



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse naturali e Ambiente
Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE ANIMALI

TESI DI LAUREA

IMPIEGO DELLA GAS PRODUCTION TECHNIQUE (GPT) PER LA VALUTAZIONE DELL'EFFETTO SULLA PRODUZIONE DI METANO E SUI PARAMETRI DI FERMENTAZIONE RUMINALE DI CINQUE ADDITIVI IN DIFFERENTI DOSAGGI

Use of the gas production technique (GPT) to evaluate the effect on methane production and rumen fermentation parameters of five additives in different dosages

Relatore:

Emiliano Raffrenato

Correlatore:

Lucia Bailoni

Laureanda:

Anna Bolognese

Matricola n. 2007130

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

INDICE

RIASSUNTO	3
ABSTRACT	4
1 INTRODUZIONE.....	5
1.1. Il rumine.....	5
1.2. Microorganismi del rumine.....	6
1.3. Le fermentazioni ruminali.....	8
1.3.1. Carboidrati.....	9
1.3.2. Proteine.....	11
1.3.3. Lipidi.....	13
1.4. Emissioni degli allevamenti.....	14
1.4.1. Metano.....	15
1.5. Strategie per la mitigazione del metano nei ruminanti.....	15
1.5.1. Impiego di additivi.....	16
2. OBIETTIVO DELLA TESI.....	18
3. MATERIALI E METODI	19
3.1. Disegno sperimentale e procedura preparatoria.....	19
3.1.1. Il sistema GPT.....	22
3.1.2. Piano sperimentale.....	23
3.2. Dieta unifeed.....	24
3.3. Additivi.....	25
3.4. Soluzione buffer.....	26
3.5. Liquido ruminale.....	28
3.6. Incubazione.....	28
3.7. I controlli sperimentali.....	29
3.7.1. Prelievo del metano.....	30
3.7.2. Misurazione del pH.....	30
3.7.3. Digeribilità della sostanza secca.....	31
4. RISULTATI	35
4.1. Digeribilità in vitro della sostanza secca.....	36
4.2. Produzione di gas.....	37
5. DISCUSSIONE	41
6. CONCLUSIONI.....	42
7. BIBLIOGRAFIA	43
8. SITOGRAFIA.....	44

RIASSUNTO

Lo scopo di questo esperimento era identificare i livelli di dose ottimali di cinque additivi per ridurre la produzione di metano senza causare cambiamenti negativi nella fermentazione ruminale. Dosi crescenti di cinque additivi (A, B, C, D, E) sono state testate in due cicli consecutivi utilizzando il sistema di produzione di gas in vitro ANKOM. I flaconi (250 ml) sono stati riempiti con 1 g di substrato (dieta per bovine in fine lattazione/ inizio asciutta) e 150 ml di liquido ruminale tamponato. Gli additivi sono stati aggiunti in differenti dosi. Il substrato (unifeed) incubato era una miscela di: pascolo, fieno di prato stabile, insilato di erba, miscela mais/orzo, soia f.e., girasole f.e., melasso, germolino. Al termine di ciascuna incubazione, i campioni di gas sono stati raccolti dallo spazio di testa della bottiglia e analizzati per CH₄. I fluidi di fermentazione sono stati analizzati per la digeribilità della sostanza secca (DMD) e il pH. In questo sistema in vitro, nessuno degli additivi testati ha causato alcun effetto significativo sulla produzione totale di gas o metano. Gli additivi hanno complessivamente diminuito la digeribilità della dieta.

ABSTRACT

The aim of this experiment was to identify optimum dose levels of five additives to decrease methane production without causing adverse changes in ruminal fermentation. Increasing doses of five additives (A, B, C, D, E) were tested in two consecutive runs using the ANKOM in vitro gas production system. Bottles (250 ml) were filled with 1 g of substrate (diet for cows at the end of lactation/ beginning dry period) and 150 ml of buffered rumen fluid. Additives were then added in different doses. Substrate (unifed) incubated was a mixture of: pasture, stable meadow hay, grass silage, corn/barley mixture, soya bean meal, sunflower meal, molasses, sprout. At the end of each incubation, gas samples were collected from bottle headspace and analyzed for CH₄. Fermentation fluids were analyzed for dry matter digestibility (DMD) and pH. In this in vitro system, none of the tested additives caused any significant effect on total gas production or methane production. The additives overall decreased the digestibility of the diet.

1 INTRODUZIONE

Le vacche da latte nel mondo sono circa 265 milioni, di razze diverse, con una produzione totale nel 2020 di circa 906 milioni di tonnellate di latte.

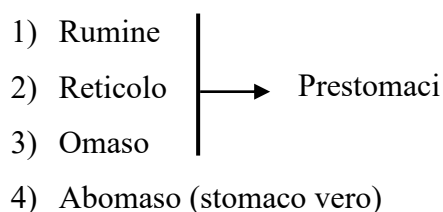
La differenza sostanziale rispetto agli anni passati è la presenza di meno allevamenti, ma più grandi, in cui sono state introdotte nuove tecnologie e pratiche che hanno consentito l'aumento della produttività per animale e quindi per allevamento (Medeiros et al. 2022).

Le nuove pratiche e tecnologie riguardano la routine di mungitura, le pratiche di alimentazione, la selezione, la concezione della stalla e i programmi di gestione della salute. Tutti questi accorgimenti e questi aspetti hanno portato inevitabilmente a dei cambiamenti negli allevamenti. Nei grandi centri di produzione (es. continente europeo, americano e Cina) si è assistito al completo passaggio dai tradizionali sistemi di produzione al pascolo verso sistemi di produzione al chiuso e quindi da sistema estensivo a sistema intensivo (Medeiros et al. 2022).

Uno dei problemi sostanziali degli allevamenti intensivi è l'inquinamento e l'impatto ambientale dovuto alla produzione di gas serra quali metano e anidride carbonica, prodotti a livello enterico dal metabolismo dei bovini. Quindi, ridurre l'impatto ambientale causato dalla produzione di metano ruminale dei ruminanti è diventato uno degli obiettivi più tipici della nutrizione animale negli ultimi anni.

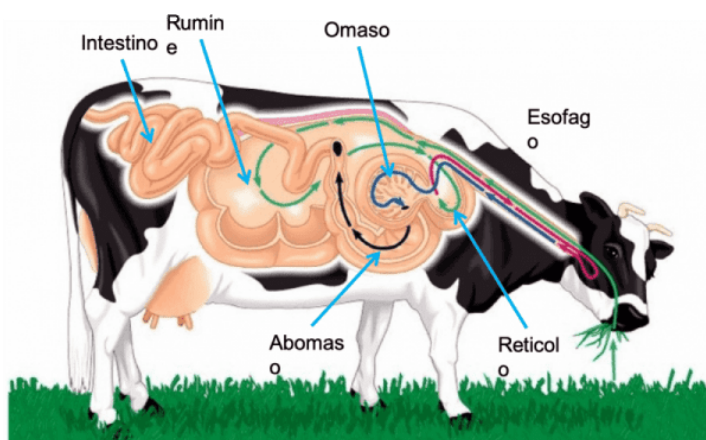
1.1. Il rumine

Nei ruminanti, l'alimento, prima di raggiungere l'intestino passa per quattro cavità:



L'apparato digerente del bovino è riportato nell'immagine 1.

Immagine 1. Apparato digerente di un bovino



Il rumine è paragonabile a un 'fermentatore' che lavora al meglio in condizioni di anaerobiosi con temperature e pH costanti; ha funzione di stoccaggio, parziale demolizione degli alimenti e, ad opera dei microorganismi che ospita al suo interno, permette una trasformazione quantitativa e qualitativa dei principi alimentari (Betti e Pacchioli, 1996).

L'alimento trasformato passa all'omaso solo quando, dopo l'azione meccanica e l'attività dei microorganismi, raggiunge dimensioni inferiori a 0,6 cm circa; alcuni composti invece (70-80% degli acidi grassi volatili) passano direttamente nel sangue dal rumine grazie alle papille, estroflessioni presenti sulla sua parete (Betti e Pacchioli, 1996).

Nei ruminanti la disgregazione dell'alimento avviene in più riprese in bocca e, inoltre, a essa contribuisce il rumine grazie ai microorganismi presenti che scompongono i principi alimentari per trarre energia e produrre sostanze utili per l'animale. Essi stessi diventano inoltre 'alimento' per il ruminante (Betti e Pacchioli, 1996).

1.2. Microorganismi del rumine

Le specie e i ceppi batterici del rumine sono numerosi, per cui risulta più semplice classificarli in base alla loro attività principale (Betti e Pacchioli, 1996).

I batteri nel rumine si classificano in:

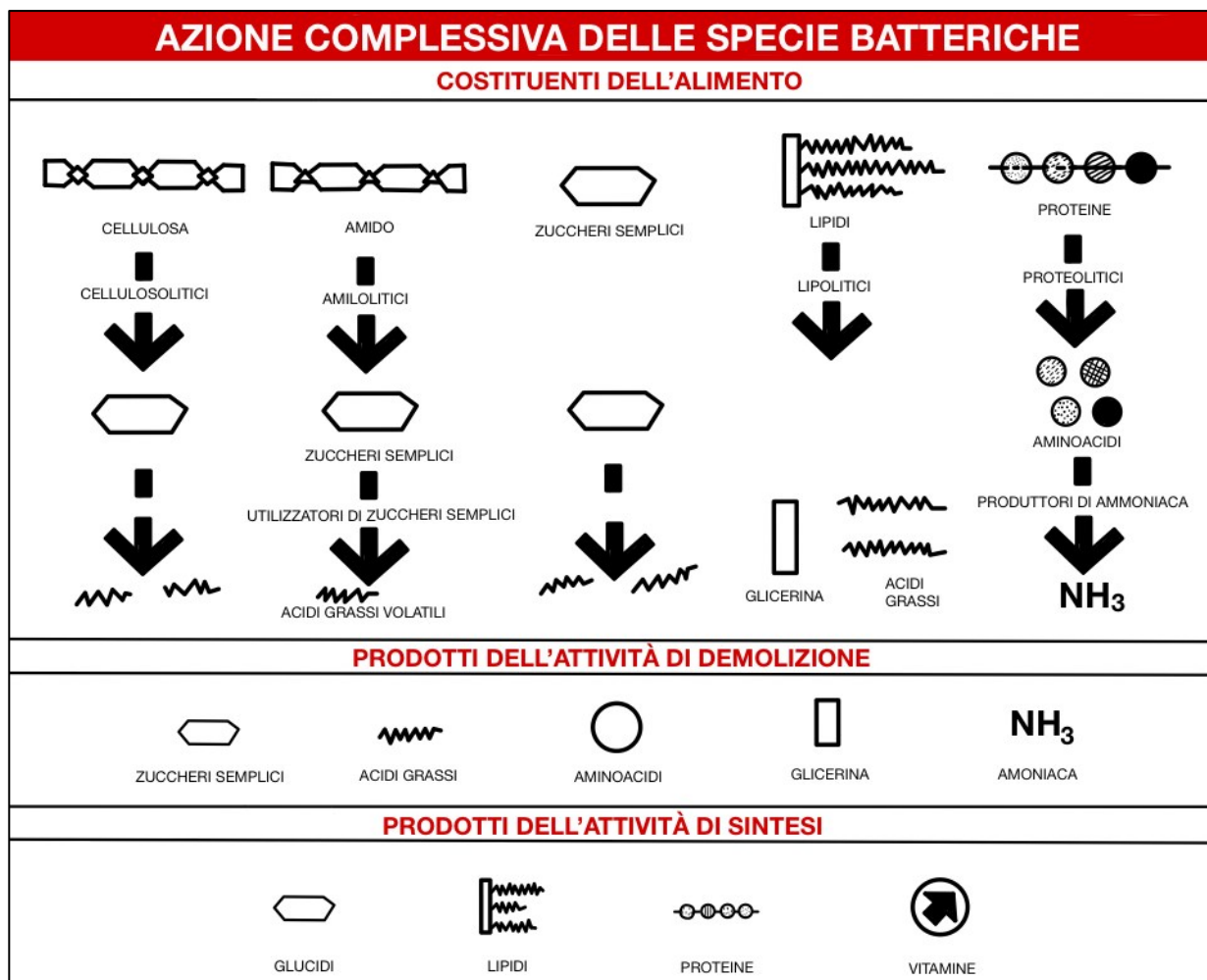
- a) Batteri cellulosolitici: sono gli unici batteri in grado di demolire la cellulosa. Questo processo è lento e complesso, per cui se nella dieta viene inserito troppo amido o troppi zuccheri semplici, i batteri trascurano la cellulosa e diminuisce quindi la digeribilità dei foraggi

