



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

**L' ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA:
principali risultati e loro trasferibilità operativa
Roma, 19 giugno 2020**



Foto - Daniele Sagrafoli

Confronto tra
lettiera tradizionale
e lettiera alternativa:
Ecologia microbica e
mastiti
in vacche da latte

Simonetta Amatiste UOS Igiene della Produzione del latte
Responsabile U.O.1 Giuseppina Giacinti
Responsabile U.O.2 Fabrizio Gamberale

LT 01/15





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Introduzione



Foto – Ruminantia.it

Il sistema di **stabilazione su lettiera compost** già affermato in Israele e negli Stati Uniti sta conoscendo una rapida diffusione anche in Europa con un particolare interesse da parte dell'Olanda. A partire dal 2006 la stabilazione su lettiera compost si è diffusa anche in Italia soprattutto nelle regioni del nord.



Foto – Ruminantia.it

Nella stabilazione su lettiera compost l'intera superficie di riposo, priva di cuccette e suddivisioni interne, è costituita da deiezioni animali e da una quota di materiale organico variabile in composizione e quantità a seconda delle caratteristiche climatiche del luogo di applicazione e delle modalità di gestione.



Foto – IZSLT

Lo strato di lettiera così costituito viene lavorato con erpice per inumare le deiezioni fresche allo scopo di favorire una costante aerazione del substrato, il conseguente instaurarsi di processi di degradazione aerobici e l'incremento dell'evaporazione dell'acqua; tale pratica serve a garantire una superficie asciutta e confortevole per le bovine.

Gli studi condotti su diverse tipologie di substrato utilizzato per la lettiera compost indicano un miglioramento dei parametri relativi alla fertilità e alla longevità e una riduzione della patologie podali, mentre, per quanto attiene le patologie mammarie, si osservano risultati non sempre concordanti. Occorre sottolineare che indipendentemente dal substrato utilizzato l'aspetto chiave per la corretta gestione di questo tipo di lettiera è la costante aerazione del substrato.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Introduzione

Negli ultimi anni in Italia si è assistito ad un rapido aumento di impianti di biogas per la produzione di energia da biomasse agricole e/o zootecniche portando gli allevamenti, soprattutto da latte, ad avere grandi quantità di un materiale solido definito *digestato*.

L'interesse per l'impiego di questo tipo di substrato nella stabulazione su lettiera compost barn sta costantemente aumentando soprattutto per una significativa riduzione dei costi di gestione.



Mancano tuttavia studi finalizzati a valutare gli effetti che ha l'applicazione del *digestato* nella lettiera compost sulle performance produttive degli animali e soprattutto sono carenti studi sulle caratteristiche qualitative e quantitative della flora microbica presente compresa l'eventuale presenza/persistenza di microrganismi causa di mastite e di *Mycobacterium paratuberculosis* (MAP).





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

OBIETTIVI

Censire a livello regionale le aziende con impianti a biogas che utilizzano il *digestato* come materiale di partenza e aggiunta per lettiera a compost.

Implementare le informazioni riguardo l'applicazione in Italia, con particolare riferimento alla regione Lazio, del sistema di stabulazione su lettiera a compost, che prevede come materiale il *digestato* proveniente da impianti a biogas.

Valutazione delle performances produttive, del benessere e dello stato sanitario della mammella delle bovine allevate su lettiera a compost barn e confronto con bovine allevate su lettiera di tipo tradizionale

Studio della microflora del *digestato* prodotto dagli impianti a biogas con particolare riferimento agli agenti patogeni della mammella e alla presenza/persistenza di *Mycobacterium paratuberculosis*.

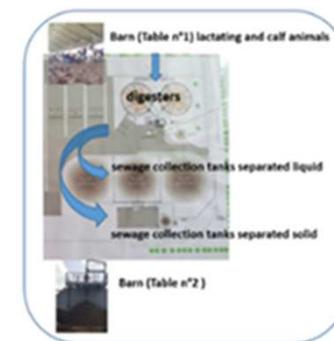




Materiali e metodi

Censimento

Nel Lazio censiti 20 impianti Biogas realizzati in aziende agro-zootecniche e/o agro-alimentari. Il numero di allevamenti da latte con annesso biogas sono risultati 7 di cui 5 autorizzati secondo il Reg. CE 1069/2009 e dalle linee guida della Conferenza unificata del 7 febbraio 2013; 2 sono risultati esclusi dal Reg. CE 1069/2009 secondo quanto stabilito dalle linee guida sopracitate. Soltanto un allevamento impiega il digestato come substrato per la lettiera.



