

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO

DI AGRONOMIA, ALIMENTI, RISORSE NATURALI E AMBIENTE

Corso di Laurea Triennale

in

Scienze e Tecnologie Agrarie

Effetto dell'inoculo microbico sulla fermentazione *in vitro* di diete per vitellone da carne

Relatore

Dott. Franco Tagliapietra

Correlatore

Prof. Stefano Schiavon

Dott. Mirko Cattani

Laureando

Alberto Pavan

Matricola 594505

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

Sommario

INDICE FIGURE E TABELLE

INDICE FORMULE

SIMBOLOGIA USATA NEL TESTO

1 RIASSUNTO

2 ABSTRACT

3 INTRODUZIONE

3.1 L'ALLEVAMENTO DEL VITELLONE DA CARNE IN ITALIA

3.2 IMPATTO AMBIENTALE DELL'ALLEVAMENTO DEL VITELLONE DA CARNE

3.2.1 AZOTO

3.2.2 METANO

3.3 TECNICHE PER LA VALUTAZIONE DEGLI ALIMENTI ZOOTECNICI E DELLE DIETE DEI RUMINANTI

3.4 EFFETTO DELL'INOCULO MICROBICO SULLA DIGERIBILITA' E SULLA PRODUZIONE DI GAS DEGLI ALIMENTI ZOOTECNICI

3.4.1 INFLUENZA DELLA TIPOLOGIA DI ANIMALE (FISTOLATO O NON)

4 OBIETTIVI

5 MATERIALI E METODI

5.1 DISEGNO SPERIMENTALE

5.2 DIETE SPERIMENTALI

5.3 ANKOM^{RF} GAS PRODUCTION SYSTEM

5.4 CARATTERISTICHE PROVE *IN VITRO*

5.5 DESCRIZIONE TECNICA *IN VITRO*

5.5.1 PROCEDURA PREPARATORIA

5.5.2 PREPARAZIONE E INSERIMENTO DEL SUBSTRATO NELLE GIARE

5.5.3 PREPARAZIONE COMPONENTI DEL MEDIUM

5.5.4 *PRELIEVO DEL LIQUIDO RUMINALE*

5.5.5 *PROCEDURA D'INCUBAZIONE*

5.6 ANALISI FISICO CHIMICHE

5.6.1 *MISURAZIONE DEL pH*

5.6.2 *ANALISI DELLA FIBRA NDF*

5.7 PROCEDURE DI CALCOLO

5.7.1 *CONVERSIONE DEI DATI DI PRESSIONE (PSI) IN VOLUME DI GAS PRODOTTO (ml)*

5.7.2 *FITTAGGIO DELLE CURVE CON IL MODELLO DI GROOT ET AL (1996)*

5.7.3 *STIMA DEL VALORE ENERGETICO METABOLIZZABILE CON DIVERSE TECNICHE*

5.7.4 *CALCOLO DELLA DIGERIBILITA' VERA DELLA SOSTANZA SECCA*

5.8 ANALISI STATISTICA

6 RISULTATI

6.1 DATI DI DEGRADABILITA' PRODUZIONE DI GAS E DI VALORE ENERGETICO DEI LIQUIDI DI FERMENTAZIONE CONTENENTI LIQUIDO RUMINALE RACCOLTO PRIMA (PRE) O DOPO (POST) IL PASTO

6.2 EFFETTO DELLA DIETA E DEL LIQUIDO RUMINALE SUI VALORI DI DEGRADABILITA' E DI PRODUZIONE DI GAS OTTENUTI *IN VITRO* E SULLE STIME DI VALORE ENERGETICO

7 CONCLUSIONI

8 BIBLIOGRAFIA

INDICE FIGURE E TABELLE

Tabella 1: caratteristiche degli animali da cui si preleva il liquido ruminale

Tabella 2: formulazione delle tre diete

Tabella 3: composizione chimica delle tre diete

Tabella 4: specifiche tecniche di Ankom gas production system RF

Figura 1: Ankom Gas Production System RF

Tabella 5: condizioni sperimentali

Tabella 6: composizione dei campioni incubazione

Tabella 7: composizione medium

Tabella 8: Valori di produzione di gas, degradabilità dell'NDF, digeribilità vera della sostanza secca, e di energia metabolizzabile misurati a T^{1/2} e a 48 h di incubazione

Tabella 9: effetto delle tre diete e dei tre liquidi ruminali sulla produzione di gas, sulla degradabilità dell'NDF, della sostanza secca e sull'energia metabolizzabili

INDICE FORMULE

(0) conversione dati pressione (PSI) in volume di gas prodotto

(1) modello di Groot et al., 1996

(2) calcolo De (NRC 2001)

(3) calcolo ME NRC (NRC 2001)

(4) calcolo ME Menke and Steingass, 1988

(5) calcolo ME Robinson et al., 2004

(6) calcolo TDMD (%)

SIMBOLOGIA UTILIZZATA NEL TESTO

ADF: fibra al detergente acido;

ADIPG: proteina grezza insolubile al detergente acido;

AGV: acidi grassi volatili;

CEN: ceneri;

CP: contenuto proteico;

DE: energia digeribile;

FA: acidi grassi;

GP: produzione di gas;

LG: lipidi grezzi;

LO: dieta a bassa emissione;

ME: energia metabolizzabile;

MP: proteina metabolizzabile;

MUFA: acidi grassi mono-insaturi;

NDF: fibra al detergente neutro;

NDFd: digeribilità della fibra al detergente neutro;

NFC: carboidrati non fibrosi;

NDICP: proteina grezza insolubile al detergente neutro;

NU: dieta nutraceutica;

PG: proteina grezza;

PUFA: acidi grassi poli-insaturi;

RF: AnkomRF gas production system;

SFA: acidi grassi saturi;

SS: sostanza secca;

STB: spazio di testa bottiglie;

TDFA: digeribilità vera acidi grassi;

TDMd: digeribilità vera della sostanza secca;

TDNFC: digeribilità vera carboidrati non fibrosi;

TDPG: digeribilità vera proteina grezza;

TQ: tal quale;

TR: dieta tradizionale;

UF: unità foraggera;

UFC: unità foraggera carne;

VIT: vitamine.

1 RIASSUNTO

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo: i) lo studio della degradabilità e della produzione di gas *in vitro* di 3 diete per vitelloni da carne; ii) lo studio dell'effetto dell'inoculo microbico sulle cinetiche di fermentazione delle 3 diete *in vitro*; iii) lo studio dell'effetto del momento di prelievo del liquido ruminale sulle cinetiche di fermentazione delle 3 diete.

In questo lavoro sono state effettuate 4 incubazioni, di cui le prime 2 aventi durata di 48 h mentre le successive 2 aventi durata di 10 h. In tutte le incubazioni è stato usato un inoculo microbico proveniente da 9 vitelloni divisi in 3 gruppi (3 animali/dieta) alimentati con 3 diete: tradizionale, ipoproteica e nutraceutica. Il liquido ruminale della prima incubazione a 48 h e della prima incubazione a 10 h è stato prelevato da animali a digiuno dalla sera prima, mentre nella seconda incubazione a 48 h e nella seconda incubazione a 10 h il liquido ruminale è stato prelevato da animali che avevano mangiato circa 2 ore prima del prelievo.

L'apparecchiatura usata nelle incubazioni prende il nome di Ankom^{RF} gas Production System, e consiste in un kit di bottiglie (capacità: 310 ml), dove all'interno si mette direttamente l'alimento, dotate di un rilevatore interno di pressione e di una valvola elettromeccanica per il rilascio del gas. Le bottiglie sono collegate via wireless ad un personal computer, il quale regola l'apertura e la chiusura delle valvole per rilasciare i gas di fermentazione e registrare le varie produzioni di gas. Ciascuna bottiglia è stata riempita con 0,5 g di campione alimentare, 25 ml di inoculo microbico e 50 ml di tampone, per le incubazioni condotte a 48 h. Per quelle condotte a 10 h, ogni bottiglia è stata riempita con 1 g di campione alimentare, 50 ml di inoculo microbico e 100 ml di tampone.

Le variabili oggetto di studio sono state: pH, degradabilità della frazione fibrosa (NDFd) e della sostanza secca (TDMd) della dieta, energia metabolizzabile (ME) (calcolata sulla base di tre diverse equazioni), nonché i valori delle produzioni gassose (in ml). Tutti i dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza con il pacchetto statistico SAS (2007). Il modello statistico utilizzato considerava la dieta, il liquido ruminale, la relativa interazione, e il momento di prelievo del liquido ruminale (pre o post-pasto) come fattori di variazione.

Le incubazioni in cui si è usato liquido ruminale raccolto dopo il pasto degli animali hanno determinato valori di produzione di gas maggiori rispetto ai corrispettivi campioni contenenti liquido ruminale di animali tenuti a digiuno. Questa maggiore produzione di gas può essere dovuta, almeno in parte, alla presenza di substrato alimentare nel liquido ruminale prelevato post-pasto, che ha provocato una produzione di gas che è andata a sommarsi al gas effettivamente prodotto dalla dieta incubata.

In generale, la dieta ha avuto un effetto minore rispetto all'inoculo microbico sia sui valori di degradabilità che su quelli di produzione di gas. Il forte effetto esercitato dal liquido ruminale dimostra che la dieta, somministrata all'animale donatore, rappresenta la principale fonte di variabilità dei valori ottenuti nelle fermentazioni *in vitro*.

2 ABSTRACT

Aims of the present thesis were to evaluate: i) *in vitro* rumen degradability and gas production of three different diets for beef cattle; ii) effects of rumen fluid on *in vitro* fermentation kinetics of the same three diets; iii) effects of timing of rumen fluid collection (before or after feeding of donor animals) on fermentation kinetics of three diets. Four incubations were conducted, two lasted 48 h and the other two lasted 10 h. All incubations were carried out using rumen fluid collected from 9 fattening bulls divided in three groups receiving three diets (3 animals/diet): i) a conventional diet for fattening bulls; ii) a low-protein diet; iii) a low protein diet supplemented with extruded flaxseed. Rumen fluid incubated in the first incubation at 48 and 10 h was collected before feeding of donor animals, whereas that used in the second incubations at 48 and 10 h was collected from donor animals which had been fed about 2 hours before collection.

In the present experiment the Ankom^{RF} Gas Production System was used to measure degradability and gas production of diets. This system is made up of glass bottles (volume: 310 ml) equipped with an internal pressure detector and an open-close valve for gas release, and wireless connected to a personal computer.

Each bottle was filled with 0.5 g of feed sample, 25 ml of rumen fluid and 50 ml of buffer in the incubations at 48 h. In the two incubations conducted at 10 h bottles were filled with 1 g of feed sample, 50 ml of rumen fluid and 100 ml of buffer. The following rumen parameters were studied: pH, NDF (NDFd) and true dry matter (TDMd) degradability, gas production, and metabolizable energy content of three diets (calculated according to three equations proposed by literature). All data were submitted to ANOVA analysis, using a model that considered diet, rumen fluid, their interaction, and timing of rumen fluid collection (before or after feeding) as sources of variation. The use of rumen fluid collected after feeding of donor animals determined greater values of GP compared to the use of rumen fluid collected from fasted animals. Such result could be partially attributed to a proportion of gas produced by feed particles present in the rumen fluid, that was additive to that effectively produced by incubated diet. In general, effects of diet on the various *in vitro* rumen parameters (degradability and gas production) were smaller compared to those imputable to the rumen fluid. Great effects exerted by rumen fluid confirms that chemical composition of diet fed to donor animals is the most important factor influencing values obtained from *in vitro* rumen fermentations.

