

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE DELLA NUTRIZIONE E DEGLI ALIMENTI
FEED AND FOOD SCIENCE

Ciclo XXII

Settore scientifico-disciplinare di afferenza: AGR 18

*Fermentazioni ruminanti e fattori che influenzano
le proprietà nutritive dell'erba medica*

Presentato da: Dott. Alberto Palmonari

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof Giuliano Zaghini

Chiar.mo Prof Andrea Formigoni

Esame finale anno 2010

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1 IL RUMINE E IL pH	4
1.2 I FORAGGI	10
1.2.1 L'ERBA MEDICA	11
1.2.1.1 CICLO BIOLOGICO	13
1.2.1.2. CONDIZIONI DELLA MATURAZIONE	14
1.2.1.3 ESIGENZE AMBIENTALI	15
1.2.1.4 LAVORI PREPARATORI DEL TERRENO	16
1.2.1.5 CONCIMAZIONE	17
1.2.1.6 SEMINA	19
1.2.1.7 IRRIGAZIONE	20
1.2.1.8 RACCOLTA	20
1.2.1.9 CONSIDERAZIONI NUTRIZIONALI	21
1.3 CELLULOSA E FIBRA	25
1.4 LE PRINCIPALI SPECIE BATTERICHE RUMINALI	32
1.5 FERMENTAZIONI DELLA CELLULOSA E ADESIONE BATTERICA	41
1.6 METODI ANALITICI PER LA DETERMINAZIONE DELLA QUALITA' DEI FORAGGI	49
2. SCOPO DELLA TESI	54
3. MATERIALI E METODI	56
3.1 DINAMICHE DI pH E COMUNITA' BATTERICHE RUMINALI	56
3.2 PROVE SU ERBA MEDICA	61
3.2.1 PROVA 2007	71
3.2.2. PROVA 2008	72
3.2.3. PROVA 2009	73
3.2.2. PROVA CAMPO 2007	73
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	74
4.1 DINAMICHE DI PH RUMINALI	74
4.2 PROVA CAMPO	82
4.3. PROVA PSB 2007	84
4.4 PROVA 2008 E 2009	89
5. CONCLUSIONI	95
6. BIBLIOGRAFIA	107
7. APPENDICE	115
7.1 PROVA MEDICA 2008	115
7.2 METABOLISMI RUMINALI	119

1. INTRODUZIONE

1.1 IL RUMINE E IL pH

L'apparato digestivo dei ruminanti è caratterizzato da un sistema complesso di stomaci. Il rumine è il primo di questa serie, che comprende, in ordine, il reticolo, l'omaso e l'abomaso. Questi compartimenti agiscono in un modo estremamente coordinato; ciò permette l'esistenza di un ambiente dove avvengono le fermentazioni degli alimenti ingeriti, dove gli stessi vengono continuamente mescolati con i microorganismi che vi abitano, dove le particelle di cibo vengono ridotte, dove i gas di fermentazione vengono assorbiti o espulsi e dove esiste una forte regolazione del flusso degli alimenti digeriti verso gli altri compartimenti (Figura 1).

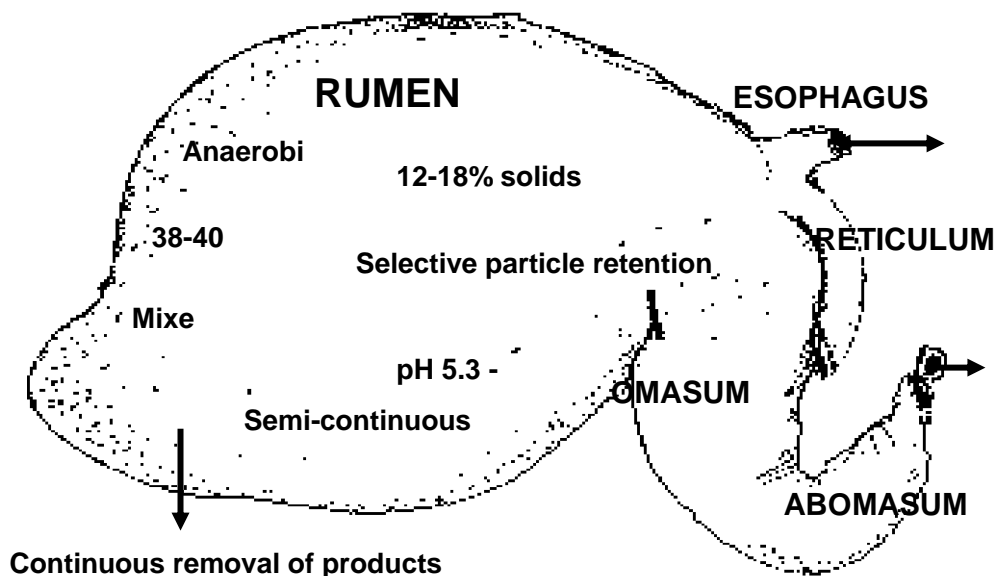


Figura 1. L'anatomia del rumine

L'apparato ruminale rappresenta più del 50% del volume dell'intero apparato gastro – intestinale del ruminante e non meno del 10% della massa totale dell'animale. Il rumine è il più grande di questi compartimenti, ed è il primo sito di fermentazione. E' ricoperto da uno strato di epitelio molto variegato, che permette di ampliare la superficie disponibile per

l'assorbimento dei gas di fermentazione. Il rumine di per sé non secerne enzimi o muco, ma risulta estremamente tamponato per via delle secrezioni salivari. All'esterno del rumine si trovano muscoli che ne permettono contrazioni e movimenti continui. Questo induce movimenti del cibo all'interno del rumine stesso, permettendo ai microorganismi di venirne in contatto e a maggiori quantità di gas di essere assorbiti dall'epitelio ruminale.

Alcune parti degli alimenti ingeriti sono però talmente amalgamati con composti indegradabili (come la lignina) da risultare anch'essi inattaccabili dai batteri ruminanti. Tuttavia la maggior parte dei composti proteici o dei carboidrati possono essere digeriti purché rimangano all'interno del rumine per un sufficiente periodo di tempo. La scomparsa di composti potenzialmente digeribili è quindi un processo dinamico controllato da due rates opposti: il tasso di fermentazione (k_d) e tasso di passaggio (k_p). L'ingestione da parte dell'animale, la quantità di acqua assunta, la ruminazione e la salivazione sono tutti fattori in grado di influire sul rapporto tra i due rates, così come il trattamento che può subire l'alimento. Una granella di mais trattata termicamente o la soia stessa estrusa piuttosto che integrale modificano le dinamiche di digestione o scomparsa ruminale. Anche le caratteristiche del foraggio hanno un forte impatto sul comportamento alimentare dell'animale (Mertens, 1997; Faichney G.J., 1986; Van Soest P.J., 1994).

Alcune tipologie di foraggi comportano maggior salivazione da parte dell'animale con conseguente aumento del potere tamponante nel rumine. Tuttavia, l'effetto della saliva è maggiormente spiegabile con meccanismi di omeostasi. Il bicarbonato di sodio o potassio che sono presenti nella saliva stessa hanno concentrazioni all'interno del rumine decisamente costanti, poiché la pressione osmotica ruminale è prossima a quella del plasma e dei fluidi interstiziali. Di conseguenza, appare più plausibile che

la salivazione agisce sul tasso di diluizione del liquido ruminale. Gli acidi di fermentazione vengono così distribuiti nella fase liquida e possono essere assorbiti più velocemente dalla mucosa, evitando un accumulo potenzialmente dannoso all'interno del rumine. Una quota di questi acidi giunge poi nell'abomaso dove il pH è più basso e una maggior frazione di AGV è indissociata, con conseguente maggior tasso di assorbimento (Allen M.S., 1997; Russel J.B. et al.,1993). Gli acidi grassi volatili infatti per venire assorbiti devono precedentemente essere protonati, in modo da non trovarsi con alcun gruppo carbossilico libero (Figura 2).

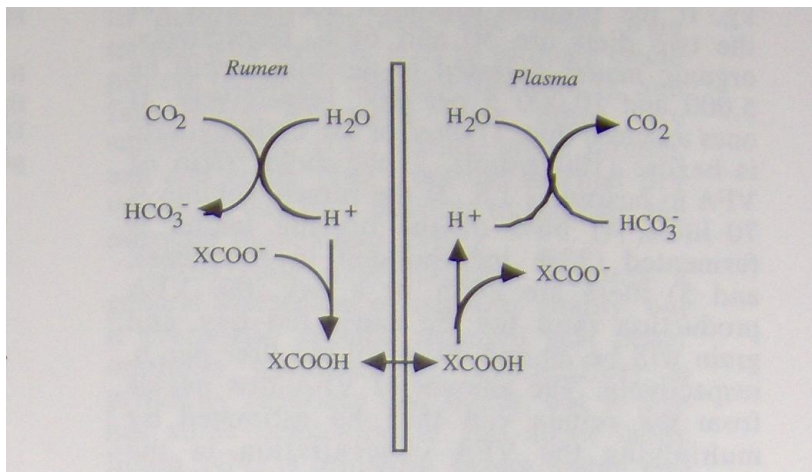


Figura 2. Sistema di assorbimento degli da parte dell'epitelio ruminale

Questo è facilitato dalla capacità dei bicarbonati presenti nella saliva, di donare protoni. La situazione è differente nelle diete povere di fibra. Si assiste così a scarsa salivazione e bassa diluizione del liquor ruminale, fino ad arrivare a un ingente accumulo di acidi all'interno del rumine, con conseguente calo dei valori di pH. Se l'animale non è stato adattato a un cambio di dieta simile, cioè se il rapporto tra foraggi e concentrati della dieta cambia troppo repentinamente, si può giungere a gravi disfunzioni ruminali. I concentrati vengono fermentati rapidamente nel rumine, e diversi batteri che degradano amidi o zuccheri portano alla formazione di acido lattico, che a differenza degli altri acidi grassi volatili più rappresentativi (acetico, butirrico e propionico) possiede una pKa più bassa

(3.9 contro 4.7). Questo significa che a parità di moli prodotte, l'acido lattico libera nel fluido un numero di ioni H^+ dieci volte maggiore rispetto agli altri AGV, con evidenti effetti sul pH. I batteri che producono l'acido lattico sono più resistenti a pH acidi rispetto ad altri batteri, e di conseguenza questo acido continua ad accumularsi, andando ad abbassare sempre di più il pH del rumine. Questa patologia viene definita acidosi ruminale, e in diversi casi può portare alla morte dell'animale.

Il pH quindi è un potente indicatore delle condizioni in cui versa l'ambiente ruminale. Le dinamiche di pH sono caratterizzate da cicli che riflettono il comportamento alimentare dell'animale. In generale il pH è alto nelle ore prima del pasto principale, salvo poi precipitare nelle ore successive, con minimi che si riscontrano dopo circa 6 – 8 ore dopo l'ingestione. Questo è dovuto alla produzione di acidi di fermentazione, tanto maggiore appena l'alimento è disponibile all'interno del rumine. L'assorbimento degli acidi prodotti, la salivazione e la ruminazione, nonché la diminuzione di elementi fermentabili permettono al pH di tornare a più alti valori nelle successive ore che separano i pasti. Queste dinamiche sono simili ma ancor più gravi nel caso in cui l'animale venga alimentato non a volontà ma ad esempio solo due volte al giorno. In questi casi, l'impatto del pasto abbondante ha un effetto maggiore sulla caduta del pH. Nelle condizioni di diete fornite ad libitum invece, meno alimento fermentabile sarà disponibile in ciascun pasto, e il pH difficilmente scenderà a livelli di rischio.

Le considerazioni sul pH quindi non possono includere esclusivamente il valore di pH medio, ma anche le dinamiche giornaliere che il pH segue. Le implicazioni di questo parametro, come confermato da numerosi studi, hanno risvolti sull'appetito dell'animale e sulle fermentazioni della fibra (Allen M.S, et al.,2006). Il requisito principale che permette ai batteri di degradare la cellulosa è la loro stessa adesione alla superficie degli

alimenti. Tuttavia con valori di pH minori di 5.3 la crescita dei batteri cellulosolitici è interrotta, ed inoltre i batteri che già aderivano alle pareti vegetali perdono l'abilità di rimanere adesi a causa dell'idrolisi del biofilm che la permetteva (Russell e Dombrowski, 1980; Mouriño et al., 2001; Shi e Weimer, 1992; Weimer, 1993). Alcuni enzimi extracellulari continuano comunque ad attaccare la cellulosa, ma l'idrolisi avviene molto lentamente (Weimer P.J., 1996).

Date le oscillazioni giornaliere del pH il punto chiave è la permanenza dei valori di pH sotto la soglia di criticità. Il fatto che al momento di massimo delle fermentazioni ruminali il pH cali potrebbe fungere da sistema di controllo interno. Rallentando il processo digestivo della cellulosa, si riduce la produzione di AGV, così da permettere al pH di ristabilirsi entro valori ottimali (Mouriño et al., 2001). Viceversa, se le fermentazioni continuassero a pieno regime, la quota di acidi prodotti supererebbe di molto quella di assorbimento, con effetti molto più gravi sull'intero ecosistema. Questi problemi si riscontrano nel caso in cui i valori di pH si attestino per troppo tempo sotto la soglia minima; come detto in precedenza, l'equilibrio all'interno del rumine viene compromesso, con danni anche gravi sulla salute dell'animale, come l'insorgenza di acidosi ruminale o laminiti (Russell J.B., 2002). Tuttavia, valori di pH adeguatamente bassi (attorno a 6.2 e 5.7) favoriscono l'attività di molti enzimi, e alcuni lavori hanno dimostrato come si riducano le quantità di metano e ammoniaca prodotti nel rumine (Allen M.S., 2006). Questi due composti vengono generalmente utilizzati come indicatori di spreco energetico, nonché fattori inquinanti. Non di minor importanza è il fatto che questi valori di pH permettono di ottenere una maggior quota di AGV indissociati, prerequisito fondamentale per il loro assorbimento. In conclusione, le dinamiche del pH sono fondamentali per permettere un corretto processo fermentativo all'interno del rumine, sia che si parli di

idrolisi della cellulosa che dell'amido o altri zuccheri. I cambi di dieta, soprattutto se si modifica il rapporto tra foraggi e concentrati, non devono essere repentini, ma devono permettere all'animale di adeguarsi alle nuove condizioni. Questo permette di mantenere costanti o in equilibrio le dinamiche di fermentazione all'interno del rumine, di cui le oscillazioni del pH sono un importante indicatore.

1.2 I FORAGGI

Per foraggio si intende l'intera parte vegetativa di una pianta destinata all'alimentazione animale.

I ruminanti, in quanto mammiferi erbivori, necessitano di diete all'interno delle quali sia presente una certa quota vegetale. Questo appare evidente per gli animali lasciati a pascolo, ma è comunque vero anche per quelli inseriti in una stalla con alimentazione controllata.

La componente foraggera è quindi la base su cui ogni nutrizionista imposta la razione, di conseguenza ogni altro componente della dieta viene inserito tenendo conto della qualità del foraggio stesso.

Le specie vegetali utilizzabili come foraggere sono molte, e ciascuna di queste ha alcune proprietà che la distinguono dalle altre. Occorre quindi caratterizzare le diverse specie coinvolte da un punto di vista biologico, nonché evidenziare quelle tecniche agronomiche in grado di modificare lo sviluppo della pianta. Prima però è necessaria una premessa. Le condizioni ambientali in cui la pianta si trova sono un ulteriore fattore che influisce sullo sviluppo. In generale, queste condizioni sono riassumibili nel concetto di stress, distinguibile tra biotico o abiotico. La presenza di parassiti, un clima torrido senza precipitazioni piuttosto che una stagione troppo piovosa o fredda, così come la presenza di un forte vento o poca differenza di temperatura tra giorno e notte, sono tutti fattori di stress a cui la pianta deve rispondere. Al suo interno si attivano dei meccanismi di difesa che nella maggior parte dei casi portano ad una maturazione repentina, alla produzione precoce di semi e all'ispessimento delle pareti cellulari per aumentare la resistenza meccanica o impedire all'acqua di entrare o uscire in quantità troppo elevate. Tutte queste risposte si traducono nella maggior parte dei casi in un calo qualitativo del foraggio. Il polimero che le piante utilizzano prevalentemente come mezzo di difesa o strutturale è la lignina, che come descriverò in seguito, influisce negativamente sulla degradabilità ruminale della fibra..

Per quanto concerne le tecniche agronomiche, come il sistema di irrigazione, le concimazioni e l'epoca di taglio influiscono più o meno severamente a seconda della specie coltivata (Raffrenato et al., 2007; Fusaro et al., 2008). Pertanto questi effetti saranno descritti all'interno della caratterizzazione della specie foraggera più rappresentata in Italia, ovvero l'erba medica.

1.2.1 L'ERBA MEDICA

Tratto da: P.Parini (1982) e M.Onofri, C. Tomasoni (1989).



Figura 3. Erba medica in stadio di fioritura

CARATTERI BOTANICI

Ordine: Rosales

Famiglia: Leguminose o Papillonacee

Genere: *Medicago*

Specie: *M. sativa* è la più importante, tipica delle regioni temperate (Figura 3). Ad essa appartengono le forme più estesamente coltivate sia in Europa che in America.

M. falcata è endemica nelle regioni più settentrionali, coltivata in Asia nord-orientale e in Europa orientale.

M. media è coltivata diffusamente in Europa settentrionale e nel nord degli USA. Deriva dall'ibridazione di *M. sativa* e *M. falcata*. È caratterizzata da una grandissima variabilità e presenta caratteristiche morfologiche, fisiologiche e agronomiche intermedie tra la due. È dotata di resistenza al freddo superiore a quella di *M. sativa* per cui le coltivazioni possono essere estese a latitudini più elevate.

L'erba medica è una pianta perenne, provvista di apparato radicale fittonante molto robusto che raggiunge alcuni metri di profondità. Gli steli sono eretti o suberetti e si originano dalla corona (parte basale della pianta); sono cavi, più o meno angolosi, ramificati e con nodi basali molto ravvicinati. Le foglie sono alterne, trifogliate con la fogliolina mediana inserita su un picciolo più lungo di quelle laterali. I fiori sono riuniti in racemi che si dipartono dal fusto in posizione ascellare e presentano una piccola brattea alla base del peduncolo (Figura 4).



Figura 4. Erba medica in stadio di pre – fioritura.

1.2.1.1 CICLO BIOLOGICO

GERMINAZIONE: consiste nel trasferimento delle sostanze di riserva dai cotiledoni all'embrione, il quale le utilizza per svilupparsi in plantula. Affinché il processo avvenga è indispensabile che il seme abbia una sufficiente disponibilità idrica e si trovi a temperatura adeguata. Infatti, la rapida emissione della radichetta è estremamente importante per l'insediamento della coltura. Parallelamente si ha l'allungamento dell'asse ipocotile, il quale assume forma arcuata ed ha la funzione di trascinare i cotiledoni attraverso lo strato di terreno che ricopre il seme fino a farli fuoriuscire e metterli in condizione di iniziare il processo fotosintetico. Si passa così dallo stadio eterotrofico, dove la plantula viveva a spese delle sostanze di riserva contenute nei cotiledoni, allo stadio di transizione, dove contribuiscono alla crescita sia le sostanze di riserva non ancora utilizzate che i prodotti della fotosintesi iniziata dai cotiledoni.

La durata della fase di germinazione può essere molto variabile in dipendenza di vari fattori:

- *TEMPERATURA*: l'erba medica è abbastanza tollerante e può germinare entro un intervallo abbastanza ampio. Le medie giornaliere da ritenersi ottimali per l'emergenza della plantula sono 24° C, al di sopra dei 35° C o al di sotto dei 10° C invece l'emergenza tende ad annullarsi.
- *LIVELLO DI SALINITA'*: la medica è ritenuta da mediamente sensibile a mediamente tollerante. La % dei semi che germinano diminuisce con l'aumentare della pressione osmotica del terreno.
- *ETA' DEL SEME*: condiziona l'intensità dell'attività enzimatica.
- *GROSSEZZA DEL SEME*: condiziona la quantità di sostanze di riserva disponibili.

1.2.1.2. CONDIZIONI DELLA MATURAZIONE

SVILUPPO VEGETATIVO: fase in cui si verifica l'”accrescimento contrattile”. Dopo l'emergenza dei cotiledoni, l'ipocotile e la parte superiore della radice iniziano a contrarsi in lunghezza e ad espandersi in diametro. I primi 2 o 3 internodi vengono trascinati verso il basso e all'ascella delle prime foglie si differenziano delle gemme, alcune delle quali si sviluppano in ramificazioni con comportamento rizomatoso. L'insieme delle porzioni basali dello stelo e di queste ramificazioni costituisce la *corona* sulla quale, già prima della fine della prima stagione, si differenziano altre gemme avventizie che si svilupperanno in steli alla successiva ripresa vegetativa. Le porzioni basali delle ramificazioni dello stelo principale, anche se chiamati rizomi, non emettono radici avventizie per cui la corona di una vecchia pianta di medica può essere molto ramificata ma mai molto estesa.

