



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIE ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI E  
AMBIENTE

DIPARTIMENTO DEL RELATORE DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E  
SALUTE

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE  
ANIMALI

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE

**Validazione delle analisi Polispec<sup>NIR</sup> su carro miscelatore**  
**“Validation of the Polispec<sup>NIR</sup> analyzes on the mixer wagon”**

Relatore

Prof. Iginio Andrighetto

Correlatore

Dott. Lorenzo Serva

Laureanda

Lara Rigon

Matricola n.

1220912

ANNO ACCADEMICO 2021/2022



## Sommario

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Riassunto .....                                                                                          | 2  |
| Abstract .....                                                                                           | 3  |
| 1. Introduzione .....                                                                                    | 4  |
| 1.1. <i>Precision Feeding</i> .....                                                                      | 4  |
| 1.2. Variabilità dei prodotti agricoli e dei carri miscelatori.....                                      | 6  |
| 1.2.1. Insilati di mais e di erba .....                                                                  | 6  |
| 1.2.2. Foraggi e fieni secchi .....                                                                      | 8  |
| 1.2.3. Carri miscelatori (Mixer Feed Wagon) e razioni miste totali (Total Mixed Ration) a confronto..... | 11 |
| 1.2.4. Fattori che influenzano l'omogeneità del TMR.....                                                 | 13 |
| 1.3. Le analisi NIRS .....                                                                               | 13 |
| 1.3.1. La tecnica NIRS.....                                                                              | 13 |
| 1.3.2. La calibrazione .....                                                                             | 14 |
| 1.3.3. Potenzialità, utilizzo, pro e contro.....                                                         | 14 |
| 1.3.4. Strumento portatile <i>PolispecNIR</i> e applicazione su carro miscelatore.....                   | 17 |
| 1.3.5. Indice omogeneità (IO) e indice selezione (IS) e applicazione sul carro miscelatore.....          | 19 |
| 2. Obiettivo.....                                                                                        | 20 |
| 3. Materiale e metodi.....                                                                               | 20 |
| 3.1. <i>Provenienza dei campioni</i> .....                                                               | 20 |
| 3.2. <i>Raccolta dei campioni</i> .....                                                                  | 21 |
| 3.3. <i>Analisi NIRS e metodi di riferimento</i> .....                                                   | 21 |
| 3.4. <i>Analisi statistica</i> .....                                                                     | 23 |
| 4. Risultati.....                                                                                        | 24 |
| 4.1. <i>Raccolta dei campioni</i> .....                                                                  | 24 |
| 4.2. <i>Analisi NIRS e metodi di riferimento</i> .....                                                   | 26 |
| 4.3. <i>Ripetibilità e variabilità</i> .....                                                             | 29 |
| 4.4. ANOVA.....                                                                                          | 35 |
| 5. Discussione.....                                                                                      | 39 |
| 6. Conclusioni .....                                                                                     | 42 |
| 7. Bibliografia.....                                                                                     | 43 |

## Riassunto

A causa della variabilità della composizione nutrizionale delle materie prime aziendali miscelate per la realizzazione dei TMR, al quale si coniuga la necessità di efficientare i processi produttivi per ottimizzare la redditività aziendale, ci si è proposto uno studio su un metodo di analisi di parametri aziendali innovativo e migliorativo, per aziende di bovini dedite alla produzione di latte e carne. La presente ricerca ha quindi considerato la valutazione, validazione e i metodi di attuazione della alimentazione di precisione analizzando l'attendibilità di analisi effettuate con uno strumento NIRS portatile (Polispec<sup>NIR</sup>), rispetto ad un NIRS fisso da laboratorio e della sua possibile applicazione sul carro miscelatore. La ricerca ha evidenziato che metodi di analisi più veloci, realizzabili sul posto, in modo ripetitivo e applicabili alle attrezzature quali *Mixed Feed Wagon* (MFW), come la tecnologia Polispec<sup>NIR</sup>, benché possano essere meno precisi di un'analisi NIRS di laboratorio singola, sono più congrui all'attività in campo, vista la ripetitività d'analisi che offrono e la velocità con la quale si ottengono i risultati a costi ridotti.

L'applicazione di questa tecnologia soprattutto sul carro miscelatore consente di migliorare la tecnica TMR con l'ottimizzazione dell'Indice di Omogeneità (IO) della razione con importanti ripercussioni sull'attività digestivo-metabolica degli animali.

## Abstract

Improving the feeding efficiency and raising the economic sustainability of farms in ruminants breeding requires evaluating the considerable variability of the chemical and physical composition of fodders affecting the variability of the diet. Therefore, we propose an innovative method for analysing technical aspects of Total Mixed Ratio (TMR) preparation in dairy farms or rearing calves. The study aimed to evaluate and validate the precision feeding (PF) method through an on-farm Near Infra-red analysis (Polispec<sup>NIR</sup>) compared to laboratory NIRS apparatus (FOSS DS 2500). Results demonstrate that despite the weaker accuracy of the portable NIRS instrument compared to a single laboratory NIRS system test, increasing the analysis repetition along the feeding line allows a more precise evaluation of TMR variability. In addition, the Polispec<sup>NIR</sup> can be installed on the mixer wagon feeder (MWF), allowing a better TMR preparation, especially to control the ration homogeneity.

## 1. Introduzione

### 1.1. *Precision Feeding*

La *Precision Feeding* (PF) rientra nel più ampio ambito dell'agricoltura di precisione (a-Precision Farming).

L'agricoltura di precisione è una nuova modalità per la gestione degli allevamenti zootecnici e consiste in raccolte di dati e di analisi che combinate permettono di orientare e modificare scelte operative in tempo reale e in funzione delle variabili che si presentano. Tale approccio permette di sfruttare in modo più efficace le risorse a disposizione degli allevatori, migliorare la produttività, operare in una maniera consapevole e quindi anche più redditizia.

Inoltre, i consumatori sono sempre più disponibili a spendere di più per prodotti animali ottenuti attraverso la soddisfazione del benessere animale e la protezione dell'ambiente [1].

Il reddito di un allevatore non dipende solo dal prezzo del latte (che viene stabilito dal caseificio privato o dalla cooperativa di raccolta), ma anche dal costo della razione. In tal senso tuttavia poiché il costo dell'alimentazione delle bovine da latte incide per 60% circa sul totale dei costi di produzione, la tentazione principale di un allevatore è quella di ridurre i costi di produzione partendo dal taglio delle spese alimentari, diminuendo il quantitativo degli alimenti più costosi o prestando meno attenzione alla qualità dei prodotti utilizzati a favore di un prezzo inferiore della materia prima.

La vacca che non mangia è un animale che costa poco dal punto di vista dell'alimentazione, ma è anche un animale che produce meno e che si ammala di più. Il rischio che si corre è quello di avere elevati costi sanitari.

Oggi invece l'allevatore si pone un duplice obiettivo: perseguire l'efficienza ovvero massimizzare la conversione dell'ingesta in produzione di latte e aumentare di fatto la differenza tra costi e ricavi a favore del profitto.

Per questo motivo diventa fondamentale attuare misure concrete, quali l'alimentazione di precisione (PF) per esempio, al fine di ottimizzare la gestione dell'azienda [2].

Un approccio all'allevamento basato sulla PF, si focalizza quindi su una alimentazione costante ed equilibrata con una razione sempre omogenea disponibile in mangiatoia e che mira a ridurre il più possibile la differenza tra razione teorica, razione somministrata di norma dall'allevatore tramite carro miscelatore e razione ingerita dall'animale [3].

Per l'attuazione di una alimentazione di precisione ci sono alcuni aspetti da tenere in considerazione:

- La valutazione qualitativa degli alimenti utilizzati. Vista la grande variabilità della qualità degli alimenti, soprattutto dei foraggi e insilati, è necessario il supporto di tecnologie in grado di fornire rapidamente profili nutrizionali.
- Necessità di riadeguamenti veloci della razione sulla base dei bisogni degli animali in allevamento, sia per stadio di lattazione che per stadio di accrescimento, ma soprattutto sulla base delle materie prime disponibili in azienda ottimizzando l'utilizzo di foraggi o cereali aziendali.
- Necessità di misure regolari e frequenti sulla sostanza secca ingerita che permettono il calcolo dell'efficienza alimentare. Quest'ultima è un chiaro indicatore di quanto un animale medio produce (ricavo aziendale) per ogni kg di sostanza secca ingerita (costo aziendale).

L'approccio quindi ad una alimentazione di precisione, nonostante richieda sicuramente importanti investimenti in termini sia di tempo, almeno inizialmente, che finanziari, diventa certamente un metodo efficace per ottimizzare il processo digestivo e di produzione, per migliorare la qualità del prodotto finito e le prestazioni riproduttive, diminuire costi di produzione, limitare gli sprechi e ridurre l'impatto ambientale. Il tutto si traduce anche con la presenza di animali con minori problemi di salute e quindi maggior benessere.

La spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS) è sicuramente un'interessante applicazione per l'allevamento in un sistema PF in quanto è un sistema economicamente valido per la somministrazione della giusta quantità di nutrienti giornalieri evitando alterazioni metaboliche e puntando a un'elevata efficienza nel consumo degli alimenti [1].

## 1.2. Variabilità dei prodotti agricoli e dei carri miscelatori

### 1.2.1. *Insilati di mais e di erba*

Prodotti agricoli quali insilati di mais o di fieno, foraggi secchi o fasciati, pastoni di cereali sono alimenti che stanno alla base della composizione di una qualsiasi dieta per ruminanti. Hanno una importanza fondamentale in quanto vengono autoprodotti dalle aziende agricole che si rendono così autonome per buona parte degli alimenti. Per questi motivi è fondamentale che tali foraggi aziendali siano prodotti ottimizzandone la quantità prodotta e il mantenimento delle proprietà nutritive.

Gli insilati in generale ma anche i foraggi, hanno un grande potenziale di variazione. Il grado di variabilità della produzione dipende in gran parte dalla gestione dei sistemi di coltivazione, irrigazione, dalle proprietà intrinseche del terreno, dai metodi e tempi di raccolta e dai sistemi di conservazione.

Esemplificativa in tal senso è una ricerca eseguita in nord America nel 2004 [4]. Per stimare le potenziali variazioni, sono stati valutati undici insilati di mais e nove trincee di insilato di erba provenienti da nove aziende zootecniche americane. Inoltre, per far sì che le rilevazioni sull'insilato potessero riflettere significativamente sulla composizione finale della dieta sono stati raccolti dati anche sul metodo di desilamento dell'insilato usato dalle aziende oggetto della prova. A riguardo sono state valutate sei aziende agricole che utilizzavano la ruspa come strumenti per desilare l'alimento, due aziende che utilizzano la pala caricatrice applicata ad un trattore e una azienda dotata di carro miscelatore provvisto di braccio desilatore. Tale confronto è derivato dalla supposizione che con l'impiego della pala il prelievo viene eseguito in una unica zona della trincea, con la ruspa invece la sezione di prelievo è più ampia rispetto alla pala ma sempre limitatamente rappresentativa dell'intera massa. L'uso del desilatore sembra offrire invece una maggiore garanzia di costanza di composizione dell'insilato prelevato. Le analisi eseguite in diversi punti delle trincee per i due prodotti insilati oggetto di prova, hanno riscontrato deviazioni standard anche molto significative (tabella 1-1 [5]). Importanti variazioni sono state rilevate in modo particolare rispetto al contenuto di sostanza secca, proteina grezza e di acido lattico, quest'ultimo rispecchia stati fermentativi diversi.



Tabella 1-1: Valori di deviazioni standard dei principali costituenti chimici e fermentative registrati su campioni prelevati in vari punti 9 trincee di insilato di erba e 11 di insilato di mais. [5]. I risultati sono espressi come contenuto % sulla sostanza secca. SS=sostanza secca, PG=proteina grezza.

|                                  | ss   | Pg   | ADF  | aNDF | Ac.lattico | Ac.acetico | Var.totale |
|----------------------------------|------|------|------|------|------------|------------|------------|
| <b>Trincea di fieno insilato</b> |      |      |      |      |            |            |            |
| deviazione std minima, %         | 5,20 | 3,30 | 1,10 | 5,40 | 5,20       | 25,0       | 7,00       |
| deviazione std massima,%         | 44,7 | 52,1 | 20,0 | 24,8 | 646        | 163        | 287        |
| deviazione std media, %          | 21,0 | 17,6 | 10,7 | 14,7 | 112        | 72,0       | 69,0       |
| deviazione std mediana, %        | 19,4 | 95,0 | 9,90 | 14,4 | 57,0       | 50,0       | 38,0       |
| <b>Trincea di mais insilato</b>  |      |      |      |      |            |            |            |
| deviazione std minima, %         | 1,30 | 2,50 | 2,30 | 0,50 | 3,80       | 11,2       | 0,10       |
| deviazione std massima,%         | 55,0 | 29,5 | 18,3 | 18,6 | 48,7       | 131        | 41,3       |
| deviazione std media, %          | 12,3 | 11,0 | 8,40 | 8,60 | 25,6       | 53,7       | 20,5       |
| deviazione std mediana, %        | 8,30 | 10,0 | 8,60 | 8,40 | 26,0       | 29,9       | 21,4       |

Figura 1-1: sostanza secca (SS) rilevata in diversi punti affiancati di una trincea di insilato [5].



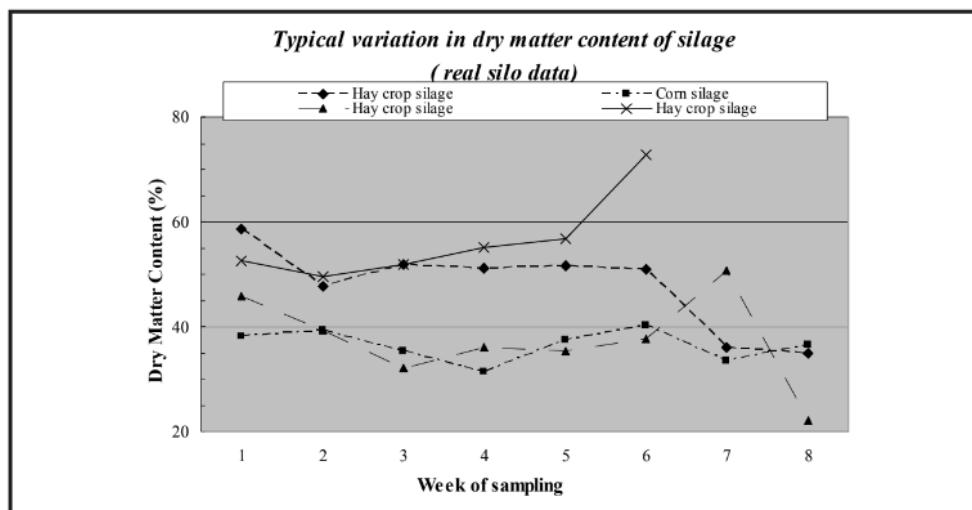
Nella figura 1-1 si rappresentano i valori di SS rilevati in tre punti di campionamento sovrapposti e due colonne di prelievo affiancate nella trincea, inoltre i prelievi sono stati ripetuti tre volte a distanza di circa tre giorni per il controllo della SS. Le SS più alte sono state rilevate nella zona più bassa della trincea di contenimento. Alla luce di questi risultati, appare chiaro che sia necessario usare un dispositivo di desilamento della trincea che renda più ampia e quindi uniforme l’area di prelievo della SS. Oggi infatti si può affermare che il metodo migliore per il prelievo dell’insilato dalla trincea è senza dubbio quello che prevede l’uso del desilatore in quanto consente di avere un Total Mixed Ration (TMR) più omogenea da distribuire in mangiatoia [5]

La poca omogeneità di un TMR e l’incertezza circa l’effettiva composizione dello stesso dipende in particolare dalla poca costanza delle caratteristiche degli ingredienti utilizzati nella formulazione delle diete; ci sono prove convincenti che un campionamento frequente e di buona

attendibilità analitica dei foraggi per qualità chimica e fisica è necessario per mantenere TMR conforme a quanto supposto in razionamento [6,7].