3 INTRODUZIONE

3.1 L'allevamento del vitellone da carne in Italia

L'Italia ha una lunga storia e tradizione come Paese produttore di bovini da carne, infatti secondo le statistiche europee (OFIVAL, 2007), nell'anno 2005 l'Italia ha rappresentato, nell'ambito dei 25 Paesi appartenenti alla UE, il terzo produttore di carne bovina (11,4% della produzione totale), preceduta solamente da Francia (22,5%) e Germania (15,3%).

In Italia i bovini da carne rappresentano il 25% della produzione agricola (Cozzi et al., 2003); il 75% della produzione nazionale si concentra nei grandi centri di ingrasso della Pianura Padana (ISMEA, 2001).

I vitelloni rappresentano il 73% dell'offerta di carne in Italia. Quasi la totalità degli animali destinati al macello deriva dall'allevamento nazionale (97%), di cui il 41% dei capi deriva da ristalli importati dall'Estero (Francia in particolare), mentre il rimanente 59% dei capi deriva da ristalli nazionali, che a loro volta sono provenienti per il 34% da allevamenti specializzati, e per il resto da allevamenti di vacche da latte.

Possiamo identificare due tipologie principali di allevamento del vitellone da carne: i) sistemi intensivi, e ii) sistemi estensivi.

I sistemi intensivi consistono in aziende di grandi dimensioni, anche fino a 1000 capi allevati, situate principalmente in Veneto e Lombardia Orientale, mentre andando verso Ovest (Piemonte) troviamo aziende più piccole, con circa 400 capi allevati. I bovini sono allevati in stalle organizzate in box multipli con pavimentazione fessurata o, più raramente, con lettiera permanente; gli animali vengono alimentati con diete “unifeed”, così da consentire l’assimilazione congiunta di fibre e concentranti e ridurre il rischio di insorgenza di acidosi metabolica. Il mais è la coltura base per la formulazione di queste diete, e viene fornito sotto forma di insilato di mais, farina derivante da granella secca o pastone integrale di mais. Le tipologie di animali allevati principalmente sono due: ci sono “tori leggeri” o “baby-beef”, derivanti da razze da latte o da incroci tra razze da latte e da carne, allevati fino ad un peso di 450-500 kg e macellati all’età di 12-14 mesi; abbiamo poi i “tori pesanti”, appartenenti a razze francesi (Charolaise, Limousine, Blonde d’Aquitaine) oppure italiane (Piemontese), i quali vengono macellati ad un peso di 600-650 kg e ad un’età di 16-24 mesi (ISMEA, 2006).

La composizione nutrizionale delle diete varia, a parità di razza bovina allevata, in base alla posizione geografica dell’allevamento. Le aziende lombarde adottano diete basate sull’insilato di mais riducendo l’uso dei cereali. In Veneto sono molto utilizzate le polpe essiccate di bietola, la farina e l’insilato di mais mentre in Piemonte l’insilato di mais è parzialmente sostituito da pastone integrale di mais e dal fieno. La paglia è l’unico alimento presente comunemente nelle razioni di bovini da carne sia in Veneto che in Lombardia mentre in Piemonte viene parzialmente o completamente sostituita da fieno di prato; in Veneto generalmente le fibre sono date da insilato di mais e paglia incluse nelle diete in quantità pari a 7 kg e 0,9 kg rispettivamente (ISMEA, 2006).

I sistemi estensivi consistono in aziende di più piccole dimensioni principalmente con sistema di produzione a ciclo completo cioè linea vacca-vitello allevando di media circa 25-40 capi per azienda. I bovini sono allevati all'aperto nei pascoli senza ripari o con solo la mangiatoia al coperto particolarmente in Piemonte, Regioni Centrali, Meridionali e nelle Isole. Le razze solitamente allevate sono quelle italiane, (Piemontese, Romagnola, Marchigiana, Chianina, Podolica, Maremmana), che vengono alimentate con concentrati e fieno derivante dai pascoli e macellate ad un peso di circa 650 kg (ISMEA, 2006).

Nel caso di aziende estensive la composizione delle diete varia anche in modo significativo (ISMEA, 2006). L'uso dell'insilato di mais è marginale il quale viene completamente sostituito da fieno di prato e leguminose (Sargentini et al., 2005).

3.2 Impatto ambientale dell'allevamento del vitellone da carne

Come nel caso degli allevamenti di bovine da latte, le maggiori problematiche di natura ambientale riguardano l'escrezione azotata e la produzione di metano.

3.2.1 Azoto

I recenti limiti introdotti dalla Direttiva Nitrati emanata dalla Comunità Europea, unitamente con il crescente prezzo di mercato della soia, stanno spingendo gli allevatori di vitelloni da carne a ridurre il tenore proteico delle diete somministrate agli animali. Mediamente le diete per vitelloni da carne utilizzate nei centri di ingrasso della Pianura Padana presentano un tenore proteico che varia tra il 14 ed il 15% (Cozzi, 2007). Negli ultimi anni, parimenti a quanto accade per l'allevamento della bovina da latte, anche in quello del vitellone da carne esiste la tendenza a ridurre il contenuto proteico delle diete, al fine di ottimizzare il metabolismo dell'animale, coprendone i fabbisogni energetici, e di limitare allo stesso tempo la perdita di azoto proteico con le deiezioni (soprattutto urinarie, ed in parte fecali). Recenti studi hanno dimostrato che una riduzione del tenore proteico dal 14% al 10% non ha influenzato le prestazioni produttive poiché non vi sono state ripercussioni negative sulle performance di crescita, sulla carcassa e

sulla qualità della carne dei vitelloni; questa riduzione ha favorito invece una riduzione consistente dell'escrezione di azoto riducendo l'impatto ambientale degli allevamenti.

3.2.2 Metano

Il metano rappresenta il secondo gas serra come importanza dopo l'anidride carbonica. In particolare il metano prodotto dal settore zootecnico deriva dalle fermentazioni ruminali ed in minor parte intestinali a carico di carboidrati strutturali (cellulose ed emicellulose). Una ulteriore produzione di metano può avvenire durante lo stoccaggio dei reflui zootecnici (letami e liquami) nelle concimaie e all'interno delle vasche di raccolta aziendali.

Le emissioni complessive di gas serra dovute all'allevamento dei bovini da carne, in tutto il mondo, ammontano a circa 2495 Mton di CO₂ eq, mentre le emissioni complessive di gas serra dovute all'allevamento dei bovini da latte, in tutto il mondo, corrispondono a circa 2128 Mton di CO₂ eq (Gerber et al., 2012).

Le emissioni in Italia invece, sempre riferite ai gas serra prodotti dagli allevamenti da carne, ammontano a circa il 17,8% delle emissioni date dal comparto zootecnico nazionale; le emissioni di gas serra negli allevamenti da latte ammontano a circa il 56% del totale (Pulina et al., 2011). Le emissioni totali imputabili all'allevamento dei bovini da latte sono maggiori rispetto a quelle dei bovini da carne poiché in Italia il numero di capi da latte e di allevamenti è superiore. In Italia l'emissione di gas serra è stimata al 3,22% del totale nazionale. Diverse strategie alimentari vengono suggerite per ridurre la formazione di metano nel rumine. L'aumento dei concentrati nella dieta comporta una riduzione potenziale medio-bassa delle emissioni di metano con effetto a lungo termine ed efficacia che sono tuttavia dipendenti dalla disponibilità di mangimi concentrati a prezzi modici (Review FAO 2013). Sull'effettiva riduzione di metano ad opera dell'aumento dei concentrati ci sono pareri contrastanti poiché alcuni autori (Eugenè et al. 2011) riscontrano una diminuzione di metano, mentre altri (Beauchemin and McGinn, 2006; Popova et al., 2011) al contrario riscontrano un aumento della produzione di metano. Il miglioramento della qualità e della

gestione dei foraggi comporta una riduzione potenziale medio-bassa delle emissioni di metano con effetto a lungo termine (Review FAO 2013). Alcune buone pratiche possono essere, ad esempio, migliorare la conservazione dei foraggi e anticipare la raccolta in uno stadio più verde, in corrispondenza del quale le piante foraggere contengono più carboidrati solubili e meno cellulose ed emicellulose (Van Soest 1994).

Un'ulteriore strategia potrebbe essere quella di aggiungere fonti lipidiche alla dieta che comporta una riduzione media della produzione di metano con una durata non prolungata nel tempo anche se in riferimento a questo dato ci sono pochi dati, poco ripetibili e contrastanti fra loro (FAO, 2013). I lipidi devono essere usati quando il loro impiego è vantaggioso dal punto di vista economico (es. sottoprodotti delle industrie di biocarburanti); inoltre senza incentivi a ridurre la produzione di metano, l'aggiunta dei lipidi nelle diete è discutibile (FAO, 2013). Alcuni limiti legati all'aumento della frazione amilacea e/o lipidica della razione sono: i) il rischio di ridurre l'efficienza delle fermentazioni ruminanti e di provocare dismetabolie all'animale (es. acidosi ruminale per eccessiva aggiunta di concentrati nella razione); ii) una riduzione della digeribilità della fibra (conseguente ad un'eccessiva aggiunta di lipidi), riduzione dell'assunzione di sostanza secca e quindi della produttività (Martin et al., 2008).

3.3 Tecniche per la valutazione degli alimenti zootecnici e delle diete per ruminanti

La degradabilità, la digeribilità, la produzione di gas ed il valore energetico delle diete utilizzate nell'alimentazione dei ruminanti possono essere stimati attraverso varie tecniche. Queste ultime possono essere classificate come: metodi biologici che comportano l'uso diretto degli animali e del loro rumine chiamati metodi *in vivo* e *in situ*; oppure attraverso metodi di laboratorio che non richiedono l'uso diretto degli animali poiché viene simulata la digestione ruminale usando campioni ruminanti prelevati precedentemente dagli animali chiamati metodi *in vitro*.

Le tecniche *in vivo* stimano la digeribilità attraverso la raccolta totale delle feci e

costituisco ancora oggi le metodiche di riferimento. Questa tecnica, nota come “tecnica di raccolta totale delle feci”, si avvale di gabbie individuali dove ciascun animale è alimentato con quantità note di alimento così da permettere, quotidianamente, la misurazione del livello di ingestione giornaliera (tramite differenza tra quantità di alimento somministrato e il residuo di mangiatoia) e delle quantità totale di feci prodotte. Le feci successivamente vengono analizzate per valutare la digeribilità in termini di sostanza secca e di specifici nutrienti (es. fibra NDF o amido). Tuttavia tali tecniche, pur essendo ampiamente utilizzate e molto affidabili, mostrano dei limiti: i) sono molto costose e laboriose, in quanto richiedono grosse quantità di alimento e un numero minimo di animali per la prova; ii) forniscono esclusivamente un dato di digeribilità totale (finale) dell'alimento, senza fornire informazioni riguardo la cinetica di degradazione. Inoltre altri fattori possono portare a variazioni come: le caratteristiche degli animali (sesso, età, razza, ecc.), o le caratteristiche della dieta o del singolo alimento (dimensioni delle particelle, effetti delle loro combinazioni, ecc..).

