

# AFLATOSSINA M1, CARICA BATTERICA TOTALE E CELLULE SOMATICHE NEL LATTE DA PRODUZIONE BIOLOGICA E CONVENZIONALE

## *M1 AFLATOXIN, TOTAL BACTERIAL COUNT AND SOMATIC CELL COUNT IN ORGANIC AND CONVENTIONAL MILK*

Coccollone A.<sup>1</sup>, Canever A.<sup>2</sup>, Trevisani M.<sup>1</sup>, Borsari A.<sup>2</sup>, Giacometti F.<sup>1</sup>, Serraino A.<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Università di Bologna

<sup>(2)</sup> Granarolo S.p.A. - Bologna

### **SUMMARY**

Comparative quality evaluation of organic and conventional milk produced in similar environmental condition was performed. Bulk-tank milk was sampled once a week during 30 weeks from 10 organic and 10 conventional dairy farms where aflatoxin M1 level was previously tested during 11 months on bulk-tank milk from tanker at the processing plant. Somatic Cells and Total Microbial Counts did not show differences that can be related to the organic production system, suggesting an effect induced by farm size and technical factors. Higher level of Aflatoxin M1 was found in organic than conventional milk.

### **Keywords**

Aflatoxin; milk quality; mastitis; organic dairy

### **INTRODUZIONE**

Negli ultimi anni in Italia sono aumentate le aziende che producono prodotti biologici, regolamentati dal Reg. 2491/01/CE (1) che ha posto le regole per la certificazione, tracciabilità ed etichettatura dei prodotti biologici. Inoltre, i consumatori, sulla base della percezione del rischio connesso al consumo degli alimenti di origine animale prodotti mediante metodo convenzionale, sono maggiormente disposti a riconoscere prezzi superiori per gli alimenti prodotti con metodo biologico; tuttavia, in alcuni casi, gli alimenti biologici possono non raggiungere gli standard qualitativi degli alimenti convenzionali. I problemi qualitativi che si riscontrano possono essere riconducibili all'applicazione, nell'allevamento biologico, dei principi di produzione del metodo tradizionale, compresa la gestione dell'aspetto sanitario. Un altro aspetto da considerare è il

fatto che la produzione o l'approvvigionamento di mangimi biologici da parte delle aziende zootecniche può determinare problematiche tecniche o commerciali tali da influenzare le produzioni animali oltre che dal punto di vista sanitario e qualitativo anche quantitativamente.

È stato ipotizzato che l'assenza di specifiche competenze nel management delle produzioni biologiche sia la principale fonte delle problematiche in cui incorrono le aziende che adottano questo sistema (2). Molti studi sottolineano che l'allevamento biologico deve confrontarsi con problemi specifici: ad esempio l'utilizzo regolare ed esclusivo del letame come fertilizzante può essere fonte di rischio nella diffusione di patogeni enterici (3, 4) e l'assenza di trattamenti chimici finalizzati alla conservazione o alla disinfestazione dei cereali prodotti con metodo biologico può favorire la crescita di muffe tossigene. Nell'allevamento bovino, inoltre, la pratica dell'al-

lattamento naturale e la stabulazione del vitello con la madre, attuate allo scopo di migliorare il benessere animale, possono rappresentare un fattore di rischio per la trasmissione di agenti patogeni quali *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium avium paratuberculosis* nelle aziende in cui questi sono presenti (5). Inoltre, il mancato utilizzo di antibiotici per la prevenzione delle mastiti comporta un elevato numero di mastiti subcliniche dovute alla presenza, nella mammella, di patogeni contagiosi e un elevato numero di cellule somatiche (6).

Anche se sono stati evidenziati aspetti critici nell'allevamento biologico in letteratura non sono presenti molti studi sull'argomento. La qualità dei prodotti può essere influenzata dalle pratiche colturali e dalle condizioni atmosferiche anche nell'ambito del medesimo sistema produttivo. Quindi, senza un disegno sperimentale, è difficoltoso dimostrare che il livello qualitativo dei prodotti sia imputabile al metodo di produzione biologico o convenzionale.