La corona svolge funzione di deposito insieme alla radice ed è da essa che si sviluppano gli steli e che prende origine la produzione. Quando con un taglio viene asportata la parte vegetativa, alcune gemme della corona interrompono lo stato di dormienza, vengono mobilizzate le sostanze di riserva e si sviluppano nuovi steli. Affinché la pianta sia in grado di riprendere vigorosamente lo stato vegetativo dopo il taglio, è necessario che nel periodo immediatamente precedente abbia goduto di condizioni favorevoli di sviluppo e di accrescimento per un tempo sufficientemente prolungato.

SVILUPPO RADICALE: è molto rapido per cui, già poco tempo dopo la germinazione, assume il tipico aspetto fittonante. Le ramificazioni sono normalmente scarse, ma possono variare a seconda della cultivar e delle condizioni del suolo. All'estremità della radice principale e di quelle secondarie si sviluppa un ricco capillizio da dove vengono assorbiti H₂O ed

elementi nutritivi dal terreno. La grande profondità a cui può arrivare il fittone conferisce alla pianta una notevole resistenza alla siccità in terreni profondi.

1.2.1.3 ESIGENZE AMBIENTALI

FOTOPERIODO: le radiazioni luminose rivestono notevole importanza nel determinare l'intensità della fotosintesi. L'assorbimento giornaliero di CO₂ segue l'andamento dell'intensità luminosa: raggiunge il massimo tra le 10 e le 11 ed inizia a decrescere dopo le 14. Sia la produzione di sostanza secca che la fioritura sono stimolate dal fotoperiodo.

TEMPERATURA: esercita anch'essa un ruolo importante sulla fotosintesi. Le temperature ottimali per l'assimilazione di CO₂ e per l'accumulo di sostanza secca sono 15-25° C durante il giorno e 10-20° C durante la notte. Sopra i 30° C e sotto i 5° C la fotosintesi decresce molto rapidamente.

PRECIPITAZIONI: influenzando la dotazione idrica del terreno possono avere peso sulla fotosintesi e quindi sui livelli produttivi raggiungibili dalla pianta. Un'anomala dotazione idrica del terreno ha maggiori effetti negativi sulla fotosintesi quando l'H₂O è in eccesso rispetto a quando è in difetto. Sembra non essere influenzata fin quando l'umidità del terreno non scende sotto il 35% dell'H₂O disponibile massima. Al contrario brevi periodi di ristagno idrico possono ridurre la fotosintesi del 30%.

In caso di periodi di siccità anche prolungati la pianta può entrare in dormienza e riprendere a vegetare allorché venga ripristinata un'adeguata umidità del terreno. Un eccesso idrico, anche se non prolungato, porta, se la pianta è in vegetazione, ad asfissia dell'apparato radicale ed alla morte.

NATURA FISICA DEL TERRENO: condiziona lo stato idrico del terreno. La medica non ha particolari esigenze, purché sia profondo e ben drenato in

modo che la radice possa penetrare senza incorrere in pericoli di ristagno idrico.

pH DEL TERRENO: la medica è molto sensibile all'acidità, valori tra 6,5 e 7,5 sembrano ottimali.

TERRENO: dovrebbe essere caratterizzato da elevata fertilità con una buona dotazione di P e K assimilabili. Preferibili terreni con buona dotazione di sostanza organica ma non in eccesso. Molto adatti alla coltivazione della medica sono i terreni con matrice calcarea o gessosa.

1.2.1.4 LAVORI PREPARATORI DEL TERRENO

Si inizia con un'aratura abbastanza profonda (35-45cm) per interrare i residui della coltura precedente. Sarebbe da eseguire prima dell'inverno per dare modo agli agenti atmosferici di agire. Alla fine dell'inverno può essere effettuata un'estirpatura con gli scopi di pareggiare il terreno e di rimuovere la vegetazione infestante. Prima dell'estirpatura o subito dopo viene effettuata la concimazione d'impianto. Si procede poi con una o più erpicature per pareggiare il terreno e per sminuzzarlo in modo da renderlo adatto alla semina.

Se la semina è avvenuta in un terreno scarsamente umido o se la preparazione non è stata molto accurata, dopo seminato, si può procedere ad una leggera rullatura con il fine di facilitare il contatto tra seme e terreno.

Le finalità di questi lavori sono ottenere un letto di semina sgombro da malerbe, sminuzzarlo per avere un buon contatto tra seme e terreno e perché il seme possa essere situato alla profondità desiderata. In caso di terreni di difficile sgrondo gli interventi devono tendere a favorire la penetrazione di H₂O in profondità in modo da non creare le condizioni di ristagno idrico.

1.2.1.5 CONCIMAZIONE

Per determinare il tipo di concimazione da adottare sono da tenere in considerazione la dotazione del terreno di elementi nutritivi, l'entità delle asportazioni in relazione alle produzioni che si desidera raggiungere e le condizioni climatiche. L'influenza delle condizioni climatiche è particolarmente incidente nel K, poiché l'assorbimento può essere difficoltoso sia in caso di aridità che in presenza di precipitazioni eccessive (limitazione alla disponibilità di O₂ necessario per la respirazione e l'assorbimento di K). La richiesta di elementi è costante ed intensa durante tutto il ciclo produttivo.

- AZOTO: elemento che non desta elevata preoccupazione in quanto la medica instaura un rapporto di simbiosi con i rizobi del terreno. Per un'adeguata nutrizione è sufficiente che si verifichino le condizioni affinché il rapporto simbiotico si instauri, si mantenga e sia efficiente.

In condizioni non ottimali di clima o di terreno, o quando questo presenta livelli bassi di sostanza organica, o quando si sospetta che l'attività del rizobio possa essere rallentata è opportuno somministrare 25-30 kg/ha di N in modo da facilitare l'insediamento della coltura fino al momento in cui non si sarà instaurato un efficiente rapporto simbiotico.

- FOSFORO: il fabbisogno dipende dal quantitativo di P disponibile nel terreno e dal livello produttivo del medicaio. In terreni con media dotazione fosfatica si effettua una concimazione in presemina con 150-200 kg/ha di P₂O₅. Il fertilizzante può essere applicato prima della semina, al momento della semina o distribuito a spaglio in un secondo momento a coltura già affrancata.

Il P è assorbito molto rapidamente dalle giovani piante per cui è importante che ci sia un'elevata disponibilità nei primi periodi di

sviluppo e accrescimento, in modo particolare quando le condizioni ambientali non sono ottimali e la fertilità non è elevata. E' suggerita l'adozione della semina a file e la distribuzione localizzata di almeno una parte del fertilizzante fosfatico.

Non è stata dimostrata differenza tra la somministrazione unica o la distribuzione frazionata del medesimo quantitativo per gli anni di durata della coltura.

- POTASSIO: elemento molto importante per produrre del foraggio di buona qualità. La concentrazione è particolarmente elevata nella pianta giovane perciò la richiesta di K è tanto maggiore quanto più intensivo è lo sfruttamento del medicaio. Se non è presente in sufficiente quantità il medicaio degenera rapidamente e si infesta di graminacee dotate di maggiore competitività rispetto alla medica.

La quantità di K richiesta per l'insediamento della coltura è più bassa di quella necessaria al suo mantenimento, date le minori produzioni durante l'anno d'impianto. I quantitativi di K_2O asportati sono circa 250 kg/ha, per mantenere un bilancio positivo è necessario somministrare dai 250 ai 350 kg/ha/anno di K_2O che consentono di mantenere la produzione su livelli elevati.

Il potassio viene generalmente somministrato prima della semina incorporandolo nel terreno, può essere distribuito in parte anche in copertura nel corso del ciclo produttivo. La somministrazione in primavera assicura una rapida ripresa vegetativa e favorisce, nel secondo taglio, l'ottenimento di produzioni elevate e di buona qualità.

- Altri elementi importanti sono Mg, S, B, Cu, Mn, Fe, Zn e Mo ma sono solitamente presenti in sufficiente quantità nel terreno o nei normali fertilizzanti.

1.2.1.6 SEMINA

La semina “primaverile” è la più consigliata in quanto sussistono le migliori condizioni termiche affinché la germinazione e l’emergenza avvengano con rapidità, si abbia un pronto affrancamento delle piantine e si instauri un efficace rapporto simbiotico con il rizobio. Il terreno è solitamente ben umidificato e le precipitazioni garantiscono un approvvigionamento idrico fino a stagione inoltrata, quando la pianta avrà sviluppato sufficientemente l’apparato radicale da poter resistere a periodi siccitosi. Nella valle padana la semina primaverile si effettua nel mese di marzo.

La semina “autunnale” viene fatta a fine estate-autunno, deve essere eseguita sufficientemente presto perché la pianta, prima di interrompere la fase vegetativa, raggiunga uno sviluppo tale da superare senza danni i mesi invernali. Sconsigliata nell’Italia settentrionale.

Utilizzare da 20-25 a 35-40 kg/ha di seme in terreni pesanti, arrivare fino a 50-60 kg/ha quando la semina avvenga in condizioni precarie e lasci presumere, oltre a difficoltà di germinazione e di emergenza, anche difficoltà di sopravvivenza. Nei primi stadi di sviluppo si verificano diradamenti spontanei dipendenti dalla competizione tra le giovani piante.

La profondità di semina ottimale è 1.1,5 cm, può avvenire a file o a spaglio. A file è più consigliata perché garantisce una più pronta e completa emergenza, permette di eseguire una concimazione fosfatica localizzata che favorisce il rapido sviluppo delle piante. La semina a spaglio è più pratica, ma risulta più difficile disporre il seme alla corretta profondità.

1.2.1.7 IRRIGAZIONE

I consumi idrici stagionali variano da 6 a 9000 m³/ha nei nostri ambienti. Per stabilire il momento per l'irrigazione ed il quantitativo di H₂O da utilizzare bisogna considerare la capacità idrica del terreno e i fabbisogni della coltura. La medica ha una buona capacità di sfruttare le riserve idriche profonde. Le migliori condizioni di accrescimento si hanno quando l'H₂O nella zona radicale è tra il 35% e l'85% dell'H₂O disponibile. In terreni poco profondi o con bassa capacità di trattenuta l'irrigazione dovrà essere effettuata quando l'umidità del terreno è il 50% dell'H₂O disponibile.

Il momento per l'intervento di irrigazione dovrebbe consentire che il terreno sia abbastanza asciutto quando si effettua la raccolta per permettere una buona fienagione. Il momento ideale è quello che segue la raccolta perché la pianta deve avere a disposizione grandi quantitativi di H₂O per ricostituire la copertura vegetale del taglio successivo.

I metodi maggiormente impiegati sono lo scorrimento superficiale e l'aspersione.

1.2.1.8 RACCOLTA

Dal punto di vista della pianta il momento migliore sarebbe in piena fioritura. La produzione di sostanza secca è più elevata e la pianta accumula carboidrati di riserva nelle radici. La medica tagliata in prefioritura ha un'elevata concentrazione di sostanze nutritive ma la produzione è inferiore e calano le sostanze nutritive digeribili. Le più elevate produzioni di sostanze digeribili si ottengono se si taglia al 10% della fioritura. Bisogna salvaguardare la presenza delle foglie poiché contengono quantitativi elevati di elementi nutritivi rispetto agli steli.

Sulla base della frequenza di taglio deve essere regolata la concimazione.

Le produzioni annue con una buona coltura sono intorno a 120-130 q/ha di fieno. Nell'anno dell'impianto si produce poco più della metà, così come nell'ultimo che può essere il 3° o 4°.

1.2.1.9 CONSIDERAZIONI NUTRIZIONALI

Dal punto di vista zootecnico, la medica è in Italia il foraggio più utilizzato nelle diete. Occorre però distinguere i diversi tagli. Il primo taglio è spesso un insieme di erba medica e infestanti, principalmente graminacee dato lo scarso utilizzo degli erbicidi. All'analisi chimica di laboratorio, la presenza di altre specie appare evidente. In quanto leguminosa, l'erba medica presenta una scarsa percentuale di emicellulose, e di conseguenza la fibra è rappresentata all'80% da cellulosa, pectine e lignina. Nelle graminacee le emicellulose sono più presenti; all'analisi chimica, un primo taglio mostra un contenuto di cellulosa, pectine e lignina pari a circa il 70% della fibra totale. La situazione cambia nei tagli successivi, che rappresentano meglio le caratteristiche tipiche di un fieno di medica pura (Formigoni et al., 2008).

Il fieno di medica viene considerato come buon apporto di fibra e di proteine; in genere se il contenuto proteico della razione è troppo basso, la quota desiderata viene raggiunta inserendo altre specie appartenenti alle leguminose, come la soia. La proteina di medica è di alta qualità, tuttavia buona parte di questa componente viene persa al momento dello sfalcio. L'organo più ricco di proteina nella pianta di medica sono le foglie, attive dal punto di vista fotosintetico, e quindi caratterizzate da un'elevata presenza di enzimi e proteine coinvolti in questo particolare processo. Quando però il fieno viene sfalcato in campo ed essiccato in loco, il distacco delle foglie dal resto della pianta viene facilitato, con conseguente perdita di contenuto proteico e incremento della componente strutturale sul totale. Un altro passaggio critico risulta il trasporto del fieno

stesso, fattore in grado di influire negativamente sulla percentuale di foglie presente. In piante raccolte preservando l'integrità di ogni parte, il contenuto di foglie rappresenta fino al 60% del peso totale. E' quindi evidente che la qualità di un fieno di medica dipende strettamente da come è stato trattato al momento dello sfalcio e del raccolto.

La fibra di medica è morfologicamente differente rispetto a quella da graminacee: le cellule che compongono gli apparati di sostegno della pianta sono disposte in modo irregolare, mentre nella maggior parte dei cereali le cellule hanno una forma rettangolare e sono consecutive l'una all'altra. Questo porta alla formazione di striature visibili anche ad occhio nudo. La struttura amorfa delle cellule di medica comporta invece una più alta deposizione di lignina, ma tuttavia alla masticazione, un fieno di questo tipo è facilmente disgregabile e di conseguenza, la cellulosa viene fermentata più rapidamente all'interno del rumine. Quello che si perde però è la capacità del foraggio di stimolare la ruminazione, cosa che avviene maggiormente con fieni o paglia di graminacee.

Trattandosi di pianta poliennale, l'erba medica risente maggiormente della maturità o invecchiamento rispetto ai cereali annuali. Con il procedere della maturazione, la pianta diminuisce l'energia disponibile per la fotosintesi, e gli zuccheri immagazzinati a livello della corona vengono smobilitati per fornire energia di riserva ai semi; lo stesso destino è riservato alle proteine, anch'esse modificate a scopo di riserva. La pianta inoltre solidifica i fusti per permettere maggior sostegno e facilitare l'impollinazione. Da un punto di vista foraggero questo si traduce in una maggior lignificazione della pianta ed una perdita di valore nutritivo data anche dalla diminuzione della disponibilità proteica (Palmonari et al., 2008). Inserito nella razione, un fieno che presenti queste caratteristiche, sarà scarsamente digerito all'interno del rumine, e la quota proteica dovrà essere corretta, in genere utilizzando altri alimenti spesso più costosi dell'erba medica .

Un altro fattore molto interessante che riguarda la pianta di medica è che non solo morfologicamente ma anche da un punto di vista puramente nutrizionale, essa può essere considerata un insieme di due grandi componenti, i fusti e le foglie. Una situazione simile si presenta con la pianta di mais, ma appartenendo ad una famiglia differente, le diverse componenti della pianta si caratterizzano per peculiarità distinte. Come già discusso in precedenza, salvaguardare le foglie durante le operazioni di sfalcio e raccolto rappresenta un problema annoso; tuttavia la reale portata del problema si definisce analizzando questa componente. Le foglie sono ricche di proteine, in particolare di proteine solubili. Essendo l'organo vegetale grossolanamente responsabile della fotosintesi, la presenza di composti enzimatici e proteici rappresenta valori anche del 35% della sostanza secca. La parte fibrosa, se la pianta non è ancora giunta alla post fioritura, è rappresentata da fibre velocemente degradabili e non ancora lignificate. Inoltre, alla masticazione le foglie risultano facilmente solubilizzabili e friabili. Tutte queste caratteristiche non sono considerate tipiche di un foraggio, ma più simili a quelle di un concentrato (Palmonari et al.,2010). Diverso è invece il comportamento dei fusti, responsabili del sostegno strutturale della pianta. Man mano che la pianta cresce, i fusti si allungano e a partire dai primi centimetri emersi dal suolo, la lignificazione procede, per garantire maggior sostegno e difendere le cellule da possibili stress. Il contenuto proteico è ridotto, e buona parte di queste proteine sono localizzate nella parete cellulare per contribuire a livello strutturale allo sviluppo della pianta. Rispetto alle foglie, i fusti sono sicuramente più attivi nello stimolare la masticazione, ma la biologia della pianta di medica impedisce di ottenere a riguardo risultati simili a quelli dovuti all'impiego di fieni di graminacee. Di conseguenza, sia da un punto di vista fisico che da un punto di vista biologico, la pianta di medica ed i fusti in particolare

sono sì buoni apportato ridi fibra, ma di una fibra morfologicamente differente da quella di altre specie.

In una situazione ambientale e climatica come quella Italiana, frequentemente si possono ottenere anche cinque tagli di medica all'anno. Tuttavia è necessario, sia per il produttore, sia per chi compra il fieno, che la qualità di tale foraggio sia elevata. Come è stato descritto precedentemente, la medica risente molto sia delle condizioni climatiche che del momento dello sfalcio, soprattutto se effettuato in particolari fasi di sviluppo. Occorre quindi saper scegliere molto accuratamente il momento di sfalcio, tenendo presente non solo la quantità di prodotto ma anche e soprattutto la qualità del prodotto stesso, per la medica identificabile con il contenuto proteico e la degradabilità della fibra (Palmonari et al., 2008; Formigoni et al., 2008).

1.3 CELLULOSA E FIBRA

La cellulosa è in assoluto il polimero più abbondante in natura, e possiede una caratteristica abbastanza inusuale, cioè quella di avere una struttura cristallina. La cellulosa viene sintetizzata come molecola unica, disposta in catena lineare, in grado poi di auto assemblarsi presso il sito di biosintesi (Brown et al., 2000). Si è inoltre osservato che, per permettere questa aggregazione, l'emicellulosa associata gioca un ruolo importante (Atalla et al., 1993). Approssimativamente 30 molecole di cellulosa sono poi assemblate in unità più complesse definite proto-fibrille, le quali a loro volta vengono compattate a formare ulteriori strutture dette micro-fibrille. Queste vengono in seguito assemblate così da ottenere quelle che vengono definite fibre di cellulosa (Figura 6).

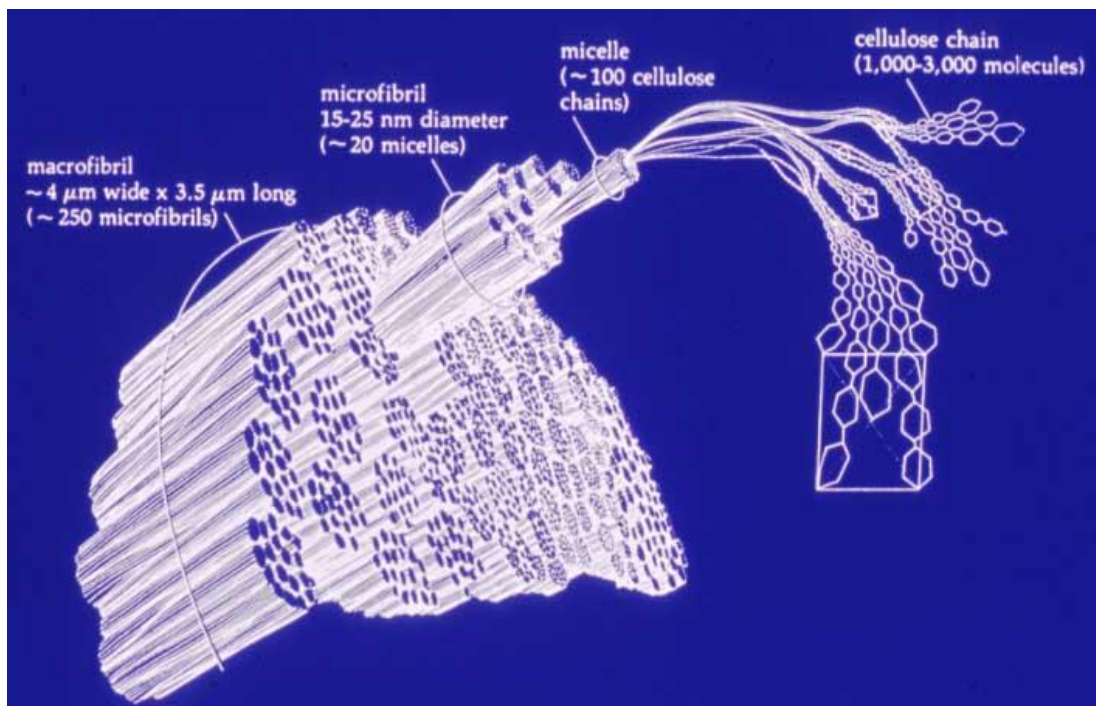


Figura 6. Struttura della macrofibrilla di cellulosa

Le irregolarità che contraddistinguono questo tipo di struttura fanno sì che, in natura, come nelle pareti vegetali, la cellulosa non si trovi mai allo stato completamente cristallino, ma assuma una conformazione amorfa

(Marchessault et al., 1957 - 1993; Blouin et al. 1970; Cowling, 1975; Fan et al., 1980).

