



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN
SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE E IL
TERRITORIO**

**EFFETTO DEL LIVELLO PROTEICO E DELL'AGGIUNTA DI
CONIUGATI DELL'ACIDO LINOLEICO (CLA)
SULL'ESCREZIONE DI AZOTO E FOSFORO E
SULL'EMISSIONE DI METANO IN VACCHE DA LATTE**

Relatore: Dott. Franco Tagliapietra
Correlatore: Dott. Giacomo Cesaro

Laureando: **Cristina Benetti**
Matricola: **1014417**

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

Indice

Riassunto	5
Abstract	7
1 Introduzione	9
1.1 Zootecnia e ambiente.....	9
1.2 Quadro normativo.....	12
1.3 Tenore di proteina nelle razioni alimentari	12
1.4 Coniugati dell'Acido Linoleico (CLA): biochimica e nutraceutica	14
2 Obiettivi	17
3 Materiali e metodi.....	19
3.1 Disegno sperimentale	19
3.2 Gruppi sperimentali e diete	19
3.3 Rilievi Sperimentali.....	20
Unifeed	20
Consumi.....	21
Peso, BCS, LS.....	21
Liquido ruminale	21
Ruminoattività	21
Sangue.....	22
Feci	22
Latte	22
3.4 Analisi chimiche.....	23
Dieta.....	23
Liquido ruminale	23
Sangue.....	24
Feci	24
Latte	25
3.5 Procedure di calcolo e stima.....	25
Ingestione alimentare.....	25
Digeribilità.....	26
Bilanci dell'azoto e del fosforo, produzione di metano.....	26

3.6	Analisi statistica dei dati.....	27
4	Risultati.....	29
	Consumi alimentari	29
	Stato corporeo.....	29
	Fermentazioni ruminali	29
	BUN.....	30
	Digeribilità.....	31
	Produzione e qualità del latte	32
	Bilancio dell'azoto	35
	Bilancio del fosforo	36
	Produzione di metano	37
5	Conclusioni	39
	Abbreviazioni.....	41
	Tabelle.....	43
6	Bibliografia	55

Riassunto

Le nuove normative internazionali sulla sostenibilità ambientale, l'aumento del costo delle materie prime di natura proteica e la sempre crescente attenzione dei consumatori per la sostenibilità e la salubrità degli alimenti acquistati obbliga gli allevatori a limitare la produzione di inquinanti derivanti dall'attività zootecnica, senza compromettere le prestazioni produttive degli animali.

La riduzione del tenore proteico della dieta di bovine in lattazione consente di ridurre l'escrezione di azoto, mentre i coniugati dell'acido linoleico rappresentano una classe di acidi grassi molto importanti dal punto di vista nutrizionale e nutraceutico.

Con il presente lavoro di tesi ci si è prefissi di studiare il bilancio dell'azoto e del fosforo e la produzione di metano di vacche da latte alimentate con razioni unifeed con livelli di proteina grezza convenzionali (15%PG) e ridotti (12%PG), in associazione o meno con CLA rumino protetto (rpCLA). A tal fine, gli effetti delle diete sperimentali sono stati valutati sulla digeribilità delle diete, sulla produzione e qualità del latte e su alcuni parametri ruminali e metabolici.

La prova è stata effettuata presso l'azienda agraria sperimentale "L. Toniolo" dell'Università degli Studi di Padova utilizzando venti vacche in lattazione di razza prevalentemente Frisona che sono state divise in quattro gruppi sperimentali. Le vacche sono state alimentate con 2 diverse diete a differenti tenori di PG (dieta convenzionale: PG = 15 % SS; dieta ipoproteica: PG = 12.0% SS) e integrate o meno con 80 g/d di rpCLA secondo un disegno sperimentale a doppio quadrato latino nidificato 2x2. Durante la prova, della durata di 3 mesi, sono stati effettuati dei rilievi sperimentali atti a evidenziare possibili influenze sugli animali derivanti dall'assunzione dei differenti livelli proteici e dall'aggiunta di rpCLA. Con scadenze ben precise sono stati effettuati i campionamenti del latte, i prelievi di sangue, feci e liquido ruminale e i rilievi dei consumi, del peso, del Body Condition Score e del Locomotion Score. Per quanto riguarda la dieta, all'inizio e alla fine della prova sono stati campionati tutti gli alimenti. Per stimare l'escrezione di azoto e di fosforo si è applicato il modello del bilancio aziendale proposto dall'ERM (2001), mentre per l'emissione enterica di metano è stata utilizzata l'equazione proposta da Mills *et al.* (2003).

L'utilizzo di diete a basso contenuto di proteina grezza non ha modificato l'ingestione degli animali ma ha diminuito di circa 1,5 litri la produzione di latte. Inoltre, rispetto a quelle convenzionali, le diete ipoproteiche hanno ridotto le concentrazioni dell'N ammoniacale nel rumine (-36%) e di quello ureico nel sangue (-47%) e nel latte (-48%). La digeribilità della dieta non è differita in misura significativa tra le tesi sperimentali e l'utilizzo di diete a basso contenuto

proteico ha permesso di migliorare l'efficienza di utilizzazione dell'azoto (+14%) e del fosforo (+2%) e di ridurre la produzione di metano (-9%).

L'aggiunta di rpCLA ha implicato una tendenziale riduzione dell'ingestione ma non ha modificato la produzione di latte (a parte il tenore di grasso che si è ridotto del 14%) e la conseguente ritenzione di azoto e fosforo. Di conseguenza, l'aggiunta di rpCLA sembra migliorare l'efficienza di utilizzazione dell'azoto (+7%) e del fosforo (+9%). Inoltre i CLA sembrano ridurre la degradazione ruminale della dieta e di conseguenza sembrano limitare la produzione di metano (-5%).

Non c'è stata significativa interazione dei rpCLA con la proteina della dieta, anche se un effetto dei rpCLA sul metabolismo proteico degli animali è emerso dal confronto con la concentrazione di urea nel sangue (BUN), infatti i rpCLA hanno ridotto di circa il 9% i valori di BUN.

Abstract

The new international standards for environmental sustainability, the rising cost of raw materials of protein nature and the increasing attention of consumers in the sustainability and safety of food purchased require farmers to limit production of pollutants from livestock activities, without affecting the production performance of animals.

The reduction of the protein level in the diet of lactating dairy cows can reduce the excretion of nitrogen, while the conjugated linoleic fatty acid are very important in nutritional and nutraceutical viewpoints.

This work was aimed to investigate the short term effects of conventional and reduced level of dietary CP, with or without the addition of rumen protected CLA (rpCLA). For this purpose, the effects of experimental diets were evaluated on the digestibility of the diets, on the production and quality of milk and on some metabolic parameters.

The test was carried out at the experimental farm "L. Toniolo ", University of Padova, using twenty lactating cows, mainly Holstein breed, which were divided into four experimental groups. The cows were fed 2 different diets at different levels of CP (conventional diet: CP = 15% OM; low-protein diet: CP = 12.0% OM) and supplemented or not top dressed with 80 g / d of conjugated linoleic acid rumen-protected (rpCLA), according to a double nested 2 x 2 latin square design. During the test period of 3 months, experimental measurements were carried out to highlight possible influences on animals resulting from providing different levels of protein and the addition of rpCLA. The sampling of milk, blood, feces and rumen fluid, food consumptions data, weight, changes in Locomotion and Body Condition Score were made with precise deadlines . With regard to the diet, at the beginning and end of the test all foods were sampled, except for the mineral vitamin supplement. N and P balances were computed using a mass balance approach proposed by ERM (2001), while the method proposed by Mills *et al.* (2003) was computed for the emission of enteric methane.

The use of diets with low protein content did not altered the intake of the animals but milk production was reduced to approximately 1.5 liters. Furthermore, compared to conventional diets, hypoproteic diets reduced concentrations of N in the rumen ammonia (-36%), the blood urea nitrogen (-47%) and milk urea nitrogen (-48%). The digestibility of the diets was not delayed significantly between experimental thesis and the use of low-protein diets improved the efficiency of nitrogen utilization (+14%) and phosphorus (+2%) and reduced the production of methane (-9%).

The addition of rpCLA implied a downward trend of ingestion but did not altered the production of milk (except fat content which has been reduced by 16%) and retention of nitrogen

and phosphorus. Consequently, the addition of rpCLA seemed to improve the efficiency of utilization of nitrogen (+7%) and phosphorus (+9%). CLA also appeared to reduce the diet ruminal degradability and therefore seemed to limit the production of methane (-5%).

There were not significant interaction of rpCLA with the protein level of the diet, even if an effect of rpCLA on protein metabolism of the animals emerged from the comparison with the concentration of blood urea (BUN), in fact rpCLA have reduced of about 9% the values of BUN.

1 Introduzione

1.1 Zootecnia e ambiente

In Italia l'evoluzione delle biotecnologie e il crescente interesse dei consumatori per prodotti sostenibili ed a basso impatto ambientale, ha comportato un cambiamento nel ruolo della zootecnia nella nostra società e nel ciclo di produzione degli alimenti di origine animale.

Secondo i dati del 6° Censimento generale dell'agricoltura (ISTAT, 2011), il profilo emergente dell'agricoltura italiana è il risultato di un processo pluriennale di concentrazione dei terreni agricoli e degli allevamenti in un numero sensibilmente ridotto di aziende. In Italia nell'ottobre 2010 risultavano attive 1.630.420 aziende agricole e zootecniche di cui 209.996 con allevamento di bestiame destinato alla vendita. La dimensione media aziendale è passata, in un decennio, da 5,5 ettari di *Superficie Agricola Utilizzabile* (SAU) per azienda a 7,9 ettari (+44,4%). Ciò è conseguenza di una forte contrazione del numero di aziende agricole e zootecniche attive (-32,2%) e di una diminuzione della superficie coltivata assai più contenuta (-2,3%). L'effetto delle politiche comunitarie e dell'andamento dei mercati ha determinato l'uscita di piccole aziende dal settore, favorendo la concentrazione dell'attività agricola e zootecnica in unità di maggiori dimensioni e avvicinando il nostro Paese alla struttura aziendale media europea.

Il settore agrozootecnico svolge, sin dalle sue origini, molteplici funzioni. Oltre alla produzione di alimenti, chi opera in questo settore assume un ruolo importante nella gestione del territorio e dell'ambiente. In particolare la zootecnia può contribuire alla qualità del suolo. Le deiezioni animali, ad esempio, possono essere impiegate come fertilizzanti organici; inoltre in molti Paesi del sud del mondo, il bestiame fornisce ancora la principale fonte di energia motrice (Crovetto *et al.*, 2010).

La relazione tra zootecnia e ambiente può essere anche negativa; principalmente le problematiche possono essere causate da pratiche di gestione aziendale non corrette, di conseguenza le emissioni da parte degli animali possono risultare inquinanti. L'impatto ambientale causato dagli allevamenti zootecnici si verifica in tutte le matrici ambientali come ad esempio l'emissione di gas serra in atmosfera, l'impoverimento del suolo dovuto al sovrappascolamento o l'eutrofizzazione delle acque dovuta ai reflui zootecnici.

Dal punto di vista ambientale l'impiego dei reflui zootecnici come fertilizzanti naturali risulta efficace se vengono considerate le caratteristiche del terreno, le esigenze della coltura da fertilizzare ed il clima, così da utilizzare la tecnica di distribuzione più idonea nonché la forma dei reflui (letame, liquame o pollina) più adatta. Maggiori sono i nutrienti contenuti nel refluo,

maggiore è la probabilità di avere perdite per lisciviazione e runoff. In quest'ottica assumono grande importanza la conoscenza del ciclo biologico delle specie coltivate e di quello colturale, che può variare in funzione del tipo di prodotto desiderato, delle tecniche colturali e delle esigenze di mercato (Borin *et al.*, 2003), in modo da far coincidere il più possibile il tipo di reflu e il periodo di spandimento con le esigenze nutrizionali della pianta.

Nelle deiezioni animali l'azoto si trova sia in forma organica (amminoacidi) che inorganica (ammoniaca, ione ammonio, nitriti e nitrati). La volatilizzazione dell'ammoniaca ha come conseguenza la deposizione, attraverso le piogge, di ioni ammonio, i quali vengono ossidati dai microrganismi del terreno. Gli ioni H^+ così prodotti contribuiscono all'acidificazione del suolo (Baird e Cann, 2006). I nitriti e i nitrati sono solubili in acqua e lisciviano facilmente per dilavamento venendo trasportati dall'acqua in tutti i corpi idrici, provocando problemi di eutrofizzazione nelle acque superficiali e problemi di potabilità nelle acque di falda. Con il termine eutrofizzazione si intende l'eccessivo accrescimento di piante acquatiche a causa della presenza di troppi nutrienti a cui si accompagnano effetti di ipossia/anossia nei fondali, specialmente nel periodo estivo, oltre che a creare problematiche per l'uso ricreativo della risorsa idrica.

Il fosforo presente nelle deiezioni viene adsorbito dalle particelle del suolo ed essendo caratterizzato da una scarsa mobilità non è soggetto a perdite per dilavamento. Subisce piuttosto fenomeni quali l'erosione e il runoff, in forma soprattutto particolata (Sharpey e Menzel, 1987). Anch'esso in quanto macroelemento contribuisce al fenomeno dell'eutrofizzazione.

Il settore zootecnico è responsabile di una vasta gamma di emissioni gassose, tra cui principalmente metano (CH_4), anidride carbonica (CO_2), protossido di azoto (N_2O) e ammoniaca (NH_3) derivanti soprattutto da fenomeni di eruttazione ruminale. Questi gas contribuiscono ad aumentare l'effetto serra (*greenhouse effect*), provocando un riscaldamento della temperatura media globale (*global warming*). La Convenzione Quadro delle Nazioni Unite sui Cambiamenti Climatici, approvata a New York il 9 maggio 1992, ha come obiettivo la stabilizzazione a livello planetario dell'emissione dei gas ad effetto serra i quali sono le principali sostanze in grado di interferire ed alterare il clima globale. Nel 2005 è entrato in vigore il protocollo di Kyoto, il cui obiettivo è la riduzione delle emissioni di gas serra rispetto all'anno di riferimento (1992) di una percentuale differente da Paese a Paese, ma con una media del 5,2% per i Paesi industrializzati (fonte UNFCCC). Nel 2008 l'Unione Europea ha approvato un obiettivo ancora più impegnativo: la riduzione del 20% delle emissioni di gas serra da raggiungere entro il 2020 (fonte EC).