- b) Batteri emicellulosolitici: demoliscono le emicellulose che sono più facili da attaccare della cellulosa ma anch'essi preferiscono zuccheri semplici se disponibili in elevata quantità
- c) Batteri amilolitici: attaccano gli amidi molto velocemente liberando grandi quantità di energia
- d) Batteri che attaccano glucidi semplici: traggono energia dagli zuccheri semplici che sono già presenti negli alimenti o che derivano da attività di semplificazione
- e) Batteri proteolitici: demoliscono le proteine fino ad aminoacidi
- f) Batteri che producono ammoniaca: semplificano e trasformano gli aminoacidi liberando ammoniaca
- g) Batteri metanigeni: producono metano (inutilizzabile per l'animale, viene espulso durante l'eruttazione) causando così la perdita di energia contenuta negli alimenti
- h) Batteri lipolitici: demoliscono i grassi fino a glicerina e acidi grassi
- i) Batteri che producono vitamine: sintetizzano la vitamina K e quelle del gruppo B in quantità elevata, rendendole disponibili sia per l'animale sia per altri microorganismi

I microorganismi ruminali sono presenti in numero e in percentuali diverse in funzione degli alimenti somministrati all'animale; una variazione brusca della razione si traduce per i batteri e per l'animale in un periodo di insufficiente nutrizione e può portare allo sviluppo di fenomeni patologici (Betti e Pacchioli, 1996).

L'azione complessiva delle specie batteriche è riportata nell'immagine 2

Immagine 2. Azione complessiva delle specie batteriche (Betti e Pacchioli, 1996)



1.3. Le fermentazioni ruminali

Per ottenere molecole che possono essere assimilate dall'animale, nel rumine, l'alimento ingerito subisce reazioni di fermentazione a opera di colonie di batteri, protozoi e funghi.

Le fermentazioni enteriche avvengono in anaerobiosi e comportano, in particolare, l'emissione di anidride carbonica e metano e avvengono ad opera di microorganismi presenti nel rumine di questo animale con il quale vivono in simbiosi (Mama and Ahmed, 2019).

I microorganismi sopravvivono grazie a diverse condizioni, quali:

- Mancanza di ossigeno
- pH neutro
- Substrato ricco di sostanza organica

Le fermentazioni, con conseguenti emissioni di metano, sono anche influenzate dal rapporto foraggio: concentrato; razioni con un maggior contenuto di fibra (NDF) portano a una maggior produzione di metano enterico. Inoltre, all'aumentare dell'ingestione della sostanza secca (DMI) aumenta linearmente la produzione di metano (Sandrucci et al., 2022).

1.3.1. Carboidrati

I carboidrati sono composti ternari in quanto costituiti da tre elementi: carbonio (C), idrogeno (H) e ossigeno (O). Quelli più semplici sono i monosaccaridi come glucosio, fruttosio e galattosio, i quali possono unirsi formando oligosaccaridi (fino a 8 molecole di monosaccaridi). Oltre agli oligosaccaridi esistono i polisaccaridi che comprendono glucidi di maggior complessità. Tra questi, nell'alimentazione zootecnica assumono particolare importanza l'amido, la cellulosa e le emicellulose.

Essi si dividono in:

- a) NSC: carboidrati non strutturali, il cui componente principale è l'amido
- b) FIBRA: carboidrati strutturali i cui componenti principali sono: cellulosa, emicellulosa e pectine. La fibra nei ruminanti ed erbivori è importante perché rappresenta una grande fonte di energia.

La fibra si divide a sua volta in:

- Fibra insolubile: cellulosa, emicellulose, lignina e amido resistente. Questo tipo di fibra è substrato per le fermentazioni batteriche intestinali.
- Fibra solubile: pectine, β -glucani, gomme e mucillagini. Questo tipo di fibra rallenta lo svuotamento gastrico e conferisce senso di sazietà (appunti di lezione).

I carboidrati hanno prevalentemente funzione energetica costituendo buona parte dell'energia necessaria per lo svolgimento di tutte le attività di accrescimento, mantenimento, movimento, produzione, riproduzione (Betti e Pacchioli, 1996).

La degradazione ruminale dei glucidi può essere schematicamente distinta in due fasi:

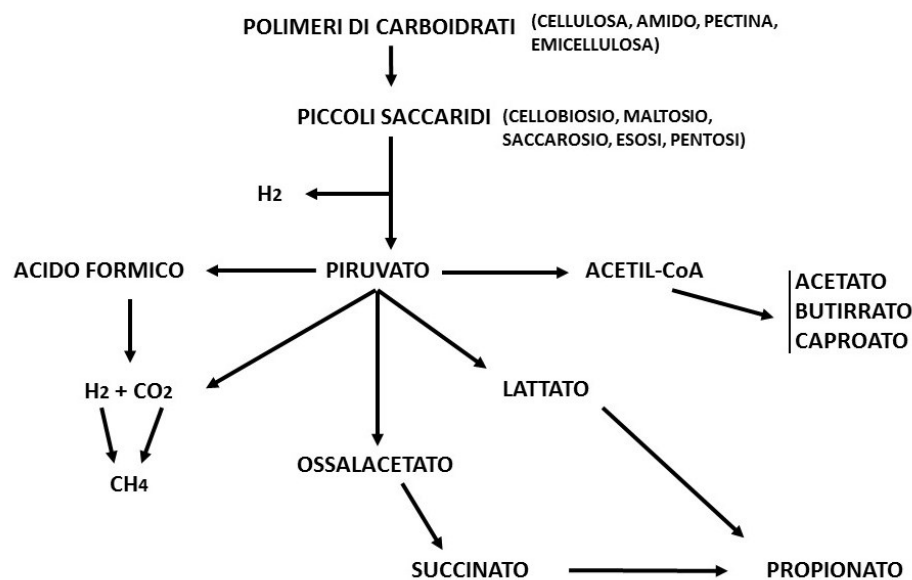
1. Semplificazione dei glucidi fino allo stadio di monosaccaridi: questo processo varia in funzione della solubilità del carboidrato e della complessità delle molecole. I polisaccaridi più semplici e l'amido sono semplificati in modo rapido e totale (circa 90-95%) mentre cellulosa ed emicellulosa subiscono una semplificazione lenta e parziale (50-60%).

2. I monosaccaridi ottenuti vengono fermentati dai microorganismi (con lo scopo di trarne energia) e parte delle catene carboniose vengono utilizzate per la sintesi di altre sostanze, soprattutto proteine.

Nel rumine, come prodotto finale delle fermentazioni, si trova una miscelazione di acidi grassi volatili, tracce di acido lattico e gas (Betti e Pacchioli, 1996) (immagine 3).

Le quantità di questi prodotti variano con la dieta e la frequenza di alimentazione (Russel e Hespell, 1981).

Immagine 3. Metabolismo dei carboidrati nel rumine (Russel e Hespell, 1981)



Gli acidi grassi volatili rappresentano la principale fonte di energia per l'animale e sono assorbiti per il 70-75% nel rumine e per il 20% circa nell'omaso (Betti e Pacchioli, 1996). La concentrazione e il rapporto degli acidi grassi volatili (AGV) varia in base all'alimentazione:

- Acido acetico: la sua concentrazione è massima (70% del totale degli AGV) quando prevalgono i foraggi. Nel rumine la fermentazione acetica comporta maggiori perdite di energia (per produzione di metano). Giunto nel sangue, l'acetato viene utilizzato nei processi di liberazione di energia nelle cellule e per la produzione di lipidi anche a livello mammario per cui sintetizza direttamente il grasso del latte diventando quindi molto importante per le lattifere.

- Acido propionico: la sua produzione cresce all'aumentare dei concentrati. Il propionato, rispetto all'acido acetico, comporta minori perdite di energia ma diminuisce l'efficienza di sintesi batteriche della proteina. Nel sangue, viene trasformato in glucosio e nell'animale favorisce la sintesi dei lipidi (non a livello mammario) e la loro deposizione nei tessuti di riserva. È la più importante fonte energetica.
- Acido butirrico: aumenta quando c'è abbondanza di zuccheri solubili, per esempio quando si somministrano melasso, erbe giovani, siero di latte ecc. Anche questo acido, una volta nel sangue viene destinato alla sintesi di lipidi.

1.3.2. Proteine

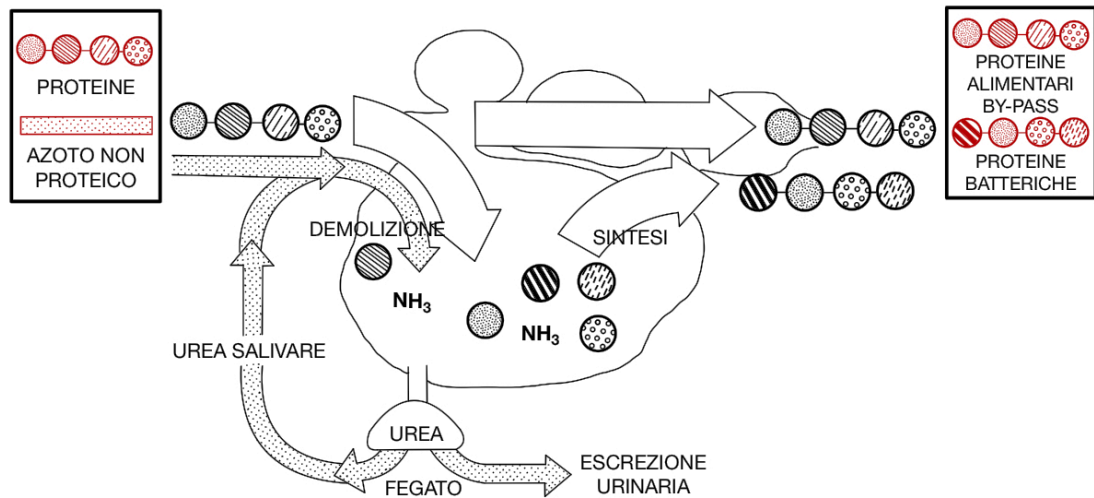
Le proteine sono sostanze quaternarie, ovvero formate da quattro elementi chimici: carbonio (C), idrogeno (H), ossigeno (O) e azoto (N). L'unità di base delle proteine è rappresentata dagli aminoacidi la cui caratteristica è quella di avere almeno un gruppo carbossilico (COOH) e un gruppo amminico (NH₂). Gli aminoacidi, al fine di formare proteine si legano tra loro tramite unione fra gruppo carbossilico e gruppo amminico dell'aminoacido successivo (Betti e Pacchioli, 1996).

