



# UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di scienze medico-veterinarie

Corso di laurea magistrale in Produzioni Animali Innovative e Sostenibili

**QUALITÀ DELLE FERMENTAZIONI RUMINALI E DIGERIBILITÀ**

**DELLA RAZIONE: UNO STUDIO DI CAMPO**

STUDY ON THE QUALITY OF RUMINAL FERMENTATIONS

AND RATION DIGESTIBILITY: A FIELD TRIAL

RELATORE:

Chiar.mo Prof. Righi Federico

CORRELATORE:

Dott.ssa Simoni Marica

LAUREANDA:

Citro Rachele

ANNO ACCADEMICO 2022/2023



## INDICE

ABSTRACT.....	6
---------------	---

### *Parte generale*

CAPITOLO 1: LE PROTEINE.....	8
1.1 La classificazione.....	8
1.2 Parametri di qualità proteica.....	9
1.3 La proteina metabolizzabile.....	10

CAPITOLO 2: FISILOGIA RUMINALE E LA PROTEINA MICROBICA.....	12
---	----

2.1 Il ruminante: concetti introduttivi.....	12
2.2 La sintesi proteica ruminale.....	13
2.3 La microflora ruminale.....	14
2.3.1 I batteri.....	14
2.3.2 I protozoi.....	16
2.3.3 I funghi.....	17
2.4 Fattori che influenzano la microflora ruminale.....	17

CAPITOLO 3: METODI DI STIMA DELLA BIOMASSA MICROBICA RUMINALE.....	23
--	----

3.1 Metodo di estrazione tramite il liquido ruminale.....	24
3.2 Metodo di estimazione tramite le urine.....	25
3.3 Metodo di estimazione tramite il latte.....	25
3.4 Metodo di estrazione tramite la saliva.....	26

CAPITOLO 4: IL PROGRESSO TECNOLOGICO E PLF.....	27
---	----

4.1 I PLF (Precision Livestock Farming) nella zootecnia di precisione.....	27
4.2 L'alimentazione di precisione.....	28

### *Contributo sperimentale*

1. Introduzione.....	31
1.1 Parametro 1: la biomassa microbica.....	31

1.2 Parametro 2: l'attività enzimatica.....	31
1.3 Parametro 3: i protozoi ciliati.....	32
2. Materiali e metodi.....	33
2.1 Campionamento.....	33
2.2 Reagenti e strumentazione.....	34
2.3 Analisi sulla biomassa microbica ruminale.....	34
2.4 Elaborazione statistica.....	35
4. Risultati e Discussione.....	36
5. Conclusioni.....	44
 BIBLIOGRAFIA.....	 46



## ABSTRACT

L'ambiente ruminale è caratterizzato da un ecosistema molto complesso dove le fermentazioni possono essere controllate con l'obiettivo di migliorare la salute e il benessere dell'animale, l'efficienza dei processi di sintesi e degradazione e la qualità dei prodotti. Un parametro che ci permette di valutare l'efficienza del ruminale è la biomassa microbica prodotta in seguito alla proliferazione dei microrganismi ruminali. Il suo valore nutrizionale risulta molto elevato, in quanto fornisce alla bovina tra il 50 e l'80% degli amminoacidi essenziali, necessari per migliorare l'efficienza di utilizzazione dell'azoto e allo stesso tempo tenere sotto controllo i costi della razione. L'analisi di questo parametro risulta utile per capire come soddisfare le esigenze nutritive, sulla base della qualità e quantità della proteina microbica prodotta.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la relazione tra la produzione di proteina microbica ruminale e la produttività delle bovine da latte. A tale scopo è stato estratto il pellet microbico di 47 campioni di liquido ruminale provenienti da bovine in lattazione e la relativa quantità è stata studiata in funzione della produzione quantitativa e qualitativa del latte delle stesse bovine. Lo studio è stato condotto in collaborazione con il medico veterinario aziendale su una mandria caratterizzata da periodiche anomalie qualitative del latte. In generale, è stato constatato come la biomassa microbica prodotta influenzi positivamente la produzione quantitativa di latte, la percentuale di lattosio e la produzione espressa come Energy Corrected Milk (ECM). Inoltre, la quantità di biomassa microbica è risultata correlata con il contenuto di protozoi Olotrici e di protozoi appartenenti al genere *Entodinium*.

La misura della sintesi microbica ruminale risulta quindi indicativa della produttività delle bovine e della funzionalità dei prestomaci.

The ruminal environment is characterized by a highly complex ecosystem where fermentations can be controlled with the aim of: improving the health and welfare of the animal, the efficiency of synthesis and degradation processes, and the quality of products. A parameter that allows us to evaluate rumen efficiency is the microbial biomass produced as a result of the proliferation of ruminal microorganisms. Its nutritional value is very high, as it provides between 50 and 80% of the essential amino acids to cattle, necessary to improve nitrogen utilization efficiency and at the same time control feed costs. The analysis of this parameter is useful for understanding how to meet nutritional needs, based on the quality and quantity of microbial protein produced. The

purpose of this study was to evaluate the relationship between ruminal microbial protein production and dairy cattle productivity. For this purpose, the microbial pellet was extracted from 47 samples of ruminal fluid from lactating cattle, and its quantity was studied in relation to the quantitative and qualitative milk production of the same cattle. The study was conducted in collaboration with the company veterinarian on a herd characterized by periodic milk quality anomalies. In general, it was found that the microbial biomass produced positively influences quantitative milk production, lactose percentage, and production expressed as Energy Corrected Milk (ECM). Furthermore, the quantity of microbial biomass was found to be correlated with the content of Olotrichi protozoa and protozoa belonging to the *Entodinium* genus.

The measurement of ruminal microbial synthesis is therefore indicative of cattle productivity and the functionality of the fore-stomachs.

## PARTE GENERALE

### **1. LE PROTEINE**

Le proteine sono macromolecole fondamentali sia per l'uomo che per gli animali.

L'unità fondamentale delle proteine è rappresentata dagli amminoacidi (AA), molecole caratterizzate dall'aver almeno un gruppo amminico (-NH<sub>2</sub>) e uno carbossilico (-COOH) che risultano essere comuni tra i diversi amminoacidi; ciò che differenzia i diversi amminoacidi, e di conseguenza le proteine, è il gruppo laterale R che risulta essere estremamente variabile e permette, a seconda della sequenza amminoacidica, di far sì che le proteine svolgano diverse funzioni. Tra gli amminoacidi possiamo distinguere quelli essenziali e quelli non.

Gli amminoacidi essenziali sono dieci e devono essere introdotti con la dieta, perché l'organismo non è in grado di sintetizzarli.

Questi cambiano in base all'età e alla specie, ad esempio la lisina risulta essere importante per il suino giovane, mentre la taurina rilevante per il gatto. Le proteine si presentano nella loro forma nativa, ossia la forma che assume naturalmente quando si ripiega ed è forma biologicamente più attiva. Le proteine possono assumere diversi livelli di struttura:

- Struttura primaria: semplice catena di amminoacidi (polipeptide);
- Struttura secondaria: torsione della struttura primaria ad alfa-elica o beta-foglietto; si instaurano legami ad idrogeno tra il gruppo amminico di un amminoacido e il gruppo carbossilico di un altro amminoacido;
- Struttura terziaria: struttura tridimensionale, risulta essere l'arrangiamento nello spazio della struttura secondaria; anche in questo caso vi sono legami a idrogeno e ponti di zolfo tra due amminoacidi solfatati;
- Struttura quaternaria: data dall'unione di più strutture terziarie; tipica di proteine complesse.

#### *1.1 La classificazione*

Oltre alle funzioni, le possiamo classificare in base alla solubilità che presentano e quindi, la suscettibilità alle proteasi microbiche:



- Proteine fibrose: insolubili, come ad esempio le prolamine e glutenine;
- Proteine globulari: presentano una solubilità variabile, come ad esempio le globuline (Romagnolo et al., 1994).

In base Composizione chimica, si distinguono in:

- Proteine semplici: dalla loro idrolisi si ottengono solo amminoacidi;
- Proteine coniugate: contengono catene polipeptidiche e gruppi non proteici.

Fondamentale, risulta essere la qualità proteica che consiste nella capacità che ha una proteina di soddisfare le esigenze fisiologiche dell'organismo e da cui dipende il valore nutrizionale della proteina stessa. La qualità proteica dipende da due componenti:

- Intrinseca: legata al contenuto degli AA essenziali nella proteina. L'organismo per sintetizzare le proteine ha bisogno di tutti i 20 aa; se un aa è carente diventa amminoacido limitante, perché anche gli altri non vengono utilizzati, ma degradati;
- Estrinseca: legata alle interazioni della proteina con l'organismo quindi alla sua digeribilità e alla biodisponibilità degli AA.

### *1.2 Parametri di qualità proteica*

I parametri utilizzati per determinare la qualità proteica sono i seguenti:

Digeribilità (D): % di azoto degli alimenti (ingerito) che viene assorbito;

Valore biologico (BV): % di azoto assorbito che viene utilizzato (trattenuto). Tale valore è legato alla quantità di AA che una proteina fornisce. Un alto valore biologico è dato da una proteina che fornisce tutti gli AA essenziali:

$$BV = \frac{N \text{ ingerito} - (N \text{ feci} + N \text{ urine})}{N \text{ ingerito} - N \text{ feci}}$$

Utilizzazione proteica netta (NPU): % di azoto ingerito che viene utilizzato (trattenuto):

$$NPU = BV * D$$

IPC, indice proteico chimico o punteggio chimico: rapporto tra la % di aa limitante nella proteina e la % della stessa AA nella proteina di riferimento (non fornisce alcuna indicazione su come la proteina viene utilizzata).

Sempre tenendo conto della qualità proteica, alcune proteine vengono definite come “proteine nobili” in quanto la loro costituzione si avvicina a quella del tessuto e quindi gli AA riescono a soddisfare i fabbisogni del tessuto. La proteina microbica risulta essere una proteina nobile, in quanto riesce a soddisfare i fabbisogni del tessuto, motivo per cui i ruminanti sono in grado di compensare ai deficit amminoacidici della dieta, grazie alla popolazione microbica.

### *1.3 La proteina metabolizzabile*

È noto che per i ruminanti, in questo caso per le vacche, la componente proteica risulti fondamentale sia per la sintesi del tessuto corporeo sia per altre funzioni dell'organismo, in quanto le proteine essendo diverse svolgono differenti attività quali secretorie, regolatrici e protettive. Nonostante ciò, la composizione in amminoacidi di una proteina sintetizzata non viene condizionata dal profilo amminoacidico degli amminoacidi assimilati.

Gli amminoacidi risultano essenziali per i ruminanti, perché giocano un ruolo chiave nella sintesi di altre proteine in quanto precursori di altri metaboliti, inoltre, sono fondamentali per il mantenimento, la crescita e la riproduzione del bovino da latte, di conseguenza, possiamo affermare che i bovini, non necessitano di proteine, bensì di amminoacidi che una volta assorbiti vengono usati per la sintesi di proteica ; in questo caso parliamo nello specifico della proteina metabolizzabile (PM), ossia la reale quantità di proteina che viene digerita e quindi la reale porzione di amminoacidi che vengono assorbiti a livello intestinale.

La PM comprende:

- La proteina microbica ruminale (MCP) che si origina dalle fermentazioni; batteri ruminali o proteine batteriche costituite tra 80-60% di proteine
- Le proteine rumino-indegradabili (RUP), ossia proteine che non vengono degradare dal rumine, ma digerite agli enzimi presente nell'intestino tenue
- La proteina degradabile ruminale (RDP), ossia proteine di origine alimentare che vengono degradate dai microrganismi presenti nel rumine a cui forniscono la maggior parte dell'azoto (N) per compiere la sintesi della proteina microbica (MCP). A questo

si include anche l'azoto non proteico (NPN) che tende a costituire il 15-20% dell'azoto nella razione (Mattuzzi et al., 2020).

## 2. LA FISILOGIA ANIMALE E LA PROTEINA MICROBICA

### 2.1 Il rumine: concetti generali introduttivi

Il rumine è uno dei quattro prestomaci dei ruminanti e svolge diverse funzioni: stoccaggio dell'alimento ingerito, parziale degradazione, metabolismo e assorbimento dei nutrienti (Mariani e Podestà, 1996).