Il contributo al riscaldamento globale di ogni gas è dovuto al peculiare comportamento delle proprie molecole all'incontro con la radiazione solare, oltre che alla quantità assoluta presente in atmosfera. Gli equivalenti di CO_2 vengono utilizzati per confrontare il potenziale di riscaldamento

globale di un gas (GWP = *Global Warming Potential*), prendendo come riferimento la CO₂, a cui viene assegnato un valore pari a 1, su un arco temporale di 100 anni. Secondo l'ultimo aggiornamento dell'IPCC (2007), metano e protossido di azoto hanno un GWP pari rispettivamente a 25 e 298.

L'emissione di gas serra del settore zootecnico è stata stimata essere il 18% delle emissioni antropiche totali di questi gas e l'80% delle emissioni del settore agricolo. La zootecnia contribuirebbe su scala globale con il 35-40% per le emissioni di metano, 9% per l'anidride carbonica e 65% per il protossido di azoto, mentre per l'ammoniaca si stima un contributo del 64% (Stenfield *et al.*, 2006).

L'anidride carbonica è il principale gas serra data l'elevata concentrazione di questo gas in atmosfera (382 ppm). Il contributo del settore zootecnico (9%) è calcolato sulla base dell'emissione dovuta all'uso di combustibile fossile per l'utilizzo di mezzi agricoli, per la produzione di alimenti, erbicidi e fertilizzanti. Viene considerato anche l'apporto della deforestazione nei paesi in via di sviluppo, caratterizzati da una zootecnia di tipo estensivo. L'emissione di CO₂ dai processi respiratori degli animali è compensata dal suo sequestro da parte delle colture destinate agli animali stessi, per cui questa fonte di emissione non viene considerata (Stenfield *et al.*, 2006).

Il metano è il secondo gas serra per concentrazione in atmosfera (1728 ppb) e possiede un GWP di 25. La zootecnia è responsabile del 35-40% delle emissioni antropiche di metano; l'origine di questo gas è dovuta alle fermentazioni ruminali, nel cieco dei monogastrici e dalle fermentazioni anaerobiche a carico di letame e liquame.

Il protossido di azoto, presente in piccole concentrazioni in atmosfera (318 ppb), presenta il valore di GWP maggiore (298) con una emivita di 150 anni. Il settore zootecnico contribuisce per il 65% alle emissioni globali antropiche di N₂O la cui produzione avviene in particolare durante la distribuzione dei reflui zootecnici e dipende da temperatura ambientale, umidità del suolo e sostanza secca del refluo. Il protossido di azoto è un prodotto intermedio della denitrificazione ovvero la conversione di nitrato a nitrito e a N₂. In una ricerca è stato calcolato che i sistemi zootecnici estensivi contribuiscono all'emissione di N₂O per il 65% del totale (Stenfield *et al.*, 2006).

L'ammoniaca volatilizza durante lo stoccaggio e lo spargimento dei reflui zootecnici e dei fertilizzanti azotati utilizzati per la produzione di alimenti per il bestiame: il 93% delle emissioni totali di NH₃ in Europa deriva dall'agricoltura (EEA, 2005). La quantità di ammoniaca volatilizzata dipende anche dal sistema di stabulazione, dalle pratiche di stoccaggio e di spargimento, nonché dalla forma fisica del refluo, dalle caratteristiche della superficie agricola e dalla temperatura ambientale, in quanto la volatilizzazione cresce all'aumento di quest'ultima.

1.2 Quadro normativo

Nel 1991 la CEE ha emanato la “Direttiva Nitrati” (Direttiva 91/676/CEE) il cui obbiettivo è la protezione e prevenzione delle acque dall’inquinamento da nitrati provenienti da fonti agricole. La direttiva ha imposto l’identificazione di *Zone Vulnerabili da Nitrati* (ZVN), in cui la concentrazione attuale o potenziale di NO_3 nei corpi idrici risulta maggiore di 50 mg/L e dove le fertilizzazioni azotate annuali non possono superare i 170 kg N/ha. Oltre a questo sono stati definiti dei *Programmi d’Azione* da attuare nelle ZVN e sono stati elaborati dei Codici di Buona Pratica Agricola (DM 19/04/99), obbligatori per le ZVN e facoltativi per zone non vulnerabili. La direttiva nitrati è stata recepita dall’Italia con il Decreto Legislativo 152/99.

Nel 1996 la Direttiva IPPC (96/61 EC) ha introdotto la logica dell'approccio integrato per tutelare l'ambiente nel suo complesso, stabilendo un'autorizzazione unica per gli scarichi in tutte le matrici ambientali. Inoltre i tipi di inquinanti e i relativi limiti di emissione delle attività non sono predefiniti per legge, ma sono da individuare in funzione delle BAT (*Best Available Technique*).

Il Decreto Legislativo 152 del 3/4/2006 (Norme in materia ambientale) e il D.M. 209 del 7/4/2006 stabiliscono i criteri e le norme tecniche generali per la disciplina, da parte delle Regioni, di utilizzazione agronomica degli effluenti e delle acque reflue provenienti dalle aziende zootecniche. I nuovi valori per la determinazione dell'escrezione azotata per tonnellata di peso vivo per le diverse specie e categorie di animali derivano dal progetto interregionale “bilancio dell'azoto negli allevamenti” (Legge 23/12/99 n. 499). Viene inoltre data la possibilità agli allevatori di presentare un proprio bilancio aziendale redatto da un tecnico qualora la gestione sia orientata alla riduzione del carico azotato emesso dagli animali.

Anche l’escrezione di fosforo nei reflui è iniziata ad essere oggetto delle normative: nel 2011 è stata concessa una deroga della Direttiva Nitrati all'Italia per le ZVN, con Decisione della CE del 3/11/2011, in cui viene considerato anche l'apporto di fosforo dei reflui zootecnici. Si assume che il valore del fosforo per l'effluente bovino e suino trattati sia pari al valore di N al campo/2,5, mentre per l'effluente suino tal quale sia pari al valore di N al campo/1,5. L'azienda in deroga può utilizzare in particolare anche frazioni chiarificate di effluenti suinicoli che garantiscano un rapporto $\text{N/P}_2\text{O}_5$ almeno pari a 2,5.

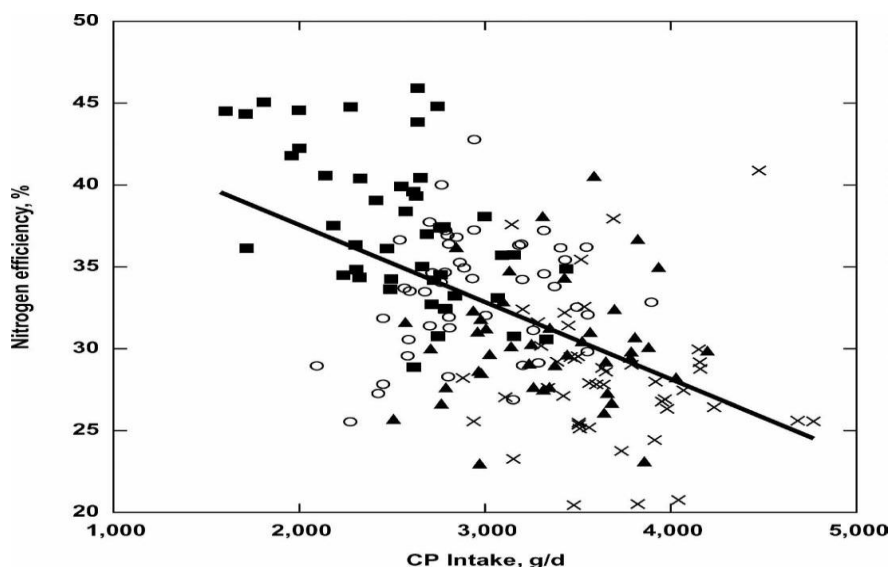
1.3 Tenore di proteina nelle razioni alimentari

A seguito dell’evoluzione delle normative, anche la zootecnia italiana deve necessariamente subire un cambiamento, in parte già in atto, adottando strategie di allevamento caratterizzate da basso impatto ambientale e da una alta efficienza di utilizzazione dei nutrienti (Crovetto *et al.*, 2010).

Tra le strategie gestionali una delle più immediate da adottare allo scopo di ridurre l'escrezione di azoto risulta essere la diminuzione del tenore proteico delle razioni. Le vacche da latte utilizzano la proteina somministrata con molta più efficienza rispetto agli altri ruminanti, ma l'escrezione dell'azoto assunto risulta essere 2-3 volte maggiore nelle deiezioni rispetto al contenuto del latte (Broderick, 2005). Ulteriori apporti di PG in eccesso rispetto al reale fabbisogno non vengono utilizzati per la sintesi del latte e non vengono assorbiti dall'organismo ma risultano persi attraverso le escrezioni di urine e feci. Diverse ricerche evidenziano come i parametri maggiormente correlati con le escrezioni di N sono il tenore proteico delle razioni alimentari e la quantità di alimento ingerito. Secondo il NRC (2001) una vacca di 680 kg in lattazione da 90 giorni che produce 25 kg di latte/d con un tenore in grasso pari a 3.5% e un tenore in proteina pari a 3.5% dovrebbe assumere circa il 15% di proteina grezza con la dieta per soddisfare i propri fabbisogni. A parità di altri fattori, l'efficienza di utilizzazione dell'azoto alimentare nella sintesi della proteina del latte aumenta al diminuire del tenore proteico della dieta (Børsting *et al.*, 2003; Crovetto *et al.*, 2009). La riduzione del tenore proteico della dieta di bovine in lattazione, pur somministrando un'adeguata quota di proteina by-pass, consente di ridurre l'escrezione di N urinario senza avere effetti negativi sulla produzione e sul tenore proteico del latte (Kröber *et al.*, 2000; Castillo *et al.*, 2001; Noftsker e St-Pierre, 2003). Uno studio effettuato in 89 allevamenti di vacche da latte nella provincia di Padova ha riscontrato che elevate produzioni medie giornaliere di latte possono essere ottenute anche utilizzando diete con un basso tenore di proteina grezza, precisamente produzioni di 31.1 kg/vacca/d utilizzando diete con il 14.5% di proteina grezza (Dal Maso *et al.*, 2009).

In figura 1 sono riportati i risultati di uno studio condotto da Kalscheur *et al.* (2006) nel quale è stata valutata la relazione fra tenore proteico della dieta, proteina degradabile ruminale ed efficienza di utilizzazione dell'azoto. Lo studio rivela come l'efficienza di utilizzazione dell'azoto nella vacca da latte diminuisca all'aumentare del tenore proteico della dieta e, a parità di proteina ingerita, l'efficienza risulti mediamente superiore per le diete con una minor percentuale di proteina degradabile a livello ruminale.

Figura 1. Efficienza di utilizzazione dell'azoto di diete con una diversa percentuale di proteina (PG % SS) e di proteina degradabile ruminale (% SS) di 6.8 (■), 8.2 (○), 9.6 (▲), e 11.0 (×).



1.4 Coniugati dell'Acido Linoleico (CLA): biochimica e nutraceutica

Fra le sostanze di natura lipidica i CLA (Conjugated Linoleic Acid) rappresentano una classe di acidi grassi molto importanti dal punto di vista nutrizionale e nutraceutico. Tra i coniugati dell'acido linoleico, quelli a cui si attribuiscono le maggiori attività biologiche sono il cis-9, trans-11 CLA e il trans-10, cis-12 CLA (Pariza *et al.*, 2001). I CLA vengono prodotti attraverso l'idrolisi e la bio-idrogenazione ruminale degli acidi grassi insaturi (C18:1, C18:2 e C18:3) assunti con la dieta, oppure attraverso la biosintesi endogena a livello mammario e nel tessuto adiposo, a partire dall'isomero trans-11 C18:1, composto intermedio della bio-idrogenazione. La scoperta del ruolo funzionale dei CLA risale a circa una trentina di anni fa, quando Pariza *et al.* (1979) scoprirono che la carne di manzo macinata conteneva un fattore anti-carcinogeno, identificato in una serie di isomeri dell'acido linoleico. I CLA in natura si trovano principalmente nei prodotti derivati dai ruminanti (latte e derivati, carne) mentre la loro concentrazione in alimenti ottenuti da animali monogastrici o presenti nei vegetali è piuttosto scarsa. Le sperimentazioni finora condotte *in vivo* su modelli animali (ratti e topi) e *in vitro* hanno confermato che i CLA possono evitare o ridurre l'insorgenza di tumori indotti chimicamente in diversi siti, quali la pelle, la ghiandola mammaria, il colon e lo stomaco (O'Shea *et al.*, 2004). Inoltre ai CLA è stata riconosciuta un'azione immunomodulante, antidiabetica e anticolesterolemica (Lee *et al.*, 1994).

Recentemente alcuni studi hanno ipotizzato che l'aggiunta di CLA alla dieta abbia effetti differenti sulle performance produttive e di escrezione degli animali in relazione al livello proteico della dieta (Park *et al.*, 1997; Pariza *et al.*, 2001). Uno studio condotto in provincia di Padova su 48

vitelloni Piemontesi (Schiavon *et al.*, 2011) ha dimostrato come l'efficienza di utilizzo dell'azoto sia stata influenzata positivamente dall'interazione favorevole di un basso livello proteico della dieta (11% PG) e CLA, rispetto a un elevato tenore proteico e CLA.

2 Obiettivi

L'obiettivo di questa sperimentazione è stato quello di valutare gli effetti di quattro diete contenenti due diversi livelli proteici integrate o meno con rpCLA, sull'escrezione di azoto, di fosforo e sulla produzione di metano da parte di 20 vacche da latte.