Lo scopo dello studio è di valutare le differenze qualitative del latte prodotto mediante metodo di produzione biologico e convenzionale in alcune aziende campione con caratteristiche ambientali e di gestione comparabili.

## MATERIALI E METODI

Nello studio sono state comprese 10 aziende certificate con metodo di produzione biologico e 10 aziende convenzionali, nelle quali erano presenti in totale, rispettivamente, 362 e 246 vacche in lattazione. Nel corso dello studio sono stati registrati, in seguito a un sopralluogo presso ciascuna azienda, i seguenti parametri: il sistema di mungitura, l'adozione o meno della disinfezione "post-dipping", la tipologia di stabulazione (l'uso della lettiera, stabulazione fissa o libera, la disponibilità di paddok esterno e la presenza del pascolo). Le aziende erano localizzate in una valle Appenninica in provincia di Bologna e sono quindi esposte alle medesime condizioni climatiche e ambientali. Tutte le aziende utilizzavano, per l'alimentazione degli animali, foraggi e orzo di produzione aziendale. Tutte le aziende oggetto di rilevamento conferivano il latte allo stesso centro di raccolta ed erano inserite in un sistema di controllo qualità (7). In ciascuna azienda, settimanalmente, è stato prelevato un campione di latte di massa per il controllo qualità (cellule somatiche, carica batterica totale, tenore in grasso, proteine e lattosio, indice crioscopico). Nello studio sono stati utilizzati i risultati di 30 campionamenti effettuati nel periodo compreso tra luglio 2002 a febbraio 2003. La

contaminazione da Aflatossina M1 era stata valutata in un precedente campionamento effettuato da febbraio a dicembre 2001, prelevando mensilmente il latte delle stesse aziende riunito in pool negli automezzi di raccolta al momento dello scarico all'impianto di trattamento; il campionamento è stato condotto in modo da campionare tutto il latte proveniente dalle aziende oggetto dello studio; in totale sono stati analizzati 31 campioni di latte convenzionale (3 masse mensili + 1 campione) e 20 campioni di latte da produzione biologica (2 masse mensili).

I campioni di latte sono stati conservati a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  e analizzati entro 24 h dalla raccolta. Tutti i campioni sono stati analizzati presso lo stesso laboratorio, presso lo stabilimento di raccolta. Nello studio sono stati elaborati i parametri relativi a: Conta delle Cellule Somatiche (CCS), Conta Batterica Totale (CBT) e concentrazione di Aflatossina M1. La CCS è stata determinata con metodo citometria di flusso (Fossomatic 250, Foss Electric, Hillerod, Denmark). La CBT è stata determinata mediante citometria di flusso (Bactoscan FC100H, Foss Electric, Hillerod, Denmark). Il contenuto di Aflatossina M1 è stato valutato con metodo ELISA (Riedel-de-Haen ELISA-System Aflatoxin M1, Honeywell, Seelze, Germany) e i campioni nei quali è stata evidenziata una concentrazione superiore a 10 ng/ml sono stati analizzati con metodo HPLC (UNI EN 12955).

I dati continui sono stati categorizzati in quantili e riassunti in forma di tabelle, istogrammi e grafici a torta. I dati sono stati analizzati per verificare la presenza di una distribuzione normale e in tal caso analizzati con il test ANOVA, mentre i dati che non mostravano distribuzione normale sono stati analizzati con i test Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Le analisi statistiche sono state fatte con il software R 2.8.1 (r-project.org). Per ottenere una stima probabilistica della frequenza con cui il latte biologico e quello convenzionale prodotto in aziende di uno stesso territorio avevano una concentrazione irregolare di aflatossina M1, è stato sviluppato, in Excel®, un modello di secondo ordine per distribuzioni non-parametriche adattate ai dati (7) e la simulazione MonteCarlo è stata fatta impiegando il software @Risk 4.0.2 (Pasilisade Co., Newfield, NY, U.S.).