Nel rumine circa il 70-75% delle proteine alimentari viene demolito dai batteri in:

- Aminoacidi: servono per costruire proteine batteriche, diverse da quelle alimentari
- Ammoniaca (NH₃): serve a sintetizzare nuovi aminoacidi, tra cui quelli essenziali per la bovina. Una quota dell'ammoniaca viene assorbita dalla parete ruminale e trasformata nel fegato in urea, la quale si trova in parte nella saliva (e torna nel rumine) e in parte viene eliminata con le urine. Se la quantità di ammoniaca è talmente elevata né da poter essere trasformata in proteina né da poter essere assorbita dal rumine, si ha un aumento del pH; se invece l'ammoniaca assorbita eccede la capacità del fegato di trasformarla in urea, si ha tossicità generale (Betti e Pacchioli, 1996).

Il ciclo delle proteine nel rumine è rappresentato nell'immagine 4.

NEL RUMINE I BATTERI DEMOLISCONO E COSTRUISCONO



Ci deve essere inoltre il giusto rapporto tra carboidrati e proteine, in quanto, dalla fermentazione dei carboidrati si ottengono catene di atomi di carbonio utili a sintetizzare le proteine. In aggiunta, la sintesi di proteina richiede energia, la quale viene ricavata dalle fermentazioni dei carboidrati (Betti e Pacchioli, 1996).

Lo scopo dell'alimentazione è quello di somministrare proteine più digeribili possibili per la funzione plastica ma anche per una funzione ambientale: se l'azoto non digerito finisce nelle deiezioni, questo finisce sulla superficie agricola influenzandone negativamente la fertilità (appunti di lezione).

È bene quindi tenere conto che le proteine contenute negli alimenti possono essere più o meno velocemente demolite dai batteri; la loro degradabilità è influenzata da:

- Natura dell'alimento
- Modalità di conservazione: la farina disidratata, per esempio, è più digeribile dell'insilato
- Trattamenti tecnologici
- Diversa tecnica di insilamento: aggiunta o meno di conservanti, trinciatura più o meno accentuata

Occorre combinare tra loro i diversi alimenti al fine di avere la massima efficienza delle sintesi batteriche e la massima disponibilità intestinale di proteine; questo significa che

deve esserci un giusto rapporto tra proteine molto degradabili, proteine più lentamente degradabili e proteine poco degradabili (Betti e Pacchioli, 1996).

La degradabilità delle proteine è correlata con la solubilità dell'azoto: più la fonte azotata si solubilizza nel liquido ruminale, maggiore è la facilità con cui avviene l'attacco dai microbi (Betti e Pacchioli, 1996).

Mediamente le sostanze insolubili sfuggono alla degradazione ruminale per circa il 65% mentre le solubili possono essere utilizzate al 100% (Betti e Pacchioli, 1996).

1.3.3. Lipidi

I lipidi nell'alimentazione del ruminante rivestono un ruolo meno importante di glucidi e proteine perché mediamente rappresentano solo il 2-4% della dieta (Betti e Pacchioli, 1996).

I lipidi nel rumine vengono scissi in glicerina e acidi grassi; la glicerina viene fermentata con produzione di acido propionico, mentre gli acidi grassi vengono trasformati dai batteri in acidi grassi diversi da quelli alimentari, che vengono successivamente assorbiti dall'intestino (Betti e Pacchioli, 1996).

Attualmente, per le grandi lattifere vi è la presenza ad aumentare la concentrazione di grassi fino al 4-6% con lo scopo di ridurre gli amidi (riducendo gli effetti negativi del loro eccesso) e di apportare più energia, a parità di sostanza secca (a parità di peso, il grasso fornisce 2,2 volte l'energia dei glucidi) (Betti e Pacchioli, 1996).

Tuttavia, dev'essere tenuto presente che un aumento eccessivo di lipidi (specie di oli vegetali) ha ripercussioni negative sull'attività dei batteri cellulolitici, diminuendo quindi la digeribilità dei foraggi e il grasso nel latte. Questi inconvenienti, però, possono essere ridotti utilizzando come fonti di lipidi i semi integrali oleosi che hanno subito trattamenti di protezione (Betti e Pacchioli, 1996).

All'uscita del rumine, indipendentemente dalla dieta, si ritrovano scarse quantità di acidi polinsaturi perché nel rumine ci sono delle condizioni tali per cui avviene la saturazione dei doppi legami (Betti e Pacchioli, 1996).

1.4. Emissioni degli allevamenti

A livello globale è stato stimato che l'emissione di gas a effetto serra da parte dell'allevamento del bovino da latte ha un impatto pari al 21% delle emissioni imputate alla zootecnia, le quali, a loro volta, sono state stimate pari al 14,5% delle emissioni antropiche globali (Sandrucci et al., 2022).

I principali gas serra emessi dall'agricoltura e dagli allevamenti sono anidride carbonica (CO₂), metano (CH₄) e protossido di azoto (N₂O). Per poter stimare l'effetto di tutti i gas sull'incremento della temperatura terrestre, il contributo di ogni sostanza è espresso in termini di Global Warming Potential (GWP) che è dato dal rapporto tra la sua capacità di assorbire le radiazioni infrarosse e quella di 1 kg di CO₂.

Nella tabella sono riportati i GWP dei gas che riguardano il settore agricolo, aggiornati secondo le indicazioni dell'IPCC (2013). In questo modo le emissioni di tutti i gas serra possono essere espresse in termini di CO₂ equivalenti (CO₂ eq) come riportato in tabella 1.

Tabella 1. Stima del potenziale riscaldante dei gas prodotti dai processi agricoli, su un arco temporale di 20 e 100 anni (Sandrucci et al., 2022)

		GWP	
Nome del gas	Formula	20 anni	100 anni
Anidride carbonica	CO ₂	1	1
Metano	CH ₄	84	28
Metano fossile	CH ₄	85	30
Protossido d'azoto	N ₂ O	264	265

Le fermentazioni enteriche e la produzione degli alimenti sono gli aspetti che contribuiscono maggiormente all'impatto ambientale (Sandrucci et al., 2022).

Le emissioni di metano sono maggiori nelle vacche in lattazione e ciò è dovuto all'aumento di assunzione del mangime in termini quantitativi (Mama and Ahmed, 2019).

Le emissioni di CH₄ rappresentano anche una perdita di energia durante l'allevamento dei ruminanti; infatti, l'8-12% di energia consumata nei mangimi viene sprecata sotto forma di emissioni di CH₄ (Sun et al., 2021).

1.4.1. Metano

Il metano (CH₄), insieme a diossido di carbonio (CO₂) e ossido nitroso (N₂O) è uno dei tre Greenhouse Gases (GHG) ma, tra questi, è quello più potenzialmente pericoloso poiché causa la degradazione dell'ozono.

Il metano è prodotto da diverse fonti, una di queste sono le fermentazioni a livello enterico che avvengono nel normale processo di fermentazione anaerobica dei ruminanti.

Il metano è un sottoprodotto della digestione dei carboidrati strutturali, a causa dell'azione dei microbi ruminali (batteri, funghi e protozoi). Durante la digestione i monosaccaridi vengono fermentati in H₂, CO₂ e acidi grassi volatili (VFA) e come parte di questa fase, alcuni microbi (metanigeni) producono CH₄ partendo da anidride carbonica e acqua (Mama and Ahmed, 2019).

Il metano prodotto da questi animali viene rilasciato tramite espirazione o flatulenza; nel caso degli allevamenti da latte, la maggior parte di metano viene emessa tramite espirazione. Il metano è prodotto principalmente nel rumine (87-90%) e in misura minore (13-10%) nell'intestino crasso (Mama and Ahmed, 2019).

Si prevede un aumento delle emissioni di metano da parte degli allevamenti nel prossimo decennio (Mama and Ahmed, 2019), per questo la comunità scientifica e le aziende private stanno sviluppando nuovi additivi che potrebbero essere in grado di diminuire la produzione di metano, possibilmente senza alterare la digeribilità all'interno del rumine.

Questi nuovi additivi sono diversi per natura e composizione, quindi è sempre interessante testarli per avere una chiara valutazione dei loro effetti. Inoltre, una delle principali preoccupazioni quando si lavora con nuovi additivi è la dose necessaria per ottenere l'effetto più favorevole del prodotto. Il lavoro mirava a testare l'effetto di cinque diversi additivi forniti da Delacon Biotechnik GmbH (Engerwitzdorf, Austria) a tre diversi dosaggi sulla produzione di metano ruminale in vitro e sui parametri di fermentazione.

1.5. Strategie per la mitigazione del metano nei ruminanti

La mitigazione della produzione di metano dalla fermentazione ruminale rappresenta un obiettivo importante per i nutrizionisti animali poiché anche questo gas è responsabile del riscaldamento globale. Infatti, la manipolazione della dieta è proposta agli allevatori come

strategia per ridurre la percentuale di energia persa sotto forma di gas eruttati e per migliorare l'efficienza energetica dei mangimi. (Maccarana et al. 2016)

L'emissione di metano è uno dei principali problemi degli allevamenti e, essendo questa aumentata a causa dell'incremento dei capi per azienda, c'è molta pressione per ridurre il numero di aziende di ruminanti o il numero di capi per azienda. Tuttavia, queste soluzioni non sono adeguate perché, secondo dei dati riportati dalla FAO nel 2011, la popolazione mondiale sta rapidamente aumentando e si prospetta una richiesta di latte del +58% e della carne del +73% per il 2050 (Donal O'Brien and Laurence Shalloo, 2016). Per la mitigazione del metano nei ruminanti ci possono essere diversi metodi che riguardano: il management dell'azienda (estendere la lunghezza della stagione del pascolo, migliorare la qualità dell'erba del pascolo e degli insilati, ottimizzare l'età del primo parto), la trasformazione del sistema aziendale, il trattamento delle deiezioni, l'uso delle biotecnologie e la manipolazione della dieta. Le uniche modifiche apportate alla dieta che sembrano aver avuto effetto finora sono state aumentare la qualità del foraggio o includere il concentrato nella dieta facendo attenzione a non eccedere con quest'ultimo poiché l'eccessivo contenuto può abbassare la degradabilità della fibra e quindi diminuire la produzione e aumentare le emissioni di metano con le deiezioni. Si sta studiando, quindi, anche l'effetto degli additivi sulle emissioni (Donal O'Brien and Laurence Shalloo, 2016).

Esistono, inoltre, prove che dimostrano che nelle diete molto concentrate o in quelle in cui vengono utilizzati integratori di grassi c'è una forte riduzione della produzione di metano. (Maccarana L. et al. 2016)

1.5.1. Impiego di additivi

Le emissioni di metano derivanti dalla fermentazione enterica nei ruminanti rappresentano la fonte di gas serra più rilevante in agricoltura ed è tra le maggiori fonti di origine antropica (Palangi e Lackner, 2022).

Poiché i ruminanti sono necessari a livello globale per la produzione di carne, latte e altri beni, gli additivi per le diete dei ruminanti potrebbero offrire una soluzione interessante per ridurre le emissioni di CH₄. Vengono studiate strategie di emissione di metano per mantenere la produttività e la salute generale dell'animale. Alcune strategie hanno dimostrato di ridurre la propagazione e/o eliminare la flora ruminale influenzando la salute e la produttività dell'animale. Pertanto, individuare strategie benefiche porta a migliorare la produttività e la salute dell'animale e dell'ambiente (Palangi e Lackner, 2022).

