

SPORE DI CLOSTRIDI IN UNA FILIERA AGRO-ZOO-CASEARIA CON E SENZA INSILATI

Colombari G.¹, Zapparoli G.A.¹, Melani D.¹

Dr. Gianni Colombari, Via Pilla 25/b – 46100 – Mantova – Tel ++39 0376
285540 / Fax ++39 0376 262422
gianni.colombari@ersaf.lombardia.it

Summary

Traditional and innovative farms are been compared.

The first farms produced solid manure and they had a low number of animals/hectare (1,1 t/ha p.v.), while the seconds produced sewage and they had an elevated number of animals/hectare (1,9 t/has p.v.).

Soil, foods, faeces, farmyard manure, sewage and milk have been analyzed in the farms for the analysis chemical and microbial (above all clostridia of spores).

The ploughed soil of the traditional farms had a lower concentration of clostridia spores in comparison to the innovative farms (17.800 vs 56.200 spores/g; $P < 0,05$) and the cows that ate more hay (contaminated with earth and therefore with spores), have not produced faeces with greater number of spores.

Also the cows fed with unifeeds (457 spore/g_{ss}) had a concentration of spores in faeces equal (617 vs 603 spores/ss) to the cows fed with traditional rations (234 spores/g_{ss}).

The vegetative forms of clostridia determine these variabilities of answer and they influence the load of spores of the various matrixes.

The relationship among spores output/input in the digestive apparatus, results very low (1,16) with rations without silage, also with green forages.

On the contrary the relationship is increased up to 2,25 ($P < 0,05$) with silage of low quality.

This points out 100.000 spores/g DM in faeces (10^5) and 165 spores/g DM in the ration ($10^{2,22}$).

With these pollutions it's very difficult to produce cheeses without damages from clostridia spores, as it shows the cheese trials experimental on years 1980.

The analyses of the fresh sewage and preserved sewage that it has been produced in three months see a variability from 500 to 348.000 spore/g DM.

These results point out that the strategy of control of the clostridia spores in the milk-cheese sector is subordinate to these three factors:

- a) to contain the ingestion of vegetative cells of clostridia in the rations with silage, and also in green forages badly preserved, forage dirty of earth and organic material;
- b) to prevent the development and the contamination of the clostridia in the places of standstill just to have animals cleaned from matrix fermented organic;
- c) to adopt an effective hygienic action in milking through mechanics brushes that clean the nipple with water and then remove the water without a real drying .

Keywords: clostridia spores, soil, liquid manure, farmyard, ration, faeces, milk, cheese.

Introduzione

La filiera lattiero-casearia, sia di montagna che di pianura, è una attività di trasformazione di prodotti vegetali in prodotti animali (latte e carne) e di prodotti animali (latte) in derivati caseari (principalmente formaggio).

¹ ERSAF - Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste

Queste trasformazioni differiscono tra loro per molti aspetti, tutti però fondamentalmente riconducibili alla diversità ambientale nella quale si svolgono questi due processi.

L'ambiente è in grado di esercitare una fortissima pressione di selezione, ad esempio, verso le specie vegetali sulla base, tra l'altro, di resistenze al freddo, somme termiche e limiti pedologici chimico- fisici .

Se in pianura sono gli erbai foraggeri, i prati avvicendati, i cereali da granella e le proteoleginose ad essere coltivati, raccolti e conservati, in montagna sono le essenze prative permanenti, base foraggera fondamentale della zootecnia da latte (Bovolenta *et al.*, 2005), che devono essere conservate.

La qualità del foraggio conservato in montagna è però attualmente molto scarsa (Bani *et al.*, 2004).

Il principale problema è rappresentato dalla discordanza tra il ritmo di sviluppo vegetativo primaverile-estivo delle cotiche prative permanenti e la loro capacità di utilizzazione da parte della mandria.

Una strategia di sostegno alla filiera lattiero-casearia di montagna dovrebbe tendere verso una armonizzazione tra produzione e utilizzazione, adottando adeguati sistemi di conservazione, come ad esempio l'insilamento in stadio vegetativo, evitando lo sfalcio di foraggio in avanzato stadio riproduttivo (Tabacco *et al.*, 2005).

In pianura, dove per altro le condizioni climatiche sono spesso più favorevoli rispetto alla montagna, i foraggi pratensi e gli erbai sono normalmente conservati mediante insilamento.