A differenza delle tecniche *in vivo*, le tecniche *in situ* forniscono invece una cinetica della degradazione degli alimenti e delle diete nell'ambiente ruminale. Tale metodica prevede di incubare una certa quantità di campione alimentare all'interno di sacchetti porosi, di solito in nylon, che vengono a loro volta inseriti nel rumine di animali fistolati (Quin et al., 1938). Il protocollo permette di misurare la progressiva scomparsa, in seguito a degradazione, del campione alimentare mediante estrazione e pesatura dei sacchetti ad orari prestabiliti. I risultati ottenuti con questo sistema, tuttavia, risultano essere poco ripetibili e riproducibili, poiché fortemente influenzati dalla porosità dei sacchetti, che a sua volta influenza la capacità dei microorganismi ruminali di penetrare nel sacchetto e di entrare pertanto a contatto con il substrato alimentare in esso contenuto. La corretta porosità dei sacchetti dovrebbe garantire l'afflusso di liquido ruminale, il passaggio di alimento digerito e la ritenzione di alimento non ancora digerito ma attualmente vi è ancora dibattuto su quale possa essere la giusta misura di porosità del sacchetto. Il grosso limite di tali metodiche è l'utilizzo di animali sottoposti ad

operazione chirurgica per l'applicazione di fistole ruminali permanenti, una pratica che solleva tuttora forti critiche da parte dell'opinione pubblica per questioni etiche legate al benessere degli animali. Questo implica una grande difficoltà da parte dei laboratori di ricerca ad ottenere le licenze necessarie per poter effettuare la fistolazione degli animali.

In conseguenza a ciò, la ricerca sperimentale si sta progressivamente orientando verso l'utilizzo di tecniche *in vitro*, che mirano a riprodurre i processi digestivi ruminali in laboratorio. Rispetto alle metodiche *in vivo* ed *in situ*, le tecniche *in vitro* risultano essere più rapide, meno laboriose e meno costose, ma soprattutto, non richiedono l'utilizzo diretto dell'animale. Esistono due differenti tipologie di tecniche *in vitro*: quelle atte a misurare la degradabilità degli alimenti e quelle in grado di rilevare la produzione dei gas di fermentazione. Goering e Van Soest (1970) hanno suggerito una procedura alternativa che fornisce una stima della digeribilità vera della sostanza secca e che prevede un'analisi in due fasi successive: una prima fase d'incubazione del campione alimentare con un inoculo microbico, seguita dal trattamento del residuo di fermentazione con un detergente neutro. Si ottengono così valori di “*degradabilità vera*” che consentono di valutare la frazione alimentare effettivamente degradabile a livello ruminale. Negli ultimi anni la ricerca ha sviluppato diversi metodi alternativi: uno di questi è rappresentato dall'incubatore Daisy^{II} (Ankom Technology[®], Macedonia, NY, USA). Questo incubatore consiste in una camera di fermentazione, mantenuta alla temperatura costante di 39°C (per riprodurre la temperatura ruminale in condizioni fisiologiche), all'interno della quale sono alloggiati 4 giare di vetro (capacità: 3 litri). Il protocollo di analisi prevede che il campione alimentare (0.25 g), precedentemente macinato con griglia da 1 mm, venga incubato all'interno di un sacchetto poroso, simile a quello utilizzato nelle metodologie *in situ* descritte in precedenza. I sacchetti porosi vengono posti a loro volta all'interno delle 4 giare di vetro ed incubati (solitamente per 48 h) con liquido ruminale ed una soluzione tampone, che serve a riprodurre la saliva dell'animale. Il principale vantaggio di questo apparecchio è di tipo operativo, in quanto esso consente di

analizzare più di 100 campioni contemporaneamente. Di contro, il principale limite della tecnica è legato, come descritto in precedenza per la metodica *in situ*, all'incubazione del campione alimentare all'interno di sacchetti che potrebbero rappresentare una sorta di "barriera" al normale ingresso dei microorganismi. Un'altra tecnica per stimare la digeribilità degli alimenti è la gas production. La gas production (GP) è nata per simulare le fermentazioni degli alimenti nel rumine ad opera della flora batterica presente al suo interno. Una delle metodologie di riferimento rimane ancora quella introdotta da Menke et al. (1979), i quali hanno sviluppato una tecnica che prevede l'impiego di siringhe nelle quali viene incubato il campione alimentare con una miscela di liquido ruminale e tampone. La produzione dei gas di fermentazione (principalmente CO₂ e CH₄) è valutata misurando lo spostamento progressivo (ad intervalli fissi di tempo) di uno stantuffo presente all'interno della siringa. Tale metodo fu originariamente ideato per determinare la produzione cumulata di gas che si sviluppavano nel corso di 24 ore di incubazione. Il principale limite di questa tecnica è che la l'affidabilità delle misurazioni di gas ottenute dipende dalla precisione con cui si legge il volume dei gas all'interno delle siringhe. Recentemente, è stato commercializzato un sistema automatico di misurazione della produzione di gas *in vitro*. Tale strumentazione consiste in un kit di 50 bottiglie dotate di un rilevatore di pressione, all'interno delle quali il substrato alimentare viene incubato con la classica miscela di liquido ruminale e tampone. Ogni bottiglia è collegata via wireless ad un personal computer, che ogni minuto registra il valori di pressione presente all'interno delle bottiglie stesse. Tale tecnica è esposta in dettaglio nel *Capitolo 5* riguardante i materiali e metodi.

Il gas è prodotto principalmente dalla fermentazione dei carboidrati, con produzione di acido acetico, propionico e butirrico. La produzione di gas imputabile alla fermentazione delle proteine è inferiore, mentre il gas derivante dalla degradazione ruminale dei lipidi è quasi irrilevante. A tale riguardo, la fermentazione di 200 mg di una fonte di carboidrati (cellulosa) produce circa 80 ml di gas, contro i 23 e i 2-3 ml forniti dalla medesima quantità di proteina

(caseina) e lipidi (olio di palma, soia e cocco). Per tale motivo una delle strategie alimentari maggiormente proposte per ridurre la formazione di gas (in particolare metano) nel ruminale prevede l'integrazione delle diete con fonti lipidiche (es. semi di oleaginose come lino, colza, cotone, etc...).

3.4 Effetto dell'inoculo microbico sulla degradabilità e sulla produzione di gas degli alimenti zootecnici

È riconosciuto che una fonte comune di variazione nelle tecniche *in vivo*, *in situ*, e *in vitro* è rappresentata dalla qualità di liquido ruminale (Mould et al., 2005). La letteratura riporta che la qualità del liquido ruminale, in termini di numero e tipologia di popolazione batterica, è molto influenzata dalla composizione della dieta somministrata all'animale (Bryant and Burkey, 1953; Makir and Foster, 1957) e dalla frequenza di alimentazione, intesa come numero di pasti giornalieri che l'animale effettua (Thorley et al., 1968). Le sperimentazioni *in vivo* e *in situ*, dovrebbero essere condotte in animali che mangiano l'alimento o la dieta di interesse, per limitare gli effetti della dieta e raggiungere il liquido ruminale "ideale" in termini di popolazione microbica (Vanzant et al., 1998; Kitessa et al., 1999). A conferma di ciò, molti Autori (Lindberg, 1981; Cronje, 1992) denotano che la digestione dei foraggi, nelle prove *in situ*, è superiore in animali abitualmente alimentati con diete a base di foraggi rispetto ad animali riceventi diete con molti concentrati. Per questo motivo, nelle tecniche *in situ* e *in vivo* si dovrebbero usare animali alimentati con le stesse diete, o diete molto simili a quelle oggetto di studio, così da ridurre il più possibile l'influenza della dieta sulla qualità del liquido ruminale ed avvicinarsi il più possibile ad una quantità di popolazione microbica il più possibile ideale.

Un utilizzo di diete diverse renderebbe difficile il confronto dei risultati ed anche creerebbe problemi organizzativi e gestionali in quanto le diete somministrate agli animali donatori dovrebbero essere continuamente modificate in base alle esigenze delle diverse prove.

Per ovviare al problema si può effettuare un periodo di pre-incubazione (di solito una decina di giorni) nel quale l'inoculo microbico viene pre-adattato alle diete

incubate (es. utilizzando il RUSITEC). In ogni caso la dieta fornita agli animali donatori non sembra esercitare un forte impatto sui valori di gas ottenuti *in vitro* (Rymer et al., 2005), a patto che il liquido ruminale prelevato abbia un'attività microbica sufficiente a sostenere un'adeguata produzione di gas. A tal proposito, Menke e Steingass (1988) hanno ipotizzato che l'attività minima microbica si ottiene utilizzando liquido ruminale prelevato da animali alimentati non più di 16 ore prima. Viceversa, un effetto di gran lunga maggiore può essere attribuito al momento in cui viene effettuato il prelievo del liquido ruminale e, nello specifico, prima o dopo la somministrazione della razione giornaliera agli animali donatori. Cone et al. (1996) hanno evidenziato che l'attività microbica del liquido ruminale è significativamente influenzata dal momento del prelievo (pre- o post-pasto), notando una maggior attività microbica nel fluido ruminale prelevato dopo il pasto degli animali. Molti autori suggeriscono che gli animali a digiuno presentano solitamente un liquido ruminale con una composizione più costante, quindi i campioni ottenuti garantiscono misure di GP più ripetibili ed attendibili. Ad oggi il momento in cui effettuare il prelievo del liquido ruminale non risulta ancora standardizzato. Infatti molte delle più comuni tecniche di GP prevedono il prelievo del liquido ruminale prima dei pasti (Menke et al., 1979; Blümmel e Ørskov, 1993; Theodorou et al., 1994; Mauricio et al., 1999), mentre altri protocolli di analisi prevedono il prelievo del liquido ruminale da animali che abbiano mangiato (Pell e Schofield, 1993; Cone et al., 1996).

3.4.1 Influenza della tipologia di animale (fistolato o non)

Quando si utilizzano animali non fistolati, e pertanto il prelievo di liquido ruminale non può essere eseguito direttamente dal rumine, risulta difficile ottenere un campione di liquido ruminale che sia rappresentativo della concentrazione e popolazione microbica presente nel rumine stesso. Per questo motivo uno dei protocolli tuttora maggiormente impiegati per l'analisi della digeribilità *in vitro* degli alimenti zootecnici (Tilley e Terry, 1963) prevede che il liquido ruminale venga prelevato da animali fistolati, per limitare la contaminazione del campione con la saliva dell'animale, una conseguenza di fatto inevitabile quando il prelievo

viene eseguito tramite sonda esofagea. Similmente, anche un altro importante protocollo di analisi (Goering e Van Soest, 1970) suggerisce di prelevare il liquido da animali dotati di fistola ruminale, sebbene in questo caso non siano spiegate le ragioni per le quali tale procedura dovrebbe essere preferita. Tuttavia, come accennato in precedenza, la pratica della fistolazione degli animali pone serie problematiche legate al benessere animale, e dovrebbe pertanto essere evitata o quantomeno limitata. In alternativa il prelievo del liquido ruminale può essere effettuato da animali non fistolati tramite apposite sonde esofagee. Il rischio connesso all'impiego di sonde per il prelievo del liquido ruminale consiste nella possibilità di inquinare il campione con la saliva dell'animale e con l'aria. La contaminazione con saliva comporta l'alterazione del pH e altera l'andamento delle fermentazioni ruminali (Raun e Burroughs, 1962); la contaminazione con l'ossigeno (aria), invece, riduce o inibisce completamente l'attività e la crescita dei microrganismi ruminali strettamente anaerobi (Hungate, 1966). Per ovviare a questi inconvenienti si può adoperare una sonda esofagea che consente di arrivare direttamente al rumine, limitando la contaminazione del campione con la saliva, e contemporaneamente mantenere l'anaerobiosi del campione. Anche nelle prove *in vitro* si è visto che la qualità del liquido ruminale è influenzata, per quanto concerne la digeribilità, dal tipo di dieta che segue l'animale. Recenti prove (Tagliapietra et al., 2012) hanno evidenziato che il prelievo del liquido ruminale tramite sonda, se effettuato adeguatamente (mantenendo le condizioni di temperatura ed anaerobiosi), può preservare le caratteristiche fermentative del liquido stesso.

