

PROVA DI EFFICACIA DI UN PRODOTTO IGIENIZZANTE DI NUOVA CONCEZIONE NEL CONTROLLO DI *Staphylococcus* spp. e Coliformi NELLA LETTIERA DI BOVINI BIOLOGICI DI RAZZA CHIANINA: PRIMI RISULTATI

Casagrande Proietti P., Franceschini R., Pennacchi M., Tacconi G.

Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie - Università di Perugia - Facoltà di Medicina Veterinaria, Via S. Costanzo, 4 - 06126 - Perugia, Italia

RIASSUNTO - Prove di campo sono state effettuate su campioni di lettiera prelevati in 2 box (T, trattato e C, controllo) di bovini da carne, di razza Chianina allevati con metodo biologico, per valutare l'efficacia di un prodotto igienizzante di nuova concezione (SOP[®] C COW), nel controllare le concentrazioni di *Staphylococcus* spp., e Coliformi.

I risultati delle prove effettuate nei campioni prelevati fino a Novembre 2004 hanno mostrato una significativa riduzione dei valori medi delle concentrazioni di *Staphylococcus* spp., e Coliformi riscontrate nei campioni di lettiera trattata rispetto ai controlli (P = 0,089927, nel caso di *Staphylococcus* spp e P = 0,05558 nel caso dei Coliformi).

La identificazione biochimica dei Coliformi ha evidenziato la presenza di *Escherichia coli* (*E. coli*) solamente nella lettiera del box C.

PAROLE CHIAVE: Additivo per lettieri, Ambiente, Bovini biologici, *Staphylococcus* spp., coliformi.

INTRODUZIONE

L'attuale corso della zootecnia risente della spinta dell'opinione pubblica, sempre più sensibile alle problematiche riguardanti sia la necessità di ottimizzare il benessere e la salute degli animali sia la tutela dell'ambiente da rischi di contaminazioni biologiche e chimico-fisiche. Ciò ha suggerito il ritorno alle pratiche più tradizionali di allevamento in grado di soddisfare tali condizioni. L'introduzione del metodo biologico, con un disciplinare che impone particolari tipologie di intervento, privilegia la prevenzione quale forma migliore per favorire la resistenza naturale degli animali alle malattie. In questo contesto l'applicazione di rigorose tutele igieniche a livello ambientale, ritenute un mezzo sicuramente valido nella prevenzione delle malattie infettive ed infestive a carattere diffusivo negli allevamenti intensivi convenzionali, assume importanza determinante nel sistema biologico. Potenziare sia la resistenza degli animali alle malattie sia le misure di prevenzione determina in conseguenza una riduzione dei problemi di salute che in condizioni di campo sono spesso associati alla igiene della lettiera.

La lettiera è considerata infatti una delle principali fonti di contaminazione biologica e chimico-fisica negli allevamenti intensivi convenzionali tanto da rendere necessari trattamenti per tenere sotto controllo tali contaminanti (Ivanov, 2001). A tale riguardo sono stati introdotti, da tempo, sul mercato dei prodotti (Parkhurst *et al.*, 1974; Reece *et al.*, 1979; Huff *et al.*, 1984; Malone, 1987) la cui azione ha dato risultati incoraggianti a proseguire nella ricerca e a migliorare ulteriormente la loro efficacia. Lo scopo di questo lavoro è stato perciò di valutare l'efficacia di un prodotto igienizzante di nuova concezione, nel controllo di alcune componenti batteriche, come *Staphylococcus* spp. e Coliformi, della lettiera di bovini da carne allevati con metodo biologico.

MATERIALI E METODI

Programma: Lo studio si riferisce ad una prova di campo condotta in un allevamento di vitelloni di razza Chianina allevati con metodo biologico ed iniziata a partire da Giugno 2004. Tale prova prevede nel corso di un anno il controllo microbiologico di campioni di lettiera

prelevati, ad intervalli regolari, in due box contrassegnati con le sigle T (Trattato) e C (Controllo). Ciascuno dei due box, con libero accesso a paddock esterni, ha dimensioni di 50 m², alloggia 7 bovini della stessa età, 15 mesi (all'inizio della prova), ed alimentati nello stesso modo. La lettiera è costituita da uno strato di 20 cm di paglia di frumento.

