



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di medicina animale, produzioni e salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

**Vantaggi e svantaggi nell'utilizzo di ibridi precoci
di mais nell'alimentazione di bovine da latte ad
alta produzione**

Relatore
Prof. Giorgio Marchesini
Correlatore
Dott. Lorenzo Serva

Laureando:
Alberto Campana
Matricola n.
1116778

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

INDICE

Riassunto.....	I
Abstract.....	III
1.INTRODUZIONE.....	1
1.1 Ibridi di mais ed insilamento.....	1
1.1.1 Il mais.....	2
1.1.2 Il processo di insilamento.....	4
1.1.3 Qualità degli insilati.....	8
1.2 Alimentazione della bovina da latte.....	11
1.2.1 La capacità di ingestione delle bovine.....	11
1.2.2 Calcolare l'ingestione di sostanza secca.....	14
1.2.3 Influenza della dieta sulla composizione del latte.....	15
1.2.4 Omogeneità della razione e attività di selezione.....	17
1.3 Digeribilità della dieta.....	21
1.3.1 Metodi per il calcolo della digeribilità ed effetti della composizione della dieta.....	21
1.3.2 Digeribilità degli insilati.....	25
1.4 Efficienza alimentare e produttiva.....	27
1.5 Rischi da micotossine.....	34
1.5.1 Sviluppo delle micotossine.....	34
1.5.2 Principali micotossine di interesse veterinario.....	36
1.5.3 Strategie per ridurre i rischi da micotossine.....	41
2.OBIETTIVI.....	47
3.MATERIALI E METODI.....	49
3.1 Caratteristiche aziendali e disegno sperimentale.....	49
3.2 Rilievi sugli animali.....	50
3.3 Razione ed analisi degli alimenti.....	51
3.4 Calcoli e Analisi statistica.....	53
4.RISULTATI E DISCUSSIONE.....	55
5.CONCLUSIONI.....	71
6.BIBLIOGRAFIA.....	73

RIASSUNTO

Lo scopo di questa prova sperimentale è stato quello di valutare gli effetti dell'utilizzo di due ibridi di mais a differente precocità di raccolta (precoce e tardiva) nell'alimentazione di bovine da latte ad alta produzione. I due ibridi sono stati sottoposti al processo di insilamento e ne sono stati analizzati la composizione chimica e il profilo fermentativo dopo l'apertura; in seguito, i due silomais sono stati somministrati separatamente nella dieta unifeed delle vacche in prova. Sono stati dunque valutati la produzione e la composizione del latte, la digeribilità della dieta, l'efficienza alimentare, l'omogeneità dell'unifeed, l'attività di selezione della dieta, il profilo metabolico e il Body Condition Score degli animali in relazione al tipo di silomais somministrato.

La prova si è svolta in provincia di Brescia (IT) presso un allevamento di Frisone Italiane in cui erano presenti 900 bovine, suddivise in tre gruppi in base allo stadio di lattazione. Tra questi animali, ne sono stati scelti 60, suddivisi poi in due gruppi da 30 ciascuno, omogenei per quanto riguardava la produzione giornaliera e i giorni in lattazione. Ogni gruppo ha ricevuto per tre settimane una delle due diete, realizzate con gli stessi ingredienti e bilanciate per contenere le medesime quantità di nutrienti ed energia, ma utilizzando due silomais differenti. Alla fine dei primi 21 giorni, è avvenuto lo scambio della razione tra i gruppi secondo uno schema di tipo cross-over. Per ognuno dei due periodi sperimentali, le prime due settimane sono state considerate di adattamento alla dieta, mentre nella terza, quella sperimentale, sono stati raccolti i campioni da esaminare tra cui: feci, latte, insilato e unifeed; questi sono stati poi analizzati principalmente attraverso spettroscopia.

Dal punto di vista della composizione, il silomais con l'ibrido precoce si è caratterizzato per avere una minor quantità di sostanza secca (- 3.1%) e di amido (- 3%SS), ed una maggior percentuale di fibra neutro detersa (+ 3.4%SS) rispetto al tardivo. Per quanto concerne il profilo fermentativo, invece, l'ibrido precoce ha mostrato concentrazioni significativamente maggiori di etanolo, acido acetico e acido propionico. La produzione giornaliera di latte nelle bovine alimentate con l'ibrido precoce è risultata inferiore di 3 Kg/giorno rispetto a quella delle bovine alimentate con l'ibrido tardivo; lo stesso è avvenuto la produzione calcolata come latte corretto al 3.5 % di grasso (-2.4 Kg/giorno). Tuttavia, nel latte di questi animali si è rilevato un aumento della percentuale di grasso (+ 0.26%) e di proteina (+ 0.12%).

La maggior quantità di NDF nell'ibrido precoce ha portato ad una minore ingestione di sostanza secca, che a sua volta ha causato la minor produzione latte; tuttavia, questo non ha portato ad

una grossa differenza nell'efficienza alimentare, che è risultata solo sensibilmente inferiore ($p=0.092$) rispetto a quella degli animali che hanno ricevuto la dieta contenente l'ibrido tardivo. Non ci sono state differenze significative tra i due gruppi per quanto riguarda i valori di omogeneità, selezione e digeribilità. Quest'ultima, tuttavia, è risultata essere molto bassa se confrontata con i valori di normalità riportati in letteratura, probabilmente perché l'elevata capacità di ingestione degli animali in prova ha aumentato la velocità di transito delle ingesta nel tratto gastro-enterico, riducendone l'assorbimento.

Nonostante l'utilizzo degli ibridi precoci abbia portato ad una minore produzione di latte, il loro ciclo colturale ridotto li espone per un tempo inferiore a muffe contaminanti in campo: ciò porta ad un minor rischio di sviluppo di micotossicosi pericolose sia nelle bovine da latte che nell'uomo.

Alla luce di questi risultati, si può desumere che la scelta dell'impiego di un tipo di ibrido di mais rispetto ad un altro vada sempre valutata con attenzione in modo da massimizzare i profitti e ridurre le problematiche associate all'utilizzo di una varietà rispetto ad un'altra.

ABSTRACT

The aim of this trial was to evaluate the effects of using two different corn hybrids with distinct earliness of maturity (early and late maturity) in high production dairy cows feeding. The two hybrids underwent the ensiling process and their chemical composition and fermentation profile have been analyzed after opening; afterwards, the two corn silages have been added separately to the TMR diets of the tested cows. Milk production, milk composition, diet digestibility, feed efficiency, TMR homogeneity index, feed sorting, metabolic profile and Body Condition Score of the selected cows have all been evaluated in relation to the type of corn silage given.

The test took place in the province of Brescia (IT), in a Holstein cows farm which hosted 900 animals, divided in three groups based on lactation stage. Among these animals, 60 cows have been chosen, and then divided in two groups with 30 animals each, homogeneous in daily production and days in milk. Every group received one of the two diets for three weeks, both made with the same ingredients and balanced with the same amount of nutrients and energy but made with two different corn silages. At the end of the first 21 days, the diets were swop between the two groups according to a cross-over design. For each test period, the first two weeks were considered of adaptation, while in the third one, the actual experimental one, the samples were collected, including: faeces, milk, silage and TMR; these ones have been subsequently analysed, mainly with spectrophotometry.

From a compositional point of view, the silage with the early maturity hybrid was characterized by a smaller amount of dry matter (-3.1%) and starch (-3%DM) and a greater percentage of neutral detergent fiber (+3.4%DM) compared to the late maturity one. Regarding the fermentation profile, the early maturity hybrid showed significantly higher concentrations of ethanol, acetic acid and propionic acid. The daily milk production in cows feeded with the early maturity hybrid was lower by 3 Kg/d in comparison to the one of the cows feeded with the late maturity hybrid; the same resulted also when the production was calculated as 3.5% fat corrected milk (-2.4 Kg/d). However, in the milk of these animals, an increase in the fat (+0.26%) and protein (0.12%) percentage was seen.

The greater amount of NDF in the early maturity hybrid led to a reduced ingestion of dry matter, which led to a decreased milk production; however, it didn't make a difference in the feed efficiency, which resulted just slightly inferior ($p=0.092$) when compared to the one of the animals than received the late maturity hybrid silage.

There haven't been significant differences between the two groups regarding the homogeneity, feed sorting and digestibility. The last one, however, resulted very low if confronted with the

normal amounts reported in literature, probably because the elevated ingestion capability of the tested animals increased the transit rate of ingesta throughout the gastroenteric system, decreasing the absorption.

Despite the use of the early maturity hybrids leading to an inferior milk production, they are less exposed to contaminant mold in the field due to their shorter crop cycle: this creates a lesser risk of developing mycotoxins, dangerous both for dairy cows and humans.

Based on these results, it can be deduced that the choice of a corn hybrid must always be carefully considered to maximize profits and reduce the problem associated with the hybrid type.

1 Introduzione

1.1. Ibridi di mais ed insilamento

L'insilato di mais (*Zea mays*, L.), comunemente noto anche come silomais, è definito come “il prodotto che si forma quando l'intera pianta di mais con un contenuto di umidità sufficientemente elevato, suscettibile di deterioramento da parte di microrganismi aerobici, viene immagazzinato in condizioni anaerobiche” (Wilkinson et al., 2003) e rappresenta uno dei foraggi più utilizzati per l'alimentazione delle vacche da latte e dei bovini da carne nelle aree a clima temperato (Erdman et al., 2011; Marchesini et al., 2017; Grant e Adesogan, 2018). Ciò è dovuto alla sua elevata produttività, alla facilità di insilamento e all'eccellente profilo nutrizionale (Khan et al., 2015) che comprende sia grandi quantità di amido altamente digeribile che fibra fisicamente efficace (peNDF) (Grant e Ferraretto, 2018). Inoltre, permette di ridurre al minimo la perdita di nutrienti durante lo stoccaggio e, se confrontato con il foraggio secco, facilita la miscelazione dell'unifeed e non richiede un periodo di appassimento in campo (Mahanna e Chase, 2003). Per questi motivi, nelle razioni dei bovini spesso rappresenta oltre un terzo della sostanza secca (SS) e oltre il 50% dei foraggi utilizzati (Grant e Adesogan, 2018). È stato dimostrato che la quantità dei nutrienti presenti nel silomais influenza notevolmente l'ingestione di SS delle vacche da latte, la digeribilità della sostanza secca, la produzione e la qualità del latte (Khan et al., 2015). Inoltre, la sua composizione può influire anche su aspetti sanitari, a causa del rischio di acidosi ruminale subacuta che dipende fortemente dalla quantità di fibra neutro detersa (NDF) e di amido nella dieta (De Nardi et al., 2014). Tuttavia, la composizione dell'insilato di mais è molto variabile ed è influenzata da vari fattori agronomici legati alla sua coltivazione, tra cui il genotipo, il tipo di amido presente nella cariosside e la maturità della pianta al momento della raccolta; quest'ultima si è dimostrata essere il parametro più efficace nel determinare il valore nutritivo dell'insilato di mais, influenzando il contenuto e la digeribilità di sostanza secca, amido e NDF (Khan et al., 2015). Inoltre, anche le pratiche adottate durante la raccolta, le condizioni di insilamento e i metodi di rimozione del silomais dalla trincea sono determinanti nel modularne la composizione chimica (Borreani et al., 2018).

1.1.1 Il mais

Il mais è una pianta a ciclo primaverile-estivo, che appartiene alla famiglia delle graminacee (piante monocotiledoni). La pianta è formata da un apparato radicale, da uno stelo lungo da uno a tre metri e da foglie presenti in numero variabile a seconda della precocità dell'ibrido: generalmente sono 10-12 nei tipi precoci e 20-22 in quelli più tardivi. La pianta di mais è monoica con i fiori unisessuali raccolti in infiorescenze distinte: l'infiorescenza maschile (pennacchio) è posta all'apice dello stelo, mentre l'infiorescenza femminile, si trova sulla spiga (e viene comunemente, ma erroneamente detta pannocchia). L'impollinazione è anemofila (avviene per mezzo del vento) e la fecondazione incrociata è una normalità; il frutto è una cariosside di forma, dimensioni e colori variabili a seconda della varietà. Ogni pannocchia può presentare da 200 a 1000 cariossidi inserite sul rachide (tutolo) attraverso un corto pedicello; all'interno di queste, nell'endosperma è presente come sostanza di riserva per l'embrione l'amido in una quantità che va dal 70 al 75% del peso dell'intero frutto. La pannocchia è avvolta da foglie modificate dette brattee che costituiscono il pericarpo. La maturazione del seme procede attraverso tre fasi: il primo è lo stadio di maturazione lattea (tre settimane dopo la fecondazione) in cui la cariosside è ripiena di liquido zuccherino e mostra il suo massimo volume. Dopo altre 3 o 4 settimane, viene raggiunta la maturazione cerosa: la cariosside perde umidità (arriva al 40-45% e aumenta di consistenza, ma è ancora sufficientemente morbida da essere spezzata con un'unghia). In questa fase iniziano i primi sintomi di senescenza della pianta come l'ingiallimento delle foglie; quest'ultima segna il momento ottimale per la raccolta del mais destinato all'insilamento. Dopo altri 20 giorni, la granella arriva a maturazione fisiologica: la sua umidità è circa 30-35% e l'embrione è maturo; cessa così l'accumulo di sostanze di riserva del seme e sulla punta della cariosside, compare uno strato necrotico nero. La granella cala rapidamente di umidità, scendendo a valori di 26-28%, ed è quindi pronta per essere raccolta tramite trebbiatura (da Damiani et al., 2019).

Il mais è una coltura macroterma e ha bisogno di temperature elevate durante il suo ciclo vitale: quelli ottimali sono comprese tra i 24 e i 30°C, inoltre necessita di un adeguato apporto idrico per sostenere la produzione, infatti, l'insufficiente disponibilità d'acqua durante la vita della pianta, specialmente a ridosso della fioritura, è uno dei principali fattori limitanti la produttività. Va però sottolineato che Lobell et al., (2013) ha dimostrato che temperature superiori ai 30°C per un lungo periodo sono un fattore di stress importante per la pianta e hanno un ruolo più determinante nella riduzione della produzione di mais rispetto a periodi di siccità.

Zea mays è una specie caratterizzata da notevole polimorfismo e, in base al tipo di endosperma (composizione e alla forma della cariosside), si possono distinguere varie tipologie, ma le due più utilizzate in ambito zootecnico sono: *Z. mays indurata* (flint corn) o mais vitreo e *Z. mays indentata* (dent corn) o mais dentato; con quest'ultima varietà che risulta essere la più coltivata per produrre insilati in Europa e Nord America (Khan et al., 2015), mentre le cultivar di mais vitreo sono utilizzate principalmente nelle zone con un clima più fresco a causa della loro tolleranza al freddo.

La classificazione ufficiale degli ibridi di mais è quella stabilita nel 1954 dalla FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), mostrata in Figura 1. Questa distinzione si basa sui giorni di maturazione necessari alla pianta per raggiungere lo stadio di raccolta: gli ibridi sono raggruppati così in classi di maturità che crescono in base alla tardività dell'ibrido e che vanno da 100 (i più precoci), a 900 cioè quelli a massima tardività (Troyer, 2000). In Italia gli ibridi commercializzati appartengono alle classi che vanno dal 200 al 700.

CLASSE FAO	IBRIDO DI RIFERIMENTO	PRECOCITÀ	CICLO IN GIORNI
100	Wisconsin 1600	Ultraprecoci	76-85
200	Wisconsin 240	Precocissimi	86-95
300	Wisconsin 355	Precoci	96-105
400	Wisconsin 464	Medio-precoci	106-115
500	Ohio M15	Medi	116-120
600	Jowa 4316	Medio-tardivi	121-130
700	Indiana 416	Tardivi	131-140
800	US13	Molto tardivi	141-150
900	US523W	Ultra-tardivi	150-160

Figura 1. Classi FAO degli ibridi di mais e relativi giorni di maturazione (da Damiani et al. 2019)

Gli ibridi precoci (classe 200-300) vengono quindi raccolti all'incirca con 30 giorni di anticipo rispetto a quelli tardivi (classe 600-700) in quanto fioriscono e raggiungono la maturità fisiologica in anticipo (Troyer, 2000). Queste differenti caratteristiche permettono al mais di essere coltivato in una vasta gamma di condizioni climatiche. In generale però, le varietà precoci vengono utilizzate in aree con temperature medie inferiori in quanto questi ibridi sono più sensibili allo stress da caldo rispetto a quelli tardivi (Buhiniček et al., 2021). Il mais precoce cresce più velocemente soprattutto durante gli stadi giovanili e può essere utilizzato con

maggior successo in aree con temperature medie inferiori, in quanto il periodo di riempimento delle cariossidi comincia in anticipo permettendogli così di crescere anche in presenza di periodi caldi più brevi. Gli ibridi tardivi invece, ottengono maggiori performance produttive in aree più calde poiché la fioritura tardiva porta la pianta ad ottenere dimensioni più grandi (Troyer, 2000). Quando bisogna scegliere la qualità di mais da seminare, va tenuto in considerazione anche l'impatto negativo del caldo estremo sui raccolti di granella di mais dovuto al cambiamento climatico e che è un fatto ormai ben noto (Schlenker e Roberts, 2009; Lobell et al., 2013; Buhiniček et al., 2021). Quando vengono sottoposti al processo di insilamento, gli ibridi precoci, generalmente si caratterizzano per avere una quantità maggiore di amido (Opsì et al., 2013; Peyart et al., 2016; Gerlach et al., 2018;) e SS (Gerlach et al., 2018; Marchesini et al., 2019), mentre presentano un'inferiore percentuale di fibra neutro detersa (Peyart et al., 2016; Gerlach et al., 2018; Marchesini et al., 2019) rispetto ai tardivi. Tuttavia, la produzione di sostanza secca totale (KgSS/ha) è maggiore per gli ibridi tardivi (Millner et al., 2005; Opsì et al., 2013;) a causa delle maggiori dimensioni della pianta. Il più alto contenuto di sostanza secca e amido degli ibridi precoci è probabilmente dovuto alla loro maggiore efficienza di utilizzo delle radiazioni che ha portato a una maggiore velocità di sintesi dei carboidrati prima della fioritura quindi alla precoce deposizione di amido nella cariosside (Marchesini et al., 2019). Millner, et al., (2005) infatti, ha riscontrato che negli ibridi precoci sono presenti maggiori quantità di cariossidi, mentre la diminuzione della percentuale di NDF è una diretta conseguenza dell'aumento della quantità di amido dovuto alla crescita delle dimensioni della spiga.

1.1.2 Il processo di insilamento

Solitamente il mais viene trinciato e quindi insilato quando ha raggiunto lo stadio di maturazione cerosa della granella (40-45% umidità della cariosside), ossia quando il contenuto totale di sostanza secca della pianta raggiunge il 30-35%. Per identificare lo stadio di maturazione, in genere si valuta la linea del latte presente dentro la cariosside del mais ovvero quella linea di demarcazione che contraddistingue il passaggio dalla frazione liquida (zuccherina) alla matrice solida (amilacea). Con il procedere della maturazione e l'aumento della frazione amilacea, questa linea si sposta da una posizione più esterna ad una posizione sempre più vicina all'inserzione della cariosside sul tutolo (Afuakwa e Crookston, 1984). Per ottenere la maturità ideale, la pianta deve essere trinciata quando la linea del latte è compresa tra $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ della lunghezza della cariosside (Wiersma et al., 1993). Tuttavia, questa valutazione

si basa su una caratteristica non del tutto ben definita in quanto sia il tipo di ibrido che le condizioni ambientali possono influenzare la relazione tra la linea del latte e la concentrazione di SS (Ganoë e Roth, 1992). Un criterio più preciso che viene quindi utilizzato per stabilire la maturità della pianta è il suo contenuto di sostanza secca al momento della raccolta visto che questo aumenta con l'avanzare dello sviluppo (Khan et al., 2015). La maturità alla raccolta è un fattore fondamentale da valutare in quanto altera la resa del raccolto, la composizione dei nutrienti e la loro digeribilità; in particolare, man mano che essa progredisce, gli zuccheri nelle cariossidi vengono convertiti in amido e il loro contenuto di SS aumenta (Buxton e O'Kiely, 2003). Viene quindi alterata la proporzione di nutrienti nella sostanza secca del silomais, con un aumento della concentrazione di amido e il corrispondente declino delle concentrazioni di NDF e proteine (Bal et al., 1997; Johnson et al., 1999; Allen et al., 2003; Opsi et al., 2013; Khan et al., 2015). Tuttavia, con il tempo diminuisce anche la digeribilità dell'NDF (Allen, 2003; Khan et al., 2015), dell'amido (Johnson et al., 1999; Allen, 2003; Ferraretto e Shaver, 2012; Khan et al., 2015), e di conseguenza quella generale della sostanza secca. Questi cali sono dovuti ai cambiamenti morfologici che avvengono nella pianta con l'avanzare della maturità e la diminuzione dell'umidità: i granuli di amido, infatti, diventano più compatti o vitrei (Allen, 2003), riducendo quindi la capacità di colonizzazione delle cariossidi da parte dei microorganismi ruminanti (McAllister et al., 1990). La digeribilità dell'NDF invece, con il tempo cala perché con l'avanzare dell'età della coltura, cresce la quantità di lignina (che non viene digerita) rispetto agli altri componenti della parete cellulare (Cone ed Engels, 1993). Tutti questi fattori vanno tenuti in considerazione quando bisogna decidere a che maturità insilare il mais e il range di sostanza secca tra il 30 e il 35% viene solitamente indicato come ottimale in quanto consente di bilanciare un'ottima resa in termini di SS e amido con buoni valori di digeribilità. Ciò è fondamentale perché per ottenere alte prestazioni produttive nei bovini sia da latte che da carne, è necessario alimentarli con insilato di mais di alta qualità, caratterizzato da un adeguato contenuto di nutrienti altamente digeribili (Krämer-Schmid, et al. 2016).

Il processo di insilamento è suddiviso in quattro fasi: la fase aerobica iniziale (in cui il mais viene trinciato, compattato nel silo e coperto da un telo impermeabile), la fase di fermentazione e la fase di stoccaggio stabile nel silo, e infine la fase di distribuzione cioè quando il silo viene aperto e il materiale viene esposto all'aria prima di essere utilizzato nell'unifeed (Elferink et al., 2000; Pahlow et al., 2003; Borreani et al., 2018). Durante la prima fase, l'ossigeno intrappolato nel foraggio mantiene attiva la respirazione cellulare della pianta che consuma così nutrienti ed energia, portando alla produzione di acqua, anidride carbonica, calore e ammoniaca (McAllister e Hristov, 2000; Muck, 2010). Anche gli enzimi vegetali rimangono attivi: le

proteasi avviano la decomposizione delle proteine in amminoacidi e le carboidrasi aumentano la quantità di carboidrati solubili disponibili per la fermentazione successiva; inoltre sono ancora attivi gli organismi aerobi obbligati e facoltativi come muffe, lieviti e alcuni batteri (Pahlow et al., 2003). Questa prima fase deve durare il minor tempo possibile, in modo tale da ridurre la produzione di calore che porta a notevoli perdite di sostanza secca (Borreani et al., 2018). Man mano che il silo diventa anaerobico, vari microrganismi anaerobi obbligati o facoltativi (lattobacilli (LAB), enterobatteri, clostridi e lieviti) proliferano e fermentano zuccheri e acidi organici (Pahlow et al., 2003). Se gli insilati fermentano correttamente, con il passare dei giorni, durante questa fase si assiste allo sviluppo di una popolazione dominante di LAB e alla progressiva diminuzione delle altre tipologie di microrganismi (Pahlow et al., 2003; Rooke e Hatfield, 2003). Infatti, il processo di insilamento preserva la coltura controllando l'attività microbica attraverso la formazione di un ambiente anaerobico e la fermentazione degli zuccheri da parte dei lattobacilli. I due principali prodotti di fermentazione (l'acido lattico e l'acido acetico) portano ad un abbassamento del pH che sopprime la crescita della maggior parte degli altri microrganismi anaerobi (Muck, 2010). I batteri lattici sono organismi fondamentali in questa fase ed in base ai processi con cui metabolizzano gli zuccheri (Figura 2) si dividono in omofermentanti ed eterofermentanti (Rooke e Hatfield, 2003; Muck, 2010; McDonald et al., 2011). L'importanza dei LAB è dovuta al fatto che essi sono i principali produttori di acido lattico ovvero l'acido presente in maggiori quantità negli insilati e quello che garantisce un rapido abbassamento del pH della massa insilata: fattore fondamentale per garantire la stabilità del foraggio ed una minore perdita di sostanza secca ed energia (McDonald et al., 2011; Kung et al., 2018). In particolare, in una fermentazione ideale sarebbero presenti solo LAB omofermentanti che utilizzano glucosio per la crescita e producono solo acido lattico, con un conseguente elevato recupero di SS ed energia (Pahlow et al., 2003; McDonald et al., 2011; Borreani et al., 2018). Tuttavia, molti fattori, tra cui il contenuto di sostanza secca, la quantità di carboidrati idrosolubili e la capacità tampone del substrato, alterano le caratteristiche nutritive del foraggio (Kung et al., 2018), portando alla produzione di una complessa gamma di composti, come acidi volatili, alcoli ed esteri. Tra questi composti, l'acido acetico a concentrazioni moderate, migliora la stabilità aerobica dell'insilato grazie alla sua attività antimicotica, ma se in concentrazioni elevate limita l'ingestione di sostanza secca da parte degli animali (Nishino et al., 2004). Va comunque ricordato che in fermentazioni diverse da quelle omolattiche ci sono perdite più o meno significative di sostanza secca ed energia (Figura 3) anche se queste solitamente influiscono per meno del 5% sul totale della massa (McDonald et al., 2011; Borreani et al., 2018). Il pH, invece, in un insilato di mais dovrebbe variare

approssimativamente da 3,7 a 4,2 (Andrighetto et al., 2018; Kung et al., 2018) ed è il risultato della concentrazione di acidi, urea e ammoniaca prodotti dai microrganismi e della capacità tampone del substrato. Come si può vedere dalla Figura 2, dalla fermentazione lattica si ottengono, come metaboliti, anche acido acetico, etanolo e mannitolo, che si ottengono però anche dal metabolismo di altri tipi di microrganismi. In particolare, l'acido acetico che è il secondo acido più presente nella massa, viene ottenuto soprattutto dal metabolismo degli eterofermentanti, ma anche da quello degli enterobatteri (Rooke e Hatfield, 2003; Gallo et al., 2016; Borreani et al., 2018).

Lactic acid bacteria

Homofermentative

Glucose → 2 lactic acid

Fructose → 2 lactic acid

Pentose → lactic acid + acetic acid

Heterofermentative

Glucose → lactic acid + ethanol + CO₂

3 Fructose → lactic acid + 2 mannitol + acetic acid + CO₂

Pentose → lactic acid + acetic acid

Figura 2. Principali prodotti della fermentazione dei lattobacilli (da McDonald et al. 2011)

Mentre etanolo e mannitolo invece, vengono prodotti generalmente in fermentazioni secondarie da lieviti ed enterobatteri (Pahlow et al., 2003; Rooke e Hatfield, 2003; Nishino et al., 2004; Muck, 2010). Inoltre, negli insilati possono essere presenti minime quantità di acido propionico prodotto da batteri del genere *Propionibacterium* (Rooke e Hatfield, 2003). L'acido butirrico invece è solitamente non rintracciabile negli insilati e una sua presenza indica la presenza di clostridi (Pahlow et al., 2003; McDonald et al., 2011) che sono microrganismi indesiderati, in quanto degradano le proteine e producono ammoniaca, ammine e altre sostanze che compromettono l'appetibilità dell'insilato (Muck, 1988). La presenza di acido propionico e butirrico è inoltre associata a una maggiore perdita di sostanza secca (Muck, 1988; McDonald et al., 2011) rispetto agli altri composti (Figura 3).

Organism	Pathway	Substrate	Products	Loss (% substrate)	
				DM	Gross energy
LAB	Ho	Glucose	2 lactate	0	0.7
LAB	He	Glucose	1 lactate, 1 ethanol, 1 CO ₂	24	1.7
LAB	He	3 Fructose	1 lactate, 1 acetate, 2 mannitol, 1 CO ₂	4.8	1.0
LAB	Ho/He	2 Citrate	1 lactate, 3 acetate, 3 CO ₂	29.7	-1.5
LAB	Ho/He	Malate	1 lactate, 1 CO ₂	32.8	-1.8
Enterobacteria		2 Glucose	2 lactate, 1 acetate, 1 ethanol, 2 CO ₂	17	11.1
Clostridia		2 Lactate	1 butyrate, 2 CO ₂ , 2 H ₂	51.1	18.4
Yeasts		Glucose	2 ethanol, 2 CO ₂	48.9	0.2

Figura 3. Perdite di sostanza secca ed energia dovute a differenti processi di fermentazione (da Borreani et al. 2018; dati di McDonald et al. 1991 e Rooke e Hatfield 2003)

Grazie alla produzione di acidi nella massa insilata, il pH di questa raggiunge valori compresi tra 3.7 e 4 che portano all'inibizione della crescita batterica (Rooke e Hatfield, 2003; Muck, 2010) e al raggiungimento della cosiddetta fase stabile che può essere anche molto lunga (Pahlow et al., 2003) la massa insilata infatti, in queste condizioni, è conservabile per un molti mesi senza alterazioni. Comunque, sebbene si ritenga che i processi chimici che si verificano nel silo raggiungano rapidamente uno stato stazionario dopo alcune settimane di fermentazione, piccoli cambiamenti continuano a verificarsi per mesi e tali processi possono influire sulla qualità dell'insilato (Kung et al., 2018). Durante la fase di apertura del silo, con la rimozione del telo impermeabile dalla prima porzione della massa insilata, comincia un inevitabile deterioramento aerobico nei primi metri esposti all'aria (Pahlow et al., 2003; Wilkinson e Davies, 2013; Borreani et al., 2018). In particolare, quando l'ossigeno viene introdotto nell'insilato, lieviti e batteri aerobici fungono da iniziatori del deterioramento consumando zuccheri e acidi di fermentazione e aumentando la temperatura e il pH dell'insilato (Pahlow et al., 2003; Wilkinson e Davies, 2013). È quindi importante sottolineare come ci possano essere perdite di sostanza secca ed energia durante tutte le fasi del processo di insilamento (Borreani et al., 2018) e come queste vadano ovviamente minimizzate per evitare perdite economiche. In particolare, fattori gestionali come la velocità di riempimento del silo, la corretta compressione della massa, la sua chiusura con materiali impermeabili per garantire l'anaerobiosi, l'utilizzo di additivi, la lunghezza del taglio della pianta, e la gestione del silo durante la fase di utilizzo del silomais possono influenzare la fermentazione dell'insilato e la sua qualità (Borreani et al., 2018; Ferraretto et al., 2018; Kung et al., 2018).

