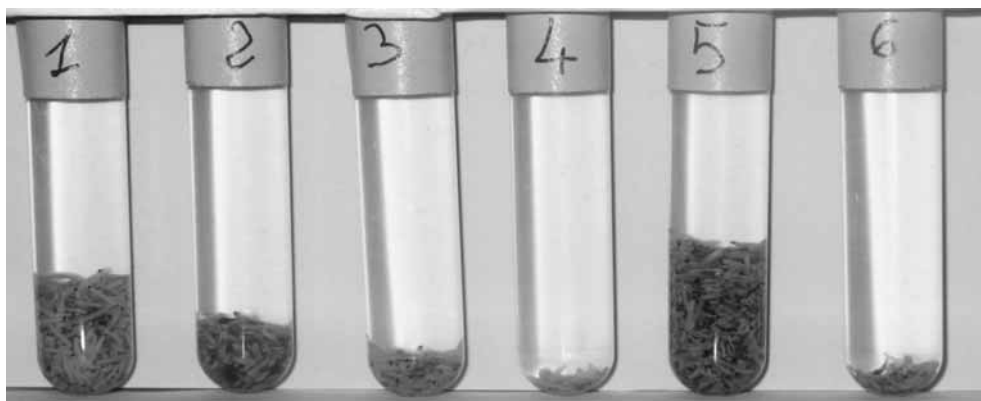


Fig. 1 - Larve di ditteri fungivori presenti in 15 g di fungo secco (6 repliche) di una marca della categoria commerciale.

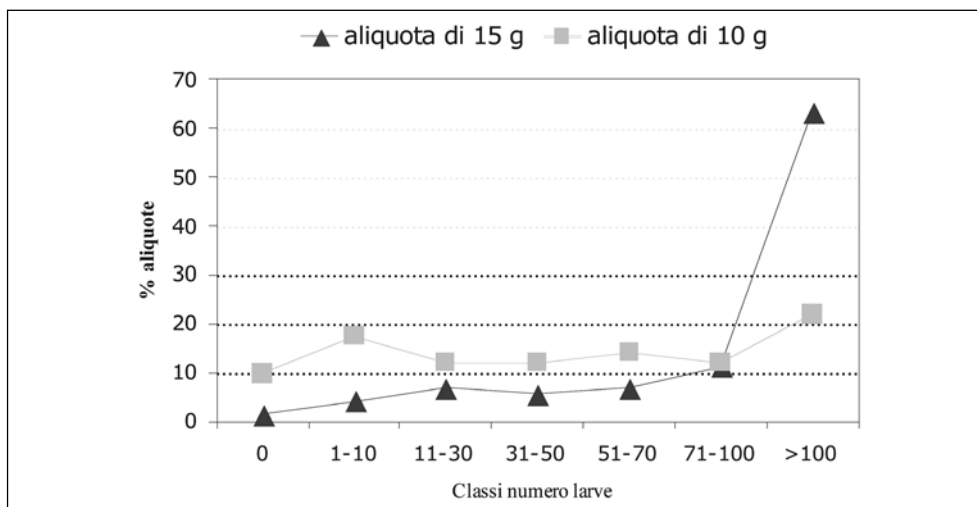


Fig. 2 - Contaminazione entomatica nei funghi porcini secchi: percentuali delle aliquote esaminate in ciascuna classe di contaminazione.