Da un punto di vista metabolico, i mammiferi non sono in grado di produrre enzimi che possano degradare questo tipo di materiale. I ruminanti, grazie alla simbiosi con batteri cellulolitici, hanno sviluppato la capacità indiretta di ricavare energia dalla digestione della cellulosa (Figura 7).

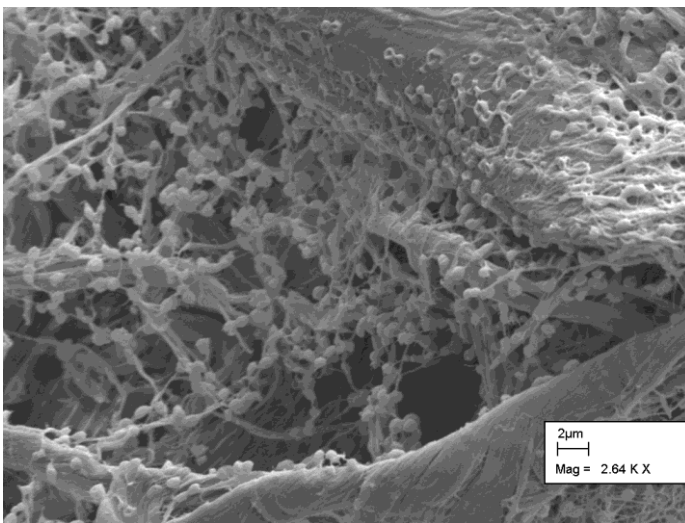


Figura 7. Cellule di *R.albus* adese alla superficie di cellulosa

Come l'amido anche la cellulosa è una struttura ripetitiva di glucosio, però queste due molecole hanno diverse tipologie di legame e strutture fisiche. Le catene di cellulosa sono molto resistenti e solo l'utilizzo di enzimi specifici o acidi forti ne provoca la solubilizzazione.

La capacità della cellulosa di formare legami insolubili riduce drasticamente la superficie esposta all'attacco di enzimi, e questo rappresenta il fattore limitante della sua degradabilità ruminale. L'animale, masticando e ruminando, permette un aumento della superficie disponibile, tuttavia questo processo meccanico ha dei limiti evidenti. L'altro fattore che influisce pesantemente sulla degradabilità della cellulosa è il suo grado di lignificazione (Van Soest, 1994). A parte qualche caso particolare, la

cellulosa si presenta legata ad altri composti, principalmente emicellulosa e lignina. Da un punto di vista biologico, la struttura della cellula vegetale comprende una parete cellulare primaria che avvolge il citoplasma (Figura 8).

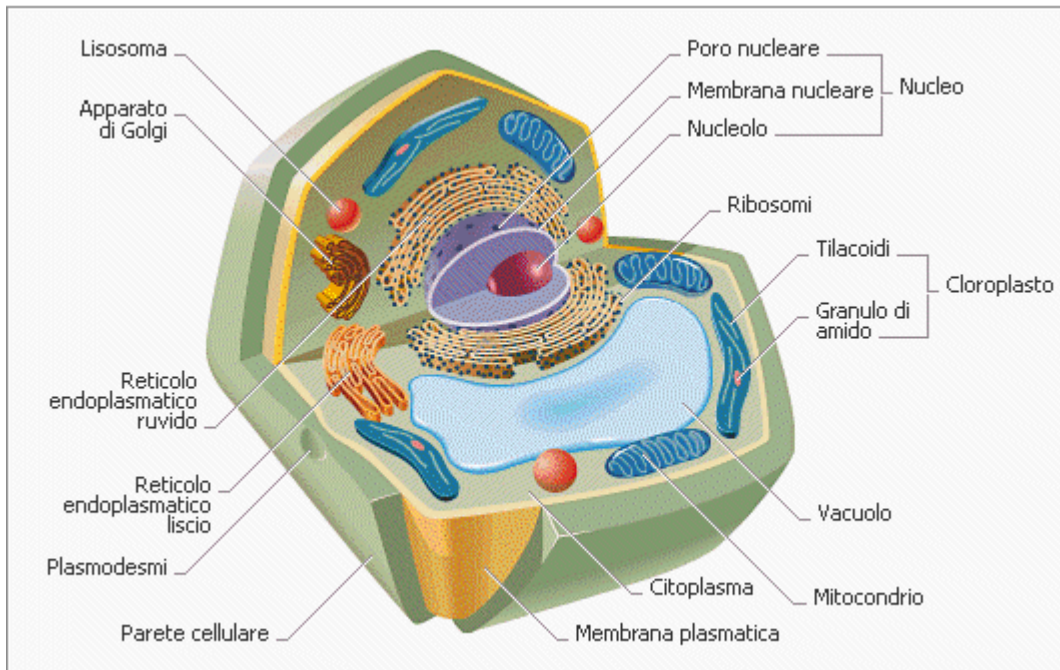


Figura 8. Schema della composizione della cellula vegetale

Lo strato più esterno della parete cellulare primaria ha fibre di cellulosa come struttura di base; internamente alla parete cellulare primaria si trova la parete cellulare secondaria, suddivisa in tre strati a seconda dell'orientamento delle fibre di cellulosa. Durante l'invecchiamento della cellula, la parete cellulare primaria prima e la parete cellulare secondaria poi, vengono impregnate dalla lignina. La lignina è un polimero fenolico ramificato, tradizionalmente la sua struttura viene definita amorfa e possiede la capacità di legarsi alle emicellulose. Il principale ruolo svolto da tale composto è di sostegno strutturale e difensivo. I batteri ruminanti non sono in grado di degradare la lignina, non potendo produrre enzimi capaci di rompere l'anello fenolico che contraddistingue i suoi precursori. Alcuni funghi sono abili degradatori di lignina perché in grado di produrre

perossidasi (Lee et al., 1997). Tuttavia gran parte di questi enzimi agisce solo in presenza di ossigeno, non presente all'interno del rumine. I batteri ruminali avrebbero quindi il potenziale per degradare ogni tipo di cellulosa, ma il grado di lignificazione e la maturità del foraggio riducono di molto questa capacità (Dann et al., 2007; Hartley, 1972; Burritt et al., 1984; Méchin et al., 2000; Caslerand Jung, 2006).

La nutrizione animale, soprattutto grazie all'introduzione di metodiche specifiche di analisi, si è concentrata sul comportamento alimentare delle diverse componenti della fibra generica. Emicellulosa, cellulosa e lignina sono state definite come tre frazioni separate, grazie al sistema di analisi detergente che discuterò in seguito. E' comunque bene ricordare che il concetto di "Fibra" e sue componenti non ha riscontri biologici, ma serve per semplificare e appunto separare le diverse matrici in base al loro comportamento da un punto di vista nutrizionale (Chesson et al., 1986). Come descritto in precedenza, la lignina ad esempio viene definita come la frazione indigeribile all'interno del rumine, sebbene da un punto di vista biologico sia da considerare come polimero estremamente complesso e vario. Tuttavia la suddivisione in queste frazioni ha permesso la messa a punto di importanti programmi di razionamento e dare una ragione alle caratteristiche particolari di fibra proveniente da diverse matrici foraggere. La componente fibrosa risulta quindi importante come indice di qualità dell'alimento, e la sua struttura regola la capacità di ingestione e quindi la degradazione a livello ruminale, la velocità di transito ed anche la digeribilità dei vari principi alimentari. Quando si considera la componente fibrosa di un foraggio ci si riferisce alla frazione definita NDF, ovvero fibra neutro detersa, che rappresenta il contenuto complessivo di cellulosa, emicellulosa e lignina del foraggio. In seguito verrà descritta la particolare analisi necessaria per la sua determinazione.

Una maggior ingestione di parete cellulare determina un aumento dell'attività masticatoria, ma riduce il tempo speso per unità di parete cellulare, risultando in una minor riduzione in dimensioni delle particelle fibrose. Le dimensioni delle particelle influiscono sulla velocità di transito nel tratto gastro-intestinale (Mertens, 1997). Macinando la componente fibrosa aumenta la velocità di transito ruminale e si ottiene una più alta capacità di ingestione a parità di altre condizioni. Le particelle di grandi dimensioni sono ostacolate nell'attraversamento del rumine in quanto devono superare la massa stratificata che separa la componente liquida da quella gassosa. Questo cappello fibroso funziona da vero e proprio filtro per le particelle, le quali sono selettivamente trattenute e destinate ad ulteriore ruminazione. L'effetto ingombro poi fa sì che la bovina alimentata con razioni ad alto contenuto in fibra limiterà l'ingestione giornaliera alla quantità di alimenti che riuscirà a masticare nelle 24 ore. Quindi la quantità iniziale del foraggio, e il tempo necessario per ridurne con la masticazione il volume, avranno un peso nel determinare l'effetto ingombro di quella razione. Diversi studi hanno dimostrato che diete con percentuali di NDF inferiori al 25% sul totale e di NDF proveniente da foraggi (per foraggi sono intesi quegli alimenti composti da foglie, steli ed eventuali semi) distribuiti freschi, come fieno o insilato, inferiori al 16 % diminuiscono la percentuale di grasso nel latte (Clark e Armentano, 1993; Depies e Armentano, 1995). Per mantenere le normali funzioni ruminali la percentuale di NDF da foraggi deve aumentare fino al 19%. Questi studi forniscono quindi validi parametri di riferimento sulla concentrazione di NDF da apportare con la dieta. Le percentuali riportate per gli apporti minimi si riferiscono a specifiche situazioni (diete contenenti foraggio con adeguata grandezza delle particelle e granella di mais come predominante forma di amido, il tutto somministrato sotto forma di unifeed); quindi, se abbiamo diete con particelle di alimento più piccole, fonti di amido più

disponibili a livello ruminale, diete con meno del 19% di NDF da foraggi e diete non somministrate come unifeed, questi valori minimi vanno aumentati. Viste le motivazioni sopra citate le concentrazioni minime quindi non vanno considerate come ottimali.

E' consigliabile prendere in considerazione l'NDF da foraggi per calcolare gli apporti di NDF totali, innanzitutto perché questa è la fonte di NDF che ha il maggior impatto sulla risposta della vacca, mentre l'NDF apportato con i concentrati ha un largo range di velocità di transito ruminale e diversa digeribilità.

L'NDF non proveniente da foraggi inoltre ha una capacità di mantenere il pH ruminale di un terzo rispetto all'NDF da foraggi (Allen, 1997), la digeribilità dell'NDF nel tratto gastrointestinale di circa la metà (Firkins, 1997) e lo stesso per quanto riguarda l'attività masticatoria (Mertens, 1997). Alla luce di questi dati si può considerare che l'effettività dell'NDF da foraggi è del 50% superiore all'NDF da non foraggi. L'indice di fibrosità (tempo di masticazione in minuti/kg di sostanza secca) influenza le prestazioni produttive in termini di quantità e qualità del latte prodotto. Una corretta gestione dell'indice di fibrosità, che dovrebbe assestarsi su valori attorno ai 30 minuti/kg di sostanza secca, assicura un adeguato controllo del pH ruminale. In relazione ai fabbisogni minimi di fibre apportate con la razione, dovremo considerare quella quota dotata di una certa struttura fisica cui viene attribuita una funzione dietetica quali la regolazione della velocità di transito nel digerente e l'induzione di tempi sufficienti di masticazione e produzione di saliva.

Per valutare questa quota di fibra, ad oggi sono state proposti diversi metodi: dalla fibra fisicamente efficace, misurabile con setacci, alla individuazione di un apporto minimo di lignina, che si assesterebbe a valori compresi fra il 3 ed il 4% della sostanza secca, o di fibra indegradabile che

dovrebbe assestarsi a valori minimi dell'8-10% della sostanza secca della razione.

Nei modelli di razionamento dinamico, che derivano le loro equazioni dal CNCPS (Cornell Net Carbohydrate & Protein System), la quota di fibra indegradabile apportata dai foraggi è stimata pari a 2,4 volte la lignina in essi contenuta.

La determinazione del contenuto di lignina dei foraggi assume quindi un peso determinante per il nutrizionista. Sottraendo alla NDF totale la quota indigeribile, si può stimare la quantità di NDF potenzialmente degradabile nel digerente. In realtà si parla di frazione potenzialmente degradabile perché la quota che in pratica viene utilizzata dai batteri nel rumine, dipende dalla velocità con cui la fibra transita e dalla facilità con cui questi glucidi possono essere attaccati e digeriti dagli enzimi batterici. Di conseguenza, appare ancora evidente come la lignina giochi un ruolo determinante nel rallentare e limitare la degradazione della fibra, ma anche nel mantenere o sbilanciare alcune necessità fisiologiche del rumine.

1.4 LE PRINCIPALI SPECIE BATTERICHE RUMINALI

Il rumine si può considerare un vero e proprio fermentatore biologico. Al suo interno si trovano diverse classi di microorganismi, che vanno dai batteri ai protozoi e i funghi. E' altresì noto che il rumine è un ambiente altamente selettivo, ed ogni microorganismo ospitato al suo interno assume un ruolo importante nel suo relativo metabolismo. La microbiologia ruminale si è sviluppata a cavallo degli anni 60 quando alcune tecniche di coltura permettevano di isolare i primi ceppi microbici. Tuttavia la svolta si ebbe quando divennero disponibili gli strumenti necessari per lavorare in campo molecolare, come la PCR o elettroforesi e altre tecniche. Anche in questo campo, il metodo è cambiato, passando da un concetto di biologia classica al moderno ed in uso concetto di biologia molecolare. Dalla necessità di formare in laboratorio colture di microorganismi per poter poi procedere con ulteriori studi, si è quindi passati ad analisi specifiche su sequenze geniche target, esulando gli studiosi dal vincolo della colturabilità. Le moderne tecniche di analisi del DNA e le librerie geniche, hanno quindi permesso di rivedere la stima delle diverse specie batteriche presenti all'interno del rumine. Fino a pochi anni fa le specie conosciute e colture erano all'incirca 30, mentre più recenti analisi condotte tramite l'utilizzo della sequenza 16s, codificante la subunità ribosomica minore, hanno permesso di distinguere almeno 300 specie diverse.

In ogni caso, i maggiori metabolismi ruminanti, e le relative specie microbiche coinvolte, sono stati individuati, permettendo quindi un importante passo per delineare una vera e propria ecologia microbica ruminale. Sebbene la presenza di protozoi e funghi non sia trascurabile, sono i batteri a rappresentare la maggior frazione quantitativa dei microorganismi ruminanti, e soprattutto i principali responsabili delle fermentazioni che avvengono all'interno del rumine.

Di seguito verranno elencate e descritte le principali di queste specie, tratte dal volume “Rumen Microbiology and Its role in Ruminant Nutrition”, di J.B. Russell, 2002.

Ruminococci: questi cocci, prevalentemente cellulosolitici furono isolati per la prima volta da Hungate. Lui stesso chiamò quelli privi di pigmenti *Ruminococcus albus* mentre quelli colorati, prevalentemente gialli, *Ruminococcus flavefaciens*. *R.albus* produce acetato, formato e idrogeno, mentre *R.flavefaciens* succinato e meno etanolo rispetto al precedente. Recenti analisi sul DNA indicano che questi ruminococchi sono strettamente correlati ad altre specie Gram-positive. Tuttavia *R.albus* risulta essere G-negativo mentre *R.flavefaciens* è variabile. Alcuni ceppi di *R.albus* producono batteriocine, tossine di origine batterica aventi come target altri batteri, che inibiscono *R.flavefaciens*; questo fornisce un ulteriore indizio che indica la prevalenza di *albus* rispetto a *flavefaciens*. Gran parte dei ruminococchi non possono crescere con pentosi, ma alcuni di loro possono usare le emicellulose come fonte di energia. La crescita con glucosio, dove possibile, risulta in genere abbastanza lenta. La preferenza ricade sul cellobiosio, un disaccaride del glucosio che si forma per azione delle cellulasi.

F. succinogenes: Gram negativo e specializzato nella degradazione della cellulosa, viene definito in questo modo per via delle sue elevate produzioni di succinato. Tuttavia esistono due distinte specie di *Fibrobacter*, *intestinalis* e appunto *succinogenes*. Quest’ ultimo aderisce strettamente alla cellulosa e spesso questo ha contribuito alla difficoltà di isolamento dal rumine. Inoltre analisi molecolari hanno dimostrato che non è abbondante come *R. albus*. *F. succinogenes* non utilizza i pentosi e il suo metabolismo risulta abbastanza ridotto con il glucosio.

Butyrivibrio: Bryant isolò per primo questi batteri ruminanti, dotati di movimento e produttori di butirrato. Questi risultano essere batteri molto versatili, in quanto possono utilizzare pentosi, esosi, pectine, amido, xilani e emicellulosa. Alcuni ceppi possono produrre lattato, tuttavia questo particolare metabolismo risulta essere legato alla presenza di precursori. Per produrre butirrato è necessario l'acetato, ma nel caso in cui quest'ultimo non risultasse disponibile, gli scheletri carboniosi vengono destinati alla produzione di lattato. Alcuni ceppi però possono disporre di un enzima, la butirrato kinasi, che permette la produzione di butirrato senza dover disporre di acetato. In questo caso la produzione di lattato risulta inesistente. Alcuni ceppi di *Butyrivibrio* sono in grado di idrogenare acidi grassi poli-insaturi che risultano tossici per i batteri ruminanti; questo meccanismo può portare alla formazione di Coniugati dell'Acido linoleico, o CLA.

Prevotella: alcune specie, isolate per la prima volta da Bryant, vennero identificate come produttrici di succinato e in grado di utilizzare diversi substrati, ma non la cellulosa. Le principali specie conosciute sono *P. ruminicola*, *P. bryanti*, *P. brevis* e *P. albesi*. Le specie di *Prevotella* sembrano essere molto influenti sul catabolismo proteico. Molte di queste possono idrolizzare le proteine, utilizzare i peptidi e deamminare gli aminoacidi. Più in generale tra i prodotti metabolici vengono elencati succinato, acetato, formato e propionato. *Prevotella* è uno dei generi batterici che fino a pochi anni fa veniva considerato poco rilevante all'interno del ruminante. Tuttavia ulteriori e più recenti studi hanno dimostrato la sua enorme importanza soprattutto in vacche alimentate con diete a unifeed, con la contemporanea presenza di foraggi e concentrati o zuccheri rapidamente digeribili.

Selenomonas ruminantium: quando sono abbondanti zuccheri, *S. ruminantium* cresce molto rapidamente e le sue fermentazioni sono

praticamente omolattiche. Tuttavia, in carenza di zuccheri, si assiste alla produzione di acetato e propionato, e addirittura a volte utilizza il lattato prodotto. Alcuni lavori indicano che *S. ruminantium* è in grado di produrre formato, ed alcuni lavori più recenti hanno mostrato la produzione di idrogeno e anidride carbonica, in particolare se non sono presenti metanogeni. Molti ceppi non sono in grado di degradare l'amido, ma possono utilizzare le destrine prodotte da altri batteri.

