

RELAZIONE CONCLUSIVA DEL PROGETTO FILAMI

L'obiettivo generale del progetto era quello di porre le basi per la creazione di una filiera del latte di asina nella regione toscana sostenibile dal punto di vista ambientale, economico e sociale ed una conoscenza più ampia e completa delle produzioni dell'asino Amiatino, effettuandone il recupero della popolazione e la valorizzazione economica.

Il progetto aveva inoltre l'obiettivo di realizzare una azienda-tipo e la realizzazione di un prototipo di struttura di zona di mungitura per le asine da latte; era prevista la realizzazione di un prototipo di una unità mobile per la mungitura adatta alla specie in oggetto, di facile trasporto e con possibilità di integrazione nelle strutture fisse, e di un prototipo di struttura leggera per la zona mungitura destinata alla permanenza per periodi più estesi. Sono stati effettuati controlli sanitari sugli animali e quanti –qualitativi ed igienico sanitari del latte d'asina, è stata messa a punto la gestione dell'attività riproduttiva (nonostante questa non fosse prevista nel progetto iniziale); sono stati individuati programmi alimentari per gli animali in relazione alle disponibilità aziendali; sono stati valutati i possibili canali di commercializzazione (individuando per ciascuna tipologia i punti di forza e i punti di debolezza) al fine di porre le basi per la creazione di una rete di vendita, e sono state effettuate tutte le pratiche al fine di un'ottimale divulgazione del progetto e dei risultati ad esso legati.

Lo scopo è stato raggiunto mediante lo svolgimento delle fasi previste in progetto.

Si riporta di seguito per ciascuna fase il quadro delle attività svolte.

FASE 1: Costituzione ATS e coordinamento progetto

Azione prevista nella fase F 1.1: Costituzione dell'ATS

Partner attuatore: P1- Complesso Agricolo Forestale Regionale Bandite di Scarlino

Stato di avanzamento della fase: **Conclusa:** con atto in data 20.04.2011 del Notaio Usticano di Grosseto è stata costituita l'Associazione Temporanea di Scopo (ATS) tra i soggetti interessati dal Progetto FILAMI, atto indispensabile e primario per la realizzazione del progetto stesso.

Azione prevista nella fase F 1.2: Gestione del coordinamento

Partner attuatore: P1- Complesso Agricolo Forestale Regionale Bandite di Scarlino

Stato di avanzamento della fase: **Conclusa.** E' stato effettuato un coordinamento continuo fra i vari soggetti partner attraverso riunioni ed incontri periodici. Tali incontri sono avvenuti a rotazione nelle varie sedi dei partner attivi (Scarlino, Grosseto e Pisa)

FASE 2: Progettazione strutture per specie equina

Azione prevista nella fase F2.1: Progettazione strutture per specie equina

Partner attuatore: P2- Dipartimento di Scienze Veterinarie –Università di Pisa

Stato di avanzamento della fase: **Conclusa,** si sono conclusi i tre livelli di progetto della Struttura Leggera Zona Mungitura (SLZM) previsti: il progetto esecutivo è stato presentato ed ha ricevuto tutte le autorizzazioni di legge (Permesso di Costruire). Vedi documentazione inviata in sede di presentazione del progetto

FASE 3. Creazione e collaudo dei prototipi in base alle specifiche del progetto

Azione prevista nella fase F 3.1: Creazione dei prototipi in base alle specifiche del progetto:

Partner attuatore: P1- Complesso Agricolo Forestale Regionale Bandite di Scarlino

Stato di avanzamento della fase: **Conclusa.**

Le Bandite hanno provveduto ad individuare il soggetto che si è occupato della progettazione e realizzazione dell'Unità Mobile di Mungitura. Il prototipo della UMM ha subito vari aggiornamenti tecnici rispetto alla progettazione iniziale in conseguenza di appositi test di verifica. Infatti il primo prototipo è stato realizzato in un'unica struttura comprendente sia la saletta mungitura che la parte energetica. La struttura adatta per contenere tutte le macchine ed attrezzature era di notevoli dimensioni tanto da richiedere una rimorchio agricolo per trasportarla. Dato l'eccessivo ingombro e la difficoltà di spostamento rapido, ci ha spinto ad elaborare un altro sistema. Nel frattempo il primo prototipo ha permesso di valutare gli spazi operativi e l'efficienza dei "chiusini" per mantenere immobili le asine nella fase di mungitura, operazione che avviene in aderenza alla struttura stessa. Altro fattore importante era che il prototipo iniziale non consentiva lunghi spostamenti sul territorio e richiedeva la presenza in azienda di un'attrezzatura adeguata, costituita appunto da un rimorchio agricolo e da una trattrice. In questo caso i costi relativi alla dotazione iniziale di macchine agricole era notevole. Il prototipo successivo è stato quindi approntato in due moduli separati: il box adibito a saletta mungitura ed il box energetico. In questo modo gli ingombri si sono ridotti notevolmente al punto che i due box possono essere trasportati mediante apposito carrello appendice con autovettura o fuoristrada. Il carrello a doppio assale agevola tutte le manovre di carico scarico essendo molto più stabile rispetto ad un monoasse.

I due moduli.

Il modulo adibito a saletta mungitura è costituito da un telaio in tubolare d'acciaio e alluminio per contenere i pesi ma al tempo stesso da conferire all'intera struttura un'adeguata robustezza. Il telaio è rivestito con materiale leggero (PVC) e facilmente lavabile. Il piano di calpestio è in alluminio antisdrucciolo. Internamente è alloggiato un piccolo serbatoio per l'aria compressa e la tubazione per la mungitura, che di volta in volta può essere asportata. Il box ha una doppia entrata ed una doppia finestrella datata per la mungitura da parte dell'operatore. Inoltre per ottemperare alla normativa sui luoghi di lavoro, che stabilisce delle dimensioni minime ad operatore di 2 mq per 3 metri di altezza, stato studiato un sistema di innalzamento del tetto automatico, attraverso due pistoni azionati con aria compressa. In tal modo si rientra ampiamente nella normativa di settore con 4 mq di superficie per 3,2 metri di altezza regolabile. Al momento in cui il tetto si alza, la chiusura ermetica del box è garantita da un telo che ripiegato su se stesso a fisarmonica che si estende. Questo sistema garantisce maggiore facilità di trasporto, limitando gli ingombri.

Dato poi che il modulo deve lavorare a terra proprio per favorire le asine che non devono abituarsi a salire su pedane o scivoli, ma solo transitare in aderenza al box, è stato ideato un sistema pneumatico di scarico, mediante un ingegnoso sistema a pistoni che consente di alzare il box di qualche centimetro per sfilare il carrello di trasporto e di calarlo a terra subito dopo.

I pistoni poi si ritraggono e il sistema di scarico si posiziona in maniera tale che non costituisce ingombro o intralcio per il passaggio delle asine.

Il prototipo perfettamente funzionante, richiede solo una successiva accortezza: la colorazione esterna adeguata in maniera che non allarmi o spaventi gli animali. Una tinta verde pastello o marrone può andare bene, si mimetizza facilmente con il paesaggio dei pascoli. (vedi foto).

Oltre al sistema di carico e scarico pneumatico sono stati predisposti altri due metodi: mediante l'impiego di trattore con forca oppure con un sistema di cavi o catene da agganciare alle estremità del tetto e sempre alzato con la forca del trattore o escavatore se è disponibile.

Il modulo energetico invece, è sempre costruito sullo stile di quello sopra descritto, ma non dispone di un tetto mobile, in quanto non necessario, visto che all'interno non vi sono operatori e consta di un ingresso posteriore che consente l'accesso ai servizi (frigo, pompa del vuoto, boiler, sistema di lavaggio). Il generatore invece, è stato collocato nella parte anteriore ed essendo molto potente e pesante, è montato su una slitta che permette lo spostamento avanti e indietro dal box, in maniera da consentire un facile accesso all'operatore per le manutenzioni o eventuali guasti. Tutti i servizi sono facilmente accessibili. Questo modulo non dispone di un carico o scarico automatico, ma ciò

avviene con gli altri due metodi descritti sopra. Questo perché il modulo per funzionare non deve essere scarrato ma si può essere posto nelle vicinanze del modulo di mungitura. Sono stati comunque predisposti gli agganci nel caso in cui si volesse dotare anch'esso di sistema pneumatico o idraulico per lo scarico ed il carico. Questo potrebbe essere il caso in cui si volesse utilizzare un solo carrello appendice che richiederebbe appunto lo scarico ed il successivo carico di entrambi i box.

Gli spostamenti di entrambi i moduli o box può avvenire rapidamente e possono viaggiare su strade pubbliche. Dai test effettuati si possono raggiungere i 100 km orari senza che via sia la benché minima vibrazione o difficoltà di guida.

I costi di realizzazione dei moduli in serie sono prevedibili come contenuti e di gran lunga minori rispetto alla realizzazione di una saletta di mungitura in muratura o comunque fissa.

Inoltre questo sistema consente di poter affittare o noleggiare la UMM alle aziende ad inizio attività oppure si potrà svolgere un servizio di mungitura itinerante per le aziende che aderiranno a progetto.

La Zona Mungitura.

Anche questa struttura ha subito aggiornamenti e variazioni rispetto al progetto iniziale. Infatti, con l'esperienza maturata nelle visite effettuate in Italia presso altri allevamenti di asini, è stata riprogettato il sistema di ingresso delle asine da sottoporre a mungitura e la riunione successivamente con i puledri. Anche la sala destinata alla conservazione e trasformazione del latte ha subito alcune modifiche migliorative. Inizialmente era previsto un serbatoio di raccolta del latte e un sistema successivo di imbottigliamento e conservazione del latte da utilizzare fresco o congelato. La miglioria sostanziale è rappresentata dall'inserimento di un modulo che permette la pastorizzazione e l'abbattimento della temperatura per poi essere imbottigliato e impiegato come prodotto fresco o inserito in sacche per la successiva fase di congelamento. Ovviamente ciò ci ha richiesto la necessità di acquisire la qualifica di stabilimento di trasformazione. Purtroppo la normativa di riferimento sulla commercializzazione del latte d'asina è alquanto disomogenea, ma la ASL di riferimento richiede tale accortezza, cioè la pastorizzazione per essere commercializzato. Anche la parte strutturale della sala latte ha subito delle modifiche mediante la predisposizione doppie aperture per l'ingresso di macchine da trasporto e con la dotazione di sicurezza (porte antipanico) per consentire agli addetti di lavorare nei locali. Anche il soffitto è stato modificato, anziché realizzarlo in muratura è stato scelto l'impiego di pannelli coibentati a sandwich con superficie lavabile. Sicuramente questo giova al mantenimento della temperatura bassa per il latte. Per mantenere ulteriormente costante la temperatura è stato realizzato un tetto coibentato e con un cuscino d'aria con il soffitto della sala mungitura e tutti gli altri locali che sono stati realizzati. Altra miglioria è stata la realizzazione di una fossa di mungitura calibrata per mungere contemporaneamente 8 asine indirizzate in un doppio corridoio realizzato in metallo. La fossa può essere coperta con apposito telaio in metallo su cui poggiare la UMM qualora si intendesse utilizzarla anche all'interno della struttura, nel caso in cui fosse necessario mungere secondo particolari protocolli (come per esempio nel campo della cosmesi). In caso di condizioni meteo difficili ed in presenza di forte vento è possibile chiudere il grande corridoio nella parte di uscita delle asine attraverso un portone mobile e far uscire gli animali mediante un corridoio laterale. L'intera struttura è dotata di un sistema autonomo di approvvigionamento energetico mediante un sistema di pannelli fotovoltaici posti sulla parte ovest del tetto che garantiscono circa 20 Kwh di produzione. Questo fa sì che si abbia un notevole risparmio sui costi di gestione e soprattutto eco-compatibile.

Azione prevista nella fase F 3.2: Collaudo prototipiPartner attuatore: P5- Azienda Agraria Santa Maria di Alberobello di Fedi RenzoStato di avanzamento della fase: Conclusa.

Questa fase è iniziata prima dei tempi stabiliti dal cronoprogramma di progetto. Poiché essa è rappresentata essenzialmente dall'assunzione di personale impiegato nel collaudo della Unità Mobile di Mungitura, questa fase ha dovuto modificare la sua tempistica in relazione ai tempi di realizzazione del prototipo.

L'azienda agraria Santa Maria ha provveduto all'assunzione di una unità lavoro OTD in base al CCNL per operai agricoli in data 01.04.2012

FASE 4: Valutazione sanitaria degli animaliAzione prevista nella fase F4.1: Valutazione sanitaria degli animaliPartner attuatore: P3- Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e ToscanaStato di avanzamento della fase: Conclusa

Sono stati effettuati sopralluoghi presso l'allevamento di asini di razza Amiatina sito in località Ponte alle Catene nel comune di Scarlino (GR) di proprietà del Complesso Agricolo Forestale Regionale "Bandite di Scarlino" (P1) e presso altre 3 aziende.

I primi sopralluoghi sono serviti per la pianificazione delle attività e per la verifica delle azioni da intraprendere. Sono state selezionate 100 asine omogenee per età, ordine di parto, morfologia. Gli animali sono stati sottoposti a valutazione sanitaria e a prelievo di materiale biologico per le analisi di laboratorio.

Nel corso della durata del progetto, il partner P3 ha visitato ulteriori 4 allevamenti di asine destinate alla produzione di latte situati nel territorio nazionale, al fine di confrontarsi con realtà zootecniche differenti (Anagni, Rignano Flaminio, Salerno, Arezzo).

Il partner P3 ha inoltre partecipato agli incontri programmati con il gruppo del progetto per la pianificazione e verifica delle attività svolte e ai vari incontri di divulgazione aperti al pubblico.