Le quattro diete sperimentali, due contenenti un tenore proteico convenzionale al 15% di proteina grezza e due ipoproteiche al 12% di proteina grezza sono state integrate o meno con rpCLA. Durante la prova sono state valutate le prestazioni produttive delle vacche, le caratteristiche qualitative del latte (tenore di proteina, grasso, azoto ureico) prodotto, nonché alcuni parametri ruminali ed ematici, così come la digeribilità delle diete.

3 Materiali e metodi

3.1 Disegno sperimentale

La prova è stata realizzata presso l'Azienda Agraria Sperimentale "L. Toniolo" dell'Università degli Studi di Padova a Legnaro, e ha avuto una durata complessiva di 3 mesi (da Maggio a Luglio 2011). La prova ha previsto l'impiego di 20 vacche da latte: 18 Frisone, 1 Bruna e 1 Pezzata Rossa, successivamente divise in 4 gruppi sperimentali. Il disegno sperimentale utilizzato durante la ricerca è stato un quadrato latino 2x2 nidificato entro un quadrato latino 2x2. Il primo quadrato latino ha previsto l'impiego di diete con 2 livelli proteici differenti (dieta convenzionale con 15% PG e dieta ipoproteica con 12% PG); il secondo quadrato latino ha previsto l'impiego di due diete con e senza l'aggiunta di rpCLA (0 e 80 g/d). La prova sperimentale si è svolta in 4 periodi della durata di 3 settimane ciascuno, più una fase preliminare di adattamento di 2 settimane, per una durata complessiva della prova di 14 settimane. Ogni gruppo di 5 vacche è stato fatto ruotare all'interno dei 4 box in modo che tutti i gruppi ricevessero le 4 diete caratterizzate da due livelli di proteina arricchite o meno con rpCLA. Il cambio di dieta è stato effettuato al termine di ogni periodo sperimentale della durata di 21 giorni seguendo lo schema riportato in Tabella 1. Durante la fase preliminare di adattamento il primo gruppo ha ricevuto una dieta composta al 15% di PG, mentre gli animali del secondo gruppo hanno ricevuto una dieta al 15% di PG con somministrazione di rpCLA pari a 80g per vacca. Il sesto gruppo ha ricevuto una dieta al 12% di PG, mentre la dieta dei capi nel gruppo 7 era composta al 12% di PG con 80 g vacca di rpCLA. Durante il primo periodo sperimentale è stato invertito il livello proteico e si sono mantenuti gli stessi livelli di rpCLA per gruppo; nel secondo periodo è stato cambiato il contenuto di rpCLA per gruppo, mantenendo inalterati i livelli proteici; durante il terzo periodo è stato variato il livello di proteina e la quantità di rpCLA è rimasta la stessa per il primo gruppo; infine nel quarto periodo è stato variato il contenuto di rpCLA per gruppo, ristabilendo le condizioni dietetiche della fase preliminare di adattamento.

3.2 Gruppi sperimentali e diete

Per lo svolgimento della prova sono state selezionate 18 vacche in lattazione di razza Frisone, un capo di razza Bruna e uno di Pezzata Rossa. I suddetti soggetti sono stati poi divisi in quattro gruppi sperimentali, omogenei per produzione di latte (32.9 kg/d), stadio di lattazione (173 giorni), ordine di parto (2.0), peso vivo (665 kg), Body Condition Score (BCS; 2,8) e Locomotion Score (LS; 1,4) (Tabella 2).

Le razioni unifeed sono state formulate considerando una produzione media di 33 kg/d di latte senza auto alimentatori (Tabelle 3 e 4). Le 4 diete sperimentali erano costituite da una formulazione di base aziendale, alla quale sono stati poi aggiunti 3.8 kg di soia f.e. per formare le diete con elevato tenore proteico (PG15 o 15%PG) e 1.7 kg di soia f.e. e 2.1 kg di orzo per formare le diete con basso tenore proteico (PG12 o 12%PG).

I due gruppi alimentati con l'aggiunta di rpCLA hanno ricevuto per capo 0.08 kg/giorno di CLA rumino-protetto. Questo prodotto commerciale è stato ottenuto legando gli esteri metilici del rpCLA ad una matrice silicea, e successivamente scaldando il complesso con olio di soia idrogenato, che contiene acidi grassi nella forma di trigliceridi (SILA, Noale).

La distribuzione dell'integrazione di rpCLA (0.08 kg/capo/d) e rpCLA+orzo (2.18 kg/capo/d) è stata eseguita mediante top dressing sull'unifeed distribuito e mescolato manualmente. L'integrazione di soia delle diete con un elevato tenore proteico (PG15) è stata miscelata all'unifeed aggiungendola direttamente al carro miscelatore.

3.3 Rilievi Sperimentali

Durante la prova sono stati effettuati dei rilievi sperimentali atti a evidenziare possibili influenze sugli animali derivanti dall'assunzione di differenti livelli proteici e dall'aggiunta di CLA. Per quanto riguarda la dieta, all'inizio e alla fine della prova sono stati campionati tutti gli alimenti fatta eccezione per l'integratore vitaminico minerale. Con scadenze ben precise invece sono stati effettuati il campionamento del latte, i prelievi di sangue, feci e liquido ruminale e i rilievi dei consumi, peso, variazioni di Locomotion e Body Condition Score (Tabella 5).

Unifeed

Le materie prime delle razioni (silomais e fieni) sono state campionate durante la prima e la terza settimana di ogni periodo, mentre un campione di unifeed è stato raccolto all'inizio e alla fine della prova. Due volte per periodo le granulometrie degli alimenti sono state analizzate con separatore Penn State, composto da 3 crivelli sovrapposti e con diametro dei fori pari rispettivamente a 19 mm (0.75"), 8 mm (0.31") e fondo raccoglitore, secondo la procedura descritta da Heinrichs e Kononoff (1996). Non si sono riscontrate differenze significative in merito alla granulometria tra le tesi e tra i periodi sperimentali. In media la dieta si distribuiva per il 13% sul primo crivello, il 42% sul secondo e il restante 45% sul fondo raccoglitore.

Consumi

Durante la sperimentazione, una volta a settimana sono stati accertati i consumi di alimento. Questo rilievo sperimentale ha previsto la quantificazione del residuo presente sul fronte mangiatoia; tale residuo è stato poi sottratto alla quantità di unifeed scaricato il giorno precedente. L'entità di unifeed scaricato in ogni box veniva modificata settimanalmente in base alla massa di residui che venivano rilevati in mangiatoia, in modo da adattare alle esigenze degli animali la quantità di dieta da somministrare.

Peso, BCS, LS

All'inizio della fase di adattamento su ciascun animale è stato rilevato il peso, il Body Condition Score (BCS) e il Locomotion Score (LS) per verificare lo stato di salute degli animali. La valutazione è stata eseguita da un operatore esperto tramite l'attribuzione ai singoli soggetti, di un punteggio che va da 1 a 5 con sottoclassi di 0.25 punti per il BCS (Edmonson *et al.*, 1989) e un punteggio che va da 1 a 5 per LS (Sprecher *et al.*, 1996).

Liquido ruminale

La procedura di prelievo del liquido ruminale è stata effettuata il martedì e il giovedì della terza settimana di ciascun periodo. Il prelievo del martedì veniva effettuato a digiuno 15 ore dopo l'ultima distribuzione del pasto mentre il prelievo del giovedì veniva effettuato 3 ore dopo lo scarico dell'unifeed. Agli animali posti in cattura è stata collocata una sonda esofagea, connessa a una beuta della capacità di 3 litri, la quale a sua volta è collegata a una pompa a vuoto. La piccola quantità di liquido prelevata è stata prontamente sottoposta a un'operazione di filtraggio utile ad eliminare la componente particolata.

Una volta terminata la filtrazione, è stato misurato il pH del filtrato e successivamente sono state raccolte 2 aliquote da 8 ml di liquido ruminale che sono state conservate in provette da 10 ml contenenti 2 ml di acido meta fosforico per le successive analisi dell'azoto ammoniacale. In totale sono stati analizzati 160 campioni per il pH (5 vacche x 4 box x 4 periodi x 2 giorni) e 320 campioni per analisi N NH₃ (5 vacche x 4 box x 4 periodi x 2 giorni x 2 provette).

Ruminoattività

Durante la prova è stata misurata l'attività di ruminazione degli animali tramite lo strumento RuminActTM, un sistema basato su un microfono sviluppato e fornito dalla ditta italiana Milkline, specializzata nei sistemi di monitoraggio degli animali (Milkline, 2007). Questa tecnologia è

costituita da un microfono incorporato in un dispositivo di plastica, che viene posizionato aderente alla parte superiore sinistra del collo della vacca. Un peso in piombo è stato posizionato ventralmente al collare per mantenere il dispositivo nella giusta posizione. Lo strumento misura l'attività ruminale intercettando il suono prodotto dalla deglutizione e rigurgito del bolo durante la ruminazione. I suoni sono analizzati attraverso un complesso algoritmo e l'attività ruminale è calcolata dal software a partire dai seguenti parametri (Milkline, 2007):

- Somma dei minuti di ruminazione ogni 2 ore di rilevazione. Le misurazioni sono state ottenute con una risoluzione di 2 minuti;
- Intervallo temporale medio che intercorre tra atti di deglutizione;
- Intervallo temporale medio che intercorre tra atti masticatori.

Il dispositivo memorizza i dati per un massimo di 24 h (Milkline, 2007). L'informazione contenuta nel dispositivo è scaricata via infrarossi (IR) a un'antenna posizionata nella sala di mungitura. Dall'antenna l'informazione è automaticamente inviata al computer che analizza i dati.

Sangue

Il prelievo del sangue è avvenuto nelle medesime condizioni del prelievo del liquido ruminale. Per effettuare il prelievo ematico l'operatore si è servito di una provetta Vacutainer contenente litio-eparina (tappo verde) innestata su un'apposita camicia. Il prelievo è stato effettuato a livello della vena giugulare esterna, in corrispondenza del secondo segmento prossimale della doccia giugulare. Una volta terminati i prelievi sui 20 soggetti, i campioni ottenuti sono stati trasferiti allo Zooprofilattico delle Venezie (Legnaro, Padova) per le analisi.

Feci

Il prelievo delle feci è avvenuto nelle medesime condizioni del prelievo di liquido ruminale. Agli animali posti in cattura è stata applicata la tecnica del grab sample, in corrispondenza dell'ampolla rettale, prelevando un campione del peso di circa 400 g. I campioni sono stati posti in forno (60°C) per 48 ore e successivamente sono stati raffreddati a temperatura ambiente per 24 ore; infine sono stati messi in sacchetti e conservati in frigo per le analisi chimiche successive.

Latte

La quantità prodotta da ogni singolo animale è stata registrata giornalmente grazie al sistema automatizzato presente in sala di mungitura. Tale sistema è collegato telematicamente al collare di ogni animale, il quale, passando attraverso le apposite porte di lettura, veniva istantaneamente

registrato su un computer. I dati relativi alla quantità di latte prodotta sono stati rilevati durante la mungitura del mattino (ore 5.30) e durante quella della sera (ore 17.30).

A giorni prestabiliti sono stati prelevati campioni univoci per ogni animale. Il campionamento è stato svolto sia durante la mungitura della mattina che della sera.

La metodologia di raccolta ha previsto per ogni animale l'utilizzo di una provetta da 50 ml tipo falcon senza conservante per analisi MIRS (Middle Infrared Spectroscopy) per la stima della composizione chimica del latte.

3.4 Analisi chimiche

Dieta

Presso il laboratorio DAFNAE (Dipartimento di agronomia, animali, alimenti, risorse naturali e ambiente) di Agripolis per ogni alimento costituente la dieta sono state svolte le analisi Tipo e Weende, la determinazione delle frazioni fibrose tramite metodica analitica Van Soest (1991) e per quanto riguarda la frazione della dieta composta dai concentrati (silomais, crusca, soia f.e., orzo) è stata eseguita anche la rilevazione dell'amido attraverso la tecnica di HPLC (High Pressure Chromatography Liquid).

In particolare, presso i laboratori del Dipartimento di Scienza Animali sono state effettuati i seguenti rilevamenti attraverso le metodiche sotto elencate:

- sostanza secca: essiccazione in stufa a 103°C (CNR – IPRA Q.8/1987 met 2.3);
- proteina greggia: Kjeldhal (AOAC 17 ED.2000-2003, 976.05);
- estratto etereo: Soxhlet (GUCE n° L257/98);
- ceneri gregge: incenerimento in muffola (CNR – IPRA Q.8/1987 met 11.2);
- fibra greggia: tecnica Ankom (CNR – IPRA Q.8/1987 met 7.2);
- amido totale: tecnica HPLC (MI 03);
- NDF: tecnica Ankom (CNR – IPRA Q.8/1987 met 12.2);
- ADF: tecnica Ankom (CNR – IPRA Q.8/1987 met 13.2);
- ADL: digestione acida (CNR – IPRA Q.8/1987 met 14.2);
- AIA: incenerimento in muffola (CNR – IPRA Q.8/1987 met 14.2).

Liquido ruminale

L'analisi chimica dei campioni di liquido ruminale per la ricerca dell'azoto ammoniacale è stata effettuata presso i laboratori del Dipartimento DAFNAE di Agripolis.

La procedura ha previsto lo scongelamento delle provette da 10 ml e l'utilizzo della metodologia indicata da Martillotti (CNR – IPRA Q.8/1987 met 4.4). Tale metodica si serve di uno strumento adatto a rilevare la differenza di potenziale in mV all'interno di una soluzione. La strumentazione, composta da un sensore ad immersione, viene opportunamente calibrata all'inizio della prova e ripetuta ogni 5 misurazioni. La calibrazione precede l'immersione del sensore all'interno di una beuta da 50 ml, contenente 20 ml di soluzione A e 1 ml di Soda Caustica 40%. Il tutto è stato posto sopra una piastra magnetica per permetterne l'agitazione grazie a un piccolo magnete. La soluzione A veniva preparata utilizzando 1 ml di Soluzione Madre (mg 1000 di N per 1000 ml di H₂O, 1,91 g di Ammonio Cloruro per 500 ml di H₂O) e portando a volume una beuta da 100 ml con acqua distillata.