1.1.3 Qualità degli insilati

Risulta quindi evidente che la qualità del processo fermentativo e la stabilità aerobica dell'insilato siano molto importanti (Borreani et al., 2014; Kung et al., 2018) per ottenere insilati di ottima qualità. Un silomais che ha subito fermentazioni anomale ha infatti un minor

valore nutritivo, ed è spesso rifiutato dagli animali, portando così ad una ridotta assunzione di alimento e a prestazioni produttive inferiori (McDonald et al., 2011). Ciò è particolarmente importante quando si alimentano animali altamente produttivi perché hanno fabbisogni metabolici molto elevati e risentono facilmente di eventuali alterazioni della razione, che porterebbero quindi, a basse prestazioni (Grant e Ferraretto, 2018) e a cattive condizioni di salute (Borreani et al., 2008). La qualità delle fermentazioni che avvengono durante il processo di insilamento può essere determinata attraverso la misurazione del pH e l'analisi della concentrazione dei prodotti di fermentazione quali: acido lattico, acetico, propionico, butirrico, etanolo, mannitolo e ammoniaca (Nishino et al., 2004; Gallo et al., 2016; Andrighetto et al., 2018). Queste analisi rappresentano ancora oggi la principale modalità di valutazione della qualità fermentativa dell'insilato di mais (Kung et al., 2018). L'insilato di mais dovrebbe avere un ottimo profilo fermentativo (Gallo et al., 2016; Kung et al., 2018) e dovrebbe essere garantita l'anaerobiosi nella massa (Borreani et al., 2014). Tuttavia, ogni parametro appena riportato dà informazioni solo su un certo aspetto della fermentazione, ad esempio l'acido butirrico indica se ci sono state o meno fermentazioni clostridiche, ma nessun dato preso singolarmente può dirci se una fermentazione è stata qualitativamente migliore di un'altra. Per questo fine, vengono utilizzati indici che tengono conto di alcuni di questi parametri a cui viene assegnato un peso diverso in base alla loro rilevanza. Tra i vari indici esistenti, ci sono lo score di Flieg-Zimmer descritto da Woolford, (1984), lo score di Vanbelle (Vanbelle e Bertin, 1985) e lo score della German Agriculture Society (DLG et al., 2006): questi sono stati formulati per valutare le fermentazioni omolattiche, eterolattiche e clostridiche ed il livello di degradazione delle proteine. Questi score sono indici con valori che vanno da 0 a 100 e sono ancora oggi utilizzati per valutare la qualità dell'insilato, ma a volte mostrano una scarsa capacità nel discriminare tra insilati ben conservati o mal conservati (Gallo et al., 2016; Andrighetto et al., 2018). Per migliorare questo aspetto, alcuni autori hanno proposto nuovi indici (Gallo et al., 2016; Andrighetto et al., 2018; Segato et al., 2022), in particolare Andrighetto ha provato a calcolare e convalidare sei nuovi indici di qualità degli insilati sulla base di fermentazioni avvenute in laboratorio grazie a piante di mais trinciate, messe in buste sottovuoto e analizzate tramite spettroscopia NIR dopo essere state conservate per 60 giorni a 23°C. I nuovi indici (I1 – I6), sono stati calcolati sulla base di vari parametri chimico fisici quali: pH, acidi organici, etanolo, sostanza secca, NDF; ogni indice teneva conto o meno di alcuni di questi fattori ai quali era assegnato un peso differente in base all'importanza; anche questi score forniscono alla fine un valore che va da 0 a 100. Gli indici sono stati pensati per tenere conto anche di parametri che non venivano considerati negli score precedenti, quali etanolo e mannitolo per approfondire

l'influenza delle fermentazioni di lieviti e batteri eterofermentanti sulla qualità degli insilati. Il valore di questi indici aumenta quando il livello di acido lattico aumenta, mentre diminuisce quando gli altri parametri aumentano; è stato quindi possibile stabilire un valore soglia per ognuno dei sei score per distinguere tra insilati di ottima o scarsa qualità; questi valori cut-off sono compresi tra 45 e 57.4 punti. In particolare, I5 (che tiene conto di acido lattico, acetico e butirrico più ammoniaca ed etanolo) ha mostrato la miglior combinazione di sensibilità (0,87) e specificità (0,77) nel differenziare tra insilati di buona e cattiva qualità. È stato quindi confermato che questi i nuovi score proposti, specialmente I5, sono adeguati nel descrivere la qualità della fermentazione dell'insilato di mais (Andrighetto et al., 2018) e possono essere uno strumento utile anche per eseguire una valutazione del profilo fermentativo in campo. Proprio utilizzando I5, Marchesini et al., (2019) ha confrontato le differenze nel profilo fermentativo di ibridi di mais precoci e tardivi; nel suo studio gli score più alti sono stati ottenuti dagli ibridi precoci a causa di una minore presenza di ammoniaca, acido acetico e acido propionico. Risultati simili erano stati ottenuti anche da Gerlach et al., (2018) che ha rilevato concentrazioni minori di acido acetico, propionico ed ammoniaca, ma anche di acido butirrico negli insilati di ibridi precoci. Sempre Marchesini ha riscontrato un'influenza della maturità del mais alla raccolta con la qualità delle fermentazioni: sembra infatti, che più la pianta va avanti con la maturazione, più l'indice di fermentazione cala, questo fenomeno è più evidente per l'ibrido precoce. Questo avviene probabilmente perché con l'avanzare della maturità, il contenuto di SS aumenta, portando a una riduzione della crescita batterica causata dalla scarsa disponibilità di acqua (Muck, 1988; Ferraretto et al., 2015a) e di conseguenza ad un minor contenuto in acido lattico. L'autore consiglia quindi di raccogliere la pianta in una fase di maturazione precoce se si utilizzano ibridi precoci, mentre con i tardivi la raccolta può essere ritardata fino allo stadio di 2/3 della linea del latte senza ridurre la qualità della fermentazione.

Va ricordato infine, che la qualità di un insilato può essere valutata, in modo approssimativo, anche dal punto di vista sensoriale: l'odore dell'insilato dopo l'apertura, infatti, non deve essere forte e pungente perché l'acido lattico è praticamente inodore. Nonostante ciò, è possibile che alcuni insilati tendano ad avere un leggero odore di aceto dovuto all'acido acetico oppure un aroma fruttato come risultato della presenza di etanolo (Kung et al., 2018). Non deve invece essere presente un odore di muffa o di "putrido" in quanto potrebbero essere un segno di contaminazione da micotossine o di proliferazione clostridiche. Altri segni di deterioramento aerobico dell'insilato possono essere visibili, tra questi abbiamo: temperature del silo superiori a 40°C nei primi 10-20 cm del fronte del silo (misurate con una sonda), riscaldamento

dell'unifeed in mangiatoia, muffa visibile, ed incremento eccessivo del pH dell'insilato (>5) dopo l'apertura (Kung et al., 2018).

1.2 Alimentazione della bovina da latte

La gestione dell'alimentazione di bovine da latte ad alta produzione è un fattore fondamentale per garantire elevate rese, in quanto influisce sulla quantità e sulla qualità del latte prodotto (Tyasi et al., 2015) e per garantire la salute dell'animale. In particolare, se si vogliono massimizzare le prestazioni utilizzando insilati di mais nell'alimentazione, è necessario che questi siano di alta qualità e caratterizzati da un adeguato contenuto di nutrienti (Krämer-Schmid et al., 2016). L'assunzione di energia è il principale fattore limitante la produzione di latte per le vacche ad alta produzione ed è determinata dal contenuto energetico della dieta e dall'ingestione di sostanza secca (Illius e Jessop, 1996; Allen, 2000); esiste infatti, una forte correlazione positiva tra l'ingestione e la produzione latte (Hirstov et al., 2005).

1.2.1 La capacità di ingestione delle bovine

L'ingestione di sostanza secca è definita come “una funzione delle dimensioni e della frequenza dei pasti che sono determinati da fattori animali e dietetici che influenzano la fame e la sazietà” (Allen, 2000; Alborno et al., 2022). In generale, l'ingestione viene regolata dall'animale sia dal punto di vista fisico che da quello energetico (Waldo, 1986; Allen, 2000; Alborno et al., 2022). Nel primo caso essa dipende dalla capacità di distensione del rumine e dalla velocità con cui esso si svuota, mentre, nel secondo caso, è la concentrazione energetica della dieta a determinare l'ingestione: se la razione è a basso contenuto energetico l'animale tenderà a consumare più cibo per ottenere più energia; il contrario succede invece se la concentrazione energetica dell'unifeed è elevata. In particolare, sono gli acidi grassi volatili (AGV) prodotti dalle fermentazioni ruminanti ad inibire l'assunzione di alimento (Sjaastad et al., 2010). A tal proposito, in uno studio del 2009, Allen et al., ha proposto la teoria dell'ossidazione epatica in cui spiega il ruolo centrale del fegato nella regolazione dell'ingestione e ne ha descritto la potenziale applicazione alle diete dei ruminanti. Il fegato può infatti trasmettere segnali ai centri di ipotalamici che regolano l'appetito tramite afferenze vagali (Anil e Forbes, 1988), questi impulsi possono essere sia inibitori (provocano sazietà) che stimolatori (provocano fame) e sono correlati all'ossidazione epatica dei nutrienti (Friedman, 1997). Il comportamento alimentare è influenzato dalla frequenza di scarica del nervo; una maggiore ossidazione di composti nel fegato diminuisce la velocità di scarica, inibendo l'alimentazione, mentre una

minore ossidazione aumenta la velocità di scarica, stimolando l'appetito (Friedman, 1997). L'apporto di composti da ossidare al fegato dipende dal loro assorbimento dalla dieta o dalla loro estrazione dai tessuti extraepatici, i nutrienti estratti dal sangue e ossidati nel fegato dei ruminanti includono acidi grassi non esterificati (NEFA), amminoacidi, lattato, glicerolo, acidi grassi a catena corta (tranne l'acetato) e a catena media; tutti i nutrienti devono essere convertiti in acetilCoA nei mitocondri per la completa ossidazione a CO₂ nel ciclo dell'acido tricarbossilico (Allen, 2020). Tra i nutrienti metabolizzati dal fegato dei ruminanti, il propionato (uno dei principali prodotti del metabolismo dei carboidrati nel rumine) è probabilmente il segnale primario di sazietà in quanto il suo flusso al fegato aumenta notevolmente durante i pasti (Allen et al., 2009). In particolare, diete ricche in amido aumentano la quantità di propionato nel liquido ruminale, facendo aumentare il flusso di AGV dal rumine al sangue. Questo contribuisce ad aumentarne i livelli di propionato che raggiungono il fegato e se i suoi valori superano la capacità di gluconeogenesi del fegato, viene ossidato, producendo quantità di ATP sufficienti per evocare sazietà mediante stimolazione cerebrale mediata dal nervo vago (Grant e Ferraretto, 2018).

Per quanto riguarda il silomais, Grant e Ferraretto, (2018) riportano che l'aggiunta di ulteriori acidi organici (lattico, acetico, propionico ecc.) sulla massa insilata porta a una maggiore concentrazione di acidi che limitano l'ingestione di sostanza secca. Huhtanen et al., (2007) infatti, in uno studio di metanalisi ha riportato che gli effetti dei prodotti finali della fermentazione sono uno dei fattori che influisce maggiormente sull'ingestione di sostanza secca da insilati. Come detto, il propionato regola il consumo nei ruminanti in misura maggiore rispetto ad altri acidi organici (Allen et al., 2009), tuttavia la sua produzione nell'insilato è limitata e rappresenta una frazione marginale (<5%) di propionato prodotta nel rumine (Weiss et al., 2003). Infatti, solitamente le quantità presenti negli insilati non sono sufficienti per ridurre l'ingestione di sostanza secca, ma possono esercitare questo effetto se sono presenti anche elevate dosi di acido acetico (Mbyana et al., 1993). In relazione a questo, esiste una relazione negativa tra la concentrazione di acido acetico nell'insilato e il consumo di quest'ultimo (Anil et al., 1993; Weiss et al., 2003). Sembra invece che la quantità di acido lattico non abbia effetti sull'ingestione di insilato: come riportato da Oliveira et al., (2017) una concentrazione maggiore di questo acido può migliorare l'ingestione e quindi la produzione di latte, ma questi effetti sono verosimilmente dovuti in maniera indiretta alla ridotta concentrazione di altri composti piuttosto che da un aumento dell'acido lattico. Per quanto riguarda altri prodotti delle fermentazioni, è improbabile che insilati contenenti alti livelli di etanolo riducano l'ingestione (Grant e Ferraretto, 2018) e sebbene il butirrato stimoli gli osmocettori ruminali con una

potenziale riduzione delle dimensioni del pasto (Allen, 2000), altri AGV sono spesso segnalati come più potenti regolatori dell'ingestione (Grant e Ferraretto, 2018).

Dal punto di vista del riempimento fisico il reticolo-rumino è generalmente considerato il sito la cui distensione regola più frequentemente l'assunzione di cibo nei ruminanti (Allen, 1996). La distensione stimola i recettori nello strato muscolare nella parete dell'organo, che inviano segnali attraverso afferenze vagali al centro della sazietà ipotalamico, e che integra questi e altri stimoli per segnalare la fine di un pasto (Forbes, 1996). Il componente della dieta che influenza maggiormente il riempimento del reticolo-rumino e quindi l'assunzione di alimento è l'NDF (Van Soest, 1965; Waldo, 1986; Allen, 2000; Oba e Kammes-Main, 2022). Quest'ultimo, inoltre, fermenta e passa dal reticolo-rumino più lentamente rispetto agli altri componenti della dieta; perciò, nel tempo, ha un effetto di riempimento maggiore (Allen, 1996). L'NDF è stato utilizzato per più di 50 anni come parametro di qualità dei foraggi e delle diete somministrate alle vacche da latte (Oba e Kammes-Main, 2022), infatti già Van Soest, nel 1965 riportava come l'effetto di riempimento dei foraggi fosse correlato al contenuto di NDF e come i foraggi avessero un effetto di riempimento maggiore rispetto ai concentrati; ma, misurare solamente l'NDF non è sufficiente per prevedere l'ingestione delle vacche in lattazione (Allen, 2000). In letteratura viene riportato come ci sia un aumento dell'ingestione quando la concentrazione di NDF nella razione viene ridotta fino al 25%SS (Allen, 2000); tuttavia sotto questa soglia sembra che aumentando la percentuale di NDF aumenti anche l'assunzione di alimento in quanto, per tali valori, questa risulta limitata principalmente da fattori energetici. Al giorno d'oggi però, le razioni formulate per le bovine da latte ad alta produzione hanno sempre valori di NDF superiori al 25% (Britt et al., 2021). A questa categoria di bovine, dopo le prime due settimane dal parto, dovrebbe essere offerta una razione che porta ad un riempimento ruminale inferiore per massimizzare l'ingestione e la produzione in quanto la loro assunzione di sostanza secca è limitata principalmente dalla concentrazione di NDF dei foraggi utilizzati nella razione (Allen, 2023). È bene far notare che comunque, l'effetto di riempimento ruminale della fibra varia anche in base ad altri fattori come la digeribilità dell'NDF e la lunghezza del taglio dei foraggi nella razione (Allen, 1996). Come già accennato, anche l'amido può regolare l'assunzione di cibo e lo fa tramite il meccanismo dell'ossidazione epatica (Allen et al., 2009), in quanto viene convertito a propionato nel rumino dai batteri amilolitici (Sjaastad et al., 2010). Quindi in vacche che consumano diete altamente fermentescibili, diminuire la quantità di amido nella dieta potrebbe ridurre l'ipertonicità nel reticolo-rumino e il flusso di propionato assorbito con grandi aumenti dell'ingestione. Tuttavia, quando questa non è limitata dagli effetti degli AGV, la riduzione della fermentazione dell'amido ruminale potrebbe comportare una minore

produzione di latte (Allen, 2000). Questo sembra essere proprio il caso delle bovine ad elevata produzione: per questo tipo di animali, l'ingestione è limitata principalmente dalla distensione del rumine (Oba e Allen, 1999); infatti in uno studio di Voelker et al., (2002), l'aumento della concentrazione di amido della razione a scapito dell'NDF da foraggio ha aumentato l'ingestione e la produzione di latte delle vacche più produttive. La quantità di amido nella dieta va quindi regolata in funzione della quantità di latte prodotta, ma anche in base allo stadio di lattazione degli animali e al loro stato di riserve corporee (Allen, 2023). Mazumder e Kumagai, (2006) inoltre, hanno riportato altri fattori che influenzano l'ingestione quali: il rapporto tra foraggi e concentrati nella dieta, il suo contenuto di proteine grezze e fattori climatici come la temperatura media e l'umidità, ma soprattutto la produzione di latte che è un fattore determinante, in quanto un animale altamente produttivo sarà portato a nutrirsi per soddisfare i suoi elevati fabbisogni.

1.2.2 Calcolare l'ingestione di sostanza secca

Sebbene l'assunzione di sostanza sia un fattore così importante, è difficile da misurare nelle classiche condizioni di allevamento in cui le vacche sono stabulate e ricevono l'alimento in gruppi. La conoscenza della variazione individuale dell'assunzione di cibo sarebbe un fattore vantaggioso per una formulazione più precisa della razione e per la selezione delle vacche in base all'efficienza della produzione di latte (Garnsworthy e Unal, 2004). A questo proposito, esiste una formula che permette di determinare l'ingestione (I) degli animali, sulla base della stima della digeribilità dell'alimento consumato (D) e sulla produzione fecale (F): $I = \frac{F}{1-D}$ (Verzichi e Trabalza Marinucci, 2002). Siccome è inverosimile raccogliere tutte le feci prodotte dall'animale nell'arco di una giornata, la produzione fecale viene di solito stimata dalla diluizione nelle feci di un indicatore o marker, totalmente indigeribile ed assente nella dieta degli animali, che viene somministrato per via orale. La produzione fecale viene quindi calcolata come rapporto tra la quantità di marker somministrato giornalmente e la sua concentrazione nelle feci (Verzichi e Trabalza Marinucci, 2002). Anche per la determinazione della digeribilità, si fa ricorso all'impiego dei marcatori, ma questo aspetto verrà trattato nel seguente capitolo di questo elaborato. I marker sono generalmente classificati in esterni ed interni: primi vanno aggiunti e mescolati con l'unifeed, come l'ossido di cromo (Cr_2O_3) (Titgemeyer, 1997) o il biossido di titanio (TiO_2) (Titgemeyer et al., 2001), mentre i secondi sono costituenti naturali indigeribili presenti nell'alimento come la lignina, le ceneri acido-insolubili (AIA) e gli idrocarburi a lunga catena (n-alcani). Mediante la misurazione di questi

ultimi in particolare, alcuni autori sono riusciti a valutare con accuratezza l'ingestione in prove con bovine da latte (Garnsworthy e Unal, 2004; Bani et al., 2014) e bovini da carne al pascolo (Undi et al., 2008). Gli n-alcani sono idrocarburi saturi contenuti nelle cere delle cuticole delle piante, la procedura per valutare il livello di ingestione si basa sull'esame di una coppia di alcani: viene somministrata una quantità conosciuta di un alcano di sintesi a catena pari (solitamente il C32) e viene valutato il rapporto tra la concentrazione fecale dell'alcano naturale (C33) e quella dell'alcano somministrato (Verzichi e Trabalza Marinucci, 2002) come riportato in Figura 4. Nonostante avere un calcolo accurato dell'ingestione possa aiutare nel valutare correttamente l'efficienza alimentare degli animali e nella formulazione della razione degli animali, ci sono dei limiti legati all'uso dei marcatori che ne riducono l'utilizzo. Tra questi fattori abbiamo il recupero incompleto dei marker nelle feci, la variazione giornaliera della loro escrezione fecale e soprattutto un elevato dispendio di manodopera e tempo per la loro somministrazione e recupero delle feci (Garnsworthy e Unal, 2004).

$$I = \frac{D_{32} \times F_{33} / F_{32}}{(H_{33} - H_{32}) \times F_{33} / F_{32}} \quad (4)$$

dove:
I è l'ingestione espressa in kg di sostanza organica (SO)/die;
D32 è la dose giornaliera di C32 (mg/giorno);
F32 e **F33** sono le concentrazioni fecali di C32 e C33 (mg/kg SO);
H32 e **H33** sono le concentrazioni di C32 e C33 (mg/kg SO) nell'alimento.

Figura 4. Formula per il calcolo dell'ingestione attraverso l'utilizzo di n-alcani (Verzichi e Trabalza Marinucci, 2002)

1.2.3 Influenza della dieta sulla composizione del latte

La composizione della dieta delle bovine è un fattore che ha una notevole influenza sulla qualità del latte ed è un mezzo che viene utilizzato per apportare rapidi cambiamenti nel contenuto di macronutrienti presenti nel secreto, ma la relazione tra i componenti della razione e la composizione del latte è complessa (Sutton, 1989; Jenkins e McGuire, 2006). In particolare, la quantità di NDF presente nell'unifeed è in grado di condizionare il contenuto di grasso del latte; questo, infatti, è sintetizzato nella mammella a partire da glicerolo e acidi grassi liberi che derivano da acetato e beta-idrossibutirrato circolanti, oppure vengono utilizzati acidi grassi circolanti nel sangue provenienti dalla mobilizzazione del grasso corporeo e dall'assorbimento

dalla dieta (Mansbridge e Blake, 1997; Sjaastad et al., 2010; Tyasi et al., 2015). L'acetato e il butirrato derivano dalla fermentazione ruminale dei carboidrati (Mansbridge e Blake, 1997; Sjaastad et al., 2010), e in particolare dalla cellulosa e dall'emicellulosa contenute nell'NDF; un aumento della quantità di foraggi nella dieta porterà quindi ad un aumento concentrazione di NDF e della percentuale di grasso nel latte (Beauchemin e Buchanan-Smith, 1989; Beauchemin, 1991; Broderick, 2003), mentre la riduzione del rapporto tra foraggi e concentrati nella dieta porta ad una riduzione del grasso nel latte (Sutton, 1989; Broderick, 2003), infatti questo fenomeno è stato osservato in seguito a somministrazione di grandi quantità di amido fermentescibile, che causano un'alterazione della bioidrogenazione degli acidi grassi (Bradford e Allen, 2004). È comunque un fatto assodato che la componente del latte più facilmente manipolabile attraverso la dieta sia il contenuto di grassi, mentre risulta più difficile riuscire a modificare il contenuto di proteine e lattosio (Sutton, 1989; Jenkins e McGuire, 2006). Anche il contenuto dietetico di proteine sembra influenzare il contenuto di grasso nel latte, tuttavia su questo aspetto ci sono risultati contrastanti dai vari studi: alcuni autori riportano un aumento del contenuto di grasso in diete con alto contenuto di proteine (Broderick, 2003; Leonardi et al., 2003) altri invece una riduzione (Rafiee-Yarandi et al., 2019). Molte pubblicazioni riportano comunque come l'aumento delle proteine nella dieta porti ad un aumento della produzione di latte (Klascheur et al., 1999; Rafiee-Yarandi et al., 2019; Van der Linden et al., 2021); tuttavia questo sembra essere vero solo fino ad un certo livello: Broderick, (2003) non ha riscontrato ulteriori incrementi di produzione per valori di proteina grezza superiori a 17%SS. Superare questa soglia sembrerebbe quindi svantaggioso sia dal punto di vista economico che ecologico in quanto porterebbe ad inutili emissioni di azoto nell'ambiente.

Come già detto in precedenza, e contrariamente a quanto riportato per la quantità di grasso, la percentuale di proteine nel latte risulta più difficile da modificare attraverso la dieta. Infatti, queste vengono prodotte nelle cellule epiteliali mammarie da aminoacidi assorbiti a livello intestinale che derivano dalla digestione di proteine che provengono dal rumine (Sjaastad et al., 2010): queste possono essere sia proteine alimentari che hanno attraversato i prestomaci senza essere digerite (proteine bypass) sia proteine prodotte dai microrganismi ruminali (Oba e Allen, 2003; Sjaastad et al., 2010). Per aumentare il loro contenuto nel latte, non basta quindi aumentare il contenuto proteico della dieta, ma bisogna cercare di massimizzare l'energia fornita ai batteri nel rumine che la potranno così utilizzare per la sintesi proteica. In particolare, in alcuni studi (Cao et al., 2008; De Nardi et al., 2014) del mais macinato più finemente rispetto a quello dei gruppi di controllo è stato utilizzato nelle razioni degli animali. Le particelle di

mais più piccole hanno aumentato la superficie di adesione microbica, questo ha portato ad una rapida e quasi completa degradazione dell'amido al loro interno a livello ruminale e quindi ad una maggiore disponibilità di energia fermentabile per i microrganismi per la sintesi proteica, portando infine ad un aumento della percentuale di proteine del latte. Tuttavia, la maggiore e più rapida degradazione dell'amido a livello ruminale ha portato le vacche alimentate con mais più fino a trascorrere più tempo al giorno con un pH reticolare inferiore a 5.5 mostrando un rischio maggiore di acidosi ruminale subacuta rispetto al controllo nonostante il livello di amido della razione fosse lo stesso (De Nardi et al., 2014). Questo è avvenuto perché una fermentazione più veloce ha portato a una più rapida produzione e accumulo di AGV e acido lattico nel rumine, con conseguente riduzione del pH (Plaizier et al., 2008; Aschenbach et al., 2011). Comunque, la relazione positiva tra la disponibilità di carboidrati fermentescibili, specialmente amido, nel rumine e la produzione di proteine batteriche con la produzione di proteine del latte è un processo ormai ben noto (Oba e Allen, 2003; Piccioli-Cappelli et al., 2022). Il meccanismo responsabile di questa relazione è dovuto ad un rapporto propionato:acetato ruminale superiore, che si traduce in una maggiore produzione di glucosio epatico (Seal et al., 1992), che porta ad un aumento del rilascio di insulina, che a sua volta stimola la sintesi proteica nella ghiandola mammaria (Mackle et al., 1999).

1.2.4 Omogeneità della razione e attività di selezione

Altri due fattori da tenere in grande considerazione quando si alimentano vacche da latte ad elevata produzione, sono l'omogeneità della razione e la capacità degli animali di selezionare particelle di dimensione differente (Costa et al., 2019; Serva et al. 2021; Andrighetto et al., 2023). La necessità di garantire una continua ed equilibrata attività ruminale impone infatti, la preparazione di diete complete ed in grado di garantire la contemporanea ingestione di tutti i nutrienti della razione (Sova et al., 2013) nelle proporzioni definite in funzione della categoria, della fase fisiologica e dei livelli produttivi degli animali allevati (Andrighetto et al., 2016). La fornitura di una razione omogenea, per quanto riguarda sia la composizione sia fisica che chimica, è infatti una parte essenziale per massimizzare le prestazioni delle vacche (Sova et al., 2014). L'omogeneità della razione è fortemente correlata alla composizione degli ingredienti inseriti nel carro miscelatore, ed in particolare al loro contenuto di sostanza secca e NDF (Serva et al., 2021); infatti le cause principali di disomogeneità dell'unifeed sono un alto contenuto di NDF, un'elevata umidità o il sovraccarico del carro (Andrighetto et al., 2016; Serva et al., 2021). Solitamente le maggiori problematiche di disomogeneità vengono riscontrate nelle

frazioni di unifeed scaricate dalla seconda metà sino alla fine del fronte mangiatoia (Andrighetto et al., 2016). Per garantire l'omogeneità serve un tempo adeguato di miscelazione degli ingredienti nel carro perché quando ciò non avviene, può accadere che questo eroghi percentuali diverse di alcuni nutrienti in punti differenti della corsia di alimentazione (Sova et al., 2014; Marchesini et al., 2020). Una miscelazione insufficiente, infatti, può causare una disomogeneità dell'unifeed lungo la mangiatoia (Marchesini et al., 2020), mentre una miscelazione troppo elevata può causare un'eccessiva riduzione della lunghezza media geometrica delle particelle (LMG) (Heinricks, 2013) con conseguenze sulla salute degli animali (Mertens, 1997; Miller-Cushon e DeVries, 2017).

A livello di allevamento sono disponibili degli strumenti per monitorare l'omogeneità della dieta e la capacità di selezione degli animali, come il Penn State Particle Separator (PSPS) (Kononoff et al., 2003), utilizzato inizialmente per l'analisi delle dimensioni delle particelle di foraggio nelle razioni (Lammers et al., 1996). Il primo prototipo utilizzato da Lammers et al., (1996), era dotato solo di due setacci (con fori di 19 mm e 8 mm) ed è il precursore del moderno PSPS (Heinricks, 2013) che contiene anche un setaccio in più da 4 mm. In particolare, la porzione di unifeed trattenuta dai diversi setacci del PSPS è stata utilizzata per stimare il valore di NDF fisicamente efficace (peNDF), che si ottiene moltiplicando il contenuto di NDF della dieta per la percentuale di particelle trattenute dai primi tre setacci del PSPS (≥ 4 mm) (Heinricks, 2013). Il peNDF è un valore correlato alle caratteristiche fisiche della fibra (principalmente alla dimensione delle particelle) che influenzano l'attività masticatoria, il pH e il contenuto ruminale dell'animale (Mertens, 1997), fattori il cui equilibrio è fondamentale per evitare l'insorgenza di patologie come l'acidosi ruminale (Plaizier et al., 2008). La prima procedura per il calcolo di peNDF descritta da Mertens, (1997) ha utilizzato 1,18 mm come valore soglia al di sopra del quale le particelle di unifeed sono considerate fisicamente efficaci per le vacche da latte. Il requisito minimo di peNDF proposto da Mertens, (1997) per le bovine in lattazione è del 22%SS, e viene indicato come il valore che consente di mantenere un pH ruminale di 6. Tuttavia, negli anni i ricercatori della Penn State, attraverso i loro studi hanno chiaramente dimostrato che questa soglia per le vacche ad alta produzione è maggiore di 1,18 mm ed è più vicina ad un valore di 4 mm circa (Heinricks, 1997) ed è per questo motivo che hanno inserito un ulteriore setaccio con fori di questa dimensione. Il valore medio della razione classificato come fisicamente efficace (≥ 4 mm) dovrebbe variare dal 60 al 70% (Heinricks, 2013). Il valore di peNDF è strettamente correlato a quello di LMG perché il tempo di miscelazione del carro influenza la lunghezza delle particelle, e quindi anche la percentuale di queste che viene trattenuta nei vari setacci del PSPS.