## RISULTATI

La dimensione media delle aziende convenzionali e biologiche era rispettivamente di 24 e 34 capi in lattazione. Le aziende biologiche partecipanti allo

studio sono risultate così suddivise in funzione del numero di capi in lattazione: 4 aziende con 10-25 capi, 4 aziende con 26-45 capi, 2 aziende con più di 45 capi; le aziende convenzionali ricadevano, in funzione del numero di capi in lattazione, nelle seguenti classi: 3 aziende con meno di 5 capi, 3 aziende con 10-25 capi, 3 aziende con 26-45 capi e 1 azienda con più di 45 capi. La quantità media giornaliera di latte prodotto era compresa tra 200 e 900 L per le aziende biologiche e tra 50 e 1500 L per le aziende convenzionali. Altri dati relativi alla gestione delle aziende sono riportati in Tabella 1.

Gli animali erano allevati a stabulazione libera in 7 aziende su 10 tra quelle che adottavano il metodo di produzione biologico e in 2 su 10 tra quelle con sistema di produzione convenzionale.

Tutte le aziende biologiche che utilizzavano la stabulazione libera erano dotate di sala di mungitura, mentre, tra le aziende di tipo convenzionale, una su due prevedeva la stabulazione libera (quella con più di 45 capi) e disponeva di sala di mungitura. Tutte le altre aziende utilizzavano il sistema di mungitura con lattodotto ad eccezione di una stalla di tipo convenzionale, con soli 2 capi, che utilizzava una mungitrice automatica portatile. Il pascolo non veniva utilizzato in nessuna azienda e le aziende biologiche godevano di una deroga temporanea per questo aspetto. Tutte le aziende utilizzavano la paglia come lettiera.

La rilevazione delle metrature a disposizione degli animali nelle aziende biologiche ha evidenziato che 3 aziende godevano di una deroga temporanea riguardo alla stabulazione degli animali. Per quanto riguarda le altre 7 aziende si è rilevato che i capi in lattazione avevano a disposizione una superficie coperta di 6-8 m<sup>2</sup>/capo (in 3 aziende) o superiore a 8 m<sup>2</sup>/capo (in 4 aziende). La superficie scoperta a disposizione degli animali era superiore a 6 m<sup>2</sup>/capo in 3 aziende e ridotta a 4,5-6 m<sup>2</sup>/capo in un'azienda.

Tutte le altre aziende, incluse quelle con gli animali a stabulazione fissa, non disponevano di spazi aperti.

La media geometrica di CCS nel latte di massa variava da 207.732/mL a 466.394/mL nelle aziende biologiche e tra 140.499/mL a 467.464/mL nelle aziende convenzionali. Dalla elaborazione sono stati esclusi i dati relativi alle aziende di tipo convenzionale più piccole (con 2-5 capi) che presentavano valori di CCS variabili tra 61.433/mL e 237.077/mL. La media dei valori di CCS nei ultimi 3 mesi analizzati ha dimostrato che 5 aziende biologiche su 10 e 3 aziende convenzionali su 10, superano il limite di 300.000 CCS. La stessa tendenza si riscontra nell'arco degli 8 mesi oggetto dello studio.

La media geometrica del valore CBT nel latte di massa variava tra 24.083/mL e 70.531/mL nelle aziende biologiche e tra 41.476/mL e 120.863/mL nelle aziende convenzionali. I dati relativi alle aziende convenzionali più piccole (2-5 capi) sono stati valutati separatamente e presentano valori compresi tra 21.206/mL e 240.297/mL.

I dati hanno evidenziato un tenore maggiore di CCS nelle aziende biologiche. Il test di Mann-Whitney ha mostrato che le aziende di tipo biologico avevano un latte qualitativamente peggiore ( $P = 0.00032$ ) con valori della mediana pari a 288.000/mL CCS nel latte biologico e 249.000/mL nel latte convenzionale.

