

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**DIP. DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie per
l'Ambiente e il Territorio**

**Studio dell'influenza dell'inoculo microbico sui processi
fermentativi in vitro di diete per vitelloni**

Relatore

Dott. Franco Tagliapietra

Correlatore

Dott. Mirko Cattani

Laureanda

Giulia Tomasi

Matricola n. 1034242

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

*<< ..dai diamanti non nasce niente,
dal letame nascono i fiori. >>*

Via del Campo,

Fabrizio de Andrè

Sommario

INDICE FIGURE, TABELLE E GRAFICI	7
INDICE FORMULE	9
SIMBOLOGIA UTILIZZATA NEL TESTO	11
1 RIASSUNTO	13
2 ABSTRACT	17
3 INTRODUZIONE	21
3.1 L'IMPATTO AMBIENTALE DEGLI ALLEVAMENTI DI BOVINI	21
3.1.1 <i>Misure per limitare le perdite di azoto degli allevamenti di bovini</i>	24
3.1.2 <i>Misure per limitare l'emissione di gas degli allevamenti di bovini</i>	26
3.2 TECNICHE PER LA VALUTAZIONE DEGLI ALIMENTI ZOOTECNICI E DELLE DIETE PER RUMINANTI.	26
3.3 EFFETTO DELL'INOCULO MICROBICO SULLA DEGRADABILITÀ E SULLA PRODUZIONE DI GAS DEGLI ALIMENTI ZOOTECNICI MISURATE IN VITRO.....	28
4 OBIETTIVI.....	31
5 MATERIALE E METODI.....	33
5.1 APPARECCHIATURE UTILIZZATE	33
5.1.1 <i>Ankom Daisy^{II} Incubator</i>	33
5.1.2 <i>Ankom^{RF} gas production system</i>	35
5.2 DISEGNO SPERIMENTALE	38
5.2.1 <i>Prima incubazione</i>	40
5.2.2 <i>Seconda incubazione</i>	40
5.3 DIETE SPERIMENTALI	41
5.4 DESCRIZIONE TECNICA IN VITRO	44
5.4.1 <i>Procedura preparatoria</i>	44
5.4.1.1 <i>Preparazione e inserimento del substrato nei filter bags (FB)</i>	45
5.4.1.2 <i>Preparazione componenti del medium (o tampone)</i>	45

5.4.2	<i>Prelievo dell'inoculo microbico</i>	47
5.4.3	<i>Procedura d'incubazione</i>	47
5.4.3.1	<i>Procedura d'incubazione con Ankom Daisy II Incubator</i>	48
5.4.3.2	<i>Procedura d'incubazione con Ankom gas production System RF</i>	48
5.5	ANALISI FISICO - CHIMICHE	50
5.5.1	<i>Misurazione del pH</i>	50
5.5.2	<i>Analisi NDF</i>	51
5.6	PROCEDURE DI CALCOLO	53
5.6.1	<i>Conversione dei dati di pressione (PSI) in volume di gas prodotto (ml)</i>	53
5.6.2	<i>Fittaggio delle curve con il modello di Groot et al (1996)</i>	53
5.6.3	<i>Stima del valore energetico metabolizzabile con diverse tecniche</i>	54
5.6.4	<i>Calcolo della digeribilità vera della sostanza secca</i>	55
5.7	ANALISI STATISTICA	56
6	RISULTATI	57
7	DISCUSSIONE	63
7.1	EFFETTO DELLA METODICA DI ANALISI (DAISY ED RF) SULLA DETERMINAZIONE DELLA DEGRADABILITÀ DELLA FIBRA	63
7.2	EFFETTO DELLE DIETE SPERIMENTALI E DELL'INOCULO MICROBICO SULLE CINETICHE DI FERMENTAZIONE	64
7.3	EFFETTO DELLE DIETE SPERIMENTALI E DELL'INOCULO MICROBICO AL PICCO DELL'ATTIVITÀ MICROBICA IN VITRO	67
8	CONCLUSIONI	71
9	BIBLIOGRAFIA	73
	RINGRAZIAMENTI	77

Indice figure, tabelle e grafici

FIGURA 1: FERMENTAZIONI RUMINALI	22
TABELLA 1: SPECIFICHE TECNICHE ANKOM DAISY II INCUBATOR	34
FIGURA 2: ANKOM DAISY II INCUBATOR.....	34
TABELLA 2: SPECIFICHE TECNICHE DI ANKOM GAS PRODUCTION SYSTEM RF	36
FIGURA 3: ANKOM GAS PRODUCTION SYSTEM RF	37
TABELLA 3: CARATTERISTICHE DEGLI ANIMALI.....	38
TABELLA 4: FORMULAZIONE DELLE DIETE	41
TABELLA 5: COMPOSIZIONE CHIMICA DELLE DIETE.....	42
TABELLA 6: INTEGRAZIONE VITAMINICO-MINERALE DELLE DIETE.....	43
TABELLA 7: COMPOSIZIONE MEDIUM (O TAMPONE)	46
TABELLA 8: METODI UTILIZZATI PER L'ANALISI NDF	51
TABELLA 9 : VALORI MEDI DI NDFD OTTENUTI CON DAISY ED RF.....	57
GRAFICO 1: REGRESSIONE LINEARE TRA I VALORI NDFD OTTENUTI CON DAISY E CON RF.....	58
GRAFICO 2: REGRESSIONE LINEARE (CORRETTA) TRA I VALORI NDFD OTTENUTI CON DAISY E CON RF	58
TABELLA 10 : PRIMA INCUBAZIONE (48 H)	60
TABELLA 11 : SECONDA INCUBAZIONE (10 H)	62

Indice formule

(1) CONVERSIONE DATI DI PRESSIONE (PSI) IN VOLUME DI GAS PRODOTTO:	53
(2) MODELLO DI GROOT ET AL., 1996:	53
(3) CALCOLO ME (NRC, 2001):.....	54
(4) CALCOLO ME MENKE AND STEINGASS, 1988:	54
(5) CALCOLO ME ROBINSON ET AL., 2004:.....	55
(6) CALCOLO TDMD (%):.....	55

Simbologia utilizzata nel testo

- ADF** Acid Detergent Fiber – Fibra al Detergente Acido (Lignina e cellulosa);
- AGV** Acidi Grassi Volatili;
- CP** Crude Protein - Proteina Grezza **PG**;
- DE** Digestible Energy - Energia Digeribile;
- DM** Dry Matter – Sostanza Secca **SS**;
- EBW** Empty Body Weight – Peso Corporeo Vuoto (della carcassa);
- FB** filter bags – Sacchetti Filtro;
- FBT** filter bags Technology – Tecnologia basata sui Sacchetti Filtro;
- GE intake** Gross energy intake - Energia Lorda Ingerita;
- GP** Gas Production – Produzione di gas;
- GWP** Global Warming Potential - Potenziale di riscaldamento globale;
- LG** Lipidi Grezzi;
- LO** Low emission diet – Dieta a bassa emissione (basso impatto ambientale);
- ME** Metabolisable Energy - Energia metabolizzabile;
- MP** Metabolisable Protein - Proteina Metabolizzabile;
- NDF** Neutral Detergent Fiber – Fibra al Natural Detergente (Lignina, cellulosa e emicellulosa);
- NU** Nutraceutical diet – dieta Nutraceutica;
- Pdig** Proteina digeribile;
- PG** Proteina Grezza
- RF** Ankom^{RF} gas production system;
- SS** Sostanza Secca
- TDMd** True Dry Matter Digestibility – Digeribilità vera della sostanza secca;
- TQ** Tal Quale;
- TR** Dieta Tradizionale;
- UF** Unità foraggera.

1 Riassunto

Il contenuto energetico delle diete per ruminanti viene spesso stimato a partire da dati inerenti la loro composizione chimica, integrati con valori di degradabilità o di produzione di gas ottenuti dalla fermentazione *in vitro* delle diete stesse. La composizione dell'inoculo microbico utilizzato nelle fermentazioni *in vitro* può tuttavia influenzare enormemente i valori di degradabilità e produzione di gas forniti dalla dieta, alterando di conseguenza la stima del suo valore energetico. Il presente lavoro di tesi ha inteso verificare l'influenza dell'inoculo microbico sui processi fermentativi di tre diverse diete per vitelloni, utilizzando due diverse strumentazioni. La prima strumentazione (*DAISY*^{II}) consiste in un incubatore termostato, contenente 4 giare di vetro (capacità: 3 litri). I campioni di dieta vengono pesati in appositi sacchetti porosi (*filter bags*), posti all'interno delle giare di vetro, e fatti fermentare con liquido ruminale e un medium (o tampone), che serve a riprodurre la saliva dell'animale. Durante la fermentazione, le giare vengono sottoposte ad una lenta rotazione, per simulare i movimenti del rumine. Al termine dell'incubazione (48 h), i sacchetti vengono estratti dall'incubatore e pesati, per misurare la quota di campione alimentare degradato. La seconda strumentazione (*Ankom*^{RF} *Gas Production System*), consiste in un kit di bottiglie (capacità: 310 ml) dotate di un rilevatore interno di pressione e di una valvola elettromeccanica per il rilascio del gas. Le bottiglie sono collegate via wireless con un personal computer, il quale regola l'apertura e la chiusura della valvole per rilasciare i gas di fermentazione quando la pressione interna alle bottiglie raggiunge un determinato valore soglia. Diversamente dal *Daisy*^{II}, il campione alimentare viene posto direttamente all'interno della bottiglia, senza l'impiego di sacchetti, e fatto fermentare con l'aggiunta di liquido ruminale e medium (detto anche tampone). Questa strumentazione, oltre a determinare la degradabilità del campione alimentare, misura anche la produzione di gas. Il presente esperimento ha valutato tre differenti diete: i) una dieta tradizionale (TR), largamente utilizzata negli allevamenti di vitelloni da carne della Pianura Padana,

contenente il 14,4% di proteina grezza; ii) una dieta ipoproteica (LO), con il 10,7% di proteina grezza; iii) una dieta “nutraceutica” (NU), che abbina un ridotto contenuto proteico (10,7%), alla presenza di lino estruso, ricco in acidi grassi della serie omega-3. L’aggiunta di lino alla dieta persegue un duplice scopo: i) l’arricchimento della carne in acidi grassi della serie omega-3; ii) la riduzione della formazione di gas nel rumine, dal momento che le fonti lipidiche esercitano un effetto depressivo sulla produzione di gas. L’inoculo microbico è stato prelevato tramite una sonda esofagea da 9 vitelloni da carne che stavano ricevendo le tre diete oggetto di studio (3 animali per dieta). Con il Daisy^{II} è stata effettuata un’unica incubazione, della durata di 48 h, nella quale è stato adottato il seguente disegno sperimentale: 3 diete × 3 inoculi microbici × 4 replicazioni, più 12 bianchi (*filter bags* senza campione alimentare), per un totale di 48 *filter bags* incubati. In ogni *filter bag* sono stati pesati 0,25 di campione alimentare. Ogni giara è stata riempita con 16 *filter bags*, 0,8 l di inoculo microbico e 1,6 l di tampone (rapporto tra inoculo e tampone di 1:2). Con l’Ankom^{RF} sono state effettuate due incubazioni, della durata rispettivamente di 48 e 10 h, nelle quali è stato adottato il seguente disegno sperimentale: 3 diete × 3 inoculi microbici × 3 replicazioni, più 9 bianchi (bottiglie senza campione alimentare, contenenti solo l’inoculo microbico e il tampone), per un totale di 36 bottiglie incubate. Nell’incubazione a 48 h ciascuna bottiglia è stata riempita con 0,5 g di campione alimentare, 25 ml di inoculo microbico e 50 ml di tampone (rapporto tra inoculo e tampone di 1:2, come nel Daisy^{II}). Nell’incubazione a 10 h, tutte le quantità sono state raddoppiate: 1 g di campione alimentare incubato con 50 ml di inoculo microbico e 100 ml di tampone (rapporto tra inoculo e tampone di 1:2). Le variabili oggetto di studio sono state: pH, degradabilità della frazione fibrosa della dieta (NDF) e della sostanza secca della dieta (TDMd), energia metabolizzabile (ME) (calcolata sulla base di tre diverse equazioni), nonché i valori delle produzioni gassose (ml). Tutti i dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza con il pacchetto statistico SAS. Le differenze tra le diverse tesi sperimentali sono state valutate mediante la tecnica dei contrasti ortogonali,

considerando come soglia di significatività $P < 0.05$. L'influenza dell'inoculo microbico è risultata evidente sia nelle produzioni di gas, a tutti gli intervalli considerati, che nei valori di degradabilità a 48 h, mostrando differenze significative ($P < 0.05$) tra i tre tipi di inoculo. Viceversa la dieta ha evidenziato effetti più blandi. La seconda incubazione a 10 h conferma l'assenza dell'effetto della dieta, tuttavia non riscontra l'influenza dell'inoculo che ha caratterizzato la prima prova. Ciò suggerisce che gli effetti di preadattamento del liquido ruminale alla dieta non sono costanti nel tempo evidenziando, quindi, la necessità di standardizzare le condizioni di allevamento degli animali al fine di poter aumentare la riproducibilità delle misure di degradabilità e di gas production (GP) *in vitro*. I dati di digeribilità a 48 h forniti dal Daisy^{II} sono risultati costantemente più bassi rispetto ai corrispondenti valori ottenuti con l'Ankom^{RF}. Questo comportamento può essere dovuto al fatto che i *filter bags* previsti dalla strumentazione Daisy^{II} possano aver esercitato un effetto barriera, ostacolando il normale flusso dell'inoculo microbico e limitando il contatto tra particelle alimentari e microorganismi dell'inoculo, così da determinare valori di degradabilità più bassi. Ciò non si è verificato nel caso dell'Ankom^{RF}, dove campione alimentare e inoculo microbico risultano essere a contatto diretto tra loro. In conclusione, la composizione dell'inoculo microbico ha determinato forti variazioni nei valori di degradabilità e di produzione dei gas forniti dalle tre diete. L'aggiunta di fonti lipidiche (semi di lino estruso) alla dieta pare essere una strategia funzionale al contenimento della produzione di gas a livello ruminale, in virtù delle minori produzioni di gas evidenziate utilizzando un inoculo microbico che deriva da animali a cui è stata somministrata la dieta NU per 10 mesi, ma determina una minor digeribilità della fibra.