In un recente studio, Serva et al., (2021) ha dimostrato che l'utilizzo di uno strumento NIRS portatile (Polispec^{NIR}) è un metodo sufficientemente accurato da poter essere utilizzato in campo come mezzo di screening rapido delle razioni per analizzarne le principali caratteristiche chimiche e fisiche, tra cui peNDF, omogeneità e selezione. Inoltre, l'autore ha proposto una serie di algoritmi per il calcolo dei valori di omogeneità (Hi) e selezione (Si) grazie all'utilizzo di un PSPS modificato (due setacci in più rispetto a quello descritto da Heinrichs, 2013) e di scansioni NIRS eseguite in più punti della mangiatoia. Questi algoritmi sono stati utilizzati con successo anche da Andrighetto et al., (2023) per comparare i valori omogeneità e selezione tra allevamenti ad elevata e a bassa produzione di latte. In questo studio, tra gli allevamenti appartenenti a categorie differenti, i valori di Hi variavano in modo notevole: sono stati rilevati valori di omogeneità più elevati e minori coefficienti di variazione di Hi negli allevamenti da latte ad alta produzione. Hi e Si hanno avuto influenze diverse sulla produzione di latte nelle due categorie di allevamenti e la loro variazione sembra essere più rilevante in quelle aziende caratterizzate da una bassa produzione, probabilmente a causa di errori nella gestione delle razioni (Serva et al., 2021; Andrighetto et al., 2023). I dati hanno quindi indicato che nelle aziende a produzione elevata, la composizione chimica e fisica dell'unifeed è più omogenea lungo la corsia di alimentazione e che è presente una sua maggiore uniformità nel tempo: fattori di fondamentale importanza per migliorare l'efficienza alimentare (Serva et al., 2021). Infatti, la maggiore variabilità dell'unifeed e le abitudini delle bovine di scegliere la stessa posizione nella mangiatoia (Costa et al., 2019) aumentano la differenza nell'assunzione giornaliera di nutrienti e alterano la popolazione microbica a livello ruminale. Questo equilibrio deve invece, essere mantenuto il più costante possibile nel tempo e sembra che maggiore sia la variazione dei nutrienti dell'unifeed, maggiore sarà il rischio di compromettere sia la produzione che la salute delle bovine (Sova et al., 2013). Ciò è in linea con i risultati di un altro studio (Sova et al., 2014), in cui un aumento dello 0,5% del coefficiente di variazione dell'energia netta per la lattazione, cioè l'energia fornita dalla dieta e utilizzata per la produzione di latte (Conrad et al., 1984), ha portato ad una riduzione dell'ingestione di sostanza secca di 1Kg/giorno e una conseguente diminuzione della produzione di latte di 3.2 Kg/giorno (Figura 5). Mentre un incremento del 5% del coefficiente di variazione della concentrazione di particelle lunghe dell'unifeed è stato associato a una diminuzione di 1,2 kg/giorno (Sova et al., 2014); queste variazioni, inoltre, hanno ridotto anche l'efficienza alimentare. Questo effetto è probabilmente dovuto ad una maggiore efficienza nell'utilizzo dei nutrienti da parte dei microrganismi ruminanti che formano comunità microbiche efficienti ed equilibrate in presenza di un apporto costante di una razione bilanciata (Andrighetto et al. 2023). Tali comunità microbiche, se alterate da uno

sbilibrato dietetico, potrebbero infatti impiegare circa 14 giorni per cambiare e adattarsi alla variazione della dieta (Gruninger et al., 2019).

Per quanto riguarda l'attività di selezione svolta dalle bovine da latte (Leonardi e Armentano, 2003; Sova et al., 2013; Sova et al., 2014), gli animali generalmente selezionano la frazione più fine (< 4 mm) e ricca di amido della razione e tendono a scartare attivamente quella più lunga (> 19 mm) ricca di fibra; lo stesso vale per i vitelloni da carne (Marchesini et al., 2020). Questo comportamento causa un maggiore apporto di carboidrati altamente fermentescibili e un minore apporto di peNDF rispetto a quanto previsto ed è associato ad una riduzione del pH ruminale con possibile sviluppo di acidosi ruminale subacuta (SARA) (Plaizier et al., 2008; Miller-Cushon e DeVries, 2017).

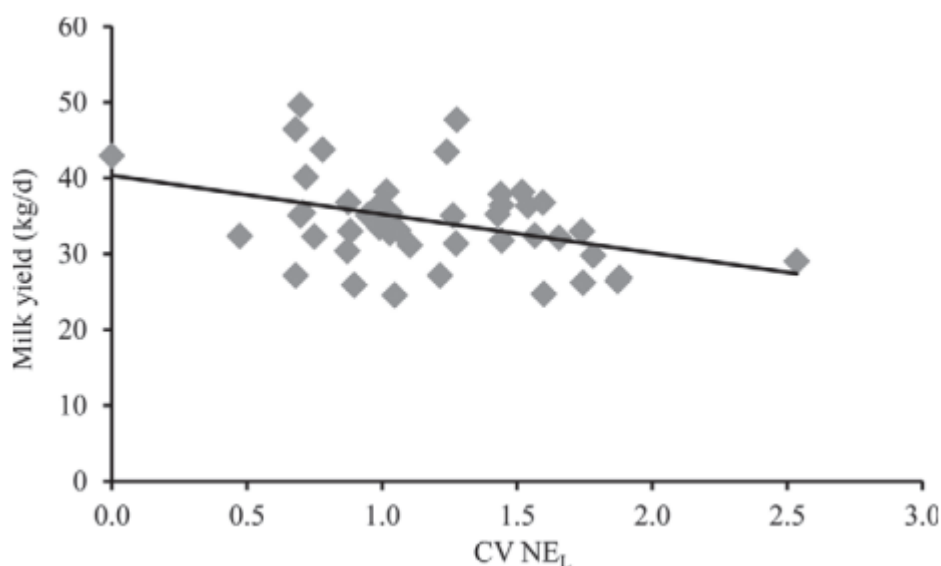


Figura 5. Relazione tra il coefficiente di variazione dell'energia netta per la lattazione (in ascissa) e la produzione di latte (in ordinata) (Sova et al., 2014)

La selezione dipende principalmente dal rapporto tra foraggi e concentrati nella razione, dal tempo di mescolamento del carro e dalla gestione dell'alimentazione in azienda (Serva et al., 2021). L'apporto sbilanciato di nutrienti dovuto alla selezione può causare una riduzione delle prestazioni dell'animale, come visto da Sova et al., (2013) infatti, nelle vacche da latte ogni 2% di rifiuto (selezione) di particelle lunghe, calcolato come rapporto tra l'assunzione di queste e la loro assunzione prevista (Leonardi e Armentano, 2003), portava a una riduzione di 1 kg/giorno nella produzione di latte. Tuttavia, i bovini si adattano bene a piccole fluttuazioni ($\pm 2\%$ SS) giornaliere di NDF e amido (McBeth et al., 2013; Marchesini et al., 2020) senza ridurre l'ingestione e la produzione di latte o l'incremento di peso giornaliero; infatti, una

leggera variazione giornaliera nella composizione della razione è inevitabile (Sova et al., 2013). In uno studio di Marchesini et al., (2020) sui vitelloni da carne, questi hanno manifestato una maggiore attività di selezione quando sono stati nutriti con unifeed miscelato per dieci minuti in meno rispetto al controllo (20 minuti vs 30 minuti). Questo era dovuto alla più alta proporzione di particelle lunghe che venivano scartate attivamente da parte degli animali, mentre quando il tempo di miscelazione è stato prolungato, c'è stata una diminuzione della variazione della composizione dell'unifeed tra recinti e tra i giorni di campionamento. Il motivo di questa differenza è legato al fatto che le particelle dei vari ingredienti non hanno avuto tempo sufficiente per essere miscelate correttamente nei 20 minuti, di conseguenza le particelle più secche e dense, come i concentrati, non hanno avuto il tempo di attaccarsi alle particelle più umide, come quelle di insilato, e sono precipitate accumulandosi sul fondo del carro miscelatore (Schingoethe, 2017). A questo proposito, i produttori di carri raccomandano spesso l'ordine e il tempo di carico degli ingredienti, ma gli operatori potrebbero comunque commettere errori dovuti a mancanza di attenzione o di formazione professionale (Sova et al., 2014) o all'abitudine nell'utilizzare pratiche di carico meno efficienti (Andrighetto et al., 2016). Il conseguimento dell'omogeneità delle caratteristiche chimico-fisiche dell'unifeed lungo tutto il tratto della mangiatoia è dunque un importante obiettivo da perseguire da parte dell'allevatore, al fine di garantire un'efficiente attività digestiva metabolica alle vacche da latte (Andrighetto et al., 2016) che si traduce in miglioramenti nella produttività della mandria (Sova et al., 2014).

1.3 Digeribilità della dieta

1.3.1 Metodi per il calcolo della digeribilità ed effetti della composizione della dieta

La digeribilità è definita come la quantità di alimento ingerito che non viene escreta nelle feci e che, quindi è assorbita da parte dell'organismo animale; viene comunemente espressa come rapporto o in termini di percentuale sulla sostanza secca ingerita (%SS) (McDonald et al., 2011). La digeribilità della razione riflette sia la digeribilità intrinseca degli ingredienti che la compongono sia la capacità digestiva dell'animale (Potts et al., 2017a; Bach et al., 2020), ed è quindi un parametro che serve a determinare quanto l'animale riesce a sfruttare i nutrienti che gli vengono forniti nella dieta.

I principali fattori che influiscono sulla digeribilità sono: la composizione chimica della razione, il pretrattamento (es. taglio o macinatura) degli ingredienti, l'integrazione con enzimi (nei non ruminanti), la specie animale e la quantità di cibo consumata dagli animali (McDonald et al., 2011).

La formula generale per il calcolo della digeribilità è la seguente:

$$DigSS (\%) = \left[\frac{KgSS\ ingerita - KgSS\ nelle\ feci}{KgSS\ ingerita} \right] * 100 \text{ (McDonald et al., 2011)}$$

La formula riportata è valida per la sostanza secca, ma può essere usata per calcolare la digeribilità di tutti i componenti della dieta (amido, NDF, proteine ecc.) semplicemente sostituendo SS con il nutriente da considerare. Tuttavia, siccome non è possibile raccogliere tutte le feci prodotte giornalmente da un animale, anche per la digeribilità, come per l'ingestione si possono utilizzare dei marker indigeribili per calcolarne il valore (Verzichi e Trabalza Marinucci, 2002; McDonald et al., 2011). I marcatori interni o esterni che siano, sono gli stessi che vengono sfruttati per il calcolo dell'ingestione, ma le formule per il calcolo sono ovviamente differenti. Tra i marker comunemente utilizzati ci sono l'ossido di cromo (Cr₂O₃) tra gli esterni (Titgemeyer, 1997; Verzichi e Trabalza Marinucci, 2002) e la lignina per gli interni (MacRae et al., 1974; Verzichi e Trabalza Marinucci, 2002). Le formule per il calcolo della digeribilità di un alimento o della sostanza secca attraverso l'uso di marcatori sono le seguenti:

$$DSS (\%) = \frac{\text{marker nelle feci (g/KgSS)} - \text{marker nell'alimento (g/KgSS)}}{\text{marker nelle feci (g/KgSS)}} * 100$$

(McDonalds et al., 2011)

$$DN (\%) = \left(1 - \frac{(\text{marker nell'alimento (g/KgSS)}) * (N\ nelle\ feci (g/KgSS))}{\text{marker nelle feci (g/KgSS)} * N\ nella\ dieta (g/KgSS)} \right) * 100$$

Con N che indica il nutriente da valutare (PG, NDF, AMIDO, ecc) e ND la sua digeribilità (Schäfers et al., 2018).

Questo metodo di stima attraverso i marcatori, fornisce il valore della digeribilità totale del componente che viene valutato, ma l'apparato gastroenterico dei ruminanti è dotato di prestomaci che permettono la digestione microbica dei nutrienti e il loro assorbimento prima del loro arrivo nell'intestino dove comunque avvengono processi di digestione e assorbimento (Sjaastad et al., 2010; McDonald et al., 2011). L'efficienza di questi processi è diversa in base al tratto dell'apparato gastroenterico considerato e al tipo di nutriente che si va a valutare. In

particolare, ha grande importanza dal punto di vista produttivo il sito di digestione dell'amido. Generalmente la sua digeribilità è vicina al 100% se si considera tutto il tratto gastroenterico (Jensen et al., 2005; Ali et al., 2012; Khan et al., 2015), ma quando questo viene digerito nell'intestino tenue viene utilizzato in modo più efficiente per sostenere la produzione lattea rispetto all'amido digerito nel rumine (McDonald et al., 2011; De Nardi et al., 2014). Secondo Owens et al., (1986) infatti, l'amido digerito nell'intestino tenue fornisce il 42% in più di energia rispetto a quello digerito nel rumine; ci sono inoltre studi che riportano una minore ingestione di sostanza secca all'aumentare della digestione di amido a livello ruminale (Allen et al., 2000). Infatti, la quantità di amido digerito nel rumine o nell'intestino influenza la natura dei prodotti finali della digestione (acidi grassi volatili o glucosio) (Sjaastad et al., 2010; McDonald et al., 2011), e quindi la quantità dei prodotti della fermentazione ruminale e l'efficienza di questo processo (Jensen et al., 2005). Tuttavia, la digeribilità ruminale è il risultato dell'equilibrio tra capacità di degradazione microbica e velocità di passaggio delle ingesta; pertanto, non è solo il tasso di degradazione ad AGV che influenza se l'amido sarà digerito o finirà nell'intestino, ma anche la velocità di passaggio del contenuto ruminale nell'intestino (Jensen et al., 2005; Lopes et al., 2015a). La velocità e l'entità della digestione dell'amido nel rumine influenzano anche il pH ruminale, il contenuto e la composizione del grasso del latte (Khan et al., 2012). Inoltre, Oba e Allen, (2003) hanno osservato una relazione positiva tra l'efficienza microbica (espressa come rapporto tra i grammi di azoto microbico che lasciano il rumine e i Kg di sostanza secca in esso digeriti) e la velocità di passaggio dell'amido, che indica che l'energia della fermentazione ruminale è stata utilizzata in modo più efficiente per la crescita microbica e la produzione di proteine microbiche all'aumentare della velocità di passaggio dell'amido. Se l'amido può essere digerito in modo più efficiente nell'intestino, lo stesso non vale per l'NDF che viene principalmente convertito in AGV nel rumine; i ruminanti hanno comunque una notevole capacità di fermentazione intestinale, che viene utilizzata con buoni risultati quando molto materiale fibroso raggiunge il cieco, ma in generale, la fermentazione batterica nell'intestino è meno efficace rispetto a quella ruminale perché il materiale non viene trattenuto per un tempo sufficiente (McDonald et al., 2011).

Per valutare dove è avvenuta la digestione degli alimenti nell'animale bisogna utilizzare animali in cui sono state inserite chirurgicamente delle cannule ruminali e/o duodenali (Jensen et al., 2005; Ali et al., 2012), attraverso la creazione di fistole chirurgiche nella parete dell'organo. Brevemente, i campioni di alimento da analizzare (es. insilato) vengono prima pesati e analizzati chimicamente, in seguito vengono inseriti nel rumine all'interno di sacchetti di nylon

con pori di alcuni μm e vengono lasciati in incubazione per alcune ore; dopo la rimozione, le sacche vengono lavate e sottoposte ad analisi per determinare quanto alimento è stato digerito nel tempo (Jensen et al., 2005; Ali et al., 2012). Mentre per le cannule intestinali, del residuo ruminale macinato viene inserito nella cannula e incubato insieme a due piccole sfere di ferro (mm) all'interno di sacchetti come quelli riportati in precedenza, questi possono essere raccolti dalla cannula ileale se a questa è stato applicato un magnete, trattenuto da un tappo di gomma, oppure possono essere raccolti direttamente dalle feci (Ali et al., 2012). Inoltre, nelle bovine con fistola ruminale si può misurare rapidamente il pH ruminale e valutare la percentuale di AGV nel liquido ruminale senza dover ricorrere alla ruminocentesi (Lopes et al., 2015a). Tuttavia, nel nostro Paese, l'utilizzo di animale fistolati non è consentito, nel rispetto delle leggi vigenti in tema di benessere animale ed in particolare del Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26 che ha attuato la Direttiva n. 2010/63/UE sulla sperimentazione animale. Esistono comunque anche metodi di valutazione della digeribilità che utilizzano tecniche in vitro; ad esempio, Lopes et al., (2015a) ha messo a punto un sistema di analisi della digeribilità totale dell'NDF utilizzando l'incubazione in vitro dell'alimento in fluido ruminale tamponato per 240 ore; questa tecnica sembra riuscire a prevedere la digeribilità totale dell'NDF in modo sovrapponibile alle tecniche in situ (Lopes et al., 2015a/b). Altri autori invece, ritengono che queste tecniche non possano sostituire la sperimentazione sugli animali, ma solamente fornire informazioni ulteriori sui processi che avvengono nel rumine in condizioni standard (Castillo e Hernández, 2021).

Le caratteristiche della fibra di un alimento sono il fattore che ha la maggiore influenza sulla digeribilità della dieta, e sia la sua quantità (%SS) che la qualità (Digeribilità dell'NDF) sono importanti (McDonald et al., 2011). La digeribilità dell'NDF (DigNDF) è influenzata soprattutto dal contenuto di lignina della pianta e dal suo legame con gli altri componenti fibrosi (Ferraretto et al., 2015b; Khan et al, 2015), infatti più questa aumenta, minore sarà la digeribilità totale dell'NDF, perché la lignina non viene digerita nel tratto gastroenterico. Esistono varietà di mais (ibridi brown midrib) che hanno un contenuto di lignina inferiore e sono caratterizzati dunque da una maggiore digeribilità (Oba e Allen, 1999; Oba e Allen, 2000; Der Bedrosian et al., 2012; Ferraretto et al., 2015b). Nelle bovine da latte, migliorare i valori di digNDF può essere molto vantaggioso perché la fibra più digeribile stimola l'ingestione poiché lascia il rumine più velocemente creando spazio per consentire una maggiore assunzione di cibo (Allen e Oba 1996). Oba e Allen, (1999) infatti hanno determinato che ad un aumento di un'unità percentuale della digeribilità dell'NDF corrisponde un aumento di 0,17 kg di ingestione di

sostanza secca e di 0,25 kg della quantità di latte corretto al 4% di grasso prodotto; più recentemente anche Krämer-Schmid et al., (2016) ha riportato un aumento della produzione di latte all'aumentare dei valori di DigNDF. Questo miglioramento nella produzione sembra essere più evidente nelle vacche ad inizio lattazione (Allen e Oba, 1996): ricevere un alimento con elevata DigNDF può essere quindi particolarmente vantaggioso in questi animali perché solitamente non riescono a consumare cibo in quantità sufficiente per ottenere l'energia necessaria a mantenere i loro fabbisogni e mobilitano le riserve corporee per sostenere la produzione di latte (Allen e Oba, 1996).

Un problema che si riscontra frequentemente nelle vacche da latte più produttive è la riduzione della digeribilità della razione e dei suoi componenti dovuto ad un aumento della quantità di cibo consumato per mantenere la produzione (Potts et al., 2017b; Andrighetto et al., 2023). L'aumento dell'ingestione provoca un aumento della velocità di passaggio delle ingesta e l'alimento è quindi esposto all'azione degli enzimi digestivi per un periodo di tempo più breve, con una conseguente riduzione della digeribilità (Tyrrel e Moe, 1975; McDonald et al., 2011; Cortese et al., 2019). A questo proposito, Potts et al., (2017b) ha analizzato i valori delle performance produttive delle bovine da latte negli Stati Uniti tra il 1970 e il 2014 ed ha rilevato che la produzione media di latte e l'ingestione di sostanza secca sono aumentate rispettivamente di 19,7 e 10,3 kg/giorno mentre la digeribilità della sostanza secca è diminuita dello 0,07% l'anno per una riduzione totale del 3,08%; inoltre anche la digeribilità di proteine e NDF è diminuita rispettivamente di 0,04% 0,17% l'anno. Le maggiori riduzioni di digeribilità dovute alla velocità di passaggio dell'alimento si verificano con concentrati pellettati o foraggi macinati molto finemente, che essendo sotto forma di particelle di piccola dimensione lasciano i prestomaci più velocemente. (McDonald et al., 2011).

1.3.2 Digeribilità degli insilati

Gli insilati di mais sono uno dei foraggi più utilizzati nelle razioni della vacca da latte (Erdman et al., 2011; Marchesini et al., 2017; Grant e Adesogan, 2018) e la loro digeribilità ha un grosso impatto sulle performance produttive di questi animali (Ferraretto e Shaver 2012; Khan et al., 2015). Tuttavia, i foraggi comunemente utilizzati nell'alimentazione bovina, hanno una composizione molto variabile e la loro digeribilità può cambiare notevolmente (McDonald et al., 2011).

Nonostante De Boever et al., (1993) attraverso studi in vitro, abbia riportato riportato che lo stadio di maturità del mais al momento della raccolta, calcolato valutando la linea del latte, non

sembra avere effetti dimostrabili sulla digeribilità, pubblicazioni più recenti suggeriscono che i cambiamenti morfologici che avvengono con l'invecchiamento della pianta, siano un fattore fondamentale nella riduzione della sua digeribilità (Allen, 2003; Ferraretto e Shaver 2012; Khan et al., 2015). In particolare, sono l'aumento del contenuto di lignina (Cone ed Engels, 1993) e la maggior quantità di granuli di amido vitrei (Allen, 2003) presenti nelle piante più mature a ridurre la digeribilità rispettivamente di NDF e amido. A questo proposito, la digeribilità dell'amido nell'insilato è influenzata dalla matrice amido-proteica (Kung et al., 2018), che limita la digestione da parte dei microrganismi nel rumine (McAllister et al., 1994), mentre la digeribilità dell'NDF è limitata principalmente dalla reticolazione della lignina con gli altri componenti fibrosi della parete cellulare (Ferraretto et al., 2015b; Khan et al., 2015) e dalla quantità di lignina (Khan et al., 2015). Tuttavia, anche altre variabili come il genotipo del mais, le condizioni di crescita della pianta, la sua lavorazione meccanica e l'insilamento possono modificare la composizione chimica del silomais (Borreani et al., 2018) quindi le sue caratteristiche di digestione ed in particolare quelle dell'amido (Khan et al., 2015).

Il genotipo del mais influenza il tipo di amido che esso contiene. Infatti esistono due diversi polimeri del glucosio (monomero che compone l'amido): l'amilosio, molecola a catena lineare molto fitta; e l'amilopectina, molecola a catena ramificata poco compatta (Sjaastad et al., 2010; Khan et al., 2015). A causa della sua struttura compatta, l'amilosio è più resistente all'idrolisi enzimatica quindi alla degradazione ruminale rispetto all'amilopectina (Khan et al., 2015). Il tipo di endosperma nella cariosside (mais vitreo e mais dentato) influenza invece la qualità della matrice proteica che contiene i granuli di amido: nel mais dentato i granuli sono debolmente delimitati da una matrice sottile e discontinua, mentre le cariossidi di mais vitreo hanno un endosperma spesso e duro con i granuli di amido incapsulati da una densa matrice proteica (Khan et al., 2015); questo porta ad una minore velocità ed entità della degradazione ruminale nel mais vitreo rispetto al dentato e nelle varietà di mais a grande contenuto di amilosio. Indipendentemente dalla cultivar, la cariosside del mais, se intatta, è altamente resistente all'attacco dei batteri ruminanti ed alla digestione enzimatica grazie alla sua matrice proteica (Johnson et al., 2002) quindi la rottura della cariosside grazie alla strumentazione della trincia risulta necessaria per rendere disponibile per la digestione l'amido contenuto al suo interno (McAllister et al., 1994; Johnson et al., 2002). Anche la lunghezza del taglio della pianta ha un effetto sulle performance produttive e sulla digeribilità: Bal et al., (2000) ha rilevato che un aumento della lunghezza del taglio da 0.95 a 1.9 cm ha impedito la depressione della digeribilità delle fibre, che avviene in presenza di particelle di insilato troppo piccole, senza compromettere la digeribilità dell'amido. Khan et al., (2015) invece ha riportato che, per quanto riguarda la

digeribilità dell'NDF, in letteratura ci sono risultati contrastanti sull'influenza della lunghezza del taglio con segnalazioni di digeribilità dell'NDF simile o aumentata, con una lunghezza del taglio più lunga. Tuttavia, migliorare la consistenza del contenuto ruminale fornendo particelle più lunghe, potrebbe avere benefici sulla salute degli animali a lungo termine o nelle vacche all'inizio della lattazione (Bal et al., 2000). Anche la durata del processo di insilamento ha un effetto importante sulla digeribilità dell'insilato e dei suoi nutrienti (Benton et al., 2005; Kung et al., 2018): generalmente avviene un grande incremento della digeribilità dell'insilato nei primi 30-45 giorni del processo di insilamento, durante la fase di fermentazione (Pahlow et al., 2003; Benton et al., 2005; Kung et al., 2018), mentre in seguito c'è un ulteriore aumento di digeribilità (+5-10%) tra i 45 e 120 giorni di insilamento (Kung et al., 2018). In particolare, l'amido aumenta la sua digeribilità con il passare del tempo perché la matrice amido-proteica delle cariossidi viene degradata dall'attività proteolitica (Hoffman et al., 2011) delle proteasi microbiche e vegetali, che si verifica durante il processo di fermentazione anaerobica (Baron et al., 1986; Simpson, 2001). La digeribilità dell'NDF è invece minimamente influenzata dal tempo di insilamento (Kung et al., 2018), infatti alcuni studi riportano una lieve riduzione di questo valore con l'avanzare di questo processo (Der Bedrosian et al., 2012), mentre altri autori non hanno osservato alcun effetto (Ferraretto et al. 2015c).

1.4 Efficienza alimentare e produttiva

Uno degli obiettivi principali dell'allevamento della bovina da latte moderno è quello di coniugare le esigenze produttive ed economiche degli allevatori con quelle di riduzione dell'impatto ambientale e di salvaguardia della salute e del benessere degli animali (Fischer et al., 2018; Britt et al., 2021; Andrighetto et al., 2023). Una delle chiavi per raggiungere questo obiettivo è migliorare l'efficienza alimentare (Bach et al., 2020; Andrighetto et al., 2023) o feed efficiency (FE), definita come il rapporto tra la quantità di latte prodotto (o latte corretto ad una percentuale di grasso definita) e la quantità di sostanza secca ingerita (Britt et al., 2003; Bach et al., 2020). La FE è infatti considerata un fattore importante che influenza l'efficienza complessiva della produzione di latte, ovvero l'efficienza produttiva (Efficiency of Milk Production o EMP) (Bach et al., 2020). L'EMP è definita come la quantità di risorse utilizzate per sostenere la produzione durante l'intero periodo di allevamento (quindi anche le vacche in asciutta e le manze) che sono effettivamente dirottate verso la produzione di latte (Bach et al., 2020) e può essere misurata in termini di risorse utilizzate o come valore economico. L'efficienza produttiva è influenzata quindi dalla quantità e dalla genetica delle manze e delle

vacche in asciutta, dalla durata dei periodi non produttivi, dalla qualità e dall'adeguatezza della razione fornita, dalle condizioni ambientali, e da numerosi altri fattori manageriali (Bach et al., 2020).

L'efficienza alimentare può essere valutata anche tramite altri metodi, ad esempio attraverso il Residual Feed Intake (RFI) cioè la differenza tra l'assunzione di sostanza secca osservata e quella prevista (Koch et al., 1963; Potts et al., 2017a; Fischer et al., 2018), che è stato utilizzato come stima indiretta della FE: gli animali con un RFI elevato sono considerati a bassa efficienza poiché mangiano più di quanto ci si aspetterebbe per il loro livello di produzione lattea (Potts et al., 2017a; Fischer et al., 2018; Bach et al., 2020). Tuttavia, i modelli di previsione utilizzati del RFI sono molti e un problema del loro utilizzo consiste nel fatto che è difficile stabilire se i residui siano effettivamente una conseguenza dell'efficienza piuttosto che imprecisioni del modello matematico utilizzato, quindi non è consigliabile utilizzare RFI come unico dato per misurare FE (Bach et al., 2020). In termini di rilevanza economica invece, la spesa più importante per la produzione di latte è quella legata all'alimentazione (Bach et al., 2020; Britt et al., 2021; Andrighetto et al., 2023), quindi la quota di denaro investito in questa attività ha una grande conseguenza sulla redditività degli allevamenti da latte (Bach et al., 2020; Andrighetto et al., 2023). Da un punto di vista economico, l'efficienza si può esprimere come la differenza tra il profitto derivante dalla vendita del latte e la spesa per la razione (Buza et al., 2014; Wu et al., 2019; Andrighetto et al., 2023), o Income Over Feed Cost (IOFC), e rappresenta un buon metodo per valutare i margini di profitto, poiché considera la volatilità dei prezzi del latte e dei componenti della dieta (Buza et al., 2014; Britt et al., 2021).

Sebbene l'efficienza produttiva sia influenzata da un'ampia varietà di fattori, l'EMP, la FE e il ritorno economico di ciascuna vacca potrebbero essere scomposti in cinque aspetti principali (Bach et al., 2020): stato fisiologico degli animali (Bach e Ahedo, 2008; Cooke et al., 2013), funzione digestiva (Potts et al., 2017b), ripartizione metabolica (Baumgard et al., 2017), genetica (Hurley et al., 2018) e nutrizione.

Come già accennato nel capitolo precedente, una digeribilità più alta, solitamente porta ad una migliore FE (Potts et al., 2017a), perché controlla la proporzione di nutrienti consumati che saranno disponibili per la i fabbisogni di lattazione della vacca. Tuttavia, esiste una variazione ampia della capacità delle vacche di digerire una razione simile, che è dettata dal loro comportamento alimentare e dalla popolazione microbica del loro tratto digestivo (Bach et al., 2020).

Per quanto concerne la selezione genetica invece, l'efficienza non è stata un parametro

selezionato direttamente nei bovini da latte ma è raddoppiata negli ultimi 50 anni (Bach et al., 2020) grazie all'aumento della produzione di latte in questo periodo (Baumgard et al., 2017; Potts et al., 2017b). Non è comunque consigliabile selezionare esclusivamente per la FE, perché ciò porterebbe le vacche ad avere un bilancio energetico negativo eccessivo all'inizio della lattazione (Collard et al., 2000), che potrebbe portare a scarse prestazioni riproduttive (Collard et al., 2000; Bach, 2019) e disturbi metabolici (Baumgard et al., 2017).

Riguardo allo stato fisiologico, particolare importanza viene data alla componente non produttiva dell'allevamento (manze e vacche in asciutta) poiché questi animali costituiscono una grossa spesa per l'allevatore (Bach e Ahedo, 2008; Cooke et al., 2013), ma non producono. In particolare, il numero di manze aumenta quando l'età al primo parto è avanzata il che porta ad un aumento dei costi per l'allevamento (Bach e Ahedo, 2008) con una conseguente diminuzione dell'EMP (Cooke et al., 2013; Bach et al., 2020).

Uno dei principali fattori per il continuo miglioramento della FE nel corso degli anni è stata la capacità di utilizzare grandi porzioni di nutrienti consumati per la produzione di latte (Baumgard et al., 2017): gli aumenti di efficienza con l'aumentare della produzione (Figura 6) sono stati quindi ottenuti attraverso la diluizione della percentuale di nutrienti utilizzati per il mantenimento (Bach et al., 2020; Andrighetto et al., 2023). Fino a qualche anno fa era frequente considerare fissi questi fabbisogni di nutrienti per il mantenimento e si pensava che i nutrienti forniti al di sopra di questi fabbisogni venissero poi utilizzati completamente per le funzioni produttive in linea con quanto riportato dal National Research Council (2000) nel Nutrient Requirements of Dairy Cattle (NRC 2001). Il fabbisogno energetico per il mantenimento (FM) veniva determinato utilizzando l'equazione $FM = \alpha PV^{0.75}$, dove $\alpha = 0.08$ e PV=peso vivo (NRC, 2001). Tuttavia, alcuni autori (Moraes et al., 2015; Weiss, 2021) riportano un aumento dei fabbisogni di mantenimento a seguito dell'aumento della produzione lattea, probabilmente perché il grande metabolismo mammario necessario per sostenere la sintesi del latte implica cambiamenti anche nel metabolismo extra mammario per garantire un sufficiente apporto di nutrienti alla mammella (Baumgard et al., 2017).