Aziende Selezionate

ID Allev.	Prov.	Specie allevata	n. capi	Biogas	Materiale utilizzato	Riconoscimento/registrazione	Digestato palabile	Utilizzo digestato
A	RM	Bovini	3500	cogenerazione da biogas per energia elettrica (625 kw)	liquami, colture dedicate	Esclusi dal Reg.CE 1069/2009	si	Ammendante /lettiera
B	RM	Bovini	500	cogenerazione da biogas per energia elettrica e termica (250kw)	liquami, insilati, melasso, pollina	Autorizzazione ai sensi del Reg.CE 1069/2009	si	Ammendante
C	VT	Bovini	600	cogenerazione da biogas per energia elettrica e termica (500 kw)	liquami, colture dedicate, scarti agroalimentari, agroindustriali, pollina	Autorizzazione ai sensi del Reg.CE 1069/2009	si	Ammendante /lettiera
D	VT	Bovini	400	cogenerazione da biogas per energia elettrica e termica (500 kw)	liquami, colture dedicate, scarti agroalimentari, agroindustriali	Autorizzazione ai sensi del Reg.CE 1069/2009	si	Ammendante
E	LT	Bufalini	1000	cogenerazione da biogas per energia elettrica e termica (250kw)	sottoprodotti aziendali	Esclusi dal Reg.CE 1069/2009	no	fertirrigazione



Materiali e metodi

Analisi digestato per ricerca agenti causa di mastite: esame microbiologico colturale su 14 campioni.

Sanità della mammella – confronto tipologie di stabulazione

Per lo studio delle due tipologie di stabulazione sono state monitorate per un periodo di 12 mesi 240 bovine in lattazione (120 bovine su lettiera tradizionale vs 120 bovine su lettiera compost barn) appartenenti alla stessa Azienda.



Sanità della mammella:

Ricerca di agenti mastidogeni (analisi eseguite su campioni di latte di bovine con sintomi di mastite) mediante esame batteriologico colturale (Rif. Laboratory handbook on bovine mastitis NMC 1999; Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th edition, 2004 OIE)



Enumerazione delle Cellule somatiche (analisi eseguite su campioni di latte di bovine con sintomi di mastite e non) con metodo fluoro-opto-elettronico (Fossomatic TM FC/200 Foss). Confronto SCC controlli funzionali nei 12 mesi considerati.

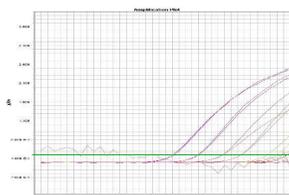
Analisi per la ricerca di MAP dal digestato e dalla lettiera:



*Esame microbiologico
(GOLD STANDARD)*



Ricerca biomolecolare di MAP



REAL-TIME PCR





Risultati

Analisi digestato per ricerca agenti causa di mastite

In nessun dei 14 campioni di digestato prelevato nelle 5 aziende studiate è stata riscontrata la presenza di **SCP** e **Prototheca spp**, nonostante le aziende A, C, D presentassero una problematica di *Staphylococcus aureus* e la sola Az. A anche di *Prototheca*.

Il gruppo degli **SCN**, presenti in tutte le aziende, sono stati isolati in 13 campioni su 14 (92,8%), con un contenuto medio di 5.16 log₁₀ ufc/g.

Il genere **Streptococcus** presente in tutte le aziende è stato riscontrato in 9 campioni su 14 (64,3%) con un contenuto medio di 5.99 log₁₀ ufc/g.

Le principali specie isolate sono state **Enterococcus faecium**, **Aerococcus viridans**, **Aerococcus urinae**, **Enterococcus faecalis** e **Streptococcus uberis**.

La presenza di **Enterobacteriaceae** è stata riscontrata in tre campioni su 14 (21,4%), tutti appartenenti all'azienda A con un contenuto medio di 5.28 log₁₀ ufc/g, mentre la presenza di **E. coli** è stata riscontrata in 1 solo campione dei 3 positivi per Enterobacteriaceae.