Gli insilati, in generale, presentano la più alta variabilità per TMR e il contenuto di umidità del foraggio può variare sostanzialmente di settimana in settimana e a volte da un giorno all'altro.

Figura 1-2: Tipica variazione in contenuto di sostanza secca (SS) dell'insilato per un periodo di otto settimane su vari tipi di insilato di mais e di erba. [8]



Nella figura 1-2 tasi possono osservare alcune modifiche tipiche nel contenuto di SS di insilati presenti in allevamenti dediti alla produzione di latte della Pennsylvania. Questi dati sono stati raccolti sulla stessa trincea di insilato per otto settimane consecutive.

All'aumentare del contenuto di SS degli insilati, i contenuti di nutrienti della razione vengono modificati. Inoltre, un'aumento del contenuto di umidità dell'insilato di mais (ad esempio, a causa della pioggia o del cambiamento delle condizioni climatiche avvenute durante le operazioni di raccolta), diluisce il contenuto percentuale di amido del foraggio con conseguente riduzione del contenuto energetico della razione. In questo scenario, poiché l'umidità del foraggio varia senza che sia effettuata una compensazione al momento della miscelazione, la quantità di energia potrebbe risultare non sufficiente e il rapporto *energia/proteina* sbilanciato. Se invece un foraggio fosse testato per il contenuto di umidità ogni giorno, la composizione della razione potrebbe essere ricalibrata tempestivamente.

### 1.2.2. Foraggi e fieni secchi

Un'accurata analisi del foraggio, che sia rappresentativa ad esempio di un lotto di fieno, è necessaria ai nutrizionisti per il bilanciamento delle razioni e agli acquirenti/venditori per individuare il corretto prezzo della merce. Un campione di fieno viene generalmente considerato rappresentativo di una partita se proviene dallo stesso taglio, campo, specie, varietà, stadio di

maturità e grado di essiccazione. Una corretta campionatura del fieno per l'analisi prevede l'utilizzo di appositi carotatori che prelevano il foraggio dal ballone in profondità. I carotatori devono campionare in modo veritiero assicurando il reale rapporto foglia/stelo delle balle e arrivando abbastanza profondamente da poter rappresentare la variabilità presente all'interno delle balle.

Vi è una notevole variazione nella composizione del fieno anche tra balle che provengono dallo stesso campo e prodotte nelle stesse condizioni. Uno studio eseguito in California nel 2000 [9], che ha analizzato la variabilità di una coltura di fieno misto di erba medica prelevando campioni da più punti della stessa balla e da più balle dello stesso lotto, per un numero minimo di venti prelievi. I campioni sono stati analizzati presso tre laboratori. Si sono osservate alte variabilità per SS, aNDF e ADF (tabella 2-2).

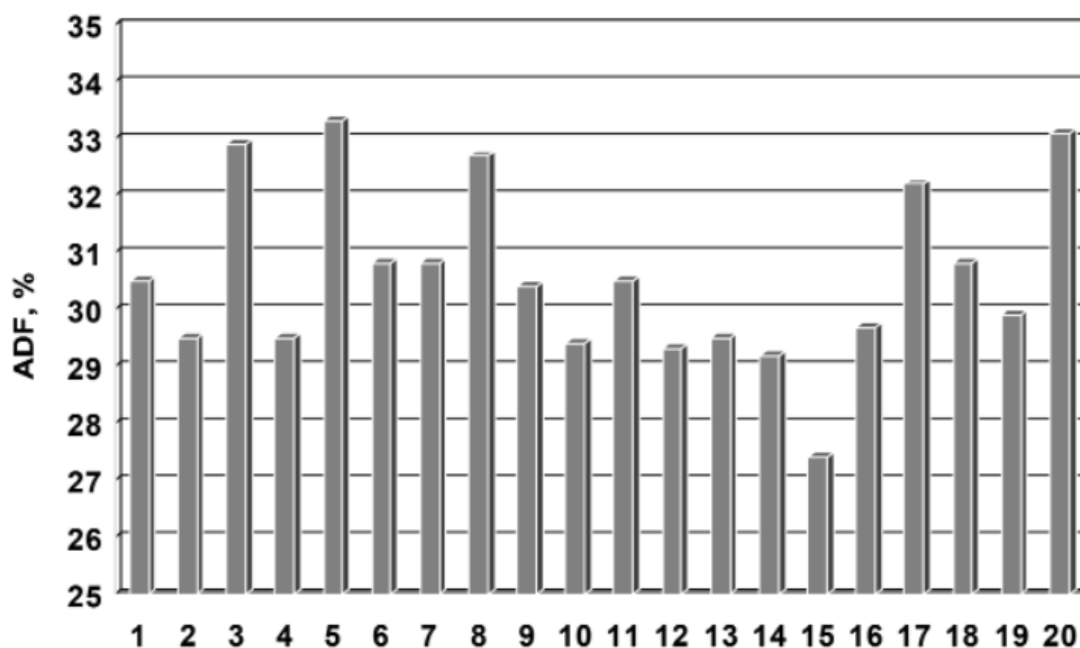
*Tabella 1-2: Esempio di variabilità del contenuto di sostanza secca (SS), aNDF, ADF e lignina, misurate in 20 balloni di erba medica provenienti dallo stesso lotto dopo tre mesi dell'immagazzinaggio [9]. Numero di osservazioni per lotto (n).*

| Variabile  | n  | media% | Dev.std% | minimo% | massimo% |
|------------|----|--------|----------|---------|----------|
| SS%        | 20 | 60,16  | 1,054    | 58,0    | 62,1     |
| NDF (%ss)  | 20 | 61,2   | 1,893    | 58,4    | 64,9     |
| ADF (%ss)  | 20 | 36,5   | 1,039    | 34,1    | 38,2     |
| Lign (%ss) | 20 | 6,81   | 0,499    | 5,90    | 7,50     |

Le evidenze sperimentali hanno sottolineato che l'entità delle variazioni era dovuta alla variazione tra le balle all'interno del lotto di fieno, al metodo di conservazione e alle condizioni climatiche di immagazzinaggio e alle analisi di laboratorio. Un prelievo troppo superficiale del ballone può anch'esso rappresentare una causa di variabilità e non conformità del campione. Sulla base dell'intervallo dei valori ottenuti, si può affermare che se fosse stato raccolto un solo campione per rappresentare questo lotto di fieno, si sarebbero potuti ottenere valori molto diversi. Per esempio, la SS poteva variare tra 58,0% e 62,1% solo a causa della variazione tra le balle all'interno del lotto di fieno.

A conferma di questi dati, una ricerca condotta in Sout Dakota[9] che prevedeva il prelievo di 20 campioni su un lotto di fieno di erba medica, sempre nell'ottica di valutare la variabilità dei foraggi, ha considerato in particolare le variazioni del contenuto di ADF. I risultati, riportati nel grafico (figura 1-3), hanno evidenziato variazioni da 33,5%, come valore massimo, a 27,5% come valore minimo, con una media pari al 30,5% e deviazione standard del 1,6%.

Figura 1-3: Variazione della concentrazione di ADF all'interno di un lotto di fieno di erba medica su 20 campioni prelevati. I campioni provenivano da balle diverse e da zone diverse nella stessa balle [9].



In definitiva, si può affermare che la variabilità dei prodotti insilati e dei foraggi è molto ampia nonostante si siano nel tempo studiati e applicati metodi sempre più efficienti per i prelievi degli alimenti, migliorate le tecniche di conservazione e di raccolta dei prodotti aziendali. Pertanto esiste ancora un ampio margine di miglioramento per rendere più costante la qualità e l'omogeneità nutrizionale delle materie prime aziendali utilizzate per l'alimentazione bovina. Trovare una tecnologia che permetta la diminuzione di tali variabilità tramite misurazioni oggettive, ripetute e in tempo reale degli apporti nutrizionali degli alimenti immessi nel carro miscelatore può creare un valore aggiunto sull'efficacia tecnico-economica aziendale e il benessere animale.

### *1.2.3. Carri miscelatori (Mixer Feed Wagon) e razioni miste totali (Total Mixed Ration) a confronto*

La tecnica di alimentazione di base nei bovini e soprattutto negli allevamenti di vacche da latte, è la somministrazione della razione in un'unica soluzione previa miscelazione di tutte le componenti. La dieta detta tecnicamente e conclamata come unifeed o TMR prevede la miscelazione di alimenti, principalmente fibrosi quali fieno, erba medica e insilati con l'aggiunta di concentrati come cereali o farine oleose. La razione alimentare così proposta ai bovini in mangiatoia influisce favorevolmente sul consumo alimentare da parte degli animali, sulla loro efficienza e il loro stato di salute [10].

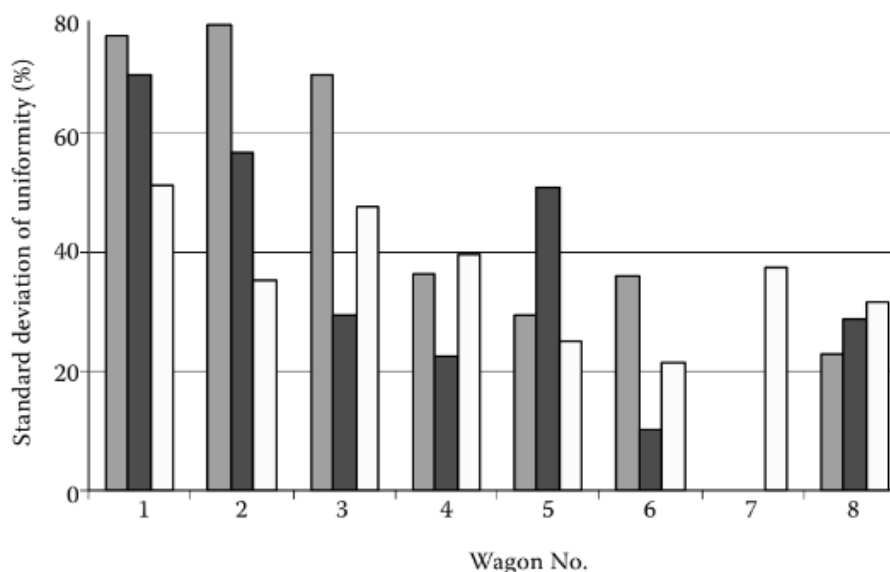
Tale operatività è possibile grazie alla disponibilità di carri miscelatori molto diversificati in progettazione, a partire dalla potenza del motore, dalla grandezza del cassone, dal tipo di coclee verticali o orizzontali, dal numero di coltelli e dalla presenza di dispositivi come desilatori e mulini di taglio dei foraggi. Tutte queste componenti possono ovviamente influenzare e rendere più o meno costante il TMR in produzione.

L'analisi della omogeneità viene perseguita in quanto la contemporanea ingestione di tutti i componenti della razione consente l'ottimizzazione delle attività microbiche ruminali con positive ricadute sui processi digestivi-metabolici degli animali.

Uno studio condotto in Repubblica Ceca nel 2007 [10] ha preso in considerazione proprio tali aspetti. Sono stati studiati otto diversi carri miscelatori di alimentazione (MFW) e sono state applicate condizioni standardizzate nella preparazione di TMR per tre diverse categorie di bovini: vacche in asciutta, bovini all'ingrasso e manze in accrescimento (figura 1-4). Sono stati prelevati 10 campioni per ogni razione erogata. Sono state studiate l'uniformità di distribuzione della razione nella mangiatoia (indice di omogeneità), la capacità della macchina nel prelevare gli alimenti dai depositi, i metodi di caricamento, la miscelazione e la distribuzione della TMR nella mangiatoia e il consumo di carburante necessario.

I risultati di questa ricerca hanno evidenziato un'uniformità ridotta nei TMR con un'elevata percentuale di fieno (valore medio della deviazione standard 49,9%).

Figura 1-4: Deviazione standard dell'uniformità di distribuzione della razione in mangiatoia con l'uso di diversi Mixer Feed Wagon (MFW). Barre grigio chiaro Total Mixer Ration (TMR) per vacche asciutte, barre grigio scuro TMR per bovini all'ingrasso e barre bianche TMR per vacche in latte [10].



I risultati migliori sono stati ottenuti con MFW progettati con coclee di miscelazione orizzontali (deviazione standard media 33,7%) mentre MFW con coclee verticali tale deviazione standard media è salita a 61,3%. Non sono state riscontrate grandi differenze tra i vari modelli di MFW per quanto riguarda la capacità della macchina nella preparazione e distribuzione della TMR.

Si può quindi affermare che a prescindere dal tipo di carro miscelatore utilizzato, la variabilità della miscelata dipende principalmente da due fattori: gli alimenti che si utilizzano per il razionamento e la disposizione delle coclee più efficace per la miscelazione. La scelta delle coclee è una scelta che spetta all'allevatore al momento dell'acquisto del carro miscelatore e non più modificabile durante il suo impiego, mentre è possibile intervenire quotidianamente sull'omogeneità della razione migliorandola, partendo dalla conoscenza delle caratteristiche nutrizionali degli alimenti. Questa omogeneità deve essere mantenuta non solo per quanto riguarda la miscelazione operata giornalmente, ma per poter beneficiare di un miglioramento reddituale persistente nel tempo, l'uniformità della razione va mantenuta costante ogni giorno dell'anno.

#### 1.2.4. Fattori che influenzano l'omogeneità del TMR

Fattori come il grado di riempimento, la sequenza di carico di alimenti nel miscelatore, il tempo di miscelazione, i livelli di umidità dei prodotti, l'affilatura dei coltelli, la manutenzione e la calibrazione della bilancia possono influenzare notevolmente l'uniformità della miscela. Quando si considera l'uniformità della miscela, ci sono due tipi distinti di variazione: variazioni entro la stessa miscelata e variazioni tra miscele somministrate in giorni successivi. Mantenendo entrambi ad un livello più uniforme possibile si possono riscontrare risposte produttive dagli animali molto interessanti e un miglioramento sullo stato di salute e sul benessere degli animali e del loro apparato digerente.

Al fine di poter monitorare tali fattori è imprescindibile il fatto che si devono apportare delle misurazioni oggettive sul TMR di volta in volta preparato.

### 1.3. Le analisi NIRS

#### 1.3.1. La tecnica NIRS

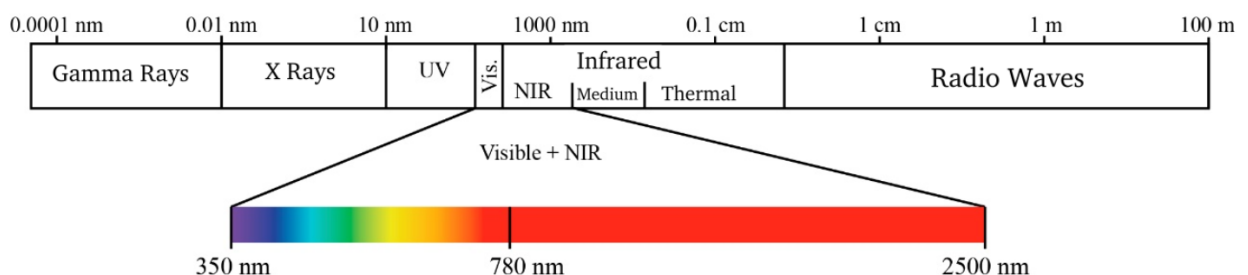
NIRS è acronimo di *Near Infrared Reflectance Spectroscopy* cioè spettroscopia basata sulla riflettanza del più vicino infrarosso. Per “spettroscopia” si intende “osservazione dello spettro”.