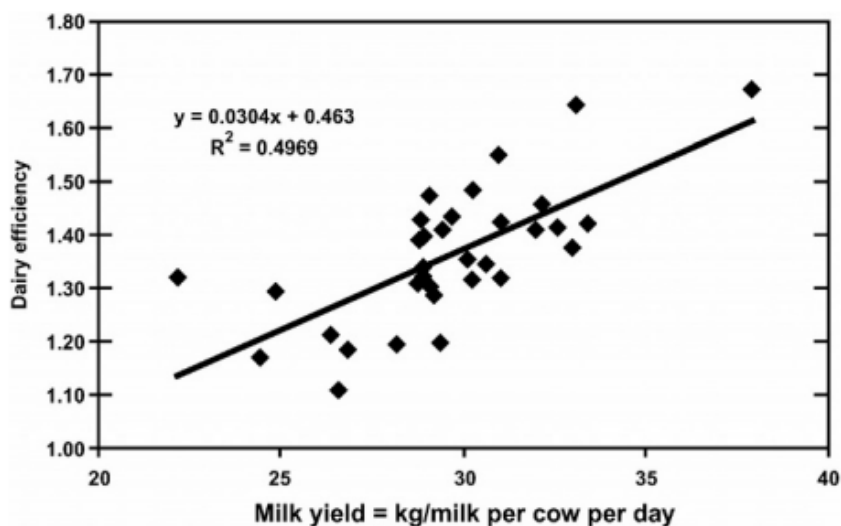


Figura 6. Relazione tra la produzione di latte (in ascissa) e l'efficienza alimentare espressa come rapporto tra la produzione di latte e l'ingestione di sostanza secca (in ordinata) (da Britt et al., 2003).

La quantità di energia che finisce nel latte è quindi inferiore a quanto ci si potrebbe aspettare se i fabbisogni per il mantenimento fossero fissi e questo avviene per due motivi: il primo è una probabile sottostima dei fabbisogni di mantenimento quando si utilizzano i metodi tradizionali come il NRC, (2001) (Bach et al., 2020; Weiss, 2021). Erdman et al. (2019) infatti, ha stabilito che il modello di calcolo utilizzato dal NRC, (2001) sottostima i fabbisogni di mantenimento di circa il 22%. Questo problema è stato risolto nell'ultima versione del Nutrient Requirements of Dairy Cattle (NASEM, 2021) dove l'equazione per il calcolo del mantenimento è stata modificata utilizzando un $\alpha = 0.1$ che ha portato ad un aumento del 25% del fabbisogno di mantenimento stimato per le vacche ad alta produzione (Weiss, 2021). Il secondo motivo è la riduzione dell'efficienza di conversione dei nutrienti consumati in latte, dovuta alla riduzione della digeribilità della dieta che avviene in animali altamente produttivi (Bach et al., 2020). Dunque, si può affermare che poiché il metabolismo basale di una vacca influenza la quantità di nutrienti che rimangono disponibili per la produzione di latte, esso influisce anche sulla FE e sull'IOFC (Bach et al., 2020) e va valutato sempre con attenzione in base al livello produttivo dell'animale.

Questi due fattori, che influenzano l'energia nel latte, vanno tenuti in considerazione soprattutto in condizioni di produzioni elevate: in questi casi, lievi aumenti di latte prodotto richiedono apporti extra di nutrienti che sono maggiori rispetto a quelli degli animali che producono meno, e poiché anche la quantità di alimento necessaria e il suo costo aumentano, l'IOFC potrebbe calare anche se la FE aumenta (Figura 7). Quindi il ritorno economico derivante da ulteriori

aumenti della produzione potrebbe essere inferiore al previsto in casi di elevate produzioni in cui la diluizione dei fabbisogni di mantenimento non compensa i miglioramenti progressivamente decrescenti della produzione di latte (Liang e Cabrera, 2015) per unità di nutriente consumato e gli aumenti dei fabbisogni di mantenimento (Bach et al., 2020). Tuttavia, la produzione totale di latte è ancora considerata il fattore più importante nella redditività degli allevamenti (VandeHaar e St-Pierre, 2006; Liang e Cabrera, 2015; Bach et al., 2020), perché all'aumentare della produzione, diminuisce la percentuale delle spese fisse dell'azienda. Pertanto, anche se venisse raggiunta un'ipotetica produzione che massimizzerebbe FE (ma non la produzione), potrebbe ancora essere più conveniente favorire una maggiore produzione di latte per diluire i costi fissi, se questi non sono eccessivi (VandeHaar e St-Pierre, 2006). In termini economici quindi, l'aumento della produzione di latte si tradurrà, quasi sempre in maggiori profitti; tuttavia, con rese di latte molto elevate, si dovrebbe prestare attenzione quando il prezzo del latte cala o il costo per la razione è elevato, poiché lievi miglioramenti nella produzione di latte potrebbero essere superati dagli incrementi dei costi. Per questo motivo, l'IOFC, e non l'efficienza alimentare o la produzione di latte, è il parametro più rilevante da misurare e massimizzare (Bach et al., 2020).

Per quanto riguarda l'alimentazione, un altro fattore che influenza notevolmente i profitti di un allevamento è la divisione della mandria in più gruppi di lattazione in base ai livelli di produzione individuale: infatti, l'utilizzo di razioni unifeed differenti per vacche distribuite in gruppi di lattazione ha migliorato notevolmente l'IOFC (Cabrera e Kalantari, 2016; Wu et al., 2019). Invece, la formulazione di una sola razione in base al livello di produzione medio dell'allevamento, spesso porta ad avere un gran numero vacche sovralimentate e, quindi, l'EMP e l'IOFC complessive del gruppo calano (Bach et al., 2020). Questo avviene perché spesso per formulare un'unica razione si utilizza il metodo del 83° percentile (Stallings e McGilliard, 1984), in cui si utilizza una razione basata sui fabbisogni delle vacche che producono una quantità di latte pari alla media dell'allevamento più una deviazione standard (in modo da coprire i fabbisogni dell'83% delle bovine). Formulare un unico unifeed per questo livello elevato di produzione aumenta quindi la proporzione di vacche che aumenteranno le loro riserve corporee (quelle meno produttive), portando ad un incremento molto lieve della FE e dell'EMP (Figura 7), perché complessivamente una percentuale inferiore dei nutrienti consumati sarà riconvertita in latte. Inoltre, la sovralimentazione delle vacche; può compromettere la montata latte e le prestazioni riproduttive nella lattazione successiva (Collard et al., 2000), aumentare gli impatti ambientali negativi della produzione, ridurre il ritorno economico (Figura 7) e aumentare la prevalenza di disturbi metabolici dopo il parto a causa dell'associazione tra BCS

eccessivo e i disturbi del metabolismo postpartum (Vanholder et al., 2015; Baumgard et al., 2017).

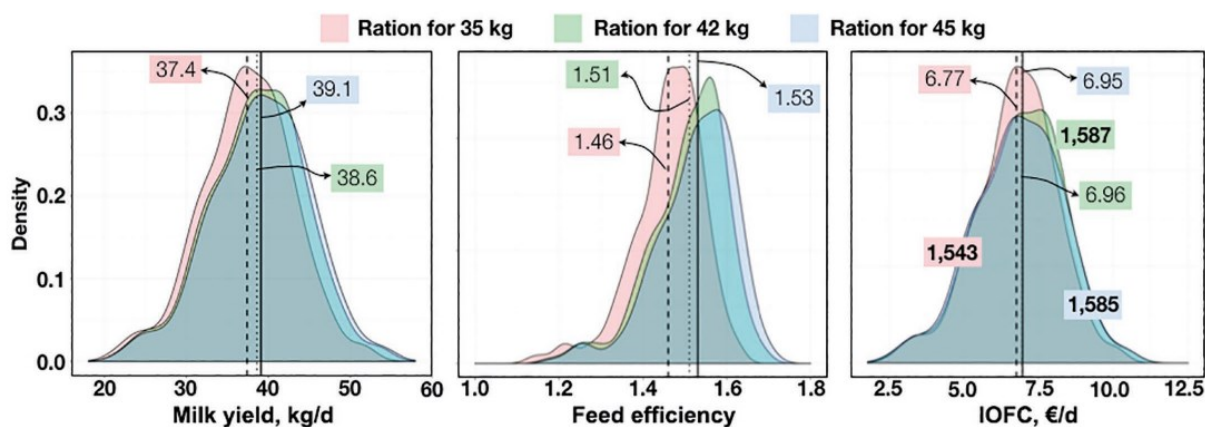


Figura 7. Grafici di densità per la produzione di latte, l'efficienza alimentare e l'IOFC previsti per una popolazione simulata di 228 vacche in lattazione con una produzione media iniziale di 38 kg/giorno e deviazione standard di 7,0 kg. Le 3 razioni sono formulate per supportare una produzione di 35, 42 e 45 kg latte/giorno. I valori in grassetto indicano l'IOFC giornaliero totale. Il prezzo del latte è stato assunto pari a 0,32 €/kg e i costi previsti delle razioni di 35, 42 e 45 kg di latte era rispettivamente di 0.207, 0.212 e 0.218 €/kg (da Bach et al., 2020).

Dalla Figura 7 si evince che all'aumentare della produzione di latte della mandria, l'efficienza alimentare continua ad aumentare, ma in modo decrescente, mentre l'IOFC non segue lo stesso modello di crescita, anzi a determinati livelli può diminuire. Pertanto, quando si alimentano gruppi di vacche, la massimizzazione della produzione di latte o della FE non sempre comporta un miglioramento dell'efficienza economica.

Altri fattori che possono influenzare l'efficienza alimentare sono stati riportati da Britt et al., (2003) e comprendono: fattori stagionali (es. stress da caldo), i giorni medi in latte e la percentuale di proteine e foraggi nella dieta; l'autore, in particolare, ha individuato una correlazione positiva tra l'efficienza alimentare e la produzione di latte (Figura 6) e una correlazione negativa tra l'efficienza e la quantità di NDF nella dieta e tra l'efficienza e i giorni medi in latte. Anche un aumento dell'omogeneità della razione è stato associato ad un miglioramento della FE (Sova et al., 2014; Serva et al., 2021; Andrighetto et al., 2023), ma poiché le vacche tendono a selezionare le particelle più fine e a scartare quelle più lunghe (Leonardi e Armentano, 2003; Sova et al., 2013; Sova et al., 2014), la composizione dell'alimento in mangiatoia in realtà cambia durante la giornata (Bach e Cabrera, 2017) portando ad uno squilibrio dei nutrienti assunti dagli animali che influenzerà FE e IOFC

all'interno del gruppo (Bach et al., 2020). Come riportato da Andrighetto et al., (2023), anche tutti gli eventi che portano ad una condizione di stress dell'animale possono ridurre l'efficienza alimentare in quanto, questa condizione può deviare parte dei nutrienti e dell'energia disponibili per produzione di latte verso percorsi metabolici necessari per tornare all'omeostasi iniziale (Ingvarsen e Moyes, 2013). A questo proposito, una misura indiretta del management dell'allevamento che potrebbe essere utilizzata per valutare la costanza della gestione degli animali lungo tutto l'anno è il Summer-Winter Ratio (SWR) ovvero il rapporto tra la produzione media di latte in estate e quella invernale (Guinn et al., 2019). Questo valore tiene in considerazione specialmente la gestione dello stress da caldo, e in generale, più è vicino a 1, minore è l'effetto che lo stress da caldo ha avuto sulla produzione di latte della stagione estiva (Guinn et al., 2019) grazie all'impiego di strategie efficaci per l'abbattimento del calore (Andrighetto et al., 2023).

L'industria lattiero-casearia a livello globale ha visto una notevole “intensificazione sostenibile” che ha portato a produrre latte in più modo efficiente rispetto al passato: le aziende lattiero-casearie nel 2017 negli Stati Uniti, per ogni tonnellata di latte prodotto, hanno utilizzato il 25,2% di vacche in meno, il 17,3% di alimento in meno, il 20,8% di suolo in meno, e il 30,5% di acqua in meno rispetto al 2007 (Capper e Cady, 2020). Tuttavia, anche così, quest'industria ha un impatto ambientale rilevante dovuto all'emissione di gas serra (GHG), all'utilizzo del suolo per la produzione di foraggi all'uso di acqua per la produzione e la lavorazione del latte e all'emissione di azoto e fosforo nell'ambiente (Naranjo et al., 2020). Visti questi dati, l'allevamento di bovini da latte deve affrontare una sfida importante: ridurre le emissioni di gas serra mantenendo o aumentando la produzione e i profitti (Liang e Cabrera, 2015). La sostenibilità del settore lattiero-caseario dipende da diversi fattori, tra cui il benessere degli animali, le dimensioni e le risorse degli allevamenti, e il mercato del latte e dei prodotti lattiero-caseari (Britt et al., 2021). I gas serra sono i principali motori del cambiamento climatico e l'allevamento di bovini globalmente incide per il 14,5% dei GHG totali (Gerber et al., 2013) e il settore lattiero-caseario rappresenta circa il 20% di queste emissioni (Britt et al., 2021). I GHG delle aziende lattiero-casearie includono CO₂, CH₄ N₂O provenienti dalla fermentazione enterica, dalla manipolazione del letame, e dai macchinari utilizzati per la produzione agricola (Rotz et al., 2010; Van Middelaar et al., 2014). Alcuni studi (Crosson et al., 2011; Liang e Cabrera, 2015) hanno rilevato che il miglioramento delle prestazioni produttive e riproduttive (es. miglioramento della fertilità, riduzione del numero di animali da rimonta, riduzione della durata dell'interparto) degli animali ridurrebbe anche le emissioni di GHG per Kg di latte

prodotto aumentando quindi anche il profitto dell'azienda agricola (Liang e Cabrera, 2015).

Migliorare l'efficienza alimentare e produttiva ha dunque due conseguenze (e obiettivi) principali: aumentare i guadagni dell'allevamento (Britt et al., 2021) attraverso un maggior divario tra costi e ricavi, e minimizzarne l'impatto ambientale (Liang e Cabrera, 2015) utilizzando una percentuale maggiore di nutrienti per la produzione di latte (Bach 2020).

1.5 Rischi da Micotossine

Le micotossine sono molecole a basso peso molecolare prodotte come metaboliti secondari da funghi filamentosi (muffe) (Zain, 2011; Gallo et al., 2015). Questi metaboliti possono esercitare un effetto tossico (micotossicosi) sugli animali e sull'uomo, la cui gravità dipende dalla tossicità della micotossina, dal grado di esposizione, dall'età, dallo stato nutrizionale dell'individuo e dai possibili effetti sinergici con altre sostanze chimiche a cui l'individuo è stato esposto (Peraica et al., 1999). Le micotossine costituiscono un gruppo eterogeneo di composti dal punto di vista chimico e tossicologico, e vengono raggruppate insieme solamente per il fatto di essere prodotte da funghi e di poter causare malattie e/o morte nei vertebrati (Zain, 2011). Le micotossine vengono secrete da organismi fungini per lo più appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Alternaria* (Mahanna e Chase, 2003; Ogunade et al., 2018); diverse specie fungine appartenenti a questi generi possono produrre micotossine e tra queste troviamo: i tricoteceni, le aflatossine, le ocratossine, lo zearalenone, e le fumonisine (Zain, 2011; Gallo et al., 2015; Ogunade et al., 2018). Dalla scoperta delle aflatossine a inizio anni '60, in letteratura sono state documentate più di 400 tossine differenti (Seglar, 2001; Zain, 2011; Ogunade et al., 2018) anche se l'attenzione si è focalizzata principalmente su quelle che si sono dimostrate cancerogene e/o tossiche per l'uomo o per gli animali. Esistono quindi, composti definiti "micotossine emergenti" (Ogunade et al., 2018), ovvero sostanze chimiche la cui incidenza è in rapido aumento, ma che non sono ancora state regolamentate dalla legislazione attuale (Leite et al., 2021).

1.5.1 Sviluppo delle micotossine

Molte micotossine vengono prodotte in campo, dove i funghi responsabili colonizzano le colture di cereali e, di conseguenza, le contaminano (Whitlow e Hagler, 2005; Alonso et al., 2013). Lo sviluppo di queste tossine può avvenire anche nelle fasi successive di lavorazione, conservazione e distribuzione dei foraggi se le condizioni climatiche e ambientali sono favorevoli (Whitlow e Hagler, 2005; Cavallarín et al., 2011; Leite et al., 2021). Il mais è un

ottimo esempio di pianta che viene contaminata con gravi impatti economici che colpiscono agricoltori e allevatori: gli effetti negativi della produzione di micotossine sono dovuti a perdite dirette nei raccolti, ad una riduzione della produzione in allevamento, e a rischi per la salute degli animali e per la sicurezza dei prodotti di origine animale (Leite et al., 2021). Le micotossine sono presenti in una vasta gamma di alimenti per il bestiame tra cui: concentrati, fieni e insilati (Fink-Gremmels, 2008; Gallo et al., 2015). La contaminazione sul campo della pianta di mais da parte delle spore fungine può avvenire in tre modi: il primo si verifica durante la fase di impollinazione e prevede la contaminazione della spiga prima della formazione della cariosside, il secondo avviene in una fase successiva attraverso fratture del pericarpo della cariosside a seguito di traumi dovuti a stress meteorologici (siccità, grandine) o danni da insetti (Seglar, 2001; Mahanna e Chase, 2003). Infine, le muffe possono entrare nella pianta attraverso le radici durante la fase di crescita se il suolo è contaminato (Seglar, 2001).

Le condizioni ottimali per lo sviluppo dei funghi in campo generalmente richiedono ambienti con elevata umidità (>70%), alta temperatura e sufficiente disponibilità di ossigeno (Seglar, 2001; Cheli et al., 2013), in queste opportune condizioni possono svilupparsi su vari foraggi, provocando gravi rischi per la salute umana e animale (Zain, 2011). Eccessiva umidità in campo e nei luoghi di stoccaggio, temperature elevate, periodi di siccità, variazioni nelle pratiche agronomiche e infestazione di insetti sono dunque i principali fattori che determinano la gravità della contaminazione da micotossine dei foraggi (Coulombe, 1993). Tuttavia, le condizioni ambientali per la crescita di muffe e per la formazione di micotossine da parte di queste non sempre combaciano (Ogunade et al., 2018; Leite et al., 2021) e la prevalenza della crescita di una muffa rispetto ad un'altra dipende anche dalle condizioni ambientali durante il periodo di sviluppo della cariosside (Mahanna e Chase, 2003; Whitlow e Hagler, 2005). Ad esempio, le estati fresche e umide consentono a *Fusarium* di prevalere (Mahanna e Chase, 2003; Cheli et al., 2013), mentre estati calde e periodi di siccità forniscono le condizioni affinché *Aspergillus* si sviluppi (Mahanna e Chase, 2003; Whitlow e Hagler, 2005). Le muffe di *Fusarium* e *Aspergillus* inoltre possono portare a perdite di produzione agricola poiché causano marcescenza della spiga e del gambo di mais (Whitlow e Hagler, 2005; Ogunade et al., 2018; Stagnati et al., 2020).

Il basso pH degli insilati, la presenza di acidi organici (soprattutto acetico e propionico) e le condizioni anaerobiche durante l'insilamento inibiscono la crescita di funghi e riducono la produzione di micotossine nell'insilato (Pahlow et al., 2003; Borreani et al., 2008). Durante questo processo, la maggior parte delle muffe può essere dunque eliminata (Gallo et al., 2015), esistono tuttavia alcune specie, come *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium roqueforti* e alcune

specie di *Fusarium* che sono in grado di tollerare sia alti livelli di acidi organici che anidride carbonica oltre alla scarsa disponibilità di ossigeno (Pahlow, 2003; Gallo et al., 2015). Inoltre, alcune micotossine sono relativamente stabili in ambiente acido e non vengono completamente distrutte durante l'insilamento (Ogunade et al., 2018). Generalmente *Fusarium* e *Alternaria* sono spesso classificati come funghi di campo, *Penicillium* viene considerato un fungo della fase di stoccaggio, mentre alcune specie di *Aspergillus* possono essere presenti sia prima che dopo il raccolto (Alonso et al., 2013; Gallo et al., 2015), tuttavia questa classificazione non è sempre veritiera e ogni genere fungino può essere trovato in entrambe le fasi di raccolta del mais. I foraggi insilati possono quindi contenere una miscela di micotossine (Ogunade et al., 2018), originata dalla contaminazione preraccolta da parte delle specie *Fusarium* e *Aspergillus* (Gallo et al., 2015) e/o dalla contaminazione post-raccolta con muffe tossigeniche comuni negli insilati, come *Aspergillus* e *Penicillium* (Alonso et al., 2013). Tuttavia, molte muffe comuni non producono micotossine e la presenza di muffe nell'insilato non indica sempre la presenza di micotossine né la loro assenza conferma l'assenza di micotossine (Mahanna e Chase, 2003; Zain, 2011; Ogunade et al., 2018). Nella massa insilata, le muffe si trovano solitamente in aree scarsamente compattate come lo strato superiore e laterale dei silos, che sono spesso più soggette ad accumuli di ossigeno rispetto al resto del silo (Borreani et al., 2008; Ogunade et al., 2018). In particolare, la presenza di ossigeno in alcune parti dell'insilato durante lo stoccaggio o la penetrazione di ossigeno durante le fasi di apertura del silo, corrispondente alla fase di deterioramento aerobico, potrebbero consentire la crescita di muffe e la produzione di micotossine all'interno dell'insilato (Gallo et al., 2015). La raccolta ritardata, riempimento lento dei silos, sigillatura ritardata o inadeguata dei silos, velocità di avanzamento del fronte di alimentazione lente, e danneggiamenti delle coperture impermeabili, possono creare un microclima favorevole alla proliferazione di muffe e alla produzione di micotossine (Borreani et al., 2018; Ogunade et al., 2018). Altri fattori che possono predisporre a questa crescita includono danni fisici alle spighe di mais prima della raccolta e alle coperture dei silos durante lo stoccaggio causati da roditori, pioggia, grandine e siccità (Teller et al., 2012).

1.5.2 Principali micotossine di interesse veterinario

I ruminanti sono più protetti dagli effetti tossici delle micotossine rispetto ai monogastrici perché i microrganismi ruminali, in particolare protozoi (Jouany, 2007), possono degradarle o inattivarle (Gallo et al., 2015; Ogunade et al., 2018). Nonostante ciò, l'ingestione di micotossine alimentari può influire negativamente sulle prestazioni e sulla salute dei bovini, infatti possono

verificarsi effetti tossici (micotossicosi), quali la riduzione dell'assunzione di alimento, un calo della produzione, problemi riproduttivi, immunosoppressione e in casi gravi anche morte (Whitlow e Hagler, 2005; Zain, 2011); tuttavia manifestazioni acute di micotossicosi sono rare in condizioni di allevamento (Gallo et al., 2015). Inoltre, le diete dei ruminanti includono numerosi alimenti che possono essere contaminati dalle muffe tra cui fieni, cereali, sottoprodotti e mangimi pellettati che aumentano il rischio di esposizione a micotossine rispetto a suini e pollame che hanno diete meno varie (Fink-Gremmels, 2008; Gallo et al., 2015). La capacità del microbiota ruminale di degradare alcune micotossine può essere saturata a seconda della dieta, dello stato metabolico dell'animale, e della velocità di passaggio degli alimenti: il basso pH ruminale (5.5-5.8) indotto da grandi quantità di amido nella razione (Ogunade et al., 2018) e l'elevata velocità di passaggio delle ingesta nelle vacche ad alta produzione (Fink-Gremmels, 2008) possono ridurre notevolmente la detossificazione microbica delle micotossine. Ciò può consentire a una parte delle micotossine ingerite di sfuggire alla degradazione ruminale e di essere trasferita ai prodotti di origine animale, in particolare al latte, rappresentando un grave pericolo per la salute dell'uomo (Ogunade et al., 2018). La presenza di micotossine negli alimenti destinati ai bovini desta, dunque, preoccupazione perché possono mettere a rischio la sicurezza dei prodotti di origine animale (Peraica et al., 1999; Driehuis et al., 2008; Leite et al., 2021). L'esposizione umana alle micotossine può derivare infatti, sia dal consumo di alimenti di origine vegetale contaminati che dall'ingestione dei loro metaboliti in prodotti di origine animale, ma anche attraverso contatto o inalazione (CAST, 2003; Zain, 2011). Inoltre, la maggior parte delle micotossine tollera temperature elevate (80–121°C) (Jouany, 2007), pertanto, anche a seguito di cottura o bollitura si verifica una riduzione minima o nulla delle micotossine negli alimenti.

Le micotossine nei foraggi per i bovini possono dunque avere effetti sulla salute umana se vengono consumati alimenti di origine animale contaminati da tossine; tra queste, le più studiate sono le aflatossine ed in particolare l'aflatossina M₁ (Leite et al., 2021). Le aflatossine sono un gruppo di derivati difuranocumarinici tossici, mutageni e cancerogeni che vengono prodotti principalmente da *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* (Cavallarin et al., 2011; Zain, 2011; Wu et al., 2014; Ogunade et al., 2018). Le aflatossine presenti in natura sono B₁, G₁, B₂ e G₂ (Cavallarin et al., 2011; Ogunade et al., 2018). Queste si trovano in vari alimenti e mangimi per animali grazie alla capacità dell'*Aspergillus* di crescere in un range di condizioni di temperatura e umidità molto ampio (Alonso et al., 2013; Gallo et al., 2015). L'aflatossina B₁ (AFB₁) è la principale tossina e il più potente cancerogeno prodotto dalle specie tossigeniche di *Aspergillus*. (Zain, 2011; Ogunade et al., 2018). Se ingerita, da esseri umani o

da animali sensibili, viene metabolizzata dagli enzimi del citocromo P-450 in aflatossin-8,9-epossido, che è altamente tossico, mutageno e cancerogeno in quanto causa danni cromosomici legandosi e formando addotti con il DNA e con l'albumina (Coulombe, 1993; Jouany et al., 2009). Un altro possibile destino metabolico dell'AFB₁ nel fegato è l'idrossilazione ad aflatossina M₁ (AFM₁) (Wu et al., 2009), che viene secreta nel latte e rappresenta un rischio per la salute umana (Ogunade et al., 2018; Leite et al., 2021). Il latte e i prodotti lattiero-caseari contaminati rappresentano la fonte principale di esposizione a AFM₁ e un rischio per la sanità umana poiché, come l'AFB₁, l'AFM₁ è cancerogena per l'uomo; infatti, l'IARC (International Agency for Research on Cancer) ha classificato le aflatossine come composti cancerogeni di gruppo 1 (cancerogeni per l'uomo) (IARC, 2002) e nello specifico, le aflatossine sono associate allo sviluppo di carcinoma epatocellulare (Zain, 2011; Wu et al., 2014). La presenza di AFM₁ nei prodotti lattiero-caseari è regolamentata dalla legislazione europea: il Limite Massimo Tollerabile nei prodotti destinati all'alimentazione umana è riportato nel Commission Regulation EC 2006/1881 (Commissione Europea 2006) ed è pari a 50 nanogrammi/Kg (50 ppt) per l'aflatossina M₁ nel latte crudo, in quello termicamente trattato e nel latte per la produzione di alimenti a base di latte, mentre il valore soglia negli alimenti destinati ai neonati e ai bambini è la metà (25 ng/l) (Commissione Europea, 2006). Infatti, l'esposizione alle aflatossine può portare all'arresto della crescita infantile, a maggiore vulnerabilità alle malattie infettive e a disturbi cognitivi permanenti (Wu et al., 2014); i neonati possono essere esposti alle aflatossine anche attraverso il latte materno (Ogunade et al., 2018). In netto contrasto con quanto avviene nel nostro continente, negli Stati Uniti, è stato adottato un limite di aflatossine nel latte 10 volte superiore, ovvero 500 ppt (FDA, 2011). Negli alimenti per l'alimentazione bovina invece, il limite di aflatossine è di 5 µg/kg in Europa (Commissione Europea 2006) e di 20 µg/kg negli Stati Uniti (FDA, 2011). Le manifestazioni cliniche dell'aflatossicosi acuta nell'uomo includono vomito, dolore addominale, edema polmonare, infiltrazione lipidica e necrosi del fegato (Wu et al., 2014). Nelle bovine invece, sono presenti inappetenza, atassia e ingrossamento del fegato (Whitlow e Hagler, 2005), mentre immunosoppressione e riduzione dell'efficienza alimentare dovuta a disturbi della funzionalità ruminale con conseguente calo delle performance produttive sono presenti in forme croniche (Whitlow e Hagler, 2005; Zain, 2011). I sintomi sono dunque aspecifici ed una diagnosi vera e propria basata solamente su questi risulta difficile (Ogunade et al., 2018). Gli elevati rischi di contaminazione da AFM₁ nel latte destano quindi particolare preoccupazione nei paesi con climi secchi o che affrontano lunghi periodi di siccità, condizioni che favoriscono l'aumento dei livelli di AFB₁ in campo o

in ambienti temperati in cui queste condizioni meteorologiche si possono manifestare a causa del cambiamento climatico (Leite et al., 2021).

Un'altra aflatoxina prodotta da muffe del genere *Aspergillus*, ma anche da *Penicillium* che può rappresentare un rischio per la salute umana è l'Ocratossina A (OTA): un composto potenzialmente cancerogeno in alcune specie di animali da laboratorio (Peraica et al., 1999; Wu et al., 2014), mentre negli umani ha principalmente un effetto nefrotossico, ma non ci sono dati sufficienti per dimostrarne la cancerogenicità nell'uomo (Wu et al., 2014; Ogunade et al., 2018). Nei ruminanti invece, OTA viene ampiamente e rapidamente degradata nel rumine in un prodotto meno tossico, l'ocratossina- α (Fink-Gremmels, 2008; Gallo et al., 2015), il che spiega la tolleranza di questi animali alla tossina (Zain, 2011). Inoltre, la presenza e la concentrazione di OTA negli insilati sono generalmente basse rispetto ad altre micotossine (Ogunade et al., 2018) perché i funghi che la producono non possono tollerare alte concentrazioni di acido acetico e CO₂ (Gallo et al., 2015). Negli esseri umani, le principali fonti di esposizione alimentare all'OTA sono cereali, vino, caffè, frutta secca, latte (Zain, 2011; Wu et al., 2014) e carne di maiale in quanto può accumularsi anche nei muscoli di questi animali se nutriti con cereali contaminati (Ogunade et al., 2018). In Unione Europea il limite massimo di OTA nei cereali destinati all'alimentazione umana è di 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Commissione Europea, 2006), mentre in altri paesi come gli Stati Uniti non ci sono leggi che indicano valori massimi per questa micotossina.

Anche le muffe del genere *Fusarium* possono produrre micotossine che rappresentano un rischio per la salute umana e degli animali (Zain, 2011; Wu et al., 2019), tra queste, le principali sono: Tricoteceni (in particolare il Desossivalenolo o DON), Fumonisine e Zearalenone (ZEA) (Peraica et al., 1999; Whitlow e Hagler, 2005; Zain, 2011; Ogunade et al., 2018).

Il deossivalenolo è la micotossina più comunemente rilevata nei foraggi e negli insilati (Wu et al., 2014; Gallo et al., 2015; Ogunade et al., 2018) e per questo può essere un marcatore utile da misurare perché indica che il mangime è stato esposto a una situazione favorevole alla crescita di muffe con possibile formazione di diverse micotossine (Whitlow e Hagler, 2005). È chiamato anche vomitossina perché inizialmente veniva associato ad una condizione che causava vomito nei suini (Whitlow e Hagler, 2005; Ogunade et al., 2018), mentre i ruminanti sono generalmente resistenti a questa tossina grazie all'attività del microbiota ruminale (Fink-Gremmels, 2008; Ogunade et al., 2018). Le malattie associate all'ingestione di alimenti contaminati da desossivalenolo negli umani comprendono: aleukia alimentare tossica, gastroenterite acuta, disturbi della crescita e malattia di Kashin-Beck (osteoartrite) (Wu et al.,

2014). Il limite di DON negli alimenti per ruminanti adulti (> 4 mesi) in Europa è di 5 mg/kgSS, mentre per i cereali ad uso umano è di 0.75 mg/Kg (Commissione Europea, 2006).