La conservazione del foraggio di montagna non è però un problema di interesse esclusivamente agro-zootecnico, ma è anche una strategia ambientale propedeutica a qualsiasi piano di contenimento del degrado territoriale.

È anche in questo contesto tematico che l'insilamento in montagna si propone ancora oggi come una strategia da riverificare alla luce anche delle conoscenze acquisite in questi anni (Colombari *et al.*, 2005), nonostante gli insuccessi del passato.

L'applicazione infatti di tecniche in grado di migliorare l'efficienza energetica del processo di conservazione del foraggio rispetto, ad esempio, al sistema della fienagione in due tempi, l'aumento del costo dell'energia fossile e della sensibilità sociale verso le emissioni gassose, il miglioramento della lotta a *Deschampsia caespitosa* e *Veratrum album* conseguente allo sfalcio, dell'efficienza di raccolta (riduzione del calpestio e del consumo di foraggio imbrattato), del soddisfacimento dei fabbisogni delle bovine da latte con relativo miglioramento del bilancio dell'azoto dell'azienda di montagna, sono aspetti complessivi che meritano una considerazione, almeno a livello sperimentale, in prima istanza.

L'obiettivo del lavoro è stato quello di indagare i principali punti critici che favoriscono lo sviluppo dei clostridi nella filiera lattiero-casearia (terreno, alimenti, feci, reflui, latte e cagliate), con la consapevolezza che questi microrganismi anaerobi obbligati sono il principale e per certi aspetti "l'unico" ostacolo, in montagna, al pieno sviluppo del sistema di conservazione mediante autoacidificazione nella filiera agro-zoo-casearia.

Le spore e le cellule vegetative

Per applicare tecniche di conservazione dei foraggi mediante insilamento in aree di montagna è indispensabile conoscere il processo mediante il quale il foraggio sfalciato e preappassito si conserva e le condizioni di moltiplicazione dei microrganismi utili che acidificano il foraggio ostacolando il deterioramento da parte dei clostridi soprattutto negli insilati molto umidi e carenti in nitrati.

I clostridi, microrganismi anaerobi obbligati, si sviluppano e sono particolarmente pericolosi nella forma di cellula vegetativa.

In questa forma si trovano nel terreno umido, nel rumine delle vacche, nel liquame, nel letame, e nel formaggio nel quale è stato riscontrato difetto fermentativo di tipo butirrico.

Il conteggio di questi microrganismi avviene come spora, secondo la tecnica MPN (Most Probably Number).

Con riferimento a razioni senza insilati, ma con erba verde, fieno e concentrato, rispetto alle razioni unifeed senza erba verde, i dati sperimentali di tabella 1 indicano che ad una minore concentrazione sporale media delle razioni tradizionali non è corrisposta una parallela minore concentrazione sporale nelle feci e ovviamente il rapporto feci/razione è risultato superiore nelle razioni tradizionali rispetto a quelle unifeed.

Questo risultato è spiegato dal maggiore contenuto in clostridi in stadio vegetativo rispetto alle più arieggiate razioni unifeed (Colombari *et al.*, 2005).

	Tecnica alimentare	
	Tradizionale	Unifeed
Razione (spore/g ss)	234 ^α	457 ^β
Feci (spore/g ss)	603	617
Feci/Razione(1)	1,20	1,11
Valori (n)	20	18

α, β: P<0,10. Valori trasformati in log e riconvertiti in numeri naturali.
⁽¹⁾Log [spore/g ss FECI]/Log [spore/g ss RAZIONE]. L'erba verde in estate ha evidenziato valori medi di 60 spore MPN/g .

I progressi realizzati

I risultati ottenuti in circa 20 anni di prove svolte in aree dove si impiegano insilati nelle diete delle bovine da latte spiegano meglio queste relazioni tra razioni, feci e coefficienti di moltiplicazione gastro-intestinale delle spore di clostridi (tabella 2).

Tabella 2 - Concentrazione di spore in razioni, feci e rapporti feci/razioni in diete con e senza insilati.			
	Alimentazione tradizionale		
	F&C	S	RF
Razione (spore/g ss)	190 ^A	370 ^{BC}	170 ^A
Feci (spore/g ss)	800 ^A	4.450 ^B	97.700 ^C
Feci/Razione ⁽¹⁾	1,29 ^{AB}	1,44 ^B	2,25 ^C
Prove (n)	9	10	5

A,B: P<0,01. F&C = foraggi affienati e concentrati. S = solo silomais in trincea; RF = rotoballe fasciate con piccole lacerazioni del telo, consumate in estate-autunno con o senza silomais; ⁽¹⁾Log [spore/g ss FECEI]/Log [spore/g ss RAZIONE]; Valori trasformati in log e riconvertiti in numeri naturali.