Quando “vediamo” qualcosa, vediamo la luce riflessa.

Quindi, se qualcosa appare giallo, è perché quell'oggetto riflette la luce gialla e assorbe le lunghezze d'onda della luce visibile. A differenza della luce visibile, la luce infrarossa riflessa sulla composizione della materia, in particolare legge i legami idrogeno. Se potessimo vedere la luce infrarossa, non vedremmo il colore ma piuttosto proteine, amidi, grassi ecc (figura 1-5).

Quindi la tecnica NIRS è un metodo di analisi che sfrutta alcune proprietà fisiche della materia ed in particolare l'interazione di questa con le radiazioni del vicino infrarosso. Questa tecnica si avvale della specifica capacità di ogni composto chimico di assorbire energia, trasmettere o riflettere la radiazione luminosa. La combinazione delle proprietà assorbenti, combinate con quelle di dispersione dell'energia luminosa, determina la diffusa riflettanza della luce, che contiene informazioni sulla composizione chimica del campione.[11]

Figura 1-5: spettro di luce visibile e NIR.



Questo metodo ha dei vantaggi molto importanti, basti pensare alla velocità e la semplicità di esecuzione delle analisi e ai costi ridotti dell'operazione rispetto alle tecniche tradizionali. Si combina molto bene con le necessità di avere esiti celeri tipici di una moderna gestione agricola; difatti le tempistiche per avere il risultato di una analisi varia da pochi secondi a qualche minuto.

### *1.3.2. La calibrazione*

Per l'analisi di nuovi prodotti è necessario creare curve di calibrazione specifiche per le quali bisogna disporre di un adeguato e rappresentativo numero di campioni. Idealmente il set di calibrazione dovrebbe avere la più ampia variabilità possibile dei costituenti e la migliore uniformità dei campioni.

Il primo passo consiste nella realizzazione di un set di calibrazione di riferimento tramite la collezione di campioni che devono contenere tutte le possibili variazioni che si potrebbero trovare nei campioni sconosciuti. Una volta ottenuto un adeguato e rappresentativo numero di curve di taratura, bisogna scegliere una metodologia statistica adeguata a ottenere la calibrazione. La più classica è la regressione lineare semplice. Ottenuta la curva di calibrazione si dovrà procedere alla sua validazione realizzandola all'inizio su un set di campioni noti, per procedere poi con nuovi campioni testando l'accuratezza della curva [11].

### *1.3.3. Potenzialità, utilizzo, pro e contro*

L'uso del NIRS è stato approvato inizialmente dall'Association of Official Analytical Chemists (AOAC) per l'uso nella determinazione dell'umidità, dell'azoto Kjeldahl e della fibra detergente acida per analisi di mangimi e foraggi.

Dobbiamo sicuramente ricordare che una analisi NIRS non può essere equiparata all'analisi chimica in quanto quest'ultima resta comunque la più precisa. L'analisi chimica è preliminare rispetto alla calibrazione delle curve NIRS quindi se vengono raccolti dati di calibrazione errati la curva NIRS produrrà dati di calibrazione poco accurati [12].

Va inoltre sottolineato che lo strumento NIRS resta una tecnologia che necessita comunque per il funzionamento di una componente umana. Quindi se usato in modo adeguato produrrà risultati accurati se usato in modo improprio non possiamo aspettarci ugualmente una risposta rappresentativa.

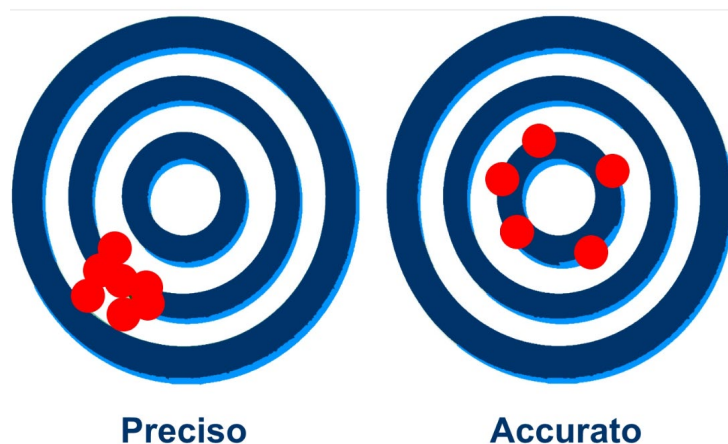
Le principali cause di variabilità tra un'analisi NIRS e un'altra, in riferimento a più campioni dello stesso lotto o in riferimento allo stesso campione ma analizzato da due laboratori diversi, sono sicuramente il metodo di campionamento e la procedura di analisi seguita. Esistono delle procedure standard di campionamento per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali



previste dal regolamento CE n.152/2009 del 27 gennaio 2009. Queste procedure prevedono l'uso di carotatrice per prelievi di campioni elementari eseguiti su più punti della massa che andranno poi adeguatamente mescolati e a sua volta ricampionati al fine di ottenere un campione ridotto rappresentativo di circa 500 grammi da portare in laboratorio. Esistono procedure consigliate per l'esecuzione di una analisi in laboratorio elencate dal *National Forage Testing Association* (NFTA) ma certamente ogni laboratorio prevede al suo interno un protocollo operativo per l'esecuzione delle analisi che permette di ottenere la maggior accuratezza possibile. Sicuramente un campionamento e una analisi eseguite in maniera più attinente possibile al protocollo, daranno risultati con minore margine di errore.

Nella maggior parte degli studi la qualità della calibrazione NIRS viene valutata in termini di precisione e accuratezza. La precisione indica quanto lo strumento, analizzando sempre lo stesso campione, è in grado di fornire un risultato sempre simile al primo con una differenza costante rispetto al valore reale (che di solito è ignoto); per accuratezza invece si intende quanto uno strumento esprime dei risultati diversi, ma comunque vicini al valore reale e mediandoli il risultato sarà molto vicino al nostro punto ignoto centrale (figura 1-6).

Figura 1-6: esempio di precisione e accuratezza applicabile allo strumento NIRS.

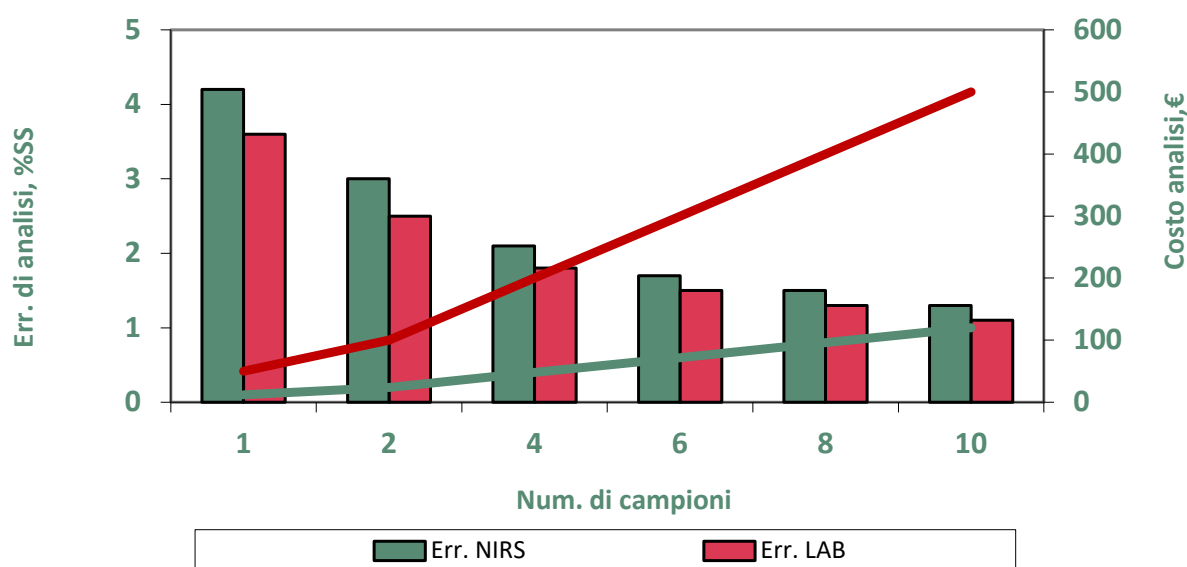


Un errore comune è presumere che, a parità di spesa, un'analisi chimica di un alimento ottenuta su un singolo campione non rappresentativo dell'intero lotto (e presumibilmente eseguita a un costo maggiore rispetto a una singola analisi NIRS) possa essere più accurata di determinazioni NIRS ripetute e capaci di considerare la reale variabilità del prodotto in esame. L'opportunità dell'impiego del NIRS è quella di prelevare e analizzare più campioni. Il minor costo di analisi NIRS e la ripetitività che consente, renderà più efficiente il processo di analisi e l'esecuzione di più campioni e ridurrà notevolmente l'errore di analisi. Ciò permette, a parità di costo, di analizzare

un maggior numero di campioni riducendo l'errore di campionamento in campo, e di conseguenza aumentando la rappresentatività del campione nella massa complessiva del prodotto aziendale.

Un altro errore comune è quindi supporre che il NIRS sia sempre sbagliato quando il risultato di un'analisi chimica e NIRS differiscono. Le calibrazioni sono efficienti al punto che, per la proteina una analisi chimica sarà d'accordo con la media delle ripetizioni in NIRS circa l'80% delle volte. Mentre la chimica per le analisi ADF e aNDF concordano con la media delle ripetizioni NIRS circa il 50% delle volte. In breve, se hai un NIRS e un'analisi chimica che differiscono, non hai modo di sapere quale sia corretta!

Figura 1-7: Errore NIRS e errore chimica a confronto tenendo presente i costi.



Come si può notare dalla figura 1-7 confrontando la probabilità di errore in % sulla SS tra l'analisi NIRS e l'analisi chimica, tenendo in considerazione anche il costo analisi, si può vedere chiaramente che all'aumentare del numero di campioni analizzati l'errore si riduce per entrambe le analisi, ma anche il divario tra l'errore in chimica e in tecnica NIRS diventa sempre più simile fino quasi ad eguagliarsi. Di contro però, analizzare 10 campioni con un metodo chimico ha un costo economico che è 5 volte più alto!

Le potenzialità dello strumento NIRS non si limitano alla sola analisi delle componenti nutrizionali come aNDF, proteina, amidi, SS, ecc. ma possono consentire lo sviluppo di sistemi di predizione ad esempio per la fibra rumino attiva o peNDF, che sta ad indicare quanta parte della fibra induce l'attività ruminale garantendo la salute dei prestomaci, o algoritmi in grado di verificare il grado di omogeneità della razione o la capacità selettiva delle bovine dopo lo scarico in mangiatoia. Inoltre si può rilevare il grado di sfibratura del foraggio, quindi la luce infrarossa rileva le estremità

della fibra nella zona in cui essa viene trinciata degli organi di taglio del carro miscelatore e ne indica la sua forma “a pettine”.

Un’interessante innovazione è rappresentata dalla realizzazione di NIRS portatili con la possibilità di riportare tutte le calibrazioni possibili attualmente su tali strumenti, applicati ad attrezzature mobili aziendali e si evidenzia la possibilità di coniugare le capacità di analisi di uno strumento da laboratorio NIRS fisso, con la possibilità di eseguire analisi ripetitive in modo illimitato o a intervalli regolari prestabiliti, senza la necessità di prelevare un campione ma analizzando direttamente sulla massa, eliminando così in toto l’errore di campionamento. Tale connubio può diventare un’arma vincente oltre ad essere un eccellente indicatore gestionale per gli allevatori. Attualmente, gli strumenti NIRS portatili vengono utilizzati per:

1. analisi della composizione chimica delle materie prime sia in campo che in fase di carico del carro miscelatore;
2. analisi dei costituenti chimici e fisici della TMR;
3. analisi degli indici di valutazione TMR come l’indice di omogeneità (IO) e l’indice di selezione (IS);
4. analisi della composizione chimica di feci, liquame e letame;
5. analisi on-line della qualità del latte (totale e individuale) in sala di mungitura [8].

#### **1.3.4. Strumento portatile *Polispec<sup>NIR</sup>* e applicazione su carro miscelatore**

Le tecniche NIRS così presentate possono avere, in termini di miglioramento dell’efficienza sulle TMR, effetti davvero interessanti soprattutto visto che l'allevamento da latte è sempre più colpito dalla rivoluzione digitale. Per rispondere alle sfide attuali, come la sostenibilità ambientale, economica e sociale, è necessario adottare nuove tecnologie, entrando nella prospettiva dell'allevamento di precisione. Ciò è reso possibile dallo sviluppo di innumerevoli sensori da adottare nella stalla. Il NIRS è versatile e può essere utilizzato *on-line/in-line* per valutare e controllare i punti critici del processo produttivo.

Gli strumenti portatili per spettroscopia applicabili anche al carro miscelatore consentono di ottenere informazioni in tempo reale evitando i lunghi tempi di attesa per le risposte delle analisi di laboratorio, consentendo un tempestivo intervento di prevenzione e/o correzione, oltre ad effettuare innumerevoli analisi di autocontrollo.

La spettroscopia nel vicino infrarosso nell'azienda agricola potrebbe essere utilizzata per progettare, analizzare e controllare i processi produttivi e i prodotti aziendali sulla base di misurazioni continue nel tempo, della qualità critica e degli attributi prestazionali delle materie prime per garantire una qualità accettabile del prodotto finale. In questa prospettiva, il NIRS può essere definito come una tecnologia analitica di processo/prodotto innovativa, in grado di influenzare positivamente il 'processo di produzione' migliorando le prestazioni dell'azienda e quindi il benessere e il reddito dell'agricoltore.

Gli strumenti portatili per l'analisi delle caratteristiche TMR sono stati progettati per essere utilizzati direttamente in stalla per l'analisi dei mangimi e inseriti su carri miscelatori per ottenere informazioni in tempo reale sulla composizione dei mangimi di carico o utilizzati manualmente dal personale tecnico.

Ad esempio, è fondamentale conoscere il reale contenuto di SS poiché le variazioni di umidità dei foraggi (insilati in particolare), anche per brevi periodi, possono causare differenze nella composizione della razione. Tali variazioni possono influenzare la salute e la produzione delle vacche da latte, compreso l'aumento dell'incidenza delle dislocazioni dell'abomaso, l'acidosi subclinica e le fluttuazioni della produzione media giornaliera di latte e dell'ingestione media giornaliera. Si può concludere che cambiamenti improvvisi nel SS del foraggio hanno ridotto l'assunzione giornaliera di una razione e che una variazione maggiore del 3% in unità di sostanza secca del foraggio è sufficiente per influenzare la produzione di latte nelle vacche da latte.

Inoltre, la variabilità del contenuto di SS di TMR tende a modificare l'appetibilità e influisce sulla selezione degli ingredienti con conseguente consumo di una dieta squilibrata. Tuttavia, si è ipotizzato che una leggera variazione giornaliera nella composizione del TMR sia inevitabile.