4 OBIETTIVI

Nel presente lavoro di tesi si possono individuare 3 obiettivi principali:

- 1) lo studio della degradabilità e della produzione di gas *in vitro* di 3 diete per vitelloni da carne: i) tradizionale (14,4% di proteina grezza), composta da ingredienti che vengono largamente utilizzati nel razionamento dei vitelloni da carne allevati nei sistemi intensivi della Pianura Padana; ii) ipoproteica (10,7% di proteina grezza), pensata allo scopo di fornire una quota di proteina maggiormente corrispondente all'effettivo fabbisogno dell'animale e ridurre le escrezioni di azoto per via urinaria e fecale; iii) nutraceutica, che abbinava un ridotto contenuto proteico (10,7% di proteina grezza), all'integrazione di semi di lino estruso, ricchi in acidi grassi della serie omega-3
- 2) lo studio dell'effetto del momento di prelievo del liquido ruminale sulle cinetiche di fermentazione delle 3 diete. A tale scopo il liquido ruminale è stato prelevato prima del pasto mattutino degli animali (animali tenuti a digiuno dalla sera prima) oppure 2 ore dopo il suddetto pasto
- 3) lo studio dell'effetto dell'inoculo microbico sulle cinetiche di fermentazione *in vitro* delle suddette diete. A tale scopo le diete sono state incubate con tre diversi inoculi prelevati da 9 vitelloni alimentati con le tre diete oggetto di studio (3 vitelloni (dieta).

5 MATERIALE E METODI

5.1 Disegno sperimentale

La prova *in vitro* condotta ha utilizzato come donatori di inoculo microbico 9 vitelloni stabulati presso l'azienda agraria "Toniolo" dell'Università di Padova. Al momento del prelievo dell'inoculo microbico gli animali, suddivisi in 3 gruppi omogenei, stavano ricevendo le tre diete oggetto di studio (3 animali/dieta): tradizionale, ipo-proteica e nutraceutica (la cui composizione è riportata in Tabella 2). La dieta tradizionale rappresentava una razione tipica utilizzata negli allevamenti intensivi del vitellone da carne della Pianura Padana (PG = 14,4%). La dieta ipoproteica (10,7% PG) è stata ottenuta a partire dalla dieta tradizionale; il tenore proteico è stato ridotto sostituendo la principale fonte proteica della dieta (farina di estrazione di soia) con una fonte amidacea (farina di mais). La dieta nutraceutica, infine, comprendeva, a differenza delle altre due diete, i semi di lino estruso; tale dieta abbinava un ridotto contenuto proteico (PG = 10,7%) ad un maggiore contenuto lipidico rispetto alle diete tradizionale e ipo-proteica. Le tre diete sono state incubate in 5 incubazioni, condotte in 5 settimane successive. Una prima incubazione, preliminare e della durata di 144 h, è stata fatta per determinare in quanto tempo, le tre diete, raggiungevano il 50% della produzione di gas asintotica (tale tempo è definito $t_{1/2}$). Questo è risultato essere mediamente di 10 h. Le due incubazioni successive, con una durata di 48 h, sono state fatte utilizzando in un liquido ruminale di animali tenuti a digiuno dalla sera prima (raccolta pre-pasto del liquido ruminale), nell'altra da animali che avevano mangiato 2 ore prima del prelievo (prelievo post-pasto). Le ultime due incubazioni, aventi durata di 10 h, sono state fatte utilizzando, anche in questo caso, liquido ruminale prelevato da animali che, al momento del prelievo, erano a digiuno dalla sera oppure che avevano mangiato 2 ore prima del prelievo. Le caratteristiche sperimentali di ciascuna incubazione sono descritte in seguito e trovano una sintesi in Tabella 5. L'inoculo microbico, in ogni prova, è stato prelevato da 3 vitelloni per ciascun gruppo.

Le caratteristiche principali degli animali sono riportate in Tabella 1.

TABELLA 1: Caratteristiche degli animali utilizzati per il prelievo di liquido ruminale

CARATTERISTICHE ANIMALI DONATORI DI LIQUIDO RUMINALE

Numero: 9 animali

Razza: incroci frisone x bianco e blu belga

Provenienza: Trentino Alto Adige

Peso vivo: 500 kg circa

Età: 20 mesi circa

Ingestione alimentare media: 9-10 kg SS/capo/d

5.2 Diete sperimentali

La composizione delle 3 diete oggetto di analisi è riportata in Tabella 2. Le caratteristiche chimiche e i microminerali contenuti in ogni dieta sono riportati nella Tabella 3.

TABELLA 2: Formulazione delle tre diete

Alimento	Tradizionale		Ipoproteica		Nutraceutica	
	T.Q.kg/d	S.S.kg/d	T.Q.kg/d	S.S.kg/d	T.Q.kg/d	S.S.kg/d
Insilato di mais	7.20	2.53	7.20	2.53	7.20	2.53
Farina di mais	4.10	3.61	4.10	3.61	4.10	3.61
Crusca di frumento	0.70	0.62	0.70	0.62	0.70	0.62
Paglia	0.70	0.65	0.70	0.65	0.70	0.65
Polpe di barbabietola	1.20	1.06	1.20	1.06	1.20	1.06
Vinacciolo	0.20	0.18	0.20	0.18	0.20	0.18
Farina di soia 44%	1.45	1.29	-	-	0.22	0.20
Mais	-	-	0.90	0.79	0.60	0.53
Semi di soia	-	-	0.55	0.48		-
Semi di lino	-	-	-	-	0.55	0.48
Min-Vit	0.20	0.20	-	-	-	-
Min-vit	-	-	0.20	0.20	-	-
Min-vit	-	-	-	-	0.20	0.20
TOTALE	15.75	10.15	15.75	10.13	15.75	10.14

TABELLA 3: Composizione chimica delle diete

		Tradizionale	Ipoproteica	Nutraceutica
SS	kg/d	10.15	10.13	10.14
SS	%	75.69	75.53	75.66
UFC	% ss	1.02	1.03	1.04
PG	% ss	14.40	10.70	10.69
NDF	% ss	30.01	29.53	29.58
ADF	% ss	17.01	16.40	16.51
Amido	% ss	36.04	41.79	40.08
LG	% ss	2.98	4.15	5.46
Ceneri	% ss	4.35	3.88	4.12

SS: Sostanza Secca; UF: unità foraggere scandinave; UFC Unità Foraggiera Carne 1 U.F.C. = 1855 Kcal/kg; PG: Proteina Grezza; NDF: Fibra al detergente Neutro; ADF: Fibra al Detergente Acido; LG: Lipidi Grezzi.

In maniera semplificativa, rispetto alla dieta tradizionale (TR) costituita da insilato di mais, farina di mais, polpe di barbabietola, frumento, paglia e un integratore vitaminico-minerale, le diete “ipoinquinanti” sono contraddistinte da:

- un diverso contenuto proteico (CP): la dieta TR, largamente utilizzata negli allevamenti bovini della Pianura Padana, mostra un tenore in proteina (14,4% PG) maggiore rispetto alle diete LO e NU, caratterizzate da un contenuto proteico minore (10,7%).
- la dieta nutraceutica (NU) contiene semi di lino estruso, come fonte di acidi grassi della serie omega-3

5.3 Ankom^{RF} gas production system

Quest’ apparecchiatura è prodotta da Ankom Technology[®] e viene venduta con il nome di “Ankom^{RF} gas production system”. E’ uno strumento innovativo che consente di determinare la degradabilità e la produzione di gas. La strumentazione è composta dalle seguenti specifiche tecniche (Tabella 4):

TABELLA 4: Specifiche tecniche di Ankom gas production system RF

Ankom gas production system RF
Organizzazione modulare ed espandibile (fino a 50 moduli per set)
Alimentazione dei moduli a batterie
Valvole di sfiato a prova di blocco
Altezza moduli RF1: 20,3 cm, volume: 310 ml)
Diametro del modulo: 7,2 cm (senza bottiglia)
Accuratezza della misura: $\pm 1\%$ del valore misurato
Risoluzione: $\pm 0,04$
Ambito di pressione cumulativa: da -10,0 a 500,0 psi (o corrispondente, in bar)
Interfaccia dati con Excel (Microsoft ©) per la rappresentazione grafica
Possibilità di campionare il gas prodotto

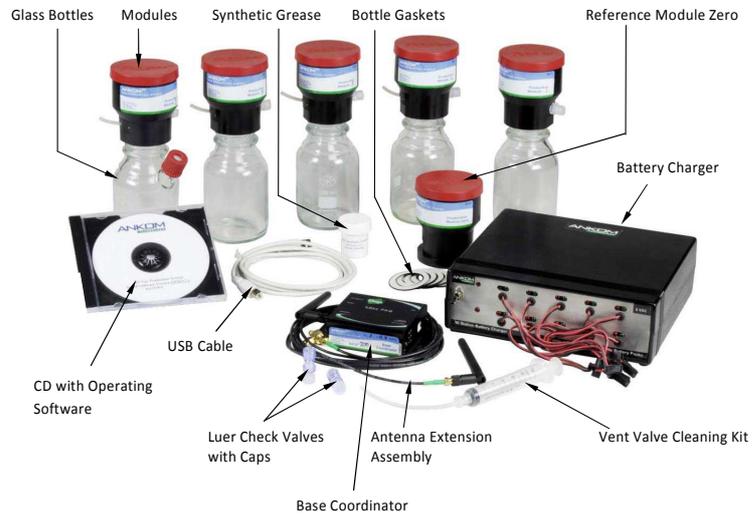
a) Giare: sono bottiglie in vetro (capacità: 310 ml), al cui interno il campione alimentare viene fatto fermentare con inoculo microbico e tampone. Ogni giara è chiusa ermeticamente tramite un apposito tappo cilindrico contenente il sistema di misurazione e trasmissione dei dati detto “modulo attivo”.

b) Il “modulo attivo” è formato da un cilindro in plastica, cavo all’interno e chiuso alla base, che presenta tre aperture: una prima apertura comunica con il sensore di pressione; una seconda apertura è collegata all’elettrovalvola di sfiato comandata attraverso il software; ed una terza apertura comunica invece con una valvola meccanica che dall’esterno consente un rapido attacco con il condotto adduttore della CO₂, necessario per creare l’anaerobiosi prima dell’incubazione.

Nella cavità interna sono pertanto disposti: un sensore di pressione, una scheda elettronica ed una batteria ricaricabile che consente di alimentare la valvola e l’antenna di collegamento wireless. I moduli “attivi”, per assicurare il funzionamento del sistema, necessitano della presenza del cosiddetto “modulo zero” il quale, non essendo collegato a nessuna giara, è posto sopra l’incubatore. Il compito fondamentale del “modulo zero” è quello di registrare la pressione atmosferica circostante.

c) Il sistema di trasmissione e registrazione dei dati è assicurato da una centralina wireless detta “*base coordinator*” e controllato tramite il software fornito dalla stessa ANKOM che può essere impiegato con qualunque PC (Windows XP© o Vista©). Questo programma consente di gestire l’intero apparato (stabilendo la pressione di apertura delle elettrovalvole e l’intervallo di registrazione dei dati) e di ottenere ulteriori informazioni come ad esempio il grado di voltaggio delle batterie o eventuali malfunzionamenti dei moduli. Le pressioni possono essere emesse in psi o bar. L’output delle registrazioni è riprodotto in un foglio Excel standard grazie al quale gli utenti possono generare facilmente le curve di produzione di gas (ANKOM Technology, 2012).