Si tratta di un ecosistema molto complesso dove le fermentazioni possono essere controllate con l'obiettivo di: migliorare la salute e il benessere dell'animale, l'efficienza dei processi di sintesi e degradazione e la qualità dei prodotti.

L'ambiente è caratterizzato da una specifica flora ruminale, composta da funghi, protozoi e batteri che per sopravvivere devono vivere in uno specifico ambiente ruminale che presenta determinate caratteristiche: anaerobiosi, una temperatura che deve essere mantenuta tra i 39-40°C e un pH compreso tra 5,5 e 7,0 e che variano in base al tipo di dieta: con alimenti ricchi di amido (concentrati) o con zuccheri fermentescibili (melasso) la velocità del processo fermentativo comporta la produzione di acido lattico con una conseguente rapida riduzione del pH; se invece l'alimento è ricco di fibra, il pH tenderà ad aumentare, perché le molecole non risulteranno essere immediatamente utilizzabili per il processo fermentativo.

Si è, inoltre, osservato che il processo di salivazione è strettamente collegato alla fisiologia del rumine; infatti, la produzione di saliva cambia in base all'ingombro fisico dell'alimento andando a influenzare il volume del liquido ruminale (Mariani e Podestà, 1996), che per una bovina adulta la produzione di saliva giornaliera si aggira intorno ai 150-200 litri.

All'interno della saliva è presente lo ione bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) che funziona come tampone naturale all'acidità dell'ambiente ruminale, dovuta alle fermentazioni; oltre al bicarbonato è presente anche l'urea la cui concentrazione troppo elevata può portare ad un innalzamento drastico del pH, ma la cui presenza risulta essere utile alla microflora ruminale in quanto rappresenta una fonte di azoto per la sintesi degli amminoacidi.

Il processo digestivo dei ruminanti comporta che questi mastichino gli alimenti in modo approssimativo, facendoli scendere nel rumine tramite l'esofago, dove si accumulano e grazie alla saliva subiranno una prima macerazione.

Successivamente questi verranno riportati alla bocca sottoforma di bolo, dove saranno accuratamente masticati, insalivati e deglutiti: avendo poca quantità di fibra, il bolo, non farà ancora parte del processo di fermentazione, ma rimarrà nello strato superficiale del rumine dove subirà un abbattimento ad opera della microflora. Successivamente la parte trasformata dai batteri passerà nell'omaso (Goff, 2006; Goff, 2018).

## *2.2 La sintesi proteica ruminale*

Solo il 30-35% delle proteine ingerite sfugge alla degradazione e arriva intatto nell'intestino, mentre la restante parte viene trasformata in proteina microbica grazie agli enzimi specifici che vengono prodotti dai batteri.

L'attacco enzimatico prevede inizialmente l'idrolisi del legame peptidico con successiva liberazione di amminoacidi a corta catena o semplici amminoacidi; seguirà la deaminazione e degradazione delle molecole semplici con i relativi prodotti finali, quali ammoniaca, peptidi e residui di amminoacidi.

L'ammoniaca, così come altri prodotti, viene intercettata dai batteri (fino al 90% di azoto) ed elaborata a proteina da loro stessi, contenendo dal 44,4% al 55% di proteina. Il 30-40% dei batteri viene ingerito dai protozoi e diretto nell'abomaso, poi nell'intestino dove verranno assorbiti.

La sintesi viene influenzata da diversi fattori come:

- la capacità di lisi dei batteri, così come dalla loro capacità enzimatico-proteolitica;
- l'equilibrio ambientale nel rumine;
- il rapporto fra la velocità di degradazione e la velocità di transito dell'alimento, che dipendono a loro volta dalla qualità dell'alimento e dal suo tempo di permanenza nel rumine.

La fonte di energia dipende sia dallo sviluppo che dalla sintesi proteica batterica: l'80% di energia deriva dai carboidrati, il 20% dalle proteine e in piccola parte dai lipidi. La metagenesi rappresenta un grande contributo, in quanto da una mole di metano otteniamo 4 ATP da 100 g di carboidrati

fermentati 2,5-3 ATP e da 100 g di proteina solo 1,2-1,5 ATP; il successo legato all'ottenimento di energia risiede principalmente nella presenza di glucidi ad alta velocità di fermentazione e al relativo prodotto di metabolismo: l'acido acetico.

Bisogna tenere conto che rispetto ad altri composti, necessitiamo di maggior consumo di energia se si produce proteina batterica, di fatti una grande mole viene utilizzata per il mantenimento e la moltiplicazione, mentre una piccola parte viene persa; la diluizione del contenuto ruminale comporta un risparmio di ATP, ad esempio, in presenza di saliva e ci permette di favorire la riproduzione e la sintesi batterica (Nuzback et al., 1983).

È stato ipotizzato che la sintesi proteica ottimale è possibile raggiungerla con una dieta contenenti circa il 13% di proteina sul secco.

Chiaramente se siamo di una razione alimentare spinta, bisognerà adeguare i valori energetici, poiché se la microflora non dispone di sufficiente energia, almeno il 75% della quota proteica eccedente del 13% si fermerà in fase di ammoniacale, si accumulerà nel rumine e trattenuta dall'urea, per poi essere eliminata, nelle migliori ipotesi, dalle urine.

In questo processo l'organo più importante risulta essere il fegato che si occupa dei processi di detossificazione. Le sue capacità non sono illimitate e anch'esso avrà bisogno di energia che in genere gli viene fornita sottoforma di glucidi. Nel caso in cui vi sia un ricolmo di ammoniaca non bruciata, ciò causerebbe un decadimento del fegato provocando il passaggio di urea nel sangue e nel latte, problemi riproduttivi, peggior assorbimento di minerali come calcio e il fosforo e intossicazione da alcalosi.

## *2.3 La microflora ruminale*

### *2.3.1 I batteri ruminali*

La maggior parte di questi batteri sono anaerobici e non possono sopravvivere in presenza di ossigeno; li possiamo trovare nel liquido ruminale, legate alle particelle alimentari e attaccate all'epitelio ruminale. Fondamentale è anche il fatto che questi lavorano in simbiosi tra loro,

motivo per cui i prodotti del metabolismo di una determinata specie microbica, possono essere utilizzati da un'altra specie.

I batteri ruminanti digeriscono la cellulosa, sintetizzano gli amminoacidi partendo dall'ammoniaca e dalle catene carboniose semplici e producono molti tipi di vitamine soprattutto gli acidi grassi volatili, che rappresentano la fonte energetica principale dei ruminanti.

Sono presenti anche batteri aerobici, ma essendo l'ambiente ruminale prevalentemente anaerobio difficilmente rimarranno vitali, allo stesso tempo quelli anaerobici dovranno presentare un metabolismo compatibile con quello ruminale se vorranno sopravvivere (Biümmel et al., 1999).

All'interno li possiamo trovare liberi nella fase liquida ruminale, adesi alle pareti o legati ai protozoi. Esistono diverse tipologie di batteri che si sviluppano in funzione dell'alimentazione: se la razione è ricca di monosaccaridi o oligosaccaridi verranno favoriti i batteri fermentativi come i lattobacilli che producono acido lattico; mentre, se la razione contiene polisaccaridi complessi come i cereali, si incentiverà la presenza dei batteri degradativi (Biümmel et al., 1999a).

La specie microbica è condizionata dalla tipologia di substrato e dai nutrienti presenti in esso, motivo per cui sono riconosciuti i batteri:

- Amilolitici (*Streptococcus bovis*, *Bacteroides ruminicola*): digeriscono gli amidi e gli zuccheri semplici, producendo propionato;
- Cellulolitici (*Ruminococcus*, *Fibrobacter*, *Clostridium*): digeriscono la cellulosa e l'emicellulosa, producendo acetato; la digestione risulta molto più lenta e complessa rispetto a quella dell'amido, per cui si ha un'intensa attività cellulolitica se la razione darà ricca di fibra;
- Proteolitici (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides ruminicola*): digeriscono gli amminoacidi, producendo isoacidi e ammoniaca; le proteine vengono utilizzate come fonte di energia;
- Metanogeni (*Methanobacterium ruminantium*, *Methanobacterium formicium*): utilizzano idrogeno e ammoniaca, producendo metano (CH<sub>4</sub>) che non viene utilizzato dall'animale, ma eliminato tramite l'eruttazione.

In relazione al metabolismo possiamo dividerli in:

- Degradativi: batteri che scindono i polisaccaridi o l'amido in composti più semplici, come ad esempio il saccarosio;
- Fermentativi: batteri che fermentano i carboidrati convertendoli in acidi grassi a corta catena come l'acetato o in anidride carbonica (ridotta a metano tramite i batteri metanogeni);
- Azoto-fissatori: degradano i substrati azotati per formare acidi grassi a catena ramificata e ammoniaca, fondamentale per la sintesi di amminoacidi e quindi per la crescita cellulare;
- Metanogeni: batteri che producono metano.

### *2.3.2 I protozoi*

La sopravvivenza dei protozoi dipende dalla presenza di batteri e funghi di cui si alimentano; anch'essi vivono liberi nella fase liquida ruminale, legati a particelle alimentari o alla parete del rumine e coinvolti nel metabolismo degradativo e fermentativo ruminale. La dieta, il numero di pasti e le caratteristiche del rumine incidono sulla loro concentrazione (in genere di  $10^5$ - $10^8$  cellule/ml di liquido ruminale) che risulta massima con razioni ricche di fibre, al contrario se la dieta è ricca di concentrati. Prima del pasto avremmo una bassa densità che aumenterà progressivamente entro 40 minuti di circa 9 volte e diminuirà successivamente dopo 4 ore, per poi tornare a valori minimi entro 6-8 ore dopo il pasto.

Nell'eventualità che avessimo una maggiore persistenza di protozoi, batteri e alimento all'interno del rumine, ne conseguirà un aumento del tempo di trattenimento di alimento nel rumine con un maggiore attacco degradativo degli stessi e minor flusso di digesto nel duodeno; inoltre, la concentrazione di ammoniaca nel rumine in presenza di protozoi, rispetto alla non presenza, risulta maggiore grazie ad un aumento della degradazione proteica e alla maggiore persistenza dell'alimento nel rumine.

La loro presenza risulta utile in quanto, concorrono insieme ai batteri, alla digeribilità delle componenti lignocellulosolitici per via della loro attività degradativa; allo stesso tempo risultano predatori dei batteri dal momento che vi è un consistente aumento, usandoli come fonte di energia. Senza la presenza dei protozoi avremmo una crescita incontrollata che metterebbe a



rischio la sopravvivenza dei batteri all'interno del rumine in quanto avremmo delle variazioni chimico-fisiche sostanziali (Susmel et al., 1993).

La loro attività va a influire sulle catene carboniose di origine glucidica: i principali prodotti del metabolismo sono lattato, acetato, butirrico, anidride carbonico e idrogeno. Il quantitativo di acidi grassi volatili (AGV) dipende dalla relazione di propionato e butirrato ottenuti dalle fermentazioni ruminali che in assenza di protozoi aumenta, poiché la disponibilità di propionato promuove la crescita dell'animale a scopo zootecnico.

### *2.3.3 I funghi*

Strettamente anaerobi, appartengono alla classe *Chytridiomycetes* e anch'essi come i batteri e i protozoi, cambiano in funzione del tipo di razione che viene somministrato all'animale: se presente un alto contenuto di cereali, all'interno del rumine il loro quantitativo è massimo; se la dieta è, invece povera di fibra, la popolazione fungina si riduce fino a quasi scomparire, allo stesso tempo una dieta ricca di fieno e concentrati stimola il loro sviluppo.

Essi sono coinvolti nei processi fermentativi e degradativi: grazie alla loro presenza, batteri e protozoi riescono a digerire le componenti lignocellulosolitiche, al contrario passerebbero indigerite nelle feci; nonostante ciò, la loro capacità di degradare la lignina è limitata ad esempio alcune graminacee sono resistenti all'attacco fungino e questo si traduce in una minor digeribilità, perché l'attività dei miceli ruminali viene inibita.

La relazione che si instaura tra i funghi e i batteri metanogeni prende il nome di "simbiosi mutualistica": da una parte i funghi ricavano un aumento della velocità di idrolisi della cellulosa, rendendo disponibile il glucosio che ne permette il loro sviluppo, dall'altra parte i batteri metanogeni utilizzano l'idrogeno prodotto dai funghi per produrre metano (Ishaq et al., 2017).