L'analisi statistica dei dati ha indicato che il CCS è correlato al sistema di mungitura e alle dimensioni dell'azienda. Tra le aziende biologiche, quelle che utilizzavano la stabulazione fissa e il sistema di mungitura a lattodotto avevano un valore più elevato ( $P \leq 0.001$ ) di CCS rispetto a quelle che utilizzavano la stabulazione libera e la sala di mungitura, con valori di CCS rispettivamente di 426.244/mL e 316.171/mL. Tuttavia quando i dati dei campioni provenienti da aziende con differenti

Tabella 1 – Caratteristiche descrittive delle aziende

Convenzionali				Biologiche			
N° aziende	Sistema di mungitura	N° capi	Stabulazione	N° aziende	Sistema di mungitura	N° capi	Stabulazione
7	Lattodotto	127	Fissa	3	Lattodotto	96	Fissa*
1		40	Libera				
1	Sala	75	Libera	7	Sala	266	Libera
1	Manuale	4	Fissa				
Totale = 10		Totale = 246		Totale = 10		Totale = 362	

\* in deroga provvisoria

sistemi di mungitura erano raggruppati sulla base della pratica del post dipping, nelle aziende biologiche si riscontrava una qualità del latte uguale o superiore rispetto alle aziende di tipo convenzionale (Tabella 2).

I valori di CCS non erano correlati ai valori di CBT ma alle dimensioni dell'azienda e al sistema di mungitura (Figure 1a e 1b). Il test di Spearman ha evidenziato che correlazioni significative in relazione alle dimensioni e al sistema di mungitura sia per le aziende biologiche (R = -0.2985; P < 0.0001) che per le aziende convenzionali (R = -0.3632; P < 0.0001). Tra le aziende biologiche, quelle con più di 45 capi, mostravano un'elevata prevalenza di campioni con un alto livello di CCS (mediana = 440.050/mL), mentre nessuna differenza è stata riscontrata nelle aziende con 10-25 o 26-45 capi che adottavano la stabulazione libera e la sala di mungitura. Tra le aziende di tipo convenzionale, quelle con 1-5 capi (mediana = 154.500/mL) e 10-25 capi (mediana = 234.500/mL), mostravano un valore di CCS inferiore (P < 0.0001 con Kruskal-Wallis test) rispetto alle aziende con 26-45 capi (mediana = 347.000/mL) o con più di 45 capi (mediana = 442.500/mL). Nelle aziende biologiche si è riscontrata la correlazione tra il valore CCS e la dimensione della stalla: per le aziende con 10-45 vacche la

correlazione (Spearman R) tra numero di cellule somatiche (CCS) e dimensione degli spazi coperti per capo era pari a -3.255 (p <0.0001) e quella tra CCS e spazi non coperti per capo era pari a -3.074 (p<0.0001). Nella sostanza, le differenze erano dovute alle stalle di tipo biologico in deroga per le norme riguardanti l'impiego di posta fissa e che utilizzavano il sistema di mungitura con lattodotto senza applicare la disinfezione post-mungitura (post-dipping). Il latte biologico presentava un contenuto superiore di aflatossina M1 (43.40 ± 27.50 µg/kg) rispetto al latte convenzionale (26.60 ± 28.90 µg/kg). La distribuzione dell'aflatossina M1 nel latte biologico e convenzionale è stata valutata mediante un modello di distribuzione cumulativa di secondo grado per separare la variabilità dall'incertezza.

La probabilità di produrre un latte contaminato da aflatossina M1 oltre il limite di 50 g/kg previsto dal Reg. 1881/2006 CE (8) è risultata rispettivamente del 50.36% e del 15.48% per le aziende biologiche e convenzionali.

### CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Nel presente studio, è stato osservato che le aziende biologiche adottavano il sistema a stabula-

Tabella 2 - CCS (x 1000)/ml in aziende che adottano differenti sistemi di mungitura

<b>Aziende che adottano il sistema a lattodotto</b>										
post-dipping	Tipo	Aziende	N° capi	Media Geom.	Mediana	25° perc	75° perc	Min	Max	p
no	Bio	2	60	395	375	301	522	149	1188	.000
	Conv.	3	90	135	148	79	239	28	612	
si	Bio	1	30	254	186	158	246	104	2013	.014
	Conv.	5	150	267	283	190	390	18	796	
Tutte	Bio	3	90	340	319	208	454	104	2013	.000
	Conv.	8	240	239	239	135	348	18	796	

<b>Aziende che adottano la sala di mungitura</b>										
post-dipping	Tipo	Aziende	N° capi	Media Geom.	Mediana	25° perc	75° perc	Min	Max	p
no	Bio	2	60	210	204	150	305	94	485	---
	Conv.	---	---							
si	Bio	5	150	304	297	199	450	112	1170	
	Conv.	1	30	419	442	298	540	227	990	.005
Tutte	Bio	7	210	273	269	177	394	94	1170	.000
	Conv.	1	30	419	442	298	540	227	990	