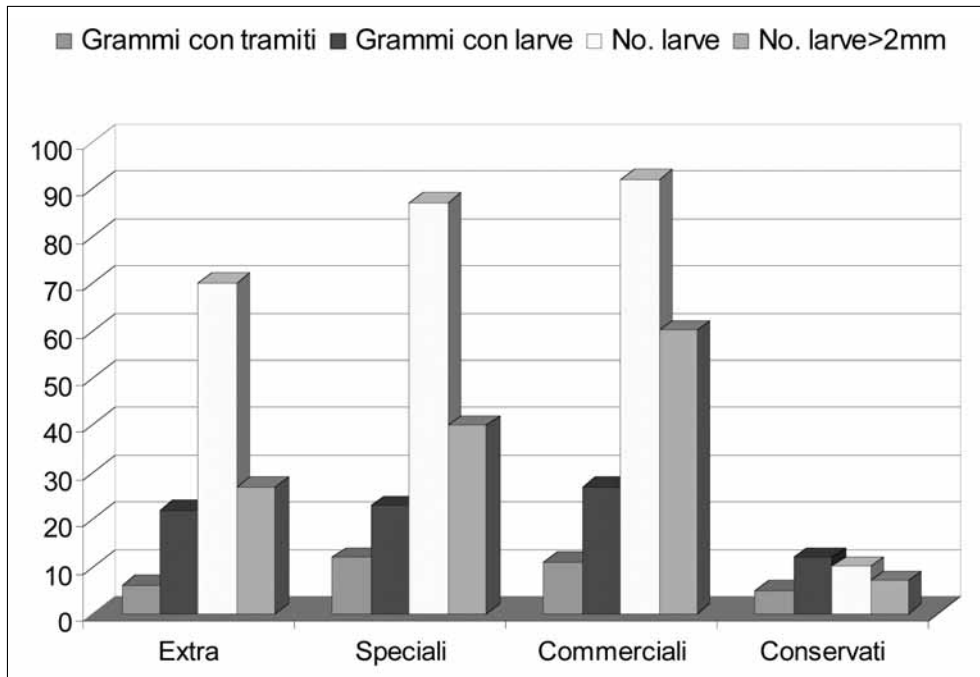


Fig. 3 - Valori minimi della contaminazione entomologica "di campo" riscontrati in marche di funghi porcini : Extra, marca C; Speciali, marca D; Commerciali, marca G; Conservati, marca N (Vedi Tab. 2).

aliquote esaminate (Fig. 1). Inoltre anche la frazione di grammi di funghi secchi difettosi con larve è sempre alta (38,3%-69,3%).

In base ai livelli di contaminazione osservati, nessuna delle marche analizzate risulta essere idonea al commercio sia per la legislazione italiana sia per quelle americana e canadese.

Inoltre, dai risultati delle analisi appare evidente che aumentando l'aliquota del campione (15 g per 6 repliche = 90 g) aumenta anche la percentuale dei campioni infestati da un numero di larve fungivore >100 (64,4%), mentre la percentuale è solo del 21,9% quando si esaminano aliquote di 10 g (Fig. 2).

In conclusione, il nostro studio ha dimostrato che non vi è un rapporto fra livelli crescenti di contaminazione entomologica, categorie di fungo e marche esaminate, potendo variare enormemente nell'ambito della stessa categoria. Tuttavia i valori minimi osservati per ciascuna categoria (Fig. 3) fanno ipotizzare che una filiera produttiva di questa matrice alimentare con infestazioni "di campo" limitate è possibile. Nel nostro studio, ad esempio, per una marca di funghi conservati la contaminazione entomologica osservata era di grado limitato essendo i grammi difettosi solo il 5,5% e 14,7%, rispettivamente con tramiti e con larve, ed il numero delle larve fungivore reperite era in media 11,7 di cui $8 \geq 2$ mm. E' auspicabile pertanto che la filiera del fungo porcino si adoperi a controllare all'origine la raccolta del fungo onde mettere in commercio un prodotto per il quale sia possibile porre dei limiti di tolleranza.