## *2.2 Fattori che influenzano la microflora ruminale*

Per migliorare la capacità digestiva dei ruminanti è necessario utilizzare come parametro di efficienza ruminale la proteina microbica (MCP), ossia una biomassa che viene prodotta dai microrganismi ruminali, la cui quantità viene definita dalla quantità di azoto disponibile nel rumine, assieme alla frazione di carboidrati fermentescibili usati come fonte di energia per la sintesi; anche la disponibilità di peptidi e/o amminoacidi può stimolare la produzione di MCP da

parte dei batteri ruminanti. Il suo valore nutrizionale risulta molto elevato, in quanto fornisce dal 50 all'80% di aminoacidi essenziali necessari per migliorare l'efficienza di utilizzazione dell'azoto e allo stesso tempo tenere sotto controllo i costi della razione, motivo per cui risulta una valida strategia, sfruttare i batteri presenti nel rumine per soddisfare il fabbisogno alimentare dell'animale.

La proteina microbica ruminale, rappresenta una delle fonti principali di aminoacidi e contribuiscono per due terzi sull'assorbimento delle proteine da parte dei ruminanti. Sebbene sia caratterizzata da un'elevata percentuale di azoto non proteico, circa il 25%, ha un ruolo inestimabile nella nutrizione; la quotidiana sintesi proteica microbica è diversa da quella dell'efficienza della sintesi proteica, poiché la prima risulta essere il prodotto della seconda, che solitamente viene definito in grammi di proteina grezza microbica o 100gr di materia organica digerita nel rumine.

La reale composizione aminoacidica delle vere proteine microbiche è molto simile a quelle delle proteine presenti nei principali prodotti di origine animale, come ad esempio il latte che, se messe a confronto con prodotti di origine vegetali, come ad esempio l'olio di semi contengono una maggiore quantità di aminoacidi come la lisina e la metionina.

Una delle fonti principali di materia organica sono i carboidrati, utilizzati per la sintesi della proteina microbica; alcuni studiosi hanno suggerito che sarebbe più appropriato, quando si parla di efficienze delle proteine microbiche, esprimersi in funzione dei carboidrati digeriti piuttosto che della materia organica.

Tale efficienza, varia in base alla specie animale a cui facciamo riferimento, così come in base al tipo di dieta, nonostante queste possano risultare simili tra una specie e l'altra.

Se parliamo di diete a base di foraggi, l'efficienza media si aggira attorno a 13,0 gr, 17,6 gr per le diete miste a base di foraggi concentrati e 13,2 g MPC/100g per diete concentrate di materia organica nel rumine; nel complesso risulta essere di 14,8 g di MCP/100gr.

Hannover e Stonks (1991) hanno dimostrato che si ha un peggioramento della sintesi microbica quando i bovini vengono alimentati con foraggi a bassa qualità che comportano un

peggioramento nella degradazione dei carboidrati, allo stesso tempo i dati hanno dimostrato lo stretto rapporto tra l'azoto degradato e la materia organica nel rumine, che varia notevolmente a distanza di qualche ora dai pasti.

Successivamente, hanno dimostrato che le diete contenenti miscele di foraggi e concentrati ottimizzano la sintesi proteica grazie ad un rumine migliorato con un ambiente favorevole alla crescita di batteri di specie diverse.

Motivo per cui sono stati analizzati diversi fattori che possano influenzare positivamente sulla microflora ruminale:

- *Assunzione di sostanza secca*: vi è una correlazione positiva tra l'assunzione di sostanza secca e la sintesi proteica, sebbene con l'aumento del livello di assunzione sia stata diminuita la percentuale di sostanza organica digerita nel rumine.

Pertanto, sono state aumentate le sostanze nutritive, ad esempio alle diete a base di orzo è stata aggiunta la paglia, allo stesso modo l'integrazione della paglia alle diete contenenti l'amido ha portato sia ad un aumento della quantità di materia organica digerita con conseguente miglioramento della resa microbica.

- *I composti azotati*: la richiesta di proteina grezza per supportare la crescita batterica si aggira attorno all'11%; la resistenza delle proteine alla degradazione, in particolare a livello ruminale, può limitare la sintesi proteica e quindi un utilizzo inefficiente da parte dei bovini.

I composti azotati che vengono rilasciati durante la degradazione proteica, risultano cruciali per lo sviluppo batterico: le proteine meno degradate concorrono a migliorare l'efficienza della sintesi microbica, probabilmente grazie ad una migliore cattura dell'azoto da parte dei batteri. Nei sistemi moderni il fabbisogno dei composti azotati viene soddisfatto dalle proteine degradabili dell'alimento o dall'azoto metabolico che deriva dall'ossidazione degli amminoacidi nei tessuti. Si è osservato un miglioramento in termini di sintesi proteica con la somministrazione di diete a base di foraggio, il cui contenuto di saponine e tannini, ha portato ad una riduzione della degradabilità dell'azoto ruminale: ad esempio con una dieta a base di foraggi è necessaria una quantità

di 2 g di azoto disponibile per 100 g di materia organica se si vuole avere lo sviluppo batterico;

- *Apporto di energia fermentescibile*: L'approvvigionamento energetico è di solito il primo fattore limitante per la crescita microbica nel rumine. Per stimare la resa proteica microbica, i moderni sistemi europei utilizzano informazioni che sono direttamente o indirettamente utilizzate per stimare l'apporto di energia che viene fornita all'animale. La massimizzazione della proteina microbica la si ha con foraggio di alta qualità, ma nel caso in cui la qualità fosse bassa, è possibile ovviare il problema integrando alla dieta elevate quantità di concentrati.

Per la sintesi proteica vengono usati come fonte di energia i carboidrati che contribuiscono alla crescita batterica e da ciò possiamo dedurre che il metabolismo dell'azoto dipende dalla fermentazione dei carboidrati.

I tassi di fermentazione di zuccheri e amidi sono elevati fino a 2 ore dopo la somministrazione, ma diminuiscono quasi completamente a circa 4 ore comportando una riduzione dell'energia, che tenderà ad esaurirsi dopo 4 ore dal pasto. A circa 3 o 4 ore dopo la fine del pasto, inizierà la degradazione della cellulosa e dell'emicellulosa che terminerà dopo 96 ore, fornendo un'ulteriore riserva di ATP per la crescita microbica motivo per cui la somministrazione di una miscela di foraggio e concentrato portano ad una maggiore sintesi proteica rispetto alla sola somministrazione di solo foraggio o solo concentrato.

- *Rapporto foraggi e concentrati*: la sintesi della proteina microbica viene migliorata se viene variata sia la fonte che la degradabilità dell'alimento all'interno della dieta. Diversi studi hanno riportato una maggiore produzione di azoto ammoniacale in presenza di diete con carboidrati facilmente digeribili, piuttosto che in diete ad alto contenuto di fibre: questa situazione suggerirebbe che le proteine prontamente degradabili favoriscono la crescita microbica dal momento in cui i foraggi vengono integrati con carboidrati non strutturali che risultano disponibili a livello ruminale, ciò potrebbe essere dato da un migliore rapporto tra l'azoto non proteico e le proteine in una dieta mista, perché la concentrazione di azoto non proteico tende ad essere più alta nei foraggi che nei concentrati, inoltre i foraggi possono fornire l'azoto sotto forma di proteina altamente

degradabile, mentre i concentrati forniscono l'azoto sotto forma di peptidi e/o aminoacidi necessari per la sintesi.

L'efficienza aumenta quando i carboidrati fermentescibili sono presenti in una quantità inferiore al 30% nella dieta, ma diminuisce quando il livello supera il 70%, perché si ha una fermentazione errata, a causa della rapida degradazione dei carboidrati. Se aumentiamo la proporzione di foraggio, andremo incontro ad un aumento del flusso di saliva, con conseguente aumento del pH ruminale e una migliore capacità di scambio cationico, una migliore idratazione e successiva riduzione dei tempi di ritenzione dell'alimento e un migliore sviluppo microbico.

- *Ambiente ruminale*: risulta fondamentale che questo rispecchi determinate condizioni, come può essere ad esempio il valore del pH: un valore basso può essere deleterio per i batteri ruminali in particolare per i protozoi, ma anche problemi legati alla digeribilità della fibra e un dirottamento dell'energia verso funzioni non legate alla crescita, ma al mantenimento del pH neutro nelle cellule batteriche.
- *Rilascio sincronizzato di azoto ed energia dalle diete*: se si sincronizza il rilascio di ammoniaca (e azoto) con il rilascio di energia, è possibile migliorare l'utilizzo dell'azoto; allo stesso modo, una razione con fonti di amido e proteine altamente degradabili stimola un maggior flusso di proteine verso il duodeno, rispetto a diete che rilasciano azoto ed energia in modo scoordinato.

Di fatto per aumentare la resa microbica, l'obiettivo è quello di ottenere un modello di approvvigionamento energetico all'interno di un regime dietetico, il più uniforme possibile; un altro obiettivo sarà quello di fornire una quantità giornaliera di azoto sufficiente per utilizzare tutta l'energia che viene rilasciata nel rumine ogni giorno;

- *Velocità di deflusso del rumine*: una fuoriuscita più veloce dovrebbe ridurre i costi di manutenzione dei batteri, poiché passano meno tempo all'interno del rumine; si suppone che l'efficienza della sintesi proteica possa essere aumentata di circa il 20% se il tasso di deflusso è tra lo 0,02 e 0,08/ora e ciò lo si può ottenere un aumento dell'apporto di sostanza secca, ad esempio con diete a base di foraggi di alta qualità si avrebbe, oltre che

un aumento della produzione di proteine microbiche, anche un'adeguata quantità di substrato fermentescibile e quindi un aumento del livello di assunzione.

- *Minerali e vitamine*: è dimostrato che la concentrazione di zolfo nella dieta influisce sulla crescita microbica, poiché implicato nella sintesi di metionina e cisteina che varia dallo 0,11-0,20% nella dieta, a seconda dello stato di salute dell'animale.

### 3. METODI DI STIMA DELLA BIOMASSA MICROBICA RUMINALE

Più della metà del fabbisogno energetico e proteico di una vacca da latte ad alto rendimento, è fornito dagli acidi grassi volatili (AGV) prodotti a livello ruminale dai microrganismi e dal flusso di proteine microbiche verso il duodeno.

Per aumentare l'assunzione di energia ed ottimare le fermentazioni ruminali, gli animali vengono alimentati con una minima quantità di carboidrati strutturali ed elevate quantità di carboidrati non strutturali: a differenza dei primi, quelli non strutturali vengono rapidamente degradati dalla microflora ruminale facendo sì che vi sia un aumento della produzione di AGV, una riduzione del pH ruminale e un aumento dell'assorbimento degli AGV (Dijkstra, 1994); inoltre, il basso contenuto di carboidrati strutturali porta ad un aumento della velocità di passaggio, ad una maggiore efficienza della sintesi proteica microbica e di conseguenza ad un aumento dell'apporto di energia metabolizzabile e di proteine digeribili a livello intestinale (Bach et al., 2005; Firkins et al., 2006).

Tuttavia, un quantitativo minimo deve essere presente per garantire la funzionalità del rumine e prevenire acidosi ruminali (Zebeli et al., 2006).

Il flusso di proteine microbiche verso il duodeno può essere considerato come l'indicatore più importante e sensibile per ottimizzare il metabolismo del rumine nelle vacche da latte ad alto rendimento.

La rilevazione del flusso di proteine microbiche in vivo richiede l'incannulamento chirurgico dei bovini: un'operazione costosa che può portare gli allevatori a preoccupazioni per la salute dell'animale e che può influenzare l'assunzione di sostanza secca e la produzione di latte.

Invece, un metodo non invasivo, affidabile e che può essere utilizzato in stalla per stimare il flusso di azoto microbico nel duodeno si basa sull'escrezione quantitativa dei derivati purinici urinari quali acido urico, allantoina, xantina e ipoxantina.

Il principio alla base di tale sistema è che il flusso duodenale degli acidi nucleici e dei loro derivati è principalmente di origine microbica: vengono in larga misura digeriti e assorbiti nell'intestino tenue e le basi puriniche vengono catabolizzate ed escrete nelle urine (Topps e Elliot, 1965).

È stato riscontrato da diversi studi che vi sia una relazione tra i derivati purinici e l'escrezione urinaria: questi provengano sia da purine assorbite sia dal contributo endogeno del tessuto corporeo. Tale correlazione è stata trovata tra i derivati purinici escreti e le basi puriniche infuse, dove l'intercetta rappresenta il contributo endogeno e la pendenza la risposta incrementale.