<b>Tutte le aziende che adottano il post-dipping a prescindere dal sistema di mungitura</b>										
	Tipo	Aziende	N° capi	Media Geom.	Mediana	25° perc	75° perc	Min	Max	p
	Bio	6	180	295	271	183	440	104	2013	.506
	Conv.	6	180	288	309	212	439	18	990	

p (test Mann-Whitney); n.s. = non significativo  
 Bio= Biologico; Conv = Convenzionale

Figura 1a – Rappresentazione grafica del numero di cellule somatiche (espresse come CCS (x1000)/ml) nelle diverse tipologie aziendali con 10-45 capi in lattazione

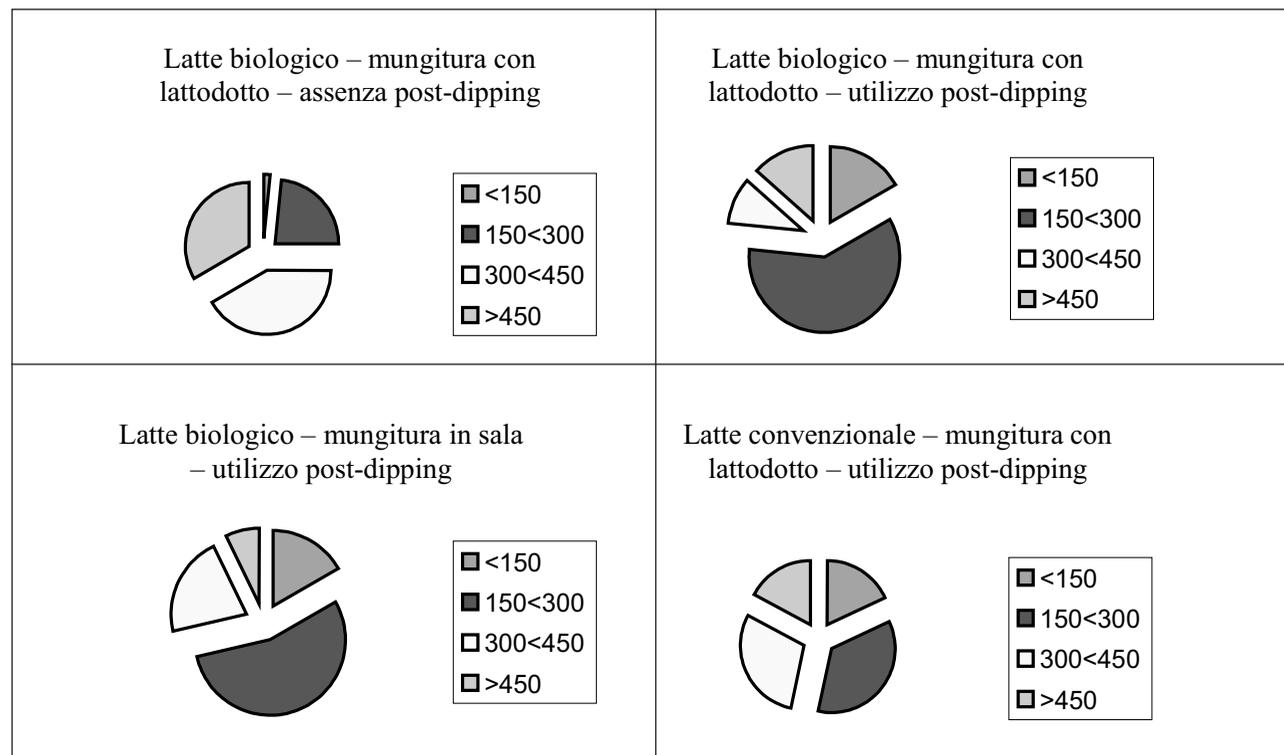
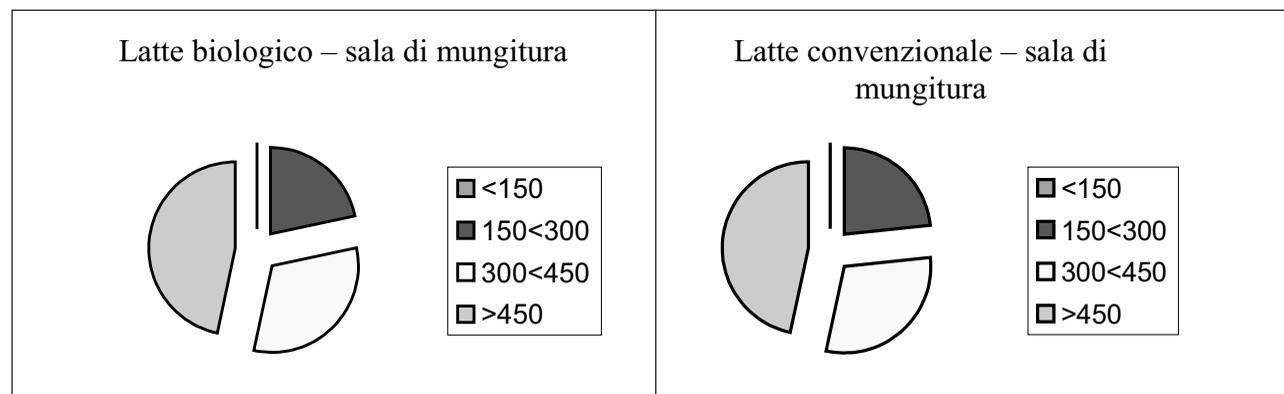