Valutazione sanitaria degli animali

100 asine (1°-10° mese di lattazione) sono state sottoposte a valutazione sanitaria nelle aziende considerate, seguendo l'esame clinico riportato in una lista di controllo predisposta.

L'esame obiettivo di tutti gli animali ha evidenziato un buon livello sanitario e di benessere. I parametri fisiologici registrati sono risultati nella norma (tabella 1).

Soltanto un capo è morto a causa di una complicazione di un'ernia inguinale sopraggiunta nel corso della gravidanza. Tale capo è stato pertanto escluso dallo studio.

	Media	Valore minimo	Valore massimo	Valori di riferimento	Bibliografia
Frequenza cardiaca (battiti/minuto)	41,14	32	52	41	<i>The Professional Handbook of the Donkey</i> 4th ed. (2008)
Frequenza respiratoria (atti respiratori/minuto)	21,48	16	28	20	
Temperatura rettale	37°C	36,6°C	37,5°C	37,1°C	
Body Condition Score	3,37	3	4	Scala da 0 a 5	

Tabella 1. Parametri clinici dei capi oggetto dello studio

Da ogni animale sono stati prelevati le seguenti tipologie di campioni:

- 1 tampone cervicale per la valutazione della flora batterica genitale;
- 1 campione di feci per analisi parassitologiche (nel caso dell'All.1 sono stati prelevati 2 campioni di feci in momenti diversi per singolo animale);
- 2 campioni di latte da ciascuna emimammella (per un totale di 4 campioni), di cui uno nei primi mesi di lattazione (1°-4° mese) e l'altro negli ultimi mesi di lattazione (5°-10° mese), per rilievi microbiologici (agenti mastidogeni);
- 2 campioni di sangue con anticoagulante e 1 campione di siero per la valutazione dei parametri emato-biochimici;
- 1 campione di siero per la ricerca di agenti infettivi potenzialmente zoonosici (*Brucella* spp. e *Leptospira* spp.) e di agenti abortigeni tipici di specie (*Brucella* spp., *Leptospira* spp., *Salmonella abortus equi*, virus dell'Arterite Virale Equina ed Herpesvirus equino tipo 1).

Da gruppi di animali sono stati prelevati:

- campioni di feci per analisi parassitologiche;
- campioni di latte di massa per analisi microbiologiche e chimico-fisiche.

In tabella 2 per ogni tipologia di campione sono riportate le analisi effettuate con la relativa tecnica analitica e il metodo di prova eseguito, il numero di campioni e il numero di determinazioni effettuate.

Tipologia di campione	Analisi effettuate per singolo campione	Tecnica analitica	Metodo di prova	Numero di campioni prelevati	Numero di determinazioni
TAMPONE GENITALE	<i>Taylorella equigenitalis/ asinigenitalis</i>	Esame colturale	Manuale OIE 2008 6th ed. Cap 2.5.2 pag 838-844	116	116
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Esame colturale	Manuale OIE 2008 6th ed. Cap 2.5.2 pag 838-844		116
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Esame colturale	Manuale OIE 2008 6th ed. Cap 2.5.2 pag 838-844		116
	<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i>	Esame colturale	Manuale OIE 2008 6th ed. Cap 2.5.2 pag 838-844		116
FECI	Enteroparassiti	Flottazione	POS ACC 011 INT	180	180
	Parassiti bronco-polmonari	McMaster	POS ACC 003 INT		158
	Trematodi digenei	Baermann	POS ACC 009 INT		100
	Agenti mastidogeni (<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Corynebacterium</i> spp.)	Sedimentazione	POS ACC 014 INT		100
LATTE	AST, ALT, Azoto ureico, B-HBA, Bilirubina totale, Calcio, CK, Colesterolo, Creatinina, Fosfatasi alcalina, Fosforo inorganico, GGT, Glucosio, Magnesio, Proteine totali, Trigliceridi	Esame colturale	POS CIP 005 INT	200	200
	Lisozima, Batteriocidia	Prova microbiologica	Metodo microbiologico		
	Attività del complemento	Tecnica densitometrica	Metodo densimetrico		
	NEFA, Radicali liberi, Antiossidanti totali, Zinco	Prova colorimetrica	Metodo chimico		
	Sodio, Potassio	Potenziometrica indiretta	POS CCR 065 INT		
	Aptoglobulina	ELISA	Metodo immunoenzimatico		
	Protidogramma	Elettroforesi	POS CCR 026 INT		
	Emocromo	Contaglobuli automatico	POS CCR 015 INT		
	Basofili, Eosinofili, Linfociti, Monociti, Neutrofilii a banda, Neutrofilii segmentati	Esame microscopico	Metodo microscopico		
	CD4+, CD8+	Prova citofluorimetrica	Metodo chimico		
SANGUE/SIERO	Brucellosi	RBPT (Rose Bengal Plate Test)	POS SIE 010 NOR	100	100
	Leptosirosi (<i>L. interrogans</i> serovar <i>bratislava</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> , <i>pomona</i> , <i>sax-koebing</i>)	Microagglutinazione in campo oscuro	Metodo sierologico		
	Salmonellosi (<i>S. abortus equi</i>)	Sieroaagglutinazione lenta	POS SIE 001 INT		
	Arterite Virale Equina	Sieroneutralizzazione	POS DMV 001 NOR		
	Herpesvirus (EHV-1)	Sieroneutralizzazione	Manuale OIE 2008 6th ed. cap 2.5.10 parte 2.a POS DMV 004 NOR Manuale OIE 2008 6th ed. cap 2.5.9 parte 2.a pag 899-900		
		Sieroneutralizzazione	100		
SIERO				100	100
				100	100
				100	100
				100	100

Tabella 2. Tipologia di campioni e di analisi effettuate, tecnica analitica e metodo di prova, numero di campioni e numero di esami con i relativi risultati.

La valutazione della flora batterica genitale delle asine è stata effettuata mediante esame colturale da tamponi prelevati a livello cervico-vaginale. L'analisi batteriologica ha previsto la ricerca dei più importanti agenti batterici potenzialmente patogeni per l'apparato riproduttivo femminile, in grado di provocare endometriti e problemi riproduttivi: *Taylorella equigenitalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus equi zooepidemicus*. Le analisi sono state condotte secondo i protocolli OIE (Manuale OIE 2008 6th ed. Cap 2.5.2).

I risultati sono mostrati in tabella 3.

<i>Taylorella equigenitalis</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i>	
N°capi positivi /totale	Prevalenza	N°capi positivi /totale	Prevalenza	N°capi positivi /totale	Prevalenza	N°capi positivi /totale	Prevalenza
0/100	0%	6/100	6%	0/100	0%	10/100	10%

Tabella 3. Risultati delle analisi batteriologiche sui tamponi genitali

I 16 capi (16% del totale dei soggetti investigati) che sono risultati positivi ad uno dei due suddetti agenti patogeni erano clinicamente sani al momento del prelievo. Sono state effettuate analisi di conferma a distanza di un mese, con esito negativo. Tale risultato suggerisce la natura opportunistica dei patogeni isolati e sottolinea la necessità di un monitoraggio costante per evitare problemi di infertilità.

I campioni di feci massali e individuali sono stati analizzati per la ricerca di:

- uova e oocisti di parassiti gastro-intestinali, mediante tecniche qualitative (flottazione in soluzione sovrasatura di NaCl) e quantitative, solo su campioni individuali prelevati dall'ampolla rettale (tecnica McMaster);
- larve di parassiti bronco-polmonari mediante tecnica Baermann;
- uova di trematodi digenei mediante tecnica di sedimentazione.

I risultati (tabelle 4 e 5) evidenziano la presenza di Strongili gastro-intestinali (prevalenza sul totale dei campioni esaminati: 91,76%), di Ossiuridi (*Oxiuris equi*) (1,17%) e di *Dyctiocaulus arnfieldi* (19%).

Strongili Gastro-Intestinali						Ossiuridi (<i>Oxiuris equi</i>)				
Primo prelievo			Secondo prelievo			Primo prelievo			Secondo prelievo	
N°capi positivi /totale	Prevalenza	Conta uova (upg) (Media±SD)	N°capi positivi /totale	Prevalenza	Conta uova (upg) (Media±SD)	N°capi positivi /totale	Prevalenza	Conta Uova Media (upg)	N°capi positivi /totale	Prevalenza
90/100	90%	793.42±632.58	66/70	94,28%	789.39±435.85	2/100	2%	400	0/70	0%

Tabella 4. Risultati delle analisi parassitologiche sui campioni di feci mediante tecnica di flottazione e tecnica McMaster

Trematodi digenei		Parassiti Bronco-polmonari	
		<i>Dyctiocaulus arnfieldi</i>	
N°capi positivi/totale	Prevalenza	N°capi positivi/totale	Prevalenza
0/100	0%	19/100	19%

Tabella 5. Risultati delle analisi parassitologiche sui campioni di feci mediante tecnica di sedimentazione e Baermann

In allevamenti di tipo estensivo/semi-estensivo come quelli visitati risulta importante garantire un controllo totale delle parassitosi, accompagnando trattamenti diselmintizzanti mirati a interventi strutturali e manageriali (rotazione dei pascoli) che permettano il raggiungimento e il mantenimento di un equilibrio tra ospite e parassiti, riducendo al minimo il rischio di residui nelle produzioni.

Dyctiocalus arnfieldi è un parassita dei piccoli e grossi bronchi degli equidi, per il quale l'asino rappresenta il serbatoio naturale dell'infezione, mentre il cavallo è solo un ospite occasionale nel quale difficilmente il nematode riesce a completare il proprio ciclo biologico. Il riscontro di questo parassita nella specie asinina non desta preoccupazione, in quanto è in grado di tollerare anche cariche infestanti elevate.

La prevalenza riscontrata per le Strongilosi gastro-intestinali è concorde con quanto riportato in letteratura (Giannetto *et al.*, 2008), per quanto riguarda l'allevamento di equidi allo stato semi-brado. L'assenza di sintomatologia clinica conclamata (coliche, diarrea, anoressia, anemia) indica lo stato di sostanziale equilibrio ospite-parassita in questi animali e conferma che la carica parassitaria riscontrata non costituisce un rischio igienico-sanitario e non compromette le performance produttive e la salubrità del prodotto finale.

L'analisi microbiologica per la ricerca di agenti mastidogeni è stata effettuata da due campioni di ciascuna emimammella delle asine oggetto dello studio in due differenti momenti della lattazione: uno nel primo periodo di lattazione (1°-4° mese) e uno nell'ultimo periodo di lattazione (6°-10° mese). I campioni di latte sono stati sottoposti a esame colturale utilizzando terreni di coltura in grado di consentire la crescita degli agenti responsabili di mastite nella specie asinina come descritti in letteratura, tra cui *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium* spp., *Escherichia coli*, *Pasteurella* spp..

I campioni di latte prelevati nel corso dei primi 4 mesi dall'inizio della lattazione si sono mostrati tutti negativi, senza alcuna crescita batterica. Nei campioni di latte prelevati nell'ultimo periodo di lattazione sono stati isolati i seguenti agenti batterici potenzialmente mastidogeni: *Streptococcus equi zooepidemicus* e *Staphylococcus aureus*, rispettivamente in 2 e in 1 campione. I capi da cui sono stati effettuati questi isolamenti, non mostravano alcun segno clinico di flogosi mammaria: la mammella era sana, non dura, non dolente e il latte era di aspetto e colore normali. In tabella 6 si mettono in relazione le positività riscontrate con i valori di cellule somatiche.

	Agente mastidogeno isolato	Mese di lattazione	Cellule somatiche (x 1000 c.som./ml)
Soggetto 1	<i>Staphylococcus aureus</i>	7°	2
Soggetto 2	<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i>	6°	3
Soggetto 3	<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i>	7°	56

Tabella 6. Confronto degli isolamenti batterici nel latte con i valori di cellule somatiche e di carica batterica totale.

In accordo con quanto riportato da Pilla *et al.* (2010) il riscontro di tali patogeni è da considerarsi occasionale e non costituisce pertanto un indicatore univoco di mastite in atto. Inoltre non si evidenzia una correlazione statistica tra positività microbiologica e innalzamento del tenore in cellule somatiche. Le analisi di sensibilità verso i chemioantibiotici hanno peraltro evidenziato la sensibilità di questi ceppi a tutte le più comuni molecole antimicrobiche.

In 13 dei campioni di latte individuale sono state eseguite 13 determinazioni mediante tecnica ELISA per la ricerca di Aflatossina M1. Tutti i campioni hanno dato esito negativo.

Da ogni singolo animale sono stati prelevati due campioni di sangue con anticoagulante e un campione di sangue senza anticoagulante per l'analisi dei parametri emato-biochimici al fine di conoscerne il profilo metabolico ed emocromocitometrico. Il prelievo è stato eseguito alla mattina, con animale a digiuno mediante vacutainer e analizzati entro le 24 h per quanto riguarda l'emocromocitometrico. Il siero è stato separato previa centrifugazione 3000 rpm per 5 minuti e conservato a -20° per le successive analisi.

Il profilo metabolico rappresenta uno dei più validi strumenti per verificare non solo lo stato di salute e di benessere degli animali, ma anche le loro performance produttive e l'adeguatezza del management cui sono sottoposti. Mentre per le altre specie animali di interesse zootecnico esiste una ampia letteratura e numerose ricerche a riguardo, per la specie asinina non esistono che indagini sporadiche e frammentarie, e soprattutto non correlate alla produzione di latte. Si è resa quindi necessaria la formazione di una banca dati di valori "fisiologici" di riferimento per l'asino, in particolare della razza Amiatina, allo scopo di fornire agli operatori del settore quel supporto scientifico necessario al corretto management della specie.