Il recupero di derivati purinici nelle urine di purine infuse per via post-ruminale variava tra 0,72 e 0,86 mol/mol, con eccezioni di recuperi più bassi (González-Ronquillo et al., 2003); mentre gli studi di Verbic hanno messo in discussione il recupero di 0,77 della purina infusa, motivo per cui è stato proposto un aggiustamento per la "vera" digeribilità di proteina di  $0,913 \pm 0,026$ , con l'obiettivo di calcolare le basi puriniche assorbite (Chen et al., 1990); con questa correzione il recupero delle basi puriniche è stato di 0,85 mol/mol.

Il parziale recupero delle purine infuse può essere attribuito alla differenza di digeribilità tra esse e le purine microbiche e ciò ci permette di dimostrare della differenza di recupero stimato. L'intervallo di recupero tra i derivati purinici nell'urina e delle basi puriniche infuse è stato ridotto risultando simile per le manze, le vacche in asciutta e in lattazione.

Tuttavia, se teniamo conto dei soggetti in lattazione i recuperi dei derivati purinici erano sostanzialmente più bassi se stimati in base al flusso duodenale delle basi puriniche (0,44 e 0,44, rispettivamente all'inizio e alla fine della lattazione) della concentrazione di basi puriniche assorbite (0,56 e 0,70, rispettivamente all'inizio e alla fine della lattazione) (González-Ronquillo et al., 2003). Un'altra via di escrezione dei derivati purinici avviene tramite il latte.

Tale rilascio risulta più basso rispetto all'escrezione urinaria, facendo sì che la prima via ci dia un minor recupero.

Inoltre, è stato ipotizzato fattori come lo stato di salute dell'animale e il suo stile di vita possano influenzare le variazioni dei derivati purinici e di conseguenza sia la proporzione di escrezione urinaria e sia quella lattea (González-Ronquillo et al., 2003).

### *3.1 Metodo di estrazione tramite il liquido ruminale*

L'estrazione della biomassa microbica dal liquido ruminale può essere effettuata utilizzando diverse tecniche di laboratorio. Una delle tecniche più comuni è la centrifugazione differenziale,



che permette di separare i componenti del liquido ruminale in base alla loro densità. Si tratta di una tecnica che sfrutta la differenza di densità tra le particelle presenti in una miscela in modo da separarle in base al loro peso molecolare e alla loro dimensione. Questa tecnica è ampiamente utilizzata nei laboratori di biologia e biochimica per separare e purificare i componenti di un campione (Verbic e Chen, 1990).

Il campione di liquido ruminale viene centrifugato in un tubo da centrifuga ad alta velocità. Durante la centrifugazione, i componenti del liquido ruminale si separano in base alla loro densità: la biomassa microbica, che è più densa rispetto ad altre componenti come, ad esempio, il liquido e i solidi non digeriti, si sedimenta sul fondo del tubo e successivamente il surnatante, che contiene principalmente liquido e componenti meno densi, viene delicatamente rimosso utilizzando una pipetta.

### *3.2 Metodo di estrazione tramite le urine*

Secondo gli studi eseguiti da Verbic e Chen nel 1990, tale approccio è stato corretto: in primo luogo, Verbic ha corretto la digeribilità delle purine infuse pari a 0,91, in secondo luogo il flusso di azoto microbico presenta un contenuto di azoto delle purine di 70 g/mol, mentre la digeribilità media del PB microbico di 0,83 con un rapporto purine-N/totale-N di 0,116 g/g.

In letteratura vi sono autori che trascurano le diverse digeribilità delle basi puriniche infuse e di quelle microbiche, mettendo a confronto l'escrezione urinaria delle purine direttamente al flusso duodenale (Balcell et al., 1991).

Moltiplicando il flusso delle basi puriniche con il rapporto di azoto e dei derivati purinici viene fornita una stima approssimativa del flusso microbico di azoto della biomassa microbica mista, ma anche delle singole componenti nel caso si volesse entrare più nello specifico.

### *3.3 Metodo di estrazione tramite il latte*

Questo metodo risulta essere sia innovativa che utile per via del semplice metodo di raccolta del latte in azienda, le informazioni sull'andamento produttivo del latte e l'ipotetica applicazione di tale sistema su scala commerciale.

In questo caso bisogna tenere conto della concentrazione di plasma sanguigno correlato al quantitativo di allantoina (Roskopf e Giesecke, 1992).

Tuttavia, la concentrazione di acido urico nel latte è più alta nel latte rispetto a quella contenuta nel plasma, ma non il quantitativo di allantoina, motivo per cui l'acido urico nel latte non può essere utilizzato come parametro efficiente per il flusso di N microbico (Giesecke et al., 1994).

Nello specifico, l'escrezione di allantoina è legata alla produzione di latte e presenta una relazione positiva per l'ottenimento di energia netta in relazione all'assunzione di sostanza secca, mentre scarsamente legata al flusso di N microbico stimato (media  $R^2= 0,09$ ) (Timmermans et al., 2000); inoltre, è da considerare che l'escrezione di allantoina nel latte risulta irrisoria rispetto a quella effettivamente stimata, motivo per cui si considera tale metodologia inefficiente.

#### *3.4 Metodo di estrazione tramite la saliva*

L'estrazione della biomassa microbica dalla saliva dei ruminanti è un processo molto più complesso rispetto all'estrazione dal liquido ruminale, in quanto la saliva contiene una miscela più eterogenea di componenti, tra cui le cellule epiteliali, i batteri, le particelle alimentari non digerite ed altri contaminanti. Tuttavia, è possibile eseguire l'estrazione utilizzando tecniche di laboratorio specifiche.

Negli studi di Verbic del 1990 viene utilizzata una centrifuga a velocità fissa. Rispetto ad una centrifuga differenziale, questa tipologia è molto più semplice e implica che la centrifuga giri ad una velocità costante per tutto il processo.

È efficace per separare i componenti della miscela in base alla loro densità, ma può richiedere tempi di centrifugazione più lunghi per ottenere una buona separazione.

#### 4. IL PROGRESSO TECNOLOGICO: LA ZOOTECCIA DI PRECISIONE

L'agricoltura intensiva ha spinto le aziende a massificarsi, diventando sempre più grandi e inquinanti: dopo un incremento progressivo degli ultimi 70 anni, ad oggi è necessario sviluppare una tipologia di allevamento sostenibile, soprattutto se si pone l'attenzione sull'interazione degli allevamenti con gli ecosistemi che li comprendono.

Nei rapporti della FAO, le attività di allevamento vengono ritenute come una delle cause principali dell'aumento delle emissioni gas serra (Greenhouse gases, GHG), del degrado del suolo e dell'inquinamento delle acque: per cui risulta necessario ideare strategie sia a sostegno delle esigenze degli allevatori sia a sostegno dell'ambiente.

Questa richiesta è stata accolta da organizzazioni governative come la FAO e WHO che hanno creato il modello One Health: termine **coniato nel 2004** a seguito della conferenza "One World, One Health: Building Interdisciplinary Bridges to Health in a Globalized World" tenutasi a New York ed organizzata dalla Wildlife Conservation Society (WCS), riconosciuto dalla Commissione Europea e dal Ministero della Salute italiano.

L'approccio One health risulta ideale, in quanto tiene conto della continua tendenza positiva di crescita della popolazione così come dell'aumento del fabbisogno alimentare, senza dimenticare di salvaguardare ciò che è il contesto sociale, economico ed ambientale di provenienza di ogni singolo essere vivente. Tutto ciò avviene grazie ad una collaborazione tra ambiti scientifici diversi, finalizzati al mantenimento e miglioramento del benessere di uomo, animali e ambiente (WHO, 2017).

##### *4.1 I PLF (Precision Livestock Farming) nella zootecnia di precisione*

Parte di questo approccio interdisciplinare è la zootecnia di precisione (Precision Livestock Farming, PLF), che consiste nell'applicazione di tecnologie e strumenti necessari per l'acquisizione e la gestione di dati in tempo reale con l'obiettivo di migliorare l'efficienza produttiva e limitare i costi aumentando al contempo il benessere degli animali e dell'uomo, mediante l'uso di dispositivi e programmi di elaborazione.

In passato, le scelte manageriali si basavano sull'esperienza e le osservazioni dirette del bestiame, mentre ad oggi un allevatore deve confrontarsi con una realtà diversa sia per il numero di capi che risulta essere sempre più numeroso sia per il suo ruolo imprenditoriale, che lo costringe a svolgere attività lontane dalle stalle impedendogli di avere un contatto diretto con l'animale.

Con il passare del tempo si è constatato che l'uso della tecnologia all'interno di un allevamento è sempre più apprezzata: rappresenta un ottimo alleato per l'allevatore, sia per ottimizzare la gestione degli animali sia per combattere con ciò che sono le criticità odierne come, ad esempio, il bilanciamento delle razioni per bovini a seconda dello stadio di crescita o produttivo in cui si trovano.

Gli strumenti della PLF sono suddivisibili in diverse categorie: sensori, elaboratori e software. Tra i sensori quelli più utilizzati sono: podometri, collari o chip auricolari che trasmettono dati via radio o tramite il computer aziendale; ad oggi è possibile anche avere questi dati in maniera "portatile", grazie alle applicazioni presenti sul telefono cellulare che permettono all'allevatore di stare in mezzo agli animali e non relegato davanti ad un computer.

Parte di questo approccio è anche la cosiddetta "agricoltura di precisione", che collabora a pari passo con quella che è l'alimentazione di precisione: ad esempio vi è la tecnologia NIR (Near-Infrared Spectroscopy) che permette di effettuare delle analisi qualitative sui foraggi direttamente in campo, essendo un dispositivo portatile che rileva la composizione chimica degli alimenti sul campione tal quale, permettendo all'operatore di non dover interfacciarsi direttamente con laboratori di analisi chimiche zootecniche. Sono noti i numerosi vantaggi di questo sistema quali referti più veloci, razioni più precise e l'eventuale possibilità di integrare in modo mirato (Monteiro et al. 2021).

#### *4.1 L'alimentazione di Precisione*

L'affidabilità del PLF e la sua variabilità sono date principalmente dall'animale stesso, il parametro principale di grande variabilità. Per questo motivo, le sue variabili devono essere frequentemente misurate.

Possiamo distinguere diverse sottocategorie, come l'alimentazione di precisione, o precision feeding, un metodo che si inserisce nel quadro dell'allevamento di precisione e che costituisce un mezzo avanzato di alimentazione del bestiame che permette l'analisi di parametri legati all'alimentazione, agli animali e all'ambiente per una formulazione bilanciata, fisiologica e sostenibile.

I sistemi di alimentazione automatizzata rappresentano una valida opzione per gli allevatori che desiderano ridurre il carico di lavoro quotidiano legato alle procedure di stalla ripetitive, dando spazio a quelle organizzative, ma anche per aumentare la qualità produttiva e il benessere degli animali (Banhazi et al., 2012).

Più nel dettaglio, possiamo riassumere gli obiettivi in tre punti:

- Giusta quantità di elementi nutritivi;
- Esatta proporzione degli ingredienti;
- Giusto momento di distribuzione dell'alimento.

L'alimentazione rappresenta una delle principali voci tra i costi di produzione in un qualsiasi allevamento zootecnico, motivo per cui risulta necessario ridurre l'impatto derivato dalla variabilità degli alimenti, sia per la salute che per la produttività della mandria: il controllo e la verifica delle caratteristiche della razione e degli alimenti permettono un tempestivo ribilanciamento degli alimenti, consentendo di somministrare agli animali la razione effettivamente formulata dall'alimentarista.

Questa strategia si articola su quattro fasi:

- Rilevazione dei dati;
- Analisi dei dati;
- Comunicazione dei dati;
- Azione.

Il processo ha come principali obiettivi quello di migliorare l'efficienza alimentare: sia per un fatto di redditività aziendale, inteso come ricavo al netto dei costi alimentari, sia per ridurre l'impatto ambientale e migliorare la salute e il benessere animale. Se i risultati ottenuti si discostano da quelli sperati, verranno effettuate azioni correttive in modo da limitare eventuali danni.

Il processo non implica semplicemente misurare l'alimento o la razione, ma prevede di stimare l'effetto che la razione ha sugli animali e di verificare che questi fattori non vadano a peggiorare le performance produttive.

