

● TEMPERATURE, MODALITÀ DI STOCCAGGIO E SOSTANZE PERICOLOSE

L'insilato, come far fronte agli organismi indesiderati

Rapido riempimento della trincea, corretta distribuzione della massa, attenta compattazione e rapida chiusura promuovono l'instaurarsi della fase anaerobia nell'insilato; un protrarsi eccessivo della fermentazione o temperature molto elevate possono danneggiare le proteine delle piante e renderle indisponibili per i batteri ruminanti e per l'assorbimento intestinale

di **Alessandro Fantini**

La qualità dei foraggi destinati alle vacche da latte è di fondamentale importanza e la possibilità di sostituzione con i concentrati si è rivelata nel tempo una scelta non priva di gravi effetti collaterali. Per qualità dei foraggi s'intende la loro digeribilità, o meglio la possibilità che hanno i microrganismi ruminanti di fermentarli più o meno completamente in molecole più semplici, e l'assenza di sostanze o organismi indesiderati. I foraggi rappresentano una parte importante della dieta della bovina in lattazione con un percentuale che può variare dal 60 al 30%.

Per come sta evolvendo nel mondo la popolazione umana e per come sta aumentando la domanda di cibo, gli alimenti destinati alle bovine da latte dovranno essere sempre meno in competizione con l'uomo. I foraggi, ricchi di fibra e azoto non proteico, rappresenteranno il focus d'interesse dei nutrizionisti dei ruminanti.

L'insilamento

È un metodo di conservazione basato sulla naturale fermentazione lattica in condizioni di anaerobiosi. Dal momento in cui il foraggio è raccolto e accumulato si svolgono una serie di reazioni biochimiche: il risultato è una

PERCHÉ SCEGLIERE UN INSILATO

Un foraggio insilato come la pianta del mais o dei cereali autunno-vernini o di leguminose e graminacee offre diversi vantaggi. I foraggi destinati all'insilamento possono essere raccolti al giusto stadio di maturazione, avere limitate perdite di conservazione ed essere più digeribili rispetto alla conservazione per essiccazione. Nel mondo gli insilati rappresentano dal 50% al 75% della dieta di una vacca da latte.

L'insilamento offre vantaggi nutritivi innegabili, ma essendo un percorso biochimico piuttosto complesso può causare un potenziale pericolo per l'alimentazione sia umana sia animale per i microrganismi e le sostanze tossiche che in essi si possono sviluppare. ●

massa che si conserva in condizione di anaerobiosi e ricca di acido lattico e quindi con un pH inferiore a 4. La fermentazione degli insilati avviene in tre fasi.

Fase aerobica

In questa fase il foraggio raccolto e opportunamente trinciato viene accumulato o in cumuli a terra o in trincee o in silos-bag o in rotoballe fasciate con materiali plastici. Questa operazione è molto delicata perché i passaggi cruciali sono la raccolta di piante con la più alta concentrazione di zuccheri possibile, il minore contenuto di terra e il rapido stoccaggio e chiusura con l'obiettivo, attraverso la compattazione, di eliminare quanto più ossigeno possibile. Durante questa fase i microrganismi aerobi presenti sulle piante come flora epifittica come batteri, muffe e lieviti attuano una «respirazione aerobia» utilizzando l'ossigeno residuo e gli zuccheri presenti. Al



In presenza di un'intensa attività di lieviti si altera il profilo fermentativo e la conseguenza è una diminuzione dell'ingestione dell'insilato

momento dell'insilamento si possono trovare specie come *Erwinia herbicola* e *Rahnella aquatilis* che dopo l'insilamento vengono rapidamente soppiantate da *Hafnia alvei*, *Escherichia coli* e *Serratia fonticola*. Sulla pianta del mais prima dell'insilamento è facile trovare *Pseudomonas syringae*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus buchneri* e *Rahnella aquatilis*. Nella fase aerobia si verifica una perdita di sostanza secca a causa della respirazione cellulare con produzione di CO₂, acqua e calore.

Dopo l'insilamento l'acidificazione progressiva è promossa dallo sviluppo di specie di batteriche che producono acido lattico. Una lunga fase aerobia, una lenta acidificazione e l'incorporazione di terreno nell'insilato possono agevolare lo sviluppo dei clostridi e incidentalmente far entrare le listerie. Alla fine della fase aerobia il pH dell'insilato di mais è circa 5 e la temperatura può raggiungere 32-40 °C. La fase aerobia se correttamente gestita dura da 3 a 5 giorni.