In tabella 7 si riportano i risultati ottenuti.

PARAMETRO (UNITÀ DI MISURA)	MEDIA	SD	VALORE MINIMO	VALORE MASSIMO
ALT (U/L)	8,95	1,78	4	17
ANTIOSSIDANTI TOTALI (ug/dl)	352,37	90,99	216	597
APTOGLOBINA (mg/ml)	3,69	1,88	1,94	11,4
AST (U/L)	298,05	53,25	190	423
AZOTO UREICO (mg/dl)	13,3	3,49	9	28
BETA-IDROSSIBUTIRRATO (B-HBA) (mg/dl)	2,56	0,84	1,45	5,23
BILIRUBINA TOTALE (mg/dl)	0,16	0,05	0,09	0,30
CALCIO (mg/dl)	12,11	0,5	10,9	13,5
CK (U/L)	181,87	82,84	93	512
COLESTEROLO (mg/dl)	83,35	15,95	59	120
CREATININA (mg/dl)	1,22	0,21	0,85	2,05
FOSFATASI ALCALINA (U/L)	286,62	88	149	547
FOSFORO INORGANICO (mg/dl)	3,25	1,28	1,7	9,8
GGT (U/L)	34,75	16,23	16	76
GLUCOSIO (mg/dl)	64,07	25,36	23	161
LISOZIMA (ug/ml)	4,63	2,1	1,39	9,83
MAGNESIO (mg/dl)	2,15	0,28	1,4	2,7
NEFA (umol/l)	101,02	152,79	12	822
POTASSIO (mmol/l)	4,39	0,66	3,1	5,6
PROTEINE TOTALI (g/dl)	7,37	0,5	6,5	9
RADICALI LIBERI (U.CARR.)	116,5	24,43	62	173
SODIO (mmol/l)	132,9	2,43	127	139
TRIGLICERIDI (mg/dl)	36,85	47,49	10	253
ZINCO (ug/dl)	103,97	34,22	53	200
CD4+	33,53	7,78	8,71	47,17
CD8+	19,2	5,7	8,31	35,29
F:BASOFILI (%)	0	0	0	0
F:EOSINOFILI (%)	14	5,82	6	30
F:LINFOCITI (%)	44	10,09	29	60
F:MONOCITI (%)	1,07	2,21	0	10
F:NEUTROFILI A BANDA (%)	0	0	0	0
F:NEUTROFILI SEGMENTATI (%)	40,89	12,03	10	60

Tabella 7. Media, deviazione standard, valori minimi e massimi dei parametri ematobiochimici indagati.

Sono state inoltre effettuate analisi sul siero dei capi oggetto dello studio al fine di evidenziare la presenza di eventuali anticorpi nei confronti dei principali agenti patogeni abortigeni della specie asinina, alcuni dei quali a rischio zoonosico (*Brucella* spp. e *Leptospira* spp.). I risultati sono illustrati in tabella 8.

Brucellosi		Salmonellosi da <i>S.abortus equi</i>		Leptosirosi		Arterite Virale Equina		Herpesvirosi da EHV-1	
Positivi/ totale	Prevalenza	Positivi/ totale	Prevalenza	Positivi/ totale	Prevalenza	Positivi/ totale	Prevalenza	Positivi/ totale	Prevalenza
0/100	0%	0/100	0%	0/100	0%	0/100	0%	0/100	0%

Tabella 8. Sieroprevalenza delle principali zoonosi e patologie infettive abortigene.

È stata effettuata una prima indagine sulle caratteristiche igienico-sanitarie del latte d'asina, al fine di tutelare la salute del consumatore. A tale scopo sono stati valutati i requisiti microbiologici e chimici indicati in tabella 9.

PROVA	METODO DI PROVA	RISULTATO
<i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579 :2002/ Cor 1 2004	assente in 25 ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	ISO 6888:2 1999	< 10 ufc/ml
<i>Listeria monocytogenes</i>	UNI EN ISO 11290-1:1997	
<i>E.coli</i> O157	ISO 16654:2001	assente in 25 ml
<i>Campylobacter</i> spp.	ISO 10272-1:2006	
Metalli pesanti	Cd, Pb, As ICP-MS (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry)	
	Hg FIMS (Flow Injection Mercury System)	
Pesticidi	GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry)	

Tabella 9. Parametri microbiologici e chimici da latte di massa, con relativi metodi di prova e risultati.

FASE 5: Progettazione e sviluppo della filiera latte

Azione prevista nella fase F 5.1: Messa a punto del razionamento per asine da latte

Partner attuatore: P2-Dipartimento di Scienze Veterinarie - Università di Pisa

Stato di avanzamento della fase: **Conclusa.**

Sono stati messi a punto razionamenti adeguati alle esigenze delle asine in lattazione, in asciutta all'ultimo stadio di gravidanza, per i riproduttori maschi nel periodo di monta, e per i puledri in fase di svezzamento in base alle disponibilità aziendali.

Si riportano di seguito i risultati relativi alla composizione chimica degli alimenti utilizzati per il razionamento degli animali

Tabella 1: Composizione chimica del fieno polifita

		Media
Sostanza Secca	%	91,53
Proteine Grezze	%	12,23
Lipidi Grezzi	%	1,14
Fibra Grezza	%	28,66
Amido	%	-
EI	%	42,19
Ceneri	%	7,30
NDF	%	49,96
ADF	%	36,93
Cellulosa	%	27,14
Emicellulose	%	13,06
ADL	%	9,55

Tabella 2: Composizione chimica del concentrato

		Media
Lipidi grezzi	% tq	3,00
Proteine grezze	% tq	15,00
Ceneri grezze	% tq	6,50
Cellulosa grezza	% tq	10,00
Sodio	% tq	0,37

Azione prevista nella fase F 5.2: Valutazione delle caratteristiche quanti-qualitative ed igienico sanitarie del latte

Partner attuatore: P2-Dipartimento di Scienze Fisiologiche- Università di Pisa

Stato di avanzamento della fase: **Conclusa**

È stato analizzato con cadenza mensile il latte proveniente da 50 asine in lattazione a partire dal trentesimo giorno dal parto fino almeno all'ottavo mese di lattazione; le analisi hanno riguardato 4 allevamenti e sono state effettuate in doppio, sia su latte singolo che massale per un totale di 864 campioni di latte analizzati.

Le analisi chimiche standard del latte (A.O.A.C, 1990; Milkoscan, Italian Foss Electric, Padova, Italy), per un totale di 13.824 determinazioni, hanno riguardato:

1. sostanza secca (864 determinazioni)
2. proteine totali (864 determinazioni)
3. lipidi totali (864 determinazioni)
4. lattosio (864 determinazioni)
5. fosforo (864 determinazioni)
6. calcio (864 determinazioni)
7. caseina (864 determinazioni)
8. ceneri (864 determinazioni)
9. Potassio (864 determinazioni)
10. Magnesio (864 determinazioni)
11. Sodio (864 determinazioni)

12. Zinco(864determinazioni)
13. Ferro(864determinazioni)
14. Manganese(864determinazioni)
15. Rame(864determinazioni)
16. Selenio(864determinazioni)

L'analisi morfometrica dei globuli di grasso per mezzo della valutazione di numero e diametro dei globuli (Scolozzi et al., 2003) è stata effettuata al fine di dare un'indicazione sulla digeribilità del latte per consumo umano. Per la valutazione morfometriche dei globuli di grasso sono state effettuate in totale 1.728 determinazioni:

1. numero dei globuli/ml (864 determinazioni)
2. diametro medio dei globuli (864determinazioni)

Le analisi relative alle caratteristiche igienico sanitarie del latte relative al partner P2 sono state carica batterica totale(plate count agar, 30°C, 72 h) e contenuto di cellule somatiche (Fossomatic) per un totale di 1.728 determinazioni:

3. carica batterica totale (864 determinazioni)
4. cellule somatiche (864 determinazioni)

Per la valutazione del profilo acidico (Rose-Gottlieb; A.O.A.C., 1990 modificato da Secchiari et al., 2003) sono state effettuate 864 determinazioni.

Si riportano di seguito le tabelle relative ai risultati delle analisi chimico fisiche dei campioni di latte d'asina sia massale che individuale.

Tabella 1 – Caratteristiche chimiche ed igienico-sanitarie del latte individuale di asina amiatina^a

		Media	DS
SS	%	9,47	0,538
Grasso	%	0,53	0,371
Proteine	%	1,63	0,165
Caseina	%	0,70	0,222
Lattosio	%	7,12	0,267
SSM	%	8,91	0,448
Ceneri	%	0,36	0,071
CBT	cfu/mLx10 ³	10,39	64,918
CCS	cells/mLx10 ³	13,36	19,952

^a SS: Sostanza Secca; SSM: Sostanza Secca Magra; CBT: Carica Batterica Totale; CCS: Conteggio Cellule Somatiche; DS: deviazione standard

Tabella 2- Composizione minerale del latte individuale di asina amiatina^a

Macroelementi		Media	DS
Ca	(mg/Kg)	1100	340
P	(mg/Kg)	700	70
K	(mg/Kg)	800	20
Mg	(mg/Kg)	130	40
Na	(mg/Kg)	200	60
Microelementi		Media	DS
Zn	(mg/Kg)	0.61	0.194
Fe	(mg/Kg)	nd	-
Mn	(mg/Kg)	nd	-
Cu	(mg/Kg)	nd	-
Se	(mg/Kg)	nd	-

^a DS: deviazione standard; nd: non determinabile

Tabella 3- Caratteristiche morfometriche dei globuli di grasso del latte individuale di asina amiatina^a

		Media	DS
Globuli/mL	(n°x10 ⁹)	2,18	1,932
Diametro Medio	(µm)	1,92	0,498
GP	(%)	69,74	20,834
GM	(%)	27,49	18,181
GG	(%)	2,77	4,450

^a GP: Globuli Piccoli(<2µm); GM: Globuli Medi (da 2 a 5 µm); GG: Globuli Grandi (>5µm); DS: deviazione standard

Tabella 4. Composizione acidica media del latte individuale di asina Amiatina (% degli acidi grassi totali)

	Media	DS		Media	DS
C4:0	0,04	0,028	C20:0	0,04	0,017
C6:0	0,26	0,080	C20:1	6,92	4,887
C8:0	3,74	1,109	C21:0	0,04	0,106
C10:0	8,25	2,978	C20:2	0,16	0,068
C11:0	1,85	8,659	C20:3n6	0,03	0,017
C12:0	7,32	2,990	C20:4n6	0,04	0,023
C13:0	0,02	0,021	C20:3n3	0,18	0,165
C14:0	5,72	2,052	C22:0	0,03	0,021
C14:1	0,31	0,162	C22:1	0,04	0,024
C15:0	0,33	0,092	C20:5n3	0,02	0,011
C15:1	0,16	0,051	C23:0	0,02	0,012
C16:0	20,5	2,861	C22:2	0,01	0,009
C16:1	3,259188	1,578	C24:0	0,02	0,014
C17:0	0,24	0,076	C24:1	0,02	0,016
C17:1	0,37	0,138	C22:5n3	0,006	0,002
C18:0	1,89	0,415	C22:6	0,05	0,043
C18:1 t9	0,03	0,018	SCFA	12,29	4,074
C18:1 t11	1,09	0,472	MCFA	40,08	7,425
C18:1 c9	23,30	6,212	LCFA	47,64	8,906
C18:2 t9,12	0,02	0,022	SFA	50,30	9,487
C18:2 c9,12	13,36	4,035	MUFA	35,50	8,854
C18:3 n6	0,03	0,015	PUFA	14,20	4,134

C18:3 n3	0,29	0,093	n3/n6	0,04	0,019
			Ins/Sfa	1,05	0,365

Abbreviazioni^a: SCFA: acidi grassi a corta catena (da 4 a 10 C); MCFA: acidi grassi a media catena (da 11 a 17 C); LCFA: acidi grassi a lunga catena (da 18 a 24 C); SFA: acidi grassi saturi; MUFA: acidi grassi monoinsaturi; PUFA: acidi grassi poliinsaturi; Ins/Sfa: acidi grassi insaturi/acidi grassi saturi; DS: deviazione standard.