Per ogni campioni sono stati prelevati 5 ml di soluzione (liquido ruminale e acido meta fosforico 25%w/v) e successivamente è stato diluito il volume prelevato con 15 ml di acqua distillata, il tutto posto all'interno di una beuta da 50 ml. Alla beuta contenente la soluzione diluita è stato aggiunto 1 ml di Soda Caustica 40% dopo il posizionamento dell'elettrodo e l'accensione della piastra magnetica, utile all'agitazione del campione. Lo strumento visualizzava sul display un valore espresso in mV e tale valore seguiva un andamento prima decrescente e poi crescente; nel momento di viraggio si registrava il dato che successivamente era convertito in mg/l tramite la seguente formula:

$$(2,306-0,04169*\text{mV di viraggio})^{\text{diluizione}}$$

$$\text{Diluizione} = [(15+5)/2]*[(8+2)/2]$$

Il fattore [(15+5)/2] rappresenta la diluizione nella beuta da 50 ml, dove 15 sono ml d'acqua distillata e 5 sono ml prelevati dalla provetta.

Il secondo fattore [(8+2)/2] rappresenta invece la diluizione nella provetta, contenente 8 ml di liquido ruminale e 2 ml di acido meta fosforico.

Sangue

Le analisi dei parametri ematici sono state eseguite presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie (Legnaro, Padova). In particolare si è determinato il valore di BUN (Blood Urea Nitrogen) per ogni campione. Si sottolinea che mentre in Italia si fa riferimento all'urea del sangue, gli statunitensi utilizzano in genere il valore di BUN.

Feci

L'analisi chimica delle feci è stata svolta presso i laboratori del Dipartimento DAFNAE di Agripolis. La preparazione base dei campioni è consistita nel creare un campione rappresentativo di

box (100 g SS = 20 g/capo*5 capi), per un totale di 32 campioni, finemente macerato (1 mm) su cui sono state condotte le analisi sotto elencate:

- proteina greggia: Kjeldhal (AOAC 17 ED.2000-2003, 976.05);
- fibra grezza: tecnica Ankom (CNR – IPRA Q.8/1987 met 7.2);
- NDF: tecnica Ankom (CNR – IPRA Q.8/1987 met 12.2);
- ADF: tecnica Ankom (CNR – IPRA Q.8/1987 met 13.2);
- ADL: digestione acida (CNR – IPRA Q.8/1987 met 14.2);
- estratto etero: Soxhlet (GUCE n° L257/98).

Latte

L'analisi per la qualità del latte, svolta presso i laboratori del Dipartimento DAFNAE di Agripolis, ha previsto la ricerca della quantità di proteine e grasso presenti, nonché del valore di MUN (Milk Urea Nitrogen), con Milkoscan FT600. Si sottolinea che mentre in Italia si fa riferimento all'urea del latte, gli statunitensi utilizzano in genere il valore di MUN. Per passare dal MUN all'urea del latte bisogna moltiplicare il dato espresso in MUN per 2,2.

Per quanto riguarda i dati sulla qualità del latte, sono stati esclusi dall'analisi statistica i record del grasso quando questo era > 6% (12 record).

3.5 Procedure di calcolo e stima

Ingestione alimentare

Nel corso della sperimentazione la quantità di ciascun ingrediente della dieta caricato nel carro miscelatore e il peso della miscela scaricata nella mangiatoia di ogni box sono stati registrati giornalmente. I residui restanti in mangiatoia sono stati pesati una volta a settimana e campionati per la valutazione della sostanza secca e della composizione chimica.

La composizione chimica media delle diete sperimentali è stata calcolata considerando i carichi giornalieri di unifeed registrati dal carro miscelatore e la composizione chimica di ogni alimento che compone la dieta. La digeribilità della sostanza organica e il contenuto di energia metabolizzabile delle diete sono state calcolate a partire dalla composizione chimica effettiva delle diete secondo il metodo suggerito dall'INRA (Sauvant, 2004).

Digeribilità

La digeribilità delle diete e dei diversi costituenti nutrizionali è stata stimata utilizzando il tenore di lignina (ADL) delle diete come marcatore interno e assumendo che questo componente della razione alimentare sia indigeribile (ingestione di ADL con la dieta = escrezione di ADL con le feci).

I dati utilizzati per il calcolo della digeribilità della SS sono stati:

- 1) kg SS ingeriti (A)
- 2) ADL % SS alimenti (marcatore alimentare) (B)
- 3) ADL % SS feci (C)
- 4) Kg SS feci = X = $A * B / C$

Digeribilità SS, % = $(A - X) / A * 100$

I dati utilizzati per il calcolo della digeribilità della proteina:

- 1) PG kg ingeriti = SS kg ingerita * PG%dieta
- 2) PG kg feci = SS kg feci * PG%feci

Digeribilità PG, % = $(PG \text{ kg alimenti} - PG \text{ kg feci}) / PG \text{ kg alimenti} * 100$

La stessa procedura è stata utilizzata anche per il calcolo della digeribilità di FG, NDF, ADF e EE.

Bilanci dell'azoto e del fosforo, produzione di metano

Per stimare l'escrezione di azoto e di fosforo si è applicato il modello del bilancio aziendale proposto dall'ERM (2001), mentre per l'emissione enterica di metano è stata utilizzata l'equazione proposta da Mills *et al.* (2003).

I dati di base utilizzati per il calcolo del bilancio dell'azoto e del fosforo sono stati: consumo giornaliero (consumoSS, kg/capo/d) e quantità giornaliera di latte prodotto (latte kg/d), quantità di azoto e fosforo presenti negli alimenti (PGdieta e Pdieta, g/kg dieta) e nel latte (PGlatte e Platte, g/kg latte).

Bilancio dell'azoto

$N \text{ ingerito (Ning)} = (\text{consumoSS} * PG_{\text{dieta}} / 100) / 6,25$

dove: 6,25 è il coefficiente di conversione PG/N alimenti

$N \text{ latte (Nlatte)} = (\text{latte} * PG_{\text{latte}} / 100) / 6,39$

dove: 6,39 è il coefficiente di ritenzione PG/N latte

$N \text{ escreto} = N_{\text{ing}} - N_{\text{latte}}$

$$N \text{ volatilizzato (Nvol)} = N_{\text{esc}} * 0,28$$

dove: 0,28 è il coefficiente di volatilizzazione dell'azoto

$$N \text{ netto al campo (Nnetto)} = N_{\text{esc}} - N_{\text{vol}}$$

$$N \text{ efficienza di utilizzo (Neff\%)} = N_{\text{latte}} / N_{\text{ing}} * 100$$

Bilancio del fosforo

$$P \text{ ingerito (Ping)} = \text{consumoSS} * P_{\text{dieta}} / 100$$

$$P \text{ latte (Platte)} = \text{latte} * 1,05$$

dove: 1,05 (g/kg) è il contenuto medio di fosforo del latte (Crovetto *et al.*, 2010)

$$P \text{ escreto (Pesc)} = P_{\text{ing}} - P_{\text{latte}}$$

$$P \text{ efficienza di utilizzo (Peff\%)} = P_{\text{latte}} / P_{\text{ing}} * 100$$

Produzione di metano

Per il calcolo della produzione di metano si è utilizzato il modello di calcolo proposto da Mills *et al.* (2003), basato sul contenuto di nutrienti (kg/giorno) della dieta, sull'energia metabolizzabile e sul consumo di SS:

$$CH_4 \text{ (g/d)} =$$

$$(45.98 - 45.98 * \exp(-(-0.0011 * (\text{amido}/\text{ADF}) + 0.0045) * (\text{ME} * \text{consumoSS}))) * 0.018$$

dove: ME è l'energia metabolizzabile (MJ/ kg SS)

Inoltre la produzione di metano è stata messa in rapporto alla produzione di latte:

$$CH_4 \text{ (g/l latte)} = CH_4 \text{ (g/d)} / \text{latte (kg/d)} * 1000$$

3.6 Analisi statistica dei dati

I valori misurati e calcolati dei diversi parametri rilevati sono stati sottoposti ad elaborazione statistica utilizzando la procedura PROC GLM del SAS un modello statistico fattoriale:

$$Y_{ijkl} = \mu + P_i + G_j + D_k + e_{ijk}$$

Dove: Y_{ijkl} è la osservazione sperimentale; μ è la media generale; P è l'effetto periodo sperimentale: 4 livelli ($i = 1, 2, 3, e 4$); G è l'effetto del gruppo di vacche: 4 livelli ($j = a, b, c, d$); D è l'effetto della dieta sperimentale: 4 livelli ($k = \text{PG15, PG15-rpCLA, PG12, PG12-rpCLA}$); e_{ijk} è l'errore $N(0, \sigma^2)$. Gli effetti delle 4 diete sperimentali sono state valutate con la tecnica dei contrasti ortogonali. Le

differenze tra i diversi fattori del modello sono state considerate significative per $P < 0,05$ e altamente significative per $P < 0,01$.

4 Risultati

Consumi alimentari

Mediamente agli animali è stata scaricata in mangiatoia una quantità di unifeed da 20 a 25 kg SS per capo al giorno (Tabella 6). L'integrazione è stata quasi nulla per le diete convenzionali, mentre per le diete ipoproteiche è stata di 1,9 kg di SS. I residui di alimento asportati giornalmente da ogni box sono stati di circa 2 kg di SS.

I capi alimentati con la dieta convenzionale (15%PG) hanno consumato mediamente di più (21 kg SS) rispetto quelli della dieta ipoproteica (12%PG, 20,1 kg SS) ma tale effetto non ha raggiunto la significatività statistica ($P=0,118$). L'ingestione non è quindi stata influenzata dal tenore proteico, mentre l'aggiunta di rpCLA ne ha provocato un calo rispetto alle diete prive di questa integrazione (21,4 kg SS contro 19,7 kg SS rispettivamente per le tesi senza e con rpCLA, $P=0,018$). Questo risultato può essere dovuto al fatto che i CLA rendono a ridurre l'appetibilità delle diete.

Stato corporeo

Il peso vivo dei capi è stato mediamente pari a 645 kg durante il corso della prova, mentre BCS e LS si sono attestate rispettivamente a 2,9 e 1,5. Per questi parametri non ci sono state variazioni di rilievo fra i diversi gruppi sperimentali ($P>0,10$) in relazione al tenore proteico, all'aggiunta di rpCLA o alla loro interazione (Tabella 7).

Come atteso, si è osservato un progressivo aumento del BCS e LS durante il corso della prova in quanto gli animali erano in fase di lattazione avanzata ed erano prossimi al periodo di asciutta. Nel terzo periodo c'è stato un lieve calo di peso degli animali e del locomotion score, come pure un leggero calo del valore di BCS, ma ciò è trascurabile anche in relazione alla brevità della prova.

Fermentazioni ruminali

Il diverso tenore proteico delle diete ha avuto un effetto significativo sulla ruminazione degli animali ($P=0,006$) (Tabella 8): i capi alimentati con diete contenenti il 15% di proteina hanno avuto un'attività ruminale pari mediamente a 30 minuti ogni 2 ore mentre quelli alimentati con il 12% di proteina pari mediamente a 33 minuti ogni 2 ore. Ciò può suggerire che il minor tenore proteico della dieta provochi un rallentamento dei processi degradativi batterici a carico degli alimenti e un

conseguente aumento della permanenza dei foraggi nel rumine e quindi un aumento dell'attività ruminale.

Anche il pH è stato significativamente influenzato dal tenore proteico delle diete ($P=0,034$), presentando un valore più alto per le diete ipoproteiche (6,65 vs. 6,79 rispettivamente per le diete al 15%PG e 12%PG). Come è noto, il valore fisiologico di pH che indica un buon funzionamento del rumine è pari a circa 6-6,5, perciò i valori riscontrati nelle vacche della prova sono in linea con quelli suggeriti dalla letteratura.

Anche la quantità di azoto ammoniacale è stata significativamente influenzata dal diverso tenore proteico delle diete ($P<0,001$): infatti i capi alimentati con diete a basso livello proteico hanno evidenziato minori concentrazioni ruminali di azoto ammoniacale (valore medio 52 mg/l) rispetto ai capi alimentati con dieta convenzionale (valore medio 81 mg/l).

L'attività ruminale e il pH non sono stati influenzati dall'aggiunta di rpCLA alle diete ($P=0,3$ e $P=0,9$ rispettivamente). I CLA sono lipidi, e come tali possiedono un'attività inibitoria verso i microrganismi che colonizzano il rumine ma, secondo uno studio di Gulati *et al.* (2000), i CLA ruminoprotetti, come quelli forniti in questa prova sperimentale, possiedono generalmente una resistenza alla degradazione pari a circa il 70-80% e ciò spiega i limitati effetti manifestati a livello ruminale.

Per quanto concerne l'azoto ammoniacale, i capi che hanno ricevuto rpCLA hanno mediamente presentato una concentrazione di azoto ammoniacale superiore di 2 mg/l rispetto ai capi che non hanno ricevuto quest'integrazione, ma tale effetto non ha raggiunto la significatività statistica ($P=0,5$).

Per tutti i parametri ruminali studiati, non è stata osservata alcuna interazione tra il tenore proteico delle diete e l'aggiunta o meno di rpCLA.

BUN

L'azoto ureico del fluido ematico (BUN) è stato significativamente influenzato dal diverso tenore proteico delle diete ($P<0,001$) (Tabella 9): i valori medi di BUN sono pari a circa 10,7 mg/dl per le diete al 15% di proteina e circa 5,7 mg/dl per quelle ipoproteiche e ciò è dovuto al fatto che il BUN è influenzato dalla quantità di azoto ammoniacale presente nel rumine, riflettendone la maggiore o minore concentrazione. Recentemente Crovetto (2010) suggerisce che valori pari a 9-12 mg/dl di BUN sono da considerarsi ottimali, mentre valori superiori rivelano una situazione di

eccesso di azoto alimentare e inferiori una possibile carenza d'azoto ruminale degradabile. L'urea è la forma primaria con cui l'azoto viene escreto nei mammiferi; quindi, un elevato tenore di azoto ureico nel sangue è da correlarsi ad un'inefficiente utilizzo della proteina della dieta e ad un eccesso di ammoniaca che non viene ben sfruttata dai batteri ruminali. I valori riscontrati in questa prova risultano in linea con i valori suggeriti dalla letteratura per le diete convenzionali, e decisamente inferiori per le diete a bassa proteina.