Fase anaerobica

Nella fase anaerobica si creano le condizioni ideali per i batteri che producono acido lattico che vengono classificati in specie omofermentative (cioè che producono quasi esclusivamente acido lattico) ed eterofermentative.

Tutti i batteri che producono acido lattico possono tollerare pH < 3,80. In questa fase aumenta la solubilità delle proteine e la digeribilità degli amidi e il pH scende al di sotto del 4,00 e la temperatura appare fredda al tatto.

In questa fase tutti i microrganismi a eccezione del *Lactobacillus buchneri*, diminuiscono la loro attività. I microrganismi che tollerano gli acidi e le loro spore possono rimanere inattivi. Batteri lattici omofermentativi come *Lactobacillus plantarum* e *L. curvatus* predominano nei buoni insilati.

Fase aerobia

Quando l'insilato viene aperto possono proliferare organismi aerobi considerati come muffe e lieviti e la temperatura rialzarsi nuovamente. Se l'insilato subisce questa fase aerobia le conseguenze sono delle profonde e gravi alterazioni della qualità. I lieviti appartengono alle specie epifitiche che normalmente si trovano in tutte le piante da insilare come la pianta intera di mais, i pastoni, i cereali autunno-ve-

TABELLA 1 - Valori massimi di micotossine negli alimenti destinati alla vacca da latte

Micotossina	Alimento	Massima concentrazione
Deossivalenolo o vomitossina (DON)	sottoprodotti del mais (1)	12 ppm
	cereali e prodotti a base (1) di cereali	8 ppm
	razione giornaliera (FDA) (2)	2 ppm
Zearalenone (ZEN)	razione giornaliera (FDA) (2)	25 ppm
	mangimi complementari e completi (1)	0,5 ppm
	cereali e prodotti a base di cereali (1)	2 ppm
Ocratossina A	sottoprodotti del mais (1)	3 ppm
	cereali e prodotti a base di cereali	0,25 ppm
Fumonisine B1 + B2 (FB)	razione giornaliera (FDA) (2)	50 ppm
	mais e prodotti derivati (1)	60 ppm
	mangimi complementari e completi (1)	50 ppm
T-2	razione giornaliera (FDA) (2)	0,5 ppm
Aflatossine	razione giornaliera (FDA) (2)	20 ppm
Aflatossina B1	mangimi complementari e completi (3)	5 ppm
	materie prime (3)	20 ppm

(1) Raccomandazione della Commissione europea del 17 agosto 2006 (2006/576 Ce) su pareri EFSA. (2) Raccomandazioni alimentari del Centro di medicina veterinaria della Food and drug administration (FDA) per le micotossine contenute nella razione giornaliera della vacca da latte (FDA). (3) Limite massimo ammesso negli alimenti destinati alla vacca in lattazione D.leg 149/2004.

rini, le **graminacee** e le **leguminose**. Le ultime due, **quando vengono raccolte e insilate a un'umidità inferiore al 50%, sono particolarmente a rischio per l'accumulo di acido butirrico.**

Organismi nocivi e loro metaboliti

Lieviti

I lieviti sono funghi formati da un unico tipo di cellula eucariota e sono anaerobi facoltativi. Tollerano gli acidi presenti negli insilati. Si tratta di organismi epifitici, che non si riproducono nella fase anaerobia ma rimangono metabolicamente attivi producendo calore, CO₂, etanolo (alcol), acido acetico, esteri e aldeidi. **All'apertura delle trincee con l'ingresso dell'ossigeno si riattiva il loro metabolismo** con la trasformazione in CO₂ e alcol dei carboidrati solubili in acqua. L'alcol è tossico per il fegato e riduce l'appetibilità dell'insilato.

Al momento dell'insilamento più del 90% dei lieviti presenti utilizzano zuccheri. Successivamente la stessa percentuale si sposta verso gli utilizzatori di lattato. **I loro metaboliti causano un innalzamento del pH e un ambiente favorevole ai batteri sporigeni e alle muffe.** I lieviti presenti all'insilamento sono specie non fermentative,

come *Cryptococcus*, *Rhadoral*, *Sporobolomyces* e *Torulopsis*. Durante la fase aerobia queste specie di lieviti producono acido acetico, calore e CO₂. Gli zuccheri residui possono essere utilizzati durante la fase anaerobica da specie di lieviti fermentative resistenti al pH basso come il *Sacchomyces* e alcuni *Torulopsis*.