I fattori da considerare per una razione ideale sono numerosi, come ad esempio la genetica, lo stato fisiologico, le funzioni digestive e l'impatto sul profilo metabolico e ormonale; a questi dobbiamo tenere in considerazione i vari rischi sanitari che potrebbero ostacolare gli obiettivi, come ad esempio le acidosi ruminali; i fattori dovranno essere continuamente monitorati e controllati per determinare il successo del razionamento (Liu et al., 2023).

I sistemi di alimentazione automatizzata maggiormente conosciuti sono:

- Unifeed automatizzato: una tecnica che permette di monitorare parametri come la miscelazione dell'Unifeed all'interno del carro, la trinciatura e il pH ruminale. Una delle criticità in cui possiamo incorrere è che con questa tipologia di alimentazione la maggior parte dell'alimento non venga consumato; tramite il Precision Feeding si può intervenire tramite l'uso di sistemi meccanici che avvicinano l'alimento più volte al giorno, permettendo un aumento di ingestione della sostanza secca del 2-3% (Bisaglia et al., 2009).
- Sistemi di alimentazione automatici (AFS): rispetto a un sistema automatizzato Unifeed vi sono numerosi vantaggi, quali la distribuzione della razione può essere programmata, il personale non è coinvolto nella preparazione del pasto e vi è la possibilità di lavorare in sinergia con altri sistemi, ad esempio con i robot di mungitura.

## CONTRIBUTO SPERIMENTALE

### *1. Introduzione*

Nei capitoli precedenti si è affrontata l'importanza della proteina microbica come parametro per ottimizzare il metabolismo ruminale e quindi di come questa viene utilizzata per garantire il benessere e la salute dei bovini da latte; si è inoltre trattato di come è possibile analizzare il contenuto di biomassa microbica a partire dalle urine e dal latte.

Un altro aspetto analizzato è la costituzione della biomassa microbica: un ecosistema complesso composto da batteri, funghi e protozoi che, lavorando in sinergia, utilizzano come fonte principale di energia la biomassa lignocellulosolitica, una delle fonti rinnovabili più abbondanti (Nguyen et al., 2019).

In questo caso-studio per valutare la funzionalità ruminale sono stati analizzati come indicatori della funzionalità ruminale la biomassa microbica nel suo complesso, l'attività enzimatica della Xylanasi e il contributo dei protozoi ciliati.

#### *1.1 Parametro 1: la biomassa microbica*

L'analisi della biomassa microbica ruminale è stata effettuata in quanto i microrganismi ruminali sono coinvolti nella degradazione delle componenti alimentari, in particolar modo la componente fibrosa. Questi microrganismi, che includono batteri, protozoi e funghi, lavorano sinergicamente per scomporre i componenti fibrosi delle pareti delle piante, come la cellulosa, l'emicellulosa e lo xilano, in sostanze più semplici che possono essere digerite dagli animali. Tale analisi, ci permette di valutare se la dieta fornisce ai microrganismi ruminali i nutrienti necessari per svolgere correttamente le loro funzioni digestive (Thirumalesh, 2013).

#### *1.2 Parametro 2: L'attività enzimatica*

Risulta fondamentale tenere conto dell'attività enzimatica dei batteri ruminali, in particolare dell'attività enzimatica esercitata dalla Xylanasi. L'enzima della Xylanasi degrada la fibra, nello

specifico l'emicellulosa che rappresenta una delle principali componenti delle piante. L'attività di questo enzima porta ad un miglioramento della digestione, con conseguente aumento dell'apporto di energia disponibile: diversi studi hanno riferito che l'alta attività della Xylanasi ha mostrato una risposta positiva nei bovini alimentati con alte percentuali di foraggio (Beauchemin et al., 1997) e nelle bovine da latte (Arriola et al., 2011).

### *1.3 Parametro 3: i protozoi ciliati*

Bisogna tenere conto che la diversità dei protozoi ciliati nel rumine può essere utilizzata come indicatore della salute dell'animale e della sua capacità di digerire efficacemente gli alimenti. Una variazione anomala della popolazione di protozoi nel rumine può essere un segnale di eventuali squilibri nella dieta dell'animale, problemi digestivi o stress ambientali. Il monitoraggio dei protozoi ciliati nel rumine può quindi fornire informazioni utili per gli allevatori, in modo da capire come gestire la dieta e la salute degli animali ruminanti, contribuendo a massimizzare la produzione di latte e il benessere animale.

È stato analizzato il contributo dei protozoi Olotrici e dei protozoi *Entodinium*: entrambi sono noti per la loro capacità di digerire la cellulosa. Durante il processo di fermentazione della cellulosa, i protozoi nel rumine producono acidi grassi volatili (AGV) come acetato, propionato e butirato. Questi AGV risultano essere una fonte importante di energia per l'animale e vengono assorbiti a livello della mucosa del ruminale; inoltre, forniscono anche proteine ed altri nutrienti utili all'animale che possono essere utilizzati per sostenere la loro crescita, la produzione di latte e altri processi metabolici.

Una delle differenze principale tra i protozoi Olotrici ed *Entodinium* risiede nella loro morfologia: i protozoi Olotrici presentano della ciglia distribuite uniformemente sulla superficie cellulare, che utilizzano per il movimento e l'alimentazione; i protozoi *Entodinium* sono caratterizzati, invece, dalla presenza di compartimenti o sacche interne chiamate "entodini" che rendono la loro morfologia molto più complessa rispetto ai protozoi Olotrici.

Lo scopo di questo studio è stato quello di determinare se esiste una possibile correlazione tra il contenuto di pellet ruminale e di come la quantità e qualità della biomassa microbica possa incidere su diversi fattori quali la produzione di latte in Kg, l'Energy Connected Milk (ECM),



l'attività della Xylanasi valutata come area in cm<sup>2</sup> di alone enzimatico, il contenuto per ml di Protozoi Olotrici e protozoi *Entodinium* ed il Total Tract Digestible Dry Matter (ttaDMD).

## *2. Materiali e metodi*

La sperimentazione è stata condotta presso un'azienda lattiero casearia dell'Italia settentrionale che ha coinvolto 180 vacche in lattazione di razza Frisona. La mandria è stata divisa in quattro gruppi distinti e alimentati con un protocollo di dieta completo con l'aggiunta di integratori dell'azienda produttrice CRYSTALYX® Products GmbH che nel caso-studio non è stato preso in considerazione.

Ogni vacca in lattazione è stata munta con robot di mungitura. La sperimentazione in laboratorio è stata condotta presso l'Università di Parma alla facoltà di medicina veterinaria al dipartimento di Nutrizione Animale tra luglio e dicembre del 2023 in cui sono stati esaminati 47 campioni di liquido ruminale; 3 di questi campioni sono stati eliminati a seguito di una diagnosi di mastite.

Ogni campione di liquido ruminale analizzato è stato prelevato dopo 60 giorni dall'inizio della lattazione.

### *2.1 Campionamento*

Tramite l'uso di una sonda esofagea è stato prelevato il liquido ruminale di ogni animale oggetto della sperimentazione. La sonda esofagea era costituita nella parte terminale da un filtro per eliminare le particelle più grossolane di alimento, mentre la sonda era collegata ad una pompa del vuoto tramite una cannula flessibile. Per evitare stress termici ai microrganismi ruminali, il contenitore di raccolta è stato preriscaldato con acqua calda e successivamente svuotato prima del prelievo effettivo del liquido ruminale. Le analisi sono state operate in collaborazione con il veterinario aziendale per adempiere ad un piano di monitoraggio clinico aziendale.

Il prelievo del liquido ruminale è stato effettuato su animali a digiuno e in tempi rapidi per garantire la sopravvivenza dei microrganismi ruminali, in una zona isolata dalla corsia di alimentazione, in modo tale che l'eventuale ingestione di foraggio non compromettesse le successive analisi.

Prima di effettuare le analisi si è provveduto a conservare accuratamente i campioni di liquido ruminale di ogni singolo animale in bottiglie sterili e poste in congelatore a -20 °C.

## *2.2 Reagenti e strumentazione*

- Cloruro di sodio allo 0,9%
- Bilancia elettronica serie BCE fornita da Orma
- Bilancia analitica AS 220.R2 fornita da RADWAG®
- Biberon da centrifuga da 250 ml
- Contenitore per pellet batterico
- Contenitori da 100 ml
- Filtri con maglia da 59 µm
- Pipette graduate

## *2.3 Analisi sulla biomassa microbica ruminale*

I campioni di liquido ruminale sono stati congelati a -20 °C in congelatore e scongelati 12 ore prima dell'inizio di ogni prova a 4 °C in cella frigorifera. La temperatura di scongelamento risulta essere differente a seconda della stagione di prova.

In una tabella sono stati registrati: l'ID del campione, dei contenitori da 100 ml e dei biberon da 250 ml. Successivamente sono stati registrati: il peso del contenitore da 100 ml senza tappo e il peso dei biberon da 250 ml con il tappo. Per tutto l'esperimento, la pesatura dei contenitori da 100 ml è avvenuta su una Bilancia elettronica serie BCE fornita da Orma, mentre la pesatura dei biberon da 250 ml è avvenuta su una bilancia analitica AS 220.R2 fornita da RADWAG®.

Successivamente, si è provveduto a omogeneizzare il contenuto ruminale, di cui, sono stati versati: 10 ml in un contenitore da 100 ml con l'uso di una pipetta graduata analitica per effettuare l'analisi della sostanza secca su campione intero, 200 ml in un biberon da 250 ml per effettuare l'analisi sulla proteina microbica e la restante parte di liquido ruminale è stata versata in una Falcon per effettuare l'analisi degli acidi grassi volatili (AGV). È stato importante considerare che il peso iniziale di ogni biberon sia lo stesso, per il corretto utilizzo della centrifuga nel passaggio successivo. Nel caso è possibile aggiungere cloruro di sodio allo 0,9% per pareggiare

i pesi. Il liquido ruminali nel biberon da 250 ml può essere ricongelato una notte, in modo favorire il distacco dei batteri. Il peso di ogni contenitore riempito è stato, quindi, registrato.

Il pH del liquido ruminale di ogni biberon è stato misurato tramite pH-metro: al cambio di ogni campione, lo strumento è stato pulito in acqua distillata.

I campioni sono poi inseriti all'interno di una centrifuga, dove hanno subito tre processi:

- La prima centrifuga presentava un rotore JA14 a 500 giri per 20 minuti. A fine centrifuga, il liquido è stato filtrato nella seconda serie di biberon da 250 ml utilizzando un filtro da 59  $\mu\text{m}$ , per evitare il filtraggio dei protozoi. L'eccesso presente sul filtro è stato eliminato, mentre il liquido ruminale è stato pesato ed equilibrato ed eventualmente aggiunto cloruro di sodio allo 0,9% per pareggiare i pesi;
- La seconda centrifuga presentava un rotore JA14, a 18.000 giri per 20 minuti. A fine centrifuga, è stato eliminato il surnatante tramite l'uso di una pipetta e il pallet è stato risospeso in una provetta da 30ml con una soluzione di cloruro di sodio allo 0,9 %, anche in questo caso per pareggiare il peso all'interno della centrifuga. La provetta da 30ml prima dell'uso è stata identificata con il nome del campione in esame e pesata senza coperchi;
- La terza centrifuga presentava un rotore JA20 a 18.000 per 25 minuti. A fine centrifuga, il surnatante è stato eliminato con una pipetta Pasteur e inserito il prodotto finale in un contenitore da 100 ml. Infine, è stato registrato il peso del contenitore all'interno del contenitore da 100 ml sprovvisto di coperchio.

Il contenitore da 100 ml con il prodotto finale è stato poi posto nel congelatore a -20 °C.

#### *2.4 Elaborazione statistica*

Il dataset è stato analizzato per Outliers secondo il metodo Quantile Range Outliers, usando un Tail quantile di 0.1 e un Q di 3; all'analisi son risultati un Outliers un valore per le caseine (%) e uno per la conta delle cellule somatiche (SCC), considerati quindi come nulli nella successiva analisi statistica. La distribuzione dei dati è stata analizzata per la normalità graficamente tramite istogrammi e tramite test Shapiro-Wilk.

I dati sono stati successivamente analizzati per correlazione, evidenziando i parametri con  $r > 0.2$ , per i quali è stata calcolata la significatività ( $p$ ). I parametri scelti sono stati analizzati tramite un modello di regressione lineare per indagarne l'andamento. L'analisi statistica è stata effettuata tramite software JMP v 16Pro (SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2023).