La presenza di **lieviti e muffe** è risultata su tutti i campioni di digestato esaminati, facendo registrare un contenuto medio di 4.65 log₁₀ ufc/g.

Ad eccezione delle Enterobacteriaceae la concentrazione di microrganismi è stata maggiore nel periodo invernale in confronto al periodo estivo.



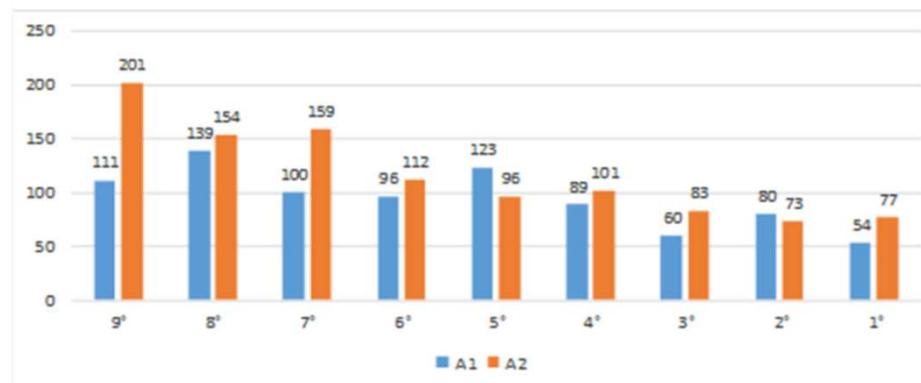
Risultati 2

Sanità della mammella – confronto tipologie di stabulazione

Occorre sottolineare che l'azienda selezionata presentava un ottimo livello di gestione degli animali sia da un punto di vista sanitario che di benessere animale. I parametri considerati sia in termini di cellule somatiche che di eventi di mastite clinica nei due gruppi mostrano valori confrontabili. Anche i punteggi relativi all'igiene score sono risultati simili nei due gruppi.

Le specie batteriche isolate da tutti i casi di mastite clinica sono risultate comparabili tra i due gruppi. Complessivamente gli agenti mastidogeni isolati con maggior frequenza sono stati *E. coli* (45.4%) e *S. dysgalactiae* (24,2%). Anche il contenuto delle cellule somatiche studiato nel corso del tempo ha mostrato un andamento analogo tra i due gruppi ma è risultato tendenzialmente più basso nel gruppo compost-barn rispetto a quello tradizionale.

Nell'ultimo periodo di studio (agosto-settembre-ottobre) sono stati osservati valori più elevati di cellule somatiche e un lieve incremento dei casi di mastite, equamente nei due gruppi: osservazioni probabilmente da ricondurre al clima caldo umido che ha caratterizzato questa fase stagionale, influenzando in modo analogo i due gruppi studiati.



Andamento medio del SCC tra i due gruppi di studio estrapolati dai CCFE (ogni 40 gg)





Risultati 3

Analisi per la ricerca di MAP dal digestato e dalla lettiera

Le prove condotte per la ricerca di MAP nelle 5 Aziende selezionate hanno dato esito negativo (MAP assente) in 4 aziende sia per i campioni di digestato sia per i campioni di lettiera tradizionale o compost barn.

L'azienda A è invece risultata positiva dalle analisi del digestato quindi lo studio è proseguito sui box e sui gruppi di animali:

dall'analisi del digestato si è registrata una sola positività all'esame colturale della aliquota 5 bis del campione n. 5 Dall'analisi molecolare è stata osservata la presenza di *MAP* in 7 distinti pool, di cui 5 provenienti dalle aree di stabulazione delle vitelle di età 3-5 mesi e 2 dalle aree di stabulazione delle vacche in lattazione; i pool provenienti dai box di stabulazione delle vitelle di età 6-9 mesi sono risultati negativi. In 2 dei 7 pool è stata confermata la presenza di *MAP* sia dall'esame colturale confermato con esame microscopico, sia dalla ricerca biomolecolare. Un pool è risultato positivo al colturale e al microscopico, mentre in 5 pool la positività è risultata solo dal biomolecolare. Tutti gli animali testati sierologicamente con test ELISA per MAP sono risultati negativi, confermando la bassa prevalenza di questa patologia nell'allevamento. (Tabella)