Trattamento della lettiera: Nel box T la lettiera è stata cosparsa di un additivo in polvere secondo il seguente piano: nel primo mese è stato impiegato SOP[®] C CALF due volte a settimana alla dose di 15 grammi di prodotto/400 grammi di Carbonato di Calcio/quintale di peso vivo; successivamente è stato impiegato SOP[®] C COW una volta a settimana alla dose di 10 grammi di prodotto/250 grammi di Carbonato di Calcio/per capo, dose da mantenere fino alla fine della prova.

Additivo:- Il prodotto è costituito da solfato di Calcio ed oli essenziali (citronella e lavanda). Per mezzo del SIRIO OPERATING PROCESS[®] i componenti del prodotto sono stati attivati tramite un processo di modulazione energetica ed arricchiti con ossigeno ed informazioni relative ai componenti della lettiera.

Campioni: La lettiera è stata prelevata con cadenze regolari ogni 20 giorni; campioni di circa 1,5 kg di lettiera sono stati prelevati da 5 differenti punti, in ciascuno dei due box ed introdotti in buste di plastica sterili, sigillate, mantenute a basse temperature fino al momento dell'esecuzione dell'esame microbiologico.

Analisi microbiologiche: Venticinque grammi di ciascun campione di lettiera sono stati trasferiti in buste di plastica sterili con l'aggiunta di 225 ml di "Buffered Peptone Water" all'1%. Dopo l'omogenizzazione con "Stomacher[®] 400 Circulator (P.B.I., Milano) i campioni sono stati lasciati per 30-45 minuti a temperatura ambiente ed agitati con regolare frequenza. Dai campioni ottenuti è stato prelevato 1 ml che è poi stato diluito serialmente (da 10⁻¹ a 10⁻⁸) secondo il fattore 10; successivamente 0,1 ml di ciascuna diluizione è stato seminato su piastre, in doppio, contenenti il terreno Baird Parker Agar (BPA) per la ricerca di *Staphylococcus* spp., e su piastre contenenti Violet Red Bile Agar (VRBA) per la ricerca di Coliformi. Le colture sono state incubate ad una temperatura di 37°C per 24-48h, al termine delle quali è stato eseguito il conteggio delle colonie.

E' stata effettuata, inoltre, la identificazione biochimica dei Coliformi, mediante il test API 20E (Biomerieux).

Analisi statistica: La valutazione dei dati è stata effettuata mettendo a confronto i valori medi, dei parametri valutati nei due box (T e C), con il "t-test".

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati del controllo microbiologico effettuato sui campioni di lettiera del box T e del box C nel periodo Giugno-Novembre 2004 sono riportati nella Tabella 1.

Dal suo esame emerge che:

i valori medi, delle concentrazioni di *Staphylococcus* spp. e di Coliformi, presenti nella lettiera del box T sono inferiori a quelli del box C;

sottoponendo a confronto le medie dei valori dei box T e C, mediante applicazione del t-test è risultato un valore di $P = 0,089927$ nel caso di *Staphylococcus* spp. e $P = 0,05558$ nel caso dei Coliformi; le stesse differenze in termini di percentuale di riduzione indicano diminuzioni pari a 39% e 50% rispettivamente delle concentrazioni di *Staphylococcus* spp. e dei Coliformi del box T rispetto a C; la identificazione biochimica dei Coliformi isolati nel box T e C ha evidenziato la presenza di *E.coli* solamente nel box C.

Questi primi risultati sembrano indicare un effetto positivo del trattamento, effettuato sulla lettiera del box T, nel ridurre le concentrazioni di *Staphylococcus* spp. e di Coliformi. Numerosi potenziali patogeni (batteri, virus, protozoi, etc.) sia per gli animali (Kirk, 2000) che per l'uomo (Caprioli *et al.*, 2004), sono stati riscontrati nella lettiera e nel letame di bovini allevati con metodo convenzionale.