Per mitigare il potenziale danno causato dalle emissioni di CH₄ del bestiame nell'ambiente, i ricercatori hanno iniziato a esplorare il ruolo di diversi additivi per mangimi nella riduzione di CH₄. Tra questi:

- i composti contenenti N₂: si è visto che integratori di ammonio possono ridurre la produzione di CH₄ attraverso la loro influenza sui microorganismi ruminanti, riducendo, per esempio, gli enzimi partecipanti alla produzione di CH₄ (Sun et al. 2021).
- i probiotici: utilizzati da molto tempo come additivi per mangimi, oltre a ridurre le emissioni di CH₄ per unità di acido grasso volatile (VFA) prodotto, influenzano l'attività dei microorganismi ruminanti, migliorando anche la qualità delle fermentazioni e la digeribilità delle fibre dell'insilato (Sun et al. 2021).
- i prebiotici: sostanze che non vengono facilmente digerite o assorbite dall'ospite, riducono la produzione di CH₄ nel rumine andando ad alterare la comunità batterica, influenzando le pareti cellulari dei batteri metanigeni e stimolando altri batteri a competere con loro per l'H₂. I prebiotici, però, rispetto ad altri additivi per mangimi, sono meno utilizzati e le loro tipologie sono limitate (Sun et al. 2021).
- gli estratti vegetali: sono additivi per mangimi non dannosi per la salute degli animali e si prevede che in futuro diventeranno inibitori ideali del CH₄. Tra questi tannini, oli essenziali e saponine hanno un effetto riduttivo sulla produzione di CH₄ ma il meccanismo d'azione non è ancora del tutto chiaro perché quasi tutti i test sono stati effettuati in vitro, ovvero sono test a breve termine (Sun et al. 2021).

2 OBIETTIVO DELLA TESI

Il lavoro di tesi intende testare l'effetto di cinque diversi additivi forniti dalla ditta Delacon Biotechnik GmbH (Engerwitzdorf, Austria), utilizzati in tre diversi dosaggi, nel corso di due incubazioni ruminanti in vitro effettuate utilizzando un inoculo contenente liquido ruminale e una soluzione tampone per 24 ore. In particolare, saranno studiati i parametri di degradabilità ruminale di una dieta unifeed per vacche da latte a fine lattazione/ inizio asciutta e altri aspetti relativi alla cinetica di fermentazione, nonché la produzione di gas nel corso della incubazione e la produzione totale di metano oltre alla digeribilità della sostanza secca.

3 MATERIALI E METODI

3.1. Disegno sperimentale e procedura preparatoria

In questa prova in vitro è stato testato l'uso di 5 diversi additivi (A, B, C, D, E), in diversi dosaggi, su una dieta tipica (unifeed) di bovine da latte (Pezzate Rosse) dell'azienda agraria sperimentale Lucio Toniolo a fine lattazione/ inizio asciutta e il loro effetto sulla produzione di metano ruminale tramite un sistema automatizzato (GPT). Ogni additivo, per ogni dosaggio, è stato replicato 3 volte.

In ogni bottiglia è stato messo: 1 grammo di dieta unifeed + 50 ml di liquido ruminale + 100 ml di soluzione tampone (saliva).

Le 54 bottiglie sono state messe all'interno di due incubatori disposte su piani diversi e lasciate in incubazione per 24 ore.

Delle 54 bottiglie:

- 2 bottiglie fungono da "bianchi" ovvero contengono all'interno solo i 50 ml di liquido ruminale e i 100 ml di saliva, ma non 1 g di dieta
- 7 bottiglie sono di controllo ovvero contengono solo 1 grammo di unifeed, 50 ml di liquido ruminale e 100 ml di saliva senza nessuna aggiunta di additivo
- Le restanti contengono: 1 grammo di unifeed + 50 ml di liquido ruminale + 100 ml di saliva + additivo (A, B, C, D o E)

Il giorno prima dell'incubazione è stato pesato, per tutte le bottiglie (eccetto per i bianchi), 1 g circa (tra 0,9990 e 1,0010) di dieta unifeed fornita dall'allevamento; sono state pesate tutte le dosi di additivi che sono state messe all'interno della bottiglia con la dieta precedentemente immessa (immagine 5); sono state collegate le bottiglie ai rispettivi moduli Ankom e riposte negli incubatori secondo uno schema prestabilito in modo che per ogni trattamento ci fossero bottiglie sul ripiano alto e altre sul ripiano basso (immagine 6).

È stata preparata poi la saliva artificiale (soluzione di Menke), per un totale di 6 litri, dato che sono 100 ml x 54 bottiglie, quindi 5400 ml (immagine 7).

Il giorno dell'incubazione ci si divide in due gruppi di lavoro:

- Il gruppo A in laboratorio, imposta 2 bagnetti termostatici a 39°C in cui vengono messi i bottiglioni con la soluzione di saliva e il liquido ruminale. Viene poi settato il programma di Ankom a 1 secondo e registrazione a 1 minuto.
- Il gruppo B si reca in azienda dove vengono estratti, per via esofagea, da 3 vacche in lattazione (a digiuno dalla sera precedente e post mungitura), 3 litri di liquido ruminale visto che servono 50 ml x 54 bottiglie (2700 ml).

Una volta raccolto il liquido ruminale e portato in laboratorio, lo si travasa nel bottiglione preriscaldato nel bagnetto termostatico a 39°C, viene posto sotto CO₂ e viene misurato il pH. Poi si aggiungono 50 ml di liquido ruminale e 100 ml di saliva per ogni bottiglia tramite un dosatore.

Man mano che le bottiglie vengono riempite, vengono riposte negli incubatori e collegate al proprio modulo che trasmetterà quindi i dati sul computer.

Riposte tutte le bottiglie negli incubatori, collegati tutti i moduli e dopo essersi assicurati che questi trasferiscano correttamente i dati sul computer nel programma, le bottiglie rimangono 24 ore negli incubatori.

Dopo l'incubazione, vengono estratti dei campioni di 10 ml di gas per analizzare il metano (CH₄) accumulato nello spazio di testa dopo aver alzato la pressione un'ora prima della chiusura dell'incubazione

Successivamente, per ogni bottiglia viene misurato il pH.

Una volta terminato questo procedimento, si passa alla prova di digeribilità.

Immagine 5. Bottiglia con all'interno 1 g di dieta e additivo

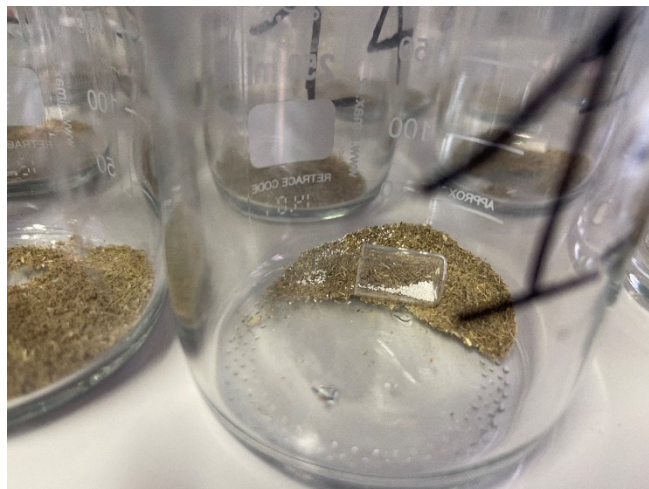


Immagine 6. Bottiglie riposte su diversi piani all'interno dell'incubatore

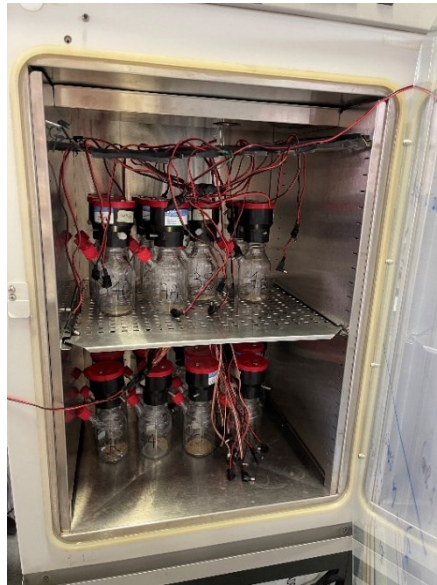


Immagine 7. Soluzione buffer



3.1.1. Il sistema GPT

Il sistema GPT fornito da Ankom è un sistema volto a determinare la degradabilità e la produzione di gas in modo automatico. Il sistema è mostrato nelle immagini 8 e 9.

Immagini 8 e 9. Ankom Gas Production System RF



Esso prevede:

- a) Giare: bottiglie di vetro (capacità di circa 260 ml) che conterranno l'inoculo di liquido ruminale e soluzione tampone. Ogni giara è chiusa ermeticamente con l'apposito tappo di forma cilindrica detto modulo attivo che contiene il sistema di misurazione e trasmissione dei dati. Ogni giara ha infatti un ID univoco per comunicare con il sistema.
- b) Modulo attivo: è un cilindro in plastica che presenta tre aperture: una che comunica con il sensore di pressione, una seconda è collegata all'elettrovalvola di sfiato comandata attraverso il software e 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 ci sono: un sensore di pressione, una scheda elettronica ed una batteria ricaricabile. I moduli "attivi", per assicurare il funzionamento del sistema, necessitano della presenza del cosiddetto "modulo zero" il quale non è collegato a nessuna giara. Il compito fondamentale del "modulo zero" è quello di registrare la pressione atmosferica circostante.
- c) Modulo remoto (modulo zero): registra la pressione atmosferica circostante.

- d) Base coordinator: centralina wireless che permette la trasmissione dei dati.
- e) Computer driver software e software operativo: il software, fornito dalla ditta stessa, è installabile su qualsiasi pc e controlla la trasmissione dei dati. Una volta che i moduli si sono connessi alla base coordinator, i dati vengono riportati su un foglio Excel. Il software permette all'operatore di registrare i parametri (es. pressione e voltaggio della batteria) per un intervallo di tempo alla fine del quale vengono poi salvati in un foglio di calcolo Excel.

3.1.2. Piano sperimentale

Ogni dose di ciascun additivo è stata incubata in triplicato in ciascuno dei due cicli di incubazione. Per ogni ciclo di incubazione sono stati inoltre previsti due bianchi (bottiglie contenenti solo l'inoculo) e sette controlli (bottiglie contenenti l'inoculo e il substrato). Il piano sperimentale delle incubazioni è riportato in tabella 2.

Tabella 2. Piano sperimentale per ogni incubazione

Trattamento	Dosaggio (mg/bottiglia)	N° repliche	Substrato (1g)	Buffer (100 ml)	Fluido ruminale (50 ml)
A (liquido)	1.4	3	Si	Si	Si
	3.5	3	Si	Si	Si
	8.5	3	Si	Si	Si
B (solido)	25	3	Si	Si	Si
	65	3	Si	Si	Si
	160	3	Si	Si	Si
C (solido)	1,4	3	Si	Si	Si
	3,5	3	Si	Si	Si
	8,5	3	Si	Si	Si
D (liquido)	1.4	3	Si	Si	Si
	3.5	3	Si	Si	Si
	8.5	3	Si	Si	Si
E (solido)	10	3	Si	Si	Si
	25	3	Si	Si	Si
	60	3	Si	Si	Si

Controlli	0	7	Si	Si	Si
Bianchi	0	2	No	Si	Si

Una volta avuto chiaro il disegno sperimentale e, una volta preparate le giare con all'interno liquido ruminale, soluzione buffer e additivo, le bottiglie vengono collegate al proprio modulo e poste all'interno dell'incubatore in attesa del giorno del prelievo del liquido ruminale (giorno successivo).

3.2. Dieta unifeed

Il substrato utilizzato nella prova consisteva in una dieta unifeed di bovine in lattazione (Tabella 3).