2 Abstract

The energy content of feeds for ruminants is traditionally estimated from data about chemical composition, plus NDF degradability measured at 48 h of incubation or gas production measured at 24 h of incubation. However, the composition of inoculum used for *in vitro* fermentations can influence the measurements of NDF degradability and gas production, altering the estimates of energy content. The objective of this thesis was to verify the effects of inoculum on *in vitro* rumen fermentation of three diets for fattening bulls. For the purposes of the study, two different instruments were used: i) Daisy^{II} Ankom Incubator; and ii) Ankom^{RF} gas production system. The first apparatus consisted of an insulated chamber with 4 glass rotating jars (capacity: 3 l) in which porous filter bags containing feed samples are incubated with rumen fluid and buffer. The second instrument, Ankom^{RF} gas production system, consists in a kit of bottles (capacity: 310 ml) equipped with a pressure detector and an open-closed valve for gas venting. All bottles are wireless-connected to a personal computer, that controls the opening of valves and gas venting at a threshold pressure (0.5 PSI). Differently from Daisy^{II} Ankom Incubator, feed sample is placed into the bottle without the use of porous bags. The latter system, in addition to the information of degradability, provides also a continuous measurement of the gas produced by fermentation processes. This trial investigated three diets: i) a traditional diet (TR), widely used in Italian fattening farms, especially those located in Padana Plane, with 14.4 % of crude protein (CP); and two diets, *Low emission* (LO) with a rate of crude protein (CP) of 10.7%, and *Nutraceutical* (NU), that in addition to a low protein content (10.7%), contained extruded flaxseed, rich in α -linolenic acid. LO and TR diets are considered “at low environmental impact”, both in terms of nitrogen and gas emissions. In particular, the supplementation of extruded flaxseed was aimed to: i) enrich meat products with omega-3 fatty acids; ii) reduce gas formation in the rumen, as fat supplements exert an inhibitory effect on methane production. Rumen fluid was collected by an oesophageal probe from nine bulls receiving the same diets

tested in this experiment. The study used fattening bulls originated from a cross between Friesian x White and Blue Belgian, divided into 3 experimental groups (one group for diet) and received the tested diets for 10 months. Each experimental group consisted by 3 animals homogeneous for sex (males), live weight (500 kg) and age (20 months). In the research, two incubations were performed using different experimental conditions: two methods and two incubation times. Furthermore, in both trials, all possible combinations substrate (3 types of diet) - inoculum (3 types of ruminal fluid) in multiple repetitions, have been taken in consideration. With the Daisy method, the experimental design was: 3 diets × 3 rumen fluids × 4 replications, plus 12 blanks (empty filter bags), for a total of 48 bags incubated (16 per jar). Each jar was filled with 0.8 l of rumen fluid and 1.6 l of buffer (ratio 1:2). Each filter bag was filled with 0.25 g of feed sample. With RF method, the experimental design was: 3 diets × 3 rumen fluids × 3 replications, plus 9 blanks (bottles without feed sample), for a total of 36 bottles incubated. Each bottle was filled with 25 ml of rumen fluid, 50 ml of buffer (ratio 1:2) and 0.5 g of feed sample in the incubation at 48 h. For incubation at t½ each bottle was filled with 50 ml of rumen fluid, 100 ml of buffer (ratio 1:2) and 1 g of feed sample. The following variables were measured: pH, NDF degradability TDMd, metabolizable energy (ME) (calculated using three different equations), and gas production. The data obtained were subjected to analysis of variance with SAS statistical package using different statistical models. Also, we evaluated the differences by the technique of orthogonal contrasts, with a threshold of significance $P < 0.05$. The effects of microbial inoculum is evident both in the gas production, in all the intervals considered, that in the values of degradability to 48 h, showed significantly differences ($P < 0.05$) in all the incubations. On the other side, the diet did not affect almost all of the parameters considered. Finally, we compared by linear regression the values of digestibility obtained with the two different *in vitro* techniques. From the results, *Ankom Daisy II Incubator* provides lower values compared to *Ankom^{RF} Gas Production* system. This result could be attributed to a possible “barrier effect”

exerted by filter bags, that could have limited the income and outcome of rumen fluid through the bags and sorted rumen microorganisms by size. In conclusion, rumen fluid showed to exert significant effects on degradability and gas production values provided by the two *in vitro* techniques. Conversely, the diet exerted small effects on these variables. The dietary supplementation of fat sources (extruded flaxseed) seems to be a valid strategy to reduce gas production in the rumen, as clearly evidenced by lower GP values provided by the rumen fluid resulting from animals which have received NU diet for 10 months, but decreases the NDF degradability.

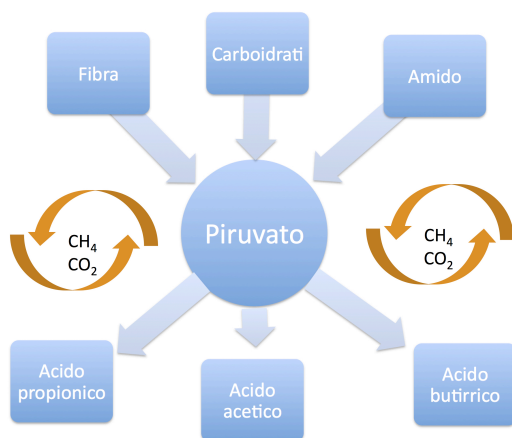
3 Introduzione

3.1 L'impatto ambientale degli allevamenti di bovini

L'obiettivo ultimo di un generico allevamento animale è la produzione di prodotti di origine animale come latte, uova o carne. Nel caso del sistema di produzione di carni bovine, vi è un'ampia varietà di razze ed ogni singolo animale è caratterizzato da diverse fasi di crescita. In termini generali, un vitello nasce con un peso iniziale di 40 kg e può raggiungere, un peso svezzato di 200 kg dopo soli 7 mesi. In condizioni ottimali di crescita, l'animale viene portato a macellazione tra 15 e 20 mesi di età. Il peso di macellazione è molto variabile e dipende in larga misura dal tipo e razza dei soggetti. Per crescita di un animale s'intende la deposizione di nutrienti nel corpo, un miscuglio di grassi, proteine, acqua e una piccola quantità di ceneri. Nei bovini da carne, durante tale periodo, il rapporto in cui queste sostanze nutritive vengono depositate cambia in maniera significativa: da un deposito prevalentemente di proteine e acqua si passa all'accumulo di grasso. Quanto un alimento è digerito nel rumine, la materia degradata viene utilizzata per produrre proteina microbica, acidi grassi volatili (AGV) e gas (CO_2 e CH_4) (*Figura 1*). La somma della proteina microbica e degli AGV rappresenta la quantità di energia derivante dalla dieta che può essere potenzialmente usata dagli animali per soddisfare il loro fabbisogno di mantenimento e di produzione. Gli AGV non sono adoperati direttamente dai batteri ruminali ma diventano una fonte di energia per l'animale: una volta protonati, possono essere assorbiti dall'epitelio ruminale e trasferiti nel fegato dove vengono trasformati in glucosio. Invece, i gas prodotti durante le fermentazioni rappresentano la porzione di energia non utilizzabile. Dell'energia ingerita con l'alimentazione (GE) da una vacca, una percentuale variabile tra il 20 e il 45% viene persa nelle feci; mentre parte dell'energia residua digerita (DE), circa il 18%, è "sprecata" in fermentazione gassosa di anidride carbonica (CO_2), metano (CH_4) e calore. Non tutto il materiale alimentare è soggetto ad una trasformazione nel rumine, esiste una parte di amido, cellula ed emicellulosa,

detta di “*by pass*”, che non subisce l’azione batterica ruminale e segue il normale decorso digestivo intestinale. Infine, per quanto riguarda i lipidi grezzi (LG), questi tendono a passare inalterati le pareti del rumine subendo solamente un processo di saturazione. Tuttavia, dosi eccessive di grasso nella dieta, possono causare addirittura l’inibizione della crescita batterica. In ultima analisi, un ruminante trova alimentazione grazie a: amido e proteina “*bypass*”, lipidi saturati, AGV e soprattutto proteina microbica. Quest’ultima, infatti, rappresenta la fonte proteica più importante.

FIGURA 1: Fermentazioni ruminali



Gli alimenti subiscono una prima degradazione meccanica in bocca e, quindi, attraverso l'esofago raggiungono il complesso dei prestomaci. All'interno del rumine, la microflora degrada la fibra vegetale per produrre sia sostanze destinate al nutrimento dell'animale, sia sostanze destinate a mantenere anaerobio l'ambiente ruminale. Si tratta AGV (Acido propionico, Acido acetico e Acido butirrico) e gas (CO₂ e CH₄). Gli AGV sono utilizzati dai ruminanti come fonte energetica invece, i gas hanno lo mantengono all'interno del rumine condizioni di anaerobiosi. Gli eccessi di gas vengono espulsi tramite eruttazione o aerofagia.

Il progressivo miglioramento delle produzioni zootecniche porta alla necessità di formulare diete per ruminanti in grado di apportare adeguate quantità di energia e di principi nutritivi, in modo tale da soddisfare il fabbisogno di mantenimento e di produzione degli animali. Tuttavia è indispensabile che le diete, a livello di allevamenti, comportino un limitato impatto ambientale e che possano garantire la salute degli animali nonché la sicurezza per chi consuma alimenti di origine animale. L'allevamento bovino intensivo contribuisce all'inquinamento ambientale con due tipologie di emissioni: i) azotate; ii) gassose.

In primo luogo, il contenuto di azoto nei reflui, incide pesantemente sull'ambiente. L'azoto, oltre ad essere una delle principali cause di eutrofizzazione delle acque superficiali, presentandosi in forma di ione mobile, concorre all'inquinamento per lisciviazione delle acque sotterranee. In generale, i principali fattori che determinano la variabilità nel contenuto di azoto nei reflui zootecnici sono legati a:

- i) tipo di animale (specie ma anche età e fase fisiologica);
- ii) tipo di dieta e modi di somministrazione;
- iii) modalità di stabulazione;
- iv) tecniche di stoccaggio dei reflui;
- v) eventuali effetti combinati tra più macrovariabili.

In secondo luogo, anche la produzione gassosa correlata all'attività ruminale, comporta un significativo impatto ambientale. Il gas è prodotto principalmente dalla fermentazione dei carboidrati, con produzione di acido acetico, propionico e butirrico (*Figura 1*). La produzione di gas imputabile alla fermentazione delle proteine è inferiore, mentre quella derivante dalla degradazione ruminale dei lipidi è quasi irrilevante. I principali gas prodotti, anidride carbonica (CO₂) e metano (CH₄), sono classificati come gas serra poiché caratterizzati da un elevato valore di potenziale di riscaldamento globale (Global Warming Potential, GWP). Nello specifico, il contributo della produzione animale alle emissioni totali di CO₂ in atmosfera è relativamente limitato e trascurabile (Sauerbeck, 2001), mentre il ruolo del metano di origine animale è rilevante. Circa il 20% delle emissioni totali di CH₄ in atmosfera, sono imputabili ai ruminanti e ai reflui animali in senso lato (EPA, 2005). Infine, un altro gas collegato indirettamente all'allevamento bovino, è il protossido di azoto (N₂O), derivante dalla nitrificazione microbica e / o denitrificazione microbica o chimica nel terreno. L'aggiunta di azoto al suolo tramite fertilizzanti minerali, quali per esempio il letame, i residui vegetali o da fanghi di depurazione, è responsabile dell'aumento delle emissioni di N₂O. La sua

emissione è considerata in media 1,25 % della quantità di azoto applicata al suolo. Oltre ad essere un potente gas serra, N₂O è in grado di limitare la formazione di composti precursori dell'ozono stratosferico, indispensabile elemento di protezione contro la radiazione UV.

3.1.1 Misure per limitare le perdite di azoto degli allevamenti di bovini

Circa il 50 % dell'azoto escreto dagli allevamenti di bovini è perso sotto forma di ammoniacca (NH₃), nitrati (NO₃⁻), protossido di azoto (N₂O) e azoto gassoso (N₂). In linea di massima, per limitare l'impatto ambientale degli allevamenti bovini dovuto alla perdita di azoto, dal punto di vista nutrizionale, è possibile adottare alcune misure tra le quali:

- i) aumentare la digeribilità della dieta (strettamente correlata al tenore di fibra, alla presenza di fattori antinutrizionali ed alla struttura fisica degli alimenti);
- ii) rispettare gli standard di razionamento (migliorando l'aderenza tra apporti e fabbisogni);
- iii) razionare per fasi fisiologiche.