Staphylococcus spp. ed *E.coli* risultano ampiamente diffusi nell'ambiente di allevamento intensivo (Ruffo, 1998); in particolare *E.coli* è stato riscontrato nelle feci di bovini sani (Lynn *et al.*, 1998; Ruffo, 1998; Kirk, 2000; Orr, 2000; Russell, 2001; Lau & Ingham, 2001), dove può persistere per diverse settimane nel terreno (Jiang *et al.*, 2002; Gagliardi & Karns, 2002); tuttavia la loro successiva proliferazione dipende dalla possibilità dei microrganismi a reinfettare il tratto gastrointestinale mediante l'acqua (Johnson *et al.*, 2003) e gli alimenti contaminati (Russell & Jarvis, 2001). Inoltre molti sierotipi di *E.coli* sono patogeni per l'uomo ed altri sierotipi ancora producono tossine ed altri fattori di virulenza. E' da sottolineare inoltre che tali microrganismi, e più in particolare il sierotipo O157:H7, spesso presenti in bovini adulti senza sintomi clinici di malattia, possono contaminare i vitelli al macello con le feci (Russell & Jarvis, 2001).

CONCLUSIONI

Il controllo di *Staphylococcus* spp. e di *E.coli* nella lettiera di bovini biologici è essenziale per migliorare la salute degli animali e la salubrità degli alimenti di origine animale.

La significativa riduzione della concentrazione di *Staphylococcus* spp. e l'assenza di *E.coli* nella lettiera del box T se confermate nel corso dei successivi controlli possono rappresentare un traguardo interessante per la lotta contro la sopravvivenza di tali microrganismi nella lettiera.

Tabella 1 - Risultati relativi alle concentrazioni di *Staph.* spp. e Coliformi in campioni di lettiera, di bovini biologici, prelevati dai box T (Trattato) e C (Controllo) (i valori medi dei 9 pool sono espressi in UFC/g).

μ = media; % = riduzione della concentrazione microbica; μ = media ; % = *reduced microbial concentration*; ogni pool è composto da 5 campioni; *each pool consisted of 3 samples*.

Table 1 - Results of *Staph.* spp. and Coliforms concentrations in organic bovine litter samples from the box T (treated) and C (control) (mean value of 9 pool are expressed in CFU/g).

| <i>Staphylococcus</i> spp. (10 ⁷) | μ | Coliformi (10 ³) | μ |
|---|----------|---|---------|
| Trattato <i>Treated</i> | 28.90 | Trattato <i>Treated</i> | 48.89 |
| Controllo <i>Control</i> | 45.71 | Controllo <i>Control</i> | 97.37 |
| T test | 0.089927 | T test | 0.05558 |
| % di riduzione T/C <i>% of reduction T/C</i> | -39 | % di riduzione T/C <i>% of reduction T/C</i> | -50 |

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Ditta SOP[®] S.r.l. sia per avere fornito il prodotto impiegato nel presente studio e per il finanziamento del progetto di ricerca.

BIBLIOGRAFIA – REFERENCES

- Caprioli A. Luzzi I., Lana S. 2004. Istituto Superiore di Sanità. Roma.
- Gagliardi J.V., Karns j.s. 2002. *Environ Microbiol.*, 4(2):89-96.
- Huff W.E., Malone G.G.W., Chaloupka G.W. 1984. *Poultry Science*, 63:2167-2171.
- Ivanov I.E. 2001. *Research in Veterinary Science*, 70,169-173.
- Jiang X., Morgan J., Doyle M.P. 2002. *App. Environ. Microbiol.*, 68(5):2605-2609.
- Johnson J.Y., Thomas J.E., Graham T.A., Townshend I., Byrne J., Selinger L.B., Gannong V.P. 2003. *Can. J. Microbiol.*, 49(5):326-335.
- Kirk J.H. 2000. http://www.vetmed.nedavis.edu/vetext/inf-da/inf-da_heartland.html-22k.
- Lau M.M., Ingham S.C. 2001. *Letters in applied microbiology*, 33:131-136.