Figura 1b - Rappresentazione grafica del numero di cellule somatiche (espresse come CCS (x1000)/ml) nelle diverse tipologie aziendali con > 45 capi in lattazione.

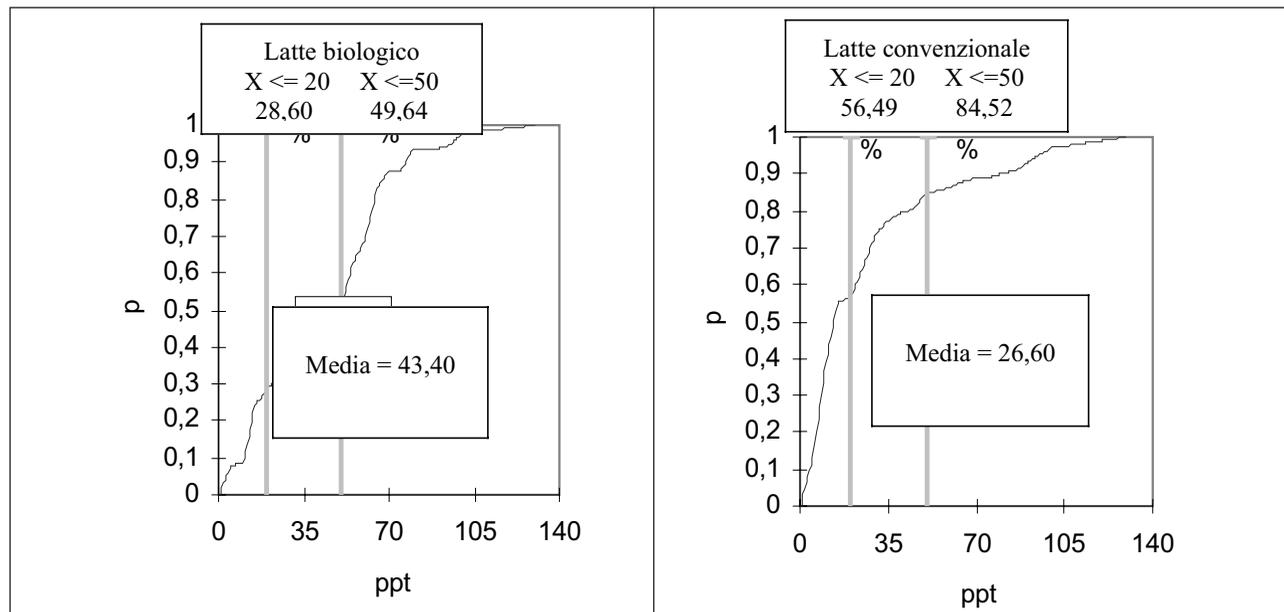


zione libera e, come conseguenza, utilizzavano la sala di mungitura, mentre le aziende di tipo convenzionale, in quell'area geografica, utilizzavano la stabulazione libera nel caso in cui il numero di capi fosse sufficientemente alto da rendere questo sistema conveniente dal punto di vista gestionale. Tra le aziende di tipo convenzionale prese in esame solo una, con 75 capi, utilizzava la stabulazione libera. È stato rilevato che le aziende con più di 45 capi avevano un valore di CCS più elevato e, secondo la nostra opinione, questo si può ricondurre a fattori tecnici e gestionali responsabili di un innalzamento

della prevalenza delle mastiti. Si è osservato che le aziende biologiche che adottavano la stabulazione fissa e il sistema di mungitura con lattodotto, presentavano una maggior prevalenza di mastiti subcliniche, ma che l'adozione del post-dipping si dimostrava efficace nella riduzione dell'incidenza di valori anomali di CCS in queste aziende. Questo ci ha permesso di concludere che un miglioramento delle misure igieniche permette di ridurre l'incidenza di mastiti nelle aziende che non eseguono trattamenti di profilassi.

I dati microbiologici sui singoli capi non sono

Figure 2 – Distribuzione cumulativa della concentrazione di Aflatossina M1 nel latte



stati presi in esame in questo studio e non permettono di dare indicazioni sull'eziologia delle mastiti. Si ritiene utile sottolineare che le aziende coinvolte nello studio facevano parte di un programma integrato di controllo qualità (9) nel quale il controllo dello stato sanitario della mammella e l'eventuale ricorso ai necessari trattamenti veniva costantemente applicato.