Negli ultimi anni in Italia, ha trovato ampia diffusione la tecnica dell'*unifeed*, la quale prevede la separazione della mandria in più gruppi, a seconda dei fabbisogni nutrizionali e della capacità produttiva degli animali, nonché l'utilizzo del carro - miscelatore per la preparazione di un *pasto unico* che viene lasciato senza limiti di quantità agli animali. In tal modo si assicura un'alimentazione costante nel tempo in termini di quantità e qualità, diversamente da quanto accade col pascolo (diffuso nel resto d'Europa) dove la dieta, essendo condizionata da ciò che l'animale trova e seleziona, è maggiormente soggetta a squilibri nutrizionali che, in ultima analisi, possono limitare la capacità produttiva degli animali. Nell'alimentazione dei ruminanti, assume notevole importanza, più

che il profilo aminoacidico (come avviene nei monogastrici, Uomo compreso), la quantità di proteina degradabile (P dig), ovvero la porzione di proteina che viene trasformata dai batteri del rumine, sul totale della proteina grezza (PG) ingerita con la dieta. La microflora ruminale, per poter utilizzare la proteina, necessita di fonti di energia come amido, zuccheri e la fibra (eccetto la frazione di lignina). Tali alimenti mostrano però una diversa rapidità di fermentazione. L'obiettivo principale da conseguire nella formulazione di una dieta ideale, quindi, è quello di massimizzare l'attività ruminale ed aumentare la disponibilità di proteina totale (in particolare quella a bassa degradabilità). Per elevare la quantità di AGV e di proteina microbica è necessario assicurare una contemporanea e sincrona disponibilità di energia fermentescibile e di azoto nella dieta. In condizioni di carenza energetica, la microflora batterica del rumine non è in grado di captare l'azoto degradabile il quale, venendo assorbito dalle pareti del rumine, finisce nel sangue e quindi nelle urine. Nell'urina, la maggior parte dell'azoto è presente in forma di urea, la quale è facilmente convertita in ammoniaca (NH₃), caratterizzata da un elevato grado di volatilità. In base al tipo di stabulazione, le perdite di azoto dovute a volatilizzazione di NH₃ sono comprese tra il 7.5% e il 44%. Tale fenomeno avviene nel periodo che intercorre tra l'escrezione e la fase di conservazione, di stoccaggio, nonché durante l'applicazione al terreno. Al contrario, se è l'azoto degradabile ad essere limitante, l'energia assunta tramite i foraggi non risulta essere utilizzabile dai microrganismi e, "by-passando" il rumine, non può essere nemmeno degradata e assorbita dall'apparato intestinale dell'animale finendo così per essere escreta con le feci. Nei bovini da carne, l'azoto fecale è di solito vicino al 10% dell'azoto ingerito e si presenta sotto la forma di composti organici piuttosto complessi, non facilmente convertibili in ammoniaca.

Conseguentemente, per migliorare l'efficienza di utilizzazione dei nutrienti, è fondamentale trovare il giusto equilibrio tra fonti di foraggio e alimenti concentrati (ad alta fermentescibilità). Tuttavia, l'integrazione alimentare a base di concentrati non deve essere eccessiva: un sovradosaggio di concentrati nelle

razioni può causare fermentazioni tumultuose e condizioni di acidosi che vanno a compromettere la salute e la capacità produttiva degli animali, rivelandosi così una soluzione improduttiva e sconveniente a livello economico. Inoltre, al fine di garantire una fornitura sufficiente di P dig, le diete per bovini da carne raramente mostrano un contenuto di PG inferiore al 12.5%. A tal riguardo numerosi studi presenti in letteratura hanno indagato sulla possibilità di ridurre la quota di PG nelle diete dei bovini da carne (Archibeque et al., 2005).

3.1.2 Misure per limitare l'emissione di gas degli allevamenti di bovini

L'entità delle emissioni gassose dipende dalla quantità di cibo ingerito e dal tipo di dieta. Il gas, come spiegato in precedenza, deriva principalmente dalla fermentazione dei carboidrati e le vie per ridurre la produzione possono essere molteplici. 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 questo motivo una delle strategie alimentari maggiormente proposte in letteratura (Beauchemin, McGinn, 2006) per ridurre la formazione di gas (in particolare metano) nel rumine prevede l'integrazione delle diete con fonti lipidiche (es. semi di oleaginose come lino, colza, etc...).

3.2 Tecniche per la valutazione degli alimenti zootecnici e delle diete per ruminanti.

La degradabilità, la digeribilità, la produzione di gas ed il valore energetico degli alimenti zootecnici e delle diete utilizzate nell'alimentazione dei ruminanti possono essere misurate mediante tecniche *in vivo*, *in situ* o *in vitro*.

Le tecniche *in vivo* costituiscono ancora oggi le metodiche di riferimento. Tuttavia, pur essendo ampiamente utilizzate, mostrano dei limiti: si tratta di tecniche molto costose e laboriose che richiedono grosse quantità di alimento e un

numero minimo di animali per la prova ma soprattutto, forniscono esclusivamente un dato di digeribilità totale e finale dell'alimento, non apportando alcuna informazione sulla cinetica della degradazione.

A differenza delle tecniche *in vivo*, le tecniche *in situ* consentono di ottenere informazioni sulla cinetica della degradazione degli alimenti e delle diete nell'ambiente ruminale. Tale metodica prevede infatti 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. Il protocollo prevede di misurare la progressiva scomparsa, in seguito a degradazione, del campione alimentare mediante estrazione e pesatura dei sacchetti ad orari prestabiliti. Il grosso limite di tali metodiche è l'utilizzo di animali alterati chirurgicamente (tramite fistole) e perciò fortemente criticate dall'opinione pubblica per questioni etiche legate al benessere degli animali. I centri di ricerca incontrano difficoltà sempre maggiori ad ottenere le licenze necessarie per fistolare gli 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 ruminanti 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

l'incubatore Daisy II (Ankom Technology®, Macedonia, NY, USA), descritto ampiamente nel *Capitolo 5* dedicato ai *Materiali e metodi*. Un'analogia fondamentale che si può riscontrare tra il Daisy II e la tecnica proposta da Quin et al. (1938), è l'uso di “bags” per contenere gli alimenti incubati.

La gas production (GP) è nata per simulare le fermentazioni degli alimenti nel ruminale 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 elaborarono una tecnica che prevede l'impiego di siringhe dove viene incubato l'alimento con una miscela di substrato e di inoculo microbico. La produzione dei gas di fermentazione è valutata misurando lo spostamento dello stantuffo della siringa. Il metodo delle siringhe originariamente fu ideato per determinare la produzione cumulata di gas che si sviluppavano nel corso di 24 ore di incubazione. Recentemente, una tecnica innovativa basata sul metodo delle bottiglie è stata sviluppata dall'azienda Ankom Technology®, Macedonia, NY, USA. Tale tecnica è esposta in dettaglio nel *Capitolo 5* riguardante i *Materiali e metodi*.

3.3 Effetto dell'inoculo microbico sulla degradabilità e sulla produzione di gas degli alimenti zootecnici misurate in vitro

È largamente riconosciuto che la fonte principale di variazione delle tecniche *in vivo*, *in situ* e *in vitro* è rappresentata dalle caratteristiche qualitative del liquido ruminale. In letteratura viene indicato che, la qualità del liquido ruminale, in termini di microflora, sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo, risulta essere fortemente influenzata dalla composizione della dieta somministrata agli animali e dalla frequenza dei pasti (Mould et al., 2005). Inoltre, la bibliografia esistente riporta che le prove *in vivo* e *in situ* dovrebbero essere condotte su animali riceventi gli alimenti o le diete d'indagine, in maniera tale da limitare gli effetti della dieta e ottenere un liquido ruminale “ideale” per quanto concerne la

popolazione microbica. A tal proposito, alcuni autori (Lindberg, 1981) hanno notato che la digestione *in situ* dei foraggi risulta essere maggiore nel rumine di animali che usualmente assumono una dieta a base di foraggi, rispetto ad animali riceventi una dieta con elevato contenuto in concentrati. Studi condotti *in situ* hanno evidenziato che, nell'ambito delle diete a base di foraggi, il tipo e la qualità del foraggio offerto agli animali influenza sia le cinetiche di degradazione della dieta, sia la degradabilità totale della dieta stessa. Nonostante queste criticità, il grande vantaggio delle metodologie *in situ*, comparate ai metodi *in vitro*, è quello di condurre le fermentazioni direttamente nel rumine dell'animale. Tuttavia, come menzionato precedentemente, l'uso delle tecniche *in situ* sta progressivamente declinando per questioni di natura etica legate alla salute e al benessere animale (Adesogan, 2002) lasciando spazio alle tecniche *in vitro*. I metodi *in vitro* cercano di riprodurre artificialmente l'ambiente ruminale, ma comunque necessitano degli animali come fonte per l'inoculo microbico. Quando il liquido ruminale viene prelevato da animali non fistolati, la difficoltà più grande è quella di riuscire ad ottenere un campione rappresentativo del numero e della concentrazione della popolazione microbica (Mould et al., 2005). È stato dimostrato che una corretta procedura di campionamento deve evitare la contaminazione dell'inoculo con l'ossigeno e la saliva, poiché entrambi possono alterare le caratteristiche dell'inoculo stesso e, di conseguenza, modificare i processi fermentativi. In particolare, la presenza di saliva può alterare il pH dell'inoculo microbico (Raun e Burroughs, 1962), mentre la contaminazione da ossigeno può ridurre, o addirittura inibire, l'attività e la crescita dei microrganismi ruminanti, che sono in prevalenza strettamente anaerobici (Hungate, 1966). In maniera analoga a quanto osservato *in situ*, alcuni studi riportano che la digeribilità *in vitro* dei foraggi subisce un calo notevole quando l'inoculo viene raccolto da animali donatori che hanno ricevuto una dieta ricca in concentrati (Tejido et al., 2002; Vargas et al., 2009). A tal proposito, alcuni autori (Schoner et al., 1981, Menke and Steingass, 1988; Cone et al., 1996; Nagadi et al., 2000) hanno osservato che, diete ad elevato tenore in alimenti concentrati

influenzano in maniera significativa il numero di microrganismi presenti nell'inoculo. A differenza di quanto riportato per i valori di digeribilità, le diete somministrate ad animali donatori hanno mostrato effetti minori sulla produzione di gas. Nagadi et al. (2000) hanno affermato che l'inoculo microbico non influenza enormemente i valori di produzione di gas, a patto che esso presenti un'attività microbica tale da sostenere una produzione minima di gas. In aggiunta, Cone et al. (1996), hanno evidenziato che l'attività microbica dell'inoculo è influenzata notevolmente dal momento del prelievo; in particolare, gli autori hanno riscontrato la massima attività dei microrganismi presenti nel rumine, in inoculi raccolti dopo il pasto. Infine, Menke e Steingass (1988) sostengono che un minimo di attività microbica è garantita fintantoché l'inoculo microbico è raccolto da animali a digiuno da non più di 16 ore. Gli stessi autori indicano che l'inoculo microbico prelevato prima del pasto presenta una composizione meno variabile rispetto a quello campionato dopo il pasto.

4 Obiettivi

Il presente lavoro di tesi ha studiato l'effetto dell'inoculo microbico sui valori di degradabilità e di produzione di gas forniti *in vitro* da tre diete per vitelloni da carne. Le diete oggetto d'indagine sono state tre:

- una dieta "tradizionale" (TR), contenente il 14,4% di proteina grezza (PG), composta di ingredienti che vengono largamente utilizzati in Italia, ed in particolare in Pianura Padana, per il razionamento dei vitelloni da carne.
- una dieta ipoproteica (LO), contenente il 10,7% di proteina grezza, somministrata allo scopo di ottimizzare il metabolismo proteico degli animali e ridurre le escrezioni di azoto per via urinaria e fecale
- una dieta nutraceutica (NU), che abbina un ridotto contenuto proteico (10,7% di proteina grezza), all'integrazione di semi di lino estruso, ricchi in acidi grassi della serie omega-3, somministrata allo scopo di migliorare il profilo acidico della carne e di ridurre la formazione di gas (in particolare metano) nel rumine, dal momento che le fonti lipidiche possono inibire la produzione di gas.

In particolare, sfruttando diverse condizioni sperimentali, gli obiettivi specifici della ricerca sono stati i seguenti:

- a. valutare l'effetto della dieta e dell'inoculo sulle cinetiche di produzione di gas fornite dalle 9 combinazioni tra dieta e liquido ruminale (3 diete × 3 inoculi microbici). Due tempi di incubazione sono stati considerati:
 - i) 48 h, che è il classico tempo di incubazione impiegato per la misurazione della degradabilità della frazione fibrosa della dieta (NDFd).
 - ii) T $\frac{1}{2}$, che è il tempo a cui si associa la maggiore attività microbica dell'inoculo, corrispondente al tempo in cui si realizza metà della produzione asintotica di gas.

- b. determinare e confrontare i valori di degradabilità della frazione fibrosa della dieta (NDFd) e della sostanza secca (TDMD) fornite da due tecniche *in vitro* (*Ankom Daisy^{II}* e *Ankom^{RF}*)

- c. calcolare i contenuti di energia metabolizzabile (ME) delle tre diete analizzate, utilizzando tre diverse equazioni che stimano l'ME in funzione della composizione chimica delle diete e dei valori di NDFd misurata *in vitro* a 48 h di incubazione (prima equazione), oppure sulla base della composizione chimica e della produzione di gas della dieta misurata *in vitro* a 24 h di incubazione (seconda e terza equazione).