Tabella 5 – Caratteristiche chimiche ed igienico-sanitarie del latte massale di asina amiatina^a

		Media	DS
SS	%	9,44	0,546
Grasso	%	0,46	0,333
Proteine	%	1,65	0,248
Caseina	%	0,71	0,231
Lattosio	%	7,15	0,243
SSM	%	8,94	0,459
Ceneri	%	0,37	0,061
CBT	cfu/mLx10 ³	2,86	4,450
CCS	cells/mLx10 ³	9,06	13,673

^a SS: Sostanza Secca; SSM: Sostanza Secca Magra; CBT: Carica Batterica Totale; CCS: Conteggio Cellule Somatiche; DS: deviazione standard

Tabella 6- Composizione minerale del latte massale di asina amiatina^a

Macroelementi		Media	DS
Ca	(mg/Kg)	1068	358,000
P	(mg/Kg)	707	55
K	(mg/Kg)	717	26
Mg	(mg/Kg)	127	38
Na	(mg/Kg)	171	82
Microlelementi		Media	DS
Zn	(mg/Kg)	0,61	0,194
Fe	(mg/Kg)	nd	-
Mn	(mg/Kg)	nd	-
Cu	(mg/Kg)	nd	-
Se	(mg/Kg)	nd	-

^a DS: deviazione standard; nd: non determinabile

Tabella 7- Caratteristiche morfometriche dei globuli di grasso del latte massale di asina amiatina^a

		Media	DS
Globuli/mL	(n°x10 ⁹)	2,27	1,969
Diametro Medio	(µm)	1,89	0,487
GP	(%)	71,50	19,593
GM	(%)	25,78	16,743
GG	(%)	2,73	4,724

^a GP: Globuli Piccoli(<2µm); GM: Globuli Medi (da 2 a 5 µm); GG: Globuli Grandi (>5µm); DS: deviazione standard

Tabella 8. Composizione acidica media del latte massale di asina Amiatina (% degli acidi grassi totali)

	Media	DS		Media	DS
C4:0	0,04	0,029	C20:0	0,04	0,017
C6:0	0,27	0,077	C20:1	6,84	5,042
C8:0	3,76	1,037	C21:0	0,05	0,116
C10:0	8,37	2,899	C20:2	0,17	0,069
C11:0	0,89	0,438	C20:3n6	0,03	0,017
C12:0	7,26	2,785	C20:4n6	0,04	0,023
C13:0	0,02	0,023	C20:3n3	0,18	0,176
C14:0	5,71	1,832	C22:0	0,03	0,022
C14:1	0,28	0,105	C22:1	0,04	0,025
C15:0	0,32	0,082	C20:5n3	0,02	0,012
C15:1	0,15	0,048	C23:0	0,02	0,012
C16:0	20,53	2,197	C22:2	0,01	0,008
C16:1	3,16	1,554	C24:0	0,02	0,015
C17:0	0,24	0,070	C24:1	0,02	0,015
C17:1	0,35	0,136	C22:5n3	0,007	0,022
C18:0	1,96	0,365	C22:6	0,05	0,043
C18:1 t9	0,03	0,018	SCFA	12,44	3,910
C18:1 t11	1,10	0,461	MCFA	38,93	4,994
C18:1 c9	23,75	5,955	LCFA	48,64	7,631
C18:2 t9,12	0,02	0,021	SFA	49,52	8,304
C18:2 c9,12	13,89	3,965	MUFA	35,73	8,184

C18:3 n6	0,03	0,016	PUFA	14,75	4,051
C18:3 n3	0,31	0,092	n3/n6	0,04	0,019
			Ins/Sfa	1,08	0,347

Abbreviazioni^a: SCFA: acidi grassi a corta catena (da 4 a 10 C); MCFA: acidi grassi a media catena (da 11 a 17 C); LCFA: acidi grassi a lunga catena (da 18 a 24 C); SFA: acidi grassi saturi; MUFA: acidi grassi monoinsaturi; PUFA: acidi grassi poliinsaturi; Ins/Sfa: acidi grassi insaturi/acidi grassi saturi; DS: deviazione standard.

Sono stati inoltre analizzati i campioni di latte individuale di 50 asine prelevate più volte nel corso della lattazione al fine di determinarne l'attività proteasica e le lattoproteine.

L'attività proteasica totale è stata analizzata mediante metodo descritto da Bendicho et al. (2002). Tale metodo, di tipo colorimetrico, utilizza come substrato l'azocaseina, la quale viene degradata dalle proteasi presenti nel latte permettendo così il dosaggio dell'attività proteolitica del latte stesso.

Le lattoproteine sui campioni di latte intero sono state analizzate mediante *isoelectrofocusing* (IEF), su gel ultrasottile (250*115*0,3 mm) (Erhardt et al., 1998), con l'utilizzo di un film di poliestere GelBond come supporto. I gel sono stati acquisiti e quantificati mediante G:Box (Syngene, model rating, Frederick, MD, USA). Oltre al latte intero sono stati analizzati anche campioni di siero e di caseina acida, per una valutazione comparativa dei tracciati.

E' stato inoltre effettuato il calcolo della ripetibilità, parametro genetico che valuta come l'individuo è in grado di ripetere le sue prestazioni in misure ripetute.

L'analisi IEF ha permesso di identificare, in base al punti isoelettrico, una serie di frazioni lattoproteiche, tra cui le proteine del siero (Figura 1) ed ha permesso di identificare un polimorfismo genetico a livello della β -LG I (Figura 1). Le varianti osservate, denominate A e B, presentavano rispettivamente una frequenza di 0,15 e 0,85 nel campione analizzato; le frequenze genotipiche erano in equilibrio di Hardy-Weinberg (Tabella 9).

Genotipo β -LG I	FO	FA	χ^2	P (χ^2)
AA	1	0,6154	0.2404	
AB	6	6,7692	0.0874	
BB	19	18,6154	0.0079	
Totale	26	26	0.3357	0.5623

Tabella 9: Frequenze genotipiche osservate (FO) e attese (FA) al locus β -LG I, e test del χ^2 per la verifica dell'equilibrio di Hardy-Weinberg.

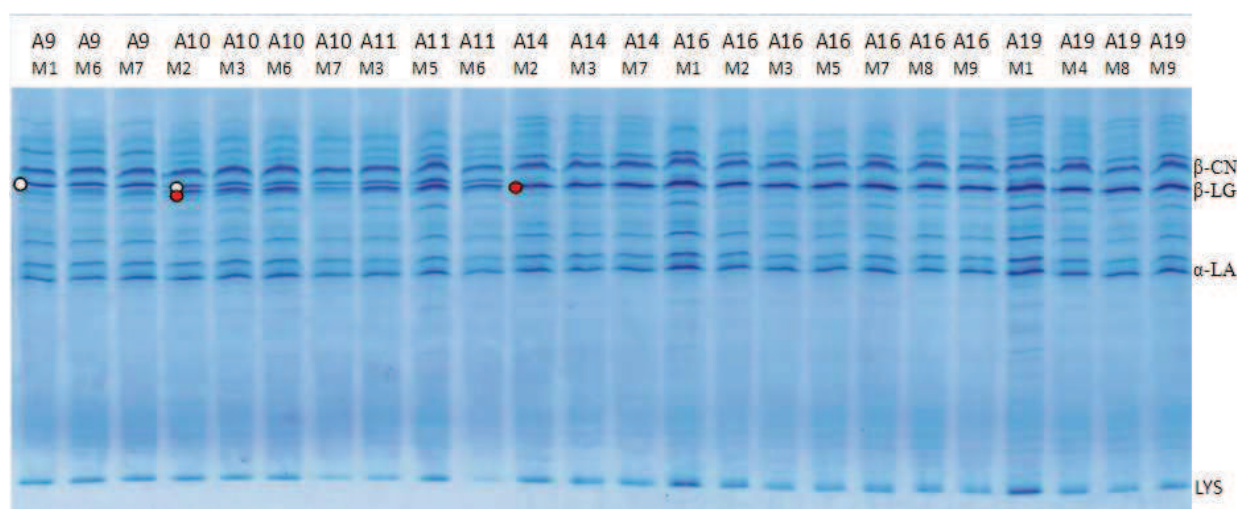


Figura 1: Esempio di *isoelectrofocusing* (IEF) di alcuni campioni individuali di latte d'asina. Le varianti A e B di β -LG sono indicate rispettivamente da un cerchio bianco e rosso in tre campioni con differente genotipo (omozigote AA, eterozigote AB e omozigote BB). A = asina; M = mese di lattazione.

La Tabella 10 riporta le statistiche dell'attività proteasica totale e della ripartizione percentuale delle principali frazioni lattoproteiche osservate mediante IEF. Le frazioni denominate CN-1, CN-2 e CN-3 sono bande di natura caseinica comprese tra β -LG e α -LA nel gel di IEF (Figura 1).

Variabile	Media	DS	Minimo	Massimo
Attività proteasica (mU/mL)	0,0006	0,0002	0,0000	0,0012
β -CN (%)	22,760	2,811	14,853	28,784
β -LG (%)	22,218	3,730	14,594	31,796
CN-1 (%)	4,691	2,120	0,000	9,872
CN-2 (%)	8,990	1,531	5,361	12,372
CN-3 (%)	12,471	1,758	7,627	16,741
α -LA (%)	19,349	2,380	14,229	26,624
Lisozima (%)	9,521	2,778	4,161	18,005
Attività del lisozima U/mL	3986,41	2,778	2082,00	8070,00

Tabella 10: Statistiche descrittive dell'attività proteasica totale e della ripartizione percentuale delle principali frazioni lattoproteiche osservate mediante IEF. DS = deviazione standard.

La Tabella 11 riporta i coefficienti di ripetibilità calcolati per l'attività proteasica totale e la ripartizione percentuale delle frazioni lattoproteiche. La ripetibilità varia da un valore minimo di 0,29 (attività proteasica totale) ad un massimo di 0,69 (β -LG). Anche per il lisozima si osserva una ripetibilità superiore al 55%.

FV	AP	β -CN	CN-1	CN-2	CN-3	CN-1+2	α -LA	LYS	β -LG
Asina	0,000	2,480	1,648	1,470	2,061	3,527	2,610	2,344	10,306
Errore	0,000	5,003	2,601	0,819	1,353	3,806	3,484	1,865	4,672
Ripetibilità	0,294	0,331	0,388	0,642	0,604	0,481	0,428	0,557	0,688

Tabella 12: Calcolo della ripetibilità delle variabili analizzate. FV = fonte di variazione. AP = attività proteasica; GG = giorni di lattazione; CN-1+2 = somma della bande CN-1 e CN-2.

La ridotta attività proteasica dei campioni di latte analizzati e l'elevato contenuto in lisozima confermano le particolari caratteristiche nutraceutiche del latte di asina. L'analisi IEF rappresenta un'analisi a basso costo che fornisce numerose indicazioni, permettendo di mettere in luce polimorfismi genetici, come quello individuato nel corso del presente *screening* a livello di β -LG I, come pure di quantificare il contenuto percentuale di frazioni lattoproteiche che potrebbero essere, in futuro, oggetto di miglioramento genetico. I valori di ripetibilità osservati suggeriscono buone possibilità per la selezione di particolari frazioni sieroproteiche.

Azione prevista nella fase F 5.3: Realizzazione di un centro per la raccolta del latte d'asina

Partner attuatore: P1- Complesso Agricolo Forestale Regionale Bandite di Scarlino

Stato di avanzamento della fase: Conclusa.

I lavori sono iniziati regolarmente in anticipo sul cronoprogramma di progetto e ad oggi risultano conclusi. Sebbene vi siano state modifiche strutturali ed ampliamenti le opere sono state definitivamente completate. Purtroppo la struttura è posta in un'area in cui vigono molti vincoli di tipo ambientale ed archeologico e questo non ha facilitato l'acquisizione agevole delle autorizzazioni. Nonostante tutto siamo rientrati nei tempi stabiliti dal progetto e la struttura è stata realizzata con dimensioni leggermente superiori. Gli ampliamenti sono stati necessari per dare maggiore completezza all'opera e nella prospettiva di svolgere la funzione di centro di raccolta per il latte prodotto dalle aziende agricole impegnate nel progetto di allevamento delle asine da latte. La richiesta di collaborazione al progetto è stata in costante crescita tanto da richiedere alla Formazione della Provincia di Grosseto di attivare uno specifico corso di allevatori per asine. Ciò è stato fatto ed il corso di allevatori terminerà a dicembre 2013 con un gruppo di 16 corsisti titolari di aziende agricole. In verità le richieste erano superiori come numero, purtroppo i posti erano quelli stabiliti. Questo lascia presagire che vi sarà uno sviluppo della filiera e sarà compito delle Bandite di far sì che l'attività sia sostenibile sia dal punto di vista sociale che economico sia per la gestione diretta sia per le aziende aderenti.

Azione prevista nella fase F5.4: Creazione di una bevanda probiotica a base di latte d'asina

Partner attuatore: A2- Consorzio Produttori Latte Maremma

Stato di avanzamento della fase: Fase conclusa

Quarantacinque ceppi di batteri lattici appartenenti alle specie *Lactobacillus plantarum* (42), *Lactobacillus paracasei* (2) e *Lactobacillus rhamnosus* (1) precedentemente isolati da matrici alimentari di origine animale (formaggi, salami, latte) sono stati analizzati per le loro caratteristiche di pre-probioticità e probioticità. Il ceppo A (ATCC 14917) è stato utilizzato in questo studio come

ceppo di riferimento. I ceppi presi in considerazione erano stati precedentemente identificati fenotipicamente tramite API 50 CH (bioMérieux, Marcy- L'Étoile, France).

Rivitalizzazione e coltura dei ceppi

I ceppi mantenuti a -80°C in brodo MRS (de Man-Rogosa-Sharpe, Oxoid, Milano, Italia) con l'aggiunta di glicerolo come crioprotettore (1,2 ml di glicerolo ogni 6 ml di coltura cellulare in MRS) sono stati rivitalizzati prima di ogni test prelevando un'aliquota ed inoculandola in 6 ml di MRS brodo sterile. I ceppi sono stati immediatamente incubati per 24 ore a 37°C.

Il ceppo di riferimento di *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 26106) impegnato per le prove di adesione è stato mantenuto a -80°C in YPD (Yeast-Peptide-Dextrose) brodo con l'aggiunta di glicerolo (1,2 ml di glicerolo ogni 6 ml di coltura cellulare in YPD). Il ceppo è stato rivitalizzato prima di ogni test prelevando un'aliquota ed inoculandola in 6 ml di YPD brodo sterile. Il ceppo è stato immediatamente incubato per 24 ore a 30°C.

Estrazione DNA

L'estrazione del DNA è stata effettuata tramite il kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kits (Sigma-Aldrich, Italia, Milano) seguendo il protocollo suggerito dal produttore.

Il DNA così ottenuto è stato conservato a -20°C ed utilizzato per le analisi molecolari.

L'efficienza dell'estrazione e la purezza del DNA ottenuto sono state valutate e confermate tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio ad una concentrazione dello 0,8% e successiva osservazione al transilluminatore.