Le vacche utilizzate per prelevare il fluido ruminale sono state alimentate con la stessa dieta, utilizzata come substrato di fermentazione. La composizione chimica della dieta è stata determinata mediante spettroscopia di riflettanza nel vicino infrarosso (NIRs) (Tabella 4).

Oltre all'alimento somministrato, le vacche hanno avuto anche la possibilità di accedere al pascolo per qualche ora al giorno.

Di questa dieta viene posto 1 g (0,9990-1,0010 g) all'interno delle bottiglie a cui poi viene aggiunto l'additivo (immagine 2).

Tabella 3. Ingredienti della dieta unifeed

Ingredienti	Quantità (kg)	Quantità (%)
Pascolo	6.5	16.1
Mix energetico (mais, frumento)	8.2	20.3
Mix proteico (soia, girasole)	3.5	8.7
Insilato di erba	12.0	29.8
Germolino	0.3	0.7
Melasso	0.8	2.0
Acqua	10.0	22.3
Totale	43.1	100

Tabella 4. Composizione chimica del substrato

INGREDIENTI	NIRS- UNIPD	NIRS- LAB	MEDIA
Sostanza secca	52.50	57.32	54.9
Proteina grezza	14.13	16.34	15.2
Estratto etereo	2.72	3.33	3.0
Ceneri	9.01	9.4	9.2
NDF	34.73	35.26	35.0
ADF	20.82	22.78	21.8
ADL	3.94	3.67	3.8
Amido	24.16	21.71	22.9

3.3. Additivi

In questa prova sono stati utilizzati 5 diversi additivi (A, B, C, D, E) forniti da Delacon Biotechnik GmbH. L'esatta natura e composizione di ciascuno di essi non è stata fornita dalla ditta perché i prodotti sono coperti da restrizioni di riservatezza.

Le caratteristiche dei campioni sono riportate in Tabella 5.

Ogni additivo è stato pesato (in mg) e riposto all'interno della bottiglia con 1 g di dieta tramite un piccolo recipiente di plastica che non rappresenta un problema per i microorganismi durante le fermentazioni negli incubatori (immagine 2).

Tabella 5. Caratteristiche dei prodotti commerciali

	Quantità di campione	Stato	Forma fisica e colore	Odore
Additivo A	5 ml	Liquido	Liquido giallo	Aglio
Additivo B	5 g	Solido	Polvere bianca	Nessuno
Additivo C	5 g	Solido	Polvere grigiastra	Nessuno
Additivo D	5 ml	Liquido	Liquido giallo	Aglio
Additivo E	5 g	Solido	Polvere bianca	Nessuno

Ogni additivo è stato posto in 3 diversi dosaggi in 3 repliche ciascuno come riportato in tabella 2. Queste dosi sono state scelte dalla ditta fornitrice sulla base di precedenti prove effettuate internamente all'azienda (Tabella 6).

Tabella 6. Dosaggio degli additivi

	Quantità incubata per bottiglia		
	Bassa	Media	Alta
Additivo A (mg)	1.4	3.5	8.5
Additivo B (mg)	25	65	160
Additivo C (mg)	1.4	3.5	8.5
Additivo D (mg)	1.4	3.5	8.5
Additivo E (mg)	10	25	60

3.4. Soluzione buffer

La soluzione buffer è un composto creato per simulare la saliva dell'animale e viene preparato con la metodologia di Menke e Steingass (1988).

È composto da una soluzione tampone, una soluzione macromineraie, una soluzione micromineraie, resazurina e una soluzione riducente come riportato in tabella 7.

Questa soluzione, di colore rosa (immagine 3), viene poi posta all'interno di un bottiglione a sua volta riposto in un bagnetto portato a temperatura di 39°C.

Una volta preparata, tutte le operazioni sono state effettuate sotto flusso continuo di CO₂.

All'interno di ogni bottiglia vengono messi 100 ml di saliva per rispettare il rapporto liquido ruminale saliva 1:2.

Tabella 7. Soluzione buffer

SOLUZIONE TAMPONE			
Sodio bicarbonato	NaHCO ₃	35 g	
Ammonio bicarbonato	NH ₄ HCO ₃	4 g	
Acqua distillata	H ₂ O	11	
SOLUZIONE MACROMINERALE			
Sodio fosfato bibasico	Na ₂ HPO ₄	5.7 g	
Potassio fosfato monobasico	K ₂ HPO ₄	6.2 g	
Magnesio solfato eptaidrato	MgSO ₄ -7H ₂ O	0.6 g	
Acqua distillata	H ₂ O	11	
SOLUZIONE MICROMINERALE			
Calcio cloruro diidrato	CaCl ₂ -2H ₂ O	13.2 g	
Magnese cloruro tetraidrato	MnCl ₂ -4H ₂ O	10 g	
Cobalto cloruro esaidrato	CoCl ₂ -6H ₂ O	1 g	
Ferro cloruro esaidrato	FeCl ₃ -6H ₂ O	1.17 g	
Acqua distillata	H ₂ O	100 ml	
RESAZURINA			
Resazurina	Polvere blu	0.1 g	
Acqua distillata	H ₂ O	100 ml	
SOLUZIONE RIDUCENTE			
Acqua distillata	H ₂ O	285 ml	
Sodio idrossido	NaOH	12 ml	
Sodio solfuro nonaidrato	Na ₂ S*9H ₂ O	2,016 g	

3.5. Liquido ruminale

Il fluido ruminale viene raccolto al mattino presso l'Azienda Agraria sperimentale L. Toniolo dopo che le vacche di razza Pezzata Rossa sono state a digiuno dalla sera prima. Il liquido viene quindi prelevato prima della somministrazione del pasto, utilizzando una sonda esofagea collegata con pompa a vuoto che evita di raccogliere il materiale più grossolano. Il fluido è stato immediatamente filtrato attraverso 4 strati di garza e inserito in thermos riempiti precedentemente con acqua calda per mantenere una temperatura di circa 39°C.

Per evitare che il liquido venga esposto a una condizione di aerobiosi, l'esecuzione del prelievo e successivo trasporto vengono svolti in modo più rapido possibile.

È stato poi travasato nel bottiglione, a sua volta riposto nel bagnetto e ogni operazione è stata effettuata sotto flusso continuo di CO₂.

All'interno di ogni bottiglia sono stati messi 50 ml di liquido ruminale per rispettare il rapporto liquido ruminale: saliva di 1:2.

3.6. Incubazione

L'incubazione ruminale è stata condotta mediante la tecnica di produzione di gas in vitro (GPT) utilizzando bottiglie da 150 ml.

Le bottiglie precedentemente riempite con dieta e additivo sono state riposte nell'incubatore il giorno prima in attesa dell'incubazione.

All'interno di ogni bottiglia sono stati messi 50 ml di liquido ruminale e 100 ml di soluzione buffer tramite dei dosatori sotto il continuo flusso di anidride carbonica affinché venisse mantenuto lo stato di anaerobiosi.

Al momento dell'incubazione si parte estraendo una giara per volta dall'incubatore e, grazie a un lavoro coordinato tra gli operatori, si segue il seguente schema di lavoro:

- Aprire l'incubatore ed estrarre una giara alla volta seguendo un ripiano dell'incubatore per volta
- Aggiungere tramite dosatori da 25 ml il liquido ruminale e la soluzione buffer evitando di fare schizzi di liquido che possano far aderire alle pareti della bottiglia le particelle alimentari che sarebbero poi escluse dal processo di fermentazione
- Riporre la giara all'interno dell'incubatore evitando movimenti bruschi che possano scuotere il contenuto
- Collegare il rispettivo modulo attivo
- Verificare sul computer che la giara sia collegata correttamente e che ci sia pressione

- Una volta completata l'incubazione, controllare che tutti i moduli comunichino con il sistema del pc

Sono state fatte 2 incubazioni consecutive, ciascuna della durata di 24 ore.

Le prove di incubazione hanno utilizzato un sistema di produzione di gas automatizzato (GPT) della tecnologia Ankom (AnkomRFGP System, Ankom Technology®, NY, USA)

3.7. I controlli sperimentali

Una volta terminata l'incubazione vengono raccolti alcuni campioni per effettuare dei controlli sperimentali:

- Prelievo di gas dallo spazio di testa per valutare il metano (CH_4)
- pH

Inoltre, si va a valutare la digeribilità della sostanza secca facendo filtrare il liquido in crogioli di vetro filtranti (gooch) tramite il sistema FT 122 Fibertec™ (Gerber Instruments AG, Effretikon, Svizzera) (immagine 10)

Immagine 10. Sistema FT 122 Fibertec™



3.7.1. Prelievo del metano

Terminata l'incubazione, viene rimossa una bottiglia alla volta dall'incubatore per prelevare i campioni.

Per il metano vengono estratti 10 ml di gas tramite siringa dal beccuccio laterale e vengono iniettati nella vacuette corrispondente contrassegnata con il numero della giara e la scritta 'CH4'.

Le vacuette (immagini 11 e 12) sono provette in PET per il prelievo venoso con metodo sottovuoto, un componente brevettato che le rende impermeabili ai gas e una chiusura di sicurezza composta da un tappo interno in gomma morbida e un cappuccio esterno in plastica.

Immagine 11 e 12. Vacuette



3.7.2. Misurazione del pH

Prima dell'incubazione viene misurato il pH della soluzione buffer e del liquido ruminale e i valori vengono riportati su un foglio di raccolta dati.

Alla fine dell'incubazione, viene estratta una giara alla volta e si misura il pH del composto buffer + liquido ruminale all'interno di ogni giara (immagine 13). Il pH viene poi riportato in un foglio dati per verificare eventuali anomalie o cambiamenti nel corso dell'incubazione.

La misurazione del pH viene fatta tramite un pH-metro (immagine 14) che deve essere precedentemente tarato e pulito tramite acqua deionizzata.

Immagine 13. pH-metro all'interno della singola giara



Immagine 14. pH-metro con elettrodo all'interno della giara



3.7.3. Digeribilità della sostanza secca

Un altro controllo che viene effettuato postumo è la digeribilità della sostanza secca.

Le diverse giare sono state precedentemente poste (alla fine della raccolta dei diversi campioni) in cella frigo a 3-4°C, chiuse con l'apposito tappo e lasciate riposare al fine di far sedimentare la parte solida sul fondo.

Per avviare la prova di digeribilità si inizia preparando i gooch (immagine 15) di porosità 2 che sono stati lavati e messi ad asciugare in stufa il giorno prima.

Il giorno stesso dell'incubazione i gooch vengono riposti all'interno di essicatori ovvero 'campane di vetro' che hanno lo scopo di assorbire l'umidità residua.

La prova di digeribilità della sostanza secca si effettua tramite il sistema FT 122 Fibertec™ (Gerber Instruments AG, Effretikon, Svizzera) che tramite il vuoto aspira il contenuto dei gooch e permette il controllo di sei crogioli alla volta.