5 Materiale e metodi

5.1 Apparecchiature utilizzate

5.1.1 Ankom Daisy^{II} Incubator

L'incubatore Daisy^{II} è prodotto da un'azienda statunitense (*Ankom Technology*[®], Macedonia, New York) e trova applicazione in molti studi sulla digeribilità *in vitro* degli alimenti.

In maniera molto schematica, lo strumento è costituito da: a) camera di digestione; b) quattro giare; c) sacchetti porosi.

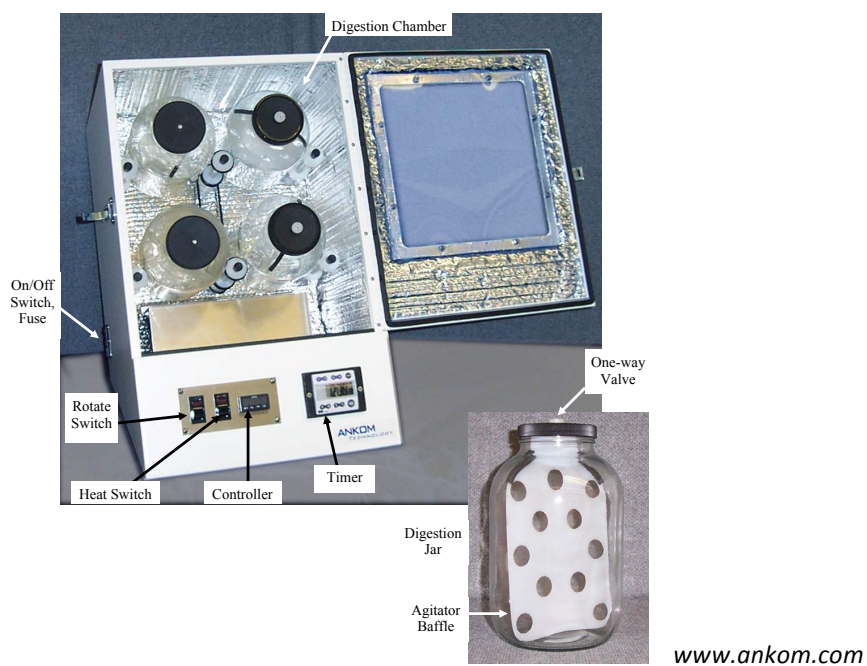
- a) una camera di digestione isolata termicamente in cui la temperatura viene mantenuta costantemente a 39,5 °C;
- b) quattro giare, dette vasi di digestione, in vetro e munite di un tappo in materiale plastico. Ciascuna giara trova sistemazione nella camera su appositi supporti rotanti che consentono l'agitazione automatica. All'interno di ogni vaso è presente un deflettore di flusso in materiale plastico che favorisce il miscelamento del liquido a contatto con i FB;
- c) sacchetti porosi (filter bags FB tipo "F57"): Ogni sacchetto è caratterizzato da una matrice filtrante 3D in grado di garantire il massimo flusso di solvente - soluzione senza avere però la perdita di particelle fini. La superficie filtrante è in grado di trattenere particelle di diametro superiore a 25 micron (ANKOM Technology, 2012);

Alcune specifiche tecniche dello strumento sono riportate in *Tabella 1*.

TABELLA 1: Specifiche tecniche Ankom Daisy II Incubator

Specifiche operative	
Dimensioni del campione	0.25 g – 1.0 g
N° di campioni analizzabili	> 100
Specifiche dello strumento	
Temperatura di esercizio	39.5 °C
Dimensioni e peso	44 cm larg. x 47 cm prof. x 6 cm alt.; 34 kg
Alimentazione	110 – 240 V, 50/60 Hz
Tipo di FB	F57

FIGURA 2: Ankom Daisy II Incubator



Il sistema Daisy^{II} permette di mantenere un ambiente anaerobico e, pur lavorando con solo quattro vasi di digestione, consente di analizzare più di cento campioni contemporaneamente. In questo modo l'inoculo ruminale ed il medium (detto anche tampone) sono divisi nei quattro vasi di digestione anziché in singoli flaconi o provette come avviene nei metodi convenzionali. I campioni alimentari da analizzare sono inseriti nei filter bags, che vengono quindi sigillati tramite termosaldatura per evitare perdite di materiale e consentire una maggior facilità di movimentazione. L'uso della termosaldatura come modalità di chiusura dei FB è consigliato dalla stessa ditta ANKOM. Inoltre, la stessa azienda, per garantire l'identificazione dei FB anche dopo le analisi, consiglia l'uso di marcatori resistenti ai solventi del tipo F08.

5.1.2 Ankom^{RF} gas production system

Tale apparecchiatura è prodotta anche essa da *Ankom Technology*[®] e viene commercializzata con il nome di "Ankom^{RF} gas production system". E' uno strumento innovativo che permette di misurare sia la degradabilità, sia la produzione di gas. La strumentazione è caratterizzata dalle specifiche tecniche elencate in *Tabella 2*.

Il sistema, altamente automatizzato, è costituito da: a) set di giare; b) moduli attivi; c) centralina wireless (detta "*base coordinator*").

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

TABELLA 2: Specifiche tecniche di Ankom gas production system RF

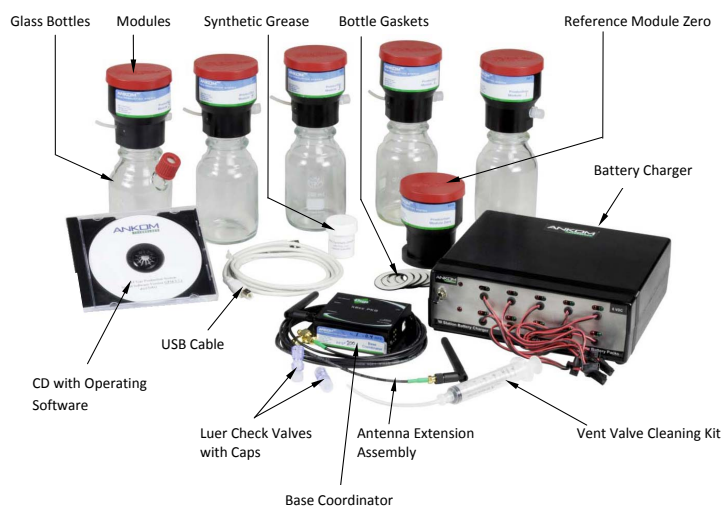
Ankom gas production system RF
Organizzazione modulare ed espandibile (fino a 50 moduli per set);
Alimentazione dei moduli a batterie;
Valvole di sfiato a prova di blocco;
Altezza moduli RF1: 20,3 cm (con bottiglia da 310 mL);
Diametro del modulo: 7,2 cm (senza bottiglia);
Accuratezza della misura: $\pm 1\%$ 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.

b) Il “modulo attivo” è formato da un cilindro in plastica cavo internamente e chiuso alla base dove presenta tre aperture: un primo foro comunica con il sensore di pressione; un secondo foro è collegato all’elettrovalvola di sfiato comandata attraverso il software, ed una terza apertura comunica invece con una valvola meccanica che dall’esterno permette un rapido attacco con il condotto adduttore della CO₂, necessario per creare l’anaerobiosi prima dell’incubazione. Nella cavità interna sono quindi collocati: un sensore di pressione, una scheda elettronica ed una batteria ricaricabile che permette di

alimentare la valvola e l'antenna di collegamento wireless. I moduli "attivi", per un corretto funzionamento del sistema, vanno affiancati al cosiddetto "modulo zero" il quale non è collegato a nessuna giara ed è posto esternamente all'incubatore. La funzione fondamentale del "modulo zero" è quella 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 utilizzato con qualsiasi PC (Windows XP® o Vista®). Tale programma consente di gestire l'intero apparato (impostandone la pressione di apertura delle elettrovalvole e l'intervallo di registrazione dei dati) ed 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 rappresentato da un foglio Excel standard grazie al quale gli utenti possono generare facilmente le curve di produzione di gas (ANKOM Technology, 2012).

FIGURA 3: Ankom Gas Production System RF



www.ankom.com

5.2 Disegno sperimentale

La prova *in vitro* condotta ha utilizzato 9 vitelloni (3 animali/dieta) come donatori di inoculo microbico, stabulati presso l'azienda agraria "Toniolo" dell'Università di Padova. Le caratteristiche principali degli animali sono riportate in *Tabella 3*. Al momento del prelievo dell'inoculo microbico gli animali stavano ricevendo le tre diete oggetto di studio da circa 10 mesi.

TABELLA 3: Caratteristiche degli animali

CARATTERISTICHE ANIMALI
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

Nell'ambito della ricerca sono state eseguite due procedure incubatorie caratterizzate da differenti condizioni sperimentali. Anzitutto, la prima prova ha avuto un tempo di incubazione pari a 48 h ed ha sfruttato due differenti apparecchiature, l'incubatore *Daisy* ed il *gas production system RF*. La seconda prova, è stata stoppata a $T_{1/2}$ e si è basata sulla sola strumentazione RF. In entrambi i casi sono state analizzate tutte le possibili combinazioni dieta – inoculo microbico in più replicazioni.

Con l'apparecchiatura Daisy^{II} è stato adottato il seguente disegno sperimentale: 3 diete (TR, LO, NU) × 3 inoculi microbici (TR, LO, NU) × 4 repliche, più 12 bianchi (*filter bags* senza campione alimentare), per un totale di 48 *filter bags* incubati. In ogni *filter bag* sono stati pesati 0,25 di campione alimentare. Ogni giara è stata riempita con 16 *filter bags*, 0,8 l di inoculo microbico e 1,6 l di tampone (rapporto tra inoculo e tampone di 1:2). La quarta giara è stata riempita con 2,4 l di acqua, per consentire la corretta rotazione delle 4 giare.

Con lo strumento Ankom^{RF} è stato seguito il seguente disegno sperimentale: 3 diete (TR, LO, NU) × 3 inoculi microbici (TR, LO, NU) × 3 repliche, più 9 bianchi (bottiglie senza campione alimentare, contenenti solo l'inoculo microbico e il tampone), per un totale di 36 bottiglie incubate. Nell'incubazione a 48 h ciascuna bottiglia è stata riempita con 0,5 g di campione alimentare, 25 ml di inoculo microbico e 50 ml di tampone (rapporto tra inoculo e tampone di 1:2, come nel Daisy^{II}). Nell'incubazione a $T_{1/2}$, tutte le quantità sono state raddoppiate: 1 g di campione alimentare incubato con 50 ml di inoculo microbico e 100 ml di tampone (rapporto tra inoculo e tampone di 1:2).

Di seguito sono ricapitolate, in maniera schematica, le condizioni sperimentali che hanno caratterizzato il presente lavoro.

5.2.1 Prima incubazione

Durata	48 h
Strumentazione	
<i>Ankom DAISY^{II}</i>	- 48 FB (16 per giara) tra cui 12 FB (4 FB per giara) bianchi; - 0.25 g di dieta/FB - 1600 ml di tampone/giara - 800 ml di inoculo/giara
<i>Ankom^{RF}</i>	- 36 bottiglie tra cui 9 bianchi - 0.5 g di dieta per bottiglia - 50 ml di tampone/bottiglia - 25 ml di inoculo/bottiglia
Medium (tampone)	Menke (1988)
Tipi di diete	TR; LO; NU
Tipi di inoculo microbico	TR; LO; NU

5.2.2 Seconda incubazione

Durata	10 h
Strumentazione	
<i>Ankom DAISY^{II}</i>	(no)
<i>Ankom^{RF}</i>	- 36 bottiglie tra cui 9 bianchi - 1 g di dieta per bottiglia - 100 ml di medium per bottiglia - 50 ml di inoculo per bottiglia - 100 ml di tampone/bottiglia - 50 ml di inoculo/bottiglia
Tipi di diete	TR; LO; NU
Tipi di inoculo microbico	TR; LO; NU

5.3 *Diete sperimentali*

La formulazione delle 3 diete oggetto di analisi è riportata in *Tabella 4*. Le caratteristiche chimiche e vitaminico - minerali di ogni dieta sono riportate nelle *Tabelle 5 e 6*.