PCR specie specifica

Per confermare l'appartenenza alla specie *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, precedentemente ottenuta con API 50 CH, è stata effettuata l'identificazione genotipica tramite PCR (Polymerase Chain Reaction) specie-specifica.

Grazie a questa analisi è stato possibile amplificare una porzione della regione 16S rDNA, codificante per la subunità 16S dell'RNA ribosomiale, secondo i protocolli operativi di Berthier e Ehrlich (1998) per *Lb. plantarum* e Desai et al (2006) per *Lb. paracasei* e *Lb. rhamnosus*.

Tutti gli amplificati ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio ad una concentrazione dell' 1,5% e successivamente osservati a transilluminatore per valutare la presenza dell'amplificato e quantificare la grandezza in paia di basi (bp) delle bande.

Come riferimento è stato usato il marker GelPilot 100 bp Ladder (100) (Qiagen, Milano, Italia).

Sensibilità antibiotici

Gli antibiotici utilizzati per il presente studio sono stati gentamicina, cloramfenicolo, tetraciclina ed eritromicina. La selezione di tali antibiotici è stata condotta scegliendo tra le molecole più impiegate in medicina veterinaria, appartenenti a diverse classi di antimicrobici, secondo il meccanismo di azione degli stessi.

L'antibiotico resistenza è stata saggiata tramite la metodologia di diffusione su gel di agar (Bauer et al., 1966) apportando alcune modifiche. I ceppi che si sono manifestati resistenti o mediamente sensibili nei confronti dei singoli antibiotici sono stati ulteriormente testati tramite tecnica delle microdiluizioni al fine di determinare il valore di Minima Concentrazione Inibente (MIC).

Per quanto riguarda la metodica di diffusione su gel di agar, gli aloni di inibizione dovuti alla diffusione dell'antibiotico dal disco di nitrocellulosa all'agar stesso sono stati misurati e confrontati con i valori proposti da Charteris et al. (1998) (Tabella 1).

Tabella 1. Diametro aloni (mm) proposti da Charteris *et al.*, 1998 per la discriminazione di ceppi resistenti, mediamente sensibili e sensibili.

	CN	TE	C	E
Resistente	12	14	12	13
Mediamente sensibile		15 - 18	13 - 17	14 - 17
Sensibile	13	19	18	18

La quantificazione del valore di MIC è stata effettuata esclusivamente sui ceppi che hanno manifestato una resistenza o una media sensibilità nei confronti di un antibiotico tramite metodica di diffusione su agar. Per il test sono state usate micropiastre da 96 pozzetti.

È stata valutata la crescita dei batteri nei pozzetti e quantificata la MIC per il singolo antibiotico. I valori ottenuti sono stati paragonati con i valori di cut-off proposti dall'EFSA nel 2012 nel documento "Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance" (EFSA Journal 2012; 10:2740). (Tabella 2).

Tabella 2. Valori di *cut-off* (mg/l) relativi a *Lb. plantarum*, *Lb. casei/paracasei* e *Lb. rhamnosus* per gli antibiotici gentamicina (CN), tetraciclina (TE), cloramfenicolo (C) ed eritromicina (E).

	CN	TE	C	E
<i>Lactobacillus plantarum</i>	16	32	8	1
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	32	4	4	1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	16	8	4	1

Valutazione della resistenza al lisozima

I ceppi sono stati testati per valutare la resistenza al lisozima ad una concentrazione pari a 100 µg/ml, al fine di simulare il transito nella cavità orale. La resistenza dei diversi ceppi è stata valutata dopo 30 e 90 minuti dall'incubazione a 37°C in presenza di lisozima.

Per ciascun campione sono state effettuate diluizioni scalari. Le diluizioni sono state successivamente piastrate per inclusione su MRS agar. Allo stesso tempo sono state effettuate diluizioni scalari del campione di controllo (non trattato con lisozima) relativo a ciascun ceppo. Le piastre sono state incubate per 24-48 ore a 37°C in anaerobiosi.

Sono state contate le colonie presenti nelle piastre e calcolate le percentuali di sopravvivenza come rapporto tra le colture provenienti dai prelievi a 30 e 90 minuti e le colonie presenti nel controllo. La soglia di sopravvivenza prestabilita per ritenere il ceppo resistente al transito nel tratto orale è stata fissata all'80% dopo 90 minuti di incubazione con lisozima.

Valutazione della resistenza a pH acido

I ceppi sono stati saggiati per la resistenza a pH acidi al fine di valutare la loro sopravvivenza a seguito del passaggio nella cavità gastrica. Per simulare tale transito i ceppi sono stati inoculati in brodi di coltura a pH sempre più bassi in maniera graduale nel tempo.

Partendo da una brodocoltura dei ceppi allestita in MRS a pH 3, dopo 30 minuti i ceppi sono stati incubati in brodo MRS pH 2,5 per 30 minuti ed infine in brodo MRS a pH 2 per ulteriori 30 minuti.

Dopo le varie incubazioni a pH acidi, per ciascun campione sono state effettuate diluizioni scalari. Le diluizioni sono state successivamente piastrate per inclusione su MRS agar. Allo stesso tempo sono state effettuate diluizioni scalari del campione di controllo (non trattato con pH acido) relativo a ciascun ceppo. Le piastre sono state incubate per 24-48 ore a 37°C in anaerobiosi.

Sono state contate le colonie presenti nelle piastre e calcolate le percentuali di sopravvivenza come rapporto tra il numero di colonie presenti nelle piastre a pH 3, 2,5 e 2 e le colonie presenti nel

campione di controllo. La soglia di sopravvivenza prestabilita per ritenere il ceppo resistente al transito nella cavità gastrica è stata fissata all'80% a pH 2,5.

Valutazione della resistenza a sali biliari

La resistenza ai sali biliari è un importante fattore per valutare la resistenza e la permanenza nel tratto intestinale umano. I ceppi sono stati testati con concentrazioni di sali biliari pari a 0,3%, 0,5% e 1% peso/volume.

I ceppi sono stati incubati in MRS brodo alle suddette percentuali di sali biliari per 24 ore a 37°C. Trascorse le 24 ore, per ciascun campione sono state effettuate diluizioni scalari. Le diluizioni sono state successivamente piastrate per inclusione su MRS agar. Allo stesso tempo sono state effettuate diluizioni scalari del campione di controllo (non trattato con Sali biliari) relativo a ciascun ceppo. Le piastre sono state incubate per 24-48 ore a 37°C in anaerobiosi.

Sono state contate le colonie presenti nelle piastre e calcolate le percentuali di sopravvivenza come rapporto tra il numero di colonie presenti nelle piastre relative ai campioni trattati con sali biliari (0,3%, 0,5% e 1%) e il numero di colonie presenti nel campione di controllo. La percentuale di sopravvivenza prestabilita per ritenere il ceppo resistente alla presenza di sali biliari è stata fissata all'80% in presenza dell'1% di bile.

Presenza gene idrolisi sali biliari (bsh)

I ceppi che hanno presentato una buona resistenza (sopra 80% per la crescita con l'1% di bile rispetto al controllo) sono stati sottoposti a valutazione per la presenza del gene *bsh*, codificante per l'enzima in grado di idrolizzare i sali biliari (bile salt hydrolase).

La presenza del gene *bsh* è stata ricercata tramite PCR dopo estrazione del DNA genomico seguendo il protocollo operativo proposto da Zago et al. (2011).

Tutti gli amplificati ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1,5% e successivamente osservati a transilluminatore per valutare la presenza dell'amplificato e quantificare la lunghezza in paia di basi (bp) delle bande. La lunghezza attesa del prodotto di amplificazione era pari a 919 bp. È stato usato come riferimento il marker GelPilot 100 bp Ladder (100) (Qiagen).

Resistenza a concentrazioni crescenti di cloruro di sodio

È stata valutata la capacità dei ceppi isolati oggetto di studio di crescere a diverse concentrazioni di cloruro di sodio (2,5%, 5% e 7,5% w/v) alla temperatura di 37°C dopo 24h in brodo MRS. La capacità dei ceppi di crescere nonostante elevate percentuali di NaCl, non solo rappresenta un indice della resistenza dei microrganismi testati a condizioni di sopravvivenza avverse, ma potrebbe risultare utile per l'impiego dei ceppi in prodotti addizionati con elevate percentuali di cloruro di sodio o che per motivi di stagionatura subiscono un aumento nel tempo della concentrazione di sale (formaggio, prodotti carni).

I ceppi sono stati inoculati in ragione dell'1% in MRS brodo addizionato con le diverse concentrazioni di NaCl ed incubati alle temperature ottimali di crescita. Lo sviluppo dei ceppi in brodo è stato considerato ottimale, debole o nullo valutando "a vista" lo sviluppo degli stessi in brodo.

Adesione a cellule di Saccharomyces cerevisiae

La capacità di aderire agli enterociti è stata valutata in via preliminare tramite impiego di *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 26106) presupponendo il coinvolgimento dei recettori del mannosio nel meccanismo di adesione (Pretzer et al., 2005). Per valutare il meccanismo di interazione tra i ceppi e tali recettori è stato eseguito un ulteriore test di adesione in presenza del lievito e della molecola α -metil-D-mannopiranoside, che si lega in maniera specifica ai recettori del mannosio.

Presenza gene adesione recettori mannosio (msa)

Tutti i ceppi sono stati sottoposti a valutazione per la presenza del gene *msa*, codificante per le adesine mannosio specifiche (*mannose specific adhesion*) al fine di valutarne la presenza, in caso di adesione, o la mancata espressione, nel caso di non adesione al lievito.

La presenza del gene *msa* è stata valutata tramite PCR dopo estrazione del DNA genomico seguendo il protocollo operativo proposto da Zago et al. (2011).

Tutti gli amplificati ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio all' 1,5% e successivamente osservati a transilluminatore per valutare la presenza dell'amplificato e quantificare la lunghezza in paia di basi (bp) delle bande. Il prodotto di amplificazione atteso era caratterizzato da una lunghezza pari a 1740 bp. È stato usato come riferimento il marker GelPilot 100 bp Ladder (100) (Qiagen).

Valutazione dell'attività antagonista nei confronti di batteri patogeni o alteranti

E' stata valutata l'eventuale attività antimicrobica dei ceppi oggetto di studio nei confronti di microrganismi quali *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *E. coli* ed *Enterococcus faecalis*.

Tale attività è stata rilevata secondo il metodo di diffusione in agar da pozzetti (agar well diffusion). Piastre da 15 ml di BHI agar (Oxoid, Italia, Milano) sono state inoculate in ragione dell'1,5% con il microrganismo da antagonizzare. Nelle piastre sono stati successivamente creati pozzetti da 7 mm di diametro, nei quali sono stati dispensati 100 µl dei surnatanti ottenuti dai ceppi da testare. Per ciascuna piastra è stato riservato anche un pozzetto di controllo negativo, inoculato con terreno di coltura sterile.

Valutazione della resistenza a stress consequenziali (lisozima, pH acido, sali biliari)

I ceppi che hanno presentato le migliori caratteristiche sono stati sottoposti ad un prova combinata, sottoponendo i pellet cellulari dei ceppi testati a stress consequenziali nel tempo per valutare eventuali diminuzione della vitalità cellulare rispetto ai risultati ottenuti dalle singole prove (lisozima, pH acido, sali biliari).

I ceppi sono stati dapprima trattati con lisozima (100 mg/ml), successivamente lo stesso pellet cellulare è stato sottoposto a trattamento con pH acido (brodo MRS a pH 3 e successivamente 2,5) ed infine con MRS ad una concentrazione dell'1% di sali biliari. Le metodiche applicate sono state le stesse relative alle prove per gli stress singoli.

Valutazione della capacità adesiva su linea cellulare CACO-2

I ceppi dalle migliori caratteristiche sono stati selezionati per valutare la capacità di adesione su linea cellulare CACO-2, secondo il protocollo di Guglielmetti *et al.* (2008).

Risultati

PCR specie specifica

I ceppi testati hanno confermato pienamente l'identificazione preliminare che era stata effettuata mediante lo studio del profilo fermentativo (API 50 CH). Quarantadue ceppi sono risultati quindi essere riconducibili alla specie *Lb plantarum* (da ceppo 1 a ceppo 55), 2 ceppi alla specie *Lb paracasei* (ceppo 56 e ceppo 57) e 1 ceppo alla specie *Lb rhamnosus* (ceppo 58).

Sensibilità antibiotici

L'analisi tramite test di diffusione su agar ha dato risultati eterogenei con alcuni campioni che si sono dimostrati resistenti o mediamente sensibili ad alcuni antibiotici.

Tutti i ceppi sono risultati essere sensibili nei confronti degli antibiotici testati ad esclusione dei ceppi A, 30, 36, 38, 39, 40, 41, 43 e 45 che sono invece risultati resistenti nei confronti di

gentamicina (CN), con aloni di inibizione di diametro inferiore a 13 mm. I ceppi 1, 2, 3, 5, 20 e 47 si sono inoltre dimostrati mediamente sensibili nei confronti di tetraciclina (TE), con aloni di inibizione di diametro inferiore a 19 mm. Tutti i ceppi resistenti o mediamente sensibili sono stati, quindi, valutati tramite tecnica delle microdiluizioni per valutare l'effettiva resistenza a tali antibiotici e determinare il valore di MIC. I valori di MIC ottenuti sono stati paragonati ai valori di cut-off proposti dall'EFSA nel 2012 (16 mg/l per CN e 32 mg/l per TE).