FIGURA 1: Ankom Gas Production System RF



www.ankom.com

5.4 Caratteristiche prove *in vitro*

Nell'ambito della ricerca sono state eseguite quattro incubazioni caratterizzate da differenti condizioni sperimentali (riassunte in Tabella 5). Le prime due prove hanno avuto un tempo di incubazione pari a 48 h; mentre le due successive hanno avuto tempo di incubazione pari a 10 h. In tutti e quattro i casi sono state analizzate tutte le possibili combinazioni dieta – inoculo, usando in due incubazioni, una a 48 h e una a 10 h, liquido ruminale di animali a digiuno da circa due ore; mentre nelle altre due incubazioni, sempre una a 48 h e una a 10 h, liquido ruminale di animali nutriti circa due ore prima.

TABELLA 5: Condizioni sperimentali

CONDIZIONI SPERIMENTALI
Metodo d'incubazione: RF;
Due tempi d'incubazione: 48 h e 10 h (T mezzi ¹);
Un tipo di medium: Menke (1988);
Tre diete: TR, LO, NU;
Tre liquidi ruminali: TR, LO, NU.
Due diversi tempi di prelievo liquidi ruminali: 2 h prima del pasto e 2 h dopo il pasto

¹ t_{1/2} = tempo al quale viene raggiunto il 50% della produzione di gas asintotica

Ogni dieta è incubata con tutti i tipi di liquido ruminale ed ogni combinazione dieta-liquido ruminale presenta 3 ripetizioni:

Tabella 6: composizione dei campioni

(3 diete x 3 liquidi rum.) x 3 replicazioni	
= 27 bottiglie	
(1 bianco ² x 3 liquidi ruminali) x 3 replicazioni	
= 9 bottiglie	
TOTALE = 36 bottiglie	
Quantità dieta incubata →	1 g per bottiglia
Quantità liquido ruminale →	50 ml per bottiglia
Quantità tampone →	100 ml per bottiglia

² “bianco”= bottiglia incubata in assenza di substrato di fermentazione

5.5 Descrizione tecnica *in vitro*

5.5.1 Procedura preparatoria

Il giorno antecedente l’incubazione, al fine di ottimizzare i tempi e l’accuratezza della prova, sono necessarie alcune operazioni:

- Preparazione e inserimento del substrato nelle giare;
- Preparazione componenti del medium.

5.5.2 Preparazione e inserimento del substrato nelle giare

Innanzitutto, ogni tipologia di dieta deve essere macinata, tramite mulino munito di griglia con fori di 1 mm, in modo tale da renderla più omogenea e favorirne la fermentazione a contatto con la miscela medium-inoculo. Si procede poi con la pesatura dei singoli campioni delle diete (1 g ± 0,001) e con l’inserimento dei vari campioni all’interno delle giare numerate, le quali verranno poi sigillate con i moduli e messe nell’incubatore a 39°C. E’ inoltre doveroso, prima di sigillare ogni bottiglia, verificare il funzionamento delle valvole di ogni modulo necessario per l’incubazione (apertura, chiusura e tenuta).

5.5.3 Preparazione componenti del medium

Il protocollo d'analisi prevede l'uso del tampone (o saliva artificiale) proposto da Menke e Steingass (1988). Il tampone è composto da cinque soluzioni (vedi Tabella 7). Solitamente, le soluzioni tampone, macrominerali e microminerali, vengono preparate il giorno precedente all'incubazione. La resazurina può essere preparata anticipatamente, tuttavia richiede una conservazione più accurata (in un luogo chiuso e al riparo dalla luce) per la sua natura fotosensibile. La parte riducente del medium, invece, viene preparata il giorno stesso dell'incubazione in quanto non permette una conservazione prolungata nel tempo.

I cinque composti sono miscelati poche ore prima dell'incubazione e, nel momento in cui si aggiunge anche la parte riducente (ultima in ordine di aggiunta) si assiste al viraggio: la soluzione passa rapidamente da una colorazione tipicamente violacea (dovuta alla presenza della resazurina) ad una incolore. Soprattutto durante queste ultime fasi di preparazione del medium, è essenziale sottoporre la miscela a un flusso di CO₂ al fine di eliminare l'ossigeno presente assicurando così un basso potenziale di ossido-riduzione al momento dell'inoculazione.

TABELLA 7: Composizione medium

MEDIUM Menke e Steingass (1988)	
Soluzione	quantità
A. Soluzione tampone:	
<i>Sodiobicarbonato (NaHCO₃)</i>	35 g
<i>Ammonio bicarbonato (NH₄HCO₃)</i>	4 g
<i>Portare a volume con un litro di acqua deionizzata</i>	1000 ml
B. Soluzione macromineraie:	
<i>Sodio fosfato bibasico (Na₂HPO₄)</i>	5.7 g
<i>Potassio fosfato monobasico (KH₂PO₄)</i>	6.2 g
<i>Magnesio solfato eptaidrato (MgSO₄·7H₂O)</i>	0.6 g
<i>Portata a volume con un litro d'acqua deionizzata</i>	1000 ml
C. Soluzione micromineraie:	
<i>Calcio cloruro diidrato (CaCl₂·2H₂O)</i>	13.2 g
<i>Cobalto cloruro esaidrato (CoCl₂·6H₂O)</i>	1.0 g
<i>Ferro cloruro esaidrato (FeCl₃·6H₂O)</i>	1.17 g
<i>Manganese cloruro tetraidrato (MnCl₂·4H₂O)</i>	10.0 g
<i>Portato a volume</i>	100 ml
D. Soluzione di resazurina:	
<i>Resazurina</i>	0.1 g
<i>Portata a volume con</i>	100 ml
E. Soluzione riducente (per ogni litro di soluzione finale):	
<i>Acqua distillata</i>	47.5 ml
<i>Sodio solfuro nonaidrato (Na₂S·9H₂O)</i>	0.336 g
<i>Soda 1M (NaOH)</i>	2 ml

5.5.4 Prelievo del liquido ruminale

L'inoculo microbico è stato prelevato da vitelloni stabulati presso le strutture dell'Azienda Agraria Sperimentale "L.Toniolo" dell'Università di Padova. In tutte le repliche sperimentali, il prelievo è stato previsto il giorno stesso

dell'incubazione da animali a digiuno da due ore circa in due incubazioni, mentre da animali nutriti due ore prima nelle altre due incubazioni.

Il prelievo del liquido ruminale avviene grazie all'utilizzo di una sonda esofagea munita di filtro nella parte terminale che impedisce l'aspirazione del materiale più grossolano. La sonda, essendo collegata a una pompa del vuoto tramite una cannula flessibile, consente di arrivare al rumine e di compiere il prelievo. L'inoculo microbico è raccolto in un matraccio, filtrato attraverso tre strati di stoffa, successivamente è versato inizialmente in un beker e poi, ottenuti circa 500 ml di filtrato, nei thermos contenuti nel frigo. Per evitare stress termici che possono compromettere l'attività dei microrganismi ruminanti, sia il matraccio di raccolta che i thermos vengono preriscaldati con acqua calda (39-40°C) e svuotati appena prima di introdurre il liquido ruminale. Inoltre, per ovviare il rischio di esporre a condizioni di aerobiosi da parte della flora ruminale, il tempo di esecuzione delle operazioni di prelievo dovrebbe essere il più possibile limitato, anche se, per questioni logistiche - pratiche legate alla distanza Azienda-Laboratorio, non può essere ridotto a meno di 15 minuti. Una volta in laboratorio, l'inoculo microbico viene nuovamente filtrato attraverso un doppio strato di garza da casaro e poi versato in un grosso beker, posto in un bagnomaria a 39°C sotto un flusso continuo di CO₂, in modo da mantenere le condizioni di anaerobiosi.

5.5.5 Procedura d'incubazione

Come accennato in precedenza, in seguito al prelievo, l'inoculo microbico deve arrivare in laboratorio nel minor tempo possibile dove viene filtrato per la seconda volta, riposto in un recipiente provvisto di apposito dispenser ed immerso a bagnomaria per mantenere la temperatura di 39°C. Parallelamente, le parti del medium riducente ed ossidante (quest'ultima costituita da: *microminerali*, *macrominerali*, *tampone* e *resazurina*), preparate separatamente ed in tempi diversi, vengono versate in un unico contenitore, dotato di un apposito dosatore, ed immerso anch'esso a bagnomaria. Durante questa fase, sia l'inoculo che il medium, devono essere sottoposti ad un flusso di CO₂ in modo tale da mantenere le soluzioni in condizioni di anaerobiosi (cercando di evitare il gorgoglio che potrebbe influenzarne il pH).

Al momento dell'inoculazione, si procede estraendo dall'incubatore una giara per volta e, grazie ad un lavoro coordinato tra più operatori, si segue il seguente procedimento:

- Aprire l'incubatore, estrarre una giara, ancora priva di medium e inoculo, e rapidamente richiudere l'incubatore così da evitare la perdita di temperatura del sistema;
- Togliere il "modulo attivo" dalla giara, svitare il tappo, collegare la batteria, verificare al PC il livello di carica (cambiarla se non è carica) e richiudere il modulo;
- Tramite l'uso di dosatori distinti (in quanto nelle quattro incubazioni sono stati utilizzati i tre diversi tipi di liquido ruminale), procedere con l'inserimento del medium e dell'inoculo nella giara aperta. In questa fase è molto importante evitare schizzi di liquido sulle pareti della giara che possono portare particelle alimentari ad aderire sulla superficie vetrosa determinando quindi la loro esclusione dal processo di fermentazione;
- Avvitare del "modulo attivo" sulla giara e reinserirla all'interno della camera d'incubazione. In quest'ultimo passaggio è necessario evitare movimenti bruschi che possono scuotere eccessivamente il liquido all'interno della giara.

L'incubatore consente di mantenere la temperatura costante di 39°C, necessaria per uno sviluppo ottimale delle fermentazioni, fino al termine dell'incubazione (48 o 10 h).

5.6 Analisi fisico - chimiche

Ai fini del presente lavoro, in ogni incubazione si sono svolte le seguenti analisi fisico - chimiche:

- Misurazione del pH dei medium, dei liquidi ruminali pre-incubazione, di ciascuna miscela medium-liquido ruminale e dei liquidi di fermentazione post-incubazione;
- Analisi NDF secondo Van Soest (1991).

Alla chiusura dell'incubazione, ogni giara RF viene estratta dall'incubatore ed

immediatamente sottoposta alla misurazione del pH, dopo di che, privata del modulo attivo e richiusa tramite un apposito tappo in plastica, è riposta in cella frigo (-20°C) in maniera tale da bloccare il procedere ulteriore delle fermentazioni. Grazie alla conservazione in ambiente chiuso e a bassa temperatura, le analisi chimico-fisiche possono essere fatte anche in momenti successivi.

5.6.1 Misurazione del pH

La determinazione del pH va eseguita sui liquidi di fermentazione contenuti in ciascuna giara RF, immediatamente dopo la chiusura dell'incubazione. Tra una lettura e l'altra è importante eseguire un'accurata pulizia dell'elettrodo con H₂O distillata per evitare di inquinare le misure successive. Inoltre si deve misurare anche il pH del medium, del liquido ruminale e delle varie miscele tra i due prima dell'incubazione.