La presenza di un'intensa attività dei lieviti nell'insilato, a causa di una presenza di ossigeno nella massa e di elevati residui di zuccheri, ne altera il profilo fermentativo per una concentrazione elevata di acido acetico. È bene ricordare che anche alcuni batteri come l'*Enterobacter* e gli eterofermentativi (responsabili della fermentazione eterolattica, con secrezioni composte per circa il 50% di acido lattico e 50% di altre sostanze) possono produrre **acido acetico. La predominanza di questo acido e delle altre sostanze prodotte dai lieviti possono causare una riduzione d'ingestione sia dell'insilato sia dell'intera razione. L'attività dei lieviti innalza il pH dell'insilato favorendo la crescita delle muffe.**

Muffe

Oltre ai lieviti, in queste condizioni si possono sviluppare le muffe che sono un tipo di funghi pluricellulari che si riproducono per mezzo di spore e, co-

me i lieviti, sono microrganismi aerobi ossia che per riprodursi hanno necessità dell'ossigeno. Negli insilati si possono riscontrare più frequentemente i generi *Penicillium* (70%), *Fusarium* (47%) e *Aspergillus* (34%).

Molte muffe producono come prodotto terminale le micotossine che residuano negli insilati anche quando esse sono scomparse. Ad esempio, le muffe del genere *Fusarium* sono in grado di produrre 20 micotossine diverse tra le quali deossinivalenolo o vomitossina, zearalenone, fumonisina e tossina T2. Tutte esercitano un'azione negativa sulla salute di chi le ingerisce (tabella 1).

Muffe del genere *Aspergillus*, invece, producono le **aflatossine**, che sono molto pericolose per la salute umana e animale. Il colore di queste muffe è giallo verdastro. Le muffe non crescono in condizioni di anaerobiosi e pH basso. È possibile che le muffe producano micotossine addizionali in condizioni di presenza di ossigeno, piante troppo secche e nelle condizioni d'impropria compattazione. L'ocratossina A è un micotossina prodotta da muffe sia del genere *Aspergillus* sia *Penicillium* ed è nefrotossica.

Le muffe del genere *Penicillium* hanno un caratteristico colore verde bluastrò. Le muffe di colore rosso sono in genere causate dal genere *Fusarium*. Nell'insilato di mais sono state isolate ben 300 micotossine diverse, ma solo poche hanno effetti significativi sulla salute degli uomini e degli animali.

Dal 70 al 90% delle micotossine sono presenti sulle piante prima dell'insilamento. Acidi e inoculi non sono in grado di degradare le micotossine. Esistono delle condizioni climatiche che agevolano la crescita di una muffa rispetto a un'altra. Ad esempio l'*Aspergillus* predilige una temperatura superiore ai 33 °C e la presenza contemporanea di uno stress idrico mentre il *Fusarium* tra i 27 °C e i 29 °C.

L'esposizione cronica a bassi livelli di micotossine non provoca sintomi specifici ma alterazioni del sistema immunitario, e sbilanci ormonali e metabolici. I ruminanti sono protetti meglio degli altri animali dalle micotossine per la capacità di biotrasformazione delle stesse a opera di certi protozoi ciliati presenti nel ruminante.

Tuttavia diete ricche d'insilato di mais e concentrati creano una condizione ruminale di pH piuttosto basso che aumenta l'assorbimento del-

ALTERAZIONI PERICOLOSE

Un protrarsi eccessivo della fase di fermentazione o temperature molto elevate che l'insilato può raggiungere durante la fase aerobia possono danneggiare le proteine delle piante e renderle indisponibili sia per i batteri ruminanti sia per l'assorbimento intestinale degli aminoacidi.

Queste proteine danneggiate dal calore, anche dette «bound», si sviluppano quanto la temperatura di fermentazione supera i 55 °C. La minore digeribilità di questa frazione è dovuta alla reazione di Maillard, che consiste in una serie complessa di fenomeni dovuta alla «cottura» di proteine e zuccheri contemporaneamente. Gli insilati surriscaldati anche detti «tabaccati» risultano molto appetibili, ma i prodotti della reazione di Maillard possono alterare il delicato equilibrio del colon della vacca da latte.

In laboratorio la presenza di queste proteine danneggiate dal calore si rileva facilmente. In tutti gli insilati, ma specialmente in quelli ad alto contenuto proteico come l'insilato

di leguminose, è possibile isolare le amine biogene che possono derivare da ogni aminoacido: dall'arginina la putrescina, dalla lisina la cadaverina e dalla tirosina la tiramina.