Le 9 prove svolte con razioni senza insilati, hanno ovviamente manifestato una bassa contaminazione fecale ed un rapporto Feci/Razione ovviamente molto contenuto sia in termini logaritmici (1,29) che come rapporto output/input tal quale (9,0; dati non riportati).

Le 10 prove svolte con silomais ammassato in trincea, hanno invece evidenziato un innalzamento della contaminazione fecale di spore e, ovviamente, del rapporto Feci/Razione sia in termini logaritmici (1,44), che come rapporto output/input tal quale (94; dati non riportati).

La somministrazione di rotoballe fasciate scadenti ha determinato un ulteriore e significativo aumento della contaminazione sporale fecale (97.700 spore/g ss) e un significativo innalzamento del rapporto Feci/Razione in termini logaritmici (2,25) e come rapporto tal quale (734; dati non riportati).

Quest'ultima contaminazione fecale non è stata però confermata da un peggioramento della concentrazione di spore nella razione e questo perché nell'insilato di rotoballe fasciate erano presenti clostridi prevalentemente in stadio vegetativo che hanno sporificato dopo la moltiplicazione verificatasi nel tratto gastro-intestinale.

Questi risultati indicano che è consigliabile valutare la qualità microbiologica clostridica di una razione analizzando direttamente la concentrazione di spore nelle feci.

I foraggi pratensi di montagna insilati e gestiti non correttamente, ad esempio, foraggi sfalciati in stadio riproduttivo, lignificati, ammassati molto umidi, non ermeticamente coperti con desilamento scorretto e somministrazione immediata alle bovine da latte subito dopo il prelievo dal silos, sono estremamente pericolosi per le trasformazioni casearie.

Le esperienze tuttavia dimostrano che è possibile produrre insilati di elevata qualità anche con foraggi pratensi di leguminose, notoriamente difficili da conservare mediante insilamento (Colombari *et al.*, 2001).

La moltiplicazione intestinale

In passato, dopo alcune prove deludenti realizzate nei primi anni '80 (tabella 3), sono stati aperti spiragli sempre più concreti circa la possibilità di impiegare insilati di foraggiere pratensi o da erbaio nella produzione di formaggi particolarmente sensibili a questi microrganismi.

Una significativa esperienza è stata condotta nel 1996 quando è stata insilata loiessa sfalciata in fase di levata, molto umida (23% ss).

Nonostante i forti dubbi sulla qualità microbiologica dell'insilato, anche perchè in fase di insilamento erano fuoriusciti liquidi zuccherini di percolazione dalla massa, è stato verificato con notevole sorpresa che non vi era stata moltiplicazione clostridica e la qualità del formaggio a stagionatura era apparsa ottima (tabella 3).

La motivazione di questo inatteso e positivo risultato è conseguente alla qualità del foraggio al taglio, del processo di gestione della copertura della massa e della modalità di desilamento e somministrazione agli animali.

E' ragionevole inoltre ritenere che un contributo "qualitativo" sia pervenuto anche dall'azione batteriostatica, esercitata dai nitrati, sui clostridi contenuti nel foraggio verde.

	Loiessa-silo		Loiessa-silo	
	Alta	Bassa	Insilato	Fieno
Tabella 3 - Erba silo di loiessa: qualità microbiologica del processo di filiera di produzione del formaggio grana. Confronto tra due prove svolte nella stessa azienda.				
Anno di prova	1986		1996	
Tipo di confronto	Quantità di insilato		Sistema di conservazione	
Sostanza secca (%)				
Foraggi (kg):	29		23	
loiessa				
Silomais	16	8	15	4
Feci (Spore/g)	00	15	15	
Latte	70.000		57	
Spore/l (MPN)				
Cbs (cfu/ml x 10 ³)	2.600	1.600	130	65
Prot. (")	76	81	21	30
Coli (")	3,6	4,1	0,7	1,4
Latte di caldaia	0,2	0,3	0,2	0,2
Spore/l (MPN)				
Cbs (cfu/ml x 10 ³)	1.220	770	27	22
Prot. (")	132	331	26	21
Coli (")	4,2	7,7	0,8	1,9
Formaggiograna	2,1	5,8	0,3	0,3
(%) Scelto comm.				
Difetto (con uso di lisozima)	(gonfiore in salamoia)		93	80
	Butirrico		Eteroform. + Prop.	