5.6.2 Analisi della fibra NDF

Il sistema detergente è stato ideato e perfezionato da Van Soest et al. (1991) per permettere una rapida determinazione della “fibra al detergente neutro”, ovvero la matrice insolubile della parete vegetale, andando a stimarne i maggiori componenti, sia quelli che vengono degradati (emicellulose e, in misura minore, cellulosa), sia i costituenti che rimangono inalterati (lignina).

Per la determinazione NDF è stato utilizzato il *Fibertech Analyzer (VELP®Scientifica)*. A tale scopo, i liquidi di fermentazione sono filtrati con crogioli porosi (40-100 µm di porosità) per separare la frazione liquida da quella solida costituita dagli alimenti indegradati e della massa microbica. Il materiale filtrato è sottoposto poi ad un trattamento con soluzione NDF secondo quanto indicato da Mertens (2002).

L'analisi dell' NDF è stata svolta sia sui campioni delle incubazioni a 48 h, che in quelli delle incubazioni a 10 h così da avere dei valori di riferimento di tutte e quattro le incubazioni.

5.7 Procedure di calcolo

5.7.1 Conversione dei dati di pressione (PSI) in volume di gas prodotto (ml)

I valori di pressione (PSI) registrati nel corso di ciascuna incubazione sono stati convertiti in volume ed espressi in ml di gas prodotto per g di sostanza secca incubata utilizzando l'equazione (0).

(0) conversione dati di pressione (PSI) in volume di gas prodotto:

$$GP = Pt * STB / [(1 + 1 / (To * T)) * (Po / (SS\% * SS_{camp}))]$$

Dove,

GP = Produzione di gas (ml);

Pt = Pressione al tempo t, PSI;

STB = Spazio di testa bottiglie = (volume bottiglia) – (volume medium);

To = Temperatura assoluta = 273,15°C;

T = Temperatura d'incubazione = 39°C;

Po = Pressione atmosferica = 14,66 PSI;

SS % = Percentuale di SS dei campioni;

SS camp = Quantità campione (dieta) incubato.

5.7.2 Fittaggio delle curve con il modello di Groot et al (1996)

Le cinetiche cumulative delle produzioni gassose (esprese in ml di gas prodotto per g di sostanza secca incubata) ottenute per ciascuna replicazione sono state corrette per il contributo dei bianchi e sono state fittate secondo il modello monofasico (1) (Groot et al., 1996).

Modello di Groot et al., 1996:

$$G_{(t)} = A / (1 + T_{1/2}^c / t^c)$$

Dove,

G = Produzione di gas per g di sostanza secca incubata al tempo t (ml/g SS);

A = Produzione di gas asintotica (ml/g SS);

c = Costante che esprime la pendenza della cinetica di fermentazione;

T_{1/2} = Tempo in cui si realizza la metà della produzione totale di gas (A);

t = Tempo (h).

5.7.3 Stima del valore energetico metabolizzabile con diverse tecniche

Utilizzando i dati di digeribilità (NDFd) e di produzione di gas (GP₂₄) delle due incubazioni a 48 h, è stato possibile stimare il valore di energia metabolizzabile (ME) delle diete applicando quattro differenti equazioni (2) (3) (4) (5) basate sulla composizione chimica delle diete stesse, più i dati di degradabilità della fibra (NDFd) misurata a 48 h di incubazione, in accordo con il sistema NRC (2001; ME_{NRC}), oppure di produzione di gas misurata a 24 h di incubazione, secondo due diverse equazioni, una proposta da Menke e Steingass (1988; MEMenke) e l'altra da Robinson et al. (2004; MEUCD).

a) Mediante la degradabilità NDF (g/kg SS) a 48 h:

$$(2) DE = (NDFd / 100 \times 4.2 + tdNFC / 100 \times 4.2 + tdPG / 100 \times 5.6 + tdFA / 100 \times 9.5 - 0.3) \times 4.184$$

Dove,

DE = Energia digeribile;

NDFd = digeribilità della Fibra al Detergente Neutro;

NFC = Carboidrati Non Fibrosi (Zuccheri, amido, glucani e pectine)

$$= 100 - (NDF + PG + LG + CEN);$$

tdNFC = Digeribilità Vera NFC;

tdPG = Digeribilità Vera PG;

FA = Acidi Grassi;

tdFA = Digeribilità Vera FA.

$$(3) ME_{NRC} \text{ (MJ/kg SS)} = [-0.45 \times 4.184 + 1.01 \times DE]$$

b) Mediante la produzione di gas *in vitro* (GP24, ml/g SS) a 24 h:

1) Menke e Steingass (1988)

$$(4) ME_{\text{Menke}} = 1.06 + 0.0314 \times GP24_{200} + 0.0084 \times PG + 0.0220 \times LG - 0.0081 \times CEN$$

Dove,

GP24₂₀₀ (ml/200 mg di SS incubata) = Gas Prodotto dopo 24 h di incubazione *in vitro*;

PG = Proteina grezza;

LG = Lipidi grezzi;

CEN = Ceneri.

Tutti i valori chimici sono espressi come g/kg SS;

Robinson et al. (2004)

$$(5) \text{ ME UCD} = 1.25 + 0.0292 \times \text{GP24} + [0.0143 \times (\text{PG} - \text{ADIPG})] + 0.0246 \times \text{LG}$$

Dove,

GP24 = Gas Prodotto dopo 24 h di incubazione *in vitro*;

PG = Proteina Grezza ;

ADIPG = proteina grezza insolubile al detergente acido;

LG = Lipidi grezzi.

5.7.4 Calcolo della digeribilità vera della sostanza secca

La digeribilità vera della sostanza secca viene convenzionalmente abbreviata con la sigla inglese TDMd che sta per vera sostanza secca digerita ed è stata calcolata, in entrambe le incubazioni, come percentuale applicando la seguente formula (6):

$$(6) \text{ TDMd (\%)} = ((\text{SS} - \text{NDF res}) / \text{SS}) * 100$$

Dove,

SS = Sostanza secca;

NDF res = NDF residua, ovvero la frazione insolubile della parete vegetale resistente al trattamento NDF, che tuttavia risulta contaminata da altri composti non di natura fibrosa.

5.8 Analisi statistica

I valori di pH, di degradabilità, produzione di gas ed energia metabolizzabile, sono stati sottoposti ad analisi della varianza utilizzando il pacchetto statistico SAS (2007). Il modello statistico utilizzato considerava la dieta, il liquido ruminale, la relativa interazione, e il momento di prelievo del liquido ruminale (pre o post-pasto) come fattori di variazione.

6 RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1 Dati di degradabilità, produzione di gas, e di valore energetico dei liquidi di fermentazione contenenti liquido ruminale raccolto prima (pre-) o dopo (post-) il pasto.

Come si vede dai dati, riferiti alla GP, l'incubazione di liquido ruminale raccolto dopo il pasto degli animali ha determinato valori di produzione di gas maggiori rispetto ai corrispettivi campioni contenenti liquido ruminale di animali tenuti a digiuno (256 vs. 288 ml per i campioni pre e post-pasto, rispettivamente). La differenza in termini di produzione di gas osservata tra le due tipologie di campione (circa 30 ml) potrebbe essere attribuita, almeno in parte, alla presenza di substrato alimentare nel liquido ruminale prelevato post-pasto, il quale, a seguito delle fermentazioni *in vitro*, ha generato una produzione di gas che è andata a sommarsi al gas prodotto dalla dieta incubata. Tale fenomeno è chiaramente dimostrato dall'elevata produzione di gas evidenziata dai bianchi (bottiglie senza campione alimentare) contenenti liquido ruminale prelevato post-pasto, i quali hanno prodotto circa 30 ml di gas in più rispetto ai bianchi contenenti liquido ruminale prelevato da animali tenuti a digiuno (28 vs. 57 ml, per il liquido ruminale raccolto prima e dopo del pasto, rispettivamente). L'utilizzo di liquido ruminale prelevato dopo il pasto comporta inoltre una maggiore variabilità dei dati (DS = $\pm 48,7$, $\pm 56,7$, $\pm 61,1$ ml rispettivamente a $t_{1/2}$, 24 e 48 h, per i dati pre-pasto; $\pm 51,7$, $\pm 69,3$, e $\pm 90,3$ ml, rispettivamente, per i dati post-pasto a $t_{1/2}$, 24, e 48 h). Tale risultato era atteso, dal momento che, con ogni probabilità, gli animali donatori, nel periodo antecedente il prelievo del liquido ruminale, hanno avuto una diversa ingestione alimentare, pertanto la quantità di alimento presente all'interno del loro ruminale al momento del prelievo non era omogenea. Poiché il livello di ingestione alimentare tra animali diversi risulta difficilmente uniformabile, si preferisce effettuare il prelievo di liquido ruminale da animali tenuti a digiuno, per avere una maggiore standardizzazione del liquido di fermentazione e ridurre la variabilità dei risultati ottenuti. L'efficacia di tale metodica è dimostrata dalla minore variabilità che caratterizza i campioni pre-pasto (DS = $\pm 48,7$, $\pm 56,7$, $\pm 61,1$ ml, per i dati pre-pasto a $t_{1/2}$, 24 e 48 h,

rispettivamente). Similmente, anche nelle incubazioni bloccate a t $\frac{1}{2}$ la produzione di gas è risultata inferiore nei campioni pre-pasto (229 vs. 340 ml per i campioni pre e post-pasto, rispettivamente). Anche in questo caso i campioni pre-pasto hanno evidenziato una minore variabilità rispetto a quelli post-pasto (DS = $\pm 42,6$ vs. $\pm 73,2$ ml, per i campioni di liquido ruminale raccolti prima e dopo il pasto, rispettivamente). Tuttavia in questo caso la differenza tra le due tipologie di campione era meno accentuata, dal momento che i campioni raccolti a t $\frac{1}{2}$, ovvero in una fase ancora iniziale dell'incubazione, sono generalmente caratterizzati da una maggiore variabilità rispetto ai residui della fermentazione raccolti a 48 h, che è un tempo di incubazione più prolungato in corrispondenza del quale i campioni tendono, sostanzialmente, ad una maggiore uniformità. Per quanto riguarda la degradabilità dell'NDF i valori pre e post-pasto sono risultati simili fra loro (53,4% vs. 55,8% di NDFd, per i campioni raccolti pre e post-pasto, rispettivamente). Anche per la digeribilità vera della sostanza secca (TDMD) i dati pre e post-pasto sono simili fra loro (86,2% vs. 86,9% di TDMD, per i campioni raccolti pre e post-pasto, rispettivamente).