Le fumonisine (B₁, B₂ e B₃ sono le principali) sono metaboliti prodotti principalmente da *Fusarium proliferatum* e *Fusarium verticillioides* (Zain, 2011; Ogunade et al., 2018) e sono considerate potenzialmente cancerogene per l'uomo (gruppo 2B) (IARC, 2002). Le fumonisine sono strutturalmente simili alla sfingosina (Zain, 2011), un componente degli sfingolipidi, che si trova in alte concentrazioni in alcuni tessuti nervosi come la mielina. La tossicità della fumonisine deriva dal blocco della biosintesi degli sfingolipidi attraverso l'inibizione dell'enzima ceramide sintetasi (Wu et al., 2014; Loi et al., 2017), quindi porta alla degenerazione dei tessuti ricchi di sfingolipidi (Whitlow e Hagler, 2005). Il consumo di alimenti contaminati da fumonisine nell'uomo è stato associato ad un aumento del cancro esofageo (Zain, 2011; Wu et al., 2014) e a malformazioni embrionali come i difetti del tubo neurale (DTN) tra cui spina bifida e anencefalia (Wu et al., 2014); negli animali invece queste micotossine sono associate a diverse patologie, tra cui leucoencefalomalacia equina, e edema polmonare suino (Whitlow e Hagler, 2005; Zain, 2011; Loi et al., 2017). Nonostante Diaz et al., (2000) abbia riportato una riduzione di 6 Kg/giorno nella produzione di latte da parte di bovine alimentate con foraggi contenenti 100 ppm di fumonisine, queste generalmente vengono degradate nel rumine, quindi la tossina tende ad essere meno potente nei ruminanti rispetto alle altre specie; tuttavia, la sua somministrazione nella dieta è stata associata ad episodi di nefrotossicità ed epatotossicità nei vitelli (Mathur et al., 2001). Il passaggio della micotossina nel latte dei bovini è quasi nullo (Scott et al., 1994) e l'intossicazione umana è principalmente dovuta al consumo di cereali contaminati (Peraica et al., 1999). Il valore soglia per gli alimenti destinati ai ruminanti adulti (>4 mesi) in Europa è di 50 mg/kgSS, mentre è rispettivamente di 1 mg/Kg e 0.2 mg/kg nei cereali per l'alimentazione umana e dei neonati (Commissione Europea, 2006).

Lo Zearalenone è una micotossina prodotta principalmente da *Fusarium graminearum* (Peraica et al., 1999; Zain, 2011) strutturalmente simile all'estrogeno e può mimarne l'azione (Whitlow e Hagler, 2005; Ogunade et al., 2018) legandosi ai suoi recettori (Loi et al., 2017). Per questo motivo, i sintomi negli animali che hanno ingerito foraggi contaminati sono solitamente: vaginite, scarse performance riproduttive, ingrossamento della mammella e aborti nelle femmine (Peraica et al., 1999; Whitlow e Hagler, 2005), mentre nei maschi può manifestarsi atrofia testicolare (Peraica et al., 1999). Come per le fumonisine, i ruminanti sono meno suscettibili e ZEA tende a non passare nel latte (Ogunade et al., 2018). In Europa il valore soglia

di ZEA per gli alimenti destinati ai ruminanti è di 0.5 mg/kgSS, mentre è di 0.075 e 0.02 mg/Kg nei cibi per l'alimentazione umana e dei neonati (Commissione Europea, 2006).

Come già detto, le muffe del genere *Fusarium* sono considerate funghi di campo in quanto la loro crescita è favorita da elevata umidità e temperature non troppo elevate, mentre non tollerano il basso pH e le condizioni anaerobiche presenti durante l'insilamento (Ogunade et al., 2018). Tuttavia, alcune loro tossine sono relativamente stabili o non vengono completamente distrutte durante il processo di insilamento (Cheli et al., 2013). Pertanto, le concentrazioni di tossine *Fusarium* rilevate negli insilati solitamente riflettono i livelli di contaminazione al momento della raccolta.

1.5.3 Strategie per ridurre i rischi da micotossine

Dati questi effetti negativi sulla salute animale e umana, risulta fondamentale prevenire la contaminazione degli alimenti da parte delle micotossine (Zain, 2011; Ogunade et al., 2018), ciò è di particolare importanza negli insilati in quanto rappresentano una grande porzione della dieta delle bovine (Marchesini et al., 2017; Grant e Adesogan, 2018). In particolare, la prevenzione dello sviluppo di micotossine in campo è l'approccio più semplice ed efficace (Gallo et al., 2015; Ogunade et al., 2018). Pratiche agronomiche efficaci nel ridurre il rischio di contaminazione da funghi includono: la rotazione dei raccolti, un'adeguata profondità di aratura del terreno, l'utilizzo di fertilizzanti, irrigazione sufficiente a prevenire danni da siccità, utilizzo di varietà di mais resistenti alle infezioni fungine e il controllo con mezzi chimici o biologici di piante e altri infestanti (Jouany, 2007; Gallo et al., 2015). Tra questi, gli insetti e in particolare la piralide del mais (Munkvold, 2003), sono quelli che mettono più a rischio la coltura in quanto possono causare danni diretti alla pianta che predispongono allo sviluppo di micotossine e sono vettori di spore fungine (Mahanna e Chase, 2003; Munkvold, 2003; Jouany, 2007). Anche se la trinciatura dovrebbe essere programmata per garantire resa, contenuto di sostanza secca e un valore nutritivo dell'insilato ottimali (Khan et al., 2015), la raccolta precoce riduce lo sviluppo di micotossine nella pianta grazie alla minor permanenza in campo (Munkvold, 2003; Jouany, 2007; Zain, 2011). Anche una semina precoce (ad inizio aprile piuttosto che a maggio) è associata a minor sviluppo di micotossine (Figura 8) nel mais (Battilani et al., 2011; Blandino et al., 2017).

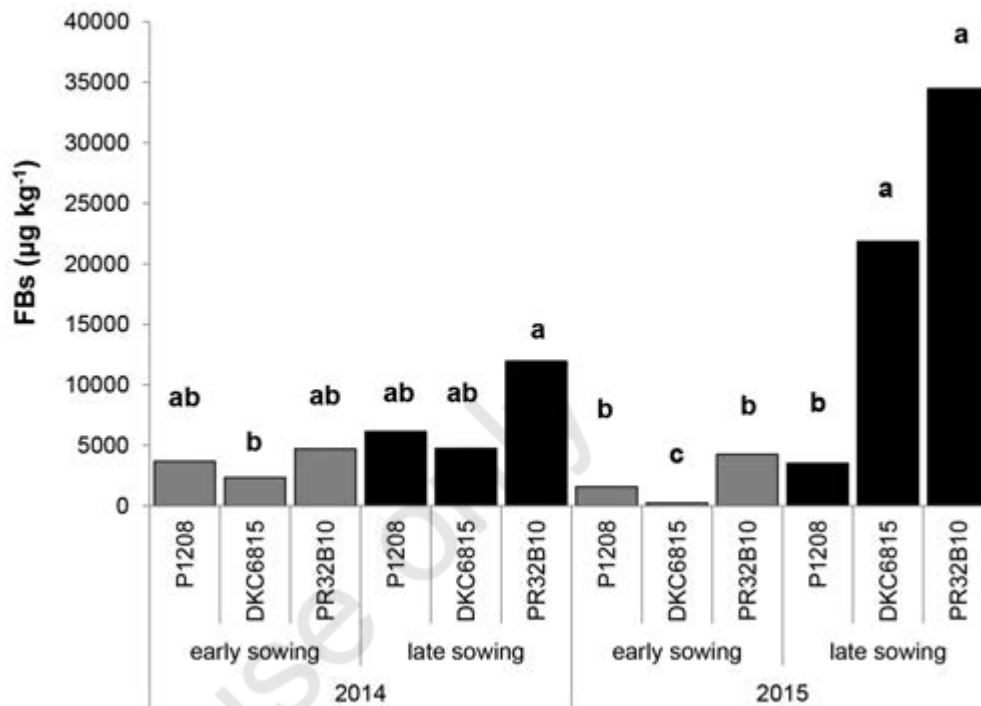


Figura 8. Relazione tra la data di semina e la precocità dell'ibrido con la contaminazione da fumonisine in due anni differenti. P1208 ibrido medio-precocce; DKC6815 ibrido tardivo; PR32B10 ibrido tardivo. Le medie seguite da lettere diverse sono significativamente differenti ($P < 0,01$) (da Blandino et al., 2017).

In quest'ottica di riduzione della permanenza in campo della coltura, utilizzare varietà di mais a maturazione precoce potrebbe essere una strategia utile per minimizzare i rischi da micotossine (Bata et al., 2001; Blandino et al., 2017), ridurre la probabilità di eventi climatici avversi (Leggieri et al., 2020) ed esporre per un tempo inferiore le piante agli attacchi da parte della piralide del mais (Blandino et al., 2017). A questo proposito, Blandino et al., (2017) (Figura 8) e Leggieri et al., (2020) hanno trovato un maggior quantitativo di fumonisine in ibridi a maturazione tardiva rispetto a quelli più precoci; Bata et al., (2001) invece, ha riscontrato negli ibridi tardivi una maggiore quantità di tricoteceni. Anche nello studio di Pietri et al., (2012) sono state trovate minori quantità di fumonisine negli ibridi precoci, tuttavia queste varietà di mais presentavano anche una quantità di aflatossine significativamente superiore rispetto a quelle tardive. Inoltre, sempre Pietri et al., (2012) ha sottolineato come le varietà precoci sopportino meno lo stress da caldo se sottoposte a condizioni di siccità come quelle presenti nel Nord Italia, soprattutto in assenza di un'adeguata irrigazione, come riportato anche da Buhiniček et al., (2021). Leggieri et al., (2015) invece ha trovato maggiori quantitativi di aflatossine negli ibridi tardivi, anche se la differenza non era statisticamente significativa

rispetto ai precoci e questo ha portato l'autore a sostenere che la classe FAO fosse un parametro improprio per distinguere gli ibridi sulla base della loro suscettibilità alle micotossine, in linea con quanto riportato da Battilani et al., (2011). Quest'ultima autrice, infatti, ha riportato che la condizione fondamentale per lo sviluppo di micotossine nella cariosside di mais è una lunga durata di valori di umidità e attività dell'acqua (a_w) adatti a far proliferare le muffe. Recentemente, Stagnati et al., (2020), attraverso una serie di incroci con linee parenterali resistenti, ha identificato nuovi ibridi a maturità medio-precocce in grado di resistere a *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus flavus*.

Per quanto riguarda la piralide del mais (*Ostrinia nubilalis*, Hübner), la presenza di questo insetto fitofago è spesso associata allo sviluppo di fumonisine nelle coltivazioni maidicole (Munkvold, 2003; Papst et al., 2005; Battilani et al., 2011) in quanto le larve si nutrono della pianta e delle cariossidi creando le condizioni ideali per lo sviluppo delle muffe. Blandino et al., (2017) ha trovato una maggiore percentuale di piante con segni di danni da piralide in ibridi tardivi a causa della loro maggiore presenza in campo. Nei paesi a clima temperato come il nostro, dove gli attacchi da parte della piralide sono frequenti, la produzione di cariossidi di mais a basso contenuto di fumonisine può essere favorita da una corretta applicazione insetticida contro le larve dell'insetto e da una semina anticipata (Blandino et al., 2009).

Anche l'applicazione di corrette pratiche di gestione degli insilati e l'utilizzo di additivi (Kung et al., 2003) possono contribuire a controllare il deterioramento aerobico e il conseguente sviluppo di micotossine (Gallo et al., 2015; Borreani et al., 2018). Dopo la trinciatura del mais, i silos dovrebbero essere riempiti rapidamente, compattati in modo da eliminare la maggior quantità di ossigeno possibile per raggiungere la densità raccomandata di 705Kg/m^3 (Borreani et al., 2018) e sigillati il prima possibile per preservare le condizioni anaerobiose (Gallo et al., 2015; Borreani et al., 2018; Ogunade et al., 2018). Infatti, negli insilati mal gestiti a causa della scarsa compattazione o dell'ingresso di aria negli strati superiori, possono essere presenti aree in cui sono favorite fermentazioni aerobiche e la crescita di muffe tossigeniche che normalmente sono meno tolleranti alle condizioni acide e anaerobiche (Borreani et al., 2008; Gallo et al., 2015; Ogunade et al., 2018). Durante la fase di apertura e utilizzo dell'insilato, questo deve essere fornito immediatamente dopo la rimozione (Jouany, 2007) e deve essere garantita una velocità di avanzamento del fronte di alimentazione di almeno 1.1 metri/settimana in inverno e 1.75 in estate (Borreani et al., 2018). Gli inoculi microbici come i batteri lattici sono attualmente utilizzati come alternative economiche e pratiche agli additivi a base di acidi (propionico, acetico e benzoico) (Gallo et al., 2015; Oliveira et al., 2017), ad esempio

Cavallarín et al., (2011) ha riportato che inoculi di *Lactobacillus buchneri* hanno ritardato il deterioramento aerobico e ridotto la quantità di aflatossine presenti negli insilati trattati.

Poiché è molto difficile prevenire del tutto la contaminazione da micotossine degli insilati e non sempre, per motivi economici, è possibile scartare tutti i foraggi contaminati, esistono varie tecniche per la riduzione degli effetti delle micotossine (Gallo et al., 2015; Ogunade et al., 2018). Diluire nella razione la quantità di foraggi contaminati con ingredienti privi di micotossine non sembra essere una strategia vincente in quanto riduce l'avanzamento del fronte di alimentazione del silo e causa un maggior deterioramento aerobico della massa insilata (Ogunade et al., 2018) oltre ad esporre comunque gli animali alla presenza delle tossine. Un metodo valido per ridurre l'assorbimento e gli effetti collaterale delle micotossine nelle bovine è invece quello di somministrare nella dieta materiali argillosi con funzione adsorbente (Whitlow e Hagler, 2005; Jouany, 2007). Infatti, l'utilizzo di adsorbenti minerali nella razione dei ruminanti è una valida strategia per ridurre l'assorbimento gastrointestinale di aflatossine contenute nei foraggi (Kolossova e Stroka, 2012), tra questi composti, la bentonite si è dimostrata essere uno tra i più efficaci nelle bovine da latte (Maki et al., 2016; Sulzberger et al., 2017) ed è l'unico autorizzato per uso zootecnico nell'Unione Europea (Regolamento CE n. 1060/2013). Altre metodologie meno utilizzate per l'eliminazione delle micotossine sono l'utilizzo di enzimi esogeni naturali o ricombinanti e di microrganismi esogeni (Loi et al., 2017).

La cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) è la tecnica attualmente più utilizzata per la rilevazione delle micotossine negli alimenti destinati agli animali grazie alla sua elevata sensibilità e specificità (Cavallarín et al., 2011; Cheli et al., 2013). Nonostante ciò, la necessità di eseguire monitoraggi su più campioni, in tempi brevi, e a costi inferiori ha portato allo sviluppo di metodi rapidi e di facile esecuzione come i kit immunoenzimatici (test ELISA), ampiamente utilizzati. Tuttavia, questo metodo può dare possibili falsi positivi dovuti a reazioni incrociate degli anticorpi, soprattutto se come matrice si utilizzano insilati di mais (Cavallarín et al., 2011). Recentemente si sono diffusi metodi basati sulla cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS) che consentono di analizzare più metaboliti in una volta (Cavallarín et al., 2011; Cheli et al., 2013) e studi sono stati condotti sull'utilizzo della spettroscopia NIR che hanno dimostrato che questa metodologia può essere uno strumento di screening utilizzabile (Cheli et al., 2013).

Le micotossine sono quindi presenti in ogni fase della filiera agroalimentare grazie alla loro capacità di passare dai foraggi agli animali e da questi all'uomo, e i loro effetti più gravi colpiscono le colture agricole e le aziende lattiero-casearie a causa della diretta perdita di raccolto, della riduzione della produzione di latte, dei rischi per salute degli animali e per la

sicurezza dei loro prodotti (Leite et al., 2021). La natura ubiquitaria delle micotossine e la gravità dei loro effetti sulla salute umana le rendono quindi un problema per la sicurezza alimentare (CAST, 2003; Wu et al., 2014). Per questi motivi, è fortemente raccomandato analizzare gli insilati, non solo per le caratteristiche nutritive e fermentative, ma anche per la quantificazione delle micotossine presenti (Cheli et al., 2013; Gallo et al., 2015).

2 Obiettivi

Lo scopo di questa prova sperimentale è quello di comparare gli effetti dell'impiego di due varietà di ibridi di mais contraddistinte da una diversa precocità di raccolta (precoce e tardiva) nell'alimentazione mediante unifeed di bovine da latte Frisone ad alta produzione.

Nello specifico, si è voluto valutare come la diversa composizione chimica e fermentativa dei due ibridi dopo l'insilamento e il differente momento di raccolta potessero influire su parametri quali la produzione di latte e la sua composizione, la digeribilità della dieta, l'efficienza alimentare, l'omogeneità dell'unifeed e sull'attività di selezione della dieta da parte degli animali.

3 Materiali e Metodi

3.1 Caratteristiche aziendali e disegno sperimentale

Lo studio in oggetto si è svolto tra Gennaio e Febbraio 2020 in due periodi consecutivi (P1, P2) di 3 settimane ciascuno per una durata totale della prova di 6 settimane; la prova è stata eseguita in provincia di Brescia (IT) in un allevamento di vacche da latte avente 900 bovine frisoni in lattazione suddivise in 3 gruppi divisi in base allo stadio di lattazione. Il protocollo sperimentale è stato approvato dall'Organismo Preposto per il Benessere Animale (OPBA) dell'Università di Padova (Prot. n. 204388 del 06/05/2020).

La sperimentazione si è svolta su due gruppi di 30 animali l'uno, omogenei per giorni in lattazione (103) e produzione di latte (41,5 litri al giorno per capo) e che sono stati allevati in box separati per tutta la durata della prova.

Gli animali dei due gruppi sono stati alimentati con due diete unifeed contenenti gli stessi ingredienti, ma differenti solamente per la tipologia di insilato di mais utilizzato: una conteneva silomais di un ibrido precoce e l'altra di uno tardivo. Gli altri componenti dell'unifeed sono stati poi bilanciati in modo da ottenere due diete isoenergetiche, isoproteiche e isofibrose. Le due diete unifeed a confronto sono state formulate con l'aiuto dell'alimentarista aziendale e sono state distribuite separatamente ai due gruppi dopo la preparazione con il carro miscelatore. Nei due periodi ad entrambi i gruppi sono state somministrate in modo alternato le due razioni secondo uno schema di tipo cross over: ogni gruppo ha ricevuto così entrambe le diete.

In ogni periodo le razioni sono state somministrate agli animali per tre settimane, di cui le prime due sono servite per l'adattamento alla nuova dieta, mentre nella terza settimana ovvero quella sperimentale, sono stati effettuati i campionamenti e sono stati rilevati i dati per lo studio.

Inoltre, durante ogni settimana sperimentale e nei tre giorni ad essa precedenti, a 15 animali per gruppo sono stati somministrati 10 grammi al giorno di biossido di titanio che è stato utilizzato come marcatore esterno per calcolare l'ingestione di sostanza secca. La polvere di biossido di titanio è stata avvolta in un'alga e somministrata alle bovine selezionate tramite l'utilizzo di una lancia boli.

Il silomais utilizzato durante tutta la prova deriva dalla produzione aziendale di mais della stagione estiva 2019 e gli ibridi sono stati insilati in due silobags separati. La scelta degli ibridi, così come ogni aspetto colturale, è stata stabilita dai tecnici dell'azienda che ha fornito le sementi ed ha finanziato la sperimentazione. Il mais è stato raccolto quando la linea del latte era all'incirca ad un terzo della lunghezza della cariosside. La gestione aziendale

dell'allevamento ha semplificato notevolmente la sperimentazione, infatti la stalla era dotata di strumentazioni che hanno permesso una più facile raccolta dei campioni e dei dati, quali un carro miscelatore equipaggiato con Polispac^{NIR} e una sala di mungitura con impianto a giostra da 70 posti dotata di campionatori.

3.2 Rilevi sugli animali

Tra il lunedì e il venerdì della terza settimana di ogni periodo si è provveduto alla raccolta dei campioni di latte, feci, sangue e alla valutazione del BCS delle bovine; la frequenza di rilievo variava in base al tipo di dato da raccogliere.

I lunedì, mercoledì e venerdì di ogni settimana sperimentale sono stati prelevati i campioni di latte necessari per l'analisi qualitativa, mentre i valori sulla produzione giornaliera sono stati ottenuti dai database aziendali. I prelievi di latte sono stati eseguiti durante le tre mungiture della giornata: alle 6:30, 14:30 e 22:30; per ogni mungitura è stato prelevato il latte ottenuto da un lattometro inserito nell'impianto di mungitura. I tre prelievi giornalieri di ogni bovina sono stati poi mescolati prendendo 3 aliquote uguali e conservati in una provetta contenente 1 ml del batteriostatico Azidiol. Le provette sono state conservate a temperatura di refrigerazione e consegnate il giorno successivo all'Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari di Veneto Agricoltura con sede a Thiene (VI) dove i campioni sono stati analizzati tramite Milkoscan (FOSS Analytics). I parametri analizzati sono stati: % di grasso, proteine, lattosio e residuo secco magro; urea (mg/100ml) e punto di congelamento (°C).

I prelievi delle feci dall'ampolla rettale per la valutazione dell'ingestione sono stati effettuati durante tutti i 5 giorni della settimana sperimentale, ma solo sui 15 animali per gruppo a cui era stato somministrato il biossido di titanio e sono stati eseguiti alla fine di ogni mungitura. Anche in questo caso per ogni animale sono state prelevate tre aliquote simili che sono state inserite in una vaschetta di alluminio. I campioni sono stati quindi congelati e trasportati fino al Laboratorio Chimico-NIRS-XRF del Dipartimento di Medicina Animale Produzioni e Salute (MAPS) dell'Università degli studi di Padova con sede a Legnaro (PD). Qui, dopo aver posto le vaschette in stufa a ventilazione forzata per 96 ore, i campioni sono stati pesati e macinati fino ad ottenere una polvere che è stata poi analizzata tramite spettroscopia NIRS (FOSS NIRSystem 5000 scanning monocromator, Silver Spring, MD, USA). Tuttavia, prima del trasporto al laboratorio MAPS, è stato fatto un pool di 7 campioni per gruppo che è stato analizzato per la composizione chimica tramite uno strumento NIRS portatile (Polispac^{NIR}; ITPhotonics, Fara Vicentina; Italy): i risultati ottenuti sono stati poi utilizzati per valutare la digeribilità dei componenti della dieta.

Per valutare lo stato di nutrizione degli animali, è stato considerato il Body Condition Score (BCS) delle bovine. Il BCS è stato assegnato, dopo un esame di ispezione e di palpazione dell'animale, utilizzando una scala di valori compresi tra 1 a 5 con intervalli di 0.25 come riportato da Edmonson et al., (1989). Il BCS è stato registrato in tre momenti differenti: prima dell'inizio della prova sperimentale e alla fine di entrambi i periodi di prova.

Successivamente a questa valutazione è stato raccolto un campione di sangue per l'analisi del profilo metabolico delle bovine. I prelievi sono stati effettuati dalla vena coccigea attraverso l'utilizzo di vacutainer (Vacuette®). In seguito, i campioni sono stati posti a temperatura di refrigerazione per essere consegnati all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IzsVe) di Legnaro (PD) dove sono avvenute le analisi dei seguenti parametri: urea (mmol/L), colesterolo (mmol/L), acidi grassi non esterificati (mmol/L), bilirubina totale ($\mu\text{mol/L}$) e AST (U/I).

3.3 Razione ed analisi degli alimenti

In Tabella 1 è indicata la composizione, delle due diete unifeed in prova, espressa in kg di ogni ingrediente utilizzati giornalmente per l'alimentazione di una bovina. Le diete sono state bilanciate grazie alla collaborazione dell'alimentarista aziendale e differiscono solamente per la tipologia di silomais utilizzato.

Ogni mattina delle settimane sperimentali, subito dopo la distribuzione dell'unifeed, sono stati raccolti dei campioni dalle due razioni distribuite. La raccolta è avvenuta in 3 punti diversi della mangiatoia, in modo tale da avere un campione più omogeneo e rappresentativo. Anche in questo caso l'analisi sulla composizione chimica è stata effettuata tramite spettroscopia NIRS (FOSS NIRSystem) presso il laboratorio di MAPS. Inoltre, l'unifeed è stato analizzato anche in mangiatoia tramite Polispec^{NIR}. I parametri analizzati nelle razioni sono stati: sostanza secca (SS), proteine gregge (PG), lipidi greggi (EE), fibra neutro detergente (NDF), fibra acido detergente (ADF), lignina acido detergente (ADL), e amido totale (AMIDO), calcolati in percentuale sulla sostanza secca.

INGREDIENTI DIETA (KG TQ)	TARDIVO	PRECOCE
Silomais tardivo	27.2	0
Silomais precoce	0	27.5
Fieno di medica	2	1.9
Fieno di prato	2	1.8
Farina di mais	3.4	3.6
Farina di estrazione di soia	3.4	3.4
Nucleo	2.1	2.1
Lino estruso	0.3	0.3

Tabella 1. Ingredienti delle due diete Unifeed

Subito dopo aver eseguito queste scansioni, il Polisp^{NIR} è stato impiegato anche per calcolare l'omogeneità della razione e l'attività di selezione degli animali secondo la procedura descritta da Serva et al., (2021). In questo caso le scansioni sono state eseguite lungo tutta la mangiatoia in 16 punti distribuiti ad intervalli regolari. Le stesse posizioni sono state utilizzate anche per valutare la selezione dell'alimento, che è stata calcolata comparando le analisi spettroscopiche dell'unifeed appena distribuito con quelle eseguite due ore dopo la distribuzione della razione. È stato poi necessario raccogliere campioni di unifeed in più punti della mangiatoia per poterli analizzare in laboratorio. Qui il FOSS (NIRSystem) è stato calibrato (Tabella 2) per PG, NDF, AMIDO, lunghezza geometrica media delle particelle (LMG) e per le percentuali di unifeed rimaste negli ultimi tre strati di un Penn State Particle Separator (PSPS) modificato rispetto a quelli utilizzati da Heinrichs et al., (2013) e Kononoff et al., (2003). Questo PSPS modificato era dotato di 5 setacci (S1-S5) con fori rispettivamente di 38, 19, 8, 4 e 1,8 mm e di un fondo. La tecnica di setacciatura utilizzata è quella descritta da Heinrichs et al., (2013) che prevede di agitare il PSPS per un totale di 40 volte in direzioni differenti.

All'inizio della prova e i lunedì, mercoledì e venerdì di ogni settimana sperimentale sono stati prelevati campioni di entrambi i silomais per analizzarne la composizione (SS, PG, EE, NDF, ADL e AMIDO) e il profilo fermentativo (pH, e % su sostanza secca di mannitolo, etanolo, acido lattico, acido acetico, acido propionico e acido butirrico) sempre tramite spettroscopia (FOSS e Polisp^{NIR}).

Per calcolare l'ingestione degli animali, ogni giorno è stata registrata la quantità totale di alimento scaricata ad ogni gruppo grazie ai dati raccolti dalla strumentazione del carro miscelatore.

COSTITUENTE	N	MEDIA	DS	SEC	RSQ	SECV	1VR
SS	937	51.46	5.05	1.03	0.96	1.06	0.96
CEN	929	3.73	0.59	0.28	0.77	0.31	0.72
PG	927	7.78	1.07	0.43	0.84	0.45	0.82
EE	915	1.92	0.46	0.23	0.75	0.23	0.74
NDF	933	17.95	2.48	1.15	0.78	1.18	0.77
ADF	871	10.66	1.68	0.83	0.76	0.85	0.75
ADL	148	1.61	0.47	0.32	0.55	0.37	0.38
AIA	148	0.30	0.18	0.13	0.44	0.15	0.23
AMIDO	955	12.37	1.78	1.10	0.62	1.12	0.60

Tabella 2. Specifiche della curva di calibrazione dello strumento FOSS (NIRSystem) usate per l'analisi dell'insilato (DS=deviazione standard, SEC=errore standard di calibrazione; RSQ=coefficiente di determinazione SECV=errore standard di cross validazione; 1VR=coefficiente di determinazione in cross-validazione)

3.4 Calcoli e Analisi statistica

In Tabella 2 è mostrata la curva di calibrazione del FOSS (NIRSystem) utilizzata per le analisi. La digeribilità di sostanza secca (DSS), proteine (DPG), NDF (DNDF) e amido (DAMIDO) è stata calcolando utilizzando lignina come marcatore interno secondo le formule riportate da McDonalds et al., (2011) e Schäfers et al., (2018):

$$DSS (\%) = \left(\frac{\text{marker nelle feci (g/KgSS)} - \text{marker nell'alimento (g/KgSS)}}{\text{marker nelle feci (g/KgSS)}} \right) * 100$$

$$DN (\%) = \left(1 - \frac{(\text{marker nell'alimento (g/KgSS)}) * (N nelle feci (g/KgSS))}{\text{marker nelle feci (g/KgSS)} * N \text{ nella dieta (g/KgSS)}} \right) * 100$$

Dove N rappresenta il nutriente da valutare (PG, NDF, AMIDO) e ND la sua digeribilità. I valori dei marker e di N sono espressi in g/KgSS.

L'analisi del titanio delle feci è stata eseguita seguendo il protocollo di Titgemeyer et al., (2001).

L'ingestione di sostanza secca è stata calcolata attraverso l'utilizzo di un marcatore esterno, il biossido di titanio, secondo le seguenti formule:

$$Feci Prodotte (Kg) = \frac{\text{Titanio somministrato (g)}}{\text{Concentrazione di titanio nelle feci (g/kg)}}$$

$$Ingestione (Kg) = \frac{\text{feci prodotte (Kg)}}{1 - DSS}$$

Seguendo le indicazioni di Bach et al., (2020) l'efficienza alimentare è stata calcolata come rapporto tra la quantità di latte prodotto, corretto al 3.5% di grasso e l'ingestione di sostanza secca.

Gli indici di Omogeneità (Hi) e Selezione (Si) sono stati calcolati seguendo gli algoritmi proposti da Serva et al., (2021) dai quali Hi ottiene un valore che va da zero a cento (0= totale disomogeneità; 100= totale omogeneità) mentre quello di Si va da zero a uno (0=nessuna selezione; 1=massima selezione).

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SAS (versione 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC). Tutti i dati sono prima stati testati per la normalità (distribuzione di Gauss) utilizzando il test di Shapiro-Wilk, considerando normali quelli con un valore superiore a 0.9. I dati sulla composizione, l'omogeneità, l'indice di selezione e la digeribilità della dieta e della composizione del silomais sono stati elaborati con un modello ANOVA utilizzando come effetti fissi il periodo, l'ibrido di mais e l'interazione tra i due. I dati sull'assunzione di sostanza secca, efficienza, produzione e composizione del latte, BCS e parametri ematici, sono stati elaborati attraverso un modello ANOVA misto utilizzando come effetto random la singola vacca e come effetti fissi, il periodo, l'ibrido di mais e la loro interazione.