La moltiplicazione nei reflui

Un secondo coefficiente di aumento dei clostridi nella filiera lattiero-casearia, oltre a quello gastro-intestinale analizzato in precedenza, è stimabile rapportando i valori del refluo fresco con il refluo conservato.

All'uscita dalla stalla il refluo fresco (mix di feci vere e proprie con paglia e urine), non fermentato, ha una concentrazione stimata di circa 400-500 spore/g ss; mentre nel liquame estivo fermentato da <1 mese fino a > 3 mesi, le spore/g ss sono aumentate rispettivamente a 48.000 spore/g ss fino a 341.000 (tabella 4).

Tabella 4 - Liquame e letame: spore/g ss (MPN x 10 ³) in funzione della stagione e della durata di stoccaggio.				
		Stoccaggio (mesi)		
		<1	1- 3	>3
Liquame				
Estate	48 ^a	145 ^b	341 ^b	
Inverno	<7	28	16	
Letame				
Estate	---	18	85	
Inverno	11	23	21	
a,b: P<0,05. Valori trasformati in log e riconvertiti in numeri naturali; ANOVA senza retta di regressione.				

Quindi in assenza di insilati, non è il refluo fresco di giornata che rappresenta il pericolo inquinante, quanto il refluo fermentato che si trova nelle varie aree di attesa, anche esterne alla stalla e che imbratta i capezzoli, la cute della mammella ed il pelo degli animali.

Gli stessi terreni che hanno ricevuto dosi elevate di reflui hanno evidenziato sviluppi di clostridi significativamente superiori alla norma (P< 0,05; tabella 5) e numericamente più che proporzionali rispetto all'apporto di refluo.

Tabella 5 – Concentrazione di spore nei terreni di piccole aziende tradizionali e grandi aziende innovative.		
	Tradizionali	Innovative
Spore (MPN x 10 ³)	18 ^a	56 ^b
Campioni (n)	20	20
Medie di log ritrasformate in numeri naturali		

Il ruolo dell'igiene

L'igiene di stalla, degli animali e di mungitura, applicati contemporaneamente in ogni realtà aziendale è in grado di contrastare efficacemente l'inquinamento ambientale da clostridi (Stadhousers J. *et al.*, 1990).

L'analisi dei risultati di tabella 6 indica che in due realtà zootecniche con processi lattiero-caseari simili vi è stato uno sviluppo di spore di clostridi estremamente differenziato, già per altro tendenzialmente evidente in "area zootecnica" (alimenti, feci e unifeed), ma molto più evidente in "area lattiero-casearia" (latte di massa, di caldaia e panne) in conseguenza di interventi igienici a livello di stalla, di animali e di mungitura, quest'ultima attuata dopo un intervento di igienizzazione dei capezzoli con un sistema meccanico a spazzole coadiuvato da acqua di pozzo come liquido di lavaggio.

In estate da una positività sui campioni di latti e panne del 78% si è passati nell'altra azienda al 32%; mentre in inverno gli stessi valori sono passati rispettivamente dal 40% al 23%.

Tabella 6 - Sviluppo di spore di clostridi nella filiera lattiero-casearia di due aziende agricole con elevato carico di animali, stabulazione libera e produzione di liquame. Campioni positivi (%). Incubazione = 7 d.		
	Azienda 1	Azienda 2
<u>Inverno</u>		
Area zootecnica ⁽¹⁾	65	55
Area latt.-casearia	78	32
<u>Estate</u>		
Area zootecnica ⁽²⁾	79	65
Area latt.-casearia	40	23
-----	-----	-----
Media	65	43
Campioni (n)	108	118

⁽¹⁾ Dati ottenuti con una diluizione superiore di 10 volte rispetto a ⁽²⁾ .
 Area zootecnica = campioni di alimenti, unifeed e feci;
 Area lattiero-casearia = campioni di latti massa, di caldaia e panne.

Conclusioni

L'insilamento è una tecnica in grado di migliorare, per l'animale, la qualità del foraggio conservato di montagna. La contaminazione microbiologica del latte e l'insorgenza di fermentazioni indesiderate nel formaggio hanno invece origine nella qualità della microflora epifitica dell'insilato e nelle condizioni igieniche di processo (azienda e caseificio).