Tabella 8. Valori di produzione di gas (GP), degradabilità dell’NDF (NDFd), digeribilità vera della sostanza secca (TDMD), e di energia metabolizzabile (EM, MJ/kg SS) misurati a T½ oppure a 48 h di incubazione, usando liquido ruminale prelevato prima o dopo il pasto

Tempo	Prelievo	GP t½ , ml/g SS incubata	GP24, ml/g SS incubata	GP48, ml/g SS incubata	NDFd, %	TDMD, %	ME_Menke, MJ/kg SS	ME_UCD, MJ/kg SS	ME_NRC, MJ/ kg SS
T½									
Bottiglie con campioni									
	Pre	229±42.6		-	31.1±6.4	79.8±2.2	-	-	-
	Post	340±73.2		-	27.5±5.3	78.1±2.0	-	-	-
Bianco									
	Pre	37±26.3							
	Post	156±32.5							
48 h									
Bottiglie con campioni									
	Pre	256±48.7	379±56.7	439±61.1	53.4±5.7	86.2±1.6	14.5±1.78	15.0±1.64	13.1±0.25
	Post	288±51.7	403±69.3	483±90.3	55.8±5.6	86.9±1.6	15.8±1.22	16.1±1.13	13.2±0.25
Bianco									
	Pre	28±7.5	33±13.8	40±16.2					
	Post	57±25.0	81±44.8	87±31.8					

La prima equazione utilizza il metodo di Menke e Steingass (1988), che si avvale di due equazioni una adatta ai foraggi ed una seconda adatta ai concentrati. Nel nostro lavoro abbiamo usato la formula indicata per i concentrati in quanto risulta idonea anche per le diete. In particolare questo metodo usa i valori di GP a 24 ore e alcuni dati dell’analisi chimica dei campioni come proteina grezza, lipidi grezzi e ceneri.

La seconda equazione utilizza il metodo UCD (Robinson et al. 2004) usa i valori di GP e alcuni dati dell’analisi chimica dei campioni come proteina grezza, ADICP (proteina grezza insolubile al detergente acido) e i lipidi grezzi.

Queste prime due equazioni forniscono valori simili con alimenti o diete poco proteiche mentre se il contenuto proteico è maggiore i risultati sono discordanti perché le due equazioni attribuiscono un valore energetico differente alla frazione proteica. Infatti, l’equazione proposta da Menke e Steingass (1988) attribuisce alla proteina un valore energetico (espresso come energia metabolizzabile) pari a 0,84 MJ per 100 g di proteina su un Kg di sostanza secca, mentre nella seconda la PG

viene moltiplicata per 1,43 MJ di energia metabolizzabile per 100 g di proteina su un Kg di sostanza secca. Questa differenza potrebbe essere dovuta al fatto che l'equazione di Robinson et al. (2004) è stata costruita a partire da un database ricco di alimenti proteici, mentre quella proposta da Menke e Steingass (1988) è stata costruita utilizzando un database che comprendeva principalmente foraggi e concentrati con un basso contenuto di proteine.

La terza equazione utilizza il metodo NRC (2001) ed usa, invece della GP a 24 ore, i valori di degradabilità dell'NDF a 48 ore e alcuni componenti chimici degli alimenti come NFC (carboidrati non fibrosi), FA (acidi grassi) e la digeribilità vera di proteine, carboidrati e lipidi.

I valori energetici ottenuti applicando l'equazione NRC (2001), basata sulla degradabilità della fibra (NDFd) misurata a 48 h, sono risultati più bassi rispetto a quelli ottenuti usando le due equazioni basate sulla GP misurata a 24 h di incubazione. La discordanza esistente tra le tre equazioni di stima del valore energetico dimostra chiaramente che la degradabilità e la produzione di gas non sono variabili direttamente correlate tra loro, come invece viene talvolta indicato in bibliografia. Infatti, come riportato nell'introduzione della presente tesi, la degradazione delle diverse componenti chimiche (carboidrati strutturali e non, lipidi e proteine) di una matrice alimentare non fornisce la stessa produzione di gas. A dimostrazione di ciò Cone e Van Gelder (1999) osservarono che la fermentazione di una fonte proteica (caseina) produceva solo il 32%, in volume, del gas prodotto dalla fermentazione di carboidrati. Gli stessi Autori hanno attribuito questo effetto al fatto che la degradazione delle proteine determina la formazione di ammoniaca che, comportando un aumento del pH del liquido di fermentazione, ha un effetto inibitorio sul rilascio del gas, poiché aumenta anche la solubilità di una frazione del gas (in particolare CO₂) nel liquido stesso.

6.2 Effetto della dieta e del liquido ruminale sui valori di degradabilità e di produzione di gas ottenuti *in vitro*, e sulle stime di valore energetico

Nel presente paragrafo verranno presentati e discussi solo i dati ottenuti nelle due incubazioni che sono state condotte utilizzando liquido ruminale prelevato da animali tenuti a digiuno dalla sera prima (dati pre-pasto). Infatti, come descritto in precedenza, tutti i dati (degradabilità, produzione di gas, valore energetico) ottenuti nelle due incubazioni condotte con liquido ruminale raccolto 2 ore dopo il pasto (dati post-pasto) sono risultati altamente variabili e fortemente viziati dalla presenza di particelle alimentari nel liquido ruminale. La presenza di questi residui alimentari nel liquido di fermentazione rende confuso l'effetto "dieta", poiché è impossibile distinguere la degradabilità e la produzione di gas generate dalla fermentazione della dieta incubata da quelle imputabili alla fermentazione delle particelle di alimento apportate dal liquido ruminale.

Nella tabella seguente sono riportati i dati misurati di GP (a T $\frac{1}{2}$, a 24 h e a 48 h), NDF, TDMD e il valore energetico metabolizzabile (Menke, UCD e NRC) riferiti alle tre diete e ai tre liquidi ruminali. Questi dati sono riferiti ai campioni contenenti liquido ruminale prelevato prima dei pasti poiché i risultati sono meno variabili, più ripetibili (minore variabilità entro incubazione) e più riproducibili (minore variabilità tra incubazioni). Si considerano solo i dati relativi all'effetto causato dalle tre diete e dai tre liquidi ruminali, poiché l'interazione tra dieta e liquido ruminale non è mai risultata significativa ($P > 0.05$).

Tabella 9. Effetto delle diete (TR = tradizionale, LO= ipoproteica, NU= nutraceutica) e dei tre liquidi ruminali (TR = tradizionale, LO= ipoproteica, NU= nutraceutica) sulla produzione di gas (GP), sulla degradabilità dell’NDF (NDFd), sulla degradabilità della sostanza secca (digeribilità vera della sostanza secca) e sull’energia metabolizzabile (ME; MJ/kg SS).

	Dieta			Liquido			SEM
	TR	LO	NU	TR	LO	NU	
T½							
GP , ml/g SS incubata	181	185	186	186	197	170	8.6
NDFd, %	44.4	40.8	37.7	37.7 ^b	46.2 ^a	39.0 ^b	1.88
TDMD, %	83.3	82.8	82.3	81.5 ^b	85.0 ^a	81.9 ^b	0.75
48 h							
GP t ½ , ml/g SS incubata	185	197	184	228 ^A	211 ^A	127 ^B	5.2
GP24, ml/g SS incubata	293	312	297	323 ^A	306 ^A	272 ^B	7.6
GP 48, ml/g SS incubata	338	357	335	367 ^A	341 ^{AB}	322 ^B	8.3
NDFd, %	59.3 ^A	54.2 ^{AB}	51.6 ^B	65.4 ^A	53.6 ^B	46.2 ^C	1.45
TDMD, %	87.8 ^A	86.5 ^{AB}	85.7 ^B	89.7 ^A	86.2 ^B	84.0 ^C	0.43
ME_Menke, MJ/kg SS	11.8	12.4	12.2	12.8 ^A	12.3 ^A	11.2 ^B	0.24
ME_UCD, MJ/kg SS	12.5	12.8	12.7	13.3 ^A	12.9 ^A	11.9 ^B	0.22
ME_NRC, MJ/kg SS	13.2	13.1	13.2	13.7 ^A	13.1 ^B	12.7 ^C	0.07
NDFd_NRC, %	54.8	54.2	54.2	-	-	-	-
ME_NRC_tab, MJ/kg SS	12.9	13.2	13.5	-	-	-	-

Nell’incubazione condotta a T½ né la dieta né il liquido ruminale hanno influenzato significativamente la produzione di gas (P>0.05). Come riportato in tabella 9, la produzione di gas non è risultata significativamente diversa (P>0.05) nelle 3 diete, con valori di 181, 185, e 186 ml rispettivamente per la dieta TR (tradizionale), LO (ipoproteica) e NU (nutraceutica). I valori di TDMD a T½ sono conseguenti ai valori di NDF con tendenza ad una bassa variabilità. I valori dell’NDF riguardanti i tre liquidi ruminali a T½ sono simili nei liquidi TR e NU, mentre il liquido LO ha fornito valori leggermente più alti (37,7, 46,2, e 39,0% per la dieta TR, LO e NU; rispettivamente; P<0.05). Questi valori hanno un andamento variabile rispetto a quelli delle tre diete poiché ci sono tre liquidi diversi, inoltre dopo 10 ore la fermentazione è appena iniziata e quindi è molto

variabile. Come per le diete, anche per i tre liquidi ruminali i valori di TDMD seguono l'andamento dei valori di NDFd.

Nell'incubazione a 48 h le tre diete sono state caratterizzate da una produzione simile di gas (338, 357, e 335 ml rispettivamente per la dieta TR, LO e NU; $P>0.05$). Anche a tempi di incubazione intermedi (10 e 24 h), la produzione di gas non è risultata significativamente diversa nelle tre diete ($P>0.05$). Viceversa, i tre liquidi ruminali hanno fornito cinetiche di produzione di gas significativamente differenti. In particolare il liquido di fermentazione ottenuto da vitelloni alimentati con la dieta nutraceutica (NU) ha evidenziato produzioni di gas costantemente più basse rispetto agli inoculi TR e LO, sia a 10 (228, 211, e 127 ml, per la dieta TR, LO e NU, rispettivamente; $P<0.01$), che a 24 (323, 306, e 272 ml, nello stesso ordine riportato in precedenza; $P<0.01$) che a 48 h di incubazione (367, 341, e 322 ml, nello stesso ordine; $P<0.01$). Questa differenza è dovuta al fatto che la popolazione batterica dei vari liquidi si è adattata in maniera diversa alle tre diete. Nel caso specifico del liquido ruminale pre-adattato alla dieta NU, la minore produzione di gas potrebbe essere ricondotta ad una minore attività microbica dell'inoculo microbico, probabilmente dovuta ad un parziale effetto inibitorio esercitato dai lipidi presenti nella dieta (integrazione con semi di lino estruso) sui batteri ruminali, con particolare riferimento a quelli ad azione cellulolitica. Viceversa, gli inoculi TR e LO non hanno evidenziato differenze significative tra loro, indipendentemente dal tempo di incubazione. A 48 h di incubazione le tre diete hanno evidenziato una diversa degradabilità della frazione NDF (59,3, 54,2, e 51,6 % per la dieta TR, LO e NU, rispettivamente; $P<0.01$). Questa differenza può essere dovuta alla maggior presenza, dal 3,3 al 5,5 %, di lipidi nella dieta. Tuttavia è bene precisare che tale tenore lipidico (5,5%), sebbene rappresenti un valore superiore a quello mediamente impiegato nel razionamento delle bovine da latte (che si attesta intorno al 3-4%), non supera comunque la soglia del 6-7% che è ritenuta dannosa per il corretto andamento delle fermentazioni ruminali.

I valori di NDFd misurati a 48 h per i liquidi ruminali hanno andamento simili a quelli delle tre diete ed in particolare un valore maggiore per la dieta TR, un valore intermedio per la dieta LO ed un valore significativamente più basso per la

dieta NU (65,4, 53,6, e 46,2% rispettivamente per la dieta TR, LO e NU). I valori di TDMD hanno evidenziato il medesimo andamento osservato per i valori di NDFd, sia in riferimento alle diete che ai diversi inoculi microbici.