La razione viene formulata da un nutrizionista sulla base della SS degli alimenti e poi viene preparata e distribuita in base al suo peso tal quale. Ciò significa che, a parità di peso, l'assunzione di nutrienti varierà in base al contenuto di umidità degli alimenti singoli, portando al rischio di sovralimentazione o sottoalimentazione degli animali, in particolare quando le diete sono in gran parte basate su insilati. Mertens e Berzaghi nel 2009 [13] hanno valutato gli effetti delle fluttuazioni giornaliere della SS dell'insilato e hanno osservato che la riduzione di SS tra l'8% e il 16% era responsabile della riduzione di 2 kg di SS ingerita, in media, con conseguente perdita di produzione di latte.

Il NIRS applicato direttamente al carro miscelatore ha l'obiettivo di prevedere il reale contenuto di SS dell'insilato durante la fase di carico. Negli allevamenti in cui è attivo il NIRS, viene suggerita una correzione in tempo reale della quantità di insilato da caricare in base al contenuto di SS reale misurato.

In questa condizione operativa, la dieta effettiva era più vicina alla dieta target rispetto alle aziende agricole in cui NIRS applicato al carro miscelatore non era attivo [1].

Queste rilevazioni mettono in evidenza l'utilità della tecnologia NIRS in azienda agricola con particolare attenzione alla strumentazione portatile utilizzabile direttamente in azienda.

#### *1.3.5. Indice omogeneità (IO) e indice selezione (IS) e applicazione sul carro miscelatore*

Diventa economicamente interessante per la gestione dell'azienda agricola, la possibilità di verificare le caratteristiche nutrizionali del TMR lungo la corsia di alimentazione. Affinché la miscela sia definita omogenea, deve contenere i singoli ingredienti (per composizione chimica e struttura fisica) uniformemente distribuiti in modo costante lungo tutta la mangiatoia. Sfortunatamente, questo non è sempre il caso e le ragioni della non omogeneità in TMR possono essere attribuite a vari fattori, tra cui il tipo di carro miscelatore, integrità degli organi di taglio, l'ordine di carico degli ingredienti, tempo di miscelazione, attenzione dell'operatore, ed eventuali variabilità delle materie prime. L'omogeneità di TMR e la relativa composizione granulometrica sono di fondamentale importanza, poiché la composizione della razione, dal punto di vista fisico, ha effetto sulla stimolazione dell'attività ruminale e sull'ottimizzazione delle fermentazioni. L'indice di omogeneità (IO) si calcola confrontando la composizione chimico-fisica della razione distribuita campionata in almeno 16 punti consecutivi allo scarico del carro. Le razioni non omogenee consentono un'ingestione separata di sostanze nutritive permettendo la scelta di un nutriente rispetto ad un altro agli animali. Per questo diventa essenziale l'indice di selezione (IS) che permette di rilevare il confronto tra la razione somministrata e quella ingerita dei bovini dopo almeno due ore dal pasto, al fine di ottenere i contenuti nutrizionali in fronte vacca (nella zona di alimentazione) e in fronte mangiatoia. I due indici combinati sono ottimi indicatori di efficienza gestionale e alimentare oltre al fatto che un costante controllo su tali indici portano ad un miglioramento in termini di produttività e profitto aziendale [14].

## 2. Obiettivo

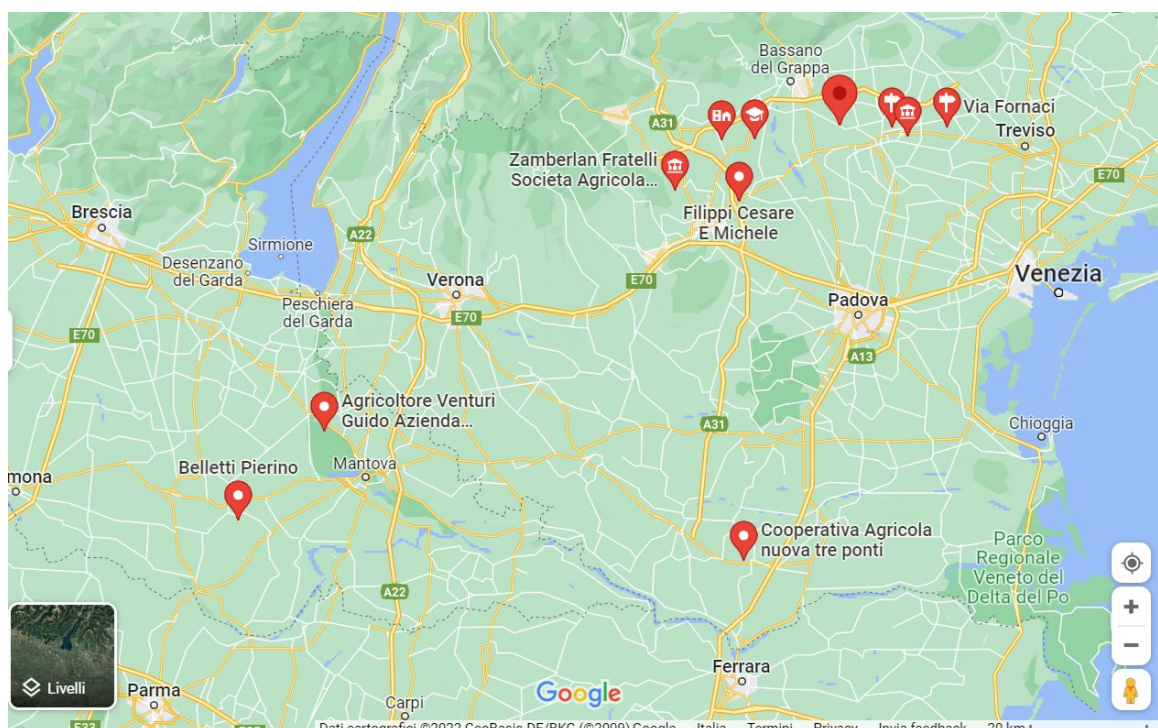
Il primo obiettivo del presente studio è stato la valutazione della capacità predittiva di uno strumento NIRS portatile rispetto ad uno fisso di laboratorio, rispetto a razioni preparate per bovini allevati per la produzione di carne e di latte. Il secondo obiettivo è stato l'analisi della variabilità entro razione osservabile lungo la corsia di alimentazione e rilevabile dagli strumenti NIRS. Infine, l'ultimo obiettivo è stato lo studio dell'errore complessivo dovuto al metodo e alla variabilità della razione. Il tutto in un'ottica di applicabilità dello strumento portatile NIRS direttamente su TMR per l'ottimizzazione dei processi produttivi.

## 3. Materiale e metodi

### 3.1. Provenienza dei campioni

La ricerca è stata condotta nel periodo compreso tra dicembre 2021 e aprile 2022, campionando la razione alimentare per bovini, presso 10 aziende (5 specializzate nella produzione di latte e 5 nella produzione di carne) aventi sede nella pianura Padano-Veneta, come riportato nella cartina rappresentata in figura 3-1.

*Figura 3-1: Cartina Google Maps posizione delle 10 aziende oggetto di prova.*



Le aziende per la produzione da latte erano caratterizzate da una presenza media di 250 vacche in lattazione (min 110 – max 450) e una razione basata sull'impiego di insilato di mais, fieni e concentrati.

Le aziende da carne erano caratterizzate da una presenza media di 900 bovini da carne di (min 500 – max 1500) e una razione basata sull'impiego di insilato di mais, fieni e concentrati.

Le aziende preparavano la razione con l'impiego del carro miscelatore e lo distribuivano all'inizio della mattina.

### *3.2. Raccolta dei campioni*

I campioni sono stati raccolti in modo accurato e secondo le migliori pratiche, procedendo subito dopo lo scarico della razione nella mangiatoia al prelievo di 16 campioni lungo la corsia di alimentazione intervallati a uguale distanza e seguendo la direzione di scarico del carro miscelatore. I sedici punti sono stati contrassegnati da un codice associato all'azienda e da un valore un progressivo compreso tra /00 e /15, il cui valore centrale era /07.

I campioni sono stati analizzati direttamente lungo la corsia di alimentazione utilizzando sempre dello stesso strumento portatile NIRS ed eseguendo tre letture sullo stesso campione che poi sono state identificate come a, b, c.

Subito dopo la lettura i campioni sono stati raccolti in sacchi e al fine di migliorare la conservazione del prodotto, prontamente posti sottovuoto e refrigerati con l'utilizzo di frigoriferi portatili, fino alla consegna presso il laboratorio di analisi Lab. CNX del Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute dell'Università degli Studi di Padova. In tale sede si sono eseguite le analisi con lo strumento fisso oggetto di prova.

### *3.3. Analisi NIRS e metodi di riferimento*

Le analisi NIRS sono state eseguite con l'utilizzo di due strumenti:

- PolISPEC<sup>NIR</sup> (ITPhotonics Srl, Fara Vicentina, IT) operante nel *range* spettrale compreso tra 900 – 1600 nm, di seguito contrassegnato come P.
- FOSS DS 2500 (FOSS Hilleroed, DK) operante nel *range* spettrale compreso tra 400 – 2500 nm, di seguito contrassegnato come F25.

I due strumenti erano precilibrati per i seguenti parametri di composizione chimica:

Sostanza secca (SS, %), ceneri (% della SS), proteina grezza (PG, % della SS), estratto etereo (EE, % della SS), aNDF (PG, % della SS), ADF (PG, % della SS), lignina (PG, % della SS) e amido (PG, % della SS). I metodi di riferimento usati per calibrare gli strumenti erano: #934.01 [15] per la SS, 2001.11 [16] per la PG, #942.05 [15] per le ceneri; #996.11 [17] per l'amido, 2003.05 [18] per l'EE; ANKOM Technology per l'aNDF, con uso di amilasi e sodio solfito [19–21]; ANKOM



Technology per non sequenziale ADF [22,23], e ANKOM Technology per la lignina insolubile in acido solforico [24].

Inoltre, gli strumenti P e F25 erano precalibrati per alcune caratteristiche fisiche della razione in particolare per la frazione (peso su peso del campione umido, %) di razione trattenuta da un setacciatore tipo *Penn State Particle Separator* (PSPS) [25,26] modificato (PSPS-M) costituito da vagli dotati di fori tondi, il cui diametro aveva valore di 38.1, 19.1, 7.9, 3.8, e 1.8 mm, e dal fondo [27]. Inoltre, gli strumenti P e F25 sono stati calibrati per la lunghezza media geometrica (LMG) della razione, calcolata sulla base della conoscenza delle frazioni trattenute dal PSPS-M e risolvendo l'Equazione 1, [28]:

$$LMG = e^{\{[\%S_1 \times \ln(48)] + [\%S_2 \times \ln(38,04)] + [\%S_3 \times \ln(17,32)] + [\%S_4 \times \ln(7,73)] + [\%S_5 \times \ln(3,69)] + [\%fondo \times \ln(0,90)]\}}$$

#### Equazione 1

I valori da % S1 a % S5 e % fondo, riportati in equazione 1 sono il rapporto (%) del campione originale trattenuto su ciascun setaccio (espresso come p/p del campione umido). Le percentuali cumulative sono state corrette per ottenere una somma pari al 100%.

I campioni /07 sono stati setacciati in doppio usando il setacciatore PSPS-M per determinare la distribuzione tra vagli e il valore di LMG delle razioni. La procedura prevedeva di setacciare circa 1.2 lt di prodotto facendo oscillare 5 volte, in piano, avanti e all'indietro il PSPS-M e ripetendo le 5 oscillazioni per ciascun lato, per un totale di 20.

Le 16 scansioni dei campioni sono state compiute con lo strumento P direttamente in mangiatoia, strisciando la finestra di lettura dello strumento su una porzione di alimento per un periodo di 5 secondi e registrando il valore finale per la composizione chimica ottenuto da una doppia strisciata. E' stato poi rilevato l'indice di omogeneità (IO) della razione secondo quanto definito da Serva et al. 2021, IO (che va da 0 a 100%, 100% = perfetta omogeneità) è stato calcolato come somma ponderata della deviazione standard rispetto ai rapporti medi della composizione TMR registrati lungo la corsia di alimentazione nei 16 punti dopo la rimozione dei valori anomali e confrontato con i rapporti massimi accettabili. I valori anomali sono stati considerati valori superiori a  $\pm 2$  punti di deviazione standard[14].

Le scansioni dei campioni operate con lo strumento F25 sono state eseguite presso il Lab. CNX, riempiendo due celle rettangolari adatte al modulo *sample transport* garante di una elevata rappresentatività; la media delle due analisi è stata registrata per le successive analisi.



La procedura descritta per P e F25 è stata ripetuta tre volte al fine di poter valutare la ripetibilità dell'analisi, tanto in condizioni di campo, quanto di laboratorio.

### 3.4. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita con l'impiego del software SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 2012). La normalità dei dati è stata valutata con il test Shapiro-Wilk. I dati normalmente distribuiti sono riportati come media, deviazione standard, minimo o massimo. In accordo con il disegno sperimentale, è stato calcolato un modello lineare (PROC GLM) per la composizione chimico-fisica della razione per testare tramite ANOVA l'effetto della azienda (A1-A10), dello strumento (P e F25), del punto di lettura (da /00 a /15) e delle loro iterazioni, usati come effetti fissi. Inoltre, sono stati eseguiti confronti a coppie *post-hoc* tra i livelli dei fattori, utilizzando la correzione di Bonferroni. Le assunzioni di linearità del modello sui residui sono state valutate graficamente.

La ripetibilità delle analisi è stata espressa come *Root Mean Square error* (RMS) delle ripetizioni entro strumento, secondo la formula espressa in Equazione 2:

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - x_{i-1})^2}{n}}$$

Equazione 2

La variabilità delle analisi tra strumenti (*assay*) è stata valuta con il calcolo del coefficiente di variabilità (CV) delle analisi *intra-* e *inter-assay* (Equazione 3, Equazione 4), dove:

$$intra - assay CV = \frac{\sum_1^n \frac{\sum_{i=1}^{i=m} x_{i,n}}{m}}{n}$$

Equazione 3

$$inter - assay CV = \frac{\overline{sd}}{\bar{x}}$$

Equazione 4

Dove:  $\overline{sd}$  = deviazione standard media delle medie delle ripetizioni *intra-assay*;  $\bar{x}$  = media delle medie delle ripetizioni *intra-assay*;  $m$  = numero di ripetizioni *intra-assay*;  $n$  = numero degli *assay*;  $x_{i,n}$  = valore di analisi della  $i$ -esima ripetizione dell' $n$ -esimo *assay*. Le ripetizioni si riferiscono orizzontalmente alle tre repliche (a, b, c) e verticalmente ai 16 punti di lettura (/00 - /15) [29].

Le calibrazioni NIRS sono state valutate calcolando il coefficiente di determinazione ( $R^2$ ), l'errore standard (SE), in calibrazione ( $R_c^2$ ,  $SE_c$ ), in validazione incrociata ( $R_{cv}^2$ ,  $SE_{cv}$ ) e in validazione ( $R_v^2$ ,  $SE_v$ ). La validazione incrociata è stata eseguita con una *venetian blinding* a quattro gruppi.

## 4. Risultati

### 4.1. Raccolta dei campioni

Le caratteristiche delle razioni, divise per produzione di latte e produzione di carne, sono riportate in tabella 4-1 per i parametri chimici e tabella 4-2 per i parametri fisici. I valori rilevati rientrano ampiamente negli intervalli di oscillazione normalmente riscontrati negli allevamenti da latte e da carne presenti nelle zone delle aziende oggetto di studio[27].