BIBLIOGRAFIA

- Borlenghi A., Somenzi C., Ablondi L., Bravi P., Garbazza C., Pedrazzani S., 2002 - Controllo sanitario dei funghi commercializzati: esame morfobotanico, qualitativo e parassitologico. - Atti del 7° Simposio "La Difesa antiparassitaria nelle Industrie alimentari e la Protezione degli Alimenti", Piacenza 18-20.IX.2002, Chiriotti Editori, Pinerolo: 456-461.
- DM dell'Industria del Commercio e dell'Artigianato 9 ottobre 1998 "Menzioni qualificative e che accompagnano la denominazione di vendita dei funghi secchi". GU 24 ottobre 1998 n. 249.
- DPR 14 luglio 1995, n. 376 "Regolamento concernente la disciplina della raccolta e commercializzazione dei funghi epigei freschi e conservati". GU 11 settembre 1995 n. 212.
- FDA, 1998 - Food defect action levels. Department of Health and Human Service, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Washington DC: 1-27.
- Government of Canada, 1999 - Health Protection Branch Guidelines for the General Cleanliness of Food. An Overview: 1-9.
- Legge 23 agosto 1993, n. 352 "Norme quadro in materia di raccolta e commercializzazione dei funghi epigei freschi e conservati". GU 13 settembre 1993 n. 215.
- Legge 30 aprile 1962 n. 283 "Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande". GU 4 giugno 1962 n. 139.
- Locatelli D.P., Süss L., Grua P., 1994 - Contaminazioni entomologiche dei funghi conservati. - *Industrie Alimentari*, 33: 1084-1088.
- Locatelli D.P., Süss L., Trevisan A., 2005a - Ditteri fungivori in funghi essiccati. - *Industrie Alimentari*, 44: 250-256.
- Locatelli D.P., Süss L., Trevisan A., Grioni S., 2005b - Presenza di tramiti di Ditteri fungivori in funghi essiccati: aspetti legislativi. - *Industrie Alimentari*, 44: 387-393.
- Maroli M., Khoury C., Bianchi R., Aureli P., 2002 - Considerazioni sui livelli di contaminazione entomologica dei funghi secchi attualmente in commercio in Italia. Atti del 7° Simposio "La Difesa antiparassitaria nelle Industrie alimentari e la Protezione degli alimenti", Piacenza 18-20.IX.2002, Chiriotti Editori, Pinerolo: 462-471.

RIASSUNTO

Lo studio ha preso in considerazione le tre categorie di funghi porcini secchi in commercio in Italia, "extra", "speciali" e "commerciali". Tre differenti marche di funghi sono state esaminate per ciascuna categoria e confrontate con tre marche di funghi conservati. Campioni di 15 e 100 g sono stati analizzati rispettivamente per i funghi secchi e conservati. Sono state costituite sei repliche per ciascun campione. Sono stati esaminati, registrati e pesati i funghi contaminati da (i) tramiti di larve e (ii) larve fungivore. Le larve rinvenute sono state contate e misurate.

I valori minimi e massimi (14,7 e 76,7) della percentuale media dei grammi difettosi contenente larve di insetti fungivori, sono stati riscontrati nei funghi "conservati". Per tutte le categorie di funghi secchi i valori sono stati tra il 38,3% e 69,3%. L'analisi entomologica ha evidenziato un'infestazione dovuta a larve di Ditteri appartenenti alle famiglie di Micetofilidi e Muscidi. Il valore minimo di $11,7 \pm 11,1$ larve/100 g ed il valore massimo di $662,2 \pm 373,7$ larve/15 g sono stati osservati rispettivamente nelle categorie conservati e speciali.

Molte delle larve reperite superavano i 2 mm: il valore minimo ($8,0 \pm 7,6$) e massimo ($370,2 \pm 99,6$) è stato riscontrato in due marche della categoria conservati. I ri-

sultati del presente lavoro dimostrano che i livelli di infestazione naturali nei funghi secchi e conservati sono consistentemente alti indipendentemente dalla categoria e dalle marche in vendita. Il grado di infestazione naturale osservato viene discusso in relazione ai possibili livelli di tolleranza.

SUMMARY

ARTHROPOD INFESTATION OF DRIED MUSHROOMS: METHODS OF ANALYSIS AND PERSPECTIVE FOR ESTABLISHING DEFECT ACTION LEVELS

A study aimed to evaluate the natural arthropod infestation of edible mushrooms, was carried out on three categories of dried products ('extra', 'special' and 'commercial') on sale in Italy. Three different brands were examined for each category and compared to three brands of canned mushrooms. Samples of 15 and 100 g have been analyzed for dried and canned products, respectively. Six replicates were performed for each sample. Mushrooms contaminated by (i) insect holes alone, or (ii) fungivorous insect larvae were sorted and weighted. Insect larvae detected were counted and measured. Brands of canned product showed both the lowest (14.7%) and the highest (76.7%) percentages of mushrooms infested by fungivorous larvae, while for the categories of dried mushrooms these values ranged between 38.3% and 69.3%. Insect larval stages belonging to Mycetophilidae and Muscidae families (Diptera) were the most common pests detected. A minimum of 11.7 ± 1.1 larvae/100 g and a maximum of 662.2 ± 373.7 larvae/15 g were observed in canned and "special" dried categories, respectively. Among the mushrooms infested by larvae ≥ 2 mm, the canned category showed both the lower (8.0 ± 7.6) and the highest (370.2 ± 99.6) number of specimens. Our findings demonstrate that the levels of natural pest infestation in dried and canned mushrooms on sale in Italy are consistently high, and the contamination extent is independent from category and brand of mushrooms. The observed degrees of infestation are discussed with regard of the perspectives for establishing defect action levels.