I valori di energia metabolizzabile delle tre diete calcolati con le equazioni basate sulla GP misurata a 24 h di incubazione (Menke e Steingass,1988; Robinson et al., 2004) non presentavano differenze significative ($P>0.05$). Viceversa, i valori forniti dai tre liquidi ruminali hanno messo in luce differenze significative; nello specifico, quando le diete sono state incubate con i liquidi ruminali TR e LO, i valori energetici sono risultati significativamente più elevati rispetto a quando sono stati incubati con l'inoculo ottenuto dai 3 vitelloni alimentati con la dieta NU [12,8, 12,3 e 11,2 MJ/kg SS, rispettivamente per i liquidi TR, LO e NU, calcolati con l'equazione di Menke e Steingass (1988); 13,3, 12,9 e 11,9 MJ/kg SS, rispettivamente per i liquidi TR, LO e NU, calcolati con l'equazione di Robinson et al. (2004)].

I valori di energia metabolizzabile delle 3 diete derivati dall'equazione NRC (2001), basata sulla degradabilità della fibra (NDFd) misurata a 48 h di incubazione, non sono risultati significativamente diversi ($P>0.05$), ma sono risultati maggiori ($P>0.05$) rispetto ai valori ottenuti con le due equazioni basate sulla GP. A tal proposito, Vermorel e Coulon (1998) hanno evidenziato che, a parità di alimento, di composizione chimica e di digeribilità, l'impiego di diverse equazioni per la stima del valore energetico determina una notevole variabilità nei valori finali ottenuti, come osservato nel presente lavoro di tesi. I valori calcolati con l'equazione del sistema NRC (2001), ma riferiti ai tre liquidi ruminali, presentano variazioni significative; nello specifico, le diete incubate con il liquido ruminale prelevato dai vitelloni alimentati con la dieta TR, hanno fornito i valori maggiori, quelle incubate con l'inoculo LO hanno fornito valori intermedi, mentre i valori energetici più bassi sono emersi incubando le 3 diete con il liquido ruminale ottenuto dagli animali alimentati con il liquido NU.

Infine è interessante notare che il sistema NRC (2001) stima per le tre diete un valore molto simile di degradabilità dell'NDF (54,8; 54,2; e 54,2 rispettivamente per la dieta TR, LO e NU), diversamente da quanto misurato *in vitro*, dove invece

sono emerse differenze significative tra le tre diete (59,3 %, 54,2 %, e 51,6 % rispettivamente per la dieta TR, LO e NU ; $P < 0.01$). Tale risultato è dovuto al fatto che il sistema NRC (2001) stima la degradabilità teorica dell'NDF di un alimento/dieta sulla base del suo contenuto in lignina e in NDICP (proteina grezza insolubile al trattamento con la soluzione NDF). Dal momento che queste due componenti erano presenti in quantità simili nelle tre diete, la degradabilità teorica della frazione fibrosa risulta essere comparabile nelle diete stesse.

7 CONCLUSIONI

L'analisi dei risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi consente di trarre le seguenti conclusioni:

- L'utilizzo di liquido ruminale prelevato prima del pasto, quindi da animali tenuti a digiuno dalla sera prima, appare essere una scelta conveniente rispetto all'impiego di liquido ruminale raccolto da animali che abbiano mangiato. In quest'ultimo caso, infatti, la presenza di particelle alimentari nel liquido (che peraltro varia fortemente da soggetto a soggetto, in funzione di quanto alimento l'animale ha ingerito prima del prelievo) influenza notevolmente i valori di degradabilità e di produzione di gas ottenuti dalle fermentazioni *in vitro*, aumentandone la variabilità. Inoltre, quando viene incubato liquido ruminale raccolto dopo il pasto, risulta di fatto impossibile distinguere la produzione di gas dovuta, rispettivamente, alla fermentazione della dieta incubata (oggetto di studio) e delle particelle alimentari apportate invece dal liquido ruminale (facenti parte della dieta assunta dall'animale prima del prelievo).
- L'effetto della dieta sui valori di degradabilità e di produzione di gas è stato complessivamente minore di quello imputabile all'inoculo microbico. Il forte effetto esercitato dal liquido ruminale dimostra che la dieta somministrata all'animale donatore rappresenta la principale fonte di variabilità dei valori ottenuti dalle fermentazioni *in vitro*, in quanto essa influenza direttamente la composizione della popolazione microbica. Tuttavia andrebbero condotti studi appositi per verificare l'entità di queste modificazioni sulla popolazione microbica.

8 BIBLIOGRAFIA

ANKOM Technology. www.ankom.com: ultima consultazione febbraio 2013; Method 6 4/13/11 - Neutral Detergent Fiber in Feeds Filter Bag Technique (For A200, A200I)

Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., 2006. Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola Oil. *J. Anim. Sci.* 84:1489-1496

Blümmel, M., Ørskov, E.R., 1993. Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughage in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 40, 109-119

Bryant, M.P., Burkey, L.A., 1953. Cultural methods and characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *J. Dairy Sci.* 36:205-217

Cone, J.W., Van Gelder, A.H., Visscher, G.J.W., Oudshoorn, L., 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim. Feed Sci. Technol.* 61:113-128

Cone, J.W., van Gelder, A.H., 1999. Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Anim. Feed Sci. Technol.* 76:251-264

Cozzi, G., Ragno, E., 2003b. Meat production and market in Italy. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 68:71-77

Cozzi, G. 2007. Present situation and future challenges of beef cattle production in Italy and the role of the research. *Ital. J. Anim. Sci.* 6 (Suppl. 1):389-396

Cronjé, P.B., 1992. Effects of dietary roughage: concentrate ratio and rumen ammonia concentration on *in situ* feedstuff degradation in the rumen of sheep. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 22, 207-213

Eugène, M., Martin, C., Mialon, M.M., Krauss, D., Renand, G. & Doreau, M. 2011. Dietary linseed and starch supplementation decreases methane production of fattening bulls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167:330-337

FAO, 2013. Mitigation of Greenhouse gas emission in Livestock Production. Editors Pierre J. Gerber, Benjamin Henderson and Harinder P.S. Makkar

Gerber, P., MacLeod, M., Opio, C., Vellinga, T., Falcucci, A., Weiler, V., Tempio, G., Gianni, G., Dietze, K., 2012. Greenhouse gas emissions from livestock food chains: a global assessment. Bratislava, EAAP

Goering, M.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). In: Agricultural Handbook, No. 379. Agricultural Research Services, USDA, Washington, DC

Groot, J.C.J, Cone, J.W., Williams, B.A., Debersaques, F.M.A, Santiago, E.A., 1996. Multiphasic on gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 64:77-89

Hungate, R.E., 1966. The Rumen and Its Microbes. Academic Press, New York, USA, pp. 533.

ISMEA, 2006. Il mercato della carne bovina. Franco Angeli, Milano, Italy

Lindberg, J.E., Knutsson, P.G., 1981. Effect of bag pore size on the loss of particulate matter and on the degradation of cell wallfibre. Agriculture and Environment 6:171-182

Kitessa, S., Flinn, P.C., Irish, G.G., 1999. Comparison of methods used to predict *in vivo* digestibility of feeds in ruminants. Australian Journal of Agricultural Research 50:825-841

Makir, L.R., Foster, E.M., 1957. Effect of roughage in the bovine ration on types of bacteria in the rumen. J. Dairy Sci. 40:905-913

Martin, C., Rouel, J., Jouany, J.P., Doreau, M. & Chilliard, Y. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. J. Anim. Sci. 86:2642-2650

Mauricio, R.M., Mould, F.L., Dhanoa, M.S., Owen, Channa, K.S., Theodorou, M.K., 1999. A semiautomated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuffs evaluation. Anim. Feed. Sci. Technol. 79:321-330

- Menke, K., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz D., Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. Journal of Agriculture Science. (Camb.) 93:217-222
- Menke, K.H., Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Anim. Res. Dev. 28:7-55
- Mertens, D.R., 2002. Gravimetric Determination of Amylase-Treated Neutral Detergent Fiber in Feeds with Refluxing in Beakers or Crucibles: Collaborative Study. Journal of AOAC International. 85:1217-1239
- Mould, F.L., Kliem, K.E., Morgan, R., Mauricio, R.M., 2005. *In vitro* microbial inoculum: a review of its function and properties. Anim. Feed Sci. Technol. 123–124:31–50
- NRC, 2001. National Research Council, Nutrient Requirements of Dairy Cattle, seventh ed. National Academy Press, Washington, DC, USA
- Pell, A.N., Schofield, P., 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. J. Dairy Sci. 76:1063-1073
- Popova, M., Martin, C., Eugène, M., Mialon, M.M., Doreau, M. & Morgavi, D.P. 2011. Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic Archaea diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. Anim. Feed Sci. Technol. 166: 113–121
- Pulina, G., Dias Francesconi, A.H., Mele, M., Ronchi, B., Stefanon, B., Sturaro, E., Trevisi, E., 2011. Sfamare un mondo di nove miliardi di persone: le sfide per una zootecnia sostenibile. Ital J. Agron. 6(Suppl.2): e 7
- Quin, J.I., Van der Wath, J.B., Myburg, S., 1938. Studies on the alimentary tract of Merino sheep in South Africa. IV. Description of experimental technique. Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind. 11(2):341-360
- Raun, N.S., Burroughs, W., 1962. Suction strainer technique in obtaining rumen fluid samples from intact lambs. J. Anim. Sci. 21:454–457

Rymer, C., Huntington, J.A., Williams, B.A., Givens, D.I., 2005. *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124:9–30

Robinson, P.H., Givens, D.I., Getachew, G., 2004. Evaluation of NRC, UC Davis and ADAS approaches to estimate the metabolizable energy values of feeds at maintenance energy intake from equations utilizing chemical assays and *in vitro* determinations. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114:75–90

Sargentini, C., Giorgetti, A., Bozzi, R., Lorenzini, G., Pérez Torrecillas, C., Martini, A., 2005. “Performance produttive di vitelli Maremmani allevati secondo il metodo biologico e macellati a 19 e 23 mesi di età” *Atti 4th World Italian Beef Cattle Congress, Gubbio April 29th – May 1st*, pp. 383-388

SAS® User’s Guide: Statistics, version seventh ed. 2007. SAS Institute, Cary, NC, USA

Tagliapietra, F., Cattani, M., Hindrichsen, I.K., Hansen, H.H., Colombini, S., Bailoni, L., Schiavon, S., 2012. True dry matter digestibility of feeds evaluated *in situ* with different bags and *in vitro* using rumen fluid collected from intact donor cows. *Anim. Prod. Sci.* 52:338-346

Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:185-197

Tilley, J.M.A., Terry, R.A., 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grass; Soc.* 18:104–111

Thorley, C.M., Sharpe, M.E., Bryant, M.P., 1968. Modification of the rumen bacterial flora by feeding cattle ground and pelleted roughage as determined with culture media with and without rumen fluid. *J. Dairy Sci.* 51:1811-1816

Van Soest, P.J., 1994. *Nutritional Ecology of Ruminants*, 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597

Vanzant, E.S., Cochran, R.C., Titgemeyer, E.C., 1998. Standardisation of *in situ* techniques for ruminant feedstuff evaluation. *J. Anim. Sci.* 76:2717–2729

Vermorel, M., Coulon, J.B., 1998. Comparison of the National Research Council energy system for lactating cows for European systems. *J. Dairy Sci.* 81:846-855

9 SITOGRAFIA

ISMEA, 2001. <http://www.ismea.it>

Office National Interprofessionnel De L'élevage Et De Ses Productions 2007.

<http://www.office-elevage.fr/statistiques/> chiffres-05/union/Bov_Ue2.pdf