TABELLA 4: Formulazione delle diete

Alimento	Dieta tradizionale (TR)		Dieta basso impatto (LO)		Dieta nutraceutica (NU)	
	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 NRC	0.20	0.20	-	-	-	-
Min-vit LO	-	-	0.20	0.20	-	-
Min-vit NU	-	-	-	-	0.20	0.20
TOTALE	15.75	10.15	15.75	10.13	15.75	10.14

TABELLA 5: Composizione chimica delle diete

		Dieta tradizionale (TR)	Dieta basso impatto (LO)	Dieta nutraceutica (NU)
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
Ca	g/kg SS	3.84	3.84	3.76
P	g/kg SS	3.27	3.10	2.87
N	g/kg SS	0.78	0.83	0.78
Mg	g/kg SS	1.80	1.72	1.62
K	g/kg SS	8.12	7.22	6.49
Cl	g/kg SS	2.05	1.77	1.78
S	g/kg SS	1.50	1.32	1.22
CEN	% SS	4.35	3.88	4.12
Fe	mg/kg SS	122.18	108.15	108.16
Cu	mg/kg SS	18.19	8.53	7.49
Zn	mg/kg SS	58.53	26.63	26.98
Co	mg/kg SS	0.19	0.10	0.12
I	mg/kg SS	0.57	0.57	0.34
Se	mg/kg SS	0.18	0.10	0.12
Mn	mg/kg SS	48.29	25.23	25.75
Mo	mg/kg SS	0.98	0.95	0.77
Vit A	UI/kg SS	4,123	4,207	4,176
Vit E	UI/kg SS	24.95	29.81	116.38
Vit D3	UI/kg SS	400.69	401.29	400.82

SS: Sostanza Secca; UF: unità foraggiere scandinave; UFC Unità Foraggera Carne 1 U.F.C. = 1855 Kcal/kg; PG: Proteina Grezza; NDF: Fibra al detergente Neutro; ADF: Fibra al Detergente Acido; LG: Lipidi Grezzi; Ca: calcio; P: fosforo; N: azoto; Mg: magnesio; K: potassio; Na: sodio; Cl: cloro; S: zolfo; Fe: ferro; Cu: rame; Zn: zinco; Co: cobalto; I: iodio; Se: selenio; Mn: manganese; Mo: molibdeno; Vit: vitamina.

		Dieta tradizionale (TR)	Dieta basso impatto (LO)	Dieta nutraceutica (NU)
SFA	% SS	15.32	15.98	15.43
MUFA	% SS	15.99	16.13	15.77
PUFA	% SS	36.44	35.31	35.63
ω3	% SS	2.50	2.00	4.35
ω6	% SS	33.94	33.30	31.28
ω6/ ω3		13.55	16.62	7.19

SFA: Saturated Fatty Acids – Acidi Grassi Saturi; MUFA: Mono-Unsaturated Fatty Acids – Acidi grassi mono-insaturi; PUFA: Poly-Unsaturated Fatty Acids – Acidi grassi poli-insaturi.

TABELLA 6: Integrazione vitaminico-minerale delle diete

	Dieta tradizionale (TR)		Dieta basso impatto (LO)		Dieta nutraceutica (NU)	
	Ingrediente attivo	Formul.	Ingrediente attivo	Formul.	Ingrediente attivo	Formul.
	%		%		%	
CaCO ₃	38.50%	16.10%	38.50%	20.91%	38.50%	20.91%
NaCl	39.00%	3.21%	39.00%	3.21%	39.00%	3.21%
MgO	52.00%	0.00%	52.00%	0.00%	52.00%	0.00%
CuSO ₄ · 5H ₂ O	25.00%	0.20%	25.00%	0.00%	25.00%	0.00%
ZnO	75.00%	0.20%	75.00%	0.00%	75.00%	0.00%
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	5.00%	0.01%	5.00%	0.00%	5.00%	0.02%
IK	68.00%	0.00%	68.00%	0.00%	10.00%	0.05%
Na ₂ SeO ₃	2.25%	0.02%	2.25%	0.00%	1.00%	0.10%
MnO	62.00%	0.16%	62.00%	0.00%	62.00%	0.16%
Vit. A	1,000,000	0.01%	1,000,000	0.01%	1,000,000	0.01%
Vit. E	50.00%	0.08%	50.00%	0.08%	50.00%	1.00%
Vit. D	500,000	0.00%	500,000	0.00%	500,000	0.00%
CLA	-	-	-	-	100.00%	40.00%
F. di frum	-	80.00%	-	75.78%	-	34.54%
TOTALE	-	100.00%	-	100.00%	-	100.00%

In maniera semplificativa, le tre diete sono caratterizzate dalla medesima composizione di base che comprende: insilato di mais, farina di mais, polpe di barbabietola, frumento, paglia e un integratore vitaminico-minerale. In aggiunta però, le tre tipologie di *unifeed* presentano delle differenze:

- la dieta TR, utilizzata comunemente negli allevamenti bovini della Pianura Padana, mostra un tenore in proteina maggiore (14,4% PG);
- la dieta LO ha un ridotto contenuto proteico (10,7%), allo scopo di ottimizzare il metabolismo proteico degli animali e ridurre le escrezioni di azoto per via urinaria e fecale
- la dieta NU abbina un basso contenuto proteico (10,7%), alla presenza di lino estruso, come fonte di acidi grassi della serie omega-3, ai fini di migliorare il profilo acidico della carne e di ridurre la formazione di gas nel rumine, dal momento che le fonti lipidiche possono inibire la produzione di gas.

Il basso contenuto proteico che caratterizza le diete LO e NU è il risultato della sostituzione della farina di soia con il mais.

5.4 Descrizione tecnica in vitro

5.4.1 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 (nel caso si utilizzi *Ankom gas production System RF*);
- Preparazione e inserimento del campione alimentare nei filter bags (FB) (se si utilizza il Daisy^{II});

- Preparazione componenti del medium (necessaria in tutti i casi).

5.4.1.1 Preparazione e inserimento del substrato nei filter bags (FB)

Anzitutto, i *filter bags* devono subire un lavaggio in acetone per rimuovere ogni eventuale impurità che possa ostruire la matrice filtrante andando quindi a compromettere l'interazione tra il substrato di fermentazione e la miscela medium-inoculo. Una volta asciugati in stufa, i FB vanno numerati e pesati. In seguito, si può procedere con l'inserimento, in ciascuno di essi, della quantità specifica di dieta (come previsto dal disegno sperimentale).

5.4.1.2 Preparazione componenti del medium (o tampone)

La ricerca ha previsto l'uso del medium (o tampone) proposto da Menke e Steingass (1988), che risulta particolarmente utile per caratterizzare gli alimenti e le diete per ruminanti dal punto di vista dell'apporto energetico. Il medium è composto di cinque soluzioni (vedi *Tabella 7*). Generalmente, le soluzioni tampone, macrominerali e microminerali, vengono preparate il giorno antecedente la prova sperimentale. La resazurina può essere preparata anticipatamente, tuttavia richiede una conservazione più attenta (in un luogo chiuso e al riparo dalla luce) per la sua natura fotosensibile. Diversamente, la parte riducente del medium, va preparata il giorno stesso dell'incubazione perché non consente una conservazione protratta nel tempo. I cinque composti sono uniti solamente poche ore prima dell'incubazione e, nell'istante in cui si miscela anche la parte riducente (ultima in ordine di aggiunta) si assiste al viraggio: la soluzione da una colorazione tipicamente violacea diventa rapidamente trasparente. Soprattutto durante queste ultime fasi di preparazione del medium, è indispensabile sottoporre la miscela a un flusso di CO₂ al fine di conservare un basso potenziale di ossido-riduzione.

TABELLA 7: Composizione medium (o tampone) Menke e Steingass (1988)

Soluzione	Quantità
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
Soluzione macromineraie:	
<i>Sodiofosfato 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</i>	1000 ml
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>	0.8 g
<i>Manganese cloruro tetraidrato (MnCl₂·4H₂O)</i>	10.0 g
<i>Portato a volume</i>	100 ml
Soluzione di resazurina:	
<i>Resazurina</i>	0.1 g
<i>Portata a volume con</i>	100 ml
Soluzione riducente (per ogni litro di soluzione finale):	
<i>Acqua distillata</i>	47.5 ml
<i>Sodio solfuro nonaidrato (NaS·9H₂O)</i>	0.336 g
<i>Soda 1M (NaOH)</i>	2 ml

5.4.2 Prelievo dell'inoculo microbico

L'inoculo microbico è stato prelevato da 9 vitelloni (3 animali/dieta) stabulati presso le strutture dell'Azienda Agraria Sperimentale "L.Toniolo" dell'Università di Padova ma di proprietà dell'Associazione Allevatori della Provincia Autonoma di Trento. In ambedue le repliche sperimentali, il prelievo dell'inoculo microbico è avvenuto prima della distribuzione mattutina dell'*unifeed*, pertanto da animali a digiuno dalla sera prima.

Tale operazione avviene grazie all'uso 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 una beuta e, filtrandolo attraverso tre strati di garza da casaro, è versato in thermos di 500 ml di capacità. Per evitare stress termici che possono compromettere l'attività dei microrganismi ruminanti, sia la beuta di raccolta che i thermos, devono essere preriscaldati con acqua calda (39-40°C) e svuotati solo 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-Laboratorio¹, non può essere ridotto a meno di 15 minuti. Infine, una volta raggiunto il laboratorio di analisi, l'inoculo microbico viene nuovamente filtrato attraverso un doppio strato di garza da casaro prima di essere incubato.

5.4.3 Procedura d'incubazione

Come accennato in precedenza, in seguito al prelievo, l'inoculo microbico deve giungere in laboratorio nel minor tempo possibile, qui, viene filtrato per la seconda volta con un triplo strato di garza, riposto in un recipiente munito di

¹ Laboratorio del Dipartimento di Scienze animali dell'Università di Padova; campus di Agripolis, viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (Pd).

apposito dispenser ed immerso a bagnomaria per mantenere la temperatura di 39°C. Contemporaneamente, le parti del medium riducente ed ossidante (quest'ultima costituita da: *tampone*, *macromineraie*, *micromineraie* e *resazurina*), preparate separatamente ed in tempi diversi, vengono unite in un unico contenitore munito di un apposito dosatore ed immerso anch'esso a bagnomaria. Durante questa fase, sia l'inoculo microbico che il medium (detto anche tapone), 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).

5.4.3.1 Procedura d'incubazione con Ankom Daisy II Incubator

Almeno ventiquattro ore prima di ogni prova sperimentale, le giare vuote del Daisy^{II}, devono essere preriscaldate nella camera d'incubazione alla temperatura di 39°C.

Durante l'inoculazione, le operazioni da eseguire sono estremamente semplici: basta riempire un vaso di digestione per volta con le quantità opportune di medium e inoculo. Il medium Menke (1988) è stato aggiunto a tutte e tre le tipologie di liquido ruminale (TR; LO; NU) utilizzando, quindi, tre vasi di digestione, ciascuno dei quali contenenti 16 FB (vedi disegno sperimentale) con un diverso tipo inoculo. Il quarto vaso, non usato ai fini sperimentali, è stato riempito con 2.4 l di acqua e comunque inserito nella camera per permettere la corretta rotazione delle giare durante il periodo d'incubazione.

5.4.3.2 Procedura d'incubazione con Ankom gas production System RF

Come visto in precedenza, anche le giare del sistema Ankom^{RF} contenenti la quantità di dieta (come previsto dal disegno sperimentale) devono essere preriscaldate alla temperatura di 39°C inserendole nell'incubatore già munite di "modulo attivo" con batteria scollegata (in maniera tale da evitare inutili sprechi

di energia).

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:

- Apertura dell'incubatore, estrazione di una giara, ancora priva di medium e inoculo, e successiva richiusura dell'incubatore. Tale operazione deve essere molto rapida per evitare la perdita di temperatura del sistema;
- Rimozione del "modulo attivo" dalla giara e collegamento della batteria presente all'interno del modulo (verificando al PC il suo grado di voltaggio);
- Tramite l'uso di dosatori distinti (in quanto in entrambe le incubazioni sono stati utilizzati 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;
- Avvitamento del "modulo attivo" sulla giara e inserimento di questa 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 (10 h o 48 h).

In tutte e due le prove sperimentali e con entrambe le strumentazioni (*Ankom gas production system RF* e con *Daisy II*), le quantità di medium e inoculo, seppur differenti, hanno rispettato sempre il rapporto 2:1, in accordo con quanto affermato da Mould et al., 2005.

5.5 Analisi fisico - chimiche

Ai fini del presente lavoro, in ogni procedura incubatoria sono state eseguite le seguenti analisi fisico - chimiche:

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

Per quanto concerne il metodo *Ankom gas production system RF*, 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. Nel caso di *Ankom Daisy II*, i vasi di digestione, una volta tolti dall'incubatore, aperti e sottoposti a misurazione del pH, possono tranquillamente essere svuotati prestando attenzione a recuperare tutti i 16 FB (per vaso) su cui saranno eseguite le analisi NDF.

5.5.1 Misurazione del pH

La determinazione del pH va eseguita sui liquidi di fermentazione contenuti in ciascuna giara RF (metodo *Ankom gas production system RF*) o vaso di digestione (nel caso dell'*Ankom Daisy Incubator*), immediatamente dopo la chiusura dell'incubazione. Tra una misurazione e l'altra è importante effettuare un'accurata pulizia dell'elettrodo con H₂O distillata per evitare di inquinare le misure successive. Inoltre, è utile controllare anche il pH del medium, del liquido ruminale e della miscela tra i due prima dell'incubazione.

5.5.2 Analisi 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” (NDF), 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 sono stati utilizzati due strumenti differenti: il *Fibertech Analyzer (VELP®Scientifica)*, e l'*ANKOM²⁰⁰ Fiber Analyzer (Ankom Technology®, Macedonia, NY, USA)*. Nello specifico, la *Tabella 8*, sottostante, mostra il campo di utilizzo delle due diverse strumentazioni nell’ambito della ricerca svolta.

Tabella 8: Metodi utilizzati per l’analisi NDF

incubazione		Strumento	
		Fibertech Analyzer	ANKOM ²⁰⁰ Analyzer
1 [^]	Daisy		X
	RF	X	
2 [^]	RF		X ²

² Dato che l’ANKOM²⁰⁰ Fiber Analyzer si basa sull’utilizzo dei filter bags, è stato necessario eseguire, a conclusione dell’incubazione e prima dell’analisi NDF, una filtrazione del contenuto di ogni singola giara RF in FB F57. Tale operazione, effettuata sfruttando una pompa di depressione ad acqua, si è rivelata lunga e laboriosa (con il rischio di non recuperare tutto il materiale, specialmente quello adeso alle pareti delle giare RF) ma necessaria per standardizzare l’analisi NDF.