I livelli ematici di azoto ureico sono stati influenzati in misura tendenziale dall'aggiunta alle diete di rpCLA ($P=0,060$), in quanto i capi riceventi rpCLA hanno presentato meno azoto ureico nel sangue (7,8 mg/dl) rispetto a quelli che non hanno ricevuto questa integrazione (8,6 mg/dl).

Per il BUN non è stata osservata alcuna interazione tra il tenore proteico delle diete e l'aggiunta o meno di rpCLA.

Digeribilità

Riducendo il tenore proteico della dieta diminuisce la digeribilità della sostanza secca della razione alimentare di circa un punto percentuale, ma tale effetto non ha raggiunto la significatività statistica ($P=0,40$) (Tabella 10). Come atteso, anche la digeribilità della proteina è calata in modo molto significativo ($P<0,001$): il valore medio di 62% delle diete convenzionali (15%PG) si è ridotto al 52% quando gli animali sono stati alimentati con le diete ipoproteiche (12%PG). Al variare del tenore proteico delle diete, non è stata osservata una significativa differenza nella digeribilità delle componenti fibrose delle razioni alimentari (FG: $P=0,9$; NDF: $P=0,3$; ADF: $P=0,5$) mentre la digeribilità del grasso si è significativamente ridotta (61% vs. 46% rispettivamente per le tesi al 15%PG e 12%PG; $P<0,001$). Nelle diete ipoproteiche questo risultato può essere imputato alla minore disponibilità di proteina per la crescita dei batteri ruminali determinando una minor capacità degradativa da parte degli stessi nei confronti dei costituenti lipidici.

L'aggiunta di rpCLA ha manifestato un effetto tendenziale sulla digeribilità della dieta ($P=0,069$). La digeribilità della sostanza secca delle diete è calata di 3 punti percentuali quando gli animali sono stati alimentati con i rpCLA (63% vs. 61% rispettivamente per le diete con e senza rpCLA). Ciò è dovuto all'effetto inibitorio degli rpCLA, che, nonostante la protezione, sono degradati per circa il 20-30% (Gulati *et al.*, 2000). L'aggiunta di rpCLA non ha avuto effetti sulla digeribilità delle proteine, delle componenti fibrose e dei grassi.

Per tutti i parametri ruminali studiati, non è stata osservata alcuna interazione tra il tenore proteico delle diete e l'aggiunta o meno di rpCLA.

Durante la prova sperimentale, la degradabilità delle componenti fibrose della dieta è progressivamente aumentata (dal 44 al 50% di degradabilità dell'NDF; $P=0,027$) come pure la ruminoattività, mentre l'ingestione alimentare si è progressivamente ridotta. L'insieme di questi risultati suggerisce che nel corso della prova si sia verificata una riduzione della velocità di transito degli alimenti e un conseguente aumento della permanenza degli alimenti nel rumine comportando un progressivo aumento della degradazione dei costituenti fibrosi.

Produzione e qualità del latte

La produzione media di latte al giorno è stata di 28 kg per capo (Tabella 11). Il diverso tenore proteico della dieta ha influito in misura tendenziale ($P=0,071$) sulla quantità di latte prodotto: i capi alimentati con le diete ipoproteiche (12%PG) hanno prodotto circa 1-2 kg in meno di latte al giorno rispetto a quelle convenzionali (15%PG). Ovviamente si è riscontrato un effetto periodo ($P=0,003$) dovuto ad un calo naturale della produzione proseguendo lungo il periodo di lattazione.

La percentuale di proteina nel latte ha manifestato il diverso tenore proteico della dieta ($P=0,026$): una media di 3,37% di proteina nelle diete al 12% di PG contro il 3,53% nelle diete convenzionali, con una contrazione di 5 punti percentuali. La percentuale di proteina è aumentata lungo il periodo sperimentale ($P=0,021$), passando da un valore medio del 3,29% del primo periodo a 3,66% dell'ultimo; ciò è un fenomeno naturale che si verifica con il proseguimento del periodo di lattazione. La quantità di proteina nel latte si è ridotta di circa l'9% a seguito della riduzione del tenore proteico delle diete (1,00 kg/d vs. 0,92 kg/d rispettivamente per le diete 15%PG e 12%PG, $P=0,031$).

Il diverso tenore proteico delle diete non ha avuto effetti sulla percentuale di grasso presente nel latte ($P=0,707$) anche se la produzione giornaliera di grasso si è tendenzialmente ridotta di circa 0,06 kg/capo/d diminuendo il tenore proteico delle diete ($P=0,048$).

L'aggiunta di rpCLA alle diete non ha avuto effetti significativi ($P=0,368$) sulla produzione di latte, anche se alcuni studi riportano che l'integrazione di rpCLA alle diete di vacche da latte ne aumenti significativamente la produzione (Bauman *et al.*, 2001; Overton *et al.*, 2001; Veth *et al.*,

2006). Tale differenza non è stata rilevata quando gli animali sono stati alimentati con le diete a tenore proteico convenzionale (29,4 kg/capo/d per entrambe le diete al 15%PG), ma è emersa nella diete con il 12% di proteina grezza dove l'aggiunta dei CLA ha incrementato la produzione di circa 0,9 kg di latte anche se in misura non statisticamente significativa (27,2 vs. 28,1 kg/capo/d rispettivamente con le tesi 12%PG e 12%PG-rpCLA).

Il tenore proteico del latte ($P=0,6$) non ha subito variazioni dovute all'aggiunta di rpCLA, come pure la produzione giornaliera di proteina ($P=0,8$).

L'aggiunta di rpCLA ha avuto effetti significativi sulla percentuale di grasso nel latte ($P=0,002$): le diete rpCLA presentano un valore medio di grasso pari a circa 3,13%, contro il 3,71% delle diete prive di questa integrazione. Di conseguenza, la quantità di grasso prodotto quotidianamente si è ridotta in misura significativa ($P=0,001$) di circa il 14% a seguito dell'aggiunta dei CLA alle diete (1,03 vs. 0,89 rispettivamente per le diete senza e con rpCLA). Di fatto precedenti studi hanno evidenziato che l'impiego di rpCLA diminuisce il contenuto di grasso nel latte (Baumgard *et al.*, 2001; Veth *et al.*, 2006; Maxin *et al.*, 2010; Pappritz *et al.*, 2011). I CLA sembrano interferire a livello mammario con le vie metaboliche che portano alla sintesi degli acidi grassi secreti con il latte.

In generale su tutti i parametri qualitativi e quantitativi del latte non si sono evidenziati effetti dell'interazione fra tenore proteico e rpCLA.

Il diverso livello di proteina delle diete ha significativamente influito sul MUN ($P<0,001$), in quanto le diete convenzionali (15%PG) presentano un valor medio molto diverso (11,6 mg/dl) da quello delle diete ipoproteiche (6,00 mg/dl). L'aggiunta di rpCLA non presenta effetti sul MUN ($P=0,230$), e nemmeno l'interazione PG-CLA ($P=0,8$).

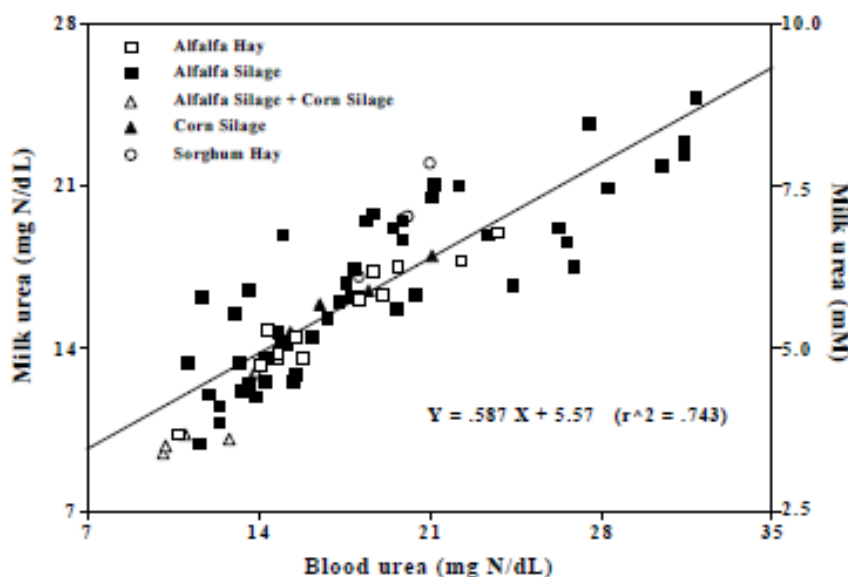
Il tenore di azoto ureico nel latte è direttamente correlato al tenore proteico della dieta: Broderick e Clayton (1997), e successivamente Nousiainen *et al.* (2004), hanno proposto delle equazioni per determinare il tenore proteico della dieta a partire dei valori di MUN (Tabella 12). I risultati ottenuti con l'equazione proposta da Broderick risultano sovrastimati rispetto a quelli riscontrati in questa prova, mentre i risultati ottenuti con la più recente equazione di Nousiainen vi si avvicinano maggiormente, dimostrando la stretta relazione tra MUN e tenore proteico della dieta.

Il valore di MUN è inoltre strettamente correlato al valore di BUN (Gustafsson e Palmquist, 1993): infatti è noto come l'azoto presente nel latte sia in equilibrio osmotico con quello contenuto nel sangue. Perciò i bassi valori di MUN riscontrati nelle diete al 12% di proteina riflettono gli altrettanto bassi valori di BUN.

Inoltre attraverso un'equazione di regressione lineare proposta da Broderick (1995) è possibile stimare il valore di MUN a partire dal valore di BUN (Tabella 13).

I valori misurati nella presente ricerca per le diete convenzionali sono simili a quelli stimati utilizzando l'equazione proposta da Broderick, ma sono sovrastimati per le diete ipoproteiche. Ciò è dovuto al fatto che l'equazione proposta da Broderick è stata ottenuta utilizzando valori di BUN compresi tra 10 e 35 mg/dl mentre nella nostra ricerca questi sono compresi tra 5 e 12 mg/dl. Come visibile in figura 2, i valori riscontrati nello studio di Broderick (1995) hanno un andamento non lineare quando le concentrazioni ematiche scendono al di sotto del valore di 14 mg/dl.

Figura 2. Regressione della concentrazione di MUN sulla concentrazione di BUN osservata in 419 vacche in lattazione alimentate con 78 diete in 22 differenti prove (Broderick, 1995).



Secondo Hutjens e Barmore (1995), valori di MUN pari a 12-17 mg/dl di latte indicano un ottimo bilanciamento fra proteina degradabile ed energia. Recentemente Crovetto (2010) suggerisce che valori pari a 9-12 mg/dl di MUN sono da considerarsi ottimali, mentre valori superiori rivelano una situazione di eccesso di azoto alimentare e inferiori una possibile carenza d'azoto ruminale degradabile. I valori riscontrati in questa prova risultano in linea con i valori suggeriti dalla letteratura per le diete convenzionali, e decisamente inferiori per le diete a bassa proteina. I bassi valori di azoto nel latte e nel sangue degli animali dovute alle diete ipoproteiche possono quindi spiegare il calo nella produzione di proteina con il latte (-9%). Infatti, la ridotta disponibilità ruminale di azoto si ripercuote sull'attività degradativa ruminale, sulla sintesi di proteina microbica e quindi sulla disponibilità di amminoacidi per la sintesi proteica mammaria.

Bilancio dell'azoto

Il diverso tenore di proteina delle diete ha significativamente influito sulla quantità di azoto ingerito ($P<0,001$), presente nel latte ($P=0,006$), e conseguentemente su quello escreto ($P<0,001$), volatilizzato ($P<0,001$) e netto al campo ($P<0,001$) (tabella 14). Minor quantità di proteina assunta con la dieta si è tradotta in minor proteina non utilizzata ed escreta dall'animale. L'azoto netto al campo ha assunto valori medi di 0,25 kg/capo/d per le diete al 15%PG e di 0,18 kg/capo/d per le diete ipoproteiche. Il differente livello proteico delle diete ha avuto un effetto significativo sull'efficienza di utilizzo dell'azoto ($P<0,001$): l'efficienza percentuale dei capi alimentati con dieta ipoproteica è stata maggiore di 14 punti percentuali (31 vs. 36% rispettivamente per le diete al 15%PG e 12%PG) come chiaramente evidenziato in figura 3. Nella pratica di allevamento, l'efficienza di utilizzo dell'azoto oscilla tra il 20 e il 35% ed è legata principalmente al livello produttivo dell'animale e al livello proteico delle diete (Crovetto, 2010). I valori di efficienza riscontrati sono quindi in linea con quelli suggeriti dalla letteratura.

L'aggiunta di rpCLA ha avuto effetti sull'ingestione di azoto alimentare ($P=0,014$), poiché, come già osservato, i capi alimentati con questa integrazione presentano un valore di ingestione più basso (21,4 vs. 19,9 kg SS rispettivamente per le tesi senza e con aggiunta di rpCLA). L'azoto contenuto nel latte non ha subito l'influenza dell'aggiunta di rpCLA. L'azoto escreto, volatilizzato e netto al campo hanno presentato quindi valori differenti fra diete con o senza aggiunta di rpCLA ($P=0,008$); in particolare, i capi alimentati con rpCLA hanno escreto meno azoto (0,28 kg/capo/d) rispetto quelli privi di quest'integrazione (0,32 kg/capo/d). Di conseguenza i CLA hanno avuto un effetto significativo sull'efficienza di utilizzo dell'azoto ($P=0,001$): l'efficienza percentuale dei capi alimentati con rpCLA è stata maggiore di 7 punti percentuali (32 vs. 35% rispettivamente per le diete senza e con rpCLA).

L'interazione fra livello proteico e rpCLA non è stata evidenziata per nessuno dei parametri esaminati.