I vari passaggi che si eseguono sono:

- Pesatura dei diversi gooch (6 per ciclo di prova); i gooch vanno estratti uno alla volta per evitare che assorbano umidità e quindi che si vada a sovrastimare il peso effettivo
- Su un file cartaceo precedentemente stampato, va riportato il peso del gooch che viene a sua volta numerato con l'indelebile con il numero della giara corrispondente
- Sullo stesso file cartaceo, viene riportato il codice identificativo del gooch così da renderlo riconoscibile anche nel caso in cui il numero scritto con l'indelebile si rimuova a contatto con calore o liquidi
- I gooch vengono messi nel sistema Fibertec dove vengono fissati (immagine 16)
- Pesati e numerati i primi 6 gooch, vengono rimosse dalla cella frigo le prime 6 giare
- Si versa all'interno del sistema Fibertec il contenuto di una giara per volta (immagine 17) cercando di versare prima la parte liquida e poi il rimanente solido sedimentato sul fondo così da non ostruire con le particelle grossolane la parte filtrante del gooch. È buona pratica in questa fase quella di procedere con calma e non versare tutto il liquido in una sola volta in modo da rimanere con il liquido all'interno del gooch (immagine 18)
- Una volta svuotato l'intero contenuto, si nota che alcune particelle sono rimaste attaccate sulla superficie interna della giara per cui si usa dell'acqua deionizzata precedentemente riscaldata per pulire al meglio possibile la bottiglia. Quest'acqua di lavaggio viene anch'essa inserita all'interno del sistema Fibertec sia per pulire i tubi della macchina che per cercare di effettuare il controllo della digeribilità su quasi il 100% del contenuto
- Pulita la bottiglia, all'interno della macchina viene versato dell'acetone per pulire i tubi del sistema al fine di renderlo disponibile per il ciclo successivo evitando che rimanga della sostanza precedentemente adesa

Immagine 15. Gooch



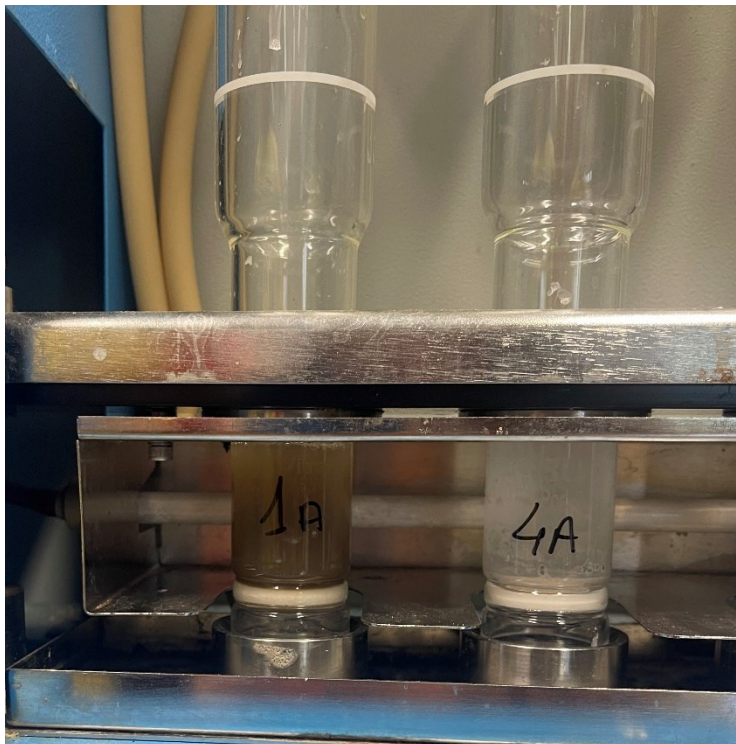
Immagine 16. Gooch fissati nel sistema Fibertech



Immagine 17. Liquido della giara che viene versato all'interno del sistema Fibertec



Immagine 18. Liquido che non supera il livello massimo del gooch



4. RISULTATI

La valutazione dei risultati prevede l'uso di un modello statistico con la seguente equazione:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + D_j + (P_i \times D_j) + \varepsilon_{ijk}$$

Dove,

μ = media complessiva

P= effetto del prodotto (i=5; A, B, C, D, E)

D= effetto del dosaggio (j= 4; CTR-0, Basso, Medio, Alto)

ε = residuo

I valori delle diverse variabili incluse nel modello statistico sono riportati nella tabella 8.

Tabella 8. Valori delle diverse variabili incluse nel modello

VARIABILE	PRODOTTO (P)	DOSAGGIO (D)	P X D
Digeribilità della sostanza secca in vitro	0.0390	0.0001	0.7718
pH	<.0001	<.0001	<.0001
Produzione di gas totale	0.3335	0.1665	0.8032
Produzione di metano	0.4677	0.0617	0.6771

La media complessiva per ogni variabile è riportata in tabella 9.

Tabella 9. Media complessiva di ogni variabile

VARIABILE	PRODOTTO					DOSAGGIO			
	A	B	C	D	E	CTR	L	M	H
IVDMD (%)	61.54	59.37	63.97	65.99	58.09	67.65 ^a	62.96 ^b	63.02 ^b	59.40 ^b
pH	6.56	6.46	6.57	6.57	6.56	6.57 ^a	6.56 ^a	6.55 ^a	6.52 ^b
GP (ml/g DM)	252.80	233.42	219.48	217.00	225.07	235.58	213.18	232.11	243.38
CH ₄ (ml/g DM)	8.26	7.08	8.03	7.33	7.73	8.55	7.82	7.80	7.44

4.1. Digeribilità in vitro della sostanza secca

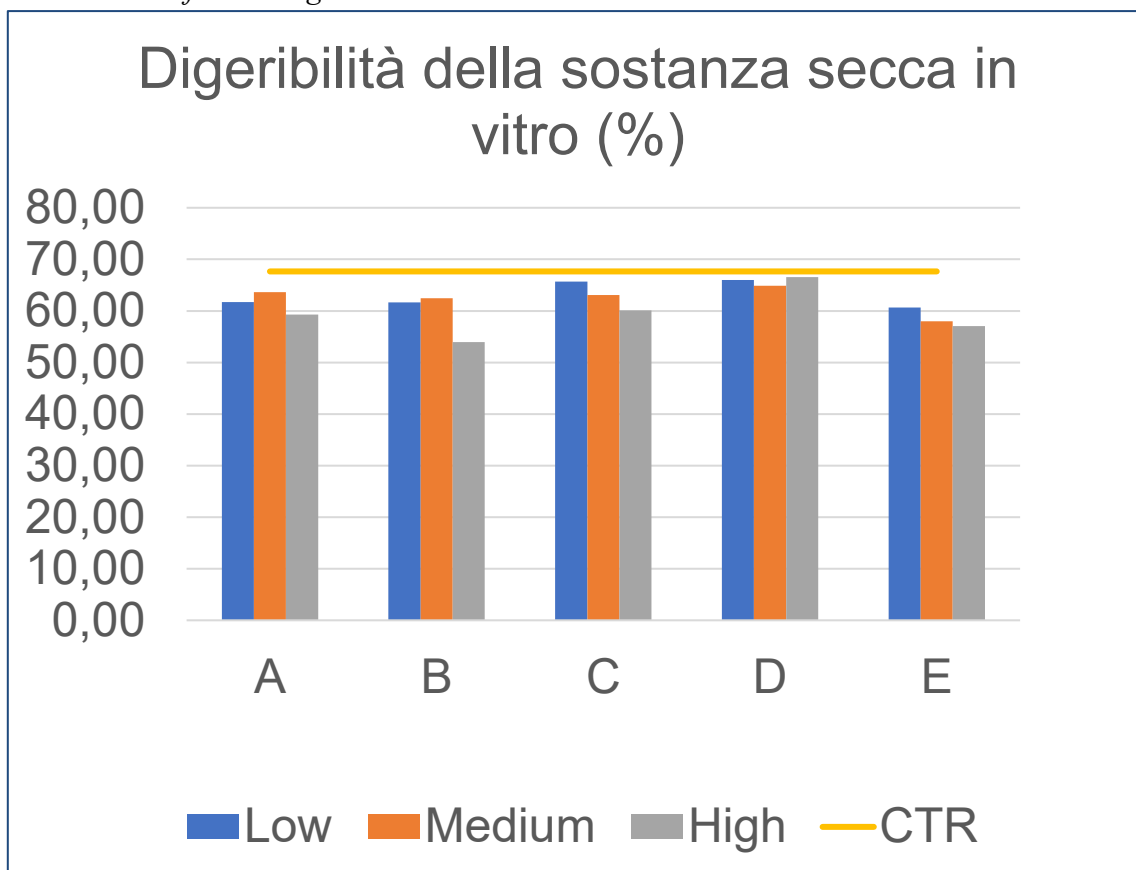
La digeribilità della sostanza secca in vitro, dopo aver analizzato i risultati, è apparsa minore con l'uso degli additivi rispetto alle bottiglie di controllo (digeribilità di circa 67,65%).

In particolare:

- Additivo A: la digeribilità è risultata minore (59,30%) con il dosaggio alto, più alta (63,60%) con il dosaggio medio e media (61,71%) con il dosaggio basso
- Additivo B: la digeribilità è risultata minore (53,97%) con il dosaggio alto, più alta (62,45%) con il dosaggio medio e media (61,68%) con il dosaggio basso
- Additivo C: la digeribilità è risultata minore (60,10%) con il dosaggio alto, più alta (65,66%) con il dosaggio basso e media (63,06%) con il dosaggio medio
- Additivo D: la digeribilità è risultata minore (64,88%) con il dosaggio medio, più alta (66,53%) con il dosaggio alto e media (66,02%) con il dosaggio basso
- Additivo E: la digeribilità è risultata minore (57,08%) con il dosaggio alto, più alta (60,69%) con il dosaggio basso e media (57,99%) con il dosaggio medio

La digeribilità della sostanza secca nei vari additivi è riportata nel grafico 1.

Grafico 1. Digeribilità in vitro della sostanza secca



4.2. Produzione di gas

La produzione di gas dei diversi additivi è riportata nei grafici 2, 3, 4, 5, 6.

Come si può notare dal grafico, la produzione di gas è inferiore, rispetto ai controlli, negli additivi C e D dove non supera i 250 ml/ g di sostanza secca, indipendentemente dal dosaggio.

Con l'uso degli additivi A, B, E, si nota che con almeno un dosaggio, la produzione di gas supera quella dei controlli.

Grafico 2. Produzione di gas dell'additivo A (ml/g SS)