I ceppi A, 30, 36, 38, 39, 40, 41, 43 e 45 hanno dimostrato di avere un valore di MIC inferiore al cut-off proposto dall'EFSA per gentamicina. I ceppi 1, 2, 3, 5, 20 e 47 hanno invece dimostrato di avere un valore di MIC per tetraciclina superiore al cut-off proposto dall'EFSA. Per tale motivo, questi ultimi ceppi non possono essere impiegati quali colture microbiche in prodotti alimentari destinati al consumo alimentare umano.

Valutazione della resistenza al lisozima

La resistenza all'enzima lisozima in concentrazione di 100 µg/ml si è dimostrata molto elevata con percentuali comprese tra il 95,15% ed il 102,09% di crescita rispetto al campione di controllo dopo 90 minuti di esposizione al trattamento. Tutti i ceppi sono risultati quindi resistenti (rapporto crescita dopo 90 minuti rispetto al campione di controllo maggiore dell'80%).

Valutazione della resistenza a pH acido

I ceppi testati per la resistenza al pH gastrico hanno fornito risultati eterogenei, con tasso di vitalità cellulare a pH 2,5 compreso tra il 60,69% ed il 100,08% rispetto al campione di controllo. Alcuni dei ceppi testati si sono quindi dimostrati non sufficientemente resistenti al pH acido secondo i criteri di selezione imposti nel il presente studio (sopravvivenza cellulare maggiore dell'80% a pH 2,5). Nello specifico i ceppi 34, 42, 48 e 49 hanno riportato rispetto al campione di controllo una sopravvivenza a pH 2,5 (previo trattamento a pH 3) sotto l'80%: 71,43%, 60,69%, 77,87% e 60,69%, rispettivamente.

Valutazione della resistenza a sali biliari e presenza del gene codificante l'idrolisi sali biliari (bsh)

I ceppi testati per la resistenza ai sali biliari hanno dimostrato un'ottima resistenza a queste molecole, quindi sarebbe ipotizzabile una loro resistenza al contatto con la bile a livello dell'apparato digerente. I ceppi in grado di sopravvivere per l'80% rispetto al campione di controllo dopo crescita in brodo addizionato con l'1% di sali biliari sono stati considerati resistenti. Le percentuali ottenute hanno oscillato tra 85,24% (ceppo 46) e 97,85% (ceppo 35). La totalità dei ceppi riporta una sopravvivenza superiore all'80% dopo crescita per 24 ore a 37°C in brodo MRS addizionato con l'1% di sali biliari.

Per questo motivo tutti i ceppi testati sono stati considerati resistenti e sono stati saggiati per verificare la capacità di adesione a cellule di *Saccharomyces cerevisiae*.

Per quanto riguarda la ricerca del gene *bsh*, codificante per l'idrolisi dei sali biliari, solo 12 ceppi (*Lb* A, 4, 30, 31, 33, 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 55) hanno dato risultato positivo. I ceppi dotati di questa caratteristica sono risultati essere tutti appartenenti alla specie *Lb. plantarum*.

Resistenza a concentrazioni crescenti di cloruro di sodio

Tutti i ceppi testati sono risultati essere resistenti alla massima concentrazione testata di cloruro di sodio, pari al 7,5%. Questo fenomeno può essere anche in parte attribuito alla natura della provenienza dei ceppi stessi, per lo più ambientale, che conferisce loro un'elevata adattabilità e resistenza a condizioni talvolta sfavorevoli.

Adesione a cellule di Saccharomyces cerevisiae e presenza del gene codificante per l'adesione ai recettori mannosio (msa)

La prova di adesione effettuata in presenza di *Saccharomyces cerevisiae* ha dato risultati eterogenei se confrontati con la ricerca del gene *msa*. Vi sono ceppi che hanno mostrato la capacità di aderire

al lievito, sebbene non presentassero gene *msa* nel loro corredo genomico. Al contrario, alcuni ceppi provvisti del gene codificante per l'adesione, non sono stati in grado di aderire alle cellule di lievito.

I ceppi 22-23-24-25-26-27-28-29-30-37-38-e 40 non sono stati in grado di aderire alle cellule di *S. cerevisiae*. Il gene *msa* è stato, invece, evidenziato in soli 7 ceppi (ceppo A, 36, 38, 39, 40, 41 e 55) appartenenti alla specie *Lb. plantarum*.

Valutazione dell'attività antagonista nei confronti di batteri patogeni o alteranti

Dei ceppi testati solamente i ceppi 2 e 3 hanno mostrato un profilo di attività inibente. Nello specifico questa attività si esplicava nei confronti di *Enterococcus faecalis*, *Listeria innocua* e *Staphylococcus aureus*. Questi ceppi non sono stati invece in grado di inibire la crescita di *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Clostridium perfringens*. E' stato singolare notare che i ceppi 2 e 3 erano anche tra quelli che presentavano resistenza alla tetraciclina e quindi non considerati sicuri per un eventuale impiego in prodotti destinati al consumo alimentare umano.

Un'ulteriore attività inibente è stata invece evidenziata per i ceppi 40-42-43-46 nei confronti di *Pseudomonas fluorescens*, spesso implicato in fenomeni di alterazione dei prodotti lattiero caseari.

Valutazione della resistenza a stress consequenziali (lisozima, pH acido, sali biliari)

I ceppi suscettibili agli antibiotici, in grado di resistere all'azione del lisozima, pH acido (2,5), sali biliari (1%), cloruro di sodio (7,5%) in grado di aderire a cellule di *S. cerevisiae* e in possesso dei geni *bsh* e *msa* sono stati sottoposti a stress consequenziali multipli, per valutare al meglio la risposta dei ceppi in condizioni fisiologiche. I ceppi scelti per questo esame sono stati A-36-39-41 e 55.

Ciò che è stato possibile notare è che dopo trattamento con lisozima (100 mg/ml) i ceppi hanno mostrato una migliore resistenza al pH acido (2,5), con un incremento della vitalità cellulare compreso tra il 2% ed il 15%. Al contrario l'esposizione a pH acido non ha in nessuna maniera influenzato ne le caratteristiche di resistenza ai sali biliari (1%) dei ceppi o la capacità di aderire alle cellule di *S. cerevisiae*.

Valutazione della capacità adesiva su linea cellulare CACO-2

I ceppi selezionati 32-39-41 e 55 sono stati valutati per la capacità di adesione intestinale *in vitro* su linee cellulari CACO-2. Di seguito sono riportate le foto relative alla prova per ciascun ceppo (Figura 1-2-3-4)

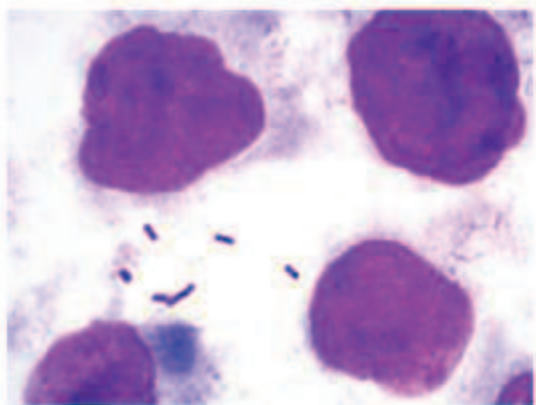


Fig.1: Adesione ceppo 39

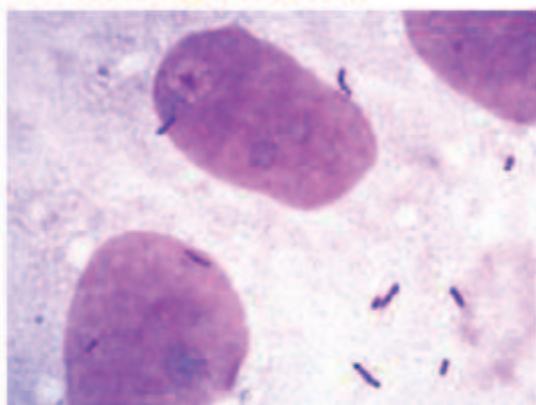


Fig.2: Adesione ceppo 41

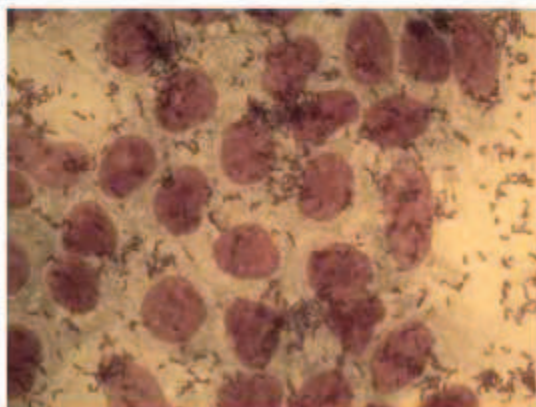


Fig.3: Adesione ceppo 32

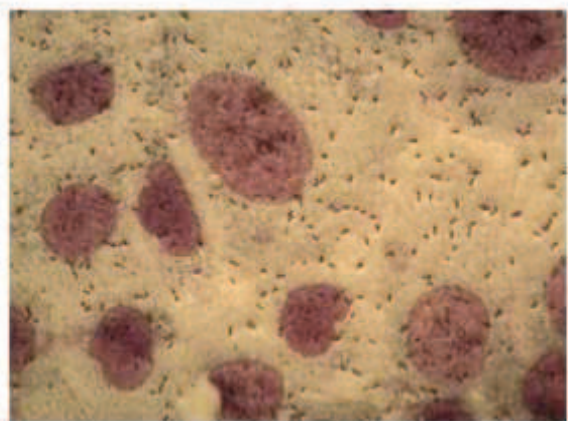


Fig.4: Adesione ceppo 55

Come si può osservare dalle foto il ceppo che ha mostrato le migliori capacità di adesione è stato il ceppo 32. Tale ceppo sembrerebbe aderire in misura maggiore rispetto agli altri, che non rimangono invece adesi alle cellule intestinali

I ceppi selezionati sono stati sottoposti ad alcune prove preliminari di impiego in latte di asina. Queste prove sono state effettuate al fine di testare l'effettiva capacità dei ceppi di crescere in una matrice particolare, quale il latte d'asina e di valutare (in maniera preliminare) le caratteristiche organolettiche dei prodotti ottenuti. I ceppi di *Lb plantarum* sono stati inoculati nel latte singolarmente ed in combinazione con ceppi del commercio (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii*) in ragione dell'1%. Sono state allestite sette aliquote di latte d'asina (100 ml) al fine di testare sette possibili alternative. A seconda dei ceppi scelti è stato utilizzato un appropriato protocollo. Una volta che i prodotti hanno raggiunto valore di pH pari a 4,5 sono stati messi in condizione di refrigerazione.

Sono state successivamente effettuate analisi in merito all'enumerazione dei batteri lattici nei campioni, al fine di verificare lo sviluppo degli stessi in latte d'asina; nonché una valutazione delle caratteristiche organolettiche dei prodotti ottenuti. A seguito di quest'ultima è stato possibile verificare l'effettiva influenza dei ceppi usati sull'aroma del prodotto. La combinazione di *Lb plantarum* con ceppi del commercio (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii*) è sembrata essere la più idonea, anche se il basso tenore proteico dello stesso latte d'asina rappresenta un limite per l'ottenimento di una texture adeguata. Tutti i ceppi erano in grado di mantenere cariche dell'ordine di 10^6 UFC/ml anche dopo 25 giorni di stoccaggio del prodotto a temperatura di refrigerazione. Una volta scelti i ceppi da impiegare, la realizzazione di un prodotto probiotico a base di latte d'asina sembra quindi essere possibile.

Si riportano inoltre di seguito le tabelle relative alla composizione chimica dei prodotti probiotici realizzati.

Tabella 3: Caratteristiche qualitative della bevanda probiotica a base di latte d'asina

		Media	DS
Sostanza secca	%	8.90	0.111
Grasso	%	0.22	0.042
Proteine	%	1.06	0.083
Ceneri	%	0.36	0.021

Tabella 4: Composizione minerale della bevanda probiotica a base di latte d'asina^a

Macroelementi (mg/kg)		
	Media	DS
Ca	663,12	49,800
P	54,69	3,120
K	758,75	40,09
Mg	84,69	6,070
Na	202,19	25,67
Microelementi (mg/kg)		
	Media	DS
Zn	1,87	1,109
Fe	nd	-
Mn	nd	-
Cu	nd	-
Se	nd	-

^a DS: deviazione standard; nd: non determinabile

Tabella 5. Composizione acidica media della bevanda probiotica a base di latte di asina Amiatina (% degli acidi grassi totali)

	Media	DS		Media	DS
C4:0	0,07	0,043	C20:0	0,03	0,006
C6:0	0,44	0,085	C20:1	2,48	0,136
C8:0	6,37	0,370	C21:0	0,12	0,125
C10:0	14,34	0,564	C20:2	0,14	0,014
C11:0	2,38	0,197	C20:3n6	0,03	0,010
C12:0	13,69	0,477	C20:4n6	0,04	0,008
C13:0	0,06	0,023	C20:3n3	0,05	0,017
C14:0	9,44	0,184	C22:0	0,02	0,006
C14:1	0,54	0,055	C22:1	0,03	0,015
C15:0	0,29	0,028	C20:5n3	0,01	0,004
C15:1	0,18	0,015	C23:0	0,01	0,009
C16:0	18,42	0,176	C22:2	0,007	0,005
C16:1	2,27	0,042	C24:0	0,01	0,003
C17:0	0,26	0,028	C24:1	0,03	0,011
C17:1	0,33	0,033	C22:5n3	0,00	0,000
C18:0	1,64	0,181	C22:6	0,06	0,011
C18:1 t9	0,02	0,011	SCFA	21,23	1,058
C18:1 t11	0,48	0,094	MCFA	47,83	0,747
C18:1 c9	16,73	0,879	LCFA	30,94	1,802
C18:2 t9,12	0,02	0,022	SFA	67,58	1,741
C18:2 c9,12	8,68	0,759	MUFA	23,08	1,016

C18:3 n6	0,01	0,009	PUFA	9,34	0,746
C18:3 n3	0,30	0,053	n3/n6	0,05	0,010
			Ins/Sfa	0,48	0,037

Abbreviazioni^a: SCFA: acidi grassi a corta catena (da 4 a 10 C); MCFA: acidi grassi a media catena (da 11 a 17 C); LCFA: acidi grassi a lunga catena (da 18 a 24 C); SFA: acidi grassi saturi; MUFA: acidi grassi monoinsaturi; PUFA: acidi grassi poliinsaturi; Ins/Sfa: acidi grassi insaturi/acidi grassi saturi; DS: deviazione standard.