BOX	Cultural isolation	Ziehl-Neelsen TB QUICK STAIN	PCR Real Time (average CT)	Animal Serological screening ELISA test
Pool 1 (3-5 months)	negative	-	positive (32,32)	negative
Pool 2 (3-5 months)	negative	-	negative	negative
Pool 3 (3-5 months)	negative	-	positive (33,9)	negative
Pool 4(3-5 months)	positive (< 10 CFU)	positive	positive (34,10)	negative
Pool 5 (3-5 months)	negative	-	positive (31,97)	negative
Pool 6 (3-5 months)	negative	-	positive (33,72)	negative
Pool 7 (3-5 months)	negative	-	negative	negative
Pool 8 (3-5 months)	negative	-	negative	negative
Pool 9 (6-9 months)	negative	-	negative	negative
Pool 10 (6-9 months)	negative	-	negative	negative
Pool 11 (lactating animal)	positive (< 50 CFU)	positive	positive (30,67)	negative
Pool 12 (lactating animal)	positive (< 50 CFU)	positive	negative	negative
Pool 13 (lactating animal)	negative	-	positive (34,58)	negative
Pool 14 (lactating animal)	negative	-	negative	negative





Impatto e trasferibilità operativa

Raccomandazioni



Negli impianti di biogas alimentati con effluenti agro-zootecnici il processo di digestione è di tipo anaerobico e la temperatura di fermentazione oscilla tra i 35°C se si opera con batteri mesofili e i 55° C se si utilizzano batteri termofili.

Tuttavia queste temperature sembra non siano sufficienti a distruggere MAP e/o patogeni responsabile di mastite, quindi non si potrebbe escludere la necessità di un trattamento di igienizzazione del digestato, al fine di ridurre eventuali rischi sanitari agli animali e/o all'uomo. E' necessario quindi considerare questo aspetto nell'analisi del rischio quando si affronta l'eventuale piano di risanamento da Paratubercolosi.



L'utilizzo del digestato come substrato di lettiera nella nostra regione, come nel resto d'Italia, è poco utilizzato soprattutto per le scarse conoscenze d'impiego e di sicurezza, per esempio all'interno dell'impianto per la produzione di biogas possono essere inseriti sottoprodotti provenienti da allevamenti di altre specie animali quali la "pollina" da allevamenti avicoli. L'utilizzo di questi sottoprodotti può comportare l'introduzione di altri rischi microbiologici come *Salmonella* spp per gli allevatori che dovessero utilizzare il "separato" per la lettiera; l'impiego di pollina è stato riscontrato in un allevamento del presente studio.

L'utilizzo del digestato come substrato di lettiera, che potrebbe ridurre in modo significativo i costi di gestione della lettiera e migliorare la redditività aziendale, quindi deve essere realizzato con la consapevolezza dei potenziali rischi sanitari.





Conclusioni 1

- Dallo studio eseguito nei 14 campioni di digestato, complessivamente è stata osservata una variabilità nel contenuto delle specie batteriche studiate tra le diverse Aziende arruolate anche in considerazione dei periodi stagionali. Sebbene siano scarsi in letteratura dati sulla qualità microbiologica di questa tipologia di compost-barn, i risultati ottenuti in questo studio preliminare sottolineano una qualità igienica idonea all'impiego del digestato come lettiera.
- I risultati ottenuti in questo studio evidenziano che l'utilizzo del digestato nella preparazione di lettiera secondo la tecnica compost-barn non ha influenzato negativamente lo stato sanitario della mammella rispetto alla stabulazione tradizionale, risultando un valido sostituto alla lettiera convenzionale, anche per il bilancio positivo relativamente ai costi aziendali diretti e indiretti. Una interessante ricerca olandese (Galama et al., 2011) ha calcolato che il costo per singola vacca di un compost barn si riduce del 14% rispetto a una stalla a cuccette. Tuttavia, altri autori hanno osservato che il costo e la disponibilità della lettiera potrebbe limitare l'uso del compost-barn (Barberg et al., 2007a; Shane et al., 2010).
- Nel nostro studio, il SCC è risultato tendenzialmente più basso nel gruppo compost-barn rispetto a quello tradizionale, in accordo a quanto osservato da alcuni autori ((Barberg et al., 2007b; Black et al., 2014, Zhao et al., 2012). Valori più elevati sono stati osservati nell'ultimo periodo di studio (agosto-settembre-ottobre - controlli 7°;8°;9°), con un leggero incremento dei casi di mastite, registrati equamente nei due gruppi. Riteniamo che questi incrementi siano probabilmente da ricondurre ad un clima caldo umido, che ha caratterizzato questa fase stagionale, e che ha influenzato in modo analogo le due tipologie di stabulazione.