In particolare, con il *Fibertech Analyzer (VELP®Scientifica)*, al termine dell'incubazione, 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). Lo strumento *ANKOM200 Fiber Analyzer* lavora in modo analogo al *Fibertech Analyzer*, mantenendo tuttavia i campioni nei *filter bags*. Il protocollo seguito in questo caso per l'analisi NDF è quello proposto dalla stessa azienda Ankom (ANKOM Technology, Method 6 4/13/11).

La soluzione neutra è formata principalmente da *Sodio Lauril Solfato ed EDTA*, caratterizzata da un grado di acidità prossimo a 7.0. Tale composto permette di allontanare le frazioni solubili presenti nella cellula vegetale (pectine, zuccheri e amido, proteine e lipidi) conservando la frazione insolubile della parete vegetale. Tuttavia, la stessa parete vegetale, può essere contaminata da composti non di natura fibrosa che sono "intrappolati" al suo interno (principalmente amido). Per ovviare questo problema, si ricorre all'utilizzo di enzimi specifici come *l'alfa-amilasi*, fallire in questa correzione significherebbe andare incontro ad una sovrastima della frazione fibrosa.

5.6 Procedure di calcolo

5.6.1 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 (1).

$$^{(1)} GP = Pt * STB / Po / (SS\% * SScamp)$$

Dove,

GP = Produzione di gas, ml/g SS;

Pt = Pressione al tempo *t*, PSI;

STB = Spazio di testa bottiglie, ml = (volume bottiglia) – (volume medium) = 310 - 75 = 235 ml;

Po = Pressione atmosferica, PSI = 14,66 PSI;

SS % = Percentuale di SS dei campioni, %;

SS camp = Quantità campione (dieta) incubato, g.

5.6.2 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 (2) (Groot et al., 1996).

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

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;

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

t = Tempo (h).

5.6.3 Stima del valore energetico metabolizzabile con diverse tecniche

Utilizzando i dati di digeribilità (NDFd) e di produzione di gas (GP₂₄) della prima incubazione a 48 h, è stato possibile stimare il valore energetico metabolizzabile (ME) delle diete applicando tre differenti equazioni (3) (4) (5) basate sulla composizione chimica delle diete stesse.

Mediante la degradabilità NDF (g/kg DM) a 48 h secondo la procedura suggerita da NRC (2001):

$$^{(3)} \text{ME}_{\text{NRC}} \text{ (MJ/kg DM)} = [-0.45 \times 4.184 + 1.01 \times \text{DE}]$$

Con,

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

Dove,

DE = Digestible Energy – Energia digeribile, MJ/kg SS

NDFd = Neutral Detergent Fibre digestibility – digeribilità della Fibra al Detergente Neutro;

NFC = Carboidrati Non Fibrosi = $100 - (\text{NDF} + \text{PG} + \text{LG} + \text{CEN})$;

tdNFC = True Digestibility NFC – Digeribilità Vera NFC;

tdPG = True Digestibility PG – Digeribilità Vera PG;

FA = Fatty Acids – Acidi Grassi;

tdFA = True Digestibility FA – Digeribilità Vera FA.

Mediante la produzione di gas in vitro (GP 24, ml/g DM) a 24 h:

a) Menke e Steingass (1988)

$$^{(4)} \text{ME}_{\text{Menke}} = 1.06 + 0.0314 \times \text{GP}_{24_{200}} + 0.0084 \times \text{PG} + 0.0220 \times \text{LG} - 0.0081 \times \text{CEN}$$

Dove,

$GP24_{200}$ (ml/200 mg di DM 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;

b) Robinson et al. (2004)

$$^{(5)} ME_{UCD} = 1.25 + 0.0292 \times GP24 + [0.0143 \times (CP - ADICP)] + 0.0246 \times LG$$

Dove,

$GP24$ = Gas Prodotto dopo 24 h di incubazione in vitro, ml/g DM;

CP = Crude Protein – Proteina Grezza (PG);

$ADICP$ = Acid Detergent insoluble Crude Protein;

LG = Lipidi grezzi.

5.6.4 Calcolo della digeribilità vera della sostanza secca

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

$$^{(6)} TDMD (\%) = ((DM - NDF_{res}) / DM) * 100$$

Dove,

DM = Dry Matter – Sostanza secca (SS), g;

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

5.7 *Analisi statistica*

I valori di pH, di degradabilità, di energia metabolizzabile, nonché i valori delle produzioni gassose, sono stati sottoposti ad analisi della varianza utilizzando il pacchetto statistico SAS (2010) e sfruttando due diversi modelli statistici.

- Per i valori di degradabilità NDFd e TDMD e di ME_{NRC} della prima incubazione, il modello statistico include come fattori di variazione lo strumento, la dieta ed il liquido ruminale prelevato (inoculo microbico);
- Per la produzione gassosa (di entrambe le incubazioni) e per i valori di degradabilità NDFd e TDMD (della seconda incubazione), il modello statistico considera come fattori di variazione il liquido ruminale e la dieta. Questo secondo modello fattoriale è stato applicato anche ai dati di pH e di energia metabolizzabile (ME_{Menke} e ME_{UCD}).

Le differenze tra le diverse tesi sperimentali sono state valutate mediante la tecnica dei contrasti ortogonali considerando come soglia di significatività $P < 0.05$. In particolare sono stati oggetto di studio 4 combinazioni di contrasti ortogonali:

- Il contrasto tra la dieta TR e le due diete a ridotto contenuto proteico (LO e NU);
- Il contrasto tra la dieta LO e NU;
- Il contrasto tra l'inoculo microbico derivante da animali donatori alimentati con dieta TR e gli inoculi (LO e NU) derivanti da animali a cui sono state somministrate tali diete;
- Il contrasto tra l'inoculo LO prelevato da vitelloni alimentati con dieta LO e l'inoculo NU derivante da animali donatori che hanno ricevuto la dieta NU.

6 Risultati

La *Tabella 9* riporta i valori medi di digeribilità NDF e TDMd ottenuti con le due diverse tecniche *in vitro*: *Ankom Daisy II Incubator* e *Ankom Gas Production system RF*.

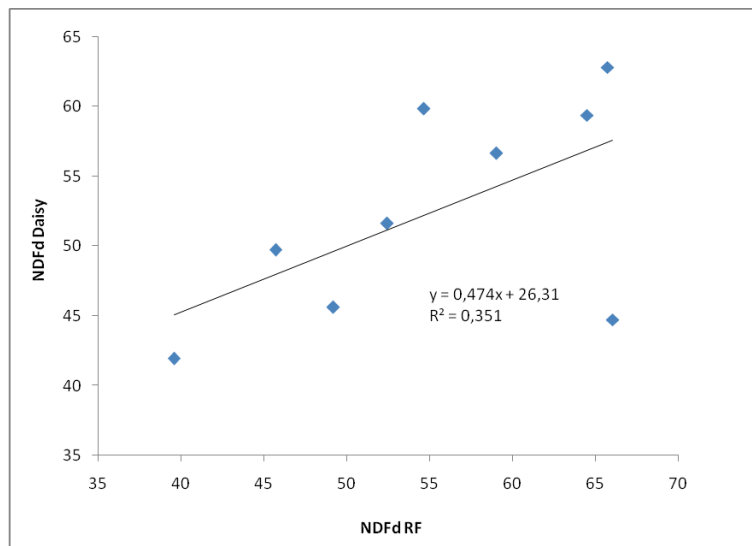
Tabella 9 : Valori medi di NDFd ottenuti con Daisy ed RF

		Strumento		
		DAISY	RF	SE
NDFd	%	52.5	55.3	0.96
TDMd	%	84.0	84.9	0.32
ME _{NRC}	MJ/kg DM	12.7	12.8	0.05

SE: Errore Standard.

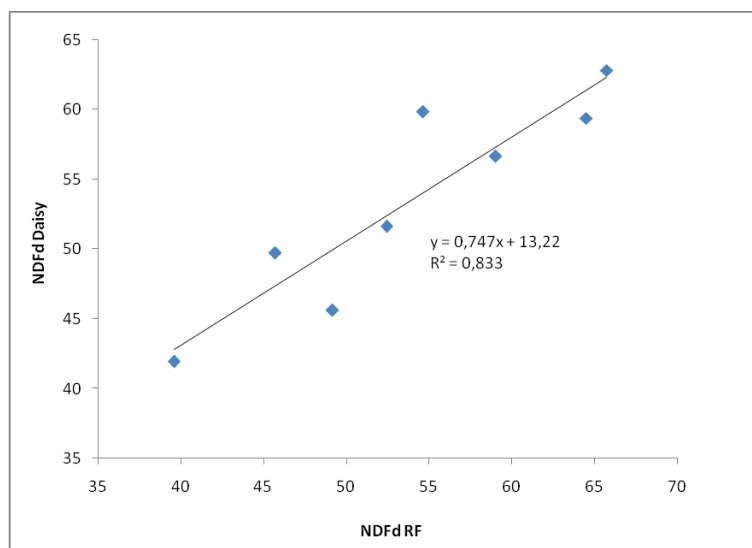
Tale confronto mostra come i valori ottenuti con il *Daisy II Incubator* siano sempre minori. Ciò vale soprattutto per la digeribilità NDF, dove la media dell'NDFd (52.5 %) del *Daisy* si discosta significativamente da medesimo valore ottenuto con l'RF (55.3 %). Per tale motivo è stata effettuata la procedura di regressione lineare eseguita sui dati mediati di NDFd ottenuti con le due differenti strumentazioni (*Grafici 1 e 2*). In particolare, il *Grafico 1* tiene in considerazione le 9 combinazioni Dieta - Inoculo mentre nel *Grafico 2*, la retta di regressione è stata costruita a partire da 8 punti ed è caratterizzata da un $R^2 = 0.83$.

Grafico 1: Regressione lineare tra i valori NDFd ottenuti con Daisy e con RF



Regressione lineare tra i 9 valori mediati di NDFd (delle diverse combinazioni Dieta – Inoculo) ottenuti con i due strumenti.

Grafico 2: Regressione lineare (corretta) tra i valori NDFd ottenuti con Daisy e con RF



Regressione lineare tra 8 valori mediati di NDFd (escludendo la combinazione Dieta: NU - Inoculo: TR).

In accordo con gli obiettivi prestabiliti da questa ricerca, volti a verificare l'esistenza di un preadattamento del liquido ruminale alla dieta, di seguito vengono riportati i risultati frutto delle procedure di calcolo, nonché dell'analisi statistica.

La *Tabella 10* evidenzia i parametri relativi all'incubazione a 48 h, mentre la *Tabella 11* presenta i valori della seconda incubazione arrestata a $T_{1/2}$.

Per entrambe le prove, sono indicati i valori medi di pH, di digeribilità (NDFd % e TDMD %) e di produzione gassosa (ml) mentre, per quanto concerne l'energia metabolizzabile, calcolata a partire da tre diverse equazioni (ME_{NRC} , ME_{Menke} e ME_{UCD} in MJ/Kg SS), i dati sono riportati solamente per la prima incubazione in quanto per la loro determinazione è necessario un tempo di incubazione di almeno 24 h. Inoltre, i valori di gas, sono stati analizzati ogni due ore fino alla dodicesima ora di fermentazione e, successivamente, a 24, 36 e 48 h per quanto riguarda la prima prova; per la seconda incubazione, è stato deciso di riportare solamente la produzione gassosa a 10 h visto che l'andamento delle cinetiche di produzione di gas non si discostano in misura rilevante tra le due incubazioni.