#### 4. Risultati e discussione

Il pellet ruminale risulta essere correlato positivamente in maniera numericamente decrescente con la percentuale di lattosio nel latte, le ECM, il numero di Olotrici per ml di liquido ruminale, i kg di latte prodotti e ttaDMD (0.338, 0.316, 0.296, 0.283, 0.214 rispettivamente), come riportato nella tabella 1.

La percentuale di lattosio e le ECM riportano inoltre una tendenza alla significatività con il pellet ruminale ( $p = 0.03$  e  $0.04$  rispettivamente).

	Correlazioni ( $r$ ; $p$ )			
	Pellet ruminale	Xylanasi	Grassi	Olotrici
	g/250g	cm <sup>2</sup>	%	n/ml
ECM	0,316; 0,04	0,173	0,264; 0,094	0,028
Latte (kg)	0,283; 0,07	0,373; 0,01	-0,321	0,057
Entodinium (n/ml)	-0,221	0,002	0,230; 0,16	0,317; 0,04
Lattosio (%)	0,338; 0,03	0,093	-0,197	0,058
Olotrici (n/ml)	0,296; 0,059	0,122	0,002	1,000
TTADMD	0,214; 0,196	0,147	0,108	0,506; 0,001

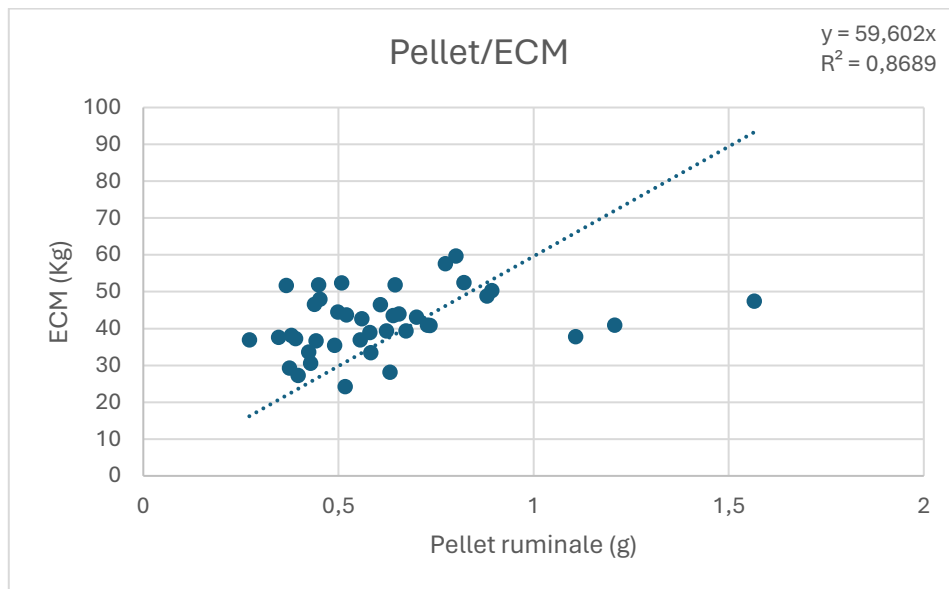
Tabella 1 – i dati riportano il valore del coefficiente di correlazione di Pearson e la loro significatività, ove di interesse statistico.

Gli stessi parametri, se analizzati successivamente come regressione lineare, riportano valori di  $R^2$  decrescenti da ECM, lattosio, ttaDMD e Olotrici come n su ml ( $R^2 = 0.868, 0.864, 0.815, 0.721$ ).

Il modo in cui i microrganismi degradano i nutrienti ingeriti con la razione incide sulla produzione di latte e di conseguenza sull'Energy Corrected Milk: una misura che tiene conto non

solo della quantità di latte prodotto, ma anche della sua qualità in termini di contenuto energetico, come è possibile osservare nel grafico 1.

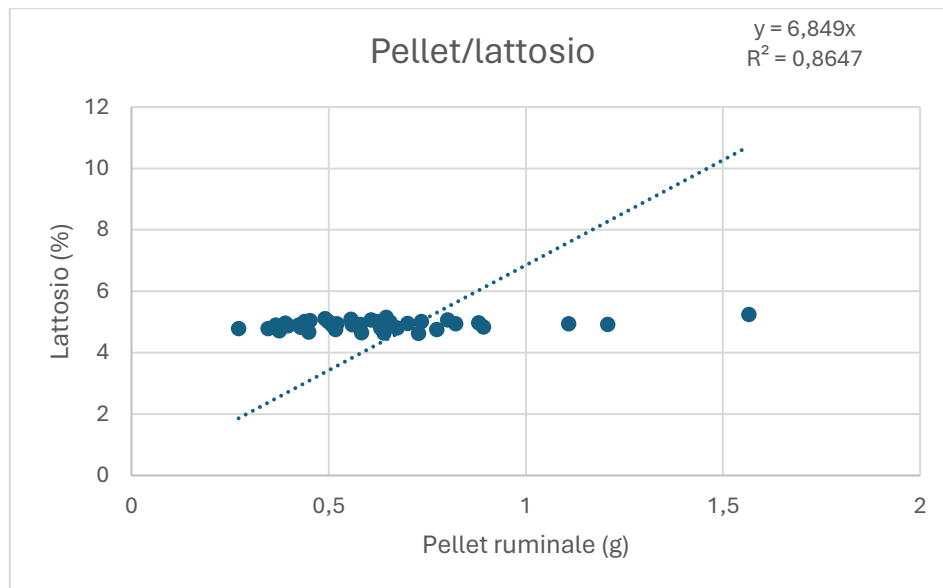
Nello specifico, questo dato si focalizza su ciò che è il contenuto di grasso, proteine e lattosio dal latte prodotto, facendo però particolare attenzione al contenuto di grasso che in genere fornisce più energia rispetto agli altri due nutrienti.



*Grafico 1 - coefficiente di determinazione risultato dal rapporto tra il pallet ruminale e l'energy corrected milk (ECM).*

Sebbene i microrganismi ruminali non siano direttamente responsabili della produzione di lattosio nel latte, la loro attività nel rumine può influenzare la disponibilità di nutrienti e l'efficienza della digestione, come è possibile osservare nel grafico 2.

Secondo gli studi una flora microbica equilibrata e attiva nel rumine può contribuire a una migliore digestione e assorbimento dei nutrienti, inclusi quelli che possono influenzare la produzione di latte (Gozho et al., 2008).



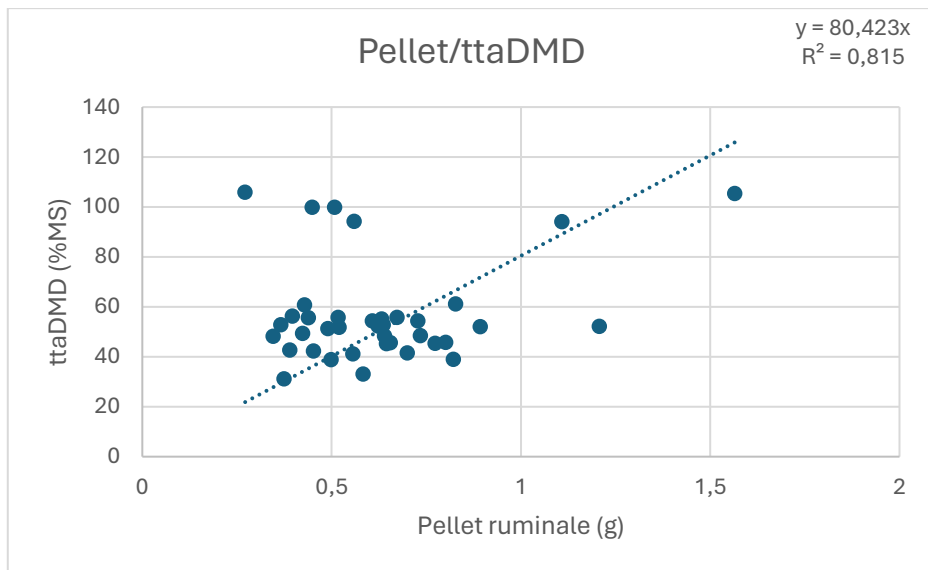
*Grafico 2 - coefficiente di determinazione risultato dal rapporto tra pellet ruminale e la percentuale di lattosio prodotto nel latte.*

Nel grafico 3 è possibile osservare la relazione positiva tra il pellet ruminale e la ttaDMD. La ttaDMD (Total Tract Digestible Dry Matter) è una misura dell'efficienza con cui i ruminanti digeriscono la materia secca degli alimenti lungo l'intero tratto digestivo.

I batteri presenti nella microflora ruminale sono responsabili della fermentazione della fibra vegetale presente negli alimenti consumati dagli animali.

Questo processo produce acidi grassi volatili (AGV), che sono una fonte importante di energia per gli animali. Una popolazione equilibrata e attiva di batteri ruminali può favorire una migliore fermentazione della fibra e una maggiore ttaDMD.

Allo stesso modo, gli enzimi prodotti dai batteri possono contribuire alla digestione e all'assorbimento dei nutrienti nel tratto digestivo degli animali ruminanti, influenzando così la ttaDMD complessiva (Lopes, 2015).

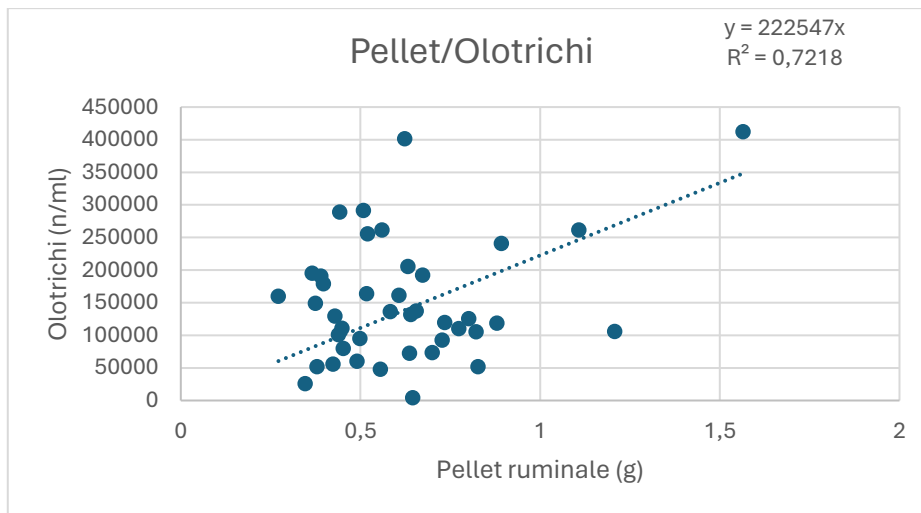


*Grafico 3 - coefficiente di determinazione risultato dal rapporto tra il pellet ruminale e ttaDMD.*

Da come è possibile osservare nel grafico 4 il pellet ruminale risulta essere correlato positivamente con il numero per ml dei protozoi Olotrichi, poiché questi partecipano attivamente alla digestione della fibra, in particolare della cellulosa e dell'emicellulosa.

I protozoi Olotrichi sono uno dei componenti principali del pellet microbico nel rumine, contribuendo insieme ai batteri e ai funghi.

I protozoi Olotrichi svolgono un ruolo importante nella fermentazione e nella digestione degli alimenti nel rumine. Grazie alle loro ciglia lunghe, sono in grado di muoversi e digerire materiali fibrosi come la cellulosa, contribuendo alla produzione di acidi grassi volatili e altri metaboliti utili per l'animale ospite. (Dewhurst et al., 1986).