ALLEGATO

PROCEDURA STANDARD PER LA VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI CONTAMINAZIONE ENTOMATICA NEI FUNGHI SECCHI

Esaminare la/e confezione/i ed annotare la classe qualitativa (extra, speciale, commerciale), la data di scadenza, lotto e peso dichiarato.

Preparare il campione da esaminare che dovrà essere costituito da almeno 90 g.

Per la sua costituzione aprire le confezioni e mescolare il contenuto in una bacinella per alimenti (30X40).

Prelevare dalla bacinella, con il criterio della casualità, 6 aliquote di 15 g ciascuna.

Per ciascuna aliquota procedere come segue.

Esaminare e registrare la pezzatura/tipologia delle fette, colore, fette annerite.
Setacciare l'aliquota utilizzando un setaccio 10 mesh con contenitore.
Trasferire il materiale presente nel contenitore su una carta da filtro posta in una piastra Petri (Ø 140 mm).
Analizzare al microscopio (60-160X) il filtro e registrare eventuali impurità entomatiche e/o impurezze minerali, vegetali e animali.
Porre l'aliquota nel cristallizzatore ed aggiungere 300 ml di acqua demineralizzata.
Mettere in ammollo i funghi per diverse ore (2-3), a seconda delle specie dei funghi da esaminare, fino a completa reidratazione.
In alternativa, riscaldare il cristallizzatore su piastra ad una temperatura di 90-100 °C per circa 30 min, comunque fino a completa reidratazione dei funghi.
Filtrare il liquido di reidratazione su carta da filtro utilizzando un imbuto Büchner posto sopra ad una beuta da vuoto collegata ad una pompa da vuoto.
Trasferire il filtro nella piastra di Petri di vetro utilizzando la pinzetta in acciaio e mantenendo il filtro in orizzontale.
Lasciare sgocciolare i funghi reidratati per 10 minuti, utilizzando un setaccio 8 mesh.
Trasferire i funghi su carta da filtro per circa 3 minuti per far assorbire le rimanenti gocce d'acqua.
Dopo completo sgocciolamento pesare il campione di fungo reidratato.
Esaminare al microscopio (60-160X) il filtro per la determinazione del numero delle impurità solide leggere presenti nel liquido di reidratazione.
Isolare i reperti in una capsula di vetro (Ø 60 mm) contenente alcool al 70% ed annotare il numero.
Trasferire i funghi reidratati dalla carta da filtro al cristallizzatore e predisporre 3 piastre Petri (Ø 140 mm) per la classificazione delle fette in: (i) integre; (ii) con tramiti (iii) con larve fungivore.
Porre piccole quantità di funghi reidratati (fino ad esaurimento del campione da esaminare) su una piastra Petri (Ø 140 mm), dissezionando allo stereoscopio (60-160X) ogni fetta di fungo sgocciolato mediante l'aiuto di un bisturi e di una pinzetta, isolare i reperti entomatici.
Secondo l'esito, porre la fetta esaminata in una delle piastre indicate al punto 20.
Annotare il numero dei reperti rinvenuti nei funghi sgocciolati ed aggiungere a questo il numero di quelli presenti nel liquido di reidratazione.
Pesare le fette di fungo per ciascuna classe del punto 19, annotando i relativi pesi.
Misurare le larve reperite nei funghi utilizzando un vetrino graduato.
Contare e annotare il numero di larve < 2 mm e quelle > 2 mm.
Una volta esaminate le 6 aliquote reidratate, esprimere i risultati come segue:
Calcolare il peso medio delle sei aliquote.
Calcolare il peso medio delle fette con tramiti.
Calcolare il peso medio delle fette con larve fungivore.
Calcolare il numero medio delle larve fungivore ivi compreso quelle > di 2mm.
Per la determinazione della classe, ordine, famiglia e, laddove è possibile anche la specie, dei reperti entomatici rinvenuti, allestire preparati entomologici ed identificare allo stereomicroscopio e/o composto utilizzando chiavi di identificazione specifiche per ogni taxon.