La produzione di micotossine nelle derrate alimentari è influenzata dalle condizioni climatiche (temperatura, umidità, anaerobiosi), ma può essere favorita anche da un'infestazione da parte di parassiti delle piante in campo (10). L'utilizzo di biocidi nelle fasi di stoccaggio successive alla raccolta può contribuire al controllo delle muffe tossigeniche. Le aziende biologiche, che riducono l'uso di pesticidi e biocidi, sono quindi esposte ad un rischio maggiore, rispetto alle aziende convenzionali, di produrre latte contaminato da un elevato livello di aflatossina M1.

**BIBLOGRAFIA**

1) European Commission, 2001. Regolamento (CE) n. 2491/2001 della Commissione, del 19 dicembre 2001, che modifica il regolamento (CEE) n. 2092/91 del Consiglio relativo al metodo di produzione biologico di prodotti agricoli e all'indicazione di tale metodo sui prodotti agricoli e sulle derrate alimentari. In: GU L 337 del 20.12.2001, pag. 9-17.

2) Sandrum, A., 2001. Organic farming. A critical review. *Livestock Production Science* 67: 207-215.

3) Nicholson, F.A., Hutchinson, M.L., Smith, K.A., Keevil C.W., Chambers B.J., Moore A., 2000. A study on farm manure applications to agricultural land and an assessment on the risk of pathogen transfer into the food chain. MAFF.

4) Tauxe, R.V., 1997. Does organic gardening foster food-borne pathogens? *Journal of American Medical Association* 277(21): 1680-1685.

5) Vaarst, M., Alban, L., Mogensen, L., Milan, S., Thamborg, Kristensen, E.S., 2001. Health and welfare in Danish dairy cattle in the transition to organic production: problems, priorities and perspectives. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 14: 367-390.

6) Busato, A., Trachsel, P., Schällibaum, M., Blum, J.W., 2000. Udder health factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. *Prev Vet Med* 44: 205-220.

7) Vose, D., 2001. Risk Analysis. 2nd Edition, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.

8) Serraino, A., Trevisani, M., Rosmini, R., 2002. Latte sotto controllo del sistema qualità. *Informatore Zootecnico* XLIX(5): 92-96.

9) Bottalico, A., 1999. Micotossine negli alimenti e possibile rischio per la salute umana, parte 1-aflatossine. *Igiene Moderna* 111(2): 133-169.