*Grafico 4 - coefficiente di correlazioni tra il numero per ml dei protozoi Olotrichi e il pellet ruminale.*

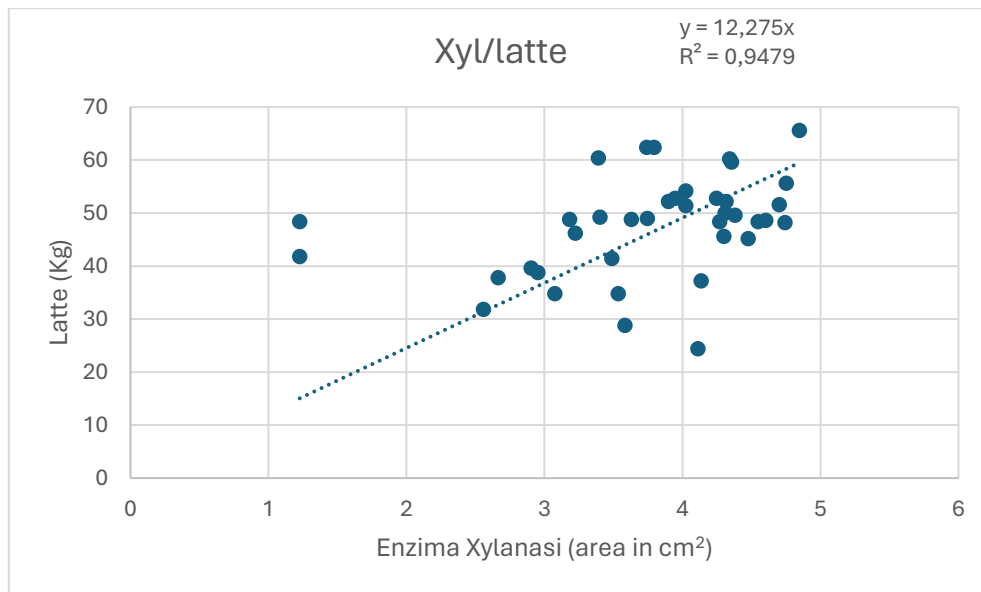
L'attività enzimatica delle Xylanasi, valutata come area in  $\text{cm}^2$  di alone enzimatico, ha riportato una correlazione positiva moderatamente debole non significativa con i kg di latte prodotti dall'animale ( $r = 0.373$ ) e una regressione con  $R^2 = 0.947$  (grafico 5).

La relazione tra le Xylanasi valutata come area in  $\text{cm}^2$  e la produzione di latte espressa in Kg ha riportato una correlazione positiva, in quanto le Xylanasi sono coinvolte nella digestione della fibra grezza, inclusa la cellulosa e l'emicellulosa, presenti nella dieta: una digestione più efficiente della fibra può influenzare positivamente l'efficienza alimentare degli animali, consentendo loro di utilizzare in modo più efficace la materia vegetale consumata e di ottenere un maggiore apporto energetico dalla loro dieta (Petch-Cervantes et al., 2021).

La presenza della Xylanasi può contribuire a mantenere l'ambiente microbico equilibrato nel rumine, migliorando la salute digestiva complessiva.

Studi scientifici hanno dimostrato che l'uso delle Xylanasi in alcune diete per animali da reddito può portare a miglioramenti nella produzione di latte, ma l'efficacia può variare a seconda delle circostanze specifiche dell'allevamento (Romero et al., 2016).



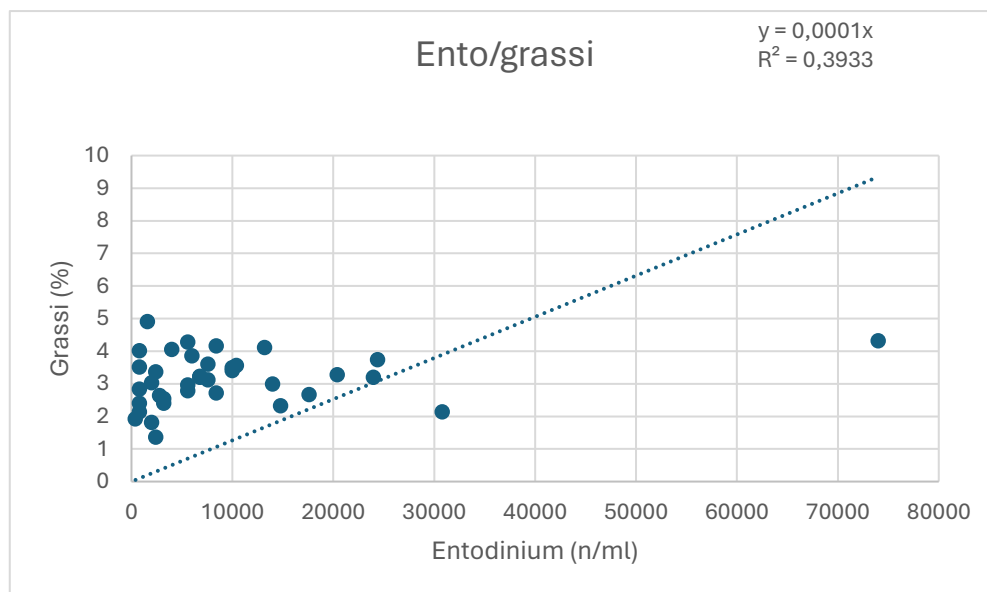


*Grafico 5 - coefficiente di determinazione risultato dal rapporto tra l'attività della Xylanasi valutata come area in cm<sup>2</sup> e la produzione in Kg di latte.*

La correlazione tra il contenuto percentuale di grassi e il numero di protozoi *Entodinium* per ml è risultata moderatamente debole ( $r = 0.230$ ) con una coefficiente di regressione lineare altrettanto basso ( $R^2 = 0.393$ ).

Tale correlazione, che è possibile osservare nel grafico 6, è risultata moderatamente debole, in quanto potrebbe essere possibile che una maggiore presenza di protozoi *Entodinium* nel rumine possa influenzare indirettamente il contenuto di grassi nel latte attraverso la produzione di AGV e la modulazione del metabolismo energetico dell'animale. Tuttavia, è importante considerare che vi sono diversi fattori coinvolti e che la relazione potrebbe non essere direttamente

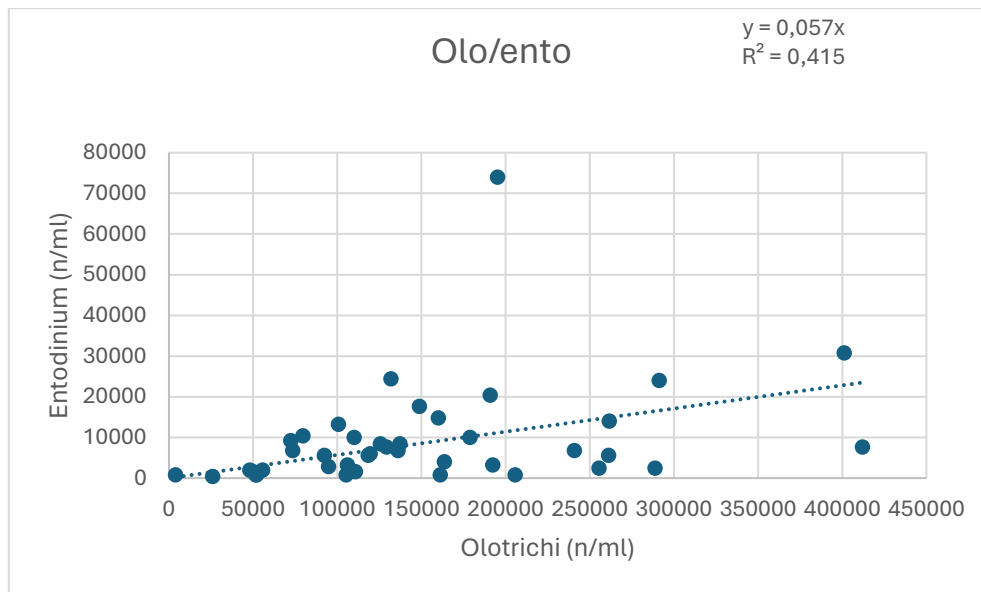
proporzionale o inversamente proporzionale, come già osservato negli studi di Brainbridge et al. del 2018.



*Grafico 6 – coefficiente di determinazione in relazione alla percentuale di grasso e il numero dei protozoi Entodinium per ml.*

Il numero di protozoi contenuti su ml, tra Olotrichi ed *Entodinium* riporta anche esso un coefficiente di correlazione moderatamente basso, ma con una tendenza alla significatività ( $r = 0.317$ ,  $p = 0.04$ ), risultato in un coefficiente di regressione lineare di  $R^2 = 0.415$ .

È stato constatato che il numero di protozoi Olotrichi e di protozoi *Entodinium* contenuti su ml per quanto risulti basso presenta una tendenza alla significatività, come riportato nel grafico 7. Gli studi di Franzolin e Dehority del 1996 condividono il concetto che il contenuto dei nutrienti nella dieta ha un'enorme influenza sulla popolazione di protozoi Olotrichi e di protozoi *Entodinium* e di come questi svolgano la loro attività degradativa della fibra, in particolar modo delle cellulose ed emicellulose. Si è osservato che le razioni con diverse livelli di fibra, carboidrati e proteine possono influenzare la crescita e la diversità dei protozoi: una dieta ricca di fibre tende a favorire la crescita dei protozoi ciliati, mentre una dieta ricca di amido tende a favorire la crescita di altre specie di protozoi.



*Grafico 7 - coefficiente di regressione in relazione al contenuto per ml di protozoi Olotrichi e protozoi Entodinium.*

Particolare attenzione va rivolta verso il coefficiente di correlazione tra il numero per ml di Olotrichi e la ttaDMD, risultando in una buona interazione statisticamente significativa ( $r = 0.506$ ;  $P = 0.001$ ) e un coefficiente di regressione  $R^2 = 0.7914$ .

In questo studio la ttaDMD presenta una buona interazione statisticamente significativa con il numero di protozoi Olotrichi contenuti per ml, come è possibile osservare nel grafico 8: i protozoi Olotrichi sono noti per la loro capacità di digerire la cellulosa, una componente fibrosa che somministrata ai ruminanti. La loro attività nella digestione della cellulosa può contribuire alla quantità di materia secca digerita e di conseguenza alla ttaDMD complessiva; inoltre, i protozoi Olotrichi interagendo con gli altri microrganismi presenti nel rumine, favoriscono una maggiore efficacia nella digestione e nell'assorbimento dei nutrienti, e quindi possono influenzare positivamente la ttaDMD (Fessenden et al, 2017).

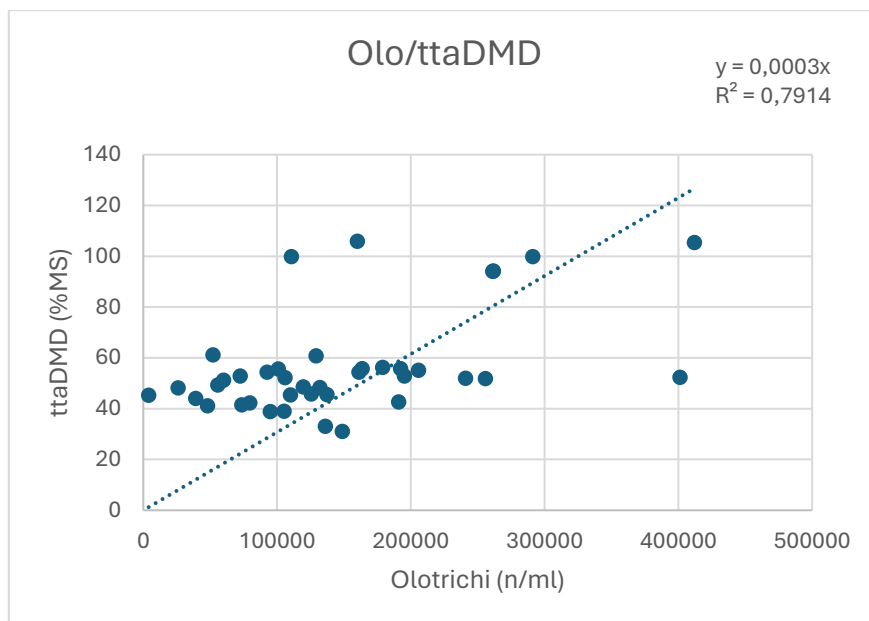


Grafico 8 – coefficiente di correlazione tra il numero per ml di protozoi Olotrichi e la ttaDMD.

## 5. Conclusioni

Questo studio ha coinvolto 47 campioni di liquido ruminale da cui è stata estratto il pellet ruminale, tramite centrifugazione differenziale. È stato possibile constatare come il pellet ruminale estratto sia correlato positivamente con la percentuale di lattosio nel latte, l'ECM, il numero di Olotrichi per ml di liquido ruminale, i kg di latte prodotti e ttaDMD. A differenza di questi, è risultata essere debole la correlazione tra il numero per ml tra protozoi Olotrichi e protozoi *Entodinium*, così come la percentuale di grassi e il numero di protozoi *Entodinium* per ml.