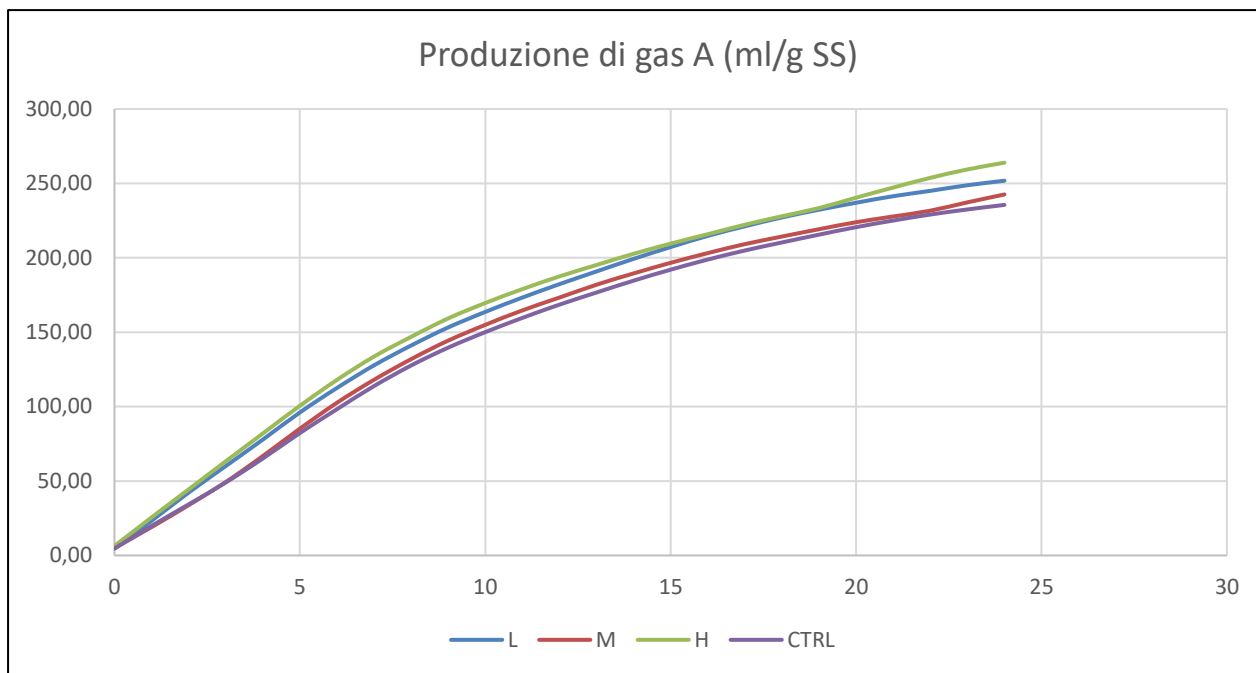


Grafico 3. Produzione di gas dell'additivo B

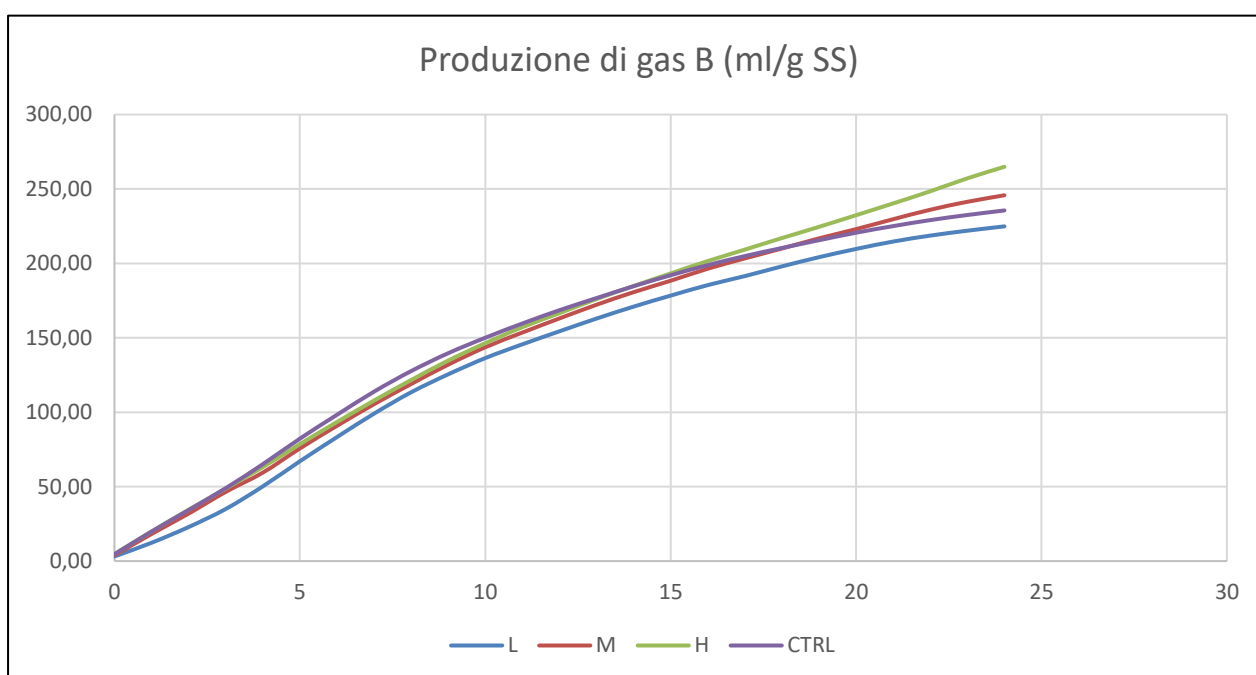


Grafico 4. Produzione di gas dell'additivo C

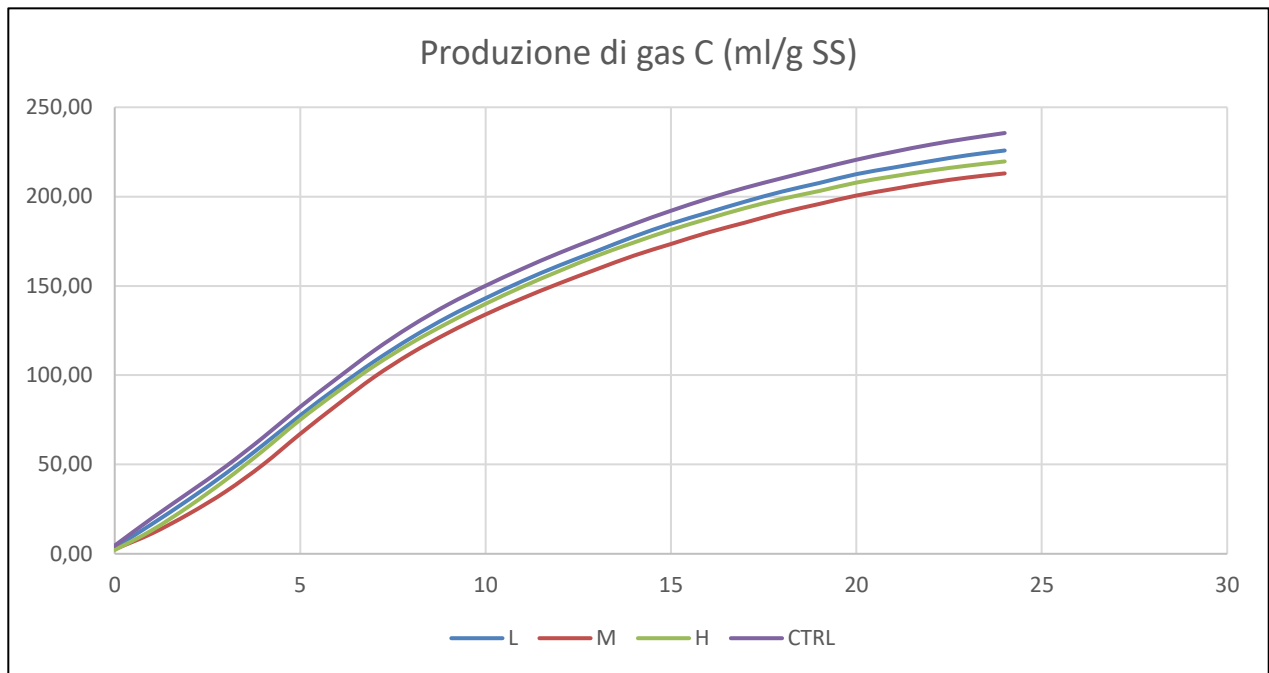


Grafico 5. Produzione di gas dell'additivo D

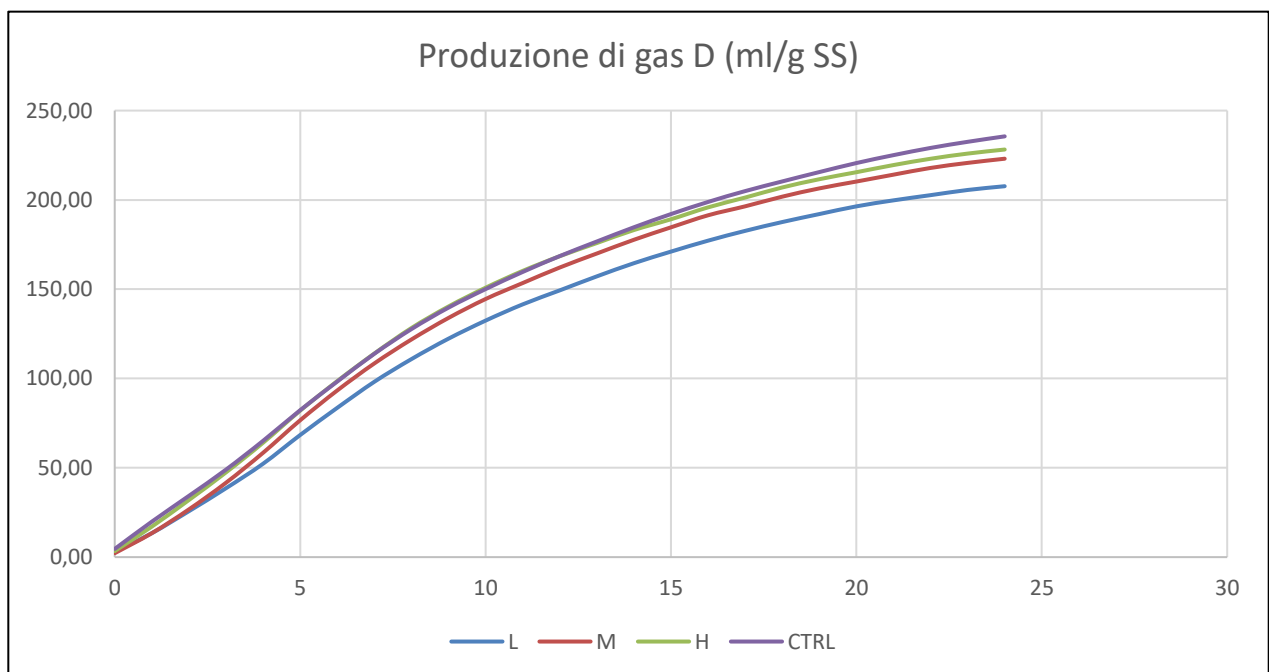
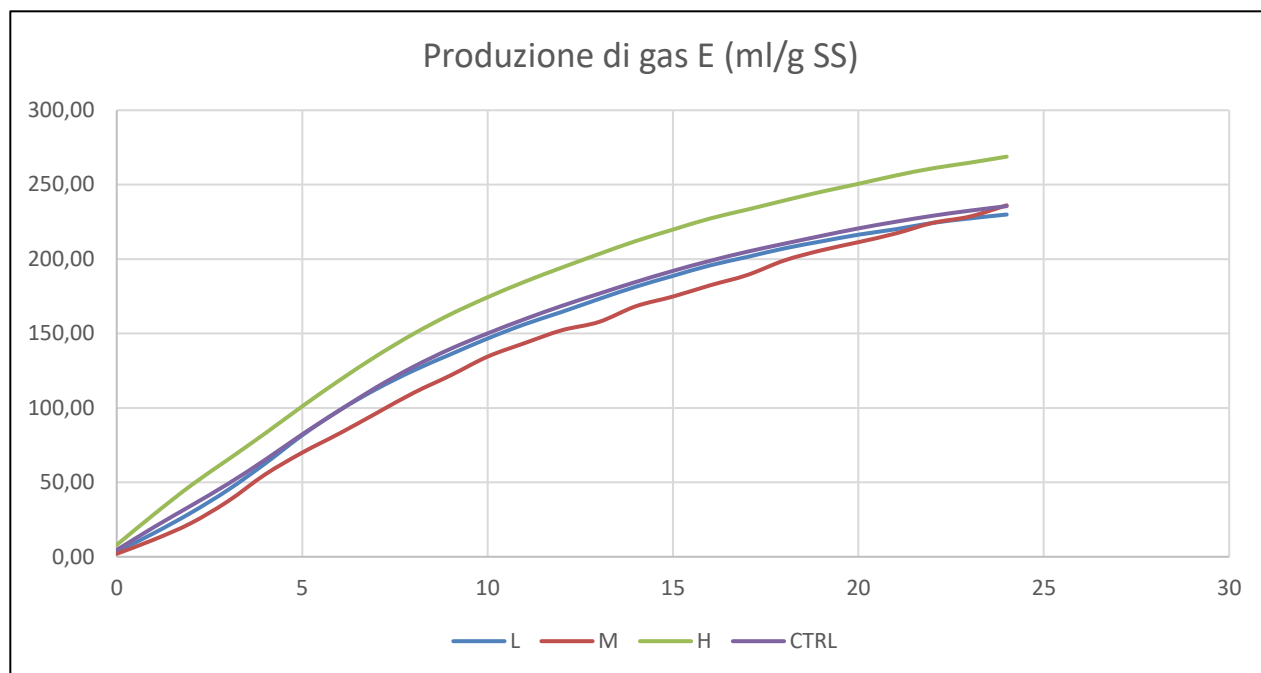
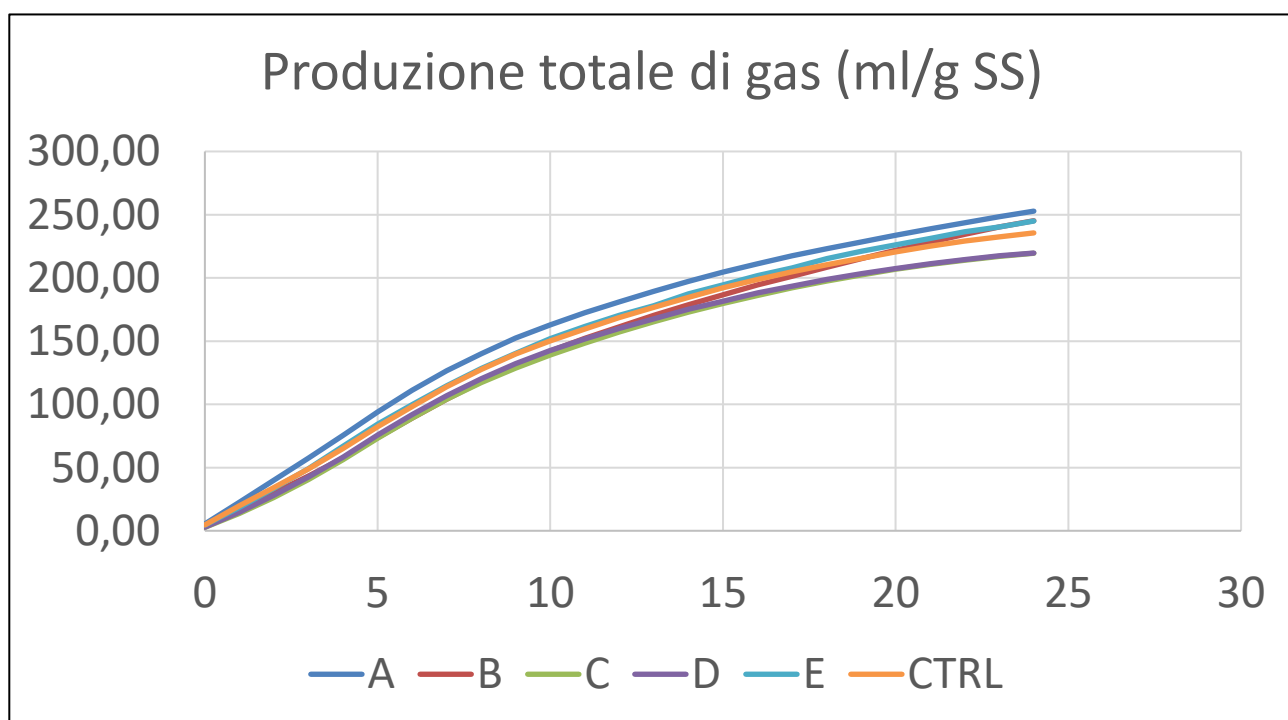