Streptococcus bovis: questo batterio fu isolato quando ancora non erano utilizzabili gli strumenti per mantenere l'anaerobiosi stretta. Questo perché *S. bovis* è anaerobio facoltativo. Può infatti crescere lentamente anche in presenza di ossigeno, ma il suo tasso di crescita è molto più elevato in un terreno ridotto in condizioni di anaerobiosi. Il suo tempo di replicazione è di poco superiore ai 20 minuti, e questo ne fa uno dei più veloci batteri in natura. Molti ceppi hanno una colorazione arancione, ma questo dipende dalle condizioni di crescita. *S. bovis* fu originariamente descritto come un batterio "omolattico", tuttavia le fermentazioni virano sulla produzione di acetato, formato e etanolo se il tasso di utilizzo del glucosio è lento. Mentre molti batteri lattici necessitano di almeno 8 aminoacidi precostituiti, *S. bovis* può utilizzare l'ammonio come unica fonte di azoto. Viene spesso definito come batterio opportunisto, e diventa la specie dominante solo nel caso in cui la dieta è molto ricca di carboidrati solubili. Il risultato è uno shift di fermentazioni ruminanti, ed una grande quantità di lattato viene prodotta, con conseguente calo di pH. Inoltre, *S. bovis* resiste a pH acidi molto di più degli altri batteri ruminanti, e questo comporta un drammatico cambiamento degli equilibri all'interno del rumine. Se queste condizioni non vengono modificate, si va incontro all'acidosi ruminale e spesso alla morte dell'animale. *S. bovis* è stato ritrovato anche nel colon umano ed poi correlato ai primi sintomi del cancro del colon. Quando questo si deteriora infatti, gli zuccheri non vengono più correttamente assorbiti, e di

conseguenza *S. bovis* si trova a disposizione ulteriori substrati per svilupparsi. Nel caso in cui riesca a passare nel sangue, può provocare endocarditi, meningiti e setticemia come altri streptococchi.

Megasphaera elsdenii: questa specie fu isolata per la prima volta negli anni 50 da S.R. Elsdén, e si presenta come un batterio relativamente aerotollerante. E' in grado di fermentare un ampio spettro di zuccheri, ma la sua nicchia è prevalentemente il lattato. Diversi studi hanno dimostrato che è responsabile di circa l' 80% del turnover del lattato nel rumine quando le diete sono ricche di granella da cereali. E' in grado di produrre ammonio da idrolisato proteico, ma può utilizzare solo pochi aminoacidi (come serina e treonina). Alcuni ceppi sono in grado di deaminare aminoacidi ramificati, producendo acidi grassi volatili a catena ramificata. Alcuni ceppi inoltre possono saturare l'acido linoleico, producendo CLA. Tuttavia in questo caso il CLA prodotto risulta diverso da quello formato di *Butyrivibrio*. Mentre a quest' ultimo si deve la presenza nel rumine del cis9-trans11 CLA, *M. elsdenii* è in grado di produrre trans10-cis12 CLA, che a differenza del precedente, influisce negativamente sulla sintesi di grasso da parte della ghiandola mammaria. Questa sindrome viene definita Depressione del Grasso nel Latte o MFD (Milk Fat Depression). Recenti studi hanno dimostrato la presenza di questo batterio in vacche ov'era presente anche la MFD, tuttavia *M. elsdenii* non sembra essere la causa esclusiva di questo problema.

Ruminobacter amylophilus: questa specie è in grado di degradare l'amido e produrre succinato. Risulta quindi completamente dipendente dall'amido per ricavare l'energia necessaria. Utilizza maltosio, destrine o appunto amido. Viene considerato proteolitico, ma sembra essere in grado di utilizzare solo azoto ammoniacale. Risulta essere inoltre difficilmente colturabile, e se l'intervallo di trasferimento è troppo lungo, le cellule vanno incontro a lisi e quindi morte.

Anaerovibrio lipolitica: isolato per la prima volta in pecore alimentate a farina di semi di lino, è capace di idrolizzare i trigliceridi e fermentare il glicerolo da essi originato. E' in grado di utilizzare anche lattato, tuttavia possiede una limitata capacità di utilizzare altri substrati. L'unico zucchero che può fermentare è il fruttosio. Gram negativo, di forma allungata e ricurva, possiede un flagello polare, e i suoi prodotti principali sono succinato e propionato.

Succinomonas anylolytica: la sua nicchia principale è rappresentata dall'amido. Dalle sue fermentazioni è in grado di produrre succinato, acetato e piccole quantità di propionato.

Succinivibrio destrinisolvens: isolato da vacche alimentate con grandi quantità di amido, utilizza maltodestrine extracellulari che vengono rilasciate dall'azione di amilasi prodotte da altri batteri. Gram negativo, produce succinato, acetato e piccole quantità formate e lattato.

Spicrochaete: Gram negative, vengono spesso osservate fluttuare nel liquor ruminale. Sono state classificate con il termine *Treponema*; sembrano essere organismi molto versatili, e di conseguenza non c'è chiarezza riguardo le principali nicchie metaboliche. Tuttavia sembrano attivamente coinvolte nelle fermentazioni delle pectine. I principali prodotti risultano essere acetato, formato e succinato.

Wolinella succinogenes: Wolin isolò questo batterio, chiamandolo *Vibrio succinogenes*, ma poi venne rinominato in suo onore. La sua nicchia metabolica è molto ridotta: può infatti utilizzare H₂ e malato o fumarato per produrre succinato. Si trova quindi a dover competere con i metanogeni per l'utilizzo di H₂ e non viene considerato generalmente come specie dominante all'interno del ruminale.

Archaea: il metano è il principale prodotto delle fermentazioni ruminanti, e una vacca può produrre circa 17 litri di questo gas all'ora. Il metano viene formato da un gruppo di batteri altamente specializzato, capace di utilizzare

H₂ e CO₂ . Anche il formato può essere utilizzato per la produzione di metano, previa l'azione di un enzima in grado di scindere il formato in idrogeno e anidride carbonica. Molti metanogeni si trovano in stretta associazione con i protozoi, così da sfruttare la produzione di idrogeno di quest'ultimi e di aumentare il tempo di ritenzione all'interno del ruminante. La specie più rappresentativa di questo gruppo è stata denominata *Metanobrevibacter ruminantium*.

All'interno del ruminante troviamo anche diverse specie batteriche che vengono definite come fermentatori obbligati di aminoacidi. Hungate nel suo lavoro denotò che “batteri ruminali capaci di digerire caseina senza avere la necessità di carboidrati erano stati riscontrati dall'autore”, anche se tuttavia non fu in grado di isolarli. Lavori più recenti indicarono alcuni di questi batteri come *Peptostreptococcus anaerobius* e *Clostridium sticklandii*. Il primo venne identificato come un cocco di notevoli dimensioni, mentre il secondo caratterizzato da piccole dimensioni e di forma allungata. Una terza specie, di forma simile a un pallone da rugby, non risultava essere geneticamente simile ad altri batteri, e venne così chiamato *Clostridium ammoniphilum*. Questi batteri non possono ricavare energia dalle fermentazioni dei carboidrati, ma tuttavia sono in grado di deaminare gli aminoacidi con una velocità di quasi 20 volte superiore rispetto agli altri batteri ruminali (Attwood et al., 1998; Avgustin et al., 1997; Bryant et al., 1955 - 1956; Counotte et al., 1981; Elsdén et al., 1956; Hungate, 1950; Johnson et al., 1995; Kim et al., 2002; Mannarelli et al., 1991; Montgomery et al., 1988; Opperman et al., 1957; Palmonari et al., 2010; Paster et al., 1993; Rogosa, 1971; Schleifer et al., 1987; Shab et al., 1990; Smith et al., 1958; Stackebrandt et al., 1986; Stevenson et al., 2007; Stewart et al., 1989 – 1997; Weimer et al., 1993 – 1996 – 1997 – 2008 – 2009 – 2010; Whitford et al., 1998; Wolin et al., 1959).

Appare quindi evidente l'elevata diversità microbica all'interno del rumine, nonché l'elevata specializzazione dei microorganismi stessi. Il rumine è un ambiente altamente selettivo, e ciascun microorganismo deve essere in grado di ritagliarsi una nicchia specifica per poter sopravvivere. Tuttavia, data la moltitudine di specie diverse, diversi studi hanno evidenziato l'abilità di certi batteri di sfruttare i prodotti di fermentazione di altri batteri, ricambiando il favore con ulteriori prodotti altrimenti inaccessibili. Questa particolare associazione metabolica viene definita *crossfeeding*. In letteratura si trovano diversi esempi, tuttavia data la non ampia conoscenza dell'intero ecosistema ruminale, questi esempi sono ancora sporadici e quindi non completamente rappresentativi di ciò che avviene nel rumine. Per dimostrare questo tipo di metabolismo, si è partiti dalla considerazione che in colture pure si osservavano prodotti di fermentazione non rintracciabili all'interno del rumine. Diversi batteri ruminali producono succinato, ma questo, all'interno del rumine, viene immediatamente decarbossilato da altre specie per produrre propionato. Studi condotti utilizzando marcatori hanno dimostrato che circa il 50% di questo acido prodotto nel rumine è frutto di *crossfeeding*. Stessa sorte spetta al lattato, prodotto principalmente da *S. ruminantium* e *S. bovis*, ma immediatamente utilizzato da altrettante specie batteriche. Di conseguenza, a meno di condizioni particolari, all'interno del rumine troviamo una bassa concentrazione di lattato. Uno degli esempi più rappresentativi è quello del *crossfeeding* tra batteri cellulolitici e non. All'interno del rumine i non cellulolitici sono molto più numerosi anche quando la dieta è ricca di fibra. Tuttavia, co-colture di *S. ruminantium* e *R. albus* dimostrano che il primo è in grado di svilupparsi anche nel caso in cui l'unica fonte di energia fosse cellulosa. Questo è possibile grazie all'abilità di *S. ruminantium* di utilizzare le cellodestrine prodotte dall'idrolisi della

cellulosa. La relazione tra cellulolitici e non è comunque ancor più complessa. Le principali specie capaci di fermentare la cellulosa (*R. albus*, *R. flavefaciens* e *F. sccinogenes*) non sono in grado di sintetizzare aminoacidi a catena ramificata (BCAA) a meno che non dispongano di acidi grassi volatili a catena ramificata (BCVFA). Tuttavia questi batteri non possiedono l'abilità di produrre BCVFA, il che li rende dipendenti da batteri non cellulolitici. Questi a loro volta sono in grado di utilizzare i prodotti dell'idrolisi della cellulosa (Allison, 1959; Wells et al., 1995; Wolin, 1975).

Questi esempi ci permettono di comprendere, seppur limitatamente, la grande complessità che il rumine rappresenta, da cui dipende anche il benessere dell'animale nonché la sua efficienza produttiva.

1.5 FERMENTAZIONI DELLA CELLULOSA E ADESIONE BATTERICA

All'interno del ruminante troviamo una abbondante quantità di alimenti, che si trovano altrettanto spesso sotto forma di polimeri complessi. Questi composti devono prima essere ridotti a sostanze con basso peso molecolare da enzimi extracellulari prima di poter essere utilizzati. Come già introdotto nel capitolo sulle specie batteriche ruminanti, quando questi enzimi agiscono all'esterno della cellula batterica che li ha prodotti, anche i microorganismi incapaci di secernerli si trovano a disposizione le stesse molecole potenzialmente utilizzabili. Di conseguenza, se i batteri che producono questi enzimi specifici rimanessero fermamente ancorati alle particelle di cibo, secernendo enzimi cellula – associati, avrebbero a disposizione in teoria una via preferenziale per l'utilizzo dei prodotti di idrolisi.

Il compartimento più facilmente analizzabile risulta la frazione liquida. Batteri liberi di muoversi nel liquor ruminale, protozoi e zoospore fungine utilizzano nutrienti solubili (zuccheri, peptidi, aminoacidi), ma tuttavia questi composti si trovano disponibili solo per un breve lasso di tempo successivo all'ingestione da parte dell'animale. La maggior parte della frazione planktonica appare in fase di transito, composta cioè da cellule figlie di microorganismi già adesi a un substrato e "in cerca" di un nuovo sito dove legarsi. Alcuni batteri sono ancorati alle pareti ruminanti; sono batteri tipicamente proteolitici che digeriscono le cellule epiteliali, sono attivi nell'idrolisi dell'urea e nella riduzione delle piccole quantità di ossigeno che entrano nel ruminante per via della pressione sanguigna. Tuttavia questi batteri rappresentano solo l'uno – due per cento delle popolazioni totali. Una ben più grande frazione batterica (circa il 70% del totale) si trova in biofilm aderenti alla superficie delle particelle di cibo.

Lo studio di questi sistemi di adesione risulta ostacolato dal fatto stesso che gran parte dei batteri ruminanti si trova strettamente legato alle particelle di

cibo, in un sistema che coinvolge diverse specie batteriche contemporaneamente. Questo consorzio comprende enzimi in grado di lavorare in maniera altamente sinergica. Gli enzimi presenti in queste strutture sono stati nominati a partire dal substrato preferenziale (Bayer et al., 1998; Beguin, 1990 – 1992 – 1994 – 1996 - 1998; Doi et al., 1998; Felix, 1993; Leschine, 1995; Robson et al., 1989; Schwarz, 2001; Shoham et al., 1999).

Alcuni batteri ruminanti, come *R. amylophilus*, sono in grado di legarsi all'amido. Questo è reso possibile dalla presenza di un dominio di legame specifico per l'amido; le molecole di amido vengono poi trasportate attraverso porine di membrana all'interno della cellula dove vengono idrolizzate.

Tuttavia la struttura più studiata e complessa è il cellulosoma, prodotto da alcuni batteri cellulosolitici. L'adesione alla cellulosa è mediata da un biofilm extracellulare prodotto dai batteri in sviluppo chiamato glicocalice (Figura 9).

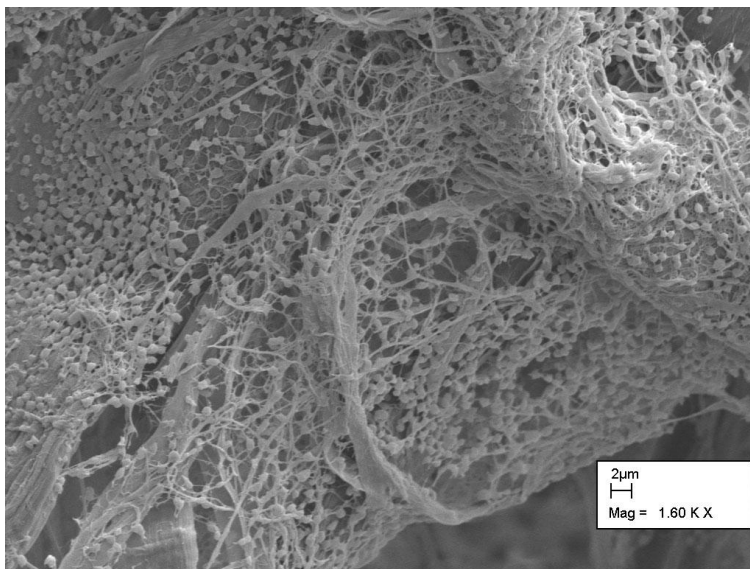


Figura 9. Il glicocalice di *R.albus*

Questo complesso è ricco di cariche negative, così come la superficie vegetale. Si potrebbe quindi pensare a una completa repulsione tra i due composti dovuta allo stesso segno di carica, tuttavia il legame è reso

possibile dalla presenza di cationi divalenti in grado di associarsi alle cariche negative del glicocalice e a quelle delle lectine vegetali (Weimer et al., 2006) (Figura 10).

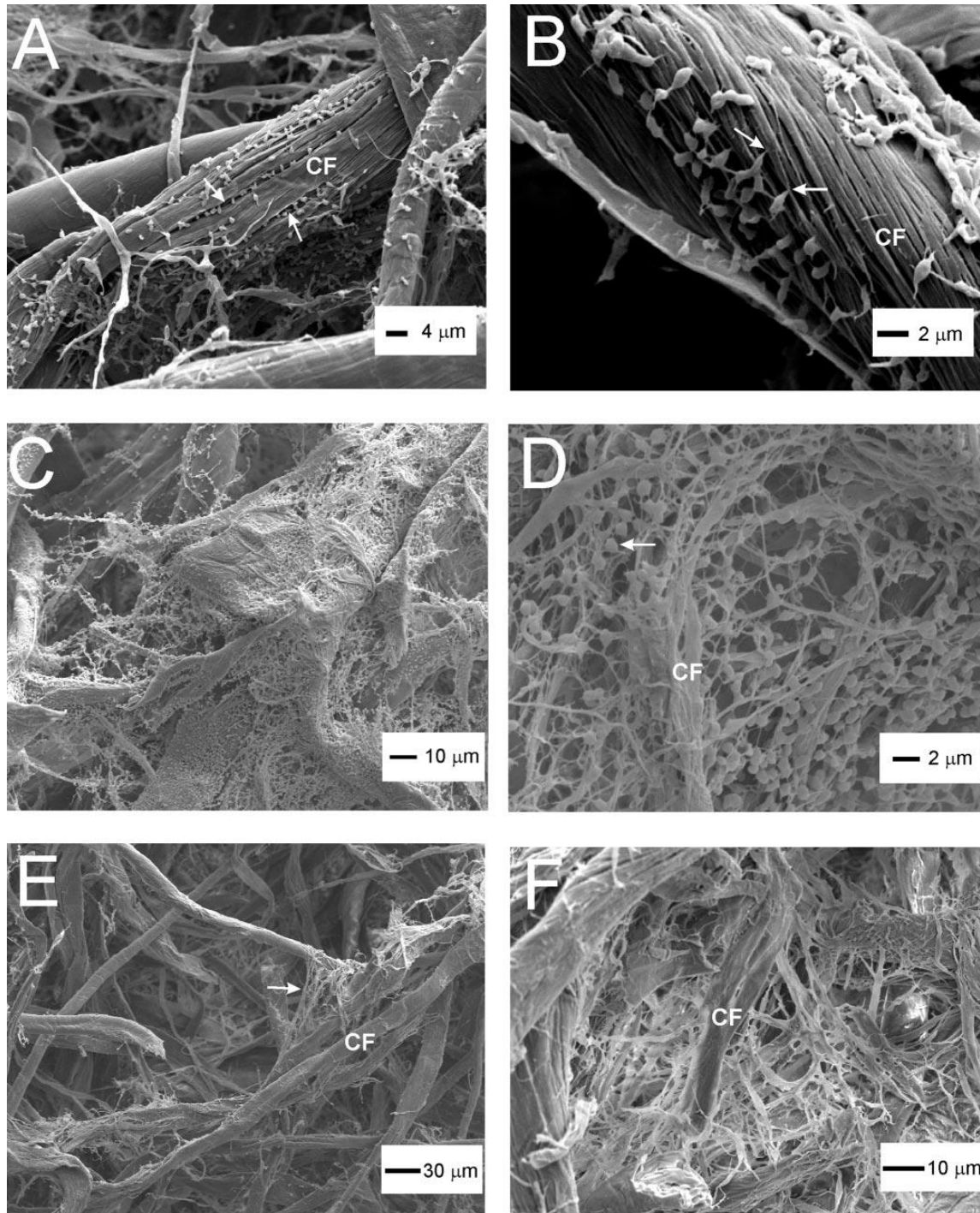


Figura 10. Immagini di *R.albus* con glicocalice a diversi stadi di sviluppo (da Weimer et al., 2006)

Il glicocalice è composto da eteropolisaccaridi, che vengono idrolizzati quando il pH scende sotto valori di 5.3. Diversi lavori descritti in precedenza dimostrano che le fermentazioni della cellulosa si interrompono sotto certi valori di pH, e anche la crescita microbica rallenta drasticamente. Questo potrebbe essere la conseguenza dell'idrolisi del glicocalice, la cui produzione è necessaria ai batteri per aderire alla superficie delle cellule vegetali. La degradazione della cellulosa avviene grazie alla presenza del cellulosoma, una protuberanza della cellula batterica che contiene appunto una batteria di enzimi specifici (Figura 11).