La putrescina è uno dei fattori causali la chetosi, unitamente all'ingestione di alte dosi di acido butirrico: 100 g al giorno di questa amina biogena possono causare nella vacca da latte anoressia. L'istamina di provenienza ruminale può essere assorbita dall'epitelio del ruminante danneggiato dall'eccessiva acidità ed è causa dell'istaminosi sistemica tipica negli episodi di acidosi ruminale.

Le amine biogene sono ritenute una presenza indesiderata negli insilati in quanto provocano ridotta appetibilità. In una ricerca effettuata da Steidlova e Kalac (2002) in 51 campioni di insilato di mais sono state isolate mediamente 145 ppm di tiramina, 136 ppm di putrescina, 96,2 ppm di cadaverina, 37,9 ppm di spermidina, 3 ppm d'istamina, 2,8 ppm di spermina e 2,5 ppm di triptamina. ●

le micotossine a causa di una minore detossificazione ruminale. Per l'aflatossina B1 prodotta dall'*Aspergillus flavus* esiste una regolamentazione a se stante, come per la M1 che in Europa la legge limita a 50 ppt di aflatossina M1 nel latte.

Batteri

I batteri produttori di acido butirrico (Bab) come *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium butyricum* e *Bacillus cereus* sono gram-positivi sporigeni, anaerobi, e **possono contaminare gli insilati quando in esso viene inclusa la terra al momento dello stoccaggio.**

Sono abili a trasformare l'acido lattico in acido butirrico, H⁺ e CO₂ anche a un pH relativamente basso. La crescita dei batteri produttori di acido butirrico causa un aumento del pH favorendo la crescita di specie batteriche meno acido-resistenti.

Bacillus cereus. Può causare nell'uomo intossicazioni alimentari a causa della sua spora, che può resistere alla maggior parte dei metodi di risanamento dei prodotti lattiero-caseari.

Produce due tipi di tossine: una a effetto emetico responsabile del vomito e un'enterotossina che da diarrea e dolori addominali. La sintomatologia è molto simile a quella causata dagli Stafilococchi.

Botulinum. Si può trovare in insilati d'erba che hanno un pH > 5,5 occasionalmente contaminati da carcasse di animali. La sintomatologia nei bovini è piuttosto grave, caratterizzata inizialmente da disappetenza e debolezza muscolare. Successivamente si osserva decubito, con paralisi motoria di tutti e quattro gli arti. Nella fase terminale si riscontra una grave depressione, respiro addominale e disfagia. **La morte può sopraggiungere dopo 24-48 ore dall'inizio della sintomatologia.**

Listeria. Batterio potenzialmente pericoloso che può essere riscontrato negli insilati alterati. Si conoscono diversi tipi di *Listeria*, ma a causare la listeriosi è *Listeria monocytogenes* (gram-positivo non sporigeno) responsabile della sintomatologia caratterizzata da encefalite, aborto e setticemia. Questa *Listeria* prende questo nome perché una

sua infezione è caratterizzata da un aumento notevole dei monociti circolanti nell'uomo. È stata isolata in più del 6% di campioni di insilati d'erba e di mais analizzati nel corso di specifiche ricerche. **Un insilato con un pH > 4,5 è considerato a rischio per questa grave infezione. Questo batterio resiste da 1 a 18 mesi nelle feci e da 1 a 2 anni nel terreno e per questo viene anche definito idrotellurico.** La listeriosi compare nei bovini **soprattutto nei mesi invernali** dopo l'infezione tramite l'ingestione e la respirazione del batterio presente nell'insilato. Una volta giunto nell'intestino può dare enterite e successivamente trasferirsi nel circolo sanguigno (batteriemia) causando una meningocelalite, setticemia e aborti dal 4° all'8° mese. La listeriosi è considerata una zoonosi in quanto l'uomo si può infettare attraverso alimenti contaminati come il latte e formaggi prodotti senza previa pastorizzazione.