Grafico 6. Produzione di gas dell'additivo E



In generale, la produzione di gas minore rispetto ai controlli si è verificata con l'utilizzo dell'additivo D, come si può vedere nel grafico 7.

Grafico 7. Produzione totale di gas



5. DISCUSSIONE

Solo di recente sono stati scoperti gli effetti degli oli essenziali sulla fermentazione microbica del ruminante; tuttavia, è ragionevole iniziare identificando gli additivi che aumentano e diminuiscono la produzione di propionato, acetato e metano. Alcuni studi hanno dimostrato che alcuni oli come olio d'aglio, cinnamaldeide, capsaicina e anetolo migliorano il profilo di fermentazione dei microorganismi ruminanti e quindi sono stati studiati approfonditamente in vitro e, in alcuni casi, in vivo (Calsamiglia et al., 2007).

Gli studi in vitro si rivelano molto utili per testare gli effetti degli additivi sulla fermentazione ruminale ma bisogna tener conto che presentano delle limitazioni; infatti, le dosi utilizzate nelle prove in vitro sono molto più elevate rispetto a delle prove in vivo poiché la concentrazione batterica in vivo è maggiore rispetto a quella in vitro (Calsamiglia et al., 2007).

Un recente studio ha comunque dimostrato che le misurazioni di gas e CH₄ in vitro possono essere indicative della produzione di gas e CH₄ in vivo (Maccarana et al., 2016).

Rispetto alle prove condotte nel 2021 nel lavoro svolto da Nida Amin et al. (2021) sull'effetto di alcuni additivi e della loro combinazione sui parametri di fermentazione ruminale in vitro e sulla produzione di metano, il risultato della presente tesi coincide sulla mancanza di effetti riguardo la produzione totale di gas.

La differenza con lo studio di Nida Amin et al. (2021) consiste nella digeribilità della sostanza secca; infatti, in quella prova gli estratti vegetali non hanno causato differenze significative su questo parametro mentre nel presente lavoro di tesi si è visto che i 5 additivi testati hanno diminuito la digeribilità della sostanza secca rispetto ai controlli.

Rispetto al lavoro svolto da Sun et al., gli additivi testati nel presente lavoro di tesi non hanno un effetto significativo sulla riduzione del metano come invece hanno dimostrato gli additivi testati nella prova di Sun et al. (2021) come il Nitroetano e i probiotici (batteri dell'acido lattico o batteri dell'acido acetico) che hanno mostrato un significativo effetto inibitorio sulla produzione di metano.

Per quanto riguarda gli estratti vegetali ancora non si conoscono bene i meccanismi di inibizione ma si è visto che quelli di piante medicinali, i tannini e gli oli essenziali sopprimono la produzione di CH₄ alterando la struttura e l'abbondanza della flora microbica ruminale. In generale nello studio di Sun et al. (2021) si è visto che gli estratti vegetali hanno un effetto significativo sulla riduzione di metano dei ruminanti, va però tenuto conto che la ricerca sugli estratti vegetali negli animali è ancora carente e che quasi tutti i test condotti sono in vitro quindi a breve termine (Sun et al., 2021).

6. CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi si intendeva valutare l'effetto di cinque diversi additivi in tre diverse dosaggi su alcuni parametri riguardanti le fermentazioni ruminali quali la produzione di gas e la digeribilità della sostanza secca.

A tal fine è stata condotta una prova sperimentale in vitro consistente in due incubazioni ruminali a distanza di 24 ore dove si sono testati sia gli additivi in giare contenenti liquido ruminale e dieta unifeed che bottiglie con solo liquido ruminale e dieta unifeed per avere un parametro di riferimento su cui paragonare gli additivi.

I risultati di questa prova hanno dimostrato che gli additivi aggiunti alla dieta non hanno diminuito in maniera significativa la produzione di gas totale; inoltre, dai risultati ottenuti è emerso che tutti i prodotti hanno avuto un effetto negativo sulla digeribilità della sostanza secca che ha subito una riduzione rispetto alle bottiglie di controllo senza additivi.

Tali risultati possono anche essere dovuti al fatto che non si conosce nello specifico l'esatta natura degli additivi e al fatto che alcuni componenti attivi in quelli costituiti da olio essenziale possono variare la loro concentrazione in base alle condizioni di crescita o metodi di lavorazione (Calsimiglia et al., 2007).

Altri motivi di questi risultati potrebbero essere:

- Il fatto che la prova sia stata condotta in vitro, per cui, ad esempio, la concentrazione microbica è sicuramente minore rispetto a quella del rumine
- L'ecosistema microbico può adattarsi a nuove condizioni ambientali come quello della prova in vitro e quindi dare un risultato a breve termine che potrebbe essere distorto rispetto a quello a lungo termine

Questo lavoro è stato tuttavia svolto solo con due ripetizioni, per cui i risultati sono limitati a due prove e sarebbero più accurati se ripetuti più volte.

Le indagini future potrebbero focalizzarsi sugli additivi che meglio hanno fatto sperare come l'additivo A, il quale è riuscito ad aumentare la gas production rispetto al controllo ed eventualmente testare diversi dosaggi in una prova di durata più lunga

Considerando comunque che i test in vitro sono a breve termine, sarebbe opportuno cercare di testare gli effetti di questi additivi anche sugli animali poiché si potrebbero effettivamente valutare le conseguenze e i benefici ed osservarne l'effetto sul prodotto latte.

7. BIBLIOGRAFIA

- Amin N.; Bailoni L.; Wendler R.W.; Caldwell J.; Pourazad P.; (2021), Effects of citrus flavonoid, vanillin, and their combination on in vitro rumen fermentation parameters and methane production, 3, 4
- Betti S.; Pacchioli M.T.; (1996), Centro ricerche produzioni animali: l'alimentazione della vacca da latte Vol. 2, 9-18, 24, 27, 38, 39, 50
- Calsimiglia S.; Busquet M.; Cardozo P.W.; Castillejos L.; Ferret A.; (2007), Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation, 2586, 2592
- Maccarana L.; Cattani M.; Tagliapietra F.; Bailoni L.; Schiavon S.; (2016), Research: Influence of main dietary chemical constituents on the in vitro gas and methane production in diets for dairy cows, 1-8
- Mama A.; Seid A.; (2019), Review on Methane Emission from Dairy Farms and Its Impact on Global Warning, Austin J Vet Sci & Anim Husband., 6(1): 1-6
- Medeiros I.; Fernandez-Novo A.; Astiz S.; (2022) Historical Evolution of Cattle Management and Herd Health of Dairy Farms in OECD Countries, 9,125
- O'Brien D.; Shalloo L.; (2016), A Review of Livestock Methane Emission Factors, EPA Research Report 288: 35-41
- Palangi V.; Lackner M. (2022), Management of Enteric Methane Emissions in Ruminants Using Feed Additives: A Review, 12(24), 3452
- Russell J.; Hespell R. (1981) Journal of Dairy Science Vol. 64, No. 6: 1154-1157
- Sandrucci A.; Trevisi E.; Abeni F.; Albenzio M.; Battaglini L.; Bava L.; Bernabucci U.; Bertoni G.; Bovolenta S.; Campanile G.; Cesari V.; Cozzi G.; Di Palo R.; Gallo L.; Gasparrini B.; Mantovani R.; Mattiello S.; Menghi A.; Montanari C.; Nanni Costa L.; Neglia G.; Piasentier E.; Piccioli Cappelli F.; Premi M.; Salzano A.; Santillo A.; Schiavon S.; Tamburini A.; Toschi I.; Zucali M.; (2022) Produzioni Animali, 220, 221
- Sun K.; Liu H.; Fan H.; Liu T; Zheng C.; (2021), Research progress on the application of feed additives in ruminal methane emission reduction: a review, 3-18

8. SITOGRAFIA

1. <https://www.ruminantia.it/wp-content/uploads/2016/05/LA-CORRETTA-NUTRIZIONE-MINERALE-PARTE-DALLO-STUDIO-DEI-FABBISOGNI/> consultato il 28/06/2023
2. <https://ruminantiamese.ruminantia.it/la-nutrizione-macromineraale-i-parteconsultato> il 03/07/2023
3. <https://www.feedcentral.com.au/what-is-dcad-and-why-is-it-important/> consultato il 03/07/2023