Tabella 10 : Prima incubazione (48 h)

		Medie stimate						Dieta			Liquido ruminale			SE
		Dieta			Liquido ruminale			p value	Contrasti ortogonali		p value	Contrasti ortogonali		
		TR	LO	NU	TR	LO	NU		TR vs. LO+NU	LO vs. NU		TR vs. LO+NU	LO vs. NU	
pH		6.85	6.83	6.84	6.74	6.77	7.01	0.60	0.42	0.55	<0.01	<0.01	<0.01	0.012
NDFd	%	60.1	54.1	47.5	60.0	52.5	49.2	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.05	1.18
TDMd	%	86.4	84.6	82.4	86.5	84.0	82.6	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.05	0.39
Gas	ml/g													
2 h	SS	49	38	45	64	49	19	0.02	0.05	0.09	<0.01	<0.01	<0.01	2.9
Gas	ml/g													
4 h	SS	91	82	87	115	96	48	0.15	0.11	0.33	<0.01	<0.01	<0.01	3.3
Gas	ml/g													
6 h	SS	118	127	116	148	138	75	0.09	0.48	0.04	<0.01	<0.01	<0.01	3.4
Gas	ml/g													
8 h	SS	159	156	156	202	174	95	0.90	0.65	0.94	<0.01	<0.01	<0.01	4.5
Gas	ml/g													
10 h	SS	190	193	191	237	210	127	0.94	0.81	0.80	<0.01	<0.01	<0.01	5.2
Gas	ml/g													
12 h	SS	207	225	212	242	238	165	0.07	0.09	0.12	<0.01	<0.01	<0.01	5.6
Gas	ml/g													
24 h	SS	288	312	297	317	304	275	0.09	0.09	0.20	<0.01	<0.01	<0.05	7.7
Gas	ml/g													
36 h	SS	317	340	324	347	326	308	0.12	0.13	0.19	<0.01	<0.01	0.14	8.1
Gas	ml/g													
48 h	SS	332	356	337	362	338	324	0.11	0.17	0.13	<0.01	<0.01	0.24	8.2
ME	MJ/kg													
NRC	DM	13.0	12.8	12.5	13.1	12.7	12.5	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.05	0.06
ME	MJ/kg													
Menke	DM	11.6	12.3	12.1	12.6	12.2	11.3	0.13	0.06	0.59	<0.01	<0.01	<0.01	0.25
ME	MJ/kg													
UCD	DM	12.4	12.8	12.7	13.2	12.8	12.0	0.41	0.21	0.75	<0.01	<0.01	<0.01	0.23

Le differenze sono considerate significative all'analisi statistica per $P < 0.05$

Le tre diete sperimentali si caratterizzano per una differente degradabilità delle frazioni fibrose (NDFd %) dopo 48 h di incubazione che risulta significativa ($P < 0.05$) e, in particolare, si osserva una maggior degradabilità da parte della dieta TR (60.1 %), seguita da valori intermedi della LO (54.1 %) e da valori più bassi della NU (47.5 %). La TDMD % delle diete, cioè la digeribilità vera delle diete, ha un comportamento analogo (TR: 86.4 %; LO: 84.6 %; NU: 82.4 %). Dai contrasti ortogonali si osserva che le tre tipologie di razioni differiscono significativamente ($P < 0.05$) tra loro. Per quanto riguarda la cinetica delle produzioni gassose (GP) riportate fino a 48 h non sono state osservate differenze significative tra le tre diete fatta eccezione per i valori di GP misurati a 2 h dove si registra un valore di P significativo ($P = 0.02$).

Per quanto riguarda l'effetto degli inoculi microbici sui parametri di fermentazione delle diete, sono state evidenziate delle differenze significative sia sulla degradabilità dell'NDF a 48 h, che sulle produzioni gassose a tutti gli intervalli di tempo considerati ($P < 0.05$). I valori di degradabilità (NDFd %), come visto in precedenza per la dieta, risultano maggiori per la TR (60.0 %), intermedi per LO (52.5 %) e inferiori per NU (49.2 %). Analogamente accade alle produzioni di gas, dove TR a 48 h assume valori significativamente superiori (362 ml), rispetto a LO (338 ml) e NU (324 ml).

I dati di ME_{NRC} , ME_{Menke} , ME_{UCD} , espressi in MJ/Kg SS, seguono lo stesso andamento dei valori di TDMD %, ovvero le tre diete TR, LO e NU mostrano, ancora una volta, valori decrescenti. Analogamente, i tre inoculi microbici prelevati da vitelloni alimentati con le tre diete sperimentali hanno modificato in misura significativa ($P < 0.05$) la degradabilità, le produzioni gassose e con questi anche i valori energetici delle diete sperimentali.

Tabella 11 : Seconda incubazione (10 h)

	Medie stimate						p value	Dieta		p value	Liquido ruminale		SE	
	Dieta			Liquido ruminale				Contrasti ortogonali			Contrasti ortogonali			
	TR	LO	NU	TR	LO	NU		TR vs. LO+NU	LOvs. NU		TR vs. LO+NU	LOvs. NU		
pH	6.91	6.91	6.87	6.86	6.86	9.98	0.45	0.58	0.26	<0.01	0.06	<0.01	0.022	
NDFd	%	34.9	31.2	33.0	31.3	36.6	31.0	0.61	0.39	0.61	0.23	0.42	0.13	2.45
TDMd	%	77.8	76.9	77.5	76.8	78.6	76.7	0.77	0.58	0.63	0.24	0.42	0.13	0.84
Gas 10 h	ml/g SS	185	188	190	187	198	177	0.93	0.74	0.88	0.27	0.99	0.11	9.0

Le differenze sono considerate significative all'analisi statistica per P<0.05

La seconda incubazione a $T_{1/2}$ conferma l'assenza dell'effetto della dieta, tuttavia non riscontra l'influenza dell'inoculo che ha caratterizzato la prima prova. I valori di P risultano, in tutti i casi, lontani dalla soglia di significatività ($P < 0.05$).

La discussione dei risultati, ai fini di una migliore ed efficace interpretazione, viene esposta nel capitolo seguente.

7 Discussione

7.1 Effetto della metodica di analisi (Daisy ed RF) sulla determinazione della degradabilità della fibra

Analizzando i dati di digeribilità (NDFd e TDMD) presenti in *Tabella 9* per i quali è possibile fare un confronto tra le due strumentazioni utilizzate nell'ambito di questa ricerca, è possibile evidenziare come, allo strumento *Ankom Daisy II Incubator*, siano associati valori più bassi rispetto all'*Ankom Gas Production System^{RF}*. Ciò è particolarmente evidente poiché lo scarto esistente tra le coppie di valori è superiore all'errore standard (SE). In letteratura, questo comportamento è stato già largamente osservato e descritto da Cattani et al. (2009). L'utilizzo dei filter bags (FB), alla base della strumentazione *Daisy II*, costituisce purtroppo una limitazione ostacolando la libera interazione tra alimento e inoculo. Damiran et al. (2008), a tal proposito, hanno evidenziato differenze significative di degradabilità imputabili alla diversa dimensione del campione (0,25 e 0,50 g/FB). Tale discordanza tra valori, trova una spiegazione ipotizzando che un campione di dimensioni ridotte può facilitare il rilascio di particolato fine e solubile dal FB mentre, al contrario, un campione più grande può esercitare un effetto "barriera" andando ad ostruire la matrice porosa del FB e a limitare il passaggio del liquido ruminale. Lo strumento *Ankom Daisy II Incubator*, per tali motivi, va considerato maggiormente sensibile e meno ripetibile rispetto all'*Ankom Gas Production System^{RF}*. Col metodo delle bottiglie RF, il substrato di fermentazione si trova a diretto contatto con l'inoculo microbico, riproducendo le condizioni che avvengono naturalmente nel rumine. Per indagare sull'esistenza di una correlazione tra i valori di digeribilità ottenuti con l'apparecchiatura *Daisy II* ed il sistema *Ankom^{RF}*, è stata fatta una regressione lineare tra valori mediati NDFd ottenuti con i due strumenti e frutto delle combinazioni Dieta – Inoculo. Il *Grafico 1* tiene in considerazione i valori di NDFd delle 9 combinazioni di dieta e inoculo microbico ottenuti con la strumentazione

Daisy^{II} e RF, ed evidenzia un coefficiente di determinazione delle due serie di valori pari a 0.35. Tale valore non permette certamente di poter dedurre una correlazione tra i valori analitici misurati con le due metodiche analitiche messe a confronto. Tuttavia, escludendo dalla regressione un valore relativo alla combinazione “Dieta – Inoculo” “NU – TR”, si ottiene il *Grafico 2* dove il *coefficiente di determinazione della retta di regressione* ($R^2 = 0.83$) evidenzia un elevato grado di correlazione tra le due serie di dati analitici.

7.2 Effetto delle diete sperimentali e dell'inoculo microbico sulle cinetiche di fermentazione

- Le tre diete (TR, LO, NU) hanno evidenziato una diversa degradabilità (NDFd e TDMd) che ha raggiunto la significatività statistica ($P < 0.05$) e, in particolare, è stata osservata una maggior degradabilità NDF da parte della dieta TR (60.1 %), seguita da valori intermedi della LO (54.1 %) e da valori più bassi della NU (47.5 %). I valori di TDMd seguono lo stesso andamento (TR: 86.4 %; LO: 84.6 %; NU: 82.4 %) e la dieta TR differisce significativamente ($P < 0.05$) dalle due diete ipoproteiche LO e NU, probabilmente per effetto del diverso tenore proteico delle razioni; ma anche le due diete ipoproteiche (LO e NU) sono caratterizzate da valori di degradabilità significativamente differenti. Questo ultimo dato suggerisce che, oltre al tenore proteico ridotto, anche l'introduzione di acidi grassi insaturi³ provoca una riduzione nella degradabilità complessiva della razione. Per quanto riguarda le produzioni gassose riportate fino a 48 h, è interessante notare che le tre diete non si sono differenziate. Solamente a 2 h si registra un valore significativo di P ($P = 0.02$). Tuttavia, è necessario tenere presente che nella fase iniziale del processo fermentativo i valori della GP tendono ad essere molto variabili e quindi poco attendibili. A 24 h, come pure a 48 h, le differenze numeriche di produzione gassosa non hanno raggiunto la considerate significative ($P < 0.05$) a livello statistico. L'effetto della dieta sulla GP risulta quindi assente.

³ Derivanti dai semi di lino estrusi introdotti nella dieta NU.

I risultati di digeribilità sopra esposti, sono in accordo con quanto affermato da Beauchemin e McGinn (2006) in uno studio sugli effetti di alcuni additivi per diete nei bovini da carne; dove è stato riscontrato che l'introduzione di colture oleaginose nella dieta, determina una diminuzione della digeribilità della fibra.

- I tre inoculi microbici, prelevati da vitelloni alimentati con le tre diete sperimentali, hanno influito in misura significativa sia sulla degradabilità che sulle cinetiche delle produzioni gassose dei substrati fermentati. In particolare, la degradabilità delle diete (NDFd) è risultata mediamente pari al 60.0%, 52.5% e 49,5% quando è stato utilizzato rispettivamente l'inoculo microbico prelevato dagli animali alimentati con la dieta TR, LO e NU. Questo andamento è analogo a quello precedentemente descritto per le tre differenti diete. Anche i valori di TDMD seguono lo stesso andamento (TR: 86.5; LO: 84.0 %; NU: 82.6 %). L'influenza dell'inoculo porta ad una maggior produzione di gas del TR rispetto al LO e, ancor di più, rispetto al NU fino a 24 h. È interessante notare che la produzione di gas a 24 h è un valore cruciale che consente di stimare l'energia metabolizzabile delle diete (ME). Dopo le 24 h di incubazione, la differenza tra l'inoculo TR e quello proveniente da animali alimentati con le due diete ipoproteiche si riduce in termini numerici anche se rimane una differenza significativa ($P < 0.05$). L'influenza evidenziata dell'inoculo TR sulla produzione gassosa a 48 h, rispecchia quindi la diversa quantità di substrato degradato utilizzando questo inoculo microbico rispetto a quanto determinato dagli altri due inoculi prelevati da animali alimentati con diete LO e NU. Invece, l'effetto del liquido ruminale prelevato da animali alimentati con le due diete ipoproteiche (inoculo LO e NU) appena descritto, suggerisce che l'inoculo NU presenta un'attività microbica molto inferiore rispetto a LO ma che, al termine dell'incubazione, il substrato degradato non è differente. Quindi, in sintesi, l'andamento delle cinetiche di GP stanno ad indicare che la velocità di degradazione tra LO e NU cambia, ma la quantità di substrato potenzialmente degradabile è fondamentalmente uguale.

- I valori di energia metabolizzabile calcolati utilizzando i valori di degradabilità dell'NDF secondo la procedura proposta dall'NRC (2001) (ME_{NRC}), espressi in MJ/Kg SS, relativi alle tre diete differiscono significativamente ($P < 0.05$) con valori maggiori per la dieta TR (13.0 MJ/Kg SS), minori per la dieta LO (12.8 MJ/Kg SS) e più bassi per la dieta NU (12.5 MJ/Kg SS). Anche i valori di ME_{NRC} , relativi ai tre inoculi microbici prelevati dai 9 vitelloni alimentati con le tre diete sperimentali, differiscono significativamente e mostrano valori decrescenti (TR: 13.1 MJ/Kg SS; LO: 12.7 MJ/Kg SS; NU: 12.5 MJ/Kg SS). I valori di energia metabolizzabile calcolati a partire dalle cinetiche di GP (ME_{Menke} e ME_{UCD}), non differiscono significativamente per quanto concerne le tre tipologie di diete; si registrano però delle differenze significative ($P < 0.05$) nei valori energetici delle diete in relazione all'inoculo microbico utilizzato per fermentare le diete. Anche in questo caso, l'impiego di un inoculo microbico prelevato da vacche alimentate con diete differenti influisce in misura significativa sulla stima del valore energetico delle diete.
- Il pH del medium di coltura al termine dell'incubazione è influenzato dagli AGV prodotti dalla degradazione del substrato di fermentazione. In linea teorica, un pH acido è indicatore di un'elevata degradabilità associata ad una forte produzione di gas. In questo specifico caso, non si registrano effetti delle diete sul grado di acidità del liquido di fermentazione, prova del fatto che le quantità di AGV durante l'incubazione non sono stati tali da modificare il pH iniziale del medium (6.80 circa). Al contrario, i valori di P e dei contrasti (aventi $P < 0.01$) relativi ai tre tipi di liquidi ruminali prelevati da animali che hanno ricevuto le tre diete sperimentali, mettono in risalto l'importanza dell'inoculo nell'apportare esso stesso una diversa quantità di AGV o di tampone (saliva). Inoltre, è interessante notare che il pH finale del liquido di fermentazione contenente l'inoculo microbico degli animali a cui è stata somministrata la dieta NU, è significativamente ($P < 0.05$) più elevato (pH = 7.01) rispetto agli altri. Tale risultato può essere spiegato da una maggiore contaminazione da saliva di questo inoculo microbico rispetto agli altri. Infatti, il tampone bicarbonato

contenuto nella saliva degli animali può contaminare l'inoculo microbico nelle fasi di prelievo del liquido ruminale con la sonda esofagea e può modificare il pH del terreno di coltura, interferendo con il rilascio del gas durante l'incubazione e, in ultima analisi, alterando i processi microbici fermentativi. Questo può giustificare almeno in parte, la minore degradabilità nonché il minore rilascio di gas di fermentazione associati all'impiego all'inoculo microbico NU rispetto alle altri inoculi microbici.