4 Risultati e Discussione

COMPOSIZIONE (%SS)	P1	P2	TARDIVO	PRECOCE	P	
					periodo	silomais
SS (% tal quale)	32.5	34.0	34.8	31.7	0.031	<0.001
PG	7.93	7.75	7.93	7.75	0.332	0.324
EE	2.58	2.82	2.66	2.74	0.034	0.438
NDF	39.1	39.1	37.4	40.8	0.899	<0.001
ADL	2.44	2.45	2.36	2.53	0.963	0.236
AMIDO	35.9	35.5	37.2	34.2	0.498	<0.001
PROFILO FERMENTATIVO (% SS)						
pH (numero puro)	3.88	3.81	3.84	3.85	0.214	0.837
Azoto (N) da Urea (%N totale)	7.66	7.06	7.15	7.57	0.041	0.126
Mannitolo	0.128	0.210	0.150	0.188	0.109	0.422
Etanolo	0.610	0.483	0.370	0.723	0.066	<0.001
Acido lattico	4.94	5.31	5.14	5.11	0.529	0.963
Acido acetico	2.89	2.11	2.05	2.94	0.003	0.001
Acido propionico	0.727	0.565	0.563	0.728	0.037	0.034
Acido butirrico	0.063	0.065	0.062	0.067	0.580	0.121

Tabella 3 Composizione e Profilo fermentativo dei due Silomais

In Tabella 3 sono riportati i valori relativi alla composizione ed al profilo fermentativo dei due Silomais analizzati tramite spettroscopia NIR. Dal punto di vista compositivo, i valori rilevati in entrambi gli ibridi rientrano nei range di normalità indicati dal National Research Council (2000) nel Nutrient Requirements of Dairy Cattle (NRC, 2001) e da Khan et al., (2015).

In letteratura viene riportato come le varietà precoci siano caratterizzate da quantitativi maggiori di sostanza secca (Gerlach et al., 2018; Marchesini et al., 2019) e da percentuali di amido e NDF rispettivamente maggiori e minori (Opsì et al., 2013; Gerlach et al., 2018) rispetto a quelle tardive.

Tuttavia, i nostri risultati mostrano come l'ibrido precoce si sia caratterizzato per avere 3.1 punti percentuali in meno di sostanza secca, 3.4 punti in più di NDF e 3 punti in meno di amido rispetto al tardivo. Questa incongruenza è dovuta alle differenti caratteristiche dei due ibridi,

malgrado la raccolta allo stesso stadio di maturazione. In genere con l'aumentare della maturità della pianta, aumentano le quantità di sostanza secca e amido, mentre diminuisce la percentuale di NDF (Bal et al., 1997; Opsi et al., 2013; Khan et al., 2015). Ciò avviene perché con l'avanzare della maturazione della pianta, aumentano sia la deposizione di amido nella cariosside che le dimensioni della pannocchia, con una conseguente diminuzione della porzione di NDF (Cone et al., 2008; Khan et al., 2015). Ali et al., (2012) e Khan et al., (2015) hanno inoltre osservato una relazione inversa tra la quantità di amido e quella di NDF presente negli insilati e ciò è evidente anche confrontando i risultati ottenuti dai nostri due ibridi. La maggior percentuale di fibra neutro-detersa nel precoce è un aspetto da tenere in considerazione quando verranno analizzati i valori produttivi degli animali poiché una quantità di NDF superiore, soprattutto se poco digeribile, riduce l'ingestione di sostanza secca (Jensen et al., 2005; Opsi et al., 2013; Grant e Ferraretto, 2018; Oba e Kammer-Main, 2022) e di conseguenza la produzione di latte dell'animale.

Dal punto di vista fermentativo, in entrambi i silomais, i valori analizzati rientrano nei parametri di insilati di ottima qualità (McDonald et al., 1991; Kung e Shaver, 2001; Kung et al., 2018). Si può notare come l'acido lattico, prodotto principalmente dai lattobacilli (LAB) eterofermentanti e omofermentanti, sia l'acido presente in quantità maggiori in entrambi gli insilati. È molto importante che questo avvenga perché questo acido è il fattore che contribuisce maggiormente al calo del pH della massa insilata; infatti, è dieci volte più potente rispetto agli altri acidi che vengono comunemente prodotti durante il processo di insilamento (Kung et al., 2018). Alte dosi di acido lattico e minori concentrazioni degli altri acidi organici prodotti garantiscono una minore perdita di energia e sostanza secca (Muck, 1988; McDonald et al., 2011). I valori di pH (3.84 nel tardivo e 3.85 nel precoce) e di acido lattico (5.14 e 5.11 %SS) da noi rilevati non differiscono significativamente tra i due silomais e rientrano nei range ottimali (Kung et al., 2018): indicano quindi che il processo di acidificazione durante la fase di insilamento è avvenuto correttamente.

L'ibrido precoce è caratterizzato da una concentrazione significativamente maggiore di etanolo ed acido acetico che indicano, rispetto al tardivo, una maggiore attività fermentativa da parte di batteri eterolattici, enterobatteri e lieviti (Nishino et al., 2004), mentre diminuiscono di conseguenza le fermentazioni omolattiche. Questo pattern fermentativo porta ad una maggiore perdita di sostanza secca nella massa insilata (Borreani et al., 2018).

L'acido acetico è prodotto principalmente da batteri eterolattici e da enterobatteri (Rooke e Hatfield, 2003; Gallo et al., 2016; Borreani et al., 2018), mentre l'etanolo può derivare anche dai lieviti (Rooke e Hatfield, 2003; Kung et al., 2018). Come dimostrato da Anil et al., (1993),

esiste una relazione inversa tra la quantità di acetato che un bovino assume con la dieta e l'ingestione di insilato da parte dello stesso animale. Le bovine che hanno ricevuto l'insilato di ibrido precoce tenderanno quindi ad avere un'ingestione di sostanza secca minore rispetto a quelle che hanno ricevuto il tardivo in quanto la quantità di acido acetico (2.94%SS) è significativamente maggiore ($p=0.001$) rispetto al tardivo (2.05%SS) nonostante rientri nei range di normalità (1-3%) indicati da Kung et al., (2018). La maggior quantità di etanolo invece, non ha alcun effetto sull'ingestione di sostanza secca da parte degli animali (Grant e Ferraretto, 2018).

Dalla Tabella 3 si può notare come l'ibrido precoce presenti anche un quantitativo statisticamente maggiore ($p=0.034$) di acido propionico (0.728 vs 0.563 %SS) rispetto al tardivo; ma anche in questo caso i valori registrati risultano normali in quanto McDonald et al., (1991) considera ottimale un valore di acido propionico inferiore a 10 g/Kg di Sostanza secca negli insilati ben conservati. Secondo Kung et al., (2018) invece, sono da considerarsi normali quantità di acido propionico minori di 0.1%SS, mentre valori superiori a 0.3-0.5% indicherebbero fermentazioni anomale, soprattutto da clostridi (*Clostridium propionicum*). Nel nostro caso questa ipotesi è da escludere: le fermentazioni clostridiche sono associate ad un'elevata produzione di acido butirrico che nei nostri insilati non sono stati rilevati. Verosimilmente, nella nostra prova, questi valori un po' anomali sono dovuti ad altri tipi di fermentazioni che però non hanno effetti significativi sulla qualità complessiva dell'insilato.

L'acido propionico viene prodotto principalmente da batteri del genere *Propionibacterium* (Rooke e Hatfield, 2003) ed è stato uno dei primi additivi utilizzati negli insilati (Kung et al., 2003) grazie alla sua capacità di inibire la crescita dei lieviti e di conseguenza il deterioramento aerobico; se utilizzato a questo scopo i suoi livelli nella massa insilata aumentano di conseguenza. Solitamente l'acido propionico negli insilati si trova in quantità tali da non riuscire a ridurre l'ingestione di sostanza secca da solo, ma può esercitare questo effetto se sono presenti anche elevate dosi di acido acetico (Mbyana et al., 1993).

Nell'ibrido Precoce si può notare anche una maggiore quantità di acido butirrico che, seppur non statisticamente significativa ($p=0.121$), potrebbe indicare una maggior attività da parte di clostridi con conseguenti perdite di sostanza secca ed energia, ma i valori restano comunque nei limiti della norma (Pahlow et al., 2003). Un'elevata attività clostridica è spesso associata ad una maggiore concentrazione di azoto da urea (NH_4) (Mills e Kung, 2002; Pahlow et al., 2003), tuttavia anche in questo caso, l'aumento di NH_4 nel precoce non è statisticamente significativo ($p=0.126$) e i valori rilevati rientrano nella normalità. Inoltre, nell'insilato non sono presenti altri segni tipici di fermentazioni clostridiche quali diminuzione dell'acido lattico e conseguente

aumento del pH (Kung et al., 2018).

I risultati da noi ottenuti sono in contrasto con quanto riportato da Gerlach et al., (2018) e Marchesini et al., (2019) che hanno individuato quantità più alte di acido acetico, propionico e ammoniaca negli insilati di ibridi tardivi; Gerlach ha trovato quantità maggiori anche di acido butirrico nel tardivo.

Osservando la Tabella 1 si può notare come la composizione della dieta formulata per ogni animale sia pressoché identica dal punto di vista degli ingredienti utilizzati: questo si riflette nella composizione delle due razioni (Tabella 4) che è praticamente la stessa.

L'unica differenza significativa tra i due unifeed ($p=0.046$) risiede nella quantità di sostanza secca: l'ibrido tardivo ha infatti, 1.1 punti percentuali in più rispetto al precoce e ciò deriva dal maggiore quantitativo di sostanza secca nell'insilato tardivo.

	P1	P2	TARDIVO	PRECOCE	P	
					Periodo	Silomais
SS	48.3	48.1	48.7	47.6	0.7189	0.0467
PG-SS	16.1	15.8	16.0	15.9	0.1008	0.7247
EE-SS	3.94	3.67	3.72	3.89	0.0035	0.0429
NDF-SS	31.9	32.2	31.8	32.3	0.4608	0.2523
ADF-SS	19.0	19.2	18.9	19.3	0.358	0.302
ADL-SS	2.95	2.85	2.86	2.94	0.414	0.328
AMIDO-SS	27.3	27.7	27.7	27.4	0.1613	0.2397

Tabella 4. Composizione delle due diete Unifeed

Anche se la razione con la varietà di mais precoce tende a mantenere un livello medio di NDF leggermente maggiore mentre l'amido si trova in quantità minori, tali differenze non sono significative ($p=0.25$ e $p=0.23$) e sono verosimilmente dovute all'aumento di variabilità giornaliera della composizione degli unifeed, rispetto a quella del silomais. A questo proposito va segnalato che McBeth et al., (2013) ha evidenziato che le vacche da latte si adattano bene ad una piccola variazione giornaliera nella composizione dell'unifeed, senza mostrare una riduzione significativa dell'ingestione di sostanza secca e della produzione di latte.

I valori riportati in Tabella 4 seguono le raccomandazioni nutrizionali per l'alimentazione di vacche Frisone da latte ad alta produzione (NRC, 2001; Grant, 2005; Britt et al., 2021) le due diete erano quindi ricche in amido e bilanciate per soddisfare i fabbisogni di mantenimento e

produttivi degli animali. Queste diete sono state scelte, infatti, per massimizzare le prestazioni, ma cercando di evitare l'insorgenza di acidosi ruminale, che nei ruminanti è causata dall'incremento di acidi grassi volatili con conseguente abbassamento del pH ruminale dovuti a diete ricche di amido e povere di fibre (De Nardi et al., 2014). In questo senso va sottolineato che i valori di amido riscontrati in prova (>27%) sono superiori alle recenti raccomandazioni di Britt et al., (2021) che indica per questo parametro un range ottimale tra il 22 e il 26% per bovine ad elevata produzione in medio stadio di lattazione. Nella presente prova però, non è stato rilevato il pH ruminale quindi non è stato possibile stabilire se gli animali fossero o meno in una condizione di acidosi ruminale subacuta.

L'aumento della concentrazione di amido e la diminuzione della percentuale di NDF con l'avanzare della maturità costituisce un vantaggio in diete in cui altri foraggi, ricchi di fibra, occupano una grande porzione dell'unifeed. In circostanze come quelle della nostra prova invece, in cui l'insilato di mais è quasi l'unico foraggio, sarebbe preferibile fornire agli animali una percentuale maggiore di NDF digeribile e una quantità inferiore di amido per garantire una corretta struttura fisica della razione (Jensen et al., 2005).

Va comunque sottolineato come nell'azienda in esame, la presenza di razioni unifeed personalizzate per i diversi gruppi di lattazione aiuti a massimizzare le produzioni. Inoltre, questa pratica aiuta a migliorare l'efficienza alimentare e l'IOFC dell'azienda oltre a ridurre le escrezioni di nutrienti e le emissioni nell'ambiente (Cabrera e Kalantari, 2016).

DIGERIBILITA' TOTALE (%)	P1	P2	TARDIVO	PRECOCE	P	
					Periodo	Silomais
DigSS	56.3	56.6	56.9	56.0	0.813	0.398
DigPG	55.9	54.1	55.5	54.5	0.126	0.363
DigNDF	29.5	33.8	31.9	31.3	0.030	0.736
DigAMIDO	97.3	97.5	97.3	97.5	0.241	0.245

Tabella 5. Digeribilità totale dei principali costituenti della dieta

Per questioni di benessere animale, non è stato possibile utilizzare vacche fistolate in prova, quindi è stato possibile valutare solamente la digeribilità totale delle componenti della dieta e non è stato possibile capire dove sia avvenuta la degradazione degli alimenti. Le ricerche condotte sugli animali, infatti, sono obbligate a seguire rigidi protocolli (Castillo e Hernández,

2021) nel rispetto della normativa dell'Unione Europea per la sperimentazione animale (Direttiva 2010/63/UE).

La digeribilità delle due razioni (Tabella 5) non risulta differente tra i due silomais, in linea con quanto riportato da Etle e Schwarz, (2003) che non hanno individuato grosse variazioni di digeribilità in bovine alimentate con ibridi caratterizzati da differente precocità di raccolta; tuttavia, nel loro studio sono state comparate varietà di mais a precocità intermedia e precoce. Quando si analizzano i dati in Tabella 5 è molto importante sottolineare che, tranne per i valori riguardanti l'amido, la digeribilità è in generale molto bassa rispetto ai range di normalità riportati in letteratura. In particolare, è la digeribilità dell'NDF che mostra i risultati peggiori, soprattutto nel primo periodo (digNDF=29.5%).

La DigNDF nelle prove con gli ibridi tardivo e precoce è rispettivamente del 31.9% e 31.3%, mentre in genere vengono considerati nella norma valori che si attestano attorno al 38% o superiori (Ali et al., 2012; Ferraretto e Shaver, 2012; Khan et al., 2015; Potts et al., 2017a; Potts et al., 2017b).

Questa grossa diminuzione rispetto alle aspettative è dovuta alla notevole ingestione di sostanza secca (Tabella 7) da parte degli animali in prova e alla contemporanea bassa concentrazione di NDF, infatti all'aumentare dell'ingestione e al diminuire delle concentrazioni di NDF nella dieta, aumenta la velocità di passaggio delle ingesta attraverso il rumine, portando a un declino della digeribilità totale (Cortese et al., 2019). È noto da tempo che una maggiore velocità di transito dell'alimento attraverso il rumine abbassa il tempo disponibile per la degradazione e l'assorbimento dei nutrienti (Tyrrell e Moe, 1975). Questo avviene soprattutto con razioni contenenti grandi proporzioni di ingredienti con bassa digeribilità, come i foraggi maturi (Bach et al., 2020). L'NDF rappresenta il maggior componente dei due unifeed analizzati (circa il 32%SS, Tabella 4) e il ragionamento appena fatto si può applicare anche per la digeribilità della sostanza secca, visto che pure la digeribilità degli altri componenti è ridotta. Nel nostro caso la digeribilità totale della sostanza secca si attesta tra il 56 e il 57%, mentre in letteratura vengono riportati valori medi superiori di circa 10 punti percentuali (Ferraretto e Shaver, 2012; Khan et al., 2015; Potts et al., 2017a; Potts et al., 2017b).

Migliorare la digeribilità dell'NDF dovrebbe essere un obiettivo da raggiungere in questa azienda in quanto questo dato è correlato positivamente con la produzione di latte (Krämer-Schmid et al., 2016). Oba e Allen, (1999) infatti, hanno associato un aumento di una unità percentuale nella digeribilità dell'NDF in vitro o in situ ad un aumento di 0,17 kg di ingestione di sostanza secca e di 0,25 kg nella quantità di latte corretto al 4% prodotto. Ciò avviene perché una maggiore facilità di idrolisi dell'NDF stimola un passaggio rapido dello stesso nel rumine,

riducendone il riempimento fisico e consentendo una maggiore assunzione di cibo (Allen e Oba, 1996).

Anche la digeribilità dell'amido non è ottimale: alcuni studi (Jensen et al., 2005; Ali et al., 2012) suggeriscono una quasi completa digestione dell'amido (maggiore di 98.5%) quando vengono considerati sia il rumine che l'intestino; nel nostro studio invece la digeribilità totale dell'amido non supera mai il 97.5%. Tuttavia, altre pubblicazioni (Ferraretto e Shaver, 2012; Khan et al., 2015; Ferraretto et al., 2015b; Potts et al., 2017a) indicano che potrebbero esserci valori inferiori da quelli rilevati in questa prova. La digeribilità dell'amido è influenzata dalla varietà del mais, dal tipo di endosperma, dai metodi di lavorazione (lunghezza del taglio e processazione della cariosside) e di conservazione della pianta e dalla maturità alla raccolta (Allen, 2000; Ferraretto e Shaver, 2012; Oba e Kammes-Main, 2022).

Come già detto ed in linea con le altre componenti della dieta, anche la digeribilità della componente proteica (55.5% per il tardivo e 54.5% per il precoce) risulta diminuita rispetto a quanto riportato in numerose pubblicazioni. Ali et al., (2012) riporta una DigPG di 87.5%, similmente Khan et al., (2015) riporta una digeribilità media di 82.6% (deviazione standard 3.94%); mentre Potts et al., (2017a,b) nelle sue pubblicazioni ha trovato valori medi per questo parametro attorno al 65%. Le proteine sono la componente più costosa della razione (Cortese et al., 2019) e una loro scarsa digeribilità porta ad elevate perdite economiche, ma anche a criticità ambientali in quanto elevate quantità di azoto vengono perse sotto forma di ammoniaca con le feci. Infatti, un maggior quantitativo di azoto viene eliminato se sono presenti una elevata concentrazione o una scarsa digeribilità delle proteine nella dieta (Dou et al., 1996; Paul et al., 1998; Cole et al., 2005). Tuttavia, in alcuni casi, aumentare la quantità di proteine nell'unifeed potrebbe portare a dei vantaggi quali: aumento della digeribilità dell'NDF (Ghorbani et al., 2011), incremento della digeribilità ruminale della componente proteica (Ghorbani et al., 2011; Khan et al., 2015) e aumento della produzione di latte (Ghorbani et al., 2011; Van der Linden et al., 2021). Bisogna quindi scegliere sempre con attenzione il livello di proteine gregge della dieta e ne va tenuta in considerazione la digeribilità in modo da massimizzare la produzione di latte riducendo l'impatto ambientale ed evitando spese alimentari superflue.

Analizzando i dati sulla digeribilità della Tabella 5 si può perciò affermare che nell'azienda in prova ci sia un notevole spreco di nutrienti che non vengono assorbiti nel tratto gastroenterico, ma vengono eliminati inalterati nelle feci.

Per risolvere questo problema, la strategia migliore da utilizzare, sarebbe quella di aumentare sensibilmente la quantità di fibra digeribile presente nella razione e diminuire di conseguenza il contenuto di amido in modo da avere un'inferiore velocità di passaggio delle ingesta

attraverso il rumine quindi un maggior tempo per l'assorbimento dei nutrienti. Questa decisione porterebbe però ad una riduzione dell'ingestione con una conseguente diminuzione della produzione lattea: va pertanto cercato il giusto compromesso in modo da massimizzare la produzione diminuendo la quantità di sostanza secca non digerita eliminata con le feci.

Un'altra soluzione per aumentare i valori di digeribilità in azienda potrebbe essere quella di utilizzare varietà di mais caratterizzati da una maggiore digeribilità dell'NDF come, ad esempio, gli ibridi brown midrib (BMR) che hanno un basso contenuto di lignina. Infatti, la selezione di piante ad elevata digNDF ha migliorato le prestazioni di lattazione delle vacche riducendo gli effetti di riempimento del rumine dell'NDF nelle vacche ad alta produzione, consentendo così un aumento dell'assunzione di cibo e della produzione lattea (Oba e Allen, 1999; Oba e Allen, 2000). Tuttavia, come indicato da Ferraretto et al. 2015b, ci sono incoerenze in letteratura con alcuni autori riportano una maggiore digNDF per il BMR mentre altri non hanno trovato valori significativamente differenti. Ciò avviene perché la digeribilità valutata in vitro dell'NDF non riesce a prevedere necessariamente la digeribilità dell'NDF in vivo (Oba e Allen, 2000). Ciononostante, una maggiore digeribilità in vitro dell'NDF potrebbe indicare una maggiore fragilità della parete cellulare della pianta portando così ad un ridotto riempimento fisico del rumine e ad un aumento di produzione lattea (Oba e Allen, 2000).

Analizzando i dati ottenuti per gli indici di omogeneità e selezione (Tabella 6), si può notare come per questi valori, non ci siano sostanziali divergenze tra i due unifeed o tra i due periodi. L'unica variazione significativa ($p < 0.001$) individuabile è quella della lunghezza media delle particelle di unifeed tra P1 e P2 (5.16 vs 6.19 mm). Ciò è dovuto probabilmente al fatto che in P1, l'operatore che si occupava caricare e distribuire il carro miscelatore l'ha fatto girare per un tempo maggiore rispetto al P2, oppure nei due periodi ci sono stati due operatori diversi che si sono occupati di questa mansione. Verosimilmente è stata proprio questa disuguaglianza che ha peggiorato l'omogeneità generale in P2 rispetto a P1 (57.3 vs 67); questa differenza non è significativa ($p = 0.2$), ma ha comunque portato a classificare l'unifeed come "sufficientemente omogeneo", mentre nel primo periodo questo poteva considerarsi omogeneo. Anche nello studio di Marchesini et al., (2020) su gruppi di vitelloni da carne, un tempo di miscelazione più lungo ha influito in modo positivo sull'omogeneità dell'unifeed, riducendo la dimensione delle particelle e l'attività di selezione degli animali, migliorando così le prestazioni di crescita. In generale gli indici di omogeneità sono comunque discreti, ma non eccezionali: sarebbe ottimale raggiungere valori il più possibile vicini al 100% o comunque superiori a 80% in quanto un'omogeneità elevata porta ad un aumento delle produzioni anche nelle vacche da latte. Infatti, il presupposto fondamentale per ottenere i benefici associati all'utilizzo della dieta unifeed è la

miscelazione omogenea degli alimenti: la somministrazione simultanea di tutti i nutrienti consente una maggiore stabilità del pH ruminale, aumentando così le prestazioni produttive e la salute delle bovine da latte, evitando l'acidosi ruminale (Costa et al., 2019).

	P1	P2	TARDIVO	PRECOCE	P	
					Periodo	Silomais
IO-GEN	67.06	57.30	64.86	59.50	0.20	0.48
IO-S4	79.07	48.88	52.58	73.67	0.30	0.82
IO-S5	27.20	23.00	27.87	21.79	0.76	0.78
IO-Fondo	30.42	30.30	31.93	28.79	0.99	0.83
IO-LMG	79.25	70.97	78.04	72.18	0.26	0.42
IO-PG	74.87	69.43	68.12	76.18	0.37	0.19
IO-NDF	75.17	77.00	79.57	72.60	0.82	0.40
IO-Amido	66.10	68.05	68.35	65.80	0.84	0.80
Media-LMG	5.16	6.19	5.56	5.79	<0.001	0.31
IS-GEN	0.34	0.34	0.31	0.36	0.94	0.53
IS-S4	0.27	0.58	0.40	0.48	0.48	0.80
IS-S5	0.38	0.26	0.30	0.36	0.54	0.64
IS-Fondo	0.33	0.30	0.25	0.37	0.86	0.43
IS-LMG	0.26	0.20	0.30	0.19	0.52	0.89
IS-PG	0.48	0.58	0.43	0.59	0.53	0.27
IS-NDF	0.53	0.62	0.55	0.57	0.72	0.82
IS-Amido	0.25	0.26	0.27	0.24	0.97	0.93

Tabella 6. Valori di omogeneità e selezione

(IO=indice di omogeneità; IS=indice di selezione; S4 e S5=setaccio 4 e 5 del PSPS modificato; Fondo=fondo del PSPS modificato; LMG=lunghezza media geometrica delle particelle di unifeed espressa in millimetri)

Range di Omogeneità:

0-25 = Estremamente disomogeneo
 25-35 = Molto disomogeneo
 35-50 = Disomogeneo
 50-65 = Sufficientemente omogeneo
 65-80 = Omogeneo
 80-100 = Molto omogeneo

Range di Selezione:

0-0.2= Selezione accettabile
 0.2-0.4= Selezione modesta
 0.4-0.6= Selezione moderata
 0.6-0.8= Selezione accentuata
 0.8-1= Selezione Elevata

(da Andrighetto et al. (2016); modificati)

Nell'ultimo setaccio del PSPS modificato e sul fondo di questo la disomogeneità è evidente, questa potrebbe essere dovuta ad un errore nell'ordine di carico del carro miscelatore: probabilmente gli operatori aggiungono le farine di mais e soia dopo aver messo i fieni e prima dell'insilato. Questo le porta a depositarsi sul fondo del carro e a non attaccarsi correttamente con il resto dell'unifeed: durante la preparazione del carro, infatti, gli ingredienti più pesanti o con le particelle più piccole tendono a sedimentare mentre gli ingredienti più leggeri restano nello strato superiore (Schingoethe, 2017). Sarebbe quindi preferibile mettere le farine dopo il silomais oppure si potrebbe provare ad aggiungere acqua prima di caricarle (dopo aver messo i fieni) in modo che queste si attacchino meglio alle particelle dell'unifeed e non cadano sul fondo (Andrighetto et al., 2016). Anche Arzola-Alvarez et al., (2010) ha trovato una minore quantità di particelle negli ultimi setacci del PSPS per gli unifeed a cui era stata aggiunta acqua rispetto al controllo. Inoltre, va sottolineato come con l'uso di razioni contenenti molti ingredienti ognuno dei quali con una grande variazione di dimensioni, forma e densità, la determinazione della corretta sequenza di carico risulti spesso molto complessa (Jordan, 2001). Gli indici di selezione ottenuti nella prova sono generalmente buoni, con gli animali che tendono a manifestare una selezione moderata solamente nei confronti dell'NDF e delle proteine, mentre per gli altri parametri la selezione è accettabile o modesta. In linea con i nostri risultati, anche DeVries et al., (2007) ha individuato una tendenza delle bovine da latte a scartare l'NDF e le particelle di maggiori dimensioni rispetto a quelle più piccole. Anche se nel nostro caso non ci sono grossi problemi di selezione, vale comunque la pena sottolineare che Marchesini et al., in una prova del 2011, ha notato che sostituendo nella razione di vacche da latte una piccola percentuale (8%) di NDF da fieni con sottoprodotti (bucce di soia e crusca di frumento) la produzione di latte rimaneva inalterata, ma diminuiva la selezione degli animali nei confronti dell'NDF.

Dalla Tabella 7 emerge chiaramente come le vacche nutrite con il silomais di ibrido tardivo abbiano ingerito una quantità decisamente superiore ($p < 0.001$) di sostanza secca rispetto a quelle che hanno ricevuto il precoce (27.2Kg vs 25.9Kg) inoltre, l'ingestione è stata superiore nel secondo periodo rispetto al primo. La differenza di ingestione tra i due unifeed è dovuta al maggior contenuto di NDF presente nel silomais precoce.

LATTE QUALITA'	P1	P2	TARDIVO	PRECOCE	P	
					Periodo	Silomais
Dry Matter Intake (DMI)	26.2	26.9	27.2	25.9	0.005	<0.001
Feed Efficiency (FE)	1.58	1.45	1.55	1.48	0.002	0.092
Produzione (kg)	41.2	40.8	42.5	39.5	0.440	<0.001
FCM 3.5% (kg)	40.6	39.6	41.3	38.9	0.302	0.009
Grasso (g/100 g)	3.41	3.39	3.27	3.53	0.677	<0.001
Proteine (g/100 g)	3.19	3.21	3.14	3.26	0.030	0.005
Lattosio (g/100 g)	4.86	4.85	4.91	4.80	0.444	<0.001
Residuo secco magro (da calcolo) (g/100 g)	8.75	8.77	8.75	8.76	0.225	0.954
Caseina (g/100 g)	2.53	2.55	2.50	2.57	0.075	0.048
Urea (mg/100 ml)	21.6	24.2	22.6	23.2	<0.001	0.305

Tabella 7. Performance produttive, Ingestione di sostanza secca ed efficienza alimentare (DMI=ingestione di sostanza secca; FE=efficienza alimentare; FCM 3.5%=Latte corretto al 3.5% di grasso)

L'NDF generalmente fermenta e passa dal reticolo-rumine più lentamente rispetto agli altri costituenti della dieta; perciò, nel tempo, ha un effetto di riempimento maggiore rispetto ai componenti non fibrosi (Allen, 1996) ed è risultato essere il miglior parametro chimico per predire l'ingestione volontaria (Waldo, 1986). Tuttavia, vi sono prove che l'NDF da solo sia inadeguato per questa valutazione; perché il suo effetto di riempimento varia in base alle differenze nella dimensione iniziale delle particelle dell'unifeed, alla fragilità delle particelle e alla capacità di digestione dell'NDF dell'animale (Allen, 1996).

L'ingestione è influenzata anche da altri fattori oltre al contenuto di NDF: la stessa produzione di latte è uno dei fattori che influiscono maggiormente sulla DMI, fattori secondari sono invece il rapporto tra foraggi e concentrati nell'unifeed, contenuto di proteine gregge e fattori climatici quali temperatura media ed umidità (Mazumder e Kumagai, 2006). Inoltre, Huhtainen et al., (2007) riporta che l'ingestione di insilati è correlata principalmente alla digeribilità della sostanza secca che questi contengono e loro al profilo fermentativo. Infatti, come già riportato precedentemente, il silomais precoce conteneva quantità superiori di acido acetico e propionico che posso aver diminuito l'ingestione volontaria degli animali.

Khan et al., 2015 ha notato che l'ingestione di sostanza secca così come la produzione di latte e la percentuale di proteine nel latte sono massimi quando vengono utilizzati insilati con un contenuto di sostanza secca compreso tra il 30 e il 35%, proprio come nel nostro caso. Sempre

secondo Khan, la minore ingestione per gli insilati a maturità precoce è dovuta al maggior contenuto di NDF e al minor contenuto di amido che questi presentano. La relazione positiva tra produzione di latte e ingestione è ben nota (Hirstov et al., 2005; Van der Linden et al., 2021) e la maggiore ingestione da parte del gruppo che ha ricevuto l'ibrido tardivo spiega dunque anche la produzione di latte superiore che questi animali hanno prodotto.