Broderick (1995) e successivamente Nouasiainen *et al.* (2004) hanno proposto delle equazioni per la stima dell'efficienza di utilizzo dell'azoto a partire dai valori di MUN (tabella 15). I valori riscontrati in questa prova sperimentale sono in linea con quelli previsti dall'equazione di Broderick (1995), mentre alcune differenze sono visibili utilizzando l'equazione di Nouasiainen *et al.* (2004) soprattutto nelle diete con l'aggiunta di CLA.

Bilancio del fosforo

Le diete convenzionali e ipoproteiche hanno fornito rispettivamente 40 e 39 g di fosforo per kg di alimento ($P=0,075$) (Tabella 16). Ciò è dovuto al minor contenuto di soia, ricco apportatore di fosforo, nelle diete ipoproteiche (3,8 vs. 1,7 kg sul tq/capo/d rispettivamente per le diete 15%PG e 12%PG). Di conseguenza, con le diete al 12%PG si riscontra una significativa riduzione dell'ingestione di fosforo ($P=0,003$); infatti i capi alimentati con diete ipoproteiche hanno ingerito circa il 7% di fosforo in meno rispetto ai capi alimentati con dieta convenzionale, con valori di 84 e di 78 g/d per le diete al 15% di PG e al 12% di PG.

Analogamente anche il tenore di fosforo del latte è stato tendenzialmente inferiore per le diete ipoproteiche ($P=0,072$) ed è significativamente diminuito lungo il corso della prova ($P=0,003$), da 33 g/capo/d dell'inizio a 27 g/capo/d dell'ultimo periodo sperimentale.

La quantità di fosforo escreto è proporzionale alla quantità di fosforo ingerito con la dieta e a quello utilizzato dal metabolismo animale (tra cui la sintesi del latte) e di conseguenza, la quantità di fosforo escreto è stata minore per i capi alimentati con dieta ipoproteica ($P=0,004$) rispetto ai capi alimentati con il 15% di PG (54 vs. 49 g/capo/d di fosforo escreto rispettivamente con le diete 15%PG e 12%PG). Nonostante questo, non sono state riscontrate differenze di efficienza di utilizzo del fosforo da parte delle vacche alimentate con diversi tenori proteici ($P=0,2$).

L'aggiunta di rpCLA non ha ovviamente modificato la quantità di fosforo della razione alimentare ($P=1$) ma, come già evidenziato, essa comporta un minor consumo di alimenti ($P=0,018$) e perciò una minor ingestione di fosforo con la dieta ($P=0,002$). I capi alimentati con rpCLA hanno ingerito il 7 % di fosforo in meno (84 vs. 78 g/capo/d rispettivamente per le tesi senza e con rpCLA) ma hanno ritenuto la stessa quantità di fosforo nel latte ($P=0,5$). Di conseguenza i capi alimentati con rpCLA ($P<0,001$) hanno escreto circa il 13 % di fosforo in meno (55 vs. 48 g/capo/d rispettivamente per le tesi senza e con rpCLA) e l'efficienza è aumentata del 9 % (35 vs. 39 % rispettivamente per le tesi senza e con rpCLA) come riportato in figura 4. Uno studio di Arriaga *et al.* (2009) riporta valori di efficienza di utilizzo del fosforo che oscillano tra il 19 e il 45% in vacche da latte alimentate con il 16%PG, con rapporto foraggi:concentrati pari a 50:50 e con un'ingestione giornaliera media di fosforo di 85 g/d per capo.

L'interazione PG-rpCLA non è stata osservata per i diversi parametri del bilancio del fosforo.

Produzione di metano

Utilizzando il metodo di calcolo proposto da Mills *et al.* (2003) sono state stimate produzioni di metano differenti tra le diverse diete sperimentali ($P=0,002$) (Tabella 17). I capi alimentati con diete ipoproteiche hanno ridotto la produzione di metano del 9% (440 vs. 400 g/capo/d rispettivamente per le diete 15%PG e 12%PG). Questo risultato riflette la diversa ingestione alimentare e la differente composizione chimica in amido, fibra ed energia metabolizzabile delle diverse diete.

In termini di performance di emissione la dieta che ha comportato minor produzione di metano è stata quella PG12%-rpCLA (394 g/capo/d), seguita da PG12% (407 g/capo/d), PG15%-rpCLA (426 g/capo/d) e la peggiore PG15% (454 g/capo/d). Come visibile in figura 5, quando la produzione di metano è espressa per litro di latte prodotto, la miglior dieta è stata la PG12%-rpCLA (14,04 g/l latte), seguita da PG15%-rpCLA (14,83 g/l latte), PG12% (15,11 g/l latte) e infine la dieta convenzionale (PG15%, 15,69 g/l latte).

Anche l'aggiunta dei rpCLA alle diete ha avuto effetti sulla produzione di metano ($P=0,036$) che si è ridotta del 5% (431 vs. 410 g/capo/d rispettivamente per le diete senza e con rpCLA). Questo effetto è dovuto al fatto che, come già sottolineato, gli rpCLA sono lipidi e possiedono una degradabilità del 20-30%; perciò essi inibiscono l'utilizzazione della fibra e conseguentemente possono avere un effetto inibitorio sui batteri metanogeni.

L'interazione fra livello proteico e rpCLA non è stata evidenziata per la produzione di metano ($P=0,4$).

La quantità di metano è diminuita durante il corso della prova, da 430 a 415 g/capo/d, senza raggiungere la significatività ($P=0,3$), principalmente a causa del calo delle ingestioni alimentari. Anche uno studio di Yan *et al.* (2010) ha evidenziato come la produzione di metano diminuisca con l'aumento della digeribilità della dieta, mentre secondo uno studio di Garnsworthy *et al.* (2012) la produzione di metano, proseguendo lungo il periodo di lattazione, tende a diminuire.

La quantità di metano per litro di latte prodotto è diminuita significativamente durante il corso della prova ($P=0,016$), per il già citato calo fisiologico della produzione di latte.

Figura 3. Efficienza di utilizzo dell'azoto (N ritenuto/ N ingerito).

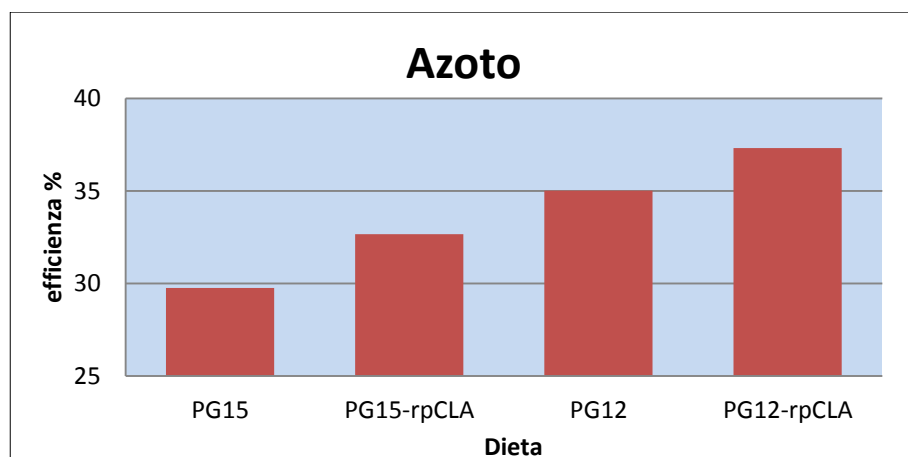


Figura 4. Efficienza di utilizzo del fosforo (P ritenuto /P ingerito).

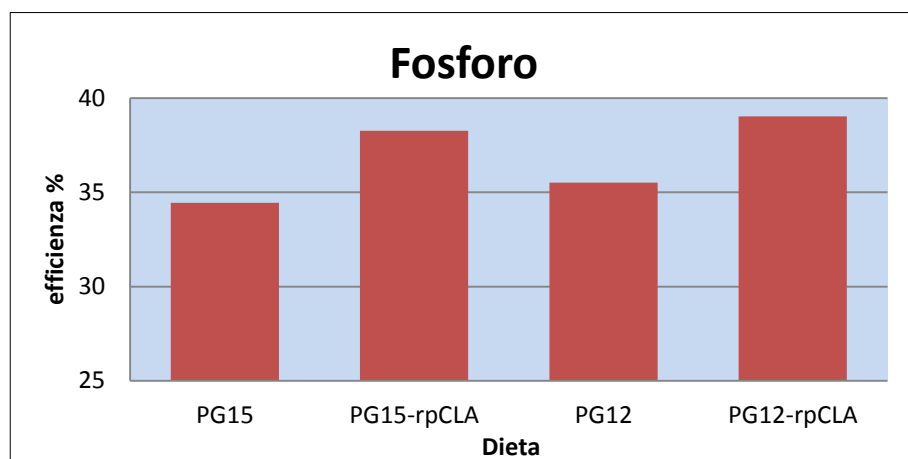
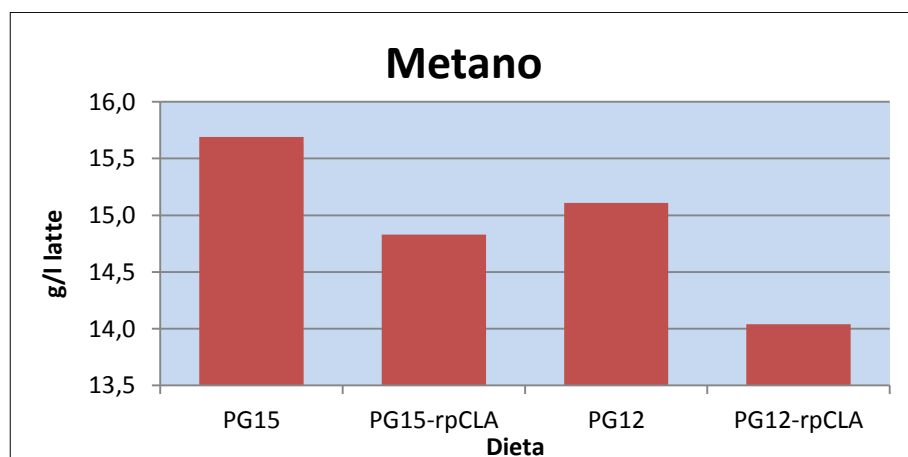


Figura 5. Produzione di metano in rapporto alla produzione di latte.



5 Conclusioni

In conclusione i risultati della presente ricerca hanno evidenziato che la riduzione del tenore proteico della dieta dal 15 al 12% non ha modificato in maniera significativa l'ingestione alimentare, la digeribilità della dieta, ma ha ridotto di circa 1,5 kg/d la produzione di latte. Anche la qualità del latte si è modificata sensibilmente quando il tenore proteico della dieta è stato ridotto al di sotto di quello convenzionale, diminuendo la produzione giornaliera di proteina e riducendo la ritenzione di N dell'8%. Come atteso, la riduzione del tenore proteico delle diete ha diminuito in maniera significativa la concentrazione di N-NH₃ a livello ruminale, da 82.5 mg/l a 52.0 mg/l, come pure l'azoto ureico nel sangue (BUN) e nel latte (MUN), rispettivamente del 47% e del 48%, determinando così una minore escrezione di N con le deiezioni del 26% e un aumento dell'efficienza di utilizzazione dell'azoto del 14%.

Con la dieta ipoproteica si è riscontrata una significativa riduzione dell'ingestione di fosforo (-7%) compensata da una riduzione nella ritenzione con il latte (-5%). Di conseguenza, non sono state riscontrate differenze nell'efficienza di utilizzazione del fosforo da parte delle vacche alimentate con diversi tenori proteici. I capi alimentati con diete ipoproteiche hanno ridotto la produzione di metano del 9% per effetto della differente ingestione alimentare e della diversa composizione chimica in amido, fibra ed energia metabolizzabile delle diete.

I risultati della presente ricerca hanno evidenziato che l'aggiunta di rpCLA alla dieta ha ridotto l'ingestione degli animali di circa 1 kg/capo/d per effetto della limitata appetibilità di questo integratore alimentare. Inoltre l'aggiunta di rpCLA alle diete ha modificato la composizione chimica del latte abbassandone il tenore di grasso del 14%. I rpCLA hanno avuto un limitato effetto inibitorio sui processi fermentativi ruminali come evidenziato dalla riduzione della digeribilità della dieta (-5%) e della produzione di metano (-5%). I capi alimentati con rpCLA hanno ingerito minor azoto con la dieta (-0,06 kg/d) a causa del calo dell'ingestione e quindi hanno escreto una minore quantità di questo nutriente, migliorando del 7% l'efficienza di utilizzazione dell'azoto. Analogamente i capi alimentati con rpCLA hanno escreto circa 7 g/d di fosforo in meno migliorando l'efficienza di utilizzazione del fosforo del 9%.

Non c'è stata significativa interazione tra l'aggiunta di rpCLA e il tenore proteico delle diete. Comunque i rpCLA hanno ridotto di circa il 9% i valori di BUN e migliorato l'efficienza di utilizzazione dell'azoto suggerendo un possibile effetto di queste molecole sul metabolismo proteico degli animali.

Infine la dieta 12%PG con integrazione di rpCLA si è dimostrata la migliore sotto il profilo delle performance ambientali in quanto presenta la maggior efficienza di utilizzazione dell'azoto e del fosforo e la minor quota di emissioni di metano.

Abbreviazioni

ADF= fibra al detergente acido

ADL= lignina al detergente acido

AIA= ceneri acido insolubili

BAT= Best Available Technique

BCS= Body Condition Score

BUN= Blood Urea Nitrogen

CEN= Ceneri

CH₄= metano

CLA= Conjugated Linoleic Acid

EE= Estratto Etereo

f.e.= farina di estrazione

FG= Fibra Greggia

GWP= Global Warming Potential

HPLC= High Pressure Liquid Chromatography (cromatografia liquida ad alta pressione)

INRA= Institut National de la Recherche Agronomique

LS= Locomotion Score

ME= Metabolizable Energy

MIRS= Middle InfrRed Spectroscopy

MUN= Milk Urea Nitrogen

N= azoto

NDF= fibra al detergente neutro

NFE= Nitrogen-Free Extract

NRC= National Research Council

OMd= Organic Matter digestibility

P= Fosforo

PV= Peso Vivo

PG= Proteina Greggia

p.s.= prato stabile

RDP= Rumen Degradable Protein

rpCLA= rumen protected CLA

SAS= Statistical Analysis Institute

SAU= Superficie Agricola Utilizzabile

SE= Standard Error

ZVN= Zona Vulnerabile da Nitrati

Tabelle

Tabella 1. Disegno sperimentale della prova e contenuti proteici della dieta (espressi come PG % SS). Ogni gruppo è composto da 5 vacche.