- Lynn T.V., Hancock D.D., Besser T.E., Harrison J.H., Rice D.H., Stewart N., Rowan L.L. 1998. J. Dairy Sci., 81(4):1102-1108.
- Malone G.W. 1987. Proceedings of the 22nd meeting on poultry health and condemnations, Ocean City, MD.
- Ogden L.D., Fenlon D.R., Vinten A.J., Lewis D. 2001. Int. J. Food Microbiol., 66(1-2):111-117.
- Orr r. 2000. <http://www.foodsafetynetwork.ca/animal/prevalence-o157-cattle.htm>.
- Parkhust C.R., Hamilton P.B., Baughman c.r. 1974. Poultry Science, 53:801-806.
- Reece F.N., Bates B.J., Lott B.D. 1979. Poultry Science, 58:754-755.
- Farina R., Scatozza F. Trattato di malattie infettive degli animali. Utet – Torino pp. 115-142, 1998.
- Farina R., Scatozza F. Trattato di malattie infettive degli animali. Utet – Torino pp. 243-254, 1998.
- Russell J.B., Jarvis G.N. 2001. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 3(2):265-272.

EVALUATION OF AN ADDITIVE EFFICACY IN THE CONTROL OF LITTER *Staphylococcus* spp. AND COLIFORM LEVELS: PRELIMINARY RESULTS OF A FIELD TRIAL IN ORGANIC CHIANTINA BEEF CATTLE

Casagrande Proietti P., Franceschini R., Pennacchi M., Tacconi G.

ABSTRACT - The present study was conducted to evaluate in field the efficacy of an additive (SOP[®] C COW), as an agent for the control of some micro-organisms in bovine litter. The *Staphylococcus* species (spp.), and Coliforms concentrations, in litter samples of both the boxes, T (Treated) and C (Control) selected, were determined, and also the Coliforms isolated were identified. The results observed in the litter sampled in box T and C until November 2004 showed a significant concentration reduction of *Staphylococcus* spp., (P = 0.089927, and Coliforms, P = 0.05558) than the control C. The biochemical identification of Coliforms isolated showed *Escherichia coli* (*E. coli*) only in litter sampled in the box C.

KEYWORDS: Litter additive, Environment, Organic bovine, *Staphylococcus* species (spp.), Coliforms.

INTRODUCTION

In the recent years the intensive livestock increased human susceptibility both to the animal-related welfare and health, and the environmental safeguard from biological and chemico-physical contamination risk. The development of organic livestock systems promote special positive health and vitality, ensuring the proper control of diseases and the encouragement of positive animal welfare. In this contest the development of a pattern of health building, considered to be an important tool for infectious disease prevention in the intensive conventional system play major role in organic livestock systems, in that all the disease control measures appropriate to the particular circumstances of the individual farm, allow for the evolution of a farming system progressively less dependent on allopathic veterinary medicinal products. Encouraging strong resistance to disease and prevention of infections reduces consequently most of the health problems that in field conditions are often known to be associated with the hygiene of the litter.

Litter is considered one of the major sources of pollutants in animal houses, then the need to ménage it using additives has been considered since the past years (Parkhust *et al.*, 1974; Reece *et al.*, 1979; Huff *et al.*, 1984; Malone, 1987 Ivanov, 2001). The present study investigated the

efficacy of an additive as an agent for the control of *Staphylococcus* spp. and Coliformes in organic bovine litter.

MATERIALS AND METHODS

Planning: This study was planned from June 2004 to June 2005, and was conducted in a farm, in which Chianina beef cattle are reared with the organic method. For the field trial two boxes where n.7 beef/each were reared, at the same conditions for age (15 months, feed, and density, have been selected; the boxes make permit the animals the free access to external paddocks. The litter was cut wheat straw (about 20-25 centimetres thick).