Tossine shiga. Si tratta di tossine prodotte dal batterio *Shigella dysenteriae* appartenente al gruppo shigatossigenico dell'*Escherichia coli*. Rappresenta un grave rischio per l'uomo e per gli animali da parte di insilati mal conservati. È possibile isolare questi batteri negli insilati mal conservati. L'intossicazione nell'uomo da parte di queste tossine provoca la sindrome emolitico-uremica dovuta all'ingestione di

alimenti come la carne o il latte contaminate da feci bovine contenenti il batterio. Nell'uomo e soprattutto nei bambini la tossina provoca diarrea, anemia emolitica, trombocitopenia e insufficienza renale acuta. La mortalità è piuttosto elevata (5-10%) e nei pazienti che sopravvivono si può sviluppare un'insufficienza renale cronica. **In Italia fino al 2010 sono stati diagnosticati 710 casi di sindrome emolitica-uremica.**

Negli insilati alterati con un pH elevato è possibile isolare anche *Yersinia enterocolitica* classificata come zoonosi, *Campylobacter* e *Salmonella*.

Nitrati e nitriti

L'intossicazione da nitrati. I nitrati o meglio lo ione nitrato (NO_3^-) è il principale precursore delle proteine vegetali. Questa molecola è abbondantemente presente nei terreni, specialmente in quelli dove si applica un'intensa concimazione azotata o dove si distribuiscono intense quantità di liquami.

Una volta che le essenze foraggere assorbono i nitrati dal terreno l'azoto che lo compone viene utilizzato per la sintesi delle proteine. Molteplici fattori intervengono nell'accumulo di nitrati negli alimenti destinati alle bovine. Ci sono specie come il mais, il sorgo e l'avena che hanno una fisiologica lentezza in questa conversione. Fattori ambientali come la siccità, la scarsa insolazione e le basse temperature possono rallentare o non permettere il completamento di questa conversione. Anche carenze minerali specifiche possono causare l'accumulo di nitrati nei foraggi. All'interno del ruminante i nitrati vengono convertiti in nitriti e successivamente in ammoniaca, la quale può essere utilizzata come nutrimento della biomassa ruminale.

Quando l'apporto di nitrati dall'acqua e degli alimenti è eccessivo i nitriti

possono essere assorbiti dal ruminante e andare in circolo e legarsi con l'emoglobina. Più specificatamente i nitriti, o meglio l'azoto in essi contenuto, competono nell'emoglobina con l'ossigeno in essa legato con legame reversibile. L'emoglobina ha la funzione di distribuire l'ossigeno a tutti i tessuti dell'organismo. L'emoglobina che invece di trasportare l'ossigeno veicola l'azoto si chiama metaemoglobina e in condizioni normali è il 2-3% dell'emoglobina, ed è presente nel sangue normalmente dagli 80 ai 150 grammi/litro.

Nell'intossicazione da nitriti. Questo tipo di intossicazione decorre in forma clinica: la metaemoglobina (molecola di emoglobina in cui l'atomo di ferro contenuto nei 4 gruppi eme è stato ossidato; il cambiamento dello stato di ossidazione priva la molecola della sua capacità di legare reversibilmente l'ossigeno, e quindi perde anche la sua funzione fisiologica di trasporto dello stesso) può arrivare al 40-50% dell'emoglobina totale, mettendo in seria difficoltà il trasporto di ossigeno ai tessuti. In questo caso la bovina esibisce una **sintomatologia caratterizzata da sangue scuro, mucose decolorate e vagina scura. Gli animali si presentano assottigliati, con andatura barcollante con spasmi muscolari e respiro accelerato.** Molto più frequente è il decorso subclinico dell'intossicazione da nitriti con rischi elevati per la sopravvivenza dell'embrione e del feto a causa dello scarso apporto dell'ossigeno per l'alto rapporto metaemoglobina/emoglobina.

Esistono condizioni che si possono verificare nel ruminante favorevoli a una più rapida conversione dei nitriti in ammoniaca, come le diete ricche di carboidrati fermentescibili e con livelli medio-alti di proteine. Si è stabilito che l'intossicazione da nitriti si può verificare quando essi superano il valore dell'1-2% della sostanza secca della razione, ossia con ingestioni giornaliere di quantità superiori a 200-250 grammi.

In ogni caso, è la misurazione della concentrazione di metaemoglobina il parametro diagnostico più importante. Nei certificati di analisi degli alimenti o dell'acqua si possono trovare i valori analitici espressi come nitriti oppure come azoto da nitriti. In quest'ultimo caso per convertirlo a nitriti basta moltiplicare il valore per 4,4.

FASE ANAEROBICA

- pH < 4,00 = condizione ideale per i batteri lattici
- Tutti i microrganismi diminuiscono attività a eccezione di *Lactobacillus buchneri*
- I batteri lattici omofermentativi (cioè il 90% del prodotto della fermentazione è acido lattico) predominano nei buoni insilati