	Gruppo a	Gruppo b	Gruppo c	Gruppo d
Fase preliminare (2 settimane)	15%	15%-CLA	12%	12%-CLA
Primo periodo (3 settimane)	12%	12%-CLA	15%	15%-CLA
Secondo periodo (3 settimane)	12%-CLA	12%	15%-CLA	15%
Terzo periodo (3 settimane)	15%-CLA	15%	12%-CLA	12%
Quarto periodo (3 settimane)	15%	15%-CLA	12%	12%-CLA

Tabella 2 Gruppi sperimentali (valori medi ante prova $\pm$ ds).

	Gruppo a	Gruppo b	Gruppo c	Gruppo d
Produzione, kg/d	32,6 $\pm$ 7,77	32,8 $\pm$ 2,75	32,6 $\pm$ 5,17	32,8 $\pm$ 9,12
Giorni di lattazione, d	179 $\pm$ 85,5	173 $\pm$ 62,6	176 $\pm$ 78,0	165 $\pm$ 74,9
Ordine parto	2,2 $\pm$ 2,68	1,8 $\pm$ 1,30	2,4 $\pm$ 1,67	1,6 $\pm$ 0,89
Peso vivo, kg	665 $\pm$ 73,1	698 $\pm$ 58,1	677 $\pm$ 100,1	620 $\pm$ 73,9
BCS (Body Condition Score)	2,9 $\pm$ 0,24	2,8 $\pm$ 0,40	2,8 $\pm$ 0,11	2,8 $\pm$ 0,25
LS (Locomotion Score)	1,40 $\pm$ 0,20	1,20 $\pm$ 0,22	1,80 $\pm$ 0,24	1,20 $\pm$ 0,21

Tabella 3. Formulazione delle diete sperimentali (tq kg/capo/d).

Ingredienti	PG15 ¹	PG15-rpCLA ²	PG12 ³	PG12-rpCLA ⁴
Acqua	8.3	8.3	8.1	8.1
Crusca di Frumento	1.5	1.5	1.4	1.4
Fieno p.s.	3.3	3.3	3.2	3.2
Mais farina	4.8	4.8	4.7	4.7
Fieno medica	2.3	2.3	2.3	2.3
Polpe secche	2.8	2.8	2.8	2.8
Silomais	24.1	24.1	23.4	23.4
Soia f.e.	3.8	3.8	1.7	1.7
CLA	-	0.08	-	0.08
Orzo	-	-	2.1	2.1
Integratore*	0.40	0.40	0.40	0.40
Totale	51.3	51.38	48.0	48.08

¹PG15= dieta al 15% di proteina grezza; ²PG15-rpCLA= dieta al 15% di proteina grezza con integrazione di 80 g/capo/d di rpCLA rumino protetto; ³PG12= dieta al 12% di proteina grezza; ⁴PG12-rpCLA= dieta al 12% di proteina grezza con integrazione di 80 g/capo/d di rpCLA rumino protetto.

*Integrazione per kg: vit. A 240000 UI, vit. E (a-Tocof.91%) 500 mg, vit. B1 80 mg, vit. B12 0,4 mg, vit PP 2040 mg, Manganese 650 mg, Rame (solf. Rameico pent.) 100 mg, Cobalto (carb. Basico di 0,4 cobalto monoid.) 12 mg.

Tabella 4. Composizione chimica delle diete sperimentali (% SS).

	PG15		PG15-rpCLA		PG12		PG12-rpCLA	
	media	ds	media	ds	media	ds	media	ds
PG, % SS	15,0	0,44	15,0	0,44	12,3	0,26	12,3	0,26
amido, % SS	22,7	0,44	22,7	0,44	26,3	0,37	26,3	0,37
EE, % SS	2,4	0,02	2,8	0,04	2,4	0,02	2,8	0,05
NDF, % SS	36,9	0,35	36,9	0,35	37,4	0,24	37,4	0,24
ADF, % SS	20,8	0,25	20,8	0,25	20,5	0,19	20,5	0,19
FG, % SS	16,7	0,24	16,7	0,24	16,6	0,17	16,6	0,17
ADL, % SS	2,1	0,06	2,1	0,06	2,1	0,05	2,1	0,05
AIA, % SS	0,4	0,01	0,4	0,01	0,4	0,01	0,4	0,01
CEN, % SS	5,6	0,06	5,6	0,06	5,2	0,05	5,2	0,05
P, % SS	0,40	0,012	0,40	0,012	0,39	0,010	0,39	0,010
OMd ^a , % SS	73,3	0,45	73,3	0,45	73,4	0,34	73,4	0,34
ME ^b , MJ/kg SS	10,6	0,07	10,7	0,07	10,6	0,07	10,8	0,05

^a Omd (Organic Matter digestibility) e ^b ME (Metabolisable Energy) calcolate dalla composizione chimica della dieta secondo le equazioni proposte dall'INRA (Sauvant, 2004).

Tabella 5 Calendario dei rilievi sperimentali e della raccolta di campioni del secondo periodo.

Settimana	Giorno	Rilievi sperimentali latte	Rilievi sperimentali alimenti	Rilievi sperimentali animali
1	Mar	MIRS+LDG mattina MIRS+LDG sera	<i>CAMBIO DIETA</i> Residui	Pesata - BCS -LS
1	Mer	MIRS+LDG mattina MIRS+LDG sera	Residui + granulometr.unifeed + campione silo, fieni	
1	Gio	MIRS+LDG mattina MIRS+LDG sera		
1	Ven	MIRS+LDG mattina MIRS+LDG sera	Residui	
1	Sab			
1	Dom			
1	Lun	MIRS+LDG mattina MIRS+LDG sera	Preparazione integrazioni alimentari	
2	Mar			
2	Mer	MIRS+LDG mattina MIRS+LDG sera		
2	Gio			
2	Ven	MIRS+LDG mattina MIRS+LDG sera	Residui	
2	Sab			
2	Dom			
2	Lun	MIRS+LDG mattina MIRS+LDG+CG+caseif. sera	Preparazione integrazioni alimentari	
3	Mar	MIRS+LDG+CG+caseif. matt. MIRS+LDG sera		Feci - Rumine - Sangue
3	Mer	MIRS+LDG mattina MIRS+LDG+CG+caseif. sera		
3	Gio	MIRS+LDG+CG+caseif. matt. MIRS+LDG sera		Feci - Rumine - Sangue
3	Ven	MIRS+LDG mattina MIRS+LDG sera	Residui + granulometr.unifeed + campione silo, fieni	
3	Sab			
3	Dom			
3	Lun	MIRS+LDG mattina MIRS+LDG	Preparazione integrazioni alimentari	Pesata - BCS - LS

Tabella 6. Consumi alimentari

	Dieta				Periodo				P			Contrast			
	PG15 ¹	PG15-rpCLA ²	PG12 ³	PG12-rpCLA ⁴	1	2	3	4	SE ⁵	Periodo	Gruppo	Dieta	PG	CLA	PG*CLA
Scarico, kg SS/capo/d	23,8	21,4	22,1	20,5	23,0	22,2	21,4	21,2	0,50	0,157	0,799	0,016	0,042	0,007	0,448
Integrazione, kg SS/capo/d	0,0	0,1	1,9	1,9	1,0	1,0	1,0	1,0	-	-	-	-	-	-	-
Residui, kg SS/capo/d	1,7	1,5	3,3	2,9	2,6	2,0	2,3	2,6	0,23	0,365	0,192	0,004	0,006	0,330	0,662
Ingestione, kg SS/capo/d	22,1	19,9	20,7	19,4	21,3	21,1	20,0	19,6	0,54	0,164	0,399	0,048	0,118	0,018	0,376

¹ PG15= dieta al 15% di proteina grezza;

² PG15-rpCLA= dieta al 15% di proteina grezza con integrazione di 80 g/capo/d di rpCLA rumino protetto;

³ PG12= dieta al 12% di proteina grezza;

⁴ PG12-rpCLA= dieta al 12% di proteina grezza con integrazione di 80 g/capo/d di rpCLA rumino protetto.

⁵ SE= Standard Error

Tabella 7. Stato corporeo degli animali

	Dieta				Periodo				P		Contrast				
	PG15	PG15-rpCLA	PG12	PG12-rpCLA	1	2	3	4	SE	Periodo	Gruppo	Dieta	PG	CLA	PG*CLA
Peso vivo var.kg/capo	+5,50	-12,40	+6,23	-0,48	+6,33	+6,23	-18,63	+4,93	7,455	0,139	0,957	0,348	0,429	0,150	0,481
BCS ^a var., n.	+0,01	+0,03	+0,05	+0,04	+0,04	+0,09	-0,08	+0,08	0,027	0,019	0,786	0,786	0,390	1,000	0,660
LS ^b var., n.	-0,03	-0,23	-0,03	+0,10	+0,03	-0,05	-0,15	-0,01	0,118	0,745	0,926	0,357	0,209	0,780	0,224

^a BCS= Body Condition Score;

^b LS= Locomotion Score

Tabella 8. Rumine

	Dieta				Periodo				P			Contrast			
	PG15	PG15-rpCLA	PG12	PG12-rpCLA	1	2	3	4	SE	Periodo	Gruppo	Dieta	PG	CLA	PG*CLA
Ruminaz., min/2 h	29,64	30,35	32,43	33,21	29,22	34,82	34,02	27,57	0,673	<0,001	0,096	0,028	0,006	0,312	0,970
pH	6,65	6,65	6,79	6,79	6,64	6,47	6,90	6,88	0,042	<0,001	0,021	0,047	0,034	0,979	0,986
N-NH ₃ , mg/l	82,53	78,58	47,62	56,28	73,65	53,54	87,66	50,18	3,925	<0,001	0,769	0,001	<0,001	0,552	0,143

Tabella 9. Sangue

	Dieta				Periodo				P			Contrast			
	PG15	PG15-rpCLA	PG12	PG12-rpCLA	1	2	3	4	SE	Periodo	Gruppo	Dieta	PG	CLA	PG*CLA
BUN ^a , mg/dl	11,12	10,25	6,01	5,35	7,90	8,16	9,07	7,63	0,391	0,115	0,879	<0,001	<0,001	0,060	0,756

^a BUN= Blood Urea Nitrogen

Tabella 10. Digeribilità della dieta.

	Dieta				Periodo				P			Contrast			
	PG15	PG15-rpCLA	PG12	PG12-rpCLA	1	2	3	4	SE	Periodo	Gruppo	Dieta	PG	CLA	PG*CLA
dieta, % SS	63,1	62,1	63,2	60,4	61,3	61,2	63,5	62,8	0,86	0,244	0,025	0,180	0,400	0,069	0,333
PG ^a , % SS	63,1	61,6	53,8	51,1	56,4	57,1	59,6	56,5	1,54	0,476	0,311	0,004	<0,001	0,231	0,699
FG ^b , % SS	43,4	43,6	44,9	42,3	37,7	42,7	45,5	48,2	1,55	0,014	0,120	0,720	0,954	0,467	0,412
NDF ^c , % SS	45,8	46,7	48,8	46,6	43,6	45,9	48,1	50,3	1,14	0,027	0,011	0,385	0,263	0,615	0,226
ADF ^d , % SS	46,6	46,7	47,2	45,3	42,9	45,1	48,1	49,6	0,84	0,005	0,032	0,484	0,619	0,315	0,299
EE ^e , % SS	59,8	61,5	46,3	46,4	50,6	52,7	58,4	52,2	1,79	0,085	0,078	0,001	<0,001	0,623	0,682

^a PG= Proteina Grezza^b FG= Fibra Grezza^c NDF= Fibra al Detergente Neutro^d ADF= Fibra al Detergente Acido^e EE= Estratto Etereo

Tabella 11. Produzione e qualità del latte (valori per capo).

	Dieta				Periodo				P			Contrasti			
	PG151	PG15-rpCLA	PG12	PG12-rpCLA	1	2	3	4	SE	Periodo	Gruppo	Dieta	PG	CLA	PG*rpCLA
Latte, kg/d	29,0	29,0	27,2	28,1	31,2	29,4	27,0	25,7	0,63	0,003	0,080	0,229	0,071	0,368	0,504
Proteina, %	3,52	3,54	3,42	3,31	3,29	3,39	3,45	3,66	0,056	0,021	0,160	0,087	0,026	0,560	0,344
Proteina, kg/d	1,00	1,00	0,92	0,91	1,01	0,99	0,92	0,91	0,017	0,031	0,582	0,032	0,007	0,789	0,752
Grasso, %	3,72	3,13	3,69	3,12	3,31	3,32	3,47	3,54	0,120	0,482	0,273	0,015	0,707	0,002	0,782
Grasso, kg/d	1,07	0,90	0,98	0,87	1,02	0,97	0,93	0,87	0,021	0,022	0,370	0,004	0,048	0,001	0,253
MUN ^a , mg/d	11,90	11,30	6,23	5,76	8,88	9,32	8,23	8,79	0,384	0,338	0,398	<0,001	<0,001	0,230	0,754

^a MUN= Milk Urea Nitrogen**Tabella 12.** Equazioni di stima per la previsione del tenore proteico della dieta in relazione al MUN e valori riscontrati in questa prova sperimentale.

Variabile	Equazione	R2	PG15	PG15-rpCLA	PG12	PG12-rpCLA
PG, % SS (Broderick e Clayton)	0,27*MUN + 13,7	0,84	16,9	16,8	15,4	15,3
PG, % SS (Nousiainen)	0,45*MUN + 10	0,78	15,4	15,1	12,8	12,6
PG, % SS (prova attuale)			15,0	15,0	12,3	12,3

Tabella 13. Equazione di stima per la previsione del valore di MUN in relazione al valore di BUN e valori riscontrati in questa prova sperimentale.