Tabella 4-1: caratteristiche chimiche delle razioni usate nelle prove. Le analisi si riferiscono esclusivamente al campione /07 e sono state realizzate mediante tecniche di chimica umida.

|              |            | SS (%) | CEN    | PG     | EE     | ANDF   | ADF    | LIGN.  | AIA    | AMIDO  |
|--------------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|              |            | (% SS) | (% SS) | (% SS) | (% SS) | (% SS) | (% SS) | (% SS) | (% SS) | (% SS) |
| <b>CARNE</b> | <u>Min</u> | 54,4   | 5,30   | 11,5   | 2,40   | 24,3   | 14,9   | 3,44   | 0,94   | 33,6   |
|              | Max        | 72,7   | 6,86   | 14,0   | 4,24   | 31,4   | 18,2   | 3,87   | 1,45   | 42,0   |
|              | Media      | 60,4   | 6,06   | 13,2   | 3,47   | 28,2   | 16,4   | 3,66   | 1,19   | 36,9   |
| <b>LATTE</b> | <u>Min</u> | 46,5   | 6,01   | 13,5   | 3,08   | 31,6   | 21,1   | 3,68   | 1,19   | 22,1   |
|              | Max        | 53,5   | 7,67   | 15,0   | 4,41   | 36,1   | 21,4   | 4,44   | 1,50   | 31,0   |
|              | Media      | 50,3   | 7,01   | 14,3   | 3,69   | 33,9   | 21,3   | 4,06   | 1,35   | 26,0   |

SS = sostanza secca, PG = proteina grezza; EE = grassi grezzi; Lign. = lignina.

Tabella 4-2: caratteristiche fisiche (frazione del setaccio), lunghezza media geometrica (LMG) e indice di omogeneità (IO) delle razioni usate nelle prove. Le analisi si riferiscono esclusivamente al campione /07 e sono state realizzate mediante l'uso di un setacciatore tipo Penn State Particel Separator, modificato (PSPS-M). L'indice di omogeneità è stato ottenuto da analisi Polispac<sup>NIR</sup>.

|              |       | S1* (%) | S2* (%) | S3* (%) | S4* (%) | S5* (%) | FONDO*<br>(% SS) | LMG**<br>(MM) | IO***<br>(%) |
|--------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|------------------|---------------|--------------|
| <b>CARNE</b> | Min   | 0%      | 1%      | 11%     | 37%     | 18%     | 19%              | 4.32          | 54%          |
|              | Max   | 0%      | 5%      | 16%     | 43%     | 29%     | 26%              | 5.30          | 87%          |
|              | Media | 0%      | 3%      | 13%     | 39%     | 21%     | 23%              | 4.73          | 65%          |
| <b>LATTE</b> | Min   | 0%      | 2%      | 18%     | 27%     | 17%     | 12%              | 5.02          | 38%          |
|              | Max   | 1%      | 17%     | 27%     | 40%     | 30%     | 19%              | 7.71          | 88%          |
|              | Media | 0%      | 7%      | 23%     | 33%     | 21%     | 16%              | 6.46          | 65%          |

\* frazioni (peso su peso del campione umido, %) di razione trattenute da un setacciatore tipo Penn State Particle Separator modificato (PSPS-M) costituito da vagli dotati di fori tondi, il cui diametro aveva valore di 38.1 (S1), 19.1 (S2), 7.9 (S3), 3.8 (S4), e 1.8 (S5) mm, e dal fondo; \*\* lunghezza media geometrica (LMG) della razione; \*\*\* Indice di omogeneità (IO) calcolato con l'impiego del Polispac<sup>NIR</sup>.

#### 4.2. Analisi NIRS e metodi di riferimento

Le prestazioni di calibrazione degli strumenti P e F25 sono riportate in tabella 4-3 e tabella 4-4, rispettivamente. Per entrambi gli strumenti l'efficacia ottimale nel prevedere i nutrienti essenziali come S.S., proteina grezza, aNDF, ADF, Lignina, Amido ecc. viene dimostrata con  $R_{cv}^2 > 0,80$ ; valori tra 0,80 e 0,60 sono considerati buoni e valori  $< 0,60$  sono considerati di scarsa efficacia predittiva di calibrazione. Tale considerazione si ritiene valida anche per i parametri fisici rilevati dei due strumenti P e F25 [14].

Tabella 4-3: performances di calibrazione del Polispac<sup>NIR</sup> per i parametri chimici e fisici considerati nella prova. Ncal=numero di campioni in calibrazione.

| Parametro                           | Ncal | PCA <sup>1</sup> | $R_c^2$ | SE <sub>c</sub> | $R_{cv}^2$ | SE <sub>cv</sub> |
|-------------------------------------|------|------------------|---------|-----------------|------------|------------------|
| <b>Sostanza secca (SS, %)</b>       | 1392 | 5                | 0,97    | 1,86            | 0,97       | 1,93             |
| <b>Ceneri (% della SS)</b>          | 1339 | 6                | 0,84    | 0,48            | 0,82       | 0,50             |
| <b>Proteina grezza (% della ss)</b> | 1394 | 9                | 0,83    | 0,73            | 0,79       | 0,81             |
| <b>Grassi grezzi (% della ss)</b>   | 1391 | 11               | 0,64    | 0,32            | 0,54       | 0,37             |
| <b>aNDF (% della ss)</b>            | 1275 | 5                | 0,88    | 1,76            | 0,86       | 1,88             |
| <b>ADF (% della ss)</b>             | 1314 | 7                | 0,87    | 1,30            | 0,85       | 1,41             |
| <b>Lignina (% della ss)</b>         | 1128 | 6                | 0,89    | 0,31            | 0,86       | 0,35             |
| <b>Aia (% della ss)</b>             | 374  | 3                | 0,30    | 0,14            | 0,10       | 0,16             |
| <b>Amido (% della ss)</b>           | 1384 | 12               | 0,84    | 1,38            | 0,78       | 1,57             |
| <b>S1* (% p/p tal quale)</b>        | 309  | 15               | 0,73    | 6,82            | 0,64       | 7,69             |
| <b>S2* (% p/p tal quale)</b>        | 310  | 15               | 0,43    | 3,84            | 0,27       | 4,30             |
| <b>S3* (% p/p tal quale)</b>        | 317  | 8                | 0,37    | 5,16            | 0,32       | 5,29             |
| <b>S4* (% p/p tal quale)</b>        | 316  | 11               | 0,62    | 5,92            | 0,56       | 6,25             |
| <b>S5* (% p/p tal quale)</b>        | 312  | 10               | 0,63    | 2,94            | 0,56       | 3,15             |
| <b>Fondo* (% p/p tal quale)</b>     | 311  | 12               | 0,74    | 3,82            | 0,69       | 4,10             |
| <b>LMG** (mm)</b>                   | 309  | 13               | 0,76    | 2,26            | 0,71       | 2,46             |

<sup>1</sup> numero di componenti principali (PCA) usate per calibrare lo strumento; \* frazioni (peso su peso del campione umido, %) di razione trattenute da un setacciatore tipo Penn State Particle Separator modificato (PSPS-M) costituito da vagli dotati di fori tondi, il cui diametro aveva valore di 38.1 (S1), 19.1 (S2), 7.9 (S3), 3.8 (S4), e 1.8 (S5) mm, e dal fondo; \*\* lunghezza media geometrica (LMG) della razione.

Tabella 4-4: tabella delle performances di calibrazione del FOSS DS 2500 per i parametri chimici e fisici considerati nella prova.

| Parametro                           | Ncal | PCA <sup>1</sup> | R <sub>c</sub> <sup>2</sup> | SE <sub>c</sub> | R <sub>cv</sub> <sup>2</sup> | SE <sub>cv</sub> |
|-------------------------------------|------|------------------|-----------------------------|-----------------|------------------------------|------------------|
| <b>Sostanza secca (SS, %)</b>       | 345  | 9                | 0,98                        | 1,06            | 0,97                         | 1,26             |
| <b>Ceneri (% della SS)</b>          | 341  | 10               | 0,88                        | 0,32            | 0,82                         | 0,38             |
| <b>Proteina grezza (% della ss)</b> | 341  | 10               | 0,87                        | 0,47            | 0,81                         | 0,56             |
| <b>Grassi grezzi (% della ss)</b>   | 344  | 9                | 0,71                        | 0,27            | 0,62                         | 0,31             |
| <b>aNDF (% della ss)</b>            | 343  | 9                | 0,91                        | 1,17            | 0,89                         | 1,35             |
| <b>ADF (% della ss)</b>             | 293  | 8                | 0,90                        | 0,75            | 0,87                         | 0,84             |
| <b>Lignina (% della ss)</b>         | 293  | 5                | 0,60                        | 0,33            | 0,54                         | 0,36             |
| <b>Aia (% della ss)</b>             | 297  | 3                | 0,50                        | 0,13            | 0,45                         | 0,14             |
| <b>Amido (% della ss)</b>           | 342  | 6                | 0,75                        | 1,34            | 0,71                         | 1,44             |
| <b>S1* (% p/p tal quale)</b>        | 117  | 2                | 0,50                        | 3,19            | 0,39                         | 3,53             |
| <b>S2* (% p/p tal quale)</b>        | 199  | 5                | 0,70                        | 2,78            | 0,47                         | 3,70             |
| <b>S3* (% p/p tal quale)</b>        | 224  | 3                | 0,58                        | 5,38            | 0,30                         | 6,93             |
| <b>S4* (% p/p tal quale)</b>        | 202  | 2                | 0,38                        | 6,66            | 0,36                         | 6,76             |
| <b>S5* (% p/p tal quale)</b>        | 200  | 7                | 0,63                        | 2,29            | 0,44                         | 2,81             |
| <b>Fondo* (% p/p tal quale)</b>     | 199  | 9                | 0,81                        | 2,61            | 0,69                         | 3,30             |

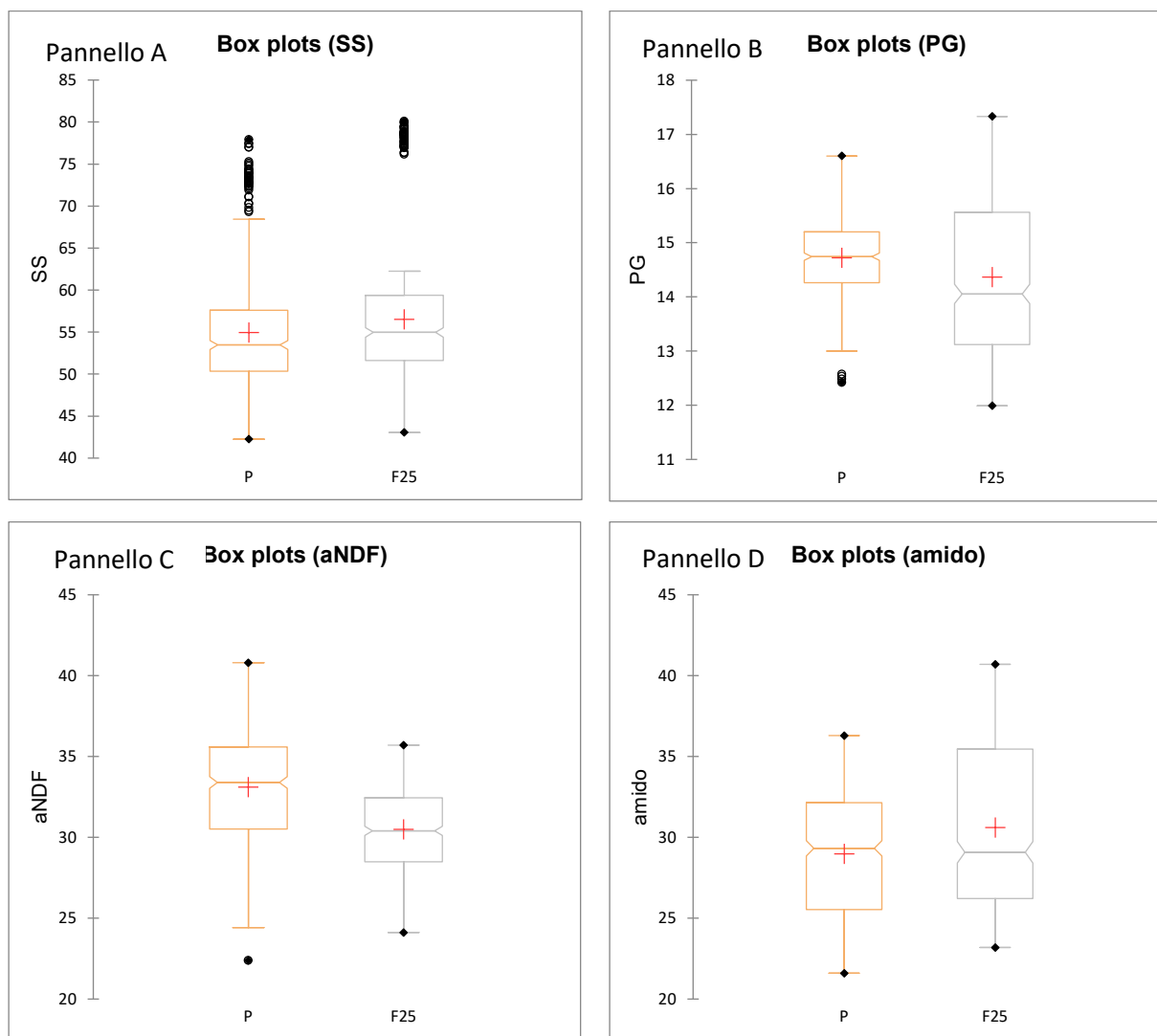
<sup>1</sup> numero di componenti principali (PCA) usate per calibrare lo strumento; \* frazioni (peso su peso del campione umido, %) di razione trattenute da un setacciatore tipo Penn State Particle Separator modificato (PSPS-M) costituito da vagli dotati di fori tondi, il cui diametro aveva valore di 38.1 (S1), 19.1 (S2), 7.9 (S3), 3.8 (S4), e 1.8 (S5) mm, e dal fondo; \*\* lunghezza media geometrica (LMG) della razione.

I box plot per i parametri S.S., PG, aNDF e amido, relativi ai due strumenti P e F25 sono riportati in figura 4-1. La scatola (box) o *range* interquartile (IQR) è compresa tra il primo e terzo quartile e mostra l'ampiezza della metà centrale della distribuzione, dentro la scatola è cioè compreso il 50% centrale di tutti i valori rilevati. La linea all'interno della scatola invece rappresenta la mediana. I due segmenti che partono dalla scatola e si prolungano verso l'alto e verso il basso sono detti "baffi". I baffi indicano la dispersione dei valori inferiori al primo quartile e superiori al terzo quartile non classificati come *outliers*. Il valore più alto tra quelli presenti nella variabile che non identifica un valore anomalo definisce la fine del baffo superiore. Allo stesso modo, il valore più basso, che non identifica un valore anomalo, definisce la fine del baffo inferiore. I valori non identificati come *outlier* rientrano nel 95% di tutti i valori analizzati. Nel caso in cui ci fossero dei valori anomali, questi ultimi sarebbero rappresentati nel box plot come dei punti isolati posizionati al di sopra e/o al di sotto dei baffi della distribuzione.

In altre parole, la scatola permette di capire cosa succede al 50% dei valori osservati, i baffi aiutano a studiare le code della distribuzione, i punti isolati indicano i possibili *outliers* [30].