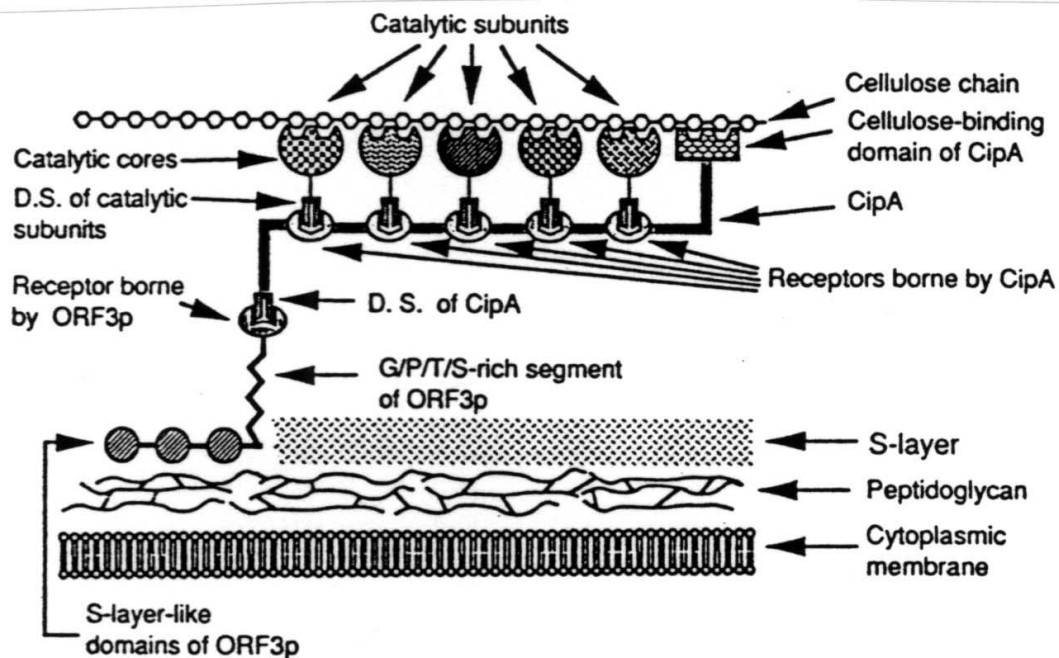


Figura 11. Schema di cellulosoma di *C.thermocellum*

Le famiglie di enzimi in esso presenti e attivi nell'idrolisi della cellulosa sono composte principalmente da: endoglucanasi, che tagliano in modo casuale i siti più amorfi della cellulosa generando oligosaccaridi di diversa lunghezza, e quindi nuovi anelli finali della catena di cellulosa. Tra essi l'enzima principale è considerato la 1,4 - β - D glucano - 4 - glucanoidrolasi. Le esoglucanasi, che comprendono la cellodestrinasi e la cellobioidrolasi, agiscono successivamente partendo dagli anelli finali della

catena e liberano cellodestrine o cellobiosio, a seconda dell'enzima coinvolto. Il passaggio finale è l'intervento delle β – glicosidasi, che idrolizzano cellodestrine e cellobiosio a glucosio. L'idrolisi dell'emicellulosa richiede la presenza di enzimi diversi, data la sua differente composizione rispetto alla cellulosa. Contiene infatti nel nucleo xilani e mannani, che però possono essere sostituiti o complessati con arabinosio, glucosio, altri zuccheri o acidi uronici e gruppi acetili. La catena di xilano può inoltre legarsi alla lignina, e questo legame etero è altamente resistente alla degradazione ruminale. I batteri ruminali cellulolitici giocano un ruolo importante nella degradazione dell'emicellulosa, ma molti di questi non sono in grado di utilizzarne i prodotti.

Il celulosoma comprende anche una serie di enzimi che sono responsabili dell'ancoraggio vero e proprio del batterio alla superficie vegetale. Viene definito dominio di legame, così da distinguerlo dal dominio catalitico sopra descritto. È composto da proteine strutturali che comprendono moduli di legame alla cellulosa (CBM o CBD) e scaffoldine.

Tuttavia, siccome la cellulosa viene degradata generalmente poco o comunque lentamente, si ipotizzò che fosse refrattaria ad essere idrolizzata (Chen et al., 1987; Chesson et al., 1997). Studi più recenti hanno invece dimostrato che il principale fattore limitante risulta essere la superficie disponibile all'attacco microbico (Fields et al., 2000; Halliwell et al., 1968; McAllister et al., 1994; Miron et al., 2001; Pegden et al., 1998). La composizione della fibra ricopre dunque un ruolo decisivo nei confronti della sua potenziale degradabilità, così come il pH ruminale (Figura 12, 13).

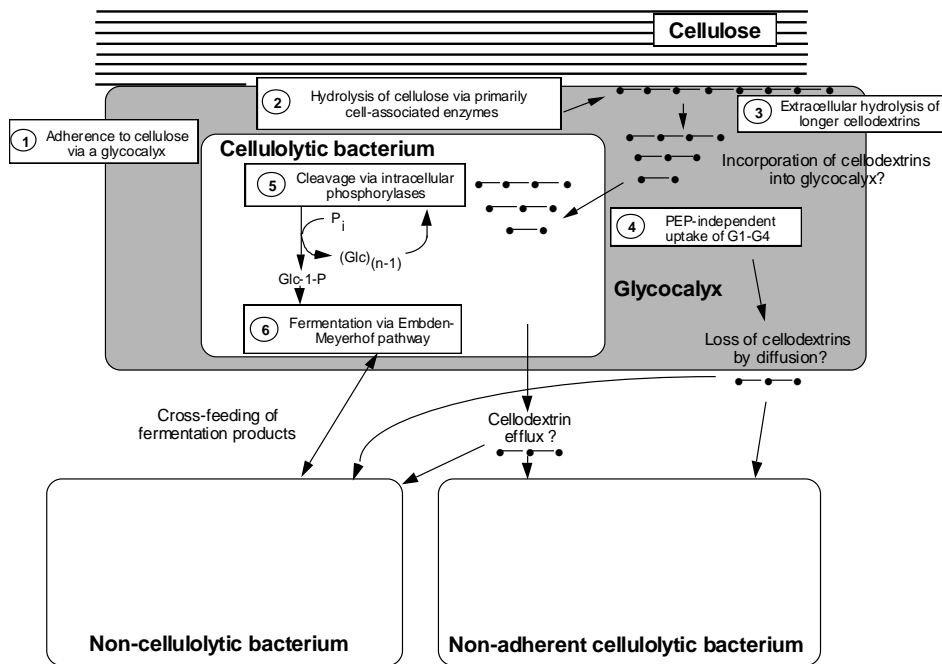


Figura 12. Schema di adesione e degradazione della cellulosa tramite un sistema complesso.

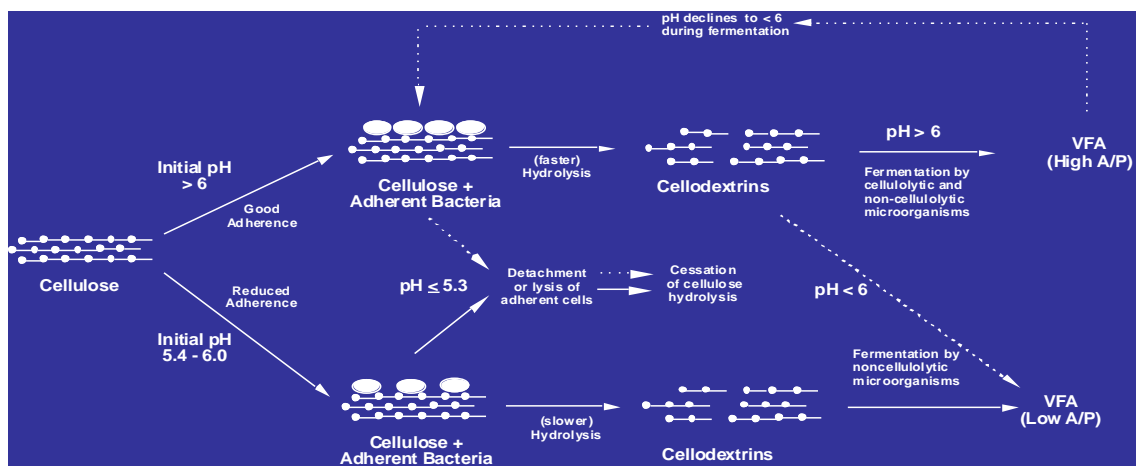


Figura 13. Fermentazioni della cellulosa e relazioni con il pH

Da un punto di vista metabolico i prodotti di fermentazione della cellulosa comprendono acetato, idrogeno e diossido di carbonio. Il glucosio viene utilizzato per produrre energia, con conseguente formazione di piruvato e idrogeno. Successivamente il piruvato viene decarbossilato ad acetato e anidride carbonica, e si assiste alla formazione di un'ulteriore molecola di ATP.

L'acido acetico sviluppato, una volta protonato, viene assorbito dalle pareti ruminali, e funge in seguito da precursore per la sintesi di grasso nella

ghiandola mammaria. Una razione che presenta un rapporto foraggi : concentrati a favore di quest' ultimi vede diminuire anche il rapporto Acetato : Propionato, e di conseguenza una minor presenza di grasso nel latte. L'altra causa di calo di grasso nel latte è la milk fat depression (MFD). Questa sindrome non è ancora stata chiarita completamente, ma sembra essere dovuta alla presenza di alcuni acidi grassi in grado di inibire gli enzimi presenti nella ghiandola mammaria deputati alla sintesi di grasso. L'acido grasso responsabile è un CLA (coniugato dell'acido linoleico) che si forma nel ruminale per via della bioidrogenazione di acidi grassi poli-insaturi, come appunto l'acido linoleico. I PUFA sono tossici per i batteri ruminanti, che utilizzano la saturazione come un meccanismo di difesa. Idrogenando i doppi legami, si ottiene al termine del processo un acido grasso saturo, sicuramente meno tossico. Alcuni batteri, come *M. elsdenii* sono in grado di compiere questa reazione, che se interrotta prima del termine, porta alla formazione di CLA. *M. elsdenii* produce il CLA trans10 – cis12, mentre alcuni batteri come *B. fibrisolvans* produce CLA cis9 – trans11. Ricordiamo che l'acido linoleico si presenta come C18:2 cis9 – cis12.

La produzione di CLA è maggiore in diete ricche di concentrati o ricche di foraggi verdi, ma il motivo non è ancora del tutto chiaro. Le ipotesi a riguardo si concentrano, da un punto di vista biologico, su alcune considerazioni. La bioidrogenazione è anche un sistema che permette di diminuire la concentrazione di ioni idrogeno nel liquor. Questa concentrazione viene classicamente definita pH, e pertanto più ioni sono in circolo più il pH risulta basso. Gli effetti del pH sull'intero ecosistema ruminale sono già stati descritti, pertanto il meccanismo di saturazione può essere considerato utile anche da un punto di vista di salvaguardia di certe condizioni. D'altro canto, una dieta ricca di foraggi verdi significa una dieta dove sono presenti in maggior quantità le parti verdi della pianta, e

cioè le foglie. Come è noto, le foglie sono ricche di cloroplasti, gli organelli cellulari responsabili della fotosintesi. All'interno dei cloroplasti sono presenti in grande percentuale gli acidi grassi poli-insaturi, che una volta giunti all'interno del ruminante sono soggetti alla bioidrogenazione. Ne consegue che diete di questo tipo sono appunto più ricche di CLA. I meccanismi di saturazione e le specie batteriche coinvolte non sono ancora del tutto stati chiariti, né di conseguenza le condizioni in cui si manifesta la MFD, tuttavia in questa tesi verrà presentato un lavoro dove si evidenzia la presenza di una specie batterica particolare in concomitanza con l'insorgere della sindrome di depressione di grasso nel latte (Palmonari et al., 2010; Baumgard et al., 1999; Dawson et al., 1970; Griinari et al., 1997; Kim et al., 2001; Russell, 2002).

1.6 METODI ANALITICI PER LA DETERMINAZIONE DELLA QUALITÀ DEI FORAGGI

Il sistema detergente è stato ideato e perfezionato da Van Soest e colleghi (Van Soest et al., 1991) per permettere una rapida determinazione della matrice insolubile della parete vegetale e stimare i suoi maggiori componenti, ovvero emicellulosa, cellulosa e lignina. Successivamente lo sviluppo di queste tecniche ha permesso di valutare anche i composti azotati e le proteine degli alimenti. Uno degli ostacoli principali nella determinazione delle componenti della parete è la presenza di altri composti in grado di interferire con l'estrazione e la quantificazione delle diverse frazioni. Si sono quindi messi a punto alcuni sistemi per liberare le frazioni fibrose da questi contaminanti, che comprendono per lo più amido e proteina. Vista la natura del detergente utilizzato, la frazione che più risulta contaminata è l'NDF ovvero la fibra neutro detersa, che rappresenta la quota totale di cellulosa, emicellulosa e lignina presente nel campione. La soluzione neutra è formata principalmente da Sodio Lauril Solfato ed EDTA ed ha un pH di 7.0. Come detto in precedenza, questo permette di conservare la frazione insolubile della parete vegetale, ancora contaminata da altri composti non di natura fibrosa. L'amido presente può essere eliminato grazie all'utilizzo di enzimi specifici come l'alfa – amilasi; fallire in questa correzione significherebbe andare incontro a ulteriori difficoltà nei passaggi successivi del trattamento, nonché a una sovrastima della frazione fibrosa. Oltre ad alcuni minerali, eliminabili con l'incenerimento al termine della procedura, l'altro composto in grado di alterare il risultato della determinazione sono le proteine. Per questo è stato introdotto l'uso del Sodio Solfito, in grado di rompere i ponti disolfito tra i peptidi, rendendo solubile la quota proteica. Sfortunatamente il Solfito attacca anche la lignina, e campioni trattati con questo composto e successivamente digeriti in vitro hanno mostrato valori più alti di

digeribilità ruminale. Pertanto i campioni analizzati con sodio solfito non possono essere utilizzati per ulteriori determinazioni, eccezion fatta per le ceneri. La metodica ufficiale per la determinazione dell'NDF è contenuta nel manuale AOAC, così come le procedure per la quantificazione delle altre frazioni (Mertens, 2002). Un altro metodo per correggere il valore di NDF di un campione per il suo contenuto proteico è la determinazione dell'NDIP, ovvero Neutral Detergent Insoluble Protein. Stimando quindi il contenuto di proteina legato alla fibra, permette poi di correggere il dato stesso, ottenendo risultati analoghi a campioni trattati con Sodio Solfito.

Un residuo con basso contenuto di azoto che comprende lignina e cellulosa può essere ottenuto estraendo il tessuto vegetale con soluzioni di acidi forti di detergenti quaternari. Questa frazione viene definita ADF, e a differenza della precedente, il campione trattato con detergenti acidi può essere utilizzato anche per successive determinazioni. L'ADF viene anche considerato un buon metodo per la stima della fibra alimentare, in alternativa alla fibra grezza.

La terza frazione fibrosa usualmente quantificata viene definita ADL, ovvero lignina acido detersa. Questa rappresenta la quota di fibra che risulta indigeribile all'interno del rumine, ed anche di ostacolo alla degradabilità degli altri composti della parete vegetale. La procedura classica vede la determinazione dell'ADL in seguito a quella dell'ADF, trattando il residuo con acido solforico a concentrazione del 72%. Un successivo incenerimento del campione permette di correggere il dato per la percentuale di minerali presenti, E' noto che una piccola parte di azoto può essere presente all'interno dell'ADL e questo per via del contenuto in cutine del campione. Un trattamento con permanganato di potassio permette l'eliminazione di questa piccola componente, nei casi in cui si ipotizzi la sua presenza nel campione da analizzare.

L'analisi qualitativa di un foraggio, oltre alle frazioni fibrose, che esprimono sia il comportamento fisico del foraggio che la possibilità di ricavare energia dalle fermentazioni della cellulosa da parte dei batteri cellulosolitici, comprende anche la determinazione delle frazioni proteiche. L'animale ha dei fabbisogni di proteina ben definiti, e va altresì ricordato che circa il 70% delle proteine utilizzate dall'animale stesso è di origine microbica. I batteri ruminanti sono in grado di formare le proteine di cui necessitano, purché la dieta fornisca una quota adeguata di azoto e peptidi. Di conseguenza, l'apporto proteico rappresenta un indicatore molto importante per determinare la qualità di un foraggio. Precedentemente ho descritto la quota proteica legata alle frazioni fibrose, definendo NDIP e ADIP, ma ci sono ancora tre frazioni ben definite. La PG o proteina grezza, indipendentemente dal nome, rappresenta la percentuale totale di azoto del campione analizzato. La sua determinazione passa per una "mineralizzazione" del campione trattato con acido solforico al 96%. Si può suddividere in proteina vera e azoto non proteico, che viene altrimenti chiamato NPN. L'azoto non proteico è la somma del contenuto in nitrati, aminoacidi liberi e peptidi, viene considerato facilmente fermentabile, e si determina in base alla solubilità in sodio tungstato. L' NPN viene insito anche nella frazione chiamata Proteina Solubile. Questa infatti, oltre all'azoto non proteico comprende anche alcune proteine che vengono definite di riserva e tipiche dei semi, ovvero albumine e globuline. Il rapporto tra NPN e PSOL può fungere da indicatore sulla natura del campione: un fieno di medica vede questo rapporto tendere a 0.8 – 1, mentre campioni di concentrati o semi lo vede ridursi, data la maggior presenza di proteine di riserva.

Da alcuni decenni l'analisi qualitativa dei foraggi è stata arricchita dalla stima della degradabilità ruminale della fibra. Per la valutazione della NDFd sono utilizzate diverse metodiche "in vitro" e "in vivo". Con le

tecniche “in vitro” una piccola aliquota dell’alimento in esame, viene incubato con liquido ruminale adeguatamente tamponato o con pool enzimatici. Le due tecniche che prevedono l’utilizzo di liquor ruminale sono rappresentate dalla metodica di Tilley and Terry modificata che prevede l’impiego di beute mantenute in anaerobiosi costante e in bagnomaria a temperatura costante, e da quella di più recente introduzione, usualmente indicata come tecnica Ankom – Daisy ove più campioni, posti in appositi sacchetti, sono contemporaneamente fermentati in contenitori di dimensioni relativamente grandi (DAISYII Icubator, ANKOM Technology). In sostanza, con entrambi i sistemi si simulano le condizioni fisiologiche del rumine: viene mantenuta l’assenza di ossigeno, la temperatura è costante per il tempo di fermentazione, e le soluzioni impiegate oltre al liquor ruminale mimano l’effetto della saliva o arricchiscono il sistema con minerali e composti assunti dall’animale con la dieta completa (Goering et al., 1970; Tilley et al., 1963). Tra le due possibili strumentazioni, nel laboratorio di Zootecnia è stato messo a punto un sistema di fermentazione che rispecchiasse il sistema Tilley & Terry, data la maggior attendibilità e riproducibilità dei dati ottenuti con questo sistema rispetto alla metodica Daisy (Palmonari et al., 2007; Fusaro et al., 2007). Le tecniche *in vivo* sono rappresentate principalmente dal metodo Cloth Bag. L’alimento viene pesato all’interno di queste piccole sacche che sono poi a loro volta inserite all’interno del rumine attraverso una fistola. Questa tecnica presenta probabilmente problemi maggiori rispetto a quelle *in vitro*. La porosità di queste sacche, in che punto del rumine vengono posizionate, l’estrazione delle stesse al termine della valutazione nonché la disponibilità di animali fistolati spesso sono problemi difficilmente risolvibili.

In conclusione gli strumenti di cui si dispone per l’analisi qualitativa dei foraggi sono molteplici, e sempre più accurati. Dalla classica analisi di

cartellino si è passati all'analisi delle diverse frazioni che compongono il foraggio, classificando ciascuna di queste anche in base al loro comportamento alimentare. Infine, in laboratorio è possibile ricreare le condizioni migliori per poter stimare la degradabilità potenziale della fibra di ogni campione, così da permettere un sempre più accurato razionamento.

2. SCOPO DELLA TESI

Ciò che si evince dall'introduzione è che l'efficienza produttiva e la qualità del prodotto delle vacche da latte dipende da diversi fattori. La produzione passa inevitabilmente dal corretto svolgimento delle fermentazioni ruminali, che devono pertanto procedere nel miglior modo possibile. Come è stato evidenziato, senza dubbio uno dei parametri che influiscono maggiormente su questi processi è il pH, che in alcuni casi è anche legato all'insorgere di gravi patologie per l'animale. Alcune condizioni estreme di pH sono causa e conseguenza di drastici cambiamenti dell'ecologia ruminale, che vedono alcuni ceppi microbici prevalere su altri. In altri casi sebbene il pH rimane mediamente costante, si assiste all'insorgere di altre sindromi, come la depressione di grasso nel latte, che rappresenta per gli allevatori un grosso problema economico, soprattutto se diffusa a diversi capi dell'allevamento. E' inoltre importante sottolineare che ogni animale possiede delle dinamiche di pH individuali, con diversi animali che possono presentare valori di pH e oscillazioni di pH diversi. Nel corso del dottorato è quindi stata condotta una prova volta ad indagare gli effetti di queste dinamiche sulle popolazioni batteriche ruminali, andando quindi a verificare se animali in condizioni di pH differenti presentassero ecosistemi ruminali diversi. A questo punto risulta evidente il secondo fattore in grado di influenzare l'efficienza produttiva delle vacche da latte: i microorganismi ruminali ricavano energia dalle fermentazioni di alimenti ingeriti dall'animale che si nutre di una dieta formulata dall'uomo. La capacità di fermentare questi composti presenti negli alimenti dipende enormemente dalle caratteristiche degli alimenti stessi. In una condizione come quella Italiana, e nell'area del Parmigiano Reggiano dove l'uso di insilati è proibito, la possibilità di disporre di foraggi di alta qualità è fondamentale per la produzione. Come detto in precedenza il foraggio più utilizzato è il fieno di medica, che però risente dell'avanzare della maturità.