FASE 6 Coinvolgimento dei produttori primari e creazione di una rete di vendita

Azione prevista nella fase 6.1: Riordinare ed aggiornare l'archivio anagrafico dell'Asino dell'Amiata

Partner attuatore: A1- Associazione Regionale Allevatori della Toscana

Stato di avanzamento della fase: **Conclusa**

Sono state effettuate le operazioni di aggiornamento del registro anagrafico della popolazione di Asino Amiatino, sono stati contattati i proprietari di animali iscritti ai quali è stato richiesto l'aggiornamento dei loro dati (indirizzo, recapito telefonico) e del numero dei capi.

Azione prevista nella fase 6.2: Individuare una rete di produttori interessati a gestire un allevamento di asine per la produzione di latte

Partner attuatore: A3- Associazione Allevatori Micci Amiatini

Stato di avanzamento della fase: **Conclusa.**

L'associazione si è impegnata nel contattare gli allevatori di animali iscritti al registro anagrafico al fine di distribuire sul territorio della provincia di Grosseto i questionari messi a punto dal partner P2 per il corretto svolgimento della fase 6.3

Azione prevista nella fase 6.3: Creazione rete di vendita

Partner attuatore: P2-Dipartimento di Scienze Veterinarie

Stato di avanzamento della fase: **Conclusa**

Nel dettaglio le attività realizzate da maggio 2012 ad oggi sono state diverse.

Nell'ambito della FASE 6.3 sono state svolte interviste ai principali allevatori di asini di razza amiatina sul territorio toscano. Le interviste, realizzate sulla base di un questionario semi-strutturato, hanno avuto come obiettivo quello di verificare le consistenze degli asini e comprendere le attuali propensioni, sia tecniche che gestionali degli allevatori. Inoltre, le interviste sono servite per conoscere le posizioni degli allevatori relativamente al possibile sviluppo di una filiera del latte d'asina sul territorio toscano.

Stante la situazione di estrema frammentazione degli allevamenti e la loro piccola dimensione in termini di capi allevati, è stato concordato insieme agli altri portatori di progetto, di restringere ulteriormente il campione da sottoporre ad intervista e di passare a considerare solo gli allevamenti toscani con più di dieci capi. La scelta è stata dettata dall'esigenza di trovare soggetti che potessero essere nelle condizioni di diversificare la propria attività aziendale orientandosi verso un indirizzo produttivo latte. In tal modo il campione è passato da 37 allevamenti a 17 (vedi tabella 1).

Tabella 1 – Elenco degli allevamenti toscani con più di dieci capi (dati al 8/5/2012)

Provincia	Numero capi	Numero allevamenti
Arezzo	0	0
Firenze	0	0
Grosseto	312	13
Livorno	0	0
Lucca	0	0
Massa Carrara	20	1
Pisa	49	1
Pistoia	0	0

Siena	62	2
Totale toscana	443	17

Fonte: nostra elaborazione su dati ARA

Gli allevatori che si sono resi disponibili per l'intervista sono stati 11 (rispetto ai 17 del campione individuato sulla base dei dati forniti dall'Associazione Regionale Allevatori (ARA) toscana - *partner A1 del progetto*), di cui 10 presenti nella provincia di Grosseto e 1 nella provincia di Massa Carrara.

Le interviste, che hanno consentito di raccogliere informazioni sia di tipo qualitativo che quantitativo, sono state realizzate nelle aziende degli intervistati nel periodo di luglio-settembre 2012.

Al termine delle interviste è stato realizzato un Report, in cui sono state riportate le informazioni relative alle 11 aziende intervistate e sono stati sinteticamente riportati i punti di forza e quelli di debolezza in relazione al possibile coinvolgimento di tali aziende nella filiera toscana del latte di asina.

Successivamente sono stati realizzati incontri con realtà produttive presenti sul territorio nazionale e sono state raccolte informazioni su iniziative di valorizzazione di filiere del latte d'asina oltre a quella toscana.

A fine maggio (29-30 maggio 2012) è stata realizzata una visita presso un'azienda che ha già avuto esperienza nella creazione della filiera di latte d'asina. Si tratta dell'azienda ASILAT, azienda agricola finalizzata alla produzione di latte d'asina. Nasce nel 1999 alle pendici dell'Etna, a circa 600 metri sul livello del mare e nel 2001 ottiene, prima azienda nel settore in Italia, l'autorizzazione alla vendita diretta di latte d'asina. A seguito della visita è stato predisposto un Report in cui è stata sintetizzata tale esperienza.

A gennaio 2013 (3 gennaio 2013) è stata realizzata una visita presso un'azienda laziale che ha già avuto esperienza nella creazione della filiera di latte d'asina.

Si tratta dell'Azienda Mariucci che ha una consolidata esperienza nel settore dell'allevamento degli asini e della produzione e vendita di Latte di Asina BIOLOGICO (certificazione CEDA ICEA Lazio – data 1° emissione 15/07/2011), settore in cui opera da marzo 2004. Presenta inoltre uno stabilimento per il trattamento termico e confezionamento del latte di asina con bollo Ce (numero Ce B161A) (ottenuto dopo due anni dalla richiesta).

E' situata alle porte di Roma Nord sulla via Flaminia nel comune di Rignano Flaminio in provincia di Roma. A seguito della visita è stato predisposto un Report in cui è stata sintetizzata l'esperienza (vedi allegato).

A marzo 2013 (3-4 marzo 2013) è stata realizzata una visita presso l'Azienda LatteA. L'azienda è sita in Oliveto Citra, piccolo comune della provincia di Salerno, immerso nel verde delle colline a ridosso dei monti Picentini.

L'allevamento è composto da circa 70 capi, allevati allo stato semibrado e alimentati al pascolo con l'integrazione di mangimi.

Tutti gli animali sono controllati secondo le normative vigenti dalla Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università "Federico II" di Napoli, e tutto il latte prodotto è sottoposto alle analisi dell'Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno. A seguito della visita è stato predisposto un Report in cui è stata sintetizzata l'esperienza.

Ad aprile 2013 (22-23 aprile) è stata realizzata una visita presso l'azienda agricola Asi Lait. L'azienda è sita in San Benigno Canavese (To) e l'allevamento è composto da circa 70 capi.

Tutti gli animali sono controllati dal punto di vista sanitario e l'azienda segue un proprio protocollo HACCP che prevede analisi chimiche e batteriologiche del latte con cadenza quindicinale.

L'Asi Lait mette commercializza latte imbottigliato e congelato, inoltre ha da poco avviato la produzione e commercializzazione di gelato a base di latte di asina.

Di seguito si riportano le iniziative di valorizzazione raccolte nel corso del lavoro.

- Coldiretti Piemonte, Oirm, Cnr-Ispa e Angea onlus sottoscrivono, nel corso del 2012, un impegno che mira alla realizzazione di una filiera garantita di latte d'asina piemontese e a tale proposito istituiscono un comitato tecnico-scientifico che progetti, coordini e controlli tutta la filiera. Tale comitato avrà i compiti di redigere un disciplinare di filiera per la produzione del latte d'asina - che, partendo dalla definizione dei requisiti degli allevamenti e del latte da loro prodotto, regolamenti tutti gli altri anelli della filiera sino al consumo -, di ideare progetti di ricerca e sviluppo, di ricercare dei partner in grado di trasformare il latte d'asina, di commercializzarne i derivati e di promuovere a tutti i livelli la conoscenza del latte d'asina e dei suoi utilizzi.
- A fine 2012 è giunto a conclusione un lavoro di ricerca, finanziato da Eurolactis Group sa - ditta cosmetica e farmaceutica italo-svizzera, che si sta insediando in Piemonte - finalizzato alla realizzazione di una gamma di prodotti nutraceutici, probiotici e parafarmaceutici a base di latte d'asina. Tale azienda sta attualmente lavorando in collaborazione con l'azienda agricola Montebaducco, di Salvarano di Quattro Castella, in provincia di Reggio Emilia.
- Si chiama Y-oh ed è uno yogurt fatto con il latte d'asina, digeribile, ipoallergenico, magro e ad alto valore nutritivo con un ceppo selezionato di fermenti probiotici. In vendita in vasetti di vetro da 120 ml, nasce dalla collaborazione di due aziende al femminile, la Cieri Milva di Tuffillo (www.latteasinacierimilva.it) che alleva, produce e imbottiglia latte di asina, e la piemontese Balansino Katiusha di Arona (www.balansino.it) che trasforma il latte di asina. Il nuovo prodotto è stato presentato per la prima volta in Europa ad ottobre 2012 al Salone internazionale del gusto di Torino.
- In Basilicata, alle porte del Parco Nazionale del Pollino, l'azienda Sagittario, in cui da circa dieci anni si allevano asine (una cinquantina, di razze ragusana, di martina franca e amiatina), ha avviato a novembre 2012 una stretta collaborazione con l'Università degli Studi della Basilicata (Facoltà di scienze agrarie, forestali, alimentari e ambientali) e con Basilicata Innovazione (Servizio di Trasferimento Tecnologico), proprio per verificare la praticabilità di produzioni alternative a quella del latte fresco.
- Nel corso del 2011 Piero D'Imperio, proprietario dell'azienda Sagittario, si rivolse presentando a Basilicata Innovazione l'esigenza di sperimentare nuovi processi di conservazione e di trasformazione del latte d'asina con il fine ultimo di prolungarne la shelf life e consentirne l'impiego in mercati alternativi a quello del "fresco". La sua richiesta si è tramutata presto in un vero e proprio progetto, coinvolgendo in esso la dottoressa Annamaria Perna e il professor Emilio Gambacorta della Scuola di Scienze agrarie, forestali, alimentari e ambientali dell'Università della Basilicata. Nell'arco di pochi mesi l'iniziativa è stata poi estesa al Citla (Consorzio Italiano Tutela Latte d'Asina) e ad altre quattro imprese lucane (altri due allevamenti, un'azienda di produzione di piante officinali e una apiaria, coinvolte nell'arricchimento di alcuni prodotti). La prima tecnica sperimentata è stata quella della liofilizzazione di prodotti fermentati, tra cui lo yogurt e il kefir, sia nella versione classica che in quelle "arricchite" con olio di rosmarino e miele. La sperimentazione ha messo in luce che la trasformazione del latte di asina in prodotti fermentati esalta le caratteristiche nutrizionali e nutraceutiche del prodotto base, permettendo di indirizzare questi prodotti anche ai soggetti intolleranti.
- A gennaio 2012 Milva Cieri, proprietaria dell'omonima azienda polifunzionale estesa su 42 ettari, insieme a piccoli imprenditori agricoli ha acquistato a Giarratana 50 asine di razza pura ragusana iscritte all'Aia, l'Associazione italiana allevatori della Sicilia, particolarmente

indicate per la produzione di latte. Questi capi di pregio si aggiungono ad altri 22 della stessa razza provenienti dalla Calabria. Nasce così un progetto di valorizzazione del latte d'asina che porta la firma di Nicandro Gambuto, esperto del settore che ha scommesso sulla reintroduzione e l'utilizzo degli asini nel comprensorio portando avanti con l'istituto d'istruzione superiore "Spataro" di Gissi nel quale insegna, e con l'associazione culturale Abruzzo futuro di Liscia, attività didattiche e divulgative. Intanto l'azienda vastese Cieri ha stipulato un accordo commerciale esclusivo con il Consorzio nazionale Allevasini di Roma, associato alla federazione agricola Coldiretti che garantirà il ritiro del latte e, insieme alla Asl Vasto-Lanciano-Chieti, la salubrità e la bontà del prodotto secondo gli standard qualitativi imposti dalla Cee.

Questo lavoro di indagine ha portato a creare un ulteriore indirizzario (di seguito riportato), in cui far convergere tali iniziative.

- azienda agricola di Cieri Milva, Tuffillo 66050 (ch) c.da Pozzitello tel: 0873950018, fax: 0873950018, cell: 3295916621
- Laura Cavallarin, facoltà di medicina veterinaria dell'università di Torino, via Leonardo da vinci, 44 - 10095 Grugliasco (to), phone: 011 6709234 - fax 011 6709297
- Angea - associazione nazionale genitori eczema atopico e allergie alimentari – onlus, sede legale: corso unione sovietica, 246 - 10134 Torino – italia, c.f. 97617810011, segreteria: c/o Oirm piazza Polonia 94 - 10126 Torino – Italia percorso a, piano 3, tel 0113135506, tel 3346667694, fax 363486060333
- Coldiretti Piemonte, piazza San Carlo, 19710123 Torino, telefono 011 562 2800
- Eurolactis Italia Srl, Sede operativa Via Boccaccio, 12/14, 20013 Magenta (MI), T +39 02 91988749, F +39 051 740 1826, H 199 662528 (199 ONALAT)
- Azienda agricola "La stalletta" di Mario Pucci Via Gromelduro, Località Molinello di Albino (Bergamo) tel335_8364060, e-mail: puccimario@libero.it
- Azienda Prato - Trimboli di Trimboli Maria Caterina, BOVALINO MARINA (RC)Tel. 333/8204455
- Sagittario S.r.l., LAURIA (PZ), Tel. 0973/823663 -- 3388640742
- Presidente del Consorzio CITLA Prof. Giacomo Antonio Rossini - Tel. 338/5239299, www.lattediasina.net

Partecipazione a incontri/riunioni

I soggetti del gruppo di lavoro hanno preso contatti con soggetti del partenariato e hanno partecipato a riunioni di coordinamento.