I risultati riportati in questo studio confermano e descrivono ulteriormente come l'ambiente ruminale incida direttamente sulle performance produttive della bovina da latte.

Nonostante gli interessanti risultati riportati, bisogna tenere presente che all'interno di un allevamento vi sono diverse variabili che possono incidere sulla microflora ruminale e su come questa svolga la sua attività degradativa, quali lo stato di salute e benessere, la dieta, la genetica e la gestione delle bovine da latte.



## BIBLIOGRAFIA

AFRC. (1992). Energy and Protein Requirements of Ruminants. CAB International Wellington, UK.

Arriola, K.G., Kim, S.C., Staples, C.R., Adesogan, A.T., 2011. Effect of fibrolytic enzyme application to low- and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 94, 832–841.

Bach, A., Calsamiglia, S., Stern, M.D. (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 88, E9–E21.

Balcells, J., Guada, J.A., Castrillo, C., Gasa, J. (1991). Urinary excretion of allantoin and allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusion into the duodenum. *J. Agric. Sci.* 116, 309–317.

Banhazi, T. M., Babinszky, L., Halas, V., & Tscharke, M. (2012). Precision Livestock Farming: Precision feeding technologies and sustainable livestock production. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 5(4), 54-61.

Beauchemin, K.A., Jones, S.D.M., Rode, L.M., Sewalt, V.J.H., 1997. Effects of fibrolytic enzymes in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 77, 645–653.

Blümmel M, Moss A, Givens I, Makkar HPS, Becker K. 1999. Preliminary studies on the relationship of microbial efficiencies of roughages in vitro and methane production in vivo. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 8:76

Blümmel M, Schroder A, Sodekum KH and Becker K. 1999a. Estimating ruminal microbial efficiencies in silage-fed cattle: Comparison of an in vitro method with a combination of in situ and in vivo measurements. *Journal of Animal Physiology Animal Nutrition.* 81: 57-67

Cabrita, A. R. J., Bessa, R. J. B., Alves, S. P., Dewhurst, R. J., & Fonseca, A. J. M. (2007). Effects of dietary protein and starch on intake, milk production, and milk fatty acid profiles of dairy cows fed corn silage-based diets. *Journal of dairy science*, 90(3), 1429-1439.

Chen G, Sniffen C J and Russel JB. (1987). Concentration and estimated flow of peptides from the rumen of dairy cattle: Effects of protein solubility and feeding frequency. *Journal of Dairy Science*. 70:983-992.

Chen, X.B., Hovell, F.D.D., Ørskov, E.R. (1990). Excretion of purine derivatives by ruminants — recycling of allantoin into the rumen via saliva and its fate in the gut. *Br. J. Nutr.* 63, 197–205.

Chen, X.B., Hovell, F.D.D., Ørskov, E.R., Brown, D.S. (1990). Excretion of purine derivatives by ruminants — effect of exogenous nucleic-acid supply on purine derivative excretion by sheep. *Br. J. Nutr.* 63, 131–142.

Chen, X.B., Ørskov, E.R., Hovell, F.D.D. (1990). Excretion of purine derivatives by ruminants — endogenous excretion, differences between cattle and sheep. *Br. J. Nutr.* 63, 121–129

Cheng, Y., Wang, Y., Li, Y., Zhang, Y., Liu, T., Wang, Y., ... & Zhu, W. (2017). Progressive colonization of bacteria and degradation of rice straw in the rumen by Illumina sequencing. *Frontiers in microbiology*, 8, 2165.

Clark, J., Klusmeyer, T., & Cameron, M. (1992). To the Duodenum of Dairy Cows<sup>1</sup>. *J Dairy Sci*, 15(2323), 2304.

Dai, X., Zhu, Y., Luo, Y., Song, L., Liu, D., Liu, L., ... & Dong, X. (2012). Metagenomic insights into the fibrolytic microbiome in yak rumen. *PloS one*, 7(7), e40430.

Depies K. K., Armentano L. E. (1995). Partial Replacement of Alfalfa Fiber with Fiber from Ground Corn Cobs or Wheat Middlings. *Journal of Dairy Science* Vol. 78 No. 6:1328-1335.

Dijkstra, J. (1994). Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen. *Livest. Prod. Sci.* 39, 61–69.

Fessenden, S. W., Hackmann, T. J., Ross, D. A., Foskolos, A., & Van Amburgh, M. E. (2017). Ruminal bacteria and protozoa composition, digestibility, and amino acid profile determined by multiple hydrolysis times. *Journal of dairy science*, 100(9), 7211-7226.

Firkins, J.L., Hristov, A.N., Hall, M.B., Varga, G.A., St-Pierre, N.R. (2006). Integration of ruminal metabolism in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89, E31–E51

Fliegerova, K., Kaerger, K., Kirk, P., Voigt, K. (2015). Rumen Fungi. In: Puniya, A., Singh, R., Kamra, D. (eds) Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution. Springer, New Delhi.

Giesecke, D., Ehrentreich, L., Stangassinger, M., Ahrens, F. (1994). Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77, 2376–2381.

Goff, J. P. (2006). Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. *Animal Feed Science and Technology*, 126(3–4), 237–257.

Goff, J. P. (2018). Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 2763–2813.

González-Ronquillo, M., Balcells, J., Belenguer, A., Castrillo, C., Mota, M. (2004). A comparison of purine derivatives excretion with conventional methods as indices of microbial yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 2211–2221.

González-Ronquillo, M., Balcells, J., Guada, J.A., Vicente, F. (2003). Purine derivative excretion in dairy cows: endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. *J. Dairy Sci.* 86, 1282–1291.

Grothmann, F., Nydegger, C., Moritz, C., Bisaglia. (2010). Automatic feeding systems for dairy cattle - potential for optimization in dairy farming. *Conference on Agricultural Engineering: towards environmental technologies*.

H. Steinfeld, P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales, and C. de Haan, *Livestock's Long Shadow: environmental issues and options*, Food and Agriculture Organization (FAO), Rome 2006, pp. 390 sgg.

Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., & Janssen, P. H. (2015). Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific reports*, 5(1), 14567.

Hoover, W. H., & Stokes, S. R. (1991). Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *Journal of dairy science*, 74(10), 3630-3644.



Huws, S. A., Creevey, C. J., Oyama, L. B., Mizrahi, I., Denman, S. E., Popova, M., ... & Morgavi, D. P. (2018). Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. *Front Microbiol* 9: 2161.

Lana, R. P., Russell, J. B., & Van Amburgh, M. E. (1998). The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *Journal of animal science*, 76(8), 2190-2196.

Lee, C. G., Baba, Y., Asano, R., Fukuda, Y., Tada, C., & Nakai, Y. (2020). Identification of bacteria involved in the decomposition of lignocellulosic biomass treated with cow rumen fluid by metagenomic analysis. *Journal of bioscience and bioengineering*, 130(2), 137-141.

Liu, N., Qi, J., An, X., & Wang, Y. (2023). A Review on Information Technologies Applicable to Precision Dairy Farming: Focus on Behavior, Health Monitoring, and the Precise Feeding of Dairy Cows. *Agriculture*, 13(10), 1858.

Lopes, F., Cook, D. E., & Combs, D. K. (2015). Validation of an in vitro model for predicting rumen and total-tract fiber digestibility in dairy cows fed corn silages with different in vitro neutral detergent fiber digestibilities at 2 levels of dry matter intake. *Journal of Dairy Science*, 98(1), 574-585.

Mariani P., Podestà A. (2019). *Biochimica e biotecnologia del rumine*.

Mertens, D. R. (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *AOAC Int.* 85:1217-1240.

Monteiro, A., Santos, S., & Gonçalves, P. (2021). Precision agriculture for crop and livestock farming—Brief review. *Animals*, 11(8), 2345.

Moraïs S., Mizrahi i., Islands in the stream: from individual to communal fiber degradation in the rumen ecosystem, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 43, Issue 4, July 2019, Pages 362–379

N. Alexandratos, J. Bruinsma, *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision*, ESA Working paper No. 12-03, FAO, Roma 2012.

Newbold, C. J., De La Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., & McEwan, N. R. (2015). The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in microbiology*, 6, 1313.

- Nguyen, L. N., Nguyen, A. Q., Johir, M. A. H., Guo, W., Ngo, H. H., Chaves, A. V., & Nghiem, L. D. (2019). Application of rumen and anaerobic sludge microbes for bio harvesting from lignocellulosic biomass. *Chemosphere*, 228, 702-708.
- Nuzback, D. E., Bartley, E. E., Dennis, S. M., Nagaraja, T. G., Galitzer, S. J., & Dayton, A. D. (1983). Relation of rumen ATP concentration to bacterial and protozoal numbers. *Applied and environmental microbiology*, 46(3), 533-538.
- Ozbayram, E. G., Ince, O., Ince, B., Harms, H., & Kleinstaub, S. (2018). Comparison of rumen and manure microbiomes and implications for the inoculation of anaerobic digesters. *Microorganisms*, 6(1), 15.
- Pathak, A. K. (2008). Various factors affecting microbial protein synthesis in the rumen. *Veterinary World*, 1(6), 186.
- Pech-Cervantes, A. A., Ogunade, I. M., Jiang, Y., Estrada-Reyes, Z. M., Arriola, K. G., Amaro, F. X., ... & Adesogan, A. T. (2021). Effects of a xylanase-rich enzyme on intake, milk production, and digestibility of dairy cows fed a diet containing a high proportion of bermudagrass silage. *Journal of Dairy Science*, 104(7), 7671-7681.
- Romagnolo D., Polan C.E., Barbeau W.E. (1991). Electrophoretic analysis of ruminal degradability of corn proteins. *J. Dairy Sci.*
- Romero, J. J., Macias, E. G., Ma, Z. X., Martins, R. M., Staples, C. R., Beauchemin, K. A., & Adesogan, A. T. (2016). Improving the performance of dairy cattle with a xylanase-rich exogenous enzyme preparation. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3486-3496.
- Roskopf, R., Giesecke, D. (1992). Investigations in cows on the influence of energy intake on rumen metabolism by means of allantoin excretion in the milk. *J. Vet. Med., Ser. A* 39, 515–524.
- Schwab, C. G., & Ordway, R. S. (2004). Balancing diets for amino acids: Implications on production efficiency and feed costs. In *Proc. Penn State Dairy Cattle Nutrition Workshop*, Grantville, PA (pp. 1-16).
- Setti G., Mattiaccio M. (2018). *L'innovazione nella stalla da latte. Studi ed esperienze*, Edagricole – Edizioni Agricole di New Business Media, Milano.

Stefanon B., Mele M., Pulina G. (2018) Allevamento animale e sostenibilità ambientale. Le tecnologie, Franco Angeli, Milano

Stefanon B., Mele M., Pulina G. (2018). Allevamento animale e sostenibilità ambientale. I principi, Franco Angeli, Milano,

Stern M, Hoover W. (1979). Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: a Review. *J Anim Sci*

Susmel, P., & Stefanon, B. (1993). Aspects of lignin degradation by rumen microorganisms. *Journal of Biotechnology*, 30(1), 141-148.

Tamminga, S., Chen, X.B. (2000). Animal based techniques for the estimation of protein value of forages. In: Givens, D.I., Owen, E., Axford, R.F.E., Omed, H.M. (Eds.), *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 215–232.

Thirumalesh, T., & Krishnamoorthy, U. (2013). Rumen microbial biomass synthesis and its importance in ruminant production. *Int. J. Livest. Res*, 3(2), 5-26.

Topps, J.H., Elliot, R.C. (1965). Relationship between concentrations of ruminal nucleic acids and excretion of purine derivatives by sheep. *Nature* 205, 498–499.

Venter, R. (2009). The effect of liquid rumen-protected lysine supplementation on lactation performance of Holstein cows (Doctoral dissertation, University of Pretoria).

Verbic, J., Chen, X.B., Macleod, N.A., Ørskov, E.R. (1990). Excretion of purine derivatives by ruminants — effect of microbial nucleic acid Infusion on purine derivative excretion by steers. *J. Agric. Sci.* 114, 243–248.

WHO, O. (2017). One health. World Health Organization, 736.

Zebeli, Q., Tafaj, M., Steingass, H., Metzler, B., Drochner, W. (2006). Effects of physically effective fiber on digestive processes and milk fat content in early lactating dairy cows fed total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 89, 651–668.