Nel corso del dottorando, in ciascuno dei tre anni, sono quindi state condotte diverse prove volte a quantificare gli effetti dell' "invecchiamento" sulle proprietà nutritive sia della medica in sé, che sulle due principali componenti della pianta, ovvero foglie e fusti.

3. MATERIALI E METODI

3.1 DINAMICHE DI pH E COMUNITA' BATTERICHE RUMINALI

La prima prova condotta che descriverò è stata pubblicata sulla rivista internazionale *Journal of Dairy Science* in data Gennaio 2010.

L'ipotesi centrale su cui si è basato questo lavoro è stata che animali diversi aventi differenti dinamiche di pH, sia in termini di valori medi che di oscillazioni giornaliere, potessero ospitare diverse popolazioni microbiche. Per testare questo, le dinamiche di pH di vacche fistolate sono state monitorate costantemente per 3 cicli alimentari consecutivi, e sono stati prelevati campioni dal rumine delle stesse vacche per procedere con la caratterizzazione delle popolazioni microbiche utilizzando l'analisi automatizzata della sequenza intergenica ribosomiale (ARISA, automated ribosomal intergenic spacer analysis). Questa tecnica si presenta come coltura – indipendente e facilita la comparazione di intere comunità batteriche, sia note che non ancora identificate, permettendo di conseguenza di procedere con ulteriori indagini volte ad identificare ceppi di interesse tramite l'uso di tecniche più specifiche e dettagliate come la PCR Real Time. Inoltre, questa tecnica particolare permette di identificare specifici animali le cui comunità microbiche differiscono drammaticamente da quelle di altri animali alimentati con la stessa dieta. La scelta di animali per ulteriori studi nutrizionali viene così facilitata, come anche una conseguente analisi più approfondita di comportamenti alimentari e performance produttive degli stessi animali.

La prova è stata condotta presso la stalla appartenente allo United States Dairy Forage Research Center in Wisconsin, in accordo con il protocollo approvato dall' Animal Care and Use Committee dell' Università del Wisconsin Madison. Otto vacche in lattazione di razza Frisona sono state alimentate con una dieta basata su insilati di medica e mais, formulata in

base alle linee guida NRC 2001. Nella dieta era presente anche una piccola quota di monensin, un antibiotico ionoforo utilizzato negli USA per prevenire coccidiosi ed altre patologie. La dieta è stata somministrata *ad libitum* ogni 24 ore, così come il supporto di acqua è stato continuo.

Dinamiche del pH. Per monitorare le oscillazioni del pH, 8 pHmetri (modello 340i, WTW, Weilheim, Germany), sono stati inseriti in contenitori di acciaio legati ad una copertura in norprene da collocarsi nella fistola. Questa copertura presentava un apertura interna centrale, da dove veniva fatto passare l'elettrodo (SenTix 41, WTW). Gli elettrodi stessi erano inseriti all'interno di un rivestimento in metallo per permetterne l'aumento di peso così da non risentire dei movimenti naturali una volta immersi all'interno del rumine. I valori di pH sono stati registrati ad intervalli regolari di 10 minuti per 54 ore consecutive, corrispondenti a due cicli alimentari completi più sei ore del terzo ciclo. Gli elettrodi e i loggers sono stati calibrati prima dell'inserimento utilizzando soluzioni a pH noto (pH 7.00 e pH 4.00, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ). Al termine dell'incubazione di 54 ore *in rumine*, gli elettrodi sono stati rimossi, puliti e immersi nuovamente nelle soluzioni a pH noto per determinare l'eventuale shift di lettura. Questi spostamenti erano nell'ordine di 0.01 – 0.1 unità di pH. Le letture (326 per animale) sono state scaricate su computer utilizzando il software MultiLab Pilot (Versione 4.01, WTW) e in seguito trasferite su un file Excel (Microsoft, Redmond, WA) per il calcolo di correzione rispetto allo spostamento misurato. L'equazione ideata per stimare questo shift è basata sul presupposto che l'incidenza di questo spostamento fosse maggiore per le ultime letture rispetto alle prime. Di conseguenza è stato assunto uno shift lineare delle letture, che sono state tutte corrette utilizzando appunto seguente:

$$\text{Shift} = \left(\{(N - 1) \times [(X - 7)/326] \times (pH_N - 4)\} + \{(N - 1) \times [(Y - 4)/326] \times (7 - pH_N)\} \right) / 3$$

Dove: N = numeri sequenziali e interi corrispondenti alla lettura, quindi da 1 a 3266,

X = lettura dell'elettrodo immerso nella soluzione a pH = 7.00 al termine della prova.

Y = lettura dell'elettrodo immerso nella soluzione a pH = 4.00 al termine della prova.

pH_N = valore del pH alla Nsima lettura durante la prova.

Il valore ottenuto è stato diviso per 3 considerando questo valore come la distanza in unità di pH tra 7 e 4.

Il valore dello spostamento è stato quindi sottratto alla lettura per ottenere il valore corretto. I valori di pH così ottenuti sono stati poi utilizzati per determinare il pH medio e le oscillazioni giornaliere di ciascun animale. Il range di pH è stato calcolato sottraendo il valore minimo da quello massimo, partendo dalla considerazione, poi verificata, che il pH è più alto nelle ore precedenti al pasto principale, mentre il minimo si riscontra dopo circa 6 – 8 ore dopo il pasto stesso. I dati di pH (valori medi e oscillazioni giornaliere) sono state oggetto di analisi cluster tramite l'utilizzo del software Minitab (Minitab, State College, PA), per valutare il livello di similarità.

Campioni ruminanti. Nel corso dei 3 cicli alimentari in cui venivano raccolti i dati relativi al pH, campioni di contenuto ruminale sono stati prelevati pochi minuti prima del pasto, dopo 3 ore e dopo 6 ore. I campioni sono stati raccolti nella regione medio – ventrale del rumine, utilizzando guanti in polietilene cambiati passando da un animale all'altro. Appena prelevati, i campioni venivano filtrati attraverso quattro strati di cheese cloth per separare la fase liquida da quella solida; il procedimento è stato ripetuto per ogni singolo animale. Le due fasi sono state collocate all'interno di due differenti contenitori per centrifuga da 50 ml (Corning, Corning, NY) e stoccati in un congelatore a -80°C prima dell'estrazione del DNA. Sono

stati così raccolti 144 campioni totali, 72 di fase liquida e 72 solida. L'estrazione del DNA è stata condotta come descritto da Welkie et al. (2009) utilizzando 25 ml di liquido ruminale o 25 g di fase solida per ciascun campione. La concentrazione del DNA nei diversi campioni è stata determinata spettrofotometricamente per permettere la diluizione della soluzione a una concentrazione di lavoro nota di 10mg / mL. Il DNA relativo a ciascun campione è stato quindi amplificato con PCR classica e poi processato secondo la tecnica ARISA. In breve questa tecnica permette di separare i diversi ceppi batterici in base alla lunghezza della sequenza interna trascritta (ITS). Questa sequenza si trova a dividere le due sequenze geniche codificanti per le due subunità ribosomiche, definite 16S e 23S. Tramite l'utilizzo di primers specifici che si collocano o all'interno della ITS o alle sue estremità, questa sequenza viene amplificata. Grazie all'impiego della macchina per l' ARISA questi prodotti di amplificazione vengono separati in base alla loro lunghezza e visualizzati come picchi differenti. A diversi picchi corrispondono specie o ceppi diversi, così come all'interno di uno stesso picco possono essere rappresentati due o più ceppi. Generalmente però, la lunghezza di questa sequenza è tipica di ciascun specie batterica. La procedura ARISA è stata condotta come descritto da Welkie et al. (2009) con le seguenti modifiche. I prodotti di amplificazione della PCR sono stati processati in una macchina per Elettroforesi Capillare Beckman Coulter CEQ8000 Genetic Analysis System (Fullerton, CA) mixando 0.5 µl di prodotto della PCR con 1 µl di WelRed #1 infrared fluorescent dye-labeled DNA standard ladder e 39 µl di Sample Loading Solution (Beckman Coulter). La somiglianza tra comunità batteriche di campioni differenti è stata determinata con Corrispondent Analysis come descritto da Weimer et al. (2010) partendo dalla separazione in base alla lunghezza degli ampliconi (AL) generata dall'ARISA. Per caratterizzare i potenziali ceppi associati con due particolari ampliconi (AL246 e AL383), i

prodotti dell'ulteriore amplificazione con PCR sono stati clonati nel vettore pGEM-T utilizzando GoTAQ PCR product cloning system (Promega Corp., Madison, WI), così da ottenere la corrispondente unità tassonomica operativa (OTU) e la sequenza genica poi determinata presso l'Università di Madison (University of Wisconsin – Madison Biotechnology Center). La procedura relativa alla PCR Real – Time, inclusi i metodi per calcolare la percentuale di copie geniche della sequenza 16S rRNA rappresentanti singoli ceppi è stata descritta da Stevenson e Weimer (2007) insieme con i primers utilizzati, inclusi quelli per *M. elsdenii* e *S. bovis* e il genere *Ruminococcus*. Tutti questi sono stati disegnati appositamente per amplificare una sequenza all'interno del gene 16S rRNA. I primers specifici per gli OTU identificati con l'ARISA sono stati disegnati manualmente basandosi sulla sequenza clonata e in seguito analizzati utilizzando il software Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA). Le paia basi dei primers sono state selezionate per avere una temperatura di fusione di circa 60°C, un contenuto di C+G compreso tra il 35 e il 70% del totale, per amplificare una regione di approssimativamente 190bp totali, per evitare strutture secondarie stabili e per minimizzare il numero di G+C all'interno degli ultimi 5 nucleotidi vicini all'estremità 3'. Per l'OTU246, la forward primer sequence, derivata dal termine del gene 16S rRNA, era TCG TAC CTT GAC AAC TGC ATA AAA A. La reverse primer sequence, derivata dalla sequenza interna trascritta (ITS), era GCG TCC TTC TTC GGC TGA TAT. Per l'OTU383 le forward e reverse primer sequence, derivate dall'ITS erano rispettivamente GGA GCG TGT CCG AAG GCA e AGT ATT GTC AAT GAT CTG GCT CCT CA.

Statistica. I dati di produzione e composizione del latte sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando PROC MIXED di SAS (versione 7.0, vSAS Institute, Cary, NC) con l'animale come variabile. I risultati delle amplificazioni qPCR dei singoli ceppi sono stati analizzati utilizzando

PROC MIXED con vacca, giorno, ora e fase come variabili, e con le potenziali interazioni a 2 e 3 vie. Le interazioni con $P > 0.4$ sono state rimosse dal modello, che è stato rielaborato di conseguenza. I valori così ottenuti sono stati comparati utilizzando il t-test Banferroni con un $P = 0.10$ per ridurre le possibilità di errori di tipo II.

3.2 PROVE SU ERBA MEDICA

Le prove riguardanti l'analisi delle erbe sono state condotte su campioni prelevati a partire dal 2007 fino al 2009. Gran parte di questi campioni provengono da varietà sperimentali coltivate dalla Società Produttori Sementi Bologna (PSB), mentre la restante quantità è stata raccolta durante una prova di campo condotta in un medicaio adiacente alla Facoltà di Medicina Veterinaria. Tale prova è stata condotta nel periodo tra Maggio e Agosto 2007.

Sebbene le prove riguardassero campioni di diversa provenienza, l'analisi di ciascun campione è stata identica, e pertanto, prima di delineare ciascuno studio, occorre descrivere le metodiche analitiche utilizzate per la valutazione qualitativa dei campioni in questione.

I campioni, se non giunti già secchi in laboratorio, sono stati essiccati in stufa ventilata a 65°C fino a peso costante. Le metodiche utilizzate, dall'essiccazione alla determinazione delle frazioni, sono riportate nel testo della AOAC (Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis) e adattate per rispondere ai parametri di sicurezza della Comunità Europea. Il laboratorio di Zootecnia dove sono state effettuate tutte queste analisi, è provvisto di procedure operative standard (SOP) che rispettano i criteri e le metodiche base AOAC e della Comunità Europea.

Una volta determinato il contenuto di sostanza secca del campione, lo stesso è stato macinato in un mulino a ciclone (Cyclotec Sample Mill 1093, Tecator) con filtro di porosità 1.00 mm in linea con i requisiti delle metodiche ufficiali. Lo strumento veniva pulito al termine della macinazione di ciascun campione, per evitare eventuali contaminazioni in grado di falsare il risultato analitico (Regolamento CE 758/95 del 06/04/95). Sui campioni macinati è stata determinata la quota di umidità residua, ponendo una quota di campione in stufa a 103 – 105°C per quattro ore. In questo modo si determina la percentuale di umidità non eliminata con l'essiccazione a 65°C ed anche l'umidità propria del laboratorio. Questa determinazione permette in seguito di correggere i valori di peso del campione necessari per altre analisi. Appare evidente che tale correzione sarà più influente per quelle analisi in cui è richiesta la pesatura di piccole quantità di campione. Estratti dalla stufa, i contenitori con il campione sono stati posti all'interno di essiccatori volti ad impedire o comunque a ridurre il contatto del campione secco con l'umidità dell'ambiente.

La determinazione della fibra neutro detersa (NDF) è stata condotta seguendo la metodica di Van Soest e Robertson (Van Soest and Robertson, 1979) con le modifiche inserite da Mertens nel 2002. In breve, i passaggi effettuati sono stati i seguenti: pesare i crogioli estratti dalla stufa dopo averli lasciati in essiccatore fino al raggiungimento della temperatura ambiente. Questo permette di creare meno errore analitico possibile pesando i diversi crogioli. La temperatura continuando a scendere può influire sul peso del crogiolo in modo differente tra i primi pesi e gli ultimi. Lasciando raffreddare i crogioli in assenza di umidità fino a temperatura ambiente si elimina la possibilità di tale errore. Pesare fino a 1.00xx g di campione all'interno del crogiolo e aggiungere 0.50xx di Sodio Solfito, nel caso in cui la determinazione dell' NDF non debba essere seguita da altre analisi. Come detto nella parte introduttiva, il solfito rompe i legami

peptidici rendendo solubile la quota proteica. La determinazione della percentuale di proteina legata all'NDF su campioni trattati in questo modo sarebbe quindi inutile. I crogioli vanno poi inseriti nel Fibertec, dove viene applicata la soluzione detergente neutra. Nel caso in cui la matrice dei campioni sia tale da presentare una buona quota di amido, occorre aggiungere alla soluzione 100 µl di amilasi, un enzima specifico in grado di solubilizzare l'amido. I campioni sono quindi soggetti a bollitura in soluzione per un'ora, al termine della quale verranno filtrati utilizzando il setto poroso del crogiolo stesso. La filtrazione è facilitata dall'applicazione di acqua bollente, che permette di lavare via eventuali residui non desiderati nonché quelli rimasti adesi alle pareti dello strumento nel corso del trattamento. Al termine della filtrazione, il residuo viene sottoposto al trattamento con acetone, così da eliminare le tracce d'acqua presenti che rallenterebbero l'essiccazione del campione. I crogioli contenenti il residuo vengono posizionati in stufa fino al completo essiccamento e pesati. Al peso finale viene sottratto il peso del crogiolo, e il valore ottenuto diviso per il peso del campione corretto per la sostanza secca residua. Il dato finale espresso in percentuale rappresenta il valore di NDF del campione. Per verificare l'attendibilità del dato, ogni campione è stato analizzato in doppio o in triplo, e se la deviazione standard tra i risultati fosse stata $> 3\%$ il trattamento è stato ripetuto.

Il trattamento per la fibra acido detersa (ADF) è pressoché identico nella procedura a quello dell'NDF, ma visto l'impiego di soluzioni diverse, il residuo è utilizzabile anche per determinazioni successive. Queste soluzioni inoltre non rendono necessario l'utilizzo di enzimi o composti come il sodio solfito. La determinazione dell'ADF viene quindi considerata come il primo passaggio nella quantificazione della componente indigeribile della parete vegetale, ovvero la lignina acido detersa (ADL). Il residuo di ADF viene trattato con una soluzione al 72% di acido solforico, in grado di

sciogliere i composti presenti, ad eccezione della lignina appunto. Questo trattamento, che dura circa 3 ore, deve essere effettuato evitando la formazione di grumi. Il residuo, che aderisce alla superficie del setto poroso del crogiolo, si stacca al momento dell'aggiunta della soluzione. Occorre quindi, utilizzando appositi strumenti, agitare e rompere tutto il residuo per permettere all'acido di entrare in contatto con tutto il materiale. Al termine delle 3 ore, il crogiolo viene filtrato e sciacquato con acqua bollente per eliminare le tracce di acido. Viene poi sistemato in stufa, e pesato una volta secco. In seguito, il contenuto del crogiolo viene incenerito in muffola a 550°C, dove rimane per circa 3 ore; portato a temperatura ambiente in un essiccatore viene nuovamente pesato, e il contenuto di ADL si calcola sottraendo il peso del crogiolo e delle ceneri al peso del crogiolo con il residuo del trattamento con acido solforico. Il risultato viene diviso per il peso iniziale del campione per ottenere la percentuale di ADL sulla sostanza secca. Determinare NDF, ADF e ADL significa ottenere il profilo fibroso del campione, ovvero la quantificazione delle diverse frazioni fibrose.

Sui campioni delle diverse prove sono state inoltre determinate tutte le frazioni proteiche, cioè la quota di azoto totale e come, nell'insieme del campione, è strutturato nelle cellule vegetali. Il metodo utilizzato è il metodo Kjeldahl, messo a punto in principio verso la fine del 1800. Il metodo, che viene anche chiamato mineralizzazione, consiste in 3 passaggi fondamentali: la digestione del campione in acido solforico con un catalizzatore, che permette la conversione di azoto in ammoniaca, la distillazione dell'ammoniaca in una soluzione e la quantificazione dell'ammoniaca in una soluzione standard titolante. Il primo passaggio avviene in circa 4 ore di tempo, dal momento in cui la soluzione contenente il campione è portata ad una temperatura di circa 400°C. Il catalizzatore utilizzato presso il laboratorio di Zootecnica è un insieme di Solfato di

Potassio e di Rame. Al termine della mineralizzazione il tubo contenente la soluzione viene processato con uno strumento (Vapodest) che automatizza il secondo e il terzo passaggio. Il risultato ottenuto è stato moltiplicato per 6.25 che rappresenta il fattore proteico per gli alimenti zootecnici. A seconda della frazione proteica desiderata occorre effettuare alcuni passaggi prima della mineralizzazione. Per la determinazione della proteina grezza, che rappresenta la quota totale in azoto del campione, viene pesato 1.00xx g di campione in appositi dischi di carta N-free che vengono di seguito inseriti in specifici tubi per la mineralizzazione. Diversa è la procedura per la determinazione della frazione solubile della proteina. Biologicamente la proteina solubile è composta da azoto non proteico e proteine di riserva contenute prevalentemente nei semi. Viene pesata una quantità di 0.50xx g di campione all'interno di un beaker ed in seguito si aggiungono 50 ml di tampone borato – fosfato a pH noto. Il beaker viene lasciato a temperatura costante di 39°C per un'ora ed in seguito si procede con la filtrazione della soluzione aggiungendo un totale di 250 ml dello stesso tampone. I composti azotati si solubilizzano e si procede quindi con la determinazione dell' azoto sulla parte residua. La percentuale di proteina solubile si ottiene poi sottraendo dalla quota proteica totale il valore ottenuto dal residuo (BIN, Borate Insoluble Nitrogen) moltiplicato per 6.25. Come accennato, una parte di Proteina Solubile è rappresentata dall'Azoto Non Proteico (NPN), che è una delle frazioni proteiche determinabili con una particolare procedura. L'NPN rappresenta la quota di aminoacidi liberi, nitrati e urea presenti nel campione. Il rapporto tra NPN e PSol ci restituisce interessanti informazioni sulla matrice del campione che si sta analizzando. In ogni caso, la procedura per la determinazione dell'azoto non proteico prevede la precipitazione di 0.50xx g di campione in soluzione di Sodio Tungstato. Come per la frazione precedente, anche l'NPN si ottiene sottraendo il valore ottenuto dalla quota proteica totale. Il

precipitato rappresenta invece la quota di proteina vera e peptidi contenuta nel campione. Per quanto riguarda le frazioni proteiche legate alle diverse componenti della fibra, ovvero NDIP e ADIP, il procedimento è pressoché identico: al termine della determinazione di ADF e NDF il residuo viene pesato in dischetti di carta N-free e si procede con la mineralizzazione e la quantificazione. Nel corso delle prove, sono stati selezionati alcuni campioni sui quali è stata valutata la differenza di valori di NDF calcolata utilizzando sodio solfito o correggendo il valore stesso per la quota proteica.