7.3 Effetto delle diete sperimentali e dell'inoculo microbico al picco dell'attività microbica in vitro

Per $T_{1/2}$ si intende il tempo in cui viene prodotto il 50% del gas asintotico, ovvero la quantità di gas che si ottiene facendo fermentare per un tempo infinito il substrato. $T_{1/2}$ è stato stimato direttamente dalla prima incubazione utilizzando il modello di Groot (1996) ed è risultato essere pari a 10 h, in corrispondenza del quale la GP assume valori attorno ai 190 ml. A $T_{1/2}$, la crescita microbica è ancora esponenziale, come diretta conseguenza del fatto che l'energia non è ancora un fattore che limita la crescita degli organismi. Oltrepassato tale istante, inizia la lisi microbica per effetto della carenza di substrato di fermentazione e la massa microbica tende a calare. $T_{1/2}$, è estremamente interessante da analizzare, soprattutto ai fini di un futuro studio microbiologico. In aggiunta, 10 h è un intervallo temporale che si avvicina molto al tempo di effettiva permanenza della dieta all'interno del ruminale, rispetto ad un tempo di incubazione di 48 h.

Chiudere l'incubazione a 10 h si è rivelato utile anche per indagare l'evoluzione e il grado di degradabilità delle diete. Infatti, è stato possibile constatare che a 10 h, la degradabilità della frazione fibrosa delle diete (NDFd) superava il 30%. Questo dato trova facilmente spiegazione nella composizione di base delle tre diete che, essendo formulate per l'alimentazione dei vitelloni da carne, non contiene foraggi se non un quantitativo limitato di paglia (0.65 SS Kg/d); le uniche altre fonti di fibra sono rappresentate dalla crusca di frumento (0.62 SS Kg/d) e dal silomais (2.53 SS Kg/d). Si tratta però di fibra molto degradabile che

nulla ha a che vedere con quella altamente strutturata tipica dei foraggi. Il silomais, elemento ben rappresentato nelle diete sperimentate in questa sede, è considerato un “foraggio energetico” giacché deriva dall’insilamento della pianta intera (parte fibrosa e la granella ricca in amido). La digeribilità dell’NDF avviene soprattutto nelle prime dieci ore dove il valore l’NDFd raggiunge il 50% della digeribilità finale registrata a 48 h.

- A 10 h di incubazione non sono state registrate differenze significative tra le diete nella degradabilità delle frazioni fibrose e della sostanza secca a differenza di quanto rilevato dopo 48 h di incubazione. Tale risultato suggerisce che, a $T_{1/2}$, la riduzione del tenore proteico di ben 3 punti percentuali, così come l’aggiunta di semi di lino (fonte di acidi grassi insaturi), non hanno un’influenza diretta sulla degradabilità delle frazioni fibrose della dieta.
- A 10 h non è stata evidenziata alcuna influenza significativa anche da parte dell’inoculo microbico. Questo risultato suggerisce che, gli effetti di preadattamento del liquido ruminale alla dieta, evidenziati nella prima incubazione, non sono costanti nel tempo e risultano essere influenzati da diverse variabili. L’obiettivo delle tecniche *in vitro* che studiano i processi fermentativi è quello di creare un ambiente che, per un insieme di parametri, riproduce al meglio il rumine. Tra questi parametri, l’inoculo è un elemento indispensabile poiché possiede un ruolo fondamentale nel fornire una microflora adatta alla fermentazione degli alimenti nel tempo. Ne consegue che, il liquido ruminale prelevato, debba essere, oltre che rappresentativo delle specie microbiche contenute in tale ambiente sia in termini qualitativi (ricchezza in specie) che quantitativi (concentrazione), anche il più possibile riproducibile. Tuttavia, queste condizioni non sono facilmente soddisfabili per una serie di fattori. Tra questi, il metodo di campionamento e i differenti procedimenti *pre-* e *post-* prelievo possono essere rilevanti. Partendo dal presupposto che la composizione del liquido ruminale è caratteristica di ogni

singolo animale (quindi affetta da un grado di variabilità intrinseca non eliminabile), essa è influenzata dalla manualità del tecnico responsabile della procedura di raccolta del liquido ruminale. Inoltre, un'altra fase che può incidere in misura rilevante sulle caratteristiche dell'inoculo è la filtrazione: in questa ricerca, secondo quanto consigliato in molti studi (Rymer et al., 2005), è stato deciso di eseguire due filtrazioni *post*-prelievo attraverso un triplo strato di garza da casaro, allo scopo di eliminare le particelle alimentari in sospensione che possono interferire con i processi fermentativi fungendo esse stesse da substrato. Tuttavia, è necessario sottolineare che la filtrazione può esercitare un effetto di "selezione" dei microrganismi ruminali riducendo la presenza soprattutto di quelle popolazioni microbiche che aderiscono alle particelle alimentari. Analogamente, anche lo stress ossidativo e le variazioni di temperatura che si verificano durante il prelievo e la filtrazione del liquido ruminale concorrono ulteriormente ad aumentare la variabilità nell'attività microbica e riducono la ripetibile e la riproducibile delle metodiche *in vitro*. Anche il momento della giornata scelto per il prelievo del liquido ruminale è fondamentale in particolare rispetto alla distribuzione della dieta agli animali. Questo, è un tema molto dibattuto in letteratura e non esistono regole universalmente accettate. Nell'ambito di questo lavoro, il prelievo dell'inoculo microbico è avvenuto prima della distribuzione mattutina dell'unifeed, pertanto da animali a digiuno dalla sera prima. Tale procedura intendeva evitare l'eccessiva contaminazione dell'inoculo da parte delle secrezioni salivari prodotte a seguito del pasto. In aggiunta, la composizione dell'inoculo, in termini di microflora, dipende fortemente dal tipo di dieta e dalle sue modalità di somministrazione (Mould et al, 2005) come ampiamente verificato anche nel presente lavoro.

8 Conclusioni

La corretta formulazione alimentare delle diete con l'obiettivo di rispettare le esigenze degli animali, senza però arrecare danno all'ambiente, richiede un'approfondita conoscenza della composizione chimica nonché del valore energetico degli alimenti e, ai fini di questa ricerca, le tecniche *in vitro* sono apparse idonee ed esaustive.

La tecnica di misura in continuo della produzione di gas *RF* è sembrata ottimale per valutare l'influenza dell'inoculo microbico sui processi fermentativi delle diete. Diversamente, la metodologia *Daisy*^{II}, non consentendo la rilevazione del gas di fermentazione e fornendo un unico dato di degradabilità, non permette di apprezzare al meglio gli effetti dell'inoculo mostrando, quindi, un campo di applicazione più limitato.

L'impiego delle due diete ipoproteiche (10.7 % PG) LO e NU nell'alimentazione di vitelloni da carne porta ad una riduzione della degradabilità ruminale complessiva delle razioni e della disponibilità di nutrienti per gli animali, provocando, di conseguenza, possibili effetti negativi sulla capacità d'ingestione e sulle *performances* produttive degli animali. D'altra parte però, l'impiego della dieta tradizionale (TR), con un livello proteico più elevato (14.4 % SS di PG), può determinare una riduzione nell'efficienza di utilizzazione della proteina alimentare con conseguente aumento del rilascio nell'ambiente di azoto. L'introduzione di diete ipoproteiche non ha però mostrato effetti significativi sulla produzione di gas durante i processi fermentativi.

Il ruolo dell'inoculo microbico nei processi fermentativi si è rivelato fondamentale. Nell'ambito di questa ricerca, è stato evidenziato che l'utilizzo dell'inoculo proveniente da animali che hanno ricevuto per dieci mesi una dieta tradizionale (TR) porta a valori di degradabilità e di produzione di gas superiori rispetto all'inoculo derivante da diete ipoproteiche (LO e NU). Tuttavia, gli effetti del preadattamento del liquido ruminale alla dieta non sono costanti nel tempo

ed evidenziano, quindi, la necessità di standardizzare le condizioni di allevamento degli animali al fine di poter aumentare la riproducibilità delle misure di degradabilità e di gas production (GP) *in vitro*.

9 Bibliografia

Adesogan, A.T., 2002. What are feeds worth?: A critical evaluation of selected nutritive value methods. Proceedings 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, pp. 33-47.

Archibeque S.L., Freetly H.C., Cole N.A., Ferrell C.L., 2005. Oscillating protein concentrations in finishing beef cattle diets improves nitrogen retention by improving nitrogen digestibility. *J. Anim. Sci.* 82 (Suppl. 1), 116.

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).

Cattani, M., Tagliapietra, F., Bailoni, L., Schiavon, S., 2009. In vitro rumen feed degradability assessed with DaisyII and batch culture: effect of sample size. *Ital.J.anlm.Sci.* vol. 8 (Suppl. 3):169-171.

Cone J.W., 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.

Damiran, D., DelCurto, T., Bohnert, D.W., Findholt, S.L., 2008. Comparison of techniques and grinding size to estimate digestibility of forage based ruminant diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141:15-35.

EPA, 2005. US emissions Inventory 2005. EPA 430R-05-003. <http://www.epa.gov>.

F.L. Mould et al., 2005. In vitro microbial inoculum: A review of its function and properties. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124:31–50.

Goering, H.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures and some applications). In: USDA Agriculture Handbook No. 379.

USDA-ARS, Washington, DC, USA.

Groot , J.C.J, Cone J.W., Williams B.A., Debersaques F.M.A e Santiago E.A. (1996). Multiphasic on gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64 (1):77-89.

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

Lindberg J.E., 1981. The effect of sample size and sample structure on the degradation of dry matter, nitrogen and cell walls in nylon bags. *Swed. J. Agric. Res.* 11: 71-76.

Menke K., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D., e 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 liquid in vitro. *Journal of Agriculture Science. (Camb.)* 93: 217-222.

Menke K.H., Roob L., Salewski A., Steingass H., Fritz D., e Schneider W. 1988. Estimation of the energy feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal research development*, 28:7-55.

Mertens, 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, 2005. In vitro microbial inoculum: A review of its function and properties. *Anim. Feed Sci. Technol* 123–124 31–50.

Nagadi S., Herrero M., Jessop N.S., 2000. The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and in vitro gas production degradability parameters. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87: 231-239.

NRC, 2000. *Nutrient requirements of beef cattle*, seventh ed. (updated). National Academy Press, Washington DC.

NRC, 2001. National Research Council, Nutrient Requirements of Dairy Cattle, seventh ed. National Academy Press, Washington, DC, USA.

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.

Sauerbeck, D.R., 2001. CO₂ emissions and C sequestration by agriculture - perspectives and limitations. Nutr. Cycl. Agroecosyst. 60: 253-266.

Schöner F.J., 1981. Schätzung des energetischen Futterwertes von Milchleistungsfuttern (Ergänzungsfutter für Milchkühe) unter besonderer Berücksichtigung des Hohenheimer Futterwerttestes. Dissertation, Bonn University, Bonn, Germany.

Tejido M.L., Ranilla M.J., Carro M.D., 2002. *In vitro* digestibility of forages as influenced by source of inoculum (sheep rumen versus Rusec fermenters) and diet of the donor sheep. Anim. Feed Sci. Technol. 97: 41-51.

RINGRAZIAMENTI

Un sincero “Grazie” di cuore è rivolto ai miei genitori, senza il vostro supporto e incoraggiamento quotidiano non sarei mai arrivata a questo importante traguardo. Vorrei che questa giornata fosse vissuta da voi non dalla parte degli spettatori, ma da veri protagonisti.

Ringrazio Michele per essere riuscito a colorare questi anni di studio che, in alcuni momenti, sembravano proprio grigi. La tua dolcezza e razionalità sono per me indispensabili.

Grazie anche al mio fratellone Francesco e a Vanessa per la loro immensa bontà dimostrata nei miei confronti e, soprattutto, per essere stati capaci di supportare l'intera famiglia anche nei momenti più difficili, superando gli ostacoli assieme.

Ma soprattutto, grazie a Federico, il più piccolo della famiglia, che ogni giorno mi dona tanta gioia e spensieratezza. Ti auguro un futuro sereno e ricco di soddisfazioni.

Ringrazio Silvia, Enrico e Lorenzo per avermi regalato tanti bei momenti in questi anni trascorsi assieme che sicuramente rimarranno nei miei ricordi, per sempre.

Un grazie speciale anche a Federica, Dora, Camilla e Sara, le mie compagne naturaliste con le quali ho condiviso “gioie e dolori” sui banchi universitari.

Inoltre, un doveroso ringraziamento spetta al Prof. Tagliapietra per la sua enorme disponibilità e cordialità. Infine, rivolgo un grazie particolare a Mirko Cattani per la sua gentilezza e disponibilità mostrata nel corso di questi mesi e durante l'intera stesura di questo elaborato.