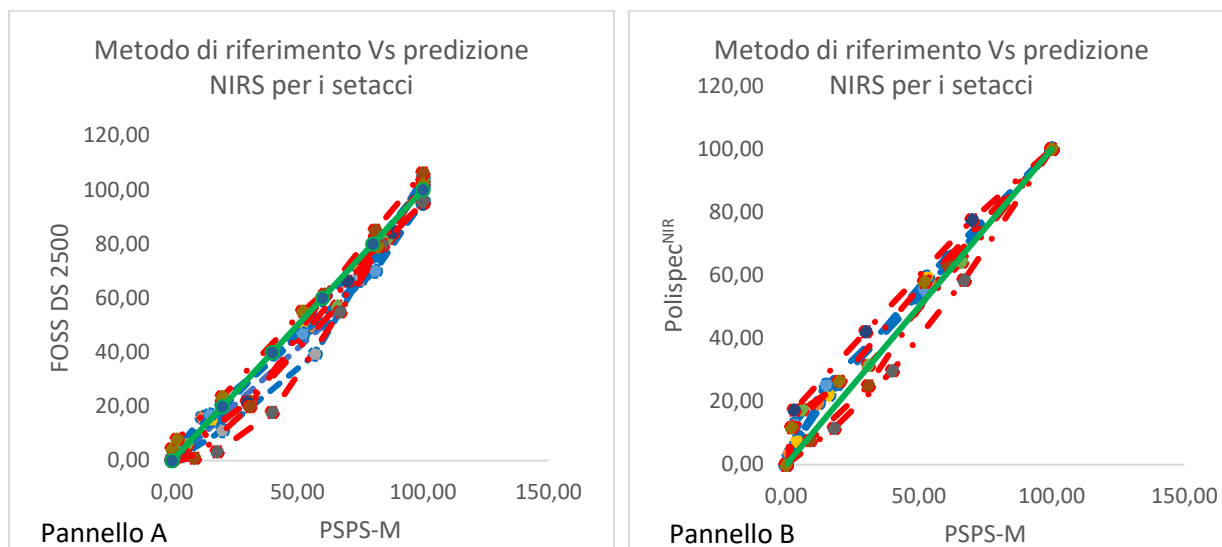
Dal confronto tra due box plot per P e F25, si analizza la precisione e l'accuratezza dello strumento per il parametro analizzato. La figura 4-2 mostra i valori cumulativi (%) trattenuti dai setacci, confrontando la predizione NIRS (F25 nel pannello A e P nel pannello B) con il metodo di riferimento (PSPS-M). In particolare, per P gli  $R_v^2$  sono 0,01, 0,39 e 0,55 per S1+S2 (Cum.1), S1+S2+S3 (Cum.2) e S1+S2+S3+S4 (Cum.3), mentre per F25 gli  $R_v^2$  sono 0,04, 0,19, 0,40 e 0,65 per Cum.1, Cum.2, Cum.3 e S1+S2+S3+S4+fondo (Cum.4).

Figura 4-1: box plot per sostanza secca (SS, %), proteina grezza PG (% della SS), aNDF (% della SS) e amido (% della SS) in ordine dal pannello a al pannello d, relativi ai due strumenti Polispes<sup>NIR</sup> (P) e Foss DS 2500 (F25). La scatola rappresenta il I (Q1) e III (Q3) quartile, con la mediana nella linea centrale. Il segno + rappresenta la media e i baffi l'intervallo definito come  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$  per il minimo e  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$  per il massimo. I punti eccedenti i baffi rappresentano gli outliers.



SS = Sostanza secca; PG = proteina grezza; P = Polispes<sup>NIR</sup>; F25 = FOSS DS2500.

Figura 4-2: plot dei valori cumulativi per le frazioni di TMR trattenute dai setacci (setacciatore tipo Penn State Particle Separator modificato (PSPS-M) costituito da vagli dotati di fori tondi, il cui diametro aveva valore di 38.1 (S1), 19.1 (S2), 7.9 (S3), 3.8 (S4), e 1.8 (S5) mm, e dal fondo) per le aziende con produzione da carne (tratteggio in blu) e da latte (tratteggio in rosso). Per lo strumento Polisp<sup>NIR</sup> il valore del setaccio S2 e il fondo sono cumulativi con lo strato immediatamente sovrastante.



#### 4.3. Ripetibilità e variabilità

La tabella 4-5 riporta i valori di RMS (deviazione standard degli errori di previsione) e le medie delle predizioni per gli strumenti F25 e P per tutti i parametri chimo-fisici dei campioni analizzati. I valori di coefficiente di variabilità (CV) *intra*- e *inter-assay* che, considerando lo strumento F25 e P come *assay* nelle tre ripetizioni (a, b, c) delle letture dello stesso punto da /00 a /15, per le dieci aziende prese in esame, sono riportati divisi per razioni da carne e da latte nelle tabella 6-6 e tabella 6-7. I valori di *intra*- e *inter-assay* che considerando lo strumento F25 e P come *assay* nelle 16 letture (da /00 a /15) dopo aver mediato le tre ripetizioni (a, b, c), per le dieci aziende prese in esame, sono riportati divisi per razioni da carne e da latte nella tabella 4-8 e tabella 4-9.

Tabella 4-5: valori medi di Root Mean Square (RMS, %) per le dieci aziende considerate e media dei valori relativi ai parametri chimico-fisici ottenuti dalla rilettura delle tre ripetizioni (a, b, c) per gli strumenti *Polispec<sup>NIR</sup>* e FOSS DS2500.

|                                     | <u>Root Mean Square (%)</u>   |             | <b>Media (%)</b>              |             |
|-------------------------------------|-------------------------------|-------------|-------------------------------|-------------|
|                                     | <u>Polispec<sup>NIR</sup></u> | FOSS DS2500 | <u>Polispec<sup>NIR</sup></u> | FOSS DS2500 |
| <u>Sostanza secca (SS, %)</u>       | 2,27                          | 1,11        | 54,9                          | 56,4        |
| <u>Ceneri (% della SS)</u>          | 0,33                          | 0,54        | 6,99                          | 6,33        |
| <u>Proteina grezza (% della SS)</u> | 0,68                          | 0,39        | 14,7                          | 14,4        |
| <u>Grassi grezzi (% della SS)</u>   | 0,27                          | 0,36        | 3,61                          | 3,53        |
| <u>aNDF (% della SS)</u>            | 1,78                          | 1,24        | 33,1                          | 30,6        |
| <u>ADF (% della SS)</u>             | 1,14                          | 0,59        | 18,3                          | 17,4        |
| <u>Lignina (% della SS)</u>         | 0,32                          | 0,09        | 2,79                          | 2,66        |
| <u>Aia (% della SS)</u>             | 0,15                          | 0,06        | 0,58                          | 0,52        |
| <u>Amido (% della SS)</u>           | 1,50                          | 0,95        | 29,0                          | 30,6        |



Tabella 4-6: Valori di coefficiente di variabilità (CV) Intra-assay, con assay definito nei due strumenti FOSS DS2500 e Polispec<sup>NIR</sup> nelle tre ripetizioni entro strumento (a, b, c), divisi per azienda da latte e da carne.

|                               |       |       | SS (%) | CEN (% SS) | PG (% SS) | EE (% SS) | ANDF (% SS) | ADF (% SS) | LIGN, (% SS) | AIA (% SS) | AMIDO (% SS) |
|-------------------------------|-------|-------|--------|------------|-----------|-----------|-------------|------------|--------------|------------|--------------|
| <b>FOSS DS2500</b>            | carne | min   | 0,02%  | 0,58%      | 0,47%     | 0,25%     | 0,38%       | 0,44%      | 0,17%        | 0,45%      | 0,11%        |
|                               |       | max   | 0,48%  | 3,37%      | 0,91%     | 1,41%     | 1,38%       | 1,67%      | 2,89%        | 5,31%      | 1,26%        |
|                               |       | Media | 0,24%  | 1,47%      | 0,66%     | 0,90%     | 0,99%       | 1,03%      | 1,13%        | 3,06%      | 0,64%        |
|                               | Latte | Min   | 0,13%  | 0,39%      | 0,14%     | 0,43%     | 0,21%       | 0,21%      | 0,24%        | 1,03%      | 0,22%        |
|                               |       | Max   | 1,11%  | 1,57%      | 0,86%     | 1,30%     | 1,55%       | 0,86%      | 1,48%        | 6,61%      | 1,29%        |
|                               |       | Media | 0,39%  | 1,00%      | 0,44%     | 1,12%     | 0,51%       | 0,44%      | 0,58%        | 2,65%      | 0,62%        |
| <b>POLISPEC<sup>NIR</sup></b> | carne | Min   | 0,24%  | 0,19%      | 0,27%     | 0,70%     | 0,37%       | 0,86%      | 0,42%        | 1,92%      | 0,38%        |
|                               |       | Max   | 1,21%  | 1,02%      | 1,16%     | 1,44%     | 1,57%       | 2,33%      | 3,46%        | 7,57%      | 1,29%        |
|                               |       | Media | 0,74%  | 0,56%      | 0,78%     | 1,11%     | 1,16%       | 1,48%      | 1,86%        | 5,19%      | 0,87%        |
|                               | Latte | Min   | 0,52%  | 0,04%      | 0,24%     | 0,78%     | 0,21%       | 0,84%      | 0,36%        | 2,62%      | 0,58%        |
|                               |       | Max   | 1,31%  | 1,30%      | 0,92%     | 4,43%     | 2,38%       | 2,92%      | 4,45%        | 8,31%      | 1,58%        |
|                               |       | media | 0,96%  | 0,69%      | 0,61%     | 2,06%     | 1,64%       | 1,63%      | 2,38%        | 4,43%      | 1,07%        |

Tabella 4-7: Valori di coefficiente di variabilità (CV) Inter-assay, con assay definito nei due strumenti FOSS DS2500 e Polispac<sup>NIR</sup> nelle tre ripetizioni entro strumento (a, b, c), divisi per azienda da latte e da carne.

|              |       | SS (%) | CEN (% SS) | PG (% SS) | EE (% SS) | ANDF (% SS) | ADF (% SS) | LIGN, (% SS) | AIA (% SS) | AMIDO (% SS) |
|--------------|-------|--------|------------|-----------|-----------|-------------|------------|--------------|------------|--------------|
| <b>CARNE</b> | Min   | 0,67%  | 6,16%      | 2,70%     | 2,41%     | 4,54%       | 0,64%      | 4,73%        | 2,85%      | 3,53%        |
|              | Max   | 6,24%  | 28,9%      | 13,1%     | 20,4%     | 10,7%       | 14,5%      | 20,0%        | 37,4%      | 11,4%        |
|              | Media | 3,55%  | 17,8%      | 8,20%     | 7,96%     | 8,28%       | 5,92%      | 12,6%        | 19,6%      | 6,88%        |
| <b>LATTE</b> | Min   | 1,72%  | 0,11%      | 1,04%     | 1,80%     | 2,51%       | 0,00%      | 0,95%        | 6,96%      | 0,32%        |
|              | Max   | 2,49%  | 5,93%      | 9,88%     | 13,4%     | 8,34%       | 4,20%      | 10,0%        | 22,5%      | 5,56%        |
|              | Media | 2,22%  | 2,55%      | 4,26%     | 8,15%     | 6,11%       | 3,01%      | 5,48%        | 12,5%      | 3,09%        |

SS =sostanza secca, PG = proteina grezza; EE = grassi grezzi; Lign. = lignina.

Tabella 4-8: Valori di coefficiente di variabilità (CV) Inter-assay, con assay definito nei due strumenti FOSS DS2500 e Polisp<sup>NIR</sup> nelle 16 letture entro strumento e lungo la mangiatoia (da /00 a /15), divisi per azienda da latte e da carne.

|                               |       |       | SS (%) | CEN (% SS) | PG (% SS) | EE (% SS) | ANDF (% SS) | ADF (% SS) | LIGN, (% SS) | AIA (% SS) | AMIDO (% SS) |
|-------------------------------|-------|-------|--------|------------|-----------|-----------|-------------|------------|--------------|------------|--------------|
| <b>FOSS DS2500</b>            | Carne | Min   | 1,24%  | 3,59%      | 2,42%     | 2,99%     | 4,30%       | 3,22%      | 3,23%        | 6,94%      | 2,46%        |
|                               |       | Max   | 2,80%  | 5,81%      | 3,51%     | 5,10%     | 5,57%       | 5,01%      | 5,28%        | 20,1%      | 3,83%        |
|                               |       | Media | 1,82%  | 4,57%      | 2,64%     | 4,19%     | 4,84%       | 3,90%      | 4,48%        | 12,9%      | 3,25%        |
|                               | Latte | Min   | 1,12%  | 3,33%      | 1,64%     | 4,98%     | 1,99%       | 2,78%      | 2,50%        | 7,94%      | 2,29%        |
|                               |       | Max   | 3,13%  | 5,81%      | 3,75%     | 9,07%     | 3,39%       | 3,11%      | 3,86%        | 14,8%      | 3,41%        |
|                               |       | Media | 1,91%  | 4,31%      | 2,70%     | 6,69%     | 2,87%       | 2,92%      | 3,21%        | 11,4%      | 2,84%        |
| <b>POLISPEC<sup>NIR</sup></b> | Carne | Min   | 2,73%  | 2,65%      | 2,67%     | 5,04%     | 3,81%       | 4,54%      | 6,71%        | 16,7%      | 3,37%        |
|                               |       | Max   | 4,42%  | 4,15%      | 3,96%     | 7,45%     | 5,69%       | 6,96%      | 20,7%        | 25,9%      | 4,51%        |
|                               |       | Media | 3,39%  | 3,52%      | 3,56%     | 6,00%     | 4,62%       | 5,97%      | 11,6%        | 21,9%      | 3,95%        |
|                               | Latte | Min   | 2,97%  | 3,12%      | 3,85%     | 5,80%     | 4,13%       | 4,56%      | 4,76%        | 17,6%      | 3,96%        |
|                               |       | Max   | 6,31%  | 5,78%      | 5,47%     | 8,74%     | 12,1%       | 9,95%      | 23,6%        | 23,0%      | 9,73%        |
|                               |       | Media | 3,94%  | 4,36%      | 4,32%     | 6,99%     | 6,20%       | 6,22%      | 10,9%        | 20,1%      | 5,55%        |

SS =sostanza secca; PG = proteina grezza; EE = grassi grezzi; Lign. = lignina.

Tabella 4-9: Valori di coefficiente di variabilità (CV) Intra-assay, con assay definito nei due strumenti Polispac<sup>NIR</sup> e FOSS DS2500, nelle 16 letture entro strumento e lungo la mangiatoia (da /00 a /15), divisi per azienda da latte e da carne.

|             |      | SS (%) | CEN (% SS) | PG (% SS) | EE (% SS) | ANDF (% SS) | ADF (% SS) | LIGN, (% SS) | AIA (% SS) | AMIDO (% SS) |
|-------------|------|--------|------------|-----------|-----------|-------------|------------|--------------|------------|--------------|
| <b>MEAT</b> | min  | 0,67%  | 6,16%      | 2,70%     | 2,41%     | 4,54%       | 0,64%      | 4,73%        | 2,85%      | 3,53%        |
|             | max  | 6,2%   | 28,9%      | 13,1%     | 20,4%     | 10,7%       | 14,5%      | 20,0%        | 37,4%      | 11,4%        |
|             | mean | 3,55%  | 17,8%      | 8,20%     | 7,96%     | 8,28%       | 5,92%      | 12,6%        | 19,6%      | 6,9%         |
| <b>MILK</b> | min  | 1,72%  | 0,11%      | 1,04%     | 1,80%     | 2,51%       | 0,00%      | 0,9%         | 6,96%      | 0,32%        |
|             | max  | 2,49%  | 5,93%      | 9,88%     | 13,4%     | 10,40%      | 7,53%      | 10,0%        | 22,5%      | 5,64%        |
|             | mean | 2,22%  | 2,55%      | 4,26%     | 8,10%     | 6,11%       | 3,00%      | 5,5%         | 12,5%      | 3,09%        |

SS =sostanza secca, PG = proteina grezza; EE = grassi grezzi; Lign. = lignina.