In questo senso le prime esperienze sui sistemi di conservazione delle foraggere pratensi e da erbaio, a causa soprattutto della scadente qualità microbiologica degli insilati stessi, hanno generato gravi sviluppi di clostridi e danni fermentativi alle cagliate, pur con l'adozione di adeguate tecniche casearie.

Adeguate cure in fase di insilamento, copertura e utilizzazione dell'insilato, gestione dell'igiene di stalla, degli animali, di mungitura e adozione di opportune tecniche casearie, hanno drasticamente contrastato lo sviluppo di fermentazioni dannose, clostridiche in particolare, soprattutto nei formaggi a più lunga stagionatura.

Pur riconoscendo nella qualità degli alimenti e nell'igiene di processo la chiave principale di controllo di questi dannosi microrganismi, è opportuno rilevare che anche la concentrazione degli animali, la forte distribuzione di liquami/letami sui terreni, la fermentazione dei reflui e la sosta continua degli animali sugli stessi suoli o su lettiere non ben governate, si stanno mostrando tematiche emergenti in grado di peggiorare la qualità microbiologica generale dell'ambiente agrario nel quale si svolge la prima e più critica fase produttiva della filiera lattiero-casearia.

I dati sperimentali indicano differenze significative ($P < 0,05$) di inquinamento di spore di clostridi tra terreni di aziende tradizionali con bassi carichi di animali (17.000 spore/g di terreno con 1,1 t/ha peso vivo allevato) e terreni di aziende innovative con elevati carichi di animali (81.000 spore/g di terreno con 1,9 t/ha peso vivo).

Anche la durata della conservazione dei reflui è apparsa un fattore non trascurabile nel quadro generale di sviluppo dei clostridi se si considera che il refluo fresco di giornata è stimato con circa 500 spore/g ss, mentre il refluo fermentato oltre 3 mesi può raggiungere le 350.000 spore/g ss.

La strategia per contrastare lo sviluppo e la contaminazione delle spore nelle razioni e negli ambienti di stabulazione degli animali deve necessariamente valutare il fatto che intensificare significa rendere più anaerobico l'ambiente (stalla, lettiera, terreni, concimaia e vasche liquami) e quindi favorire lo sviluppo dei clostridi.

L'igiene di stalla, degli animali e di mungitura si pongono sempre più come una strategia propedeutica alla qualità microbiologica degli alimenti insilati.

La tecnica di produzione degli alimenti e la gestione di questi punti critici di processo unitamente all'applicazione di adeguati principi di tecnica casearia, rappresentano un efficace metodo di miglioramento della qualità fermentativa soprattutto per i formaggi a media-lunga stagionatura.

Attività realizzata con finanziamento della l.r. 28/98 dell'Emilia Romagna e con il coordinamento tecnico-organizzativo del Centro Ricerche Produzioni Animali (C.R.P.A.).

Bibliografia

- Bani P., Calamari L., Bionaz M., Chatel A., 2004. *Caratteristiche chimico nutrizionali e digeribilità in vitro di fieni della Valle d'Aosta. Quaderno SOZOOALP, 1, 186-189.*
- Bovolenta S., Cozzi G., Tamburini A., Ventura W., Timini M., 2005. *L'alimentazione della vacca da latte in alpeggio: effetti sulla fertilità e sulle altre caratteristiche dei pascoli. Quaderno SOZOOALP, 2, 29-44.*
- Colombari G., Borreani G., and Crovetto G. M., 2001. *Effect of ensiling alfalfa at low and high dry matter on production of milk used to make grana cheese. J. Dairy Sci., 84, 2494-2502.*
- Colombari G., Allegretti A., Melani D., Bettoni B., Pecorari M., 2005. *Sviluppo di spore di clostridi nel terreno, negli alimenti zootecnici, nelle feci e nel latte di allevamenti a diverso livello evolutivo in area Parmigiano-Reggiano. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 56, 309-344.*
- Stadhousers J, Jørgensen K (1990). *Prevention of the contamination of raw milk by a hygienic milk production, Bull. Int. Dairy Fed. n. 251, 32-36.*
- Tabacco E., Borreani G., Giaccone D., Contestabile G., *Realizzazione del fieno-silo per la valorizzazione delle risorse prative alpine e la produzione di formaggi di qualità*
- Parte I. Epoca di taglio, tipologia e qualità di conservazione dei foraggi. Quaderni della Regione Piemonte. Agricoltura, 43, 21-24.*