L'utilizzo combinato dei marcatori esterni, come il biossido di titanio, in quantità nota, con marcatori interni come la lignina permette di calcolare l'ingestione individuale delle bovine. Tuttavia, è da sottolineare come il metodo da noi utilizzato per la stima dell'ingestione, sia abbastanza indaginoso e non sia praticabile in modo routinario per un'azienda in quanto ogni giorno andrebbe somministrato il marcatore alle vacche con la lancia-boli con un conseguente grosso dispendio di manodopera, e causando una condizione di stress per l'animale. Nel nostro caso il fatto che gli animali fossero abituati a ricevere dei boli di Sali minerali e vitamine ha facilitato il compito. La valutazione dell'ingestione con il biossido di titanio risulterebbe più semplice in stalle dotate di autoalimentatori o di robot di mungitura che distribuiscono mangime in quanto il marcatore potrebbe essere distribuito automaticamente assieme al pellet alle bovine da valutare.

Osservando la produzione di latte in Tabella 7 si nota che le percentuali dei principali componenti del latte rientravano nei range della normalità (Sjaastad et al., 2010; McDonald et al., 2011; Roy et al., 2020), mentre le produzioni medie si attestavano su valori superiori al 40 kg al giorno: ciò fa rientrare le bovine in prova nella categoria di "vacche ad elevata produzione". Infatti, queste produzioni sono di gran lunga superiori alla media produttiva della Lombardia e a quella italiana (rispettivamente di 27.5 kg e 25.5kg) secondo il Bollettino AIA per la stagione 2020. Questi ottimi risultati sono stati ottenuti anche grazie a strategie che hanno permesso di massimizzare la produzione lattea quali l'aumento della frequenza di mungitura da due a tre volte al giorno (Kuehnl et al., 2019) e la presenza di razioni unifeed personalizzate per i diversi gruppi di lattazione (Cabrera e Kalantari, 2016).

Da un punto di vista produttivo, gli animali nutriti con il silomais precoce hanno avuto una produzione lattea significativamente inferiore ($p < 0.001$ e $p = 0.009$) rispetto a quelli alimentati con il tardivo (-3 Kg di latte al giorno che corrispondono a -2.4 Kg di latte corretto al 3.5% di grasso). Questa differenza di resa è dovuta a due fattori principali: la minor ingestione (25.9Kg vs 27.2Kg) da parte degli animali che hanno ricevuto l'ibrido precoce (Kendall et al., 2009) e all'aumento in quest'ultimo della percentuale di NDF quindi ad un maggior effetto ingombro nel rumine (Allen, 1996; Kendall et al., 2009). Anche Etle e Schwarz, (2003), in

linea con quanto da noi rilevato, hanno riportato una maggior produzione di latte da parte di bovine alimentate con silomais di ibridi a maturità intermedia rispetto a quelli che avevano ricevuto il precoce.

L'ibrido precoce ha portato anche ad una percentuale di grasso e di proteina nel latte maggiori (rispettivamente +0.26% e + 0.12%) oltre che ad un aumento di caseina (+0.07%).

Gli esiti relativi alla percentuale di grasso sono dovuti alla maggior percentuale di NDF (+3.4%SS) presente nell'insilato precoce. È noto che una maggior quantità di NDF porterà ad una maggiore produzione di grasso a livello mammario quindi a dosi superiori di grasso nel latte (Beauchemin, 1991). L'NDF dei foraggi contribuisce all'apporto di acidi grassi nei ruminanti, infatti, i microrganismi ruminali fermentano la cellulosa e l'emicellulosa (componenti principali dell'NDF assieme alla lignina) in acetato e butirrato, che sono i precursori della sintesi del grasso del latte nella ghiandola mammaria. Il grasso viene prodotto nella mammella partendo da glicerolo e acidi grassi liberi che derivano, sia da sintesi de novo che da acetato e beta-idrossibutirrato circolanti o direttamente da acidi grassi preformati nelle lipoproteine del sangue (Mansbridge e Blake, 1997). Altri fattori dietetici noti per influenzare il contenuto di grasso nel latte vaccino sono il rapporto tra foraggi e concentrati, il livello di amido nella dieta, la lunghezza del taglio del foraggio, il grado di lavorazione del concentrato e inclusione di vegetali nella razione (McDonald et al., 2011).

I risultati da noi ottenuti sono in linea con altri studi (Phipps et al., 2000; Khan et al., 2015) che hanno riportato una maggior percentuale di grasso nel latte di vacche alimentate con silomais con un contenuto maggiore di NDF.

Nel latte prodotto dalle bovine alimentate con l'ibrido tardivo invece, la diminuzione della percentuale di proteina, e conseguentemente di caseina, è dovuta alla maggior produzione lattea e dal conseguente effetto di diluizione dei nutrienti presenti nel secreto; questo fenomeno vale anche per la percentuale di grasso, per la quale però si deve aggiungere l'effetto di una maggiore produzione di grasso nel latte legata ad una maggiore quantità di fibra. Infatti, in linea con quanto riportato da Sneddon et al., (2012) esiste una correlazione negativa tra la produzione lattea e la percentuale di proteine nel latte ($r=-0.32$) e una correlazione positiva tra la percentuale di grasso e quella di proteina nel latte ($r=0.28$).

Il contenuto di lattosio nel latte è invece positivamente correlato (Sneddon et al., 2012; Haile-Mariam e Prince, 2017) alla produzione lattea e questo spiega il contenuto più elevato ($p<0.001$) di questo zucchero (+ 0.11%) negli animali che hanno ricevuto il silomais tardivo.

Dalla Tabella 7 si può notare inoltre che nel secondo periodo di prova c'è stato un aumento significativo del contenuto di urea nel latte (+2,6mg/100ml), ma non ci sono state differenze tra

i due insilati per quanto riguarda questo parametro ($p=0.305$). L'urea è prodotta nel fegato dall'ammoniaca derivata principalmente dalla scomposizione delle proteine della dieta nel rumine da parte dei microrganismi ruminali (Sjaastad et al., 2010; Ishler, 2023). I livelli ottimali di urea nel latte possono essere associati a un equilibrio tra amido e proteina nella dieta (Ishler, 2023).

In questa prova l'efficienza alimentare (FE) è stata calcolata come rapporto tra i kg di latte al 3.5 % di grasso prodotto giornalmente e kg di sostanza secca ingerita e non semplicemente come rapporto tra la produzione giornaliera e l'ingestione in quanto utilizzare il latte corretto al 3.5% offre una valutazione più accurata dell'efficienza perché riflette meglio la proporzione di nutrienti consumati dalla vacca che finiscono per far parte del latte.

Andando a guardare l'efficienza alimentare, si può notare un leggero miglioramento negli animali che hanno ricevuto l'ibrido tardivo rispetto al gruppo con il precoce (1.55 vs 1.48), questa differenza tende alla significatività ($p=0.092$); la variazione di FE tra i due periodi è invece statisticamente significativa ($p=0.002$) ed è maggiore in P1 (1.58 vs 1.45). La variazione di efficienza tra i due periodi è dovuta alla maggiore ingestione degli animali nel secondo periodo, mentre la leggera diversità di valori tra precoce e tardivo è dovuta principalmente alla maggior produzione di quest'ultimo. A supporto di ciò, Britt et al., (2003) nel suo studio in cui ha comparato 13 differenti allevamenti di frisone, ha individuato una correlazione positiva tra l'efficienza alimentare e la produzione di latte e una correlazione negativa tra FE e la quantità di NDF e ADF nella dieta che nel nostro caso erano superiori nell'unifeed con l'ibrido precoce. Recentemente, anche Andrighetto et al., (2023) ha riscontrato una migliore FE in animali ad elevata produzione rispetto a quelli che producevano meno. I Valori di efficienza da noi raccolti sono comunque molto buoni per entrambi gli ibridi: Britt et al., (2003) ha trovato un dato medio di FE (usando latte al 3.5% di grasso) pari a 1.40 con una deviazione standard di 0.13. I nostri dati potrebbero tuttavia migliorare ancora se si riuscisse ad aumentare i valori di digeribilità aziendali: in questo modo un maggior numero di nutrienti sarebbero utilizzati per la produzione di latte con lo stesso consumo di sostanza secca. Un altro fattore che ha contribuito in modo importante a questi valori di FE è la diluizione dei bisogni nutrizionali per il mantenimento che avviene nelle vacche ad alta produzione e che porta ad una migliore efficienza (Bach et al., 2020).

	P1	P2	TARDIVO	PRECOCE	P	
					Periodo	Silomais
Urea iniziale (mmol/L)	4.51	4.05	4.26	4.30	<0.001	0.738
Colesterolo iniziale (mmol/L)	5.20	5.14	5.15	5.20	0.588	0.627
Nefa (meq/L)	0.16	0.15	0.16	0.16	0.575	0.928
Bilirubina iniziale (umol/L)	2.41	2.40	2.40	2.41	0.342	0.342
Ast iniziale (UI)	80.7	84.0	81.1	83.6	0.192	0.297
Urea finale (mmol/L)	4.06	4.03	4.00	4.09	0.787	0.442
Colesterolo finale (mmol/L)	5.15	5.31	5.14	5.32	0.082	0.043
Nefa finale (meq/L)	0.15	0.06	0.11	0.11	<0.001	0.764
Bilirubina finale (umol/L)	2.40	2.40	2.40	2.40	-	-
Ast finale (UI)	83.2	84.2	82.9	84.5	0.775	0.633
Delta urea (mmol/L)	-0.71	-0.58	-0.79	-0.50	0.633	0.268
Delta colesterolo (mmol/L)	-0.37	-0.36	-0.51	-0.23	0.967	0.475
Delta Nefa (meq/L)	-0.01	-0.10	-0.06	-0.05	<0.001	0.610
Delta Ast (UI)	-2.50	-8.90	-7.23	-4.17	0.382	0.674

Tabella 8. Profilo metabolico degli animali in prova

In Tabella 8 sono riportati i parametri metabolici analizzati durante la prova e la loro variazione tra i due periodi. Tali valori, rientrano negli intervalli fisiologici della bovina da latte (Cozzi et al., 2011; Puppel e Kuczyńska, 2016) e non presentano sostanziali differenze tra le diete. Questo sta ad indicare che complessivamente la mandria era in buono stato di salute e che le diete erano adeguate alle esigenze nutrizionali degli animali.

	P1	P2	TARDIVO	PRECOCE	P	
					Periodo	Silomais
BCS iniziale	2.92	2.81	2.87	2.86	0.0067	0.8295
BCS finale	2.81	2.83	2.83	2.81	0.3975	0.3975
Delta BCS	-0.11	-0.07	-0.13	-0.05	0.6333	0.2676

Tabella 9. BCS e sua variazione durante il periodo sperimentale

Per quanto concerne il Silomais, non ci sono differenze di BCS significative tra i due gruppi (Tabella 9). I valori di BCS rilevati durante la prova rientrano nel range fisiologico (2.75-3.25) indicato da Jones et al., (2017) per vacche in medio stadio di lattazione (100-200 giorni in lattazione). Tuttavia, questi valori si posizionano al limite inferiore di questo range e l'obiettivo nel periodo considerato è quello di avere un BCS uguale a 3. Questi valori non propriamente elevati, sono probabilmente dovuti all'elevata produzione lattea degli animali che comporta un notevole dispendio energetico e che impedisce loro di aumentare le proprie riserve di grasso corporeo. A questo proposito va ricordato che in P1 gli animali hanno avuto un'ingestione di sostanza secca inferiore rispetto al P2 (Tabella 7): si può notare infatti una perdita (-0.11 punti) statisticamente significativa ($p=0.0067$) di BCS durante il primo periodo di prova, mentre i valori tendono a stabilizzarsi nel secondo periodo.

Va comunque sottolineato che la valutazione del BCS non è un parametro completamente oggettivo e che ci possono essere differenze di valutazione dovute all'operatore che esegue le rilevazioni (Evans, 1978; Nicoll, 1981). I valori riscontrati rientrano comunque nei range di normalità indicati in letteratura (Roche et al., 2009; Soussi e Bouraoui, 2019) e ciò è indice di una buona gestione delle bovine.

5 Conclusioni

L'insilato di mais contenente l'ibrido precoce si è contraddistinto per avere una minor quantità di sostanza secca, un'inferiore percentuale di amido ed un maggiore livello di fibra rispetto al tardivo. Questi fattori hanno portato ad una minore ingestione di sostanza secca con una conseguente diminuzione della produzione di latte, sebbene questo sia risultato più ricco di grasso e proteina.

Dal punto di vista fermentativo, il silomais precoce si è caratterizzato per una concentrazione maggiore di etanolo, acido acetico e propionico: questo sta ad indicare una maggiore attività da parte di lattobacilli etero fermentanti.

Non ci sono, invece, state variazioni significative per quanto concerne i valori di omogeneità e selezione, ma va comunque sottolineata l'importanza di ottenere un unifeed omogeneo per ridurre la selezione attiva degli animali ed ottimizzare le produzioni.

Nonostante i due ibridi non abbiano mostrato alcuna differenza di digeribilità, questa sperimentazione ha evidenziato la difficoltà nel bilanciare la produttività degli animali con un'ottima digeribilità della razione. Si evince, così, la necessità di cercare un giusto compromesso tra ingestione e digeribilità al fine di massimizzare la produzione e allo stesso tempo diminuire la quantità di nutrienti non digeriti eliminati con le feci.

Se da un lato l'utilizzo di varietà di mais precoci porta ad una minor produzione latte, dall'altro è bene sottolineare come ciò non comporti un'evidente diminuzione dell'efficienza alimentare.

In aggiunta, la minor permanenza in campo del precoce lo espone a rischi minori di contaminazione da aflatossine o attacchi da parte della piralide del mais. Gli allevatori devono quindi valutare la possibilità di perdere un po' di produttività, per rischiare meno con le micotossine, considerando quindi anche i cambiamenti climatici in corso.

Questo confronto ha consentito di valutare vantaggi e svantaggi dell'utilizzo di entrambe le varietà di mais in modo da fornire informazioni utili agli allevatori nel momento della scelta del tipo di ibrido da utilizzare per migliorare produttività e profitto in allevamento.

6 Bibliografia

- Afuakwa, J. J., & Crookston, R. K. (1984). Using the Kernel Milk Line to Visually Monitor Grain Maturity in Maize 1. *Crop Science*, 24(4), 687-691.
- Albornoz, R. I., Kennedy, K. M., & Bradford, B. J. (2022). Symposium review: Fueling appetite: Nutrient metabolism and the control of feed intake. *Journal of Dairy Science*.
- Ali, M., Weisbjerg, M. R., Cone, J. W., Van Duinkerken, G., Blok, M. C., Bruinenberg, M., & Hendriks, W. H. (2012). Postruminal degradation of crude protein, neutral detergent fibre and starch of maize and grass silages in dairy cows. *Animal feed science and technology*, 177(3-4), 172-179.
- AIA- Bollettino dei Controlli della Produttività del Latte. Available from: <http://www.aia.it/aia-website/it/settori/area-tecnica/ufficio-sviluppo/bollettino-dei-controlli-della-produttivita-del-latte> (Accessed on 08 March 2023).
- Allen, M. S. (1996). Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. *Journal of animal science*, 74(12), 3063-3075.
- Allen, M., & Oba, M. (1996, September). J FIBER 1DIGESTIBILITY OF FORAGES. In 57th Minnesota Nutrition Conference (p. 151).
- Allen, M. S. (2000). Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of dairy science*, 83(7), 1598-1624.
- Allen, M. S., Coors, J. G., & Roth, G. W. (2003). Corn silage. *Silage science and technology*, 42, 547-608.
- Allen, M. S., Bradford, B. J., & Oba, M. (2009). Board-invited review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *Journal of animal science*, 87(10), 3317-3334.
- Allen, M. S. (2020). Control of feed intake by hepatic oxidation in ruminant animals: integration of homeostasis and homeorhesis. *Animal*, 14(S1), s55-s64.
- Allen, M. S. (2023). Symposium review: Integrating the control of energy intake and partitioning into ration formulation. *Journal of Dairy Science*.

- Alonso, V. A., Pereyra, C. M., Keller, L. A. M., Dalcero, A. M., Rosa, C. A. R., Chiacchiera, S. M., & Cavaglieri, L. R. (2013). Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, 115(3), 637-643.
- Andrighetto, I., Marchesini, G., Serva, L., Mirisola, M., & Tenti, S. (2016). Quanto è omogeneo l'unifeed in mangiatoia. *L'InformatoreAgrario*, 38, 19-23.
- Andrighetto, I., Serva, L., Gazziero, M., Tenti, S., Mirisola, M., Garbin, E., ... & Marchesini, G. (2018). Proposal and validation of new indexes to evaluate maize silage fermentative quality in lab-scale ensiling conditions through the use of a receiver operating characteristic analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 242, 31-40.
- Andrighetto, I., Serva, L., Fossaluzza, D., & Marchesini, G. (2023). Herd Level Yield Gap Analysis in a Local Scale Dairy Farming System: A Practical Approach to Discriminate between Nutritional and Other Constraining Factors. *Animals*, 13(3), 523.
- Anil, M. H., & Forbes, J. M. (1988). The roles of hepatic nerves in the reduction of food intake as a consequence of intraportal sodium propionate administration in sheep. *Quarterly Journal of Experimental Physiology: Translation and Integration*, 73(4), 539-546.
- Anil, M. H., J. N. Mbanya, H. W. Symonds, and J. M. Forbes. (1993). Responses in the voluntary intake of hay or silage by lactating cows to intraruminal infusions of sodium acetate or sodium propionate, the tonicity of rumen fluid or rumen distension. *Br. J. Nutr.* 69:699–712
- Arzola-Álvarez, C., Bocanegra-Viezca, J. A., Murphy, M. R., Salinas-Chavira, J., Corral-Luna, A., Romanos, A., ... & Rodríguez-Muela, C. (2010). Particle size distribution and chemical composition of total mixed rations for dairy cattle: Water addition and feed sampling effects. *Journal of dairy science*, 93(9), 4180-4188.
- Aschenbach, J. R., Penner, G. B., Stumpff, F., & Gäbel, G. (2011). Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *Journal of animal science*, 89(4), 1092-1107.
- Bach, A., & Ahedo, J. (2008). Record keeping and economics of dairy heifers. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), 117-138.

- Bach, A., & Cabrera, V. (2017). Robotic milking: Feeding strategies and economic returns. *Journal of dairy science*, 100(9), 7720-7728.
- Bach, À. (2019). Effects of nutrition and genetics on fertility in dairy cows. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(1), 40-54.
- Bach, A., Terré, M., & Vidal, M. (2020). Symposium review: Decomposing efficiency of milk production and maximizing profit. *Journal of dairy science*, 103(6), 5709-5725.
- Bal, M. A., Coors, J. G., & Shaver, R. D. (1997). Impact of the maturity of corn for use as silage in the diets of dairy cows on intake, digestion, and milk production. *Journal of Dairy Science*, 80(10), 2497-2503.
- Bal, M. A., Shaver, R. D., Jirovec, A. G., Shinnors, K. J., & Coors, J. G. (2000). Crop processing and chop length of corn silage: Effects on intake, digestion, and milk production by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 83(6), 1264-1273.
- Bani, P., Cappelli, F. P., Minuti, A., Ficuciello, V., Lopreiato, V., Garnsworthy, P. C., & Trevisi, E. (2014). Estimation of dry matter intake by n-alkanes in dairy cows fed TMR: effect of dosing technique and faecal collection time. *Animal Production Science*, 54(10), 1747-1751.
- Baron, V. S., Stevenson, K. R., & Buchanan-Smith, J. G. (1986). Proteolysis and fermentation of grain-corn ensiled at several moisture levels and under several simulated storage methods. *Canadian Journal of Animal Science*, 66(2), 451-461.
- Bata, A., Rafai, P., & Kovacs, G. (2001). Investigation and a new evaluation method of the resistance of maize hybrids grown in Hungary to *Fusarium* moulds. *Journal of Phytopathology*, 149(2), 107-111.
- Battilani, P., Formenti, S., Ramponi, C., & Rossi, V. (2011). Dynamic of water activity in maize hybrids is crucial for fumonisin contamination in kernels. *Journal of Cereal Science*, 54(3), 467-472.
- Baumgard, L. H., Collier, R. J., & Bauman, D. E. (2017). A 100-Year Review: Regulation of nutrient partitioning to support lactation. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10353-10366.

- Beauchemin, K. A., & Buchanan-Smith, J. G. (1989). Effects of dietary neutral detergent fiber concentration and supplementary long hay on chewing activities and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 72(9), 2288-2300.
- Beauchemin, K. A. (1991). Effects of dietary neutral detergent fiber concentration and alfalfa hay quality on chewing, rumen function, and milk production of dairy cows. *Journal of dairy science*, 74(9), 3140-3151.
- Benton, J. R., Klopfenstein, T. J., & Erickson, G. E. (2005). Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein.
- Blandino, M., Reyneri, A., Vanara, F., Tamietti, G., & Pietri, A. (2009). Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection, fumonisin and deoxynivalenol contamination of maize kernels. *World Mycotoxin Journal*, 2(4), 409-418.
- Blandino, M., Scarpino, V., Giordano, D., Sulyok, M., Krska, R., Vanara, F., & Reyneri, A. (2017). Impact of sowing time, hybrid and environmental conditions on the contamination of maize by emerging mycotoxins and fungal metabolites. *Italian Journal of Agronomy*, 12(3).
- Borreani, G., Bernardes, T. F., & Tabacco, E. (2008). Aerobic deterioration influences the fermentative, microbiological and nutritional quality of maize and sorghum silages on farm in high quality milk and cheese production chains. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37, 68-77.
- Borreani, G., Piano, S., & Tabacco, E. (2014). Aerobic stability of maize silage stored under plastic films with different oxygen permeability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(13), 2684-2690.
- Borreani, G, Tabacco, E, Schmidt, R. J., Holmes, B. J., & Muck, R. E. (2018). Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3952-3979.
- Bradford, B. J., & Allen, M. S. (2004). Milk fat responses to a change in diet fermentability vary by production level in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 87(11), 3800-3807.

- Britt, J. S., Thomas, R. C., Speer, N. C., & Hall, M. B. (2003). Efficiency of converting nutrient dry matter to milk in Holstein herds. *Journal of Dairy Science*, 86(11), 3796-3801.
- Britt, J. H., Cushman, R. A., Dechow, C. D., Dobson, H., Humblot, P., Hutjens, M. F., ... & Stevenson, J. S. (2021). Perspective on high-performing dairy cows and herds. *Animal*, 15, 100298.
- Broderick, G. A. (2003). Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 86(4), 1370-1381.
- Buhiniček, I., Kaučić, D., Kozić, Z., Jukić, M., Gunjača, J., Šarčević, H., ... & Šimić, D. (2021). Trends in maize grain yields across five maturity groups in a long-term experiment with changing genotypes. *Agriculture*, 11(9), 887.
- Buxton, D. R., & O'Kiely, P. (Eds.). (2003). Preharvest plant factors affecting ensiling. *Silage science and technology*, 42, 199-250.
- Buza, M. H., Holden, L. A., White, R. A., & Ishler, V. A. (2014). Evaluating the effect of ration composition on income over feed cost and milk yield. *Journal of dairy science*, 97(5), 3073-3080.
- Cabrera, V. E., & Kalantari, A. S. (2016). Economics of production efficiency: Nutritional grouping of the lactating cow. *Journal of dairy science*, 99(1), 825-841.
- Cao, Z. J., Li, S. L., Xing, J. J., Ma, M., & Wang, L. L. (2008). Effects of maize grain and lucerne particle size on ruminal fermentation, digestibility and performance of cows in midlactation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92(2), 157-167.
- Capper, J. L., & Cady, R. A. (2020). The effects of improved performance in the US dairy cattle industry on environmental impacts between 2007 and 2017. *Journal of Animal Science*, 98(1), skz291.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology). (2003). *Mycotoxins: Risk in plant, animal and human systems*. Task Force Report No. 139. Ames, IA.
- Castillo, C., & Hernández, J. (2021). Ruminal fistulation and cannulation: a necessary procedure for the advancement of biotechnological research in ruminants. *Animals*, 11(7), 1870.

- Cavallarin, L., Tabacco, E., Antoniazzi, S., & Borreani, G. (2011). Aflatoxin accumulation in whole crop maize silage as a result of aerobic exposure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(13), 2419-2425.
- Cheli, F., Campagnoli, A., & Dell'Orto, V. (2013). Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 183(1-2), 1-16.
- Cole, N. A., Clark, R. N., Todd, R. W., Richardson, C. R., Gueye, A., Greene, L. W., & McBride, K. (2005). Influence of dietary crude protein concentration and source on potential ammonia emissions from beef cattle manure. *Journal of Animal Science*, 83(3), 722-731.
- Collard, B. L., Boettcher, P. J., Dekkers, J. M., Petitclerc, D., & Schaeffer, L. R. (2000). Relationships between energy balance and health traits of dairy cattle in early lactation. *Journal of dairy science*, 83(11), 2683-2690.
- Commissione Europea (2006). Consolidated Text: Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 364, 5–24. Available from: <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1881/2015-07-31>. (Accessed on 29 March 2023).
- Cone, J. W., & Engels, F. M. (1993). The influence of ageing on cell wall composition and degradability of three maize genotypes. *Animal Feed Science and Technology*, 40(4), 331-342.
- Cone, J. W., Van Gelder, A. H., Van Schooten, H. A., & Groten, J. A. M. (2008). Effects of forage maize type and maturity stage on in vitro rumen fermentation characteristics. *NJAS: Wageningen Journal of Life Sciences*, 55(2), 139-154.
- Conrad, H. R., Weiss, W. P., Odwongo, W. O., & Shockey, W. L. (1984). Estimating net energy lactation from components of cell solubles and cell walls. *Journal of Dairy Science*, 67(2), 427-436.
- Cooke, J., Z. Cheng, N. E. Bourne, and D. C. Wathes. (2013). Association between growth rates, age at first calving and subsequent fertility, milk production and survival in Holstein-Friesian heifers. *Open J. Anim. Sci.* 3:1–12.

- Cortese, M., Segato, S., Andrighetto, I., Ughelini, N., Chinello, M., Schiavon, E., & Marchesini, G. (2019). The effects of decreasing dietary crude protein on the growth performance, feed efficiency and meat quality of finishing charolais bulls. *Animals*, 9(11), 906.
- Costa, A., Agazzi, A., Perricone, V., Savoini, G., Lazzari, M., Nava, S., & Maria Tangorra, F. (2019). Influence of different loading levels, cutting and mixing times on total mixed ration (TMR) homogeneity in a vertical mixing wagon during distribution: a case study. *Italian Journal of Animal Science*, 18(1), 1093-1098.
- Crosson, P., Shalloo, L., O'brien, D., Lanigan, G. J., Foley, P. A., Boland, T. M., & Kenny, D. A. (2011). A review of whole farm systems models of greenhouse gas emissions from beef and dairy cattle production systems. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 29-45.
- Coulombe Jr, R. A. (1993). Biological action of mycotoxins. *Journal of dairy science*, 76(3), 880-891.
- Cozzi, G., Ravarotto, L., Gottardo, F., Stefani, A. L., Contiero, B., Moro, L., ... & Dalvit, P. (2011). Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. *Journal of dairy science*, 94(8), 3895-3901.
- Damiani L., Ferrari U., Tedeschini V. (2019). Produzioni vegetali. Conoscenze, tecnologie e tecniche. Volume A: Basi agronomiche per le produzioni vegetali erbacee. REDA Editore
- De Boever, J. L., De Brabander, D. L., De Smet, A. M., Vanacker, J. M., & Boucqué, C. V. (1993). Evaluation of physical structure. 2. Maize silage. *Journal of Dairy Science*, 76(6), 1624-1634.
- DECRETO LEGISLATIVO 4 marzo 2014, n. 26 Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.
- De Nardi, R., Marchesini, G., Stefani, A. L., Barberio, A., Andrighetto, I., & Segato, S. (2014). Effect of feeding fine maize particles on the reticular p H, milk yield and composition of dairy cows. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 98(3), 504-510.

- Der Bedrosian, M. C., Nestor Jr, K. E., & Kung Jr, L. (2012). The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. *Journal of dairy science*, 95(9), 5115-5126.
- DeVries, T. J., Beauchemin, K. A., & Von Keyserlingk, M. A. G. (2007). Dietary forage concentration affects the feed sorting behavior of lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 90(12), 5572-5579.
- Diaz, D. E., Hopkins, B. A., Leonard, L. M., Hagler Jr, W. M., & Whitlow, L. W. (2000). Effect of fumonisin on lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci*, 83(1.171).
- Directive 2010/63/EU of The European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.
- DLG, Grobfutterbewertung – Teil B – DLG-Schlüssel zur Beurteilung der Gärqualität von Grünfuttersilagen auf Basis der chemischen Untersuchung. DLG-Information 2. DLG, Frankfurt, (2006).
- Driehuis, F., Spanjer, M. C., Scholten, J. M., & Te Giffel, M. C. (2008). Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. *Food Additives and Contaminants*, 1(1), 41-50.
- Dou, Z., Kohn, R. A., Ferguson, J. D., Boston, R. C., & Newbold, J. D. (1996). Managing nitrogen on dairy farms: An integrated approach I. Model description. *Journal of Dairy Science*, 79(11), 2071-2080.
- Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T., & Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of dairy science*, 72(1), 68-78.
- Elferink, S. J. W. H. O., Driehuis, F., Gottschal, J. C., & Spoelstra, S. F. (2000). Silage fermentation processes and their manipulation. *FAO Plant Production and Protection Paper*, 161, 17–30. Available from: <http://www.fao.org/docrep/005/x8486e/x8486e09.htm> (Accessed on 16 March 2023).
- Erdman, R. A., Piperova, L. S., & Kohn, R. A. (2011). Corn silage versus corn silage: alfalfa hay mixtures for dairy cows: Effects of dietary potassium, calcium, and cation-anion difference. *Journal of dairy science*, 94(10), 5105-5110.

- Erdmann, S., Derno, M., Schäff, C. T., Börner, S., Kautzsch, U., Kuhla, B., ... & Röntgen, M. (2019). Comparative analyses of estimated and calorimetrically determined energy balance in high-yielding dairy cows. *Journal of dairy science*, 102(5), 4002-4013.
- Ettle, T., & Schwarz, F. J. (2003). Effect of maize variety harvested at different maturity stages on feeding value and performance of dairy cows. *Animal Research*, 52(4), 337-349.
- Evans, D. G. (1978). The interpretation and analysis of subjective body condition scores. *Animal Science*, 26(2), 119-125.
- FDA. (2011). *Mycotoxin Regulatory Guidance: A Guide for Grain Elevators, Feed Manufacturers, Grain Processors and Exporters*.
- Ferraretto, L. F., & Shaver, R. D. (2012). Meta-analysis: Effect of corn silage harvest practices on intake, digestion, and milk production by dairy cows. *The Professional Animal Scientist*, 28(2), 141-149.
- Ferraretto, L. F., Crump, P. M., & Shaver, R. D. (2015a). Effect of ensiling time and exogenous protease addition to whole-plant corn silage of various hybrids, maturities, and chop lengths on nitrogen fractions and ruminal in vitro starch digestibility. *Journal of dairy science*, 98(12), 8869-8881.
- Ferraretto, L. F., Fonseca, A. C., Sniffen, C. J., Formigoni, A., & Shaver, R. D. (2015b). Effect of corn silage hybrids differing in starch and neutral detergent fiber digestibility on lactation performance and total-tract nutrient digestibility by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(1), 395-405.
- Ferraretto, L. F., Shaver, R. D., Massie, S., Singo, R., Taysom, D. M., & Brouillette, J. P. (2015c). Effect of ensiling time and hybrid type on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch and neutral detergent fiber digestibility in whole-plant corn silage. *The Professional Animal Scientist*, 31(2), 146-152.
- Fink-Gremmels, J. (2008). Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives and Contaminants*, 25(2), 172-180.