#### 4.4. ANOVA

L'analisi della varianza (ANOVA), per gli effetti strumento, azienda, strumento per punto di lettura e loro interazione (strumento  $\times$  punto), delle razioni raccolte nelle dieci aziende in prova è riportata in tabella 4-10. ANOVA è un metodo statistico efficace per analizzare quanto una variabile definita come dipendente è influenzata da più fattori. Tutti i valori si intendono come medie di parametri oggetto di ricerca. Il parametro discriminante in questa analisi è il p-value che identifica se le variabilità rispetto alla media delle variabili indipendenti è dovuta al caso confermando così l'ipotesi nulla. Per valori di p-value  $< 0,05$  si rifiuta l'ipotesi nulla confermando invece che le variabilità riscontrate sono influenzate da uno o più dei fattori confrontati.

La figura 4-3 riporta la scomposizione della varianza riportata a 100 entro (ripetizioni a, b, c) e tra gruppi (da /00 a /15) dell'ANOVA riportata in tabella 4-10 per l'effetto punto di lettura, valutato entro azienda, delle razioni analizzate con il NIRS F25.

La figura 4-4 riporta i valori di SS riferiti ai punti di lettura (da /00 a /15) di due aziende caratterizzate da avere (panello A) o non avere (panello B) medie stimate significativamente diverse.

Tabella 4-10: effetto dello strumento, dell'azienda e del punto di campionamento e loro iterazione (strumento × punto) per i parametri chimici delle razioni analizzate.

|                                     | STRUMENTO   |                         |         |      | AZIENDA | PUNTO | STRUMENTO × PUNTO | ADJUSTED R <sup>2</sup> |
|-------------------------------------|-------------|-------------------------|---------|------|---------|-------|-------------------|-------------------------|
|                                     | FOSS DS2500 | Polispec <sup>NIR</sup> | p       | SEM  | p       | p     | p                 |                         |
| <b>SOSTANZA SECCA (SS, %)</b>       | 56,5        | 54,9                    | <0,0001 | 0,11 | <0,0001 | 0,96  | 0,88              | 0,98                    |
| <b>CENERI (% DELLA SS)</b>          | 6,31        | 6,99                    | <0,0001 | 0,03 | <0,0001 | 1,00  | 1,00              | 0,68                    |
| <b>PROTEINA GREZZA (% DELLA SS)</b> | 14,4        | 14,7                    | <0,0001 | 0,05 | <0,0001 | 0,99  | 1,00              | 0,45                    |
| <b>GRASSI GREZZI (% DELLA SS)</b>   | 3,60        | 3,61                    | <0,0001 | 0,02 | <0,0001 | 0,99  | 0,98              | 0,49                    |
| <b>ANDF (% DELLA SS)</b>            | 30,5        | 33,1                    | <0,0001 | 0,11 | <0,0001 | 0,33  | 0,18              | 0,65                    |
| <b>ADF (% DELLA SS)</b>             | 17,4        | 18,3                    | <0,0001 | 0,07 | <0,0001 | 0,21  | 0,37              | 0,78                    |
| <b>LIGNINA (% DELLA SS)</b>         | 2,66        | 2,38                    | <0,0001 | 0,03 | <0,0001 | 0,99  | 0,99              | 0,39                    |
| <b>AIA (% DELLA SS)</b>             | 0,55        | 0,53                    | <0,0001 | 0,01 | <0,0001 | 0,99  | 1,00              | 0,35                    |
| <b>AMIDO (% DELLA SS)</b>           | 30,6        | 25,0                    | <0,0001 | 0,09 | <0,0001 | 0,20  | 0,23              | 0,88                    |

Figura 4-3: varianza stimata tra gruppi (punti di lettura da /00 a /15) ed entro gruppi (ripetizioni a, b, c) delle predizioni FOSS DS 2500 per, in ordine dal pannello a al pannello d per Sostanza secca, proteina grezza, aNDF e amido, rispettivamente.

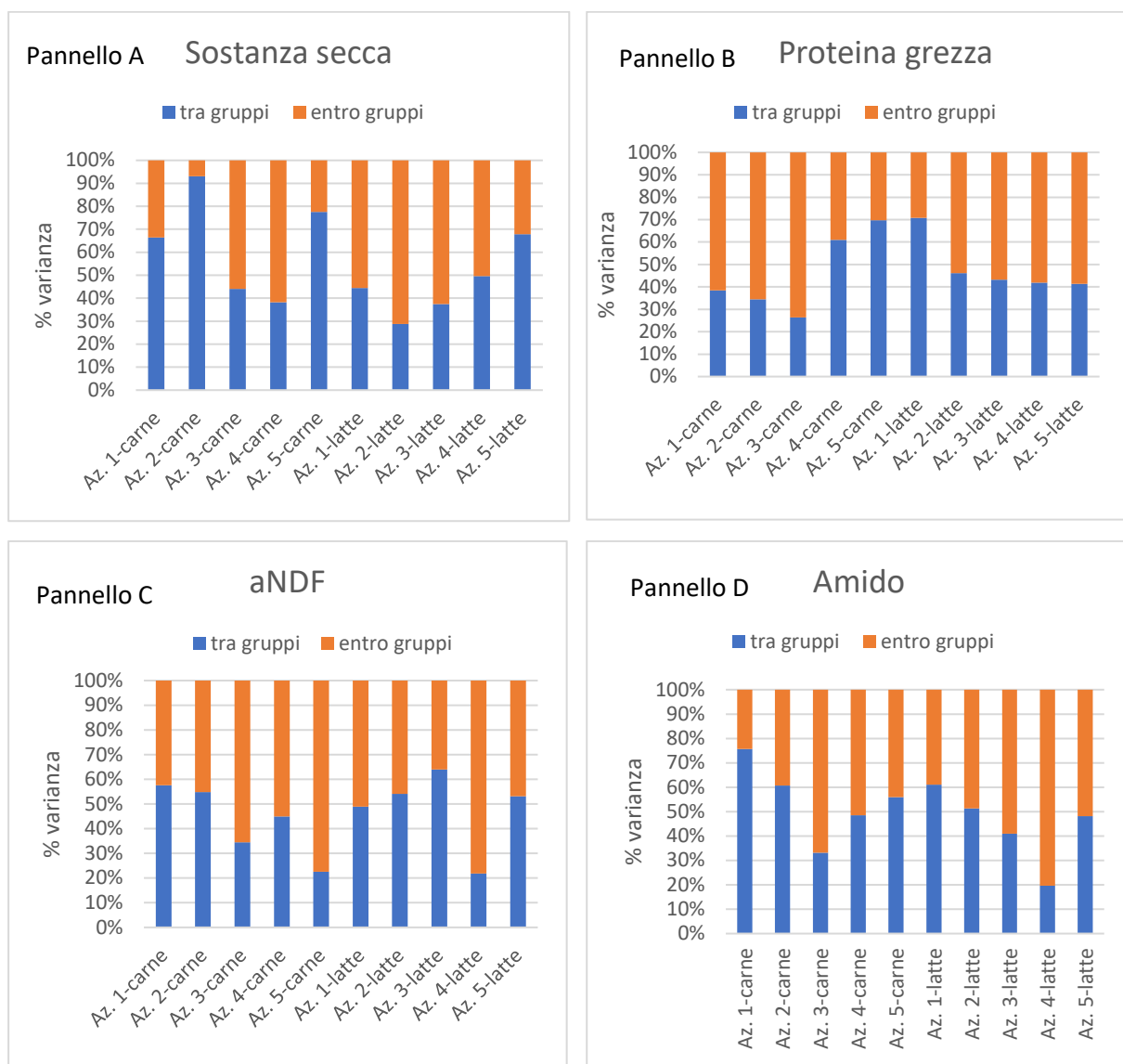


Figura 4-4: varianza stimata tra gruppi (punti di lettura da /00 a /15) delle predizioni FOSS DS 2500 della sostanza secca (SS) per due aziende con alta (pannello A) o bassa (pannello B) variabilità tra punti di lettura. Lettere uguali indicano valori di medie stimate uguali ( $P > 0.05$ ).

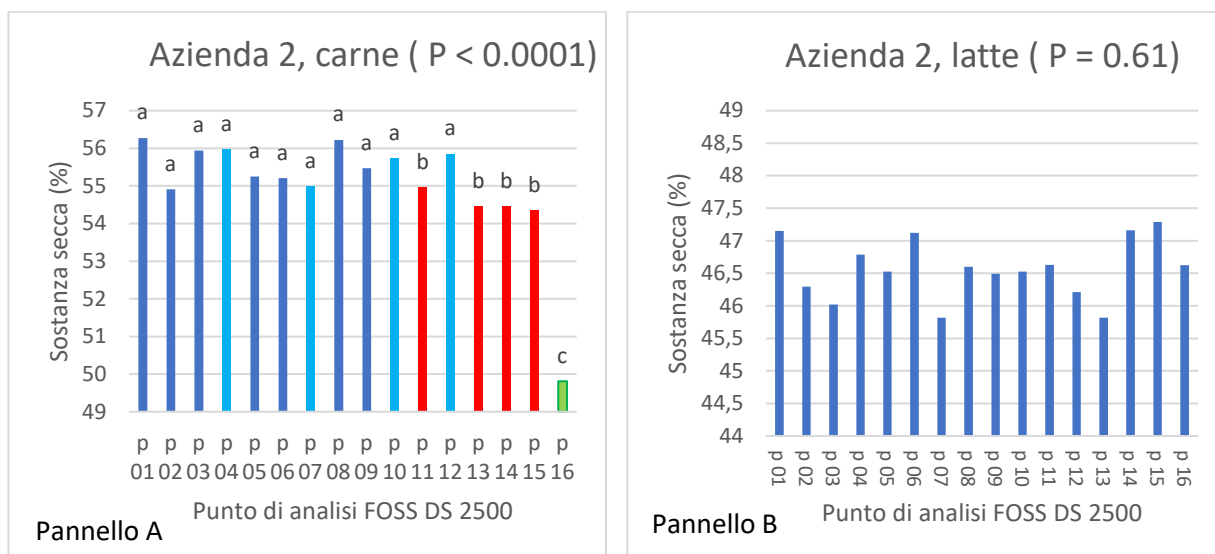




Tabella 4-11: variabilità tra gruppi (punti di lettura da /00 a /015) ed entro gruppi (ripetizioni a, b, c) delle predizioni FOSS DS 2500 per le aziende considerate nella prova e valori di probabilità associati alle variabili testate per l'effetto punto di lettura.

|            |     | SS (%) | CEN (% SS) | PG (% SS) | EE (% SS) | ANDF (% SS) | ADF (% SS) | LIGN, (% SS) | AMIDO(% SS) |
|------------|-----|--------|------------|-----------|-----------|-------------|------------|--------------|-------------|
| AZ.1-CARNE | t-g | 13.9   | 3.42       | 8.08      | 2.04      | 24.1        | 6.11       | 0.41         | 22.1        |
|            | e-g | 17.4   | 1.72       | 3.34      | 2.77      | 25.2        | 7.66       | 0.12         | 14.1        |
|            | P   | 0.10   | 0.00       | <0.001    | 0.14      | 0.05        | 0.10       | 0.05         | 0.00        |
| AZ.2-CARNE | t-g | 9.61   | 1.52       | 4.55      | 1.65      | 8.93        | 8.32       | 0.33         | 9.20        |
|            | e-g | 23.7   | 3.02       | 5.32      | 2.65      | 7.57        | 3.53       | 0.24         | 8.72        |
|            | P   | 0.61   | 0.42       | 0.08      | 0.24      | 0.01        | <0.001     | 0.00         | 0.03        |
| AZ.3-CARNE | t-g | 61.3   | 1.38       | 1.81      | 0.42      | 60.1        | 13.90      | 0.27         | 51.0        |
|            | e-g | 31.0   | 1.93       | 2.89      | 0.53      | 44.2        | 3.49       | 0.29         | 16.3        |
|            | P   | 0.00   | 0.15       | 0.24      | 0.11      | 0.01        | <0.001     | 0.05         | <0.001      |
| AZ.4-CARNE | t-g | 6.10   | 1.54       | 2.31      | 0.41      | 24.4        | 6.43       | 0.15         | 7.84        |
|            | e-g | 10.2   | 1.10       | 3.03      | 0.72      | 13.8        | 5.00       | 0.15         | 11.3        |
|            | P   | 0.27   | 0.01       | 0.01      | 0.31      | 0.00        | 0.01       | 0.04         | 0.17        |
| AZ.5-CARNE | t-g | 103    | 1.20       | 1.53      | 0.48      | 63.1        | 12.48      | 0.27         | 40.7        |
|            | e-g | 7.74   | 1.85       | 2.91      | 0.19      | 52.1        | 3.69       | 0.20         | 26.4        |
|            | P   | <0.001 | 0.22       | 0.38      | <0.001    | 0.01        | <0.001     | 0.01         | 0.00        |
| AZ.1-LATTE | t-g | 19.3   | 1.03       | 2.55      | 0.55      | 24.2        | 7.43       | 0.16         | 27.6        |
|            | e-g | 24.5   | 0.84       | 7.09      | 0.75      | 45.9        | 15.22      | 0.30         | 55.8        |
|            | P   | 0.11   | 0.01       | 0.70      | 0.15      | 0.38        | 0.44       | 0.35         | 0.43        |
| AZ.2-LATTE | t-g | 11.2   | 0.80       | 3.05      | 0.76      | 29.7        | 6.48       | 0.27         | 20.33       |
|            | e-g | 18.1   | 1.88       | 1.96      | 0.61      | 36.5        | 8.68       | 0.40         | 21.5        |
|            | P   | 0.25   | 0.56       | 0.00      | 0.01      | 0.09        | 0.13       | 0.19         | 0.05        |
| AZ.3-LATTE | t-g | 22.6   | 2.11       | 3.65      | 0.57      | 26.4        | 5.93       | 0.14         | 26.5        |
|            | e-g | 6.52   | 0.98       | 1.59      | 0.32      | 90.4        | 9.75       | 0.20         | 20.8        |
|            | P   | <0.001 | 0.00       | <0.001    | 0.00      | 0.84        | 0.26       | 0.18         | 0.01        |
| AZ.4-LATTE | t-g | 35.3   | 1.73       | 1.25      | 0.40      | 17.5        | 7.78       | 0.22         | 11.2        |
|            | e-g | 16.7   | 1.53       | 1.77      | 0.94      | 26.1        | 9.97       | 0.10         | 12.1        |
|            | P   | 0.00   | 0.02       | 0.16      | 0.57      | 0.19        | 0.11       | 0.00         | 0.05        |
| AZ.5-LATTE | t-g | 53.8   | 3.87       | 6.10      | 1.10      | 13.3        | 4.14       | 0.26         | 6.73        |
|            | e-g | 54.7   | 3.80       | 8.45      | 1.56      | 47.6        | 14.31      | 0.17         | 27.6        |
|            | P   | 0.04   | 0.03       | 0.15      | 0.17      | 0.86        | 0.84       | 0.00         | 0.91        |

t-g variabilità tra gruppi; e-g = variabilità entro gruppi; SS =sostanza secca, PG = proteina grezza; EE = grassi grezzi; Lign. = lignina.