In ultimo, tutti i campioni analizzati, sono stati digeriti *in vitro* per stimare la loro degradabilità ruminale. Grazie alla collaborazione con laboratori degli Stati Uniti, presso il lab. di Zootecnia è stato messo a punto un sistema di fermentazioni *in vitro* basato sulla metodica Tilley & Terry modificata (Figura 14).



Figura 14. Fermentatore del lab.Zootecnia per la stima della digeribilità ruminale *in vitro*

Le soluzioni e la preparazione delle fermentazioni sono riportate di seguito:

COMPOSIZIONE SOLUZIONI BUFFER, MACRO e MICROMINERALE

BUFFER:

- 72 g di bicarbonato di ammonio NH_4HCO_3
- 630 g di bicarbonato di sodio NaHCO_3
- 18L di H_2O deionizzata

SOLUZIONE MACROMINERALE:

- 102.6 g di sodio fosfato bibasico anidro Na_2HPO_4
- 111.6 g di potassio fosfato monobasico anidro KH_2PO_4
- 10.5 g di solfato di magnesio eptaidrato $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 18 L di H_2O deionizzata

SOLUZIONE MICROMINERALE:

- 13.2 g di cloruro di calcio diidrato $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 1.0 g di cloruro di cobalto esaidrato $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 10.0 g di cloruro di manganese tetraidrato $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 8.0g di cloruro di ferro esaidrato $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 100ml di H_2O deionizzata

NB: Le suddette soluzioni micromineraie, macromineraie e il buffer possono essere conservati a temperatura ambiente. E' bene quindi prepararli in anticipo e in grosse quantit , in base alla disponibilit  di laboratorio. Le altre componenti del medium vanno invece miscelati con buffer, micro e macro solo poco prima (2-3 ore) della fermentazione.

PREPARAZIONI INIZIALI

Pesare a caldo dei piccoli beaker (lasciati in stufa a 105°C per almeno 5 ore) da utilizzare per la sostanza secca. Accertarsi che nelle 5 ore precedenti la pesata non siano stati messi in stufa campioni non secchi.

Pesare 0.50xx g dei campioni di foraggio (in 2 repliche) precedentemente seccato in stufa all'interno delle boccette da utilizzare nel bagnomaria.

Accendere il bagnomaria.

PREPARAZIONE MEDIUM

Miscelare:

- 800 ml di acqua deionizzata, io farei due rate per sciacquare bene le navicelle
- 4 g di tripticase o prodotto analogo,
- 0,2 ml di soluzione microminerales,
- 400 ml di soluzione buffer,
- 400 ml di soluzione macro,
- 2 ml di resazurina,
- 10 pellets di KOH.

Sciogliere (separatamente) in 2 piccoli beaker 40 ml di acqua deionizzata e 0,5 g di cisteina e 0,5 g di H₂S. Attendere che le due soluzioni diventino chiare e miscelarle quindi al resto della soluzione. Tale soluzione può essere conservata per non più di 20 ore.

Aggiungere 40 ml di medium ad ogni boccetta utilizzando un dispenser automatico, evitando che le particelle di foraggio finiscano sulle pareti. Utilizzare delle boccette senza campione per i bianchi (2 per ogni “tempo” di fermentazione). Le boccette vanno quindi chiuse e inserite nella vasca con i tubi collegati alla CO₂. Aprire quindi la CO₂. Assicurarsi inoltre che ci sia sufficiente CO₂ per l’intera durata della fermentazione.

PRELIEVO E TRATTAMENTO FLUIDO RUMINALE

Il prelievo e il trattamento del fluido ruminale sono di estrema importanza per la riuscita della fermentazione e delle successive analisi. Si possono ottenere risultati leggermente diversi in base alle caratteristiche della dieta dell’animale utilizzato, ma tali differenze saranno aumentate qualora il trattamento del fluido risultasse mediocre. La procedura descritta qui deriva

dalla metodica Goering e Van Soest (1970) che e' a sua volta una modifica della procedura Tilley & Terry (1963).

Prima di recarsi in stalla riempire il thermos con acqua calda, e preparare il contenitore dove verrà successivamente filtrato il fluido. Il filtro dovrà essere costituito da almeno 2 strati di cheese cloth.

Recarsi in stalla e scegliere una delle vacche, assicurarsi che sia in salute e che non si sia alimentata nei minuti prossimi al prelievo. Una volta effettuato il prelievo, versare velocemente il fluido all'interno del thermos svuotato dell'acqua. Fare in modo che all'interno del thermos rimanga meno aria possibile. Tale operazione va' effettuata con estrema cura e velocità. Recarsi quindi in laboratorio e filtrare il fluido.

INOCULO DELLE BOCCHETTE E FERMENTAZIONE

Durante il prelievo del fluido in stalla, un'altra persona in laboratorio dovrà assicurarsi che il colore del medio all'interno dei bianchi sia virato dal rosa al chiaro.

Inoculare quindi 10 ml di fluido, con un dispenser automatico, in ogni boccetta evitando che le particelle di foraggio arrivino sulle pareti. Chiudere il rubinetto della boccetta.

La suddetta operazione va effettuata nel minore tempo possibile e il tempo che intercorre fra la raccolta del fluido e l'inoculo non dovrebbe superare 20-25 minuti.

Annotare l'orario dell'inoculo e quindi gli orari successivi in cui le fermentazioni dovranno essere bloccate. Quando le boccette saranno tutte chiuse, assicurarsi che la CO₂ sia in pressione positiva (almeno 2 cm di acqua). Qualora la pressione della CO₂ non possa essere mantenuta costante a causa di piccole perdite del sistema, preferire che la stessa CO₂ gorgogli saltuariamente dal tubo. Agitare le boccette 2 volte al giorno durante la fermentazione, non esagerando in modo da evitare che troppe

particelle rimangano attaccate alle pareti. Durante la fermentazione controllare che la CO₂ rimanga in pressione positiva e riparare le perdite tempestivamente qualora ve ne fossero.

Al momento prestabilito chiudere i tubi delle relative boccette che dovranno essere prelevate dal bagnomaria e disconnetterli quindi dalle stesse. Aprire le boccette e spruzzare dell'acqua distillata sulle pareti per cercare di pulire le stesse e nello stesso tempo per bloccare la fermentazione. Richiudere le. Se non fosse possibile analizzare i campioni per l'NDF immediatamente, le boccette possono essere conservate in frigo a 4°C per non più di 2 giorni.

Al termine della fermentazione ciascuna boccetta contenente il campione e le soluzioni è stata processata per la determinazione del contenuto di NDF. In seguito al trattamento, i crogioli sono stati lasciati in stufa per almeno 6 ore a 105°C. Una volta asciutti, sono stati pesati secondo la metodica della pesata a caldo descritta da Goering, H.K. and P.J. Van Soest. (1970). I pesi sono stati inseriti in un apposito foglio di calcolo, ottenendo come risultato il valore di digeribilità. Sulle repliche è stata calcolata la media e la deviazione standard, rigettando i dati in caso di valori di Dev.Std > 3 %.

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando la procedura ANOVA multivariata o fattoriale del software STATISTICA.

Di seguito saranno elencati i caratteri propri delle diverse prove.

3.2.1 PROVA 2007

I dati ottenuti da questa prova sono stati presentati a 2 diversi convegni dell' American Dairy Science Association (ADSA).

Le piante oggetto della prova appartengono a quattro diverse varietà selezionate direttamente dalla Produttori Sementi Bologna (PSB). Ognuna delle suddette varietà presenta caratteristiche distintive, quali il fusto cavo o pieno e la multifogliosità.

Ciascun campione è stato raccolto presso le parcelle sperimentali della PSB presso Argelato. I criteri del prelievo e la analisi svolte presso tale sito sono elencati di seguito.

Lotti seminati: tutti i lotti confezionati nel 2006-2007 entro il 09/03/07 e campionati per controlli qualità, in due repliche randomizzate, a confronto con standard; sono stati inoltre inseriti alcuni materiali sperimentali derivanti dalla selezione per multifogliosità su Minerva multifogliata

Semina: 15/03/07 presso l'Azienda Agricola Argelato, campo 84 (140 tesi X 2 repliche + standard al centro e ai bordi; parcelle di 5 mq; densità di semina 35 kg/ha)

Rilievi eseguiti: sviluppo (14/05/07), sintomi di patogeni, epoca di fioritura, colore del fiore e presenza di specie estranee (15 e 18/06/07), forma del legume (27/06/07), sintomi di stress idrico.

Ultimo rilievo: 27/06/06 (allegazione)

Prelievo: è stata prelevata una serie di campioni una dopo il primo sfalcio (a circa 10, 20, 30 gg).

I campioni sono stati prelevati dalle 4 varietà standard, in 2 blocchi situati nella fila centrale: dei due blocchi uno aveva evidenziato maggiore stress idrico nella fase primaverile, uno minore stress (nella fase estiva, particolarmente secca, non sono state osservate differenze di crescita tra i due blocchi).

Da ciascuna parcella sono state tagliate con le forbici circa 2 file delle 8 presenti per ciascun prelievo; il materiale prelevato da ciascuna delle due file è stato mantenuto separato per poter effettuare le analisi in un caso sull'intero contenuto, nell'altro dopo separazione di foglie e fusti. Il prelievo è stato eseguito al mattino; è stata rilevata tramite termometro a distanza la temperatura media della coltura al momento del prelievo e alle 14 circa della stessa giornata. Sono inoltre disponibili le registrazioni della centralina meteo di Argelato per tutto il periodo in cui è stato attivo il campo postcontrolli (registrazioni ogni 30 min).

I campioni sono stati trasferiti immediatamente in laboratorio per la preparazione e l'essiccazione (stufa a circa 60 ° C per 48-72 h; vaschetta di alluminio + sacchetto in plastica leggera, tipo adatto per microonde, completamente aperto): per ciascun campione è stato determinato il peso fresco e il peso secco, oltre ad una misura di peso fresco di 30 fusti prelevati a caso dal campione.

I campioni analizzati sono stati 36, per via delle 4 varietà considerate, dei 3 tempi di sfalcio e della matrice dei campioni, che rappresentavano la pianta totale, le foglie e i fusti.

3.2.2. PROVA 2008

I campioni di questa prova sono stati raccolti in sei date successive nei campi di Post – controlli ad Argelato. Sono rappresentativi di 8 diverse varietà, raccolte rispettivamente a 20 e 30 giorni di sviluppo per tre mesi successivi. Lo schema di prelievo e colturale è identico alla prova precedente. Lo stesso si può affermare per la prova 2009.

3.2.3. PROVA 2009

I campioni raccolti sono rappresentativi delle 8 varietà raccolte a circa 30 giorni di crescita. I campioni sono stati separati in foglie e fusti al momento dell'essiccazione.

3.2.2. PROVA CAMPO 2007

La prova è stata condotta in un medicaio adiacente alla facoltà di Medicina Veterinaria di Ozzano. Sono state ricavate sei parcelle divise in 3 gruppi in base all'epoca di taglio. L'area delle parcelle era di 120 m². I campioni sono stati raccolti da due parcelle a taglio, rispettivamente dopo 21, 28 e 35 giorni in seguito ad un precedente sfalcio comune. Sono stati effettuati 4 tagli consecutivi per parcella. Al momento del taglio, l'intera quantità di prodotto è stata raccolta e pesata per ottenere la resa totale della parcella. Un'aliquota di campione rappresentativa è stata trasferita in laboratorio per essere analizzata.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 DINAMICHE DI PH RUMINALI

La produzione di latte di ogni singola vacca durante i 3 giorni di studio del pH è stata del 98.5% di quelle dei 5 giorni precedenti e dei 5 seguenti alla prova, a dimostrazione del fatto che la presenza dell'elettrodo e del pHmetro non ha avuto ripercussioni sullo stato fisiologico dell'animale. Le dinamiche di pH durante le 54h di monitoraggio hanno generalmente confermato le aspettative: i valori di pH erano massimi prima del pasto principale, scendendo poi per raggiungere punti minimi tra le 5 e le 7 ore successive, come riportato in Figura 15. Dopo circa 8 ore si è osservato una ripresa degli stessi valori, che di nuovo tendeva ai massimi in corrispondenza del pasto. Nonostante questa fosse la tendenza generale per ogni animale, ciascuno di questi presentava valori medi e oscillazioni diversi dagli altri. Queste differenze sono state evidenti anche nelle singole vacche confrontando i diversi giorni (Tabella 1).

Tabella 1. Valori medi e range di pH nei diversi giorni e cluster analysis (similarità = 65%)

Cow	Mean pH			pH range			Cluster analysis results		
	day1	day 2	day3	day1	day 2	day3	Mean pH	pH range	Mean pH – pH range
1272	6.22	6.22	5.89	0.77	0.93	0.56	A	A	A
1699	6.25	6.35	6.29	0.51	1.24	0.69	B	A	B
1819	6.26	6.41	6.27	1.39	1.13	1.25	B	B	C
2007	6.63	6.36	6.44	0.48	0.85	0.42	C	A	D
2088	6.19	6.26	5.90	1.19	1.28	0.95	A	B	E
2097	6.31	6.34	6.35	1.08	1.15	0.45	B	A	F
2430	6.06	6.11	6.38	1.24	1.25	0.95	D	B	C
2653	6.53	6.44	6.56	0.64	0.45	0.26	C	A	D

I valori medi di pH hanno avuto una differenza minima di 0.04 unità (vacca n°2097) e massima di 0.32 unità (vacca n°2430). Una situazione simile è stata osservata per le oscillazioni giornaliere. Da questo punto di vista, due animali in particolare (1699 e 2097) hanno dimostrato le differenze maggiori. Posto che tra il giorno 2 e il giorno 3 ogni animale ha visto assottigliarsi le distanze tra valore di pH minimo e massimo, eccezion fatta per la vacca n°2088, nell'arco dei 3 giorni n°1699 e 2097 hanno subito delle variazioni molto maggiori. Il primo animale è passato da 0.51 unità a 1.24 per poi scendere di nuovo a 0.69. Il secondo animale invece è partito da 1.08 unità per poi salire a 1.15 e calare notevolmente a 0.45 nel terzo giorno. Gli altri sei animali si sono dimostrati tendenzialmente più stabili nel tempo, con vacche come la n°1819 in grado di mantenere non solo alti valori medi di pH, ma anche differenze costanti nell'arco dei 3 giorni di prova (1.39 – 1.13 – 1.25).

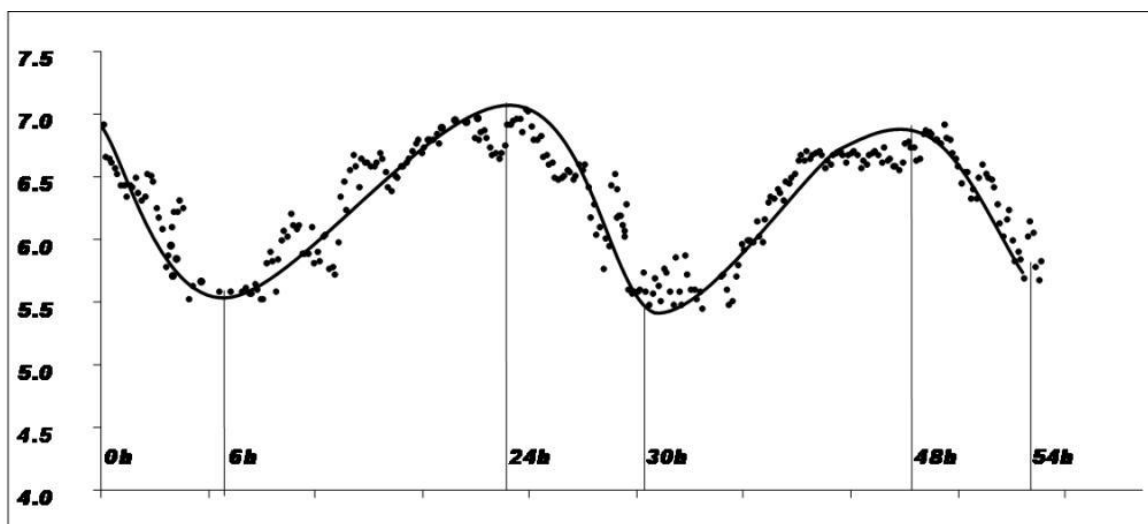


Figura 15. Andamento del pH durante il tempo di prova

Altrettanto interessante si è dimostrata la valutazione delle composizioni microbiche ruminali degli animali in prova. La similarità tra le comunità microbiche (BCC) è stata valutata tramite la metodica ARISA unita alla

CA (Correspondence Analysis). Come introdotto in precedenza, la tecnica ARISA implica la separazione tramite elettroforesi di sequenze amplificate da PCR che determinano la ITS, compresa tra i geni codificanti per le subunità ribosomiali 16S e 23S (Fisher and Triplett, 1999). Ogni picco dell'elettroferogramma capillare corrisponde a una specifica lunghezza della ITS. Siccome un singolo picco può rappresentare a più di una specie batterica, ad ogni picco viene assegnata una specifica AL (amplicon length) (Fisher and Triplett, 1999; Felske and Osborn, 2005). Di conseguenza, sebbene un elettroferogramma non rappresenti inequivocabilmente un completo profilo batterico, ottenere elettroferogrammi da animali diversi permette di comparare le diverse comunità microbiche, evidenziandone le eventuali differenze (Fisher and Triplett, 1999). La CA dei profili ARISA è basata su una regressione multivariata delle matrici generate dagli AL per campione, con un numero di dimensioni uguali al numero di AL di ogni campione. I risultati vengono visualizzati in assi cartesiani, ma è bene ricordare che la geometria in questione è di tipo vettoriale. Il primo asse di corrispondenza rappresenta tendenzialmente la frazione più grande delle varianze, con i successivi assi che contengono frazioni sempre minori. Il grafico proietta la BCC di ogni campione come singolo punto dei due assi principali. Campioni che divergevano progressivamente in base alla comunità microbica risultavano quindi progressivamente lontani nel grafico. In altre parole, maggiore è la distanza tra due punti, tanto più è differente il profilo microbico del campione che quel punto rappresenta rispetto agli altri 143. Dal grafico specifico, appare evidente la presenza di un cluster che raggruppa una grande quantità di campioni, mentre a maggiori distanze sono presenti altri 2 distinti gruppi (Figura 16). Procedendo con l'identificazione dei singoli punti, si è osservato che il cluster rappresenta tutti i campioni appartenenti a 6 diverse vacche, mentre le restanti 2 sono definite dagli altri 2 gruppi. Alla cluster analisi, questo

dato è stato confermato anche impostando il grado di similarità con cui discriminare al 90%. Sorprendentemente, all'interno del cluster di 6 animali erano presenti vacche con diversi profili di pH, cioè sia la vacca con il più alto valore medio di pH (n°2653, pH = 6.51) e quelle a più basso (n°1272 e n°2088, pH = 6.11), che le vacche con i più disparati valori di oscillazioni giornaliere (n°1819, con 1.26 unità e n°2653, con 0.45 unità).

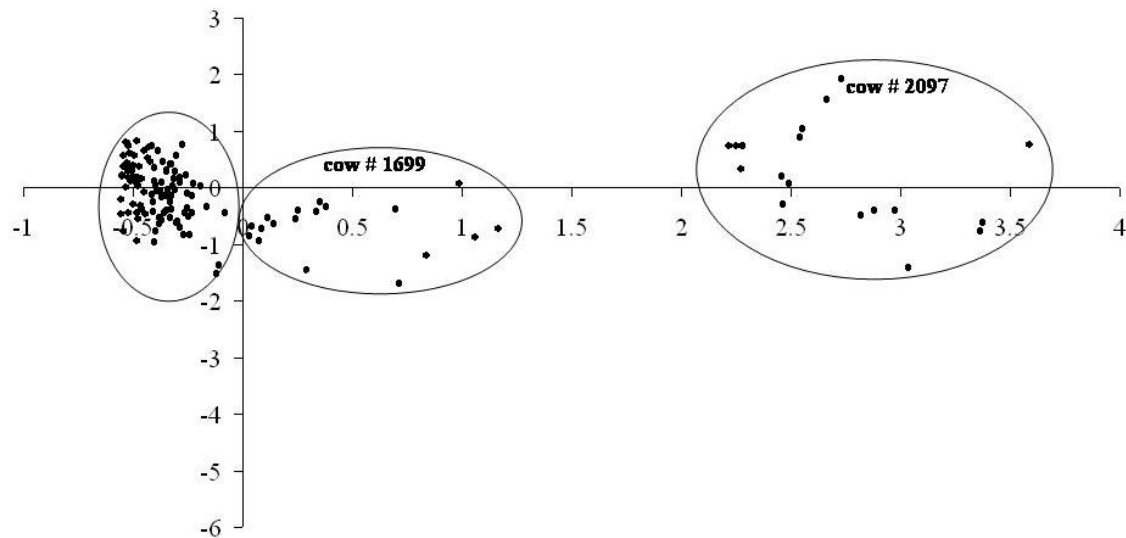


Figura 16. CA dei prodotti ARISA. Sono stati evidenziati i 3 cluster distintivi degli animali

Gli animali rappresentati dagli altri 2 clusters presentavano invece valori medi e oscillazioni di pH assolutamente intermedi. Questo è altrettanto confermato dal risultato della cluster analysis effettuata sui valori di pH, che dimostra l'impossibilità di isolare i due animali considerando esclusivamente questo tipo di dati. Questo risultato significa che comunità microbiche ruminali di animali alimentati con la stessa dieta possono essere diverse anche nei casi in cui le dinamiche di pH risultassero analoghe. Ciò che rimane ancora da decifrare è la relazione tra le diverse BCC e i differenti range giornalieri di pH entrambi presenti in due animali. Al momento, non siamo in grado di determinare se e quale sia la causa o la conseguenza. Ed ancor più interessante è il fatto che a questa dinamica si aggiungerà in seguito un altro importante dato.