Variabile	Equazione	R2	PG15	PG15-rpCLA	PG12	PG12-rpCLA
MUN, mg/dl (Broderick)	0,587*BUN+5,57	0,743	12,1	11,6	9,1	8,7
MUN, mg/dl (prova attuale)			11,9	11,3	6,2	5,8

Tabella 14. Bilancio dell'azoto.

	Dieta				Periodo				P			Contrast			
	PG15	PG15-rpCLA	PG12	PG12-rpCLA	1	2	3	4	SE	Periodo	Gruppo	Dieta	PG	CLA	PG*CLA
PG dieta, g/kg SS	149,9	149,9	123,8	123,8	135,4	135,1	137,7	139,3	0,30	<0,001	0,265	<0,001	<0,001	1,000	1,000
N ingerito, kg/capo/d	0,53	0,48	0,41	0,39	0,46	0,46	0,44	0,44	0,011	0,503	0,519	<0,001	<0,001	0,014	0,233
N latte, kg/capo/d	0,16	0,16	0,14	0,14	0,16	0,15	0,14	0,14	0,003	0,031	0,582	0,032	0,006	0,744	0,779
N escreto, kg/capo/d	0,37	0,32	0,27	0,24	0,30	0,30	0,30	0,30	0,010	0,966	0,384	<0,001	<0,001	0,008	0,196
N volatilizzato, kg/capo/d	0,11	0,09	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,003	0,966	0,384	<0,001	<0,001	0,008	0,196
N netto, kg/capo/d	0,27	0,23	0,19	0,17	0,22	0,22	0,22	0,21	0,007	0,966	0,384	<0,001	<0,001	0,008	0,196
N efficienza, %	29,75	32,66	35,02	37,31	34,67	34,14	32,77	33,14	0,818	0,403	0,259	0,003	<0,001	0,019	0,720

Tabella 15. Equazione di stima per la previsione del valore di efficienza di utilizzo dell'azoto in relazione al valore di MUN e valori riscontrati in questa prova sperimentale.

Variabile	Equazione	R2	PG15	PG15-rpCLA	PG12	PG12-rpCLA
N efficienza, % (Broderick)	$(34,4 - \text{MUN})/75,2 \cdot 100$	0,55	29,9	30,7	37,5	38,1
N efficienza, % (Nouasiainen)	$-0,73 \cdot \text{MUN} + 38$		29,3	29,8	33,5	33,8
N efficienza, % (prova attuale)	$\text{Nlatte}/\text{Ning} \cdot 100$		29,8	32,7	35,0	37,3

Tabella 16. Bilancio del fosforo.

	Dieta				Periodo				P			Contrast			
	PG15	PG15-rpCLA	PG12	PG12-rpCLA	1	2	3	4	SE	Periodo	Gruppo	Dieta	PG	CLA	PG*CLA
P dieta, g/kg SS	39,95	39,95	38,95	38,95	39,37	38,71	40,12	39,60	0,463	0,285	0,499	0,299	0,075	1,000	1,000
P ingerito, g/capo/d	88,40	79,49	80,34	75,63	83,98	81,78	80,51	77,59	1,258	0,056	0,304	0,002	0,003	0,002	0,146
P latte, g/capo/d	30,45	30,43	28,62	29,49	32,72	30,91	28,36	26,99	0,632	0,003	0,080	0,229	0,072	0,523	0,506
P escreto, g/capo/d	57,96	49,06	51,72	46,14	51,26	50,87	52,14	50,60	1,003	0,728	0,045	<0,001	0,004	<0,001	0,150
P efficienza, %	34,44	38,26	35,51	39,03	39,10	37,85	35,30	34,98	0,709	0,017	0,019	0,011	0,243	0,002	0,835

Tabella 17. Produzione di metano (valori per capo).

	Dieta				Periodo				P			Contrast			
	PG15	PG15-rpCLA	PG12	PG12-rpCLA	1	2	3	4	SE	Periodo	Gruppo	Dieta	PG	CLA	PG*CLA
CH ₄ , g/capo/d (Mills <i>et al.</i>)	454	426	407	394	430	427	415	408	7,7	0,251	0,368	0,006	0,002	0,036	0,387
CH ₄ , g/L latte (Mills <i>et al.</i>)	15,69	14,83	15,11	14,04	13,83	14,51	15,36	15,96	0,328	0,016	0,047	0,060	0,084	0,026	0,760

6 Bibliografia

- Arriaga H., Pinto M., Calsamiglia S., Merino P., 2009. Nutritional and management strategies on nitrogen and phosphorus use efficiency of lactating dairy cattle on commercial farms: An environmental perspective. *J. Dairy Sci.* 92:204–215.
- Baird C., Cann M., 2006. *Chimica ambientale*. Zanichelli.
- Bauman D. E., Peterson D. G., Corl B. A., Baumgard L. H., Perfield II J. W., 2001. Update on conjugated linoleic acids (CLA).
- Baumgard, L. H., Sangster J. K. and Bauman D. E., 2001. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). *J. Nutr.* 131:1764-1769.
- Bernal-Santos G., Perfield II J. W., Barbano D. M., Bauman D. E., Overton T. R. (2003). Production responses of dairy cows to dietary supplementation with Conjugated Linoleic Acid (CLA) during the transition period and early lactation. *J Dairy Sci* Vol. 86, No. 10.
- Borin M., Bigon E., Caprera P., 2003. *Atlante fenologico di specie agrarie*. Edagricole.
- Børsting C.F., Kristensen T., Misciattelli L., Hvelplund T., Weisbjerg M.R., 2003. Reducing nitrogen surplus from dairy farms. Effects of feeding and management. *Liv. Prod. Sci.*, 83: 165-178.
- Broderick G. A., 1995. Use of milk urea as an indicator of nitrogen utilization in the lactating dairy cow. U.S. Dairy Forage Research Center, 1995 research summaries.
- Broderick G. A., Clayton M. K., 1997. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. *J. Dairy Sci.* 80: 2964-2971.
- Broderick G.A., 2005. *Feeding to Minimize Nitrogen Excretion by Dairy Cows*. Agricultural Research Service, USDA.
- Castillo A.R., Kebreab E., Beever D.E., Barbi J.H., Sutton J.D., Kirby H.C., France J., 2001. The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. *J. Anim. Sci.* 79: 247-253
- Clark J. H., Klusmeyer T. H., Cameron M. R., 1992. Symposium: nitrogen metabolism and amino acid nutrition in dairy cattle: microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75: 2304-2323.

- Crovetto G. Matteo., Sandrucci Anna (2010). Allevamento animale e riflessi ambientali. Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche - Brescia – No. 78.
- Crovetto G.M., Colombini S., Colombari G., Rapetti L., 2009. Effects of constant vs. variable dietary protein content on milk production and N utilization in dairy cows. *It. J. Anim. Sci.* In press.
- Dal Maso M., Tagliapietra F., Cattani M., Fracasso A., Miotello S., Schiavon S., 2009. Characteristics of dairy farms in the North-Eastern part of Italy: rations, milk yield and nutrients excretion. *Ital. J. Anim. Sci.* vol. 8 (Suppl. 2), 295-297.
- Decreto Legislativo n. 152, 11 maggio 1999. Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento.
- Decreto Ministeriale n. 152, 7 aprile 2006. Criteri e norme tecniche generali per la disciplina regionale dell'utilizzazione agronomica dei reflui di allevamento.
- EC, Commissione Europea, http://ec.europa.eu/climateaction/eu_action/index_it.htm
- Edmonson A. J., Lean I. J., Weaver D., Farver T., Webster G., 1989. A body condition scoring chart of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:68-78.
- EEA, European Environmental Agency, 2005. Indicator: emission trends of ammonia NH₃. [http://themes.eea.europa.eu/Specificmedia/air/indicators/AP3a%2C2005.12/ap3a emiss NH3 1990 2005 final.pdf](http://themes.eea.europa.eu/Specificmedia/air/indicators/AP3a%2C2005.12/ap3a%20emiss%20NH3%201990%202005%20final.pdf)
- ERM, 2001. Livestock manures - Nitrogen equivalents. Copies available from: European Commission DG Environment – D1, 200 Rue de la Loi, B-1049 Brussels, Belgium.
- Garnsworthy P. C., Craigon I. J., Hernandez-Medrano J. H., and Saunders N, (2012). Variation among individual dairy cows in methane measurements made on farm during milking. *J. Dairy Sci.* 95 :3181–3189.
- Gulati S.K., Kitessa S.M., Ashes J.R., Fleck E., Byers E.B., Byers Y.G. and Scott T.W., 2000. Protection of conjugated linoleic acids from ruminal hydrogenation and their incorporation into milk fat. *Animal Feed Science and Technology* 86 (2000) 139-148.
- Gustafsson A. H., Palmquist D. L., 1993. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea and milk urea in dairy cows at high and low yields. *J. Dairy Sci.* 76: 575-484.
- Heinrichs J., Kononoff P., 1996. Evaluating particle size of forages and TMRs using the New Penn State Forage Particle Separator.

- Hutjens M. F., Barmore J., 1995. Milk urea nitrogen as a management tool. Sect. II in: protein and amino acid nutrition for dairy cattle, World Dairy Expo Symp. sponsored by Rhone-Poulenc Anim. Nutr.
- IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change , 2007. Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Cambridge University Press. <http://ipcc-wgl.ucar.edu/wgl/wgl-report.html>
- ISTAT, 2011. 6° censimento generale dell'agricoltura.
http://censimentoagricoltura.istat.it/fileadmin/template/main/res/comunicato_breve_def_.pdf
- Kalscheur K. F., Baldwin R. L., Glenn B. P., Kohn R. A., 2006. Milk production of dairy cows fed differing concentrations of rumen-degraded protein. J Dairy Sci. 89: 249-259.
- Kröber T.F., Kulling D.R., Menzi H., Sutter F., Kreuzer M., 2000. Quantitative effects of feed protein reduction and methionine on nitrogen use by cows and nitrogen emission from slurry. J Dairy Sci. 83:2941-2951.
- Lee, K. N., Kritckesky D., and Pariza M. W., 1994. Conjugated Linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. Atherosclerosis 108:19–25.
- Maxin G., Glasser F., Rulquin H., 2010. Additive effects of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and propionic acid on milk fat content and composition in dairy cows.
- Medeiros S. R., Oliveira D. E., Aroeira L. J. M., McGuire M. A., Bauman D. E., Lanna D. P. D. (2010). Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid to grazing cows in early lactation. J Dairy Sci Vol. 93, No. 3.
- Milkline, 2007. RuminAct™ Detecting welfare. Available at Internet:
http://www.healthycow24.com/eng/ruminact/down/pdf/INFO_E_Ruminact_22-10-07.pdf ,
viewed 2009-01-28.
- Mills J.A.N., Kebreab E., Yates C.M., Crompton L.A., Cammell S.B., Dhanoa M.S., Agnew R.E., France J. (2003). Alternative approaches to predicting methane emissions from dairy cows. J Anim Sci 81:3141–3150
- Noftsger S., St-Pierre N.R., 2003. Supplementation of methionine and selection of highly digestible rumen undegradable protein to improve nitrogen efficiency for milk production. J. Dairy Sci. 86:958-969
- Nousiainen, J., K.J. Shingfield and P. Huhtanen. 2004. Evaluation of milk urea nitrogen as a diagnostic of protein feeding. J. Dairy Sci. 87:386-398.

- NRC, Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 2001. Seventh Revised Edition, Washington, D.C. National Academy Press.
- O'Shea M., J. Bassaganya-Riera and I. C. M. Mohede., 2004. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *Amer. J. Clin. Nutr.* 79:1199S-1206S.
- Overton T. R., Bernal-Santos G., Perfield II J. W., Bauman D. E., 2001. Effects of feeding conjugated linoleic acids (cla) on metabolism and performance of transition dairy cows.
- Pappritz J., Meyer U., Kramer R., Weber E.M. , Jahreis G., Rehage J., Flachowsky G., Dänicke S., 2011. Effects of long-term supplementation of dairy cow diets with rumen-protected conjugated linoleic acids (CLA) on performance, metabolic parameters and fatty acid profile in milk fat.
- Pariza M., Ashoor S., Chu F., Lund D., 1979. Effects of Temperature and Time on Mutagen Formation in Pan-Fried Hamburger.
- Pariza M. W., Park, Y. and Cook, M. E. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, 40, 283-298.
- Sauvant D., Perez J. M. and Tran G., (2004). Tablets of composition and nutritional value of feed materials. INRA editions.
- Sejian V., Lal R., Lakritz J., Ezeji T. (2011). Measurement and prediction of enteric methane emission. *Int J Biometeorol* 55: 1-16.
- Sharpey A. N., Menzel R.G., 1987. The impact of soil and fertilizer phosphorous on the environment. *Advances in Agronomy*, 41: 297-324.
- Shiavon S., Tagliapietra F., Bailoni L., Cecchinato A., Bittante G. (2011). Low protein diets and rumen-protected conjugated linoleic acid increase nitrogen use efficiency and reduce environmental impact of double-muscled Piemontese bulls. *Animal Feed Science and Technology* 174 (2012) 96– 107.
- Sprecher D.J., Hostetler D.E., Kaneene J.B., 1996. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology* 47:1179-1167.
- Stenfield H., Gerber P., Wassenaar T., Castel V., Rosales M., de Haan C., 2006. Livestock's long shadow. Environmental issues and options. FAO.
<http://fto.fao.org/docrep/fao/010/a0701e/A0701E00.pdf>
- UNFCCC, the United Nations Framework Convention on Climate Change,
http://unfccc.int/kyoto_protocol/items/2830.php

Veth M.J., Castañeda-Gutiérrez E., Dwyer D.A., Pfeiffer A.M., Putnam D.E., Bauman D.E., 2006.
Response to Conjugated Linoleic Acid in Dairy Cows Differing in Energy and Protein
Status.