Treatment: Litter in box T was treated as follow: 15 g. of SOP[®] C CALF plus 400 g. of Calcium Carbonate/1 q. l.w., twice a week during the first month; after 10 g. of SOP[®] C COW plus 250 g. of Calcium Carbonate/per cow once a week until the end of the study.

Additive: The field trials were performed with Calcium sulphate (gypsum) and essential oils (lemon grass and lavender) used as carriers. By the SIRIO OPERATING PROCESS[®] method such components are activated by an energetic modulation process and enriched with oxygen and specific information about litter components.

Samples: Composite litter samples of about 1.5 kg. were obtained every twenty days from five different sites within each box and placed immediately into sterile plastic bags, sealed and refrigerated until microbiological evaluation was made.

Microbiological analysis: Twenty-five grams of each sample was transferred into a sterile plastic bag and 225 ml of sterile 1% buffered peptone water was added. After treatment with Stomacker[®] 400 Circulator (P.B.I., Milan) the samples were allowed to sit for 30-45 min at room temperature with frequent shaking. One ml of this samples (1:10 dilution) was diluted serially via 10-fold dilutions (from 10⁻¹ to 10⁻⁸). *Staphylococcus* spp., and Coliforms in 1 g. of litter were determined by plating, in duplicated, 0.1-ml of appropriate dilution on BPA (Baird Parker Agar) and VRBA (Violet Red Bile Agar). The cultures were incubated at 37°C for 24-48 hr and the number of grown colonies was determined. Lactose fermenting colonies were biochemically identified by API 20E tests (Biomerieux).

Statistical Analysis: The mean values of all parameters evaluated were compared by t-test.

RESULTS AND DISCUSSION

The results from the litter sampled until November 2004 are summarised in Table 1.

The mean levels of *Staphylococcus* spp. and Coliforms in litter in box T were lower than in the box C;

Significant differences between experimental and control samples with regard both the microbial cell counts (*Staphylococcus* spp. and Coliforms) were observed P = 0.089927 for *Staphylococcus* spp. e P = 0.05558 nel caso dei Coliformi;

the bacterial counts of the treated litter were reduced to about 39-50% of the control values;

4) *E. coli* (*E. coli*) was isolated only in control litter sampled.

These first results suggest the additive efficacy in the *Staphylococcus* spp. and Coliforms control in the litter of the box T.

In fact many potential pathogens (bacteria, virus, protozoa, etc.) for livestock (Kirk, 2000) as well as humans (Caprioli *et al.*, 2004). can be found in manure of conventional intensive cattle. *Staphylococcus* spp. and *E. coli* organisms are widely distributed in feedlot cattle populations (Lynn *et al.*, 1998; Ruffo, 1998; Kirk, 2000; Orr, 2000; Russell, 2001; Lau & Ingham, 2001). In particular *E. coli* organisms in the faecal material and soil they can survive for long time (Jiang *et al.*, 2002; Gagliardi & Karns, 2002), (Jiang *et al.*, 2002; Gagliardi & Karns, 2002); but subsequent proliferation is dependent on its ability to re-enter the gastrointestinal tract via contaminated water (Johnson *et al.*, 2003) and food (Russell & Jarvis, 2001). Most strains of *E. coli* can cause human diseases, and some strains produce toxins and other virulenced factors.

Mature cattle carry *E. coli* O157:H7 without showing signs of infection, and beef can be contaminated with cattle faeces at slaughter (Russell & Jarvis, 2001).

CONCLUSIONS

The control of micro-organisms such as *Staphylococcus* spp. and *E. coli* in organic bovine litter is essential for better health and food animal products safeguard.

The data of the present study seem to indicate a significant reduction of the bacteria evaluated in the treated litter and if confirmed during the following trials these could represent the adoption of key management practice in order to provide significant reduction in some pathogen shedding.

ACKNOWLEDGEMENTS

The writers wish to express their gratitude to the SOP[®] S.r.l. for furnishing the additive used in this study and for providing financial support for the project.