- Fischer, A., Friggens, N. C., Berry, D. P., & Faverdin, P. (2018). Isolating the cow-specific part of residual energy intake in lactating dairy cows using random regressions. *Animal*, 12(7), 1396-1404.
- Forbes, J. M. (1996). Integration of regulatory signals controlling forage intake in ruminants. *Journal of Animal Science*, 74(12), 3029-3035
- Friedman, M. I. (1997). An energy sensor for control of energy intake. *Proceedings of the Nutrition Society*, 56(1A), 41-50.
- Gallo, A., Giuberti, G., Frisvad, J. C., Bertuzzi, T., & Nielsen, K. F. (2015). Review on mycotoxin issues in ruminants: Occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. *Toxins*, 7(8), 3057-3111.
- Gallo, A., Giuberti, G., Bruschi, S., Fortunati, P., & Masoero, F. (2016). Use of principal factor analysis to generate a corn silage fermentative quality index to rank well-or poorly preserved forages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(5), 1686-1696.
- Ganoe, K. H., & Roth, G. W. (1992). Kernel milk line as a harvest indicator for corn silage in Pennsylvania. *Journal of production agriculture*, 5(4), 519-523.
- Garnsworthy, P. C., & Unal, Y. (2004). Estimation of dry-matter intake and digestibility in group-fed dairy cows using near infrared reflectance spectroscopy. *Animal Science*, 79(2), 327-334.
- Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., ... & Tempio, G. (2013). Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Gerlach, K., Pfau, F., Pries, M., Hünting, K., Weiß, K., Richardt, W., & Südekum, K. H. (2018). Effects of length of ensiling and maturity group on chemical composition and in vitro ruminal degradability of whole-crop maize. *Grass and Forage Science*, 73(3), 599-609.

- Ghorbani, B., Ghoorchi, T., Amanlou, H., & Zerehdaran, S. (2010). Effects of using monensin and different levels of crude protein on milk production, blood metabolites and digestion of dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(1), 65-72.
- Grant, R. (2005, May). Optimizing starch concentrations in dairy rations. In Fort Wayne: WH Miner Agricultural Research Institute Tri-State Dairy Nutrition Conference, Grand Wayne Center (pp. 73-79).
- Grant, R. J., & Adesogan, A. T. (2018). Journal of dairy science silage special issue: Introduction. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3935-3936.
- Grant, R. J., & Ferraretto, L. F., 2018. Silage review: Silage feeding management: Silage characteristics and dairy cow feeding behavior. *Journal of Dairy Science*, 101:4111-4121.
- Gruninger, R. J., Ribeiro, G. O., Cameron, A., & McAllister, T. A. (2019). Invited review: Application of meta-omics to understand the dynamic nature of the rumen microbiome and how it responds to diet in ruminants. *Animal*, 13(9), 1843-1854.
- Guinn, J. M., Nolan, D. T., Krawczel, P. D., Petersson-Wolfe, C. S., Pighetti, G. M., Stone, A. E., ... & Costa, J. H. (2019). Comparing dairy farm milk yield and components, somatic cell score, and reproductive performance among United States regions using summer to winter ratios. *Journal of dairy science*, 102(12), 11777-11785.
- Haile-Mariam, M., & Pryce, J. E. (2017). Genetic parameters for lactose and its correlation with other milk production traits and fitness traits in pasture-based production systems. *Journal of dairy science*, 100(5), 3754-3766.
- Heinrichs, J., & Kononoff, P. (2013). The Penn state particle separator. Penn State Extension, University Park, PA. DSE, 186, 1-8.
- Hoffman, P. C., Esser, N. M., Shaver, R. D., Coblenz, W. K., Scott, M. P., Bodnar, A. L., ... & Charley, R. C. (2011). Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. *Journal of dairy science*, 94(5), 2465-2474.

- Hristov, A. N., Price, W. J., & Shafii, B. (2005). A meta-analysis on the relationship between intake of nutrients and body weight with milk volume and milk protein yield in dairy cows. *Journal of dairy science*, 88(8), 2860-2869.
- Huhtanen, P., Rinne, M., & Nousiainen, J. (2007). Evaluation of the factors affecting silage intake of dairy cows: a revision of the relative silage dry-matter intake index. *Animal*, 1(5), 758-770.
- Hurley, A. M., Lopez-Villalobos, N., McParland, S., Lewis, E., Kennedy, E., O'Donovan, M., ... & Berry, D. P. (2018). Characteristics of feed efficiency within and across lactation in dairy cows and the effect of genetic selection. *Journal of dairy science*, 101(2), 1267-1280.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer, & World Health Organization. (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene (Vol. 82). World Health Organization.
- Ingvartsen, K. L., & Moyes, K. (2013). Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal*, 7(s1), 112-122.
- Illius, A. W., & Jessop, N. S. (1996). Metabolic constraints on voluntary intake in ruminants. *Journal of animal Science*, 74(12), 3052-3062.
- Ishler V. A. (2023). Interpretation of Milk Urea Nitrogen (MUN) Values. Available from: <https://extension.psu.edu/interpretation-of-milk-urea-nitrogen-mun-values> (Accessed on 10 March 2023).
- Jenkins, T. C., & McGuire, M. A. (2006). Major advances in nutrition: impact on milk composition. *Journal of dairy science*, 89(4), 1302-1310.
- Jensen, C., Weisbjerg, M. R., Nørgaard, P., & Hvelplund, T. (2005). Effect of maize silage maturity on site of starch and NDF digestion in lactating dairy cows. *Animal feed science and technology*, 118(3-4), 279-294.

- Johnson, L., Harrison, J. H., Hunt, C., Shinnors, K., Doggett, C. G., & Sapienza, D. (1999). Nutritive value of corn silage as affected by maturity and mechanical processing: A contemporary review. *Journal of dairy science*, 82(12), 2813-2825.
- Johnson, L. M., Harrison, J. H., Davidson, D., Robutti, J. L., Swift, M., Mahanna, W. C., & Shinnors, K. (2002). Corn silage management I: Effects of hybrid, maturity, and mechanical processing on chemical and physical characteristics. *Journal of dairy science*, 85(4), 833-853.
- Jones CM, Heinrichs J, Ishler VA. Body Condition Scoring as a Tool for Dairy Herd Management. Penn State Extension. 2017. Available from: <https://extension.psu.edu/body-condition-scoring-as-a-tool-for-dairy-herd-management> (Accessed on 4 March 2023).
- Jordan, E. R. (2001). Managing mixing wagons for performance and health. In *Proc. Mid-South Nutrition Conf* (pp. 47-56).
- Jouany, J. P. (2007). Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal feed science and technology*, 137(3-4), 342-362.
- Jouany, J. P., Yiannikouris, A., & Bertin, G. (2009). Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products. *Options méditerranéennes, A*, 85, 205-224.
- Kalscheur, K. F., Vandersall, J. H., Erdman, R. A., Kohn, R. A., & Russek-Cohen, E. (1999). Effects of dietary crude protein concentration and degradability on milk production responses of early, mid, and late lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82(3), 545-554.
- Kendall, C., Leonardi, C., Hoffman, P. C., & Combs, D. K. (2009). Intake and milk production of cows fed diets that differed in dietary neutral detergent fiber and neutral detergent fiber digestibility. *Journal of dairy science*, 92(1), 313-323.
- Khan, N. A., Tewoldebrhan, T. A., Zom, R. L. G., Cone, J. W., & Hendriks, W. H. (2012). Effect of corn silage harvest maturity and concentrate type on milk fatty acid composition of dairy cows. *Journal of dairy science*, 95(3), 1472-1483.

- Khan, N. A., Yu, P., Ali, M., Cone, J. W., & Hendriks, W. H. (2015). Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(2), 238-252.
- Koch, R. M., Swiger, L. A., Chambers, D., & Gregory, K. E. (1963). Efficiency of feed use in beef cattle. *Journal of animal science*, 22(2), 486-494.
- Kolosova, A., & Stroka, J. (2012). Evaluation of the effect of mycotoxin binders in animal feed on the analytical performance of standardised methods for the determination of mycotoxins in feed. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(12), 1959-1971.
- Kononoff, P. J., Heinrichs, A. J., & Buckmaster, D. R. (2003). Modification of the Penn State forage and total mixed ration particle separator and the effects of moisture content on its measurements. *Journal of dairy science*, 86(5), 1858-1863.
- Krämer-Schmid, M., Lund, P., & Weisbjerg, M. R. (2016). Importance of NDF digestibility of whole crop maize silage for dry matter intake and milk production in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 219, 68-76.
- Kuehnl, J. M., Connelly, M. K., Dzidic, A., Lauber, M., Fricke, H. P., Klister, M., ... & Hernandez, L. L. (2019). The effects of incomplete milking and increased milking frequency on milk production rate and milk composition. *Journal of Animal Science*, 97(6), 2424-2432.
- Kung, L., Jr., and R. D. Shaver. 2001. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. *Focus on Forage Vol. 3, No. 13*. University of Wisconsin Extension, Madison.
- Kung, L., Jr., M. R. Stokes, and C. J. Lin. 2003. Silage additives. Pages 305–360 in *Silage Science and Technology (Agronomy Series No. 42)*. Buxton D. R., R. E. Muck, and H. J. Harrison, ed. American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Kung, L., Shaver, R.D., Grant, R.J., Schmidt, R.J., 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101:4020–4033.

- Lammers, B. P., Buckmaster, D. R., & Heinrichs, A. J. (1996). A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. *Journal of dairy science*, 79(5), 922-928.
- Leggieri, M.C., Bertuzzi, T., Pietri, A., & Battilani, P. (2015). Mycotoxin occurrence in maize produced in Northern Italy over the years 2009-2011: focus on the role of crop related factors. *Phytopathologia Mediterranea*, 212-221.
- Leggieri, M. C., Lanubile, A., Dall'Asta, C., Pietri, A., & Battilani, P. (2020). The impact of seasonal weather variation on mycotoxins: Maize crop in 2014 in northern Italy as a case study. *World Mycotoxin Journal*, 13(1), 25-36.
- Leite, M., Freitas, A., Silva, A. S., Barbosa, J., & Ramos, F. (2021). Maize food chain and mycotoxins: A review on occurrence studies. *Trends in Food Science & Technology*, 115, 307-331.
- Leonardi, C., Stevenson, M., & Armentano, L. E. (2003). Effect of two levels of crude protein and methionine supplementation on performance of dairy cows. *Journal of dairy science*, 86(12), 4033-4042.
- Liang, D., & Cabrera, V. E. (2015). Optimizing productivity, herd structure, environmental performance, and profitability of dairy cattle herds. *Journal of Dairy Science*, 98(4), 2812-2823.
- Lobell, D. B., Hammer, G. L., McLean, G., Messina, C., Roberts, M. J., & Schlenker, W. (2013). The critical role of extreme heat for maize production in the United States. *Nature climate change*, 3(5), 497-501.
- Loi, M., Fanelli, F., Liuzzi, V. C., Logrieco, A. F., & Mulè, G. (2017). Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: Present and future perspectives. *Toxins*, 9(4), 111.
- Lopes, F., Cook, D. E., & Combs, D. K. (2015a). Effects of varying dietary ratios of corn silage to alfalfa silage on digestion of neutral detergent fiber in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 98(9), 6291-6303.

- Lopes, F., Ruh, K., & Combs, D. K. (2015b). Validation of an approach to predict total-tract fiber digestibility using a standardized in vitro technique for different diets fed to high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(4), 2596-2602.
- Mackle, T. R., Dwyer, D. A., Ingvarsten, K. L., Chouinard, P. Y., Lynch, J. M., Barbano, D. M., & Bauman, D. E. (1999). Effects of insulin and amino acids on milk protein concentration and yield from dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82(7), 1512-1524.
- MacRae, J. C. (1974). The use of intestinal markers to measure digestive function in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, 33(2), 147-154.
- Mahanna, B., & Chase, L. E. (2003). Practical applications and solutions to silage problems. *Silage science and technology*, 42, 855-895.
- Maki, C. R., Thomas, A. D., Elmore, S. E., Romoser, A. A., Harvey, R. B., Ramirez-Ramirez, H. A., & Phillips, T. D. (2016). Effects of calcium montmorillonite clay and aflatoxin exposure on dry matter intake, milk production, and milk composition. *Journal of dairy science*, 99(2), 1039-1046.
- Mansbridge, R. J., & Blake, J. S. (1997). Nutritional factors affecting the fatty acid composition of bovine milk. *British Journal of Nutrition*, 78(1), S37-S47.
- Marchesini, G., Segato, S., Berzaghi, P., & Andrighetto, I. (2011). Effect of non-forage roughage replacement on feeding behaviour and milk production in dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*, 10(4), e44.
- Marchesini, G., Serva, L., Garbin, E., Mirisola, M., & Andrighetto, I. (2017). Near-infrared calibration transfer for undried whole maize plant between laboratory and on-site spectrometers. *Italian Journal of Animal Science*, 17(1), 66-72.
- Marchesini, G., Serva, L., Chinello, M., Gazziero, M., Tenti, S., Mirisola, M., ... & Andrighetto, I. (2019). Effect of maturity stage at harvest on the ensilability of maize hybrids in the early and late FAO classes, grown in areas differing in yield potential. *Grass and Forage Science*, 74(3), 415-426.
- Marchesini, G., Cortese, M., Ughelini, N., Ricci, R., Chinello, M., Contiero, B., & Andrighetto, I. (2020). Effect of total mixed ration processing time on ration consistency and beef

- cattle performance during the early fattening period. *Animal Feed Science and Technology*, 262, 114421.
- Mathur, S., Constable, P. D., Eppley, R. M., Waggoner, A. L., Tumbleson, M. E., & Haschek, W. M. (2001). Fumonisin B1 is hepatotoxic and nephrotoxic in milk-fed calves. *Toxicological Sciences*, 60(2), 385-396.
- MAZUMDER, M. A. R., & KUMAGAI, H. (2006). Analyses of factors affecting dry matter intake of lactating dairy cows. *Animal science journal*, 77(1), 53-62.
- Mbyana, I.N., M.H. Anil, and J.M. Forbes. (1993). The voluntary intake of hay and silage by lactating cows in response to ruminal infusion of acetate or propionate, or both, with or without distension of the rumen by a balloon. *Br. J. Nutr.* 69:713-720.
- McAllister, T. A., Cheng, K. J., Rode, L. M., & Forsberg, C. W. (1990). Digestion of barley, maize, and wheat by selected species of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(10), 3146-3153.
- McAllister, T. A., Bae, H. D., Jones, G. A., & Cheng, K. J. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of animal science*, 72(11), 3004-3018.
- McAllister, T. A., & Hristov, A. N. (2000). The fundamentals of making good quality silage. *Adv. Dairy Technol*, 12, 381-399.
- McBeth, L. R., St-Pierre, N. R., Shoemaker, D. E., & Weiss, W. P. (2013). Effects of transient changes in silage dry matter concentration on lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 96(6), 3924-3935.
- McDonald, P., A.R. Henderson, and S.E. Heron. 1991. *The biochemistry of silage*. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., & Wilkinson, R. G. (2011). *Animal nutrition*. ed. Essex: Pearson Education Limited.
- Miller-Cushon, E. K., & DeVries, T. J. (2017). Feed sorting in dairy cattle: Causes, consequences, and management. *Journal of dairy science*, 100(5), 4172-4183.

- Millner, J. P., Aver, R. V., & Hardacre, A. K. (2005). The yield and nutritive value of maize hybrids grown for silage. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 48(1), 101-108.
- Mills, J. A., & Kung Jr, L. (2002). The effect of delayed ensiling and application of a propionic acid-based additive on the fermentation of barley silage. *Journal of Dairy Science*, 85(8), 1969-1975.
- Mertens, D. R. (1997). Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *Journal of dairy science*, 80(7), 1463-1481.
- Moraes, L. E., Kebreab, E., Strathe, A. B., Dijkstra, J., France, J., Casper, D. P., & Fadel, J. G. (2015). Multivariate and univariate analysis of energy balance data from lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 4012-4029.
- Muck, R.E., (1988). Factors influencing silage quality and their implications for management. *J. Dairy Sci.* 71, 2992–3002.
- Muck, R. E. (2010). Silage microbiology and its control through additives. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 183-191.
- Munkvold, G. P. (2003). Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual review of phytopathology*, 41(1), 99-116.
- Naranjo, A., Johnson, A., Rossow, H., & Kebreab, E. (2020). Greenhouse gas, water, and land footprint per unit of production of the California dairy industry over 50 years. *Journal of dairy science*, 103(4), 3760-3773.
- NASEM (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine). (2021). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 8th rev. ed. The National Academies Press.
- National Research Council. (2000). *Nutrient requirements of dairy cattle: 2001*.
- Nicoll, G. B. (1981). Sources of variation in the condition scoring of cows. *Irish journal of agricultural research*, 27-33.
- Nishino, N., Wada, H., Yoshida, M., Shiota, H., (2004). Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with

and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *J. Dairy Sci.* 87:2563-2570.

- Oba, M., & Allen, M. S. (1999). Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. *Journal of dairy science*, 82(3), 589-596.
- Oba, M., & Allen, M. S. (2000). Effects of brown midrib 3 mutation in corn silage on productivity of dairy cows fed two concentrations of dietary neutral detergent fiber: 3. Digestibility and microbial efficiency. *Journal of Dairy Science*, 83(6), 1350-1358.
- Oba, M., & Allen, M. S. (2003). Effects of diet fermentability on efficiency of microbial nitrogen production in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 86(1), 195-207.
- Oba, M., & Kammer-Main, K. (2022). Symposium review: Effects of carbohydrate digestion on feed intake and fuel supply. *Journal of Dairy Science*.
- Ogunade, I. M., Martinez-Tupia, C., Queiroz, O. C. M., Jiang, Y., Drouin, P., Wu, F., ... & Adesogan, A. T. (2018). Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *Journal of dairy science*, 101(5), 4034-4059.
- Oliveira, A. S., Weinberg, Z. G., Ogunade, I. M., Cervantes, A. A., Arriola, K. G., Jiang, Y., ... & Adesogan, A. T. (2017). Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 4587-4603.
- Opsi, F., Fortina, R., Borreani, G., Tabacco, E., & López, S. (2013). Influence of cultivar, sowing date and maturity at harvest on yield, digestibility, rumen fermentation kinetics and estimated feeding value of maize silage. *The Journal of Agricultural Science*, 151(5), 740-753.
- Owens, F., Zinn, R. A., & Kim, Y. K. (1986). Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. *Journal of animal science*, 63(5), 1634-1648.
- Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Elferink, S. J. O., & Spoelstra, S. F. (2003). Microbiology of ensiling. *Silage science and technology*, 42, 31-93.

- Papst, C., Utz, H. F., Melchinger, A. E., Eder, J., Magg, T., Klein, D., & Bohn, M. (2005). Mycotoxins produced by *Fusarium* spp. in isogenic Bt vs. non-Bt maize hybrids under European corn borer pressure. *Agronomy Journal*, 97(1), 219-224.
- Paul, J. W., Dinn, N. E., Kannangara, T., & Fisher, L. J. (1998). Protein content in dairy cattle diets affects ammonia losses and fertilizer nitrogen value (Vol. 27, No. 3, pp. 528-534). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America.
- Peraica, M., Radić, B., Lucić, A., & Pavlović, M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the world health organization*, 77(9), 754.
- Peyrat, J., Baumont, R., Le Morvan, A., & Noziere, P. (2016). Effect of maturity and hybrid on ruminal and intestinal digestion of corn silage in dry cows. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 258-268.
- Phipps, R. H., Sutton, J. D., Beever, D. E., & Jones, A. K. (2000). The effect of crop maturity on the nutritional value of maize silage for lactating dairy cows. 3. Food intake and milk production. *Animal Science*, 71(2), 401-409.
- Piccioli-Cappelli, F., Seal, C. J., Parker, D. S., Loor, J. J., Minuti, A., Lopreiato, V., & Trevisi, E. (2022). Effect of stage of lactation and dietary starch content on endocrine-metabolic status, blood amino acid concentrations, milk yield, and composition in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 105(2), 1131-1149.
- Pietri, A., Battilani, P., Gualla, A., & Bertuzzi, T. (2012). Mycotoxin levels in maize produced in northern Italy in 2008 as influenced by growing location and FAO class of hybrid. *World Mycotoxin Journal*, 5(4), 409-418.
- Plaizier, J. C., Krause, D. O., Gozho, G. N., & McBride, B. W. (2008). Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *The Veterinary Journal*, 176(1), 21-31.
- Potts, S. B., Boerman, J. P., Lock, A. L., Allen, M. S., & VandeHaar, M. J. (2017a). Relationship between residual feed intake and digestibility for lactating Holstein cows fed high and low starch diets. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 265-278.

- Potts, S. B., Shaughnessy, M., & Erdman, R. A. (2017b). The decline in digestive efficiency of US dairy cows from 1970 to 2014. *Journal of Dairy Science*, 100(7), 5400-5410.
- Puppel, K., & Kuczyńska, B. (2016). Metabolic profiles of cow's blood; a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4321-4328.
- Rafiee-Yarandi, H., Alikhani, M., Ghorbani, G. R., Heydari, M., & Rezamand, P. (2019). Dietary protein level and corn processing method: Lactation performance, milk fatty acid composition, rumen and blood parameters of lactation dairy cows. *Livestock Science*, 221, 95-104.
- REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) N. 1060/2013 DELLA COMMISSIONE del 29 ottobre 2013 relativo all'autorizzazione della bentonite quale additivo per mangimi destinati a tutte le specie animali.
- Roche, J. R., Friggens, N. C., Kay, J. K., Fisher, M. W., Stafford, K. J., & Berry, D. P. (2009). Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of dairy science*, 92(12), 5769-5801.
- Rooke, J. A., & Hatfield, R. D. (2003). Biochemistry of ensiling. *Silage science and technology*, 42, 95-139.
- Rotz, C. A., Montes, F., & Chianese, D. S. (2010). The carbon footprint of dairy production systems through partial life cycle assessment. *Journal of dairy science*, 93(3), 1266-1282.
- Roy, D., Ye, A., Moughan, P. J., & Singh, H. (2020). Composition, structure, and digestive dynamics of milk from different species—A review. *Frontiers in Nutrition*, 7, 577759.
- Schäfers, S., Bulang, M., Meyer, U., Lindwedel, A., Hüther, L., & Dänicke, S. (2018). Suitability of n-alkanes and chromium (III) oxide as digestibility markers in calves at the end of the milk feeding period supplemented with a prebiotic. *Animal Nutrition*, 4(1), 84-89.
- Schingoethe, D. J. (2017). A 100-Year Review: Total mixed ration feeding of dairy cows. *Journal of dairy science*, 100(12), 10143-10150.

- Schlenker, W., & Roberts, M. J. (2009). Nonlinear temperature effects indicate severe damages to US crop yields under climate change. *Proceedings of the National Academy of sciences*, 106(37), 15594-15598.
- Scott, P. M., Delgado, T., Prelusky, D. B., Trenholm, H. L., & Miller, J. D. (1994). Determination of fumonisins in milk. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 29(5), 989-998.
- Seal, C. J., Parker, D. S., & Avery, P. J. (1992). The effect of forage and forage–concentrate diets on rumen fermentation and metabolism of nutrients by the mesenteric-and portal-drained viscera in growing steers. *British Journal of Nutrition*, 67(3), 355-370.
- Segato, S., Marchesini, G., Serva, L., Contiero, B., Magrin, L., & Andrighetto, I. (2022). Assessment of Fermentative Quality of Ensiled High-Moisture Maize Grains by a Multivariate Modelling Approach. *Agronomy*, 12(2), 429.
- Seglar, B. (2001). Mycotoxin effects on dairy cattle. Available from: <https://fyi.extension.wisc.edu/forage/files/2017/04/Mycotoxin-Effects-on-Dairy-Cattle.pdf> (Accessed on: 29 March 2023).
- Serva, L., Magrin, L., Marchesini, G., & Andrighetto, I. (2021). Assessment of the Effectiveness of a Portable NIRS Instrument in Controlling the Mixer Wagon Tuning and Ration Management. *Animals*, 11(12), 3566.
- Simpson, D. J. (2001). Proteolytic degradation of cereal prolamins—the problem with proline. *Plant Science*, 161(5), 825-838.
- Sjaastad, O.V., Sand, O., Hove, K., (2010). *Fisiologia degli animali domestici*, 2013th ed.
- Sneddon, N. W., Lopez-Villalobos, N., Hickson, R. E., & Shalloo, L. (2012). Genetic parameters for lactose and its relationship with concentrations and ratios of other milk components. In *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* (Vol. 72, No. 5). New Zealand Society of Animal Production.
- Souissi, W., & Bouraoui, R. (2019). Relationship between body condition score, milk yield, reproduction, and biochemical parameters in dairy cows. *Lactation in Farm Animals- Biology, Physiological Basis, Nutritional Requirements, and Modelization*.

- Sova, A. D., LeBlanc, S. J., McBride, B. W., & DeVries, T. J. (2013). Associations between herd-level feeding management practices, feed sorting, and milk production in freestall dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4759-4770.
- Sova, A. D., LeBlanc, S. J., McBride, B. W., & DeVries, T. J. (2014). Accuracy and precision of total mixed rations fed on commercial dairy farms. *Journal of dairy science*, 97(1), 562-571.
- Stagnati, L., Martino, M., Battilani, P., Busconi, M., Lanubile, A., & Marocco, A. (2020). Development of early maturity maize hybrids for resistance to *Fusarium* and *Aspergillus* ear rots and their associated mycotoxins. *World Mycotoxin Journal*, 13(4), 459-471.
- Stallings, C. C., & McGilliard, M. L. (1984). Lead factors for total mixed ration formulation. *Journal of Dairy Science*, 67(4), 902-907.
- Sulzberger, S. A., Melnichenko, S., & Cardoso, F. C. (2017). Effects of clay after an aflatoxin challenge on aflatoxin clearance, milk production, and metabolism of Holstein cows. *Journal of dairy science*, 100(3), 1856-1869.
- Sutton, J. D. (1989). Altering milk composition by feeding. *Journal of dairy science*, 72(10), 2801-2814.
- Teller, R. S., Schmidt, R. J., Whitlow, L. W., & Kung Jr, L. (2012). Effect of physical damage to ears of corn before harvest and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation, and aerobic stability of corn silage. *Journal of dairy science*, 95(3), 1428-1436.
- Titgemeyer, E. C. (1997). Design and interpretation of nutrient digestion studies. *Journal of Animal Science*, 75(8), 2235-2247.
- Titgemeyer, E. C., Armendariz, C. K., Bindel, D. J., Greenwood, R. H., & Löest, C. A. (2001). Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *Journal of Animal Science*, 79(4), 1059-1063.
- Troyer, F. (2000). Temperate corn—background, behavior, and breeding. In *Specialty corns* (pp. 405-478). CRC press.

- Tyasi, T. L., Gxasheka, M., & Tlabela, C. P. (2015). Assessing the effect of nutrition on milk composition of dairy cows: A review. *Int. J. Curr. Sci*, 17, 56-63.
- Tyrrell, H. F., & Moe, P. W. (1975). Effect of intake on digestive efficiency. *Journal of Dairy Science*, 58(8), 1151-1163.
- Undi, M., Wilson, C., Ominski, K. H., & Wittenberg, K. M. (2008). Comparison of techniques for estimation of forage dry matter intake by grazing beef cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, 88(4), 693-701.
- Vanbelle, M. (1985). *L'ensilage, aspects biologiques nouveaux*. Laboratoire de Biochimie de la Nutrition, Faculté des Sciences Agronomiques, Université Catholique de Louvain.
- VandeHaar, M. J., & St-Pierre, N. (2006). Major advances in nutrition: Relevance to the sustainability of the dairy industry. *Journal of dairy science*, 89(4), 1280-1291.
- van der Linden, A., Oosting, S. J., van de Ven, G. W., Zom, R., van Ittersum, M. K., Gerber, P. J., & de Boer, I. J. (2021). Yield gap analysis in dairy production systems using the mechanistic model LiGAPS-Dairy. *Journal of Dairy Science*, 104(5), 5689-5704.
- Vanholder, T., Papen, J., Benders, R., Vertenten, G., & Berge, A. C. B. (2015). Risk factors for subclinical and clinical ketosis and association with production parameters in dairy cows in the Netherlands. *Journal of dairy science*, 98(2), 880-888.
- Van Middelaar, C. E., Dijkstra, J., Berentsen, P. B. M., & De Boer, I. J. M. (2014). Cost-effectiveness of feeding strategies to reduce greenhouse gas emissions from dairy farming. *Journal of Dairy Science*, 97(4), 2427-2439.
- Van Soest, P. J. 1965. Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminants: Voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. *J. Anim. Sci.* 24:834–843.
- Verzichi S., Trabalza Marinucci M. L'impiego degli indicatori, con particolare riferimento agli n-alceni, per lo studio della dieta negli erbivori domestici e selvatici. Available from: https://www.spvet.it/arretrati/numero_15/indicatori.html (Accessed on 18 March 2023).

- Voelker, J. A., Burato, G. M., & Allen, M. S. (2002). Effects of pretrial milk yield on responses of feed intake, digestion, and production to dietary forage concentration. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2650-2661.
- Waldo, D. R. (1986). Effect of forage quality on intake and forage-concentrate interactions. *Journal of Dairy Science*, 69(2), 617-631.
- Weiss, W. P. (2021). Brief introduction to the NASEM (formerly known as NRC) of the nutrient requirements of dairy cattle.
- Whitlow, L. W., & Hagler, W. M. (2005, February). Mycotoxins in dairy cattle: Occurrence, toxicity, prevention and treatment. In *Proc. Southwest Nutr. Conf* (pp. 124-138).
- Wiersma, D. W., Carter, P. R., Albrecht, K. A., & Coors, J. G. (1993). Kernel milkline stage and corn forage yield, quality, and dry matter content. *Journal of production agriculture*, 6(1), 94-99.
- Wilkinson, J. M., Bolsen, K. K., & Lin, C. J. (2003). History of silage. *Silage science and technology*, 42, 1-30.
- Wilkinson, J. M., & Davies, D. R. (2013). The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. *Grass and forage Science*, 68(1), 1-19.
- Woolford, M. K. (1984). *The silage fermentation*. Marcel Dekker, Inc.
- Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V., & Kuca, K. (2009). Biological degradation of aflatoxins. *Drug metabolism reviews*, 41(1), 1-7.
- Wu, F., Groopman, J. D., & Pestka, J. J. (2014). Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annual review of food science and technology*, 5, 351-372.
- Wu, Y., Liang, D., Shaver, R. D., & Cabrera, V. E. (2019). An income over feed cost nutritional grouping strategy. *Journal of dairy science*, 102(5), 4682-4693.
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi chemical society*, 15(2), 129-144.