Conclusioni 2

- È interessante notare che nel periodo estivo, pur avendo isolato dal separato un maggior contenuto di Enterobacteriacee ed E. coli, non è stato registrato un aumento di mastiti cliniche causate da enterobatteri nel gruppo A1. Probabilmente, il rivoltamento attuato mediante trattore con specifico attrezzo (erpice), favorisce l'areazione del materiale, consentendo così di ottenere una superficie di riposo più asciutta, e crea un processo aerobico che genera calore e temperature di circa 55÷65°C, con effetto di riduzione della carica microbica contaminante. Nello studio di Barberg (2007b), dove veniva utilizzato un altro substrato organico, osservarono una riduzione significativa nella prevalenza di mastiti in soggetti trasferiti su lettiera a compost-barn rispetto ai casi riscontrati nella precedente stabulazione. Diversamente, Petzen (2009) ha monitorato, dopo lo spostamento di bovine su lettiera a compost-barn, le cellule somatiche individuali per intero anno, non osservando alcuna differenza tra le due tipologie di stabulazione.
- Per quanto riguarda l'igiene, è importante sottolineare che nel compost barn il livello di pulizia degli animali è buono soltanto con una ottimale gestione della lettiera (Shane et al., 2010). In particolare, nel nostro studio il punteggio dell'igiene degli animali, è risultato complessivamente molto buono e lievemente migliore nel gruppo A1, questo in accordo con altri autori (Lobeck et al 2011; Fulwider et al., 2007) i quali hanno osservato un significativo miglioramento dopo il passaggio degli animali da stabulazioni tradizionali a quelle con compost-barn. Complessivamente molti studi confermano inoltre che la tecnica compost-barn ha un impatto positivo sul benessere delle vacche da latte (Barberg et al., 2007b; Fulwider et al., 2007; Lobeck et al., 2011).





Conclusioni 3

Questo studio è stato realizzato in una azienda che è l'unica nella nostra regione ad utilizzare la stabulazione compost barn. I risultati ottenuti confermano quanto riportato da altri autori da diverse parti del mondo, sottolineando che la compost-barn potrebbe rappresentare una soluzione efficace, se correttamente gestita, per l'allevamento del bovino da latte anche nella regione Lazio. I vantaggi sono molteplici, in primis un maggior benessere degli animali, un miglioramento della sanità della mammella, e conseguentemente un miglioramento della qualità del latte. Tuttavia alcuni fattori come la densità degli animali, maggiori superfici unitarie rispetto a stalle tradizionali, elevati fabbisogni di manodopera per le operazioni di gestione della lettiera, tipo e quantità di materiali da lettiera utilizzati, spesso presenti nella nostra realtà zootecnica, possono rappresentare una criticità e/o una limitazione alla sua applicazione, Per quanto riguarda la ricerca di MAP si sottolinea la difficoltà di rilevarne la presenza dalle matrici oggetto dello studio e quindi di integrare la ricerca utilizzando metodi colturali e biomolecolari.

Occorre sottolineare che negli impianti di biogas alimentati con effluenti agro-zootecnici il processo di digestione è di tipo anaerobico e la temperatura di fermentazione oscilla tra i 35°C, se si opera con batteri mesofili, e i 55° C se si utilizzano batteri termofili. Tuttavia queste temperature sembra non siano sufficienti a distruggere MAP e/o patogeni responsabile di mastite, quindi non si potrebbe escludere la necessità di un trattamento di igienizzazione del digestato, al fine di ridurre eventuali rischi sanitari per gli animali e per l'uomo.