È stato organizzato un' incontro tra i soggetti del gruppo di lavoro ed il veterinario responsabile dell'ASL 9 di Grosseto per discutere sui requisiti igienico-sanitari che le aziende interessate alla vendita del latte o al conferimento di latte al centro di raccolta dovranno rispettare.

E' stato effettuato un incontro con i referenti della Struttura Dipartimentale di Allergologia dell'ospedale pediatrico Meyer, a seguito dell'interesse che il latte di asina ha nel trattamento di patologie pediatriche legate ad allergie alimentari quali quella alle proteine del latte bovino.

I soggetti del gruppo hanno partecipato al seminario conclusivo del progetto Valorizzazione genotipi animali autoctoni (VAGAL) dal titolo "Sperimentazione e divulgazione tecniche per la mungitura, conservazione e commercializzazione del latte d'Asina dell'Amiata" svoltosi presso l'azienda agricola Poggio alle Cavalle (Suvereto – Livorno) il 7 giugno 2012

I soggetti del gruppo di lavoro hanno partecipato a un seminario in data 23 aprile 2013 a Torino dal titolo “Sanità e benessere nell’allevamento dell’asina” organizzato dall’Istituto zooprofilattico sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d’Aosta

Prodotti realizzati

I prodotti che ad oggi sono stati realizzati dal gruppo di lavoro P2 sono:

- Report. Interviste ai principali allevatori dell’asino amiatino in Toscana
- Report. Azienda Asilat.
- Report Azienda LatteA
- Report Azienda Agricola Santa Maria, Paliano (Frosinone)
- Report Azienda Mariucci
- Report Azienda Agricola Asi Lait

Sono state inoltre sviluppate linee guida per la gestione della filiera del latte di asina condivise con i soggetti che faranno parte della filiera (vedi allegato).

Il partner P2 ha curato la stesura della linee guida, coinvolgendo nella stesura anche altri partner del progetto.

Il partner P2 ha contribuito anche alla realizzazione della fase 7 “Disseminazione”. E’ stato pubblicato un articolo sull’Informatore agrario: Martini M. et al. (2012) Valorizzare il latte di asina, Informatore agrario n. 47/2012. Inoltre è stata accettato un articolo dalla rivista Largo Consumo a nome Moruzzo R., Rossignoli C. dal titolo Le strategie competitive e di marketing a sostegno della valorizzazione del latte d’asina, che sarà pubblicato a fine ottobre 2013.

FASE 7: Diffusione dei risultati

Azione prevista nella fase 7.1: Realizzazione incontri con portatori di interesse e pubblicazione di una relazione finale

Partner attuatore: P4- Provincia di Grosseto: area ambiente, conservazione della natura

Stato di avanzamento della fase: **Conclusa**

Dettaglio azioni realizzate nella fase:

I risultati relativi allo studio in oggetto sono stati organizzati in relazioni e tabelle e resi pubblici tramite divulgazione sul territorio competente. Allo scopo sono stati organizzati convegni e incontri rivolti agli allevatori ed alle organizzazioni di settore.

Le attività divulgative previste sono state incentrate sulla diffusione dei risultati parziali e finali del progetto sotto ogni suo aspetto, dedicando particolare attenzione all’impatto della creazione dei prototipi di SLZM e di UMM sulla filiera, nonché alla linea di confezionamento e congelamento del prodotto.

Sono stati inoltre oggetto di divulgazione i risultati relativi alla creazione della rete di vendita e della filiera latte d’asino. Tali azioni sono state portate a termine mediante:

1. l’organizzazione di due convegni, uno intermedio ed uno finale;
2. la realizzazione di spot pubblicitari e servizi televisivi, sulle reti locali, relativi ai risultati;
3. la creazione di un portale dinamico relativo al progetto;
4. la creazione di una pubblicazione da diffondere localmente (Linee Guida per l’allevamento);
5. la creazione di materiale di promozione (locandine, pieghevoli, banner, cartelline, borse e gadget) da distribuire in sede di convegno;
6. la creazione di un DVD divulgativo;

7. l'organizzazione di una giornata dedicata al tema del progetto FILAMI nell'ambito delle giornate di FESTAMBIENTE, al fine di promuovere la diffusione dell'asino Amiatino e le finalità del progetto con bambini/ragazzi e le loro famiglie, turisti e cittadini;

AZIONI REALIZZATE

1. In collaborazione con l'**Associazione Strada del Vino e dei Sapori Monteregio di Massa Marittima**, Al fine di veicolare il progetto FILAMI verranno realizzate le seguenti azioni: stampa di 10 Totem informativi alti 200 cm; **Stampa di 50 espositori da banco**, in formato A4 doubleface; **Organizzazione di 2 cene con degustazione di prodotti a base di latte di asina** in collaborazione con l'Associazione "I Socci Golosi di Scarlino" e "Slow Food Monteregio", a (Scarlino e Campo Ruffaldo, **31/07/2013 e 11/08/2013**).
2. Per la promozione del progetto sono state realizzate due tipologie di **depliant informativi tre ante** (quadricromia, 2000 copie ciascuno). Il primo è stato distribuito durante lo svolgimento del progetto e il secondo, con un breve riassunto delle linee guida per i potenziali allevatori, distribuito in occasione della giornata dedicata al progetto FILAMI nell'ambito di FESTAMBIENTE (12/08/2013).
3. È stato realizzato un opuscolo con le Linee Guida per l'allevamento di asine da latte che fornisce uno strumento semplice ma efficace per chi vuole intraprendere questo tipo di attività (300 copie, 40 pagine, vedi allegato). L'opuscolo è stato presentato e distribuito in occasione della giornata conclusiva del 12 agosto.
4. Nel numero di dicembre 2012 della **Nuova Ecologia, mensile di divulgazione scientifica dell'Associazione Legambiente**, è stato pubblicato un servizio specifico sul progetto FILAMI
5. Dalla data di approvazione del progetto ad oggi sono stati pubblicati molti articoli inerenti il progetto sui quotidiani locali come per la **comunicazione dell'evento 5 aprile 2013**
6. In programma uno **speciale di approfondimento** sul progetto FILAMI della **durata di 10 minuti** in onda su **TV9**, anche nell'ambito di dibattiti e programmi televisivi inseriti nel palinsesto, ed è stato integrato con le immagini della giornata conclusiva del 12 agosto 2013.
7. Organizzazione di un evento pubblico PROGETTO FILAMI – Quali prospettive per la filiera del latte d'asina, Venerdì 5 aprile 2013 presso la Sala Ausser del Puntone di Scarlino, con la partecipazione di circa 50 persone. In particolare durante il coffee break sono stati serviti prodotti locali e biologici, degustazione latte d'asina biologico; oltre al normale servizio di *beverage* con caffè, tè e succhi di frutta e snack salati e dolci.
8. Sono stati realizzati due tipologie di **messaggi spot da 30 secondi** ciascuno, che sono stati mandati in onda a rotazione nelle varie fasce del palinsesto di TV9, con particolare riguardo al TG del mattino e della sera dal 29/07/2013 al 12/08/2013 per un totale di 225 passaggi (vedi tabella sottostante e CD allegati).

Cod.	ID	Descrizione
A	filami2013spot1	FILAMI SPOT 1
B	filami2013spot2	FILAMI SPOT 2

Data	Orari previsti di trasmissione	Tot.
lun 29/07/2013	19:50 A 20:10 B 20:45 A 20:55 B 21:45 A 22:25 B 23:15 A 23:45 B	8
mar 30/07/2013	07:40 A 08:20 B 09:05 A 12:40 B 13:05 A 13:45 B 14:00 A 19:20 B 19:50 A 20:10 B 20:18 A 20:45 B 21:15 A 22:20 B 22:45 A 23:30 B	16
mer 31/07/2013	07:00 A 07:40 B 08:30 A 12:40 B 13:10 A 13:45 B 14:00 A 19:20 B 19:40 A 20:10 B 20:45 A 20:55 B 21:15 A 22:00 B 22:55 A 23:45 B	16
gio 01/08/2013	07:00 A 07:30 B 08:20 A 12:40 B 13:05 A 13:45 B 14:00 A 19:20 B 19:40 A 20:10 B 20:45 A 20:55 B 21:35 A 22:15 B 22:45 A 23:30 B	16
ven 02/08/2013	07:30 A 08:00 B 08:30 A 12:40 B 13:10 A 13:45 B 14:00 A 19:00 B 19:50 A 20:18 B 20:45 A 20:55 B 21:15 A 22:20 B 23:00 A 23:30 B	16
sab 03/08/2013	07:00 A 08:00 B 09:05 A 12:40 B 13:05 A 13:45 B 14:00 A 19:20 B 19:50 A 20:10 B 20:45 A 20:55 B 21:35 A 22:00 B 22:45 A 23:30 B	16
dom 04/08/2013	07:30 A 08:00 B 08:20 A 12:45 B 13:20 A 13:45 B 14:00 A 19:10 B 19:35 A 20:20 B 20:25 A 20:50 B 21:25 A 21:50 B 22:15 A 23:30 B	16
lun 05/08/2013	07:00 A 07:40 B 08:30 A 12:40 B 13:05 A 13:45 B 14:00 A 19:40 B 19:50 A 20:10 B 20:45 A 20:55 B 21:45 A 22:05 B 23:00 A 23:30 B	16
mar 06/08/2013	07:30 A 08:00 B 09:05 A 12:40 B 13:10 A 13:45 B 14:00 A 19:20 B 19:50 A 20:10 B 20:18 A 20:45 B 21:15 A 22:00 B 22:45 A 23:30 B	16
mer 07/08/2013	07:00 A 07:40 B 08:40 A 12:48 B 13:10 A 13:45 B 14:00 A 19:20 B 19:40 A 20:10 B 20:45 A 20:55 B 21:15 A 22:00 B 22:55 A 23:30 B	16
gio 08/08/2013	07:00 A 08:00 B 08:30 A 12:40 B 13:05 A 13:45 B 14:00 A 19:20 B 19:50 A 20:10 B 20:45 A 20:55 B 21:35 A 22:15 B 23:00 A 23:30 B	16
ven 09/08/2013	07:30 A 08:00 B 08:40 A 12:40 B 13:10 A 13:45 B 14:00 A 19:00 B 19:50 A 20:18 B 20:45 A 20:55 B 21:15 A 22:20 B 22:45 A 23:30 B	16
sab 10/08/2013	07:00 A 08:00 B 09:05 A 12:40 B 13:05 A 13:45 B 14:00 A 19:20 B 19:50 A 20:10 B 20:45 A 20:55 B 21:35 A 22:00 B 23:00 A 23:30 B	16
dom 11/08/2013	07:30 A 08:00 B 08:40 A 12:45 B 13:20 A 13:45 B 14:00 A 19:10 B 19:35 A 20:20 B 20:25 A 20:51 B 21:25 A 21:50 B 22:15 A 23:30 B	16
lun 12/08/2013	07:00 A 07:10 B 07:40 A 08:10 B 08:30 A 12:40 B 13:10 A 13:45 B 14:00 A	9
	Numero passaggi: 225	
	Gli orari potrebbero subire variazioni in più o in meno fino ad un massimo di 30 min.	

Tab. 1 – Passaggi Spot TV9.

9. Realizzazione di un **DVD** (200 copie) con immagini, musica ed interviste sul progetto FILAMI della durata di 10 minuti (Vedi allegato DVD).
10. Organizzazione di una giornata conclusiva di presentazione dei risultati del progetto nell'ambito di FESTAMBIENTE, presso il Centro Nazionale di Legambiente, il 12/08/2013. Nel corso della giornata è stato realizzato il **Convegno** "Produzione, utilizzo e commercializzazione del latte d'asina amiatina: aspetti innovativi e sostenibilità ambientale", con pranzo offerto ai partecipanti (70 persone), un **Laboratorio tematico di educazione ambientale** con la presenza dell'asina (2 Femmine con puledri) presso la Casa Ecologica e un **dibattito pubblico (a seguire cena conclusiva dei partner coinvolti)**. Per coinvolgere quante più persone possibile sono state realizzate e inviate a mezzo posta 500 cartoline di invito al convegno. Tramite posta elettronica è stato inviato anche un modulo in PDF scrivibile di pre-adesione al convegno. Ai partecipanti al convegno è stata consegnata una borsa, con stampa dei loghi e del titolo del progetto, contenente materiale informativo e gadget relativi al progetto (quaderno appunti con asinello FILAMI e logo partner, calamita decorativa in materiale ecologico con asino amiatino, borraccia pieghevole con titolo del progetto, DVD); per la promozione del convegno è stato realizzato anche uno striscione 2 m x 1 m in quadricromia (Vedi allegato CD).

11. Nel **Nuovo sito della Provincia di Grosseto**, è presente una sezione specifica sul progetto FILAMI. www.provincia.grosseto.it

Azione prevista nella fase 7.2: Disseminazione di informazioni sugli stati di avanzamento del progetto

Partner attuatore: A4- Associazione culturale Sinergie Progetto Asinomania

Stato di avanzamento della fase: Conclusa.

E' stata allestita la pagina web destinata ad esporre gli stati di avanzamento del progetto.