## 5. Discussione

Analizzando le analogie e le differenze tra le tipologie di dieta prese in considerazione si nota che nelle razioni da carne si ha una concentrazione di amido maggiore rispetto alle diete da latte ma un contenuto minore di aNDF, mentre per PG sono lievemente maggiori i contenuti nelle diete per vacche da latte. I dati rilevati sono perfettamente in linea con le attitudini produttive e la durata dei cicli di allevamento tipici delle due categorie animali. In particolare per il parametro LMG per gli alimenti di bovini da carne si riscontrano valori medi inferiori (4,73 mm) rispetto alle vacche da latte (6,46 mm). Tali valori sono inferiori rispetto a quanto riportato da Grant [31] ma in linea con più recenti studi di Serva et al. 2021 [14]. Porto in rilievo inoltre che le particelle ruminoattive (PSPS-M > 4mm) date dalla somma S1%+S2%+S3%+S4% (Cum.3) sono il 63% come

da standard suggeriti del 60-70% [32] per le diete da latte contro i 55% delle diete da carne. Come ultima evidente assunzione si deve notare che TMR per bovini da carne hanno naturalmente un contenuto di particelle sul fondo del PSPS-M maggiore (23%) rispetto al TMR per vacche da latte (16%). Tali considerazioni sono talmente chiare da poter affermare con certezza che le diete da carne sono basate su concentrazioni cereali maggiori rispetto ai contenuti di fibra mentre il contrario si può affermare per le diete da latte.

Considerando le performance di calibrazione di P e F25, stabilito che valori  $R_{cv}^2 > 0,80$  sono buoni, tra 0,80-0,60 sono accettabili e  $< 0,60$  sono scarsi, si osserva che per lo strumento P il valori di  $R_{cv}^2$  è scarso per EE, aia per i parametri nutrizionali e per le previsioni fisiche di S2, S3; mentre accettabile per tutti gli altri indici fisici, per F25 in relazione ai parametri nutrizionali risulta essere buono per la maggior parte dei valori rilevati ad eccezione di aia che è scarso. Per gli indici fisici invece lo strumento F25 è considerato scarso. In generale F25 conferisce valori buoni per parametri chimici mentre P è migliore nella determinazione della composizione fisica della razione. I risultati ottenuti per i parametri chimici si considerano in coerenza, leggermente migliorativi, o molto migliorativi (per PG) rispetto a quanto riscontrato da Serva et al. [14] sulla composizione delle razioni.

Dalla figura 4-1 appare chiaro che P, rispetto a F25, propone una predizione con maggiore dispersione dei valori attorno alla media, ma le medie stimate non sono significativamente diverse. Da questo si può affermare che P è meno preciso di F25 in riferimento ai parametri analizzati quali SS, PG, aNDF, amido. Si può vedere dalla tabella 4-5 che gli RMS di P sono maggiori degli RMS di F25. Questo assieme alla figura 4-1 e alle prestazioni di calibrazione delle tabella 4-3 e tabella 4-4 dimostra che P è meno preciso di F25 eccetto per i parametri di ceneri e estratto etereo. Invece, risulta che le frazioni cumulative dei setacci sono predette con sufficiente accuratezza da P e da F25, soprattutto per le frazioni cumulative Cum.3 del P e Cum.4 del F25 (figura 4-2). Passando poi ad un'analisi relativa agli errori intra/inter-assay da tabella 4-6 si identifica che i valori di coefficiente di variabilità (CV) valutati all'interno delle 3 ripetizioni (a, b, c) per i 2 strumenti sono inequivocabilmente a confermare che F25 è più preciso di P ad eccezione delle ceneri. Confrontando poi la tabella 4-6 con la tabella 4-7, (che rileva invece i valori inter-assay), si può vedere che il CV dovuto alla differenza di analisi tra P e F25 è circa 10 volte maggiore rispetto al CV dovuto alla differenza, entro strumento, delle tre ripetizioni a, b, c. Quindi c'è un evidente effetto dello strumento usato rispetto ai valori analitici ottenuti. Il P risulta avere delle

deviazioni maggiori rispetto alla media sia analizzando orizzontalmente intra campioni a, b, c che analizzando verticalmente ossia lungo la corsia di mangiatoia tra le 16 ripetizioni.

Confrontando le tabella 4-6 tabella 4-8 si può vedere che i CV dovuti alle letture nei 16 gruppi sono circa 5-10 volte superiori rispetto ai CV dovuti alle ripetizioni a, b, c. Ad esempio su F25 si rilevano valori di CV, rispettivamente per le 16 letture e i punti di lettura a, b, c; per il parametro aNDF 4,84% (carne) e 0,99% (carne) e per EE 6,69% (latte) e 0,90% (latte). Su P si rilevano valori di Lign 10,9% (latte) e 2,38% (latte) e per PG 3,56% (carne) e 0,78% (carne) rispettivamente per le 16 letture e i punti di lettura a, b, c.

Tuttavia, con la tabella 4-10 si ricerca, tramite analisi della varianza ANOVA, da cosa è influenzata la variabilità chimica-nutrizionale media (variabile dipendente) rilevata tra i due strumenti in relazione alle variabili indipendenti quali effetto strumento, effetto azienda e effetto del punto di campionamento. Non si rileva un effetto significativo dell'effetto punto di lettura dell'alimento ma ci sono differenza significative, sulle medie stimate dei parametri, dovute allo strumento e all'azienda. Per approfondire le motivazioni della rilevazione non significativa in riferimento al punto di lettura si è ampliata la ricerca analizzando la varianza dei parametri SS, PG, aNDF, amido scomposta in (figura 4-3): varianza tra gruppi (punti di lettura da /00 a /15) e varianza entro gruppo (ripetizioni a, b, c) e si può così affermare che entro azienda c'è un evidente effetto punto di lettura che viene assorbito e in qualche modo pareggiato se l'ANOVA non è stratificata per azienda. Inoltre, ad esempio, le medie stimate per la SS relative a due aziende, (Az.2-carne e Az.2-latte) sono riprodotte nella figura 4-4, dove si può vedere che Az.2-carne è caratterizzata valori di SS significativamente diversi tra i 16 punti di prelievo e ciò è un evidente effetto della disomogeneità di TMR lungo la corsia di alimentazione. L'az.2-carne presentava infatti un IO di 56,5%, mentre per Az.2-latte avendo un IO migliore in mangiatoia (82%) gran parte dell'errore rilevato può essere considerato come variabilità inter campione (a, b, c)(figura 4-3).

Dalla tabella 4-9 si evidenzia infine che le differenze tra strumenti, rilevate in termini di CV, sono paragonabili a quelle dovute alle differenze tra punti di lettura a, b, c. Riassumendo, questo significa che: il CV tra strumenti è circa 10 volte il CV rilevato nei punti a, b, c mentre è pressoché uguale al CV nei 16 punti di lettura. Ciò sta a significare che le principali differenze sono determinate dalla variabilità esistente tra i 16 punti di lettura.

## 6. Conclusioni

Il monitoraggio continuativo sull'operatività aziendale e la possibilità di avere parametri standardizzati per la definizione di obiettivi produttivi diventa il fulcro essenziale per una buona prassi di gestione di un allevamento di bovini. Le variabilità esistenti tra gli alimenti di produzione aziendale sono il primo scoglio che ogni attività deve affrontare con costanza e attenzione per evitare perdite di reddito che si riflettono in produttività e benessere animale. Strumenti portatili come *Polispec<sup>NIR</sup>* consentono un controllo costante, ripetibile e a basso costo sul TMR aziendale. Nonostante lo strumento portatile non sia accurato e preciso come uno strumento NIRS fisso è comunque rappresentativo e nel suo valore medio diminuisce l'effetto aleatorio degli alimenti. Inoltre da questa ricerca si è osservato che il perfezionamento della tecnica TMR e l'aumento dell'omogeneità lungo la mangiatoia migliora l'effetto predizione dello strumento portatile. Tale effetto è meno evidente con l'utilizzo di uno strumento fisso. E' stato osservato infatti che la variabilità lungo la mangiatoia tra le 16 letture è maggiore rispetto alla variabilità tra le ripetizioni a, b, c. P è abbastanza rappresentativo nell'analisi inter campione (a, b, c) ma è influenzato da IO nell'analisi orizzontale lungo i 16 punti in mangiatoia. Ciò conferma l'essenzialità di massimizzare IO come già precedenti ricerche sostenevano [14]

Una buona pratica per la massimizzazione di IO può essere la sua applicazione direttamente su MFW. Certamente la correzione di un TMR in tempo reale, sulla base di parametri chimici e fisici rilevati ad intervalli di tempo regolari da uno strumento portatile applicato direttamente alla base di un carro miscelatore può avere un effetto prezioso su IO senza aumentare le tempistiche produttive di un TMR.

## 7. Bibliografia

1. Evangelista, C.; Basiricò, L.; Bernabucci, U. An Overview on the Use of near Infrared Spectroscopy (Nirs) on Farms for the Management of Dairy Cows. *Agriculture (Switzerland)* **2021**, *11*, doi:10.3390/agriculture11040296.
2. Dinamica Generale Precision Feeding Available online: <https://informatorezootechnico.edagricole.it/notizie-dalle-aziende/precision-feeding/> (accessed on 15 June 2022).
3. Melli, E. Precision Feeding Management Available online: <https://ruminantiamese.ruminantia.it/precision-feeding-management/> (accessed on 15 June 2022).
4. Stone, W.C. Nutritional Approaches to Minimize Subacute Ruminal Acidosis and Laminitis in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* **2004**, *87*, E13–E26, doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)70057-0.
5. Stone, W.C. Nutritional Approaches to Minimize Subacute Ruminal Acidosis and Laminitis in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* **2004**, *87*, doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)70057-0.
6. Kertz, A.F. Variability in Delivery of Nutrients to Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **1998**, *81*, 3075–3084, doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75872-2.
7. James, R.E.; Cox, B. Feeding Management to Reduce the Environmental Impact of Dairy Farms.; 45th Florida Dairy Production Conference, Ed.; Gainesville, April 29 2008.
8. St, S.U.; Lafayette, W. *Optimizing Performance of TMR Mixers*; 2009; Vol. 47907;.
9. Putnam, D.; Owens, V.N. *HAY SAMPLING PRINCIPLES AND PRACTICES EcoSun Prairie Farm View Project Integrated Crop-Livestock Management Systems View Project*; 2000;
10. Vegricht, J.; Miláček, P.; Ambrož, P.; Machálek, A. *Parametric Analysis of the Properties of Selected Mixing Feeding Wagons*; 2007; Vol. 53;.
11. LA TECNICA NIRS.
12. Undersander, D. Uses and Abuses of NIR for Feed Analysis.; Florida Ruminant Nutrition Symposium, Ed.; Gainesville FL.
13. Mertens, D.R.; B.P. Adjusting for Forage Variability via On-Farm Analysis.; Getting More for Forages, Ed.; July 29 2009.
14. Serva, L.; Magrin, L.; Marchesini, G.; Andrighetto, I. Assessment of the Effectiveness of a Portable NIRS Instrument in Controlling the Mixer Wagon Tuning and Ration Management. *Animals* **2021**, *11*, doi:10.3390/ani11123566.
15. AOAC, 2003. *Official Methods of Analysis 2nd Revision*; 17th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, 2003;
16. AOAC, 2005. *Official Methods of Analysis*; 18th ed.; Association of Official Analytical Chemist: Gaithersburg, MD, 2005;
17. AOAC, 2000. *Official Methods of Analysis*; 17th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, 2000;

18. AOAC, 2006. *Official Method of Analysis*; 18th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, 2006;
19. ANKOM Technology, Macedon, N. Method 13, 4/10/15: Neutral Detergent Fiber in Feeds - Filter Bag Technique (for A2000 and A2000I) Available online: [https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method\\_13\\_NDF\\_A2000.pdf](https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_13_NDF_A2000.pdf) (accessed on 20 March 2016).
20. Ferreira, G.; Mertens, D.R. Measuring Detergent Fibre and Insoluble Protein in Corn Silage Using Crucibles or Filter Bags. *Animal Feed Science and Technology* **2007**, *133*, 335–340, doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.04.010.
21. Schlau, N.; Mertens, D.R.; Taysom, K.; Taysom, D. Technical Note: Effects of Filter Bags on Neutral Detergent Fiber Recovery and Fiber Digestion in Vitro. *Journal of Dairy Science* **2021**, *104*, 1846–1854, doi:10.3168/jds.2020-18731.
22. ANKOM Technology, Macedon, NY. Method 12, 4/10/15: Acid Detergent Fiber in Feeds - Filter Bag Technique (for A2000 and A2000I) Available online: [https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method\\_12\\_ADF\\_A2000.pdf](https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_12_ADF_A2000.pdf) (accessed on 20 March 2016).
23. Vogel, K.P.; Pedersen, J.F.; Masterson, S.D.; Toy, J.J. Evaluation of a Filter Bag System for NDF, ADF, and IVDMD Forage Analysis. *Crop Science* **1999**, *39*, 276–279, doi:10.2135/cropsci1999.0011183X003900010042x.
24. Ankom Determining Acid Detergent Lignin in Beakers. [http://www.ankom.com/media/documents/Method\\_8\\_Lignin\\_in\\_beakers\\_3\\_13\\_13.pdf](http://www.ankom.com/media/documents/Method_8_Lignin_in_beakers_3_13_13.pdf) (Site visited March 9, 2014) **2013**, 11–12.
25. Lammers, B.P.; Buckmaster, D.R.; Heinrichs, A.J. A Simple Method for the Analysis of Particle Sizes of Forage and Total Mixed Rations. *Journal of Dairy Science* **1996**, *79*, 922–928, doi:10.3168/jds.S0022-0302(96)76442-1.
26. Kononoff, P.J.; Heinrichs, A.J.; Buckmaster, D.R. Modification of the Penn State Forage and Total Mixed Ration Particle Separator and the Effects of Moisture Content on Its Measurements. *Journal of Dairy Science* **2003**, *86*, 1858–1863, doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73773-4.
27. Serva, L.; Magrin, L.; Marchesini, G.; Andrighetto, I. Assessment of the Effectiveness of a Portable NIRS Instrument in Controlling the Mixer Wagon Tuning and Ration Management. *Animals* **2021**, *11*, 3566, doi:10.3390/ani11123566.
28. ASANSI/ASAE S424.1 MAR1992 (R2017) ABE Method of Determining and Expressing Particle Size of Chopped Forage Materials by Screening. *ASABE* **2007**.
29. Salimetrics, L. Calculating Inter- and Intra-Assay Coefficients of Variability Available online: <https://salimetrics.com/calculating-inter-and-intra-assay-coefficients-of-variability/> (accessed on 8 June 2022).
30. Pozzolo, P. Boxplot e Outliers Available online: <https://paolapozzolo.it/boxplot/> (accessed on 19 June 2022).
31. Grant, R.; Smith, W.; Miller, M. Relationships Between Fibre Digestibility and Particle Size for Lactating Dairy Cows. In *Proceedings of the WCDS Advances in Dairy Technology*; 2020; Vol. 32, pp. 47–57.

32. Heinrichs, J. The Penn State Particle Separator. *DSE Penn State Extention* **2013**, 186, 1–8.