Tabella 2. Composizione e produzione di latte delle 8 vacche in prova

<u>Milk yield</u>	<u>Milk components (%)</u>		
<u>Cow</u>	<u>(kg/d)</u>	<u>Fat</u>	<u>CP</u>
1272	40.6 ^{bc}	2.8 ^b	2.8 ^b
1699	37.0 ^c	2.4 ^b	2.8 ^b
1819	36.2 ^c	2.7 ^b	2.6 ^b
2007	23.3 ^e	3.5 ^{ab}	2.8 ^b
2088	41.2 ^b	3.4 ^{ab}	2.8 ^b
2097	46.1 ^a	2.2 ^b	2.4 ^b
2430	28.1 ^d	5.0 ^a	3.9 ^a
2653	22.4 ^e	3.8 ^{ab}	3.0 ^b

Un esame retrospettivo dei dati di produzione e qualità del latte dei due animali (1699 e 2097) ci indica che questi presentano una percentuale di grasso più bassa degli altri 6 animali (< 2.5%), presentando inoltre l'inversione grasso – proteina (Tabella 2).

Sono stati quindi esaminati nuovamente i dati dell'ARISA, nel tentativo di identificare i picchi rappresentativi di specie batteriche che rendevano unici i profili batterici dei due animali. Entrambi presentavano una inusuale ampiezza dell'area del picco AL 246, e contemporaneamente una riduzione di AL 383, situazione molto simile a quella riscontrata da Weimer (Weimer et al, 2010) in uno studio riguardo a vacche con la depressione di grasso nel latte. La presenza simultanea dei due AL è stata riscontrata solo nel 21% dei 143 campioni analizzati, mentre nei campioni in cui AL246 rappresentava meno del 3% dell'area totale dei picchi dell'ARISA, AL383 era decisamente presente (tra 0.4 e 1.5% dell'area totale). Situazione opposta in quei campioni dove AL246 rappresentava più del 4% del totale, con AL383 che si attestava tra 0.0 e 0.4% del totale (Figura 17).

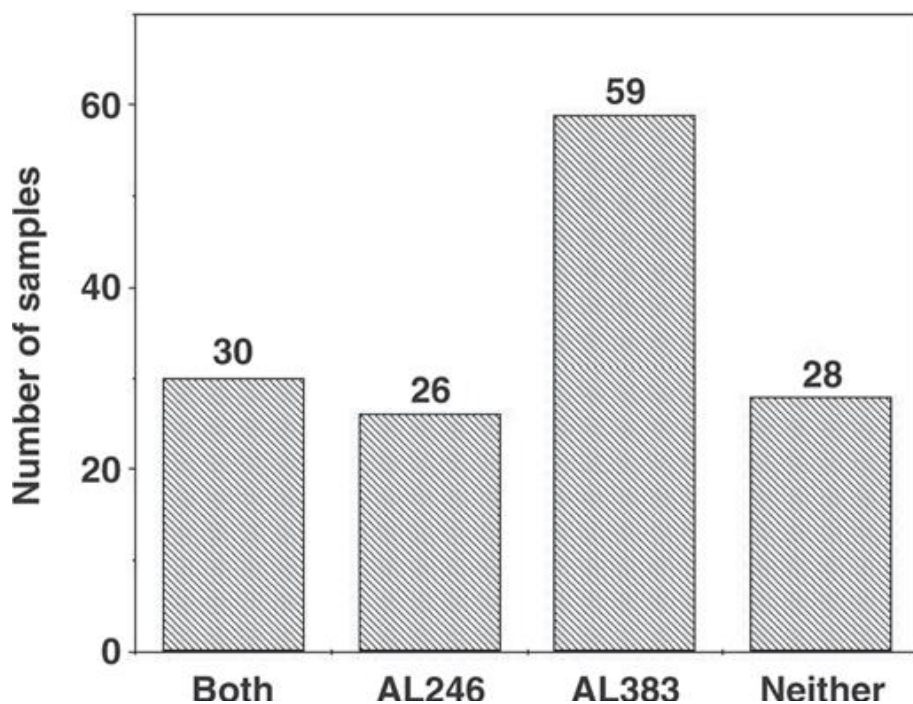


Figura 17. Presenza per campione dei due AL riscontrati

Il sequenziamento dell'amplificato di PCR di 443bp clonato (sequenza depositata in GenBank con numero di accesso FJ687347) appartenente ad un frammento di DNA prelevato dalla banda corrispondente ad AL246, ha prodotto un segmento di 150bp del gene 16S rRNA adiacente. Comparando la sequenza di OTU246 con il database di GenBank, abbiamo osservato il 100% di identità con una sequenza parziale del gene 16S rRNA di due batteri ruminali non colturali e non identificati (AB034086.1 e AB034085.1) ed il 96% di similarità con la sequenza parziale del gene 16S rRNA appartenente ad un ceppo di *Megasphaera* (clone n°SNH07, codice AY672079.2; Tajima et al.,2000). Basandosi su questa identificazione tassonomica putativa, è stata effettuata un'analisi con PCR Real – Time su campioni della fase solida appartenenti alle due vacche con depressione di grasso nel latte e ad altri due animali non depressi, utilizzando primers specifici per OTU246 e *M.elsdenii*. La scelta degli animali non depressi non è stata casuale, ma oculata, preferendo due vacche che presentavano la MFD indotta da monensin nello studio precedente (Weimer et al. 2010). Ricordiamo infatti che lo stesso antibiotico era presente anche nella dieta

degli animali oggetto di questo studio. Le due vacche quindi, erano alimentate con la stessa dieta da circa 8 mesi. I risultati della PCR Real – Time indicano che le due vacche con MFD presentavano elevati livelli sia di OTU246 che di *Meg.els.* , in particolare la vacca n°2097, situazione molto simile a quella ottenuta dalla CA. Per ciascun campione, la percentuale delle copie del gene attribuibili a queste due specie (OTU246 e *M.elsdenii*) si è dimostrata estremamente simile (Tabella 3), e la regressione lineare di tutte le analisi di qPCR dei campioni appartenenti a questi 4 animali ha rivelato una strettissima correlazione tra i due. ($r = +0.99, P < 0.0001$).

Tabella 3. Percentuale del numero di copie del gene 16s rRNA

<u>Milk fat status</u>	<u>Cow</u>	<u><i>M. elsdenii</i></u>	<u>OTU246</u>
Fat-depressed	1699	0.320 ± 0.059	0.289 ± 0.054
	2097	1.946 ± 0.759	1.582 ± 0.435
Not fat-depressed	1272	0.018 ± 0.176	0.014 ± 0.012
	2088	0.032 ± 0.024	0.028 ± 0.019

Lo stesso procedimento di sequenziamento e clonaggio è stato effettuato per AL383. Si è partiti con un frammento di 574bp per ottenere un segmento di 143bp adiacente al gene 16S rRNA. Inserita la sequenza nel database di GenBank, si è trovata la similarità del 99% con una sequenza parziale del gene 16S rRNA di un batterio ruminale non classificato né colturato. Diminuendo la similarità al 93%, è stata riscontrata una corrispondenza con *P.ruminicola*, *P.denticola* e *Prevotella* sp. La seguente analisi qPCR del corrispettivo OTU383 ha indicato che il numero relativo di copie geniche di questo potenziale ceppo di *Prevotella* non variava tra campioni diversi, anche nei casi in cui l'area del picco ARISA di AL383

differiva decisamente. Questo fa supporre che AL383 rappresenta un addizionale, non identificato filotipo le cui copie geniche variano nei diversi campioni.

A differenza di *M.elsdenii*, il genus *Ruminococcus* e la specie *Streptococcus bovis*, due taxa la cui predominanza ci si aspetti sia fortemente dipendente dal pH (Russell 2002), si sono dimostrati mediamente rappresentare rispettivamente il 10.6 % e lo 0.01 % del totale di copie del gene 16S. Non si sono inoltre osservate differenze significative tra i diversi animali, nonostante i differenti profili di pH. *S.bovis* era leggermente più presente nella vacca n°2008, che presentava un pH di poco più basso rispetto agli altri animali, ma senza alcuna ripercussione sui livelli di grasso (Tabella 4).

Tabella 4. Percentuale del numero di copie del gene 16S rRNA

<u>Cow</u>	<u><i>Ruminococcus</i></u>		<u><i>S. bovis</i></u>	
1272	9.96	± 0.029	0.0045	±0.001 ^b
1699	13.01	± 0.038	0.0043	±0.002 ^b
1819	8.35	± 0.005		NT ¹
2007	12.17	± 0.006		NT ¹
2088	10.68	±0.033	0.0222	±0.012 ^a
2097	10.80	±0.045	0.0089	±0.006 ^b
2430	9.19	±0.007		NT ¹
2653	11.03	±0.017		NT ¹

4.2 PROVA CAMPO

Per via delle condizioni climatiche della zona nell'estate 2007, nessuna parcella è stata soggetta ad irrigazione. Probabilmente a causa di ciò, all'analisi statistica non sono state verificate differenze significative all'interno dei tagli. Il trend osservato è stato però quello che si aspettava, e cioè che con l'avanzare della stagione e quindi all'aumentare delle temperature, con corrispondente assenza di precipitazioni, la quota proteica totale dei campioni diminuiva, con contemporaneo aumento della quota di fibra indigeribile e lignina. Di conseguenza, la digeribilità ruminale decresceva anch'essa. Data l'assenza di significatività, il parametro mese di taglio è stato eliminato dal programma statistico, per poi procedere con l'analisi dell'eventuale influenza della distanza tra i tagli. In questo caso, buona parte delle frazioni fibrose e proteiche non sono risultate differenti in modo significativo (Tabella 5).

Tabella 5. Valori delle frazioni analizzate espressi in %SS delle diverse parcelle, con medie, deviazioni standard e statistica. Diverse lettere (a – b – ab) indicano significatività ($P < 0.01$)

		P.G.	P.SOL	NPN	NDiP	ADiP	ADF	ADL	NDF	d-NDF 24h
P1-4 21gg	avg	20,00 a	5,69 a	4,75 a	10,79 a	5,22 a	30,42 a	6,49 a	40,12 a	45,56 a
	s.d.	2.6	1.81	1.5	3.1	0.9	2.9	0.7	3.4	8.6
P2-5 28gg	avg	16,92 b	4,51 a	3,18 b	8,07 a	4,48 a	31,06 a	6,72 a	41,34 a	37,84 b
	s.d.	0.6	0.6	0.8	2.3	0.3	2.1	0.6	3.6	4.6
P3-6 35gg	avg	16,38 b	5,07 a	3,85 ab	8,83 a	4,70 a	29,71 a	6,58 a	41,11 a	35,05 b
	s.d.	1.3	0.6	0.5	1.9	1.0	2.0	0.6	0.9	5.9

Tuttavia, il valore di PG si è dimostrato significativamente maggiore per le parcelle sfalciate ogni 21 giorni, così come la stima della digeribilità ruminale della fibra a 24 ore. Questo significa che il prodotto di questi tagli precoci rispetto alle altre parcelle, si è dimostrato qualitativamente maggiore. Dato evidenziato anche dalle frazioni proteiche, non

statisticamente significative ma che dimostrano come lo stadio di sviluppo e le condizioni climatiche possano influire sulla composizione proteica della pianta. L'erba medica, come descritto precedentemente, apporta una buona quota di fibra ma anche di proteina di alta qualità. Poter ottenere un prodotto che sia in grado di mantenere buoni standard di digeribilità e di contenuto proteico è in genere l'obiettivo principale di ogni produttore. Oltretutto, in stagioni particolarmente torride dove potrebbe non esserci disponibilità idrica per procedere con irrigazione, la scelta del momento di taglio può fare la differenza tra un prodotto di qualità e un prodotto di livello basso, con conseguenti ripercussioni sulle necessità di razionamento. In tutto questo, un altro dato si dimostra molto interessante, ovvero la resa in sostanza secca. Le rese totali maggiori si sono ottenute dalle parcelle tagliate a 21 e 35 giorni: 105.83 kg per le parcelle a 21 giorni e 116.54 kg per quelle a 35, contro 96.13 kg per le parcelle tagliate ogni 28 giorni.

Spesso la qualità del foraggio viene sacrificata per la quantità, preferendo di fatto la resa di campo alla bontà del foraggio stesso. Tuttavia in questa prova le parcelle tagliate a 21 giorni, in uno stadio vegetativo, hanno prodotto un foraggio di più alta qualità e di resa solo di poco inferiore alla classica resa di foraggi sfalciati ogni mese. Questo è reso possibile dal fatto che tagliando a 21 giorni si possono concentrare i tagli in periodi non ancora climaticamente molto stressanti per le piante, come si è verificato nei periodi di fine luglio – metà agosto. Di conseguenza possiamo osservare che in base ai dati ottenuti da questa prova, la pianta di medica risente molto degli stress ambientali, ma riuscire ad effettuare i tagli nei momenti opportuni permette di salvaguardare la qualità del foraggio, anche senza dover rinunciare ad una buona resa di campo. Maggior digeribilità e contenuto proteico significa fornire più energia al ruminante, sia come

quantità di zuccheri che di azoto, aumentando la produzione di massa batterica e quindi aumentando l'efficienza della bovina.

4.3. PROVA PSB 2007

Come descritto in precedenza, sono stati analizzati campioni di 4 diverse varietà rappresentativi della pianta totale e separati in fusti e foglie.

Per quanto riguarda le foglie, in tutte le varietà si osserva una modifica della composizione della fibra. La quota di NDF decresce con il procedere dei giorni di sviluppo, mentre ADF e ADL aumentano in modo significativo. L'effetto tempo è quindi significativo sulle frazioni fibrose, a testimoniare l'importanza della maturazione sulle foglie (Tabella 6).

Tabella 6. Valori delle frazioni analizzate espressi in %SS delle foglie di campioni a diversi giorni di sviluppo, con medie, deviazioni standard e statistica. Diverse lettere (a – b – c) indicano significatività ($P < 0.01$)

frazione	valori			statistica		
	10 giorni	20 giorni	30 giorni	10 giorni	20 giorni	30 giorni
PG avg.	33.61	28.65	24.04	a	b	C
dev.std.	1.23	1.56	1.24			
PSOL avg.	13.08	10.00	8.10	a	b	C
dev.std.	1.71	0.88	0.70			
NPN avg.	12.40	9.33	7.23	a	b	b
dev.std.	1.53	1.23	1.40			
NDF avg.	24.08	23.29	23.12	a	b	b
dev.std.	0.61	1.04	1.04			
NDIP avg.	31.61	28.18	25.07	a	b	c
dev.std.	0.29	1.45	1.07			
ADF avg.	16.25	17.10	17.96	c	b	a
dev.std.	1.01	0.97	1.30			
ADIP avg.	14.96	16.26	17.38	c	b	a
dev.std.	0.58	1.63	1.37			
ADL avg.	5.67	6.45	7.82	c	b	a
dev.std.	0.89	1.17	0.97			

Molto alti risultano i valori di NDIP %/SS. La ragione di tutto questo si può ricercare nella componente biologica delle foglie. Come descritto in precedenza, esse sono l'organo vegetale responsabile della fotosintesi. Le cellule che le compongono sono ricche di proteine ed enzimi coinvolti, di

cui una parte è altamente solubile. Anche per questo, la fibra presente nelle foglie è da considerarsi “giovanile” e poco lignificata, con nessun compito strutturale. Tra le quattro varietà però, P è quella contenente più NDF ma meno ADF e ADL rispetto alle altre. Questo si riflette poi sul rapporto ADF/NDF che rimane pressoché costante in questa varietà, invece che aumentare come accade per le altre. Risulta significativa anche l’interazione tra varietà e tempo, con la varietà P sempre differente dalle altre in studio.

Un andamento simile si è verificato per le frazioni proteiche, senza però l’esistenza di un effetto varietale. Tutte le frazioni analizzate sono diminuite significativamente con l’incedere della maturità.

Per quanto riguarda la digeribilità in vitro la stessa varietà P si è dimostrata migliore delle altre, mantenendo buonissimi livelli di fermentescibilità anche con il procedere della maturazione (Tabella 7).

Tabella 7. Valori delle frazioni analizzate espressi in %SS delle diverse varietà, con medie, deviazioni standard e statistica. Diverse lettere (a – b – ab) indicano significatività ($P < 0.01$)

frazione		Varietà				statistica			
		p	m	l	bc	p	M	l	bc
ADL	avg	5.20	6.82	6.88	7.69	c	b	b	a
	dev.std.	0.87	1.02	1.36	0.75				
ADF	avg	15.65	17.56	17.13	18.06	b	a	a	a
	dev.std.	0.30	1.32	1.20	0.55				
NDF	avg	24.43	23.53	22.76	23.25	a	b	b	b
	dev.std.	0.30	0.56	0.81	1.25				
dNDF 12h	avg	52.54	37.43	41.10	35.17	a	b	b	b
	dev.std.	8.74	9.50	7.48	9.43				

In ogni caso, visto l’elevato tenore proteico e l’elevata digeribilità, le foglie sembrano avere un comportamento simile ai concentrati; questo implica un transito molto rapido all’interno del rumine, ma anche un elevato tasso di digeribilità, accompagnato da una quota proteica decisamente buona. Non è

quindi compito delle foglie tentare di stimolare la ruminazione o la produzione di saliva, tuttavia in questo caso i rischi di un brusco abbassamento del pH sono ridotti rispetto all'impiego di amidi, date le diverse famiglie batteriche implicate nella digestione della fibra. Come ci si aspettava, i valori delle stesse frazioni per i fusti si sono dimostrati molto differenti. La quota di fibra si è rivelata molto maggiore, mentre il contenuto proteico decisamente ridotto, ma comunque in linea con i valori classici di un fieno di medica (PG = 11 – 17%SS). Da questa nota rimangono ovviamente esclusi i campioni raccolti dopo 10 giorni di sviluppo, molto più ricchi in proteina e con fibra di maggior digeribilità potenziale, data la piccola quota di lignina presente. La digeribilità dei fusti è infatti molto bassa, e raggiunge anche valori < 10% a 12h per i campioni raccolti a 30 giorni, contro un minimo di 26 % delle foglie. Si può quindi supporre un maggior tempo di ritenzione all'interno del rumine, ma comunque data la bassa resistenza alla masticazione, difficilmente si avrà un aumento delle secrezioni salivari. Foglie e fusti hanno in comune un elevato rapporto tra NPN e PSol, a testimonianza del fatto che la presenza di proteine di riserva è molto maggiore nei semi, mentre pressoché nulla negli altri organi della pianta. Tuttavia le componenti solubili risultano inevitabilmente più basse rispetto alle foglie. Un dato molto interessante riguarda i valori di proteina legata all'ADF. Risultano infatti più alti rispetto alle foglie, e con un andamento decrescente con l'avanzare della maturazione. Eccezion fatta per la varietà P, che anche in questo caso si è dimostrata particolare rispetto alle altre. I valori di ADIP tendono a crescere invece che calare. La proteina legata all'ADF è da considerarsi al pari delle pectine proteina di sostegno, cioè una sorta di “calce” in grado di impregnare le pareti vegetali, aumentando il supporto meccanico del fusto. Con il procedere dello sviluppo, questa componente però viene soppiantata dalla lignina, e questo viene considerato in genere un segno di

invecchiamento della pianta. La varietà P, a differenza delle altre, sembra pertanto risentire in misura minore della maturazione, almeno a livello delle componenti cellulari (Tabella 8).

Tabella 8. Valori medi delle frazioni analizzate espressi in %SS delle diverse varietà a differenti giorni di crescita (10 – 20 – 30).

	NDF	ADF	ADIP	ADL	dNDF 12h
P10	40.78	27.6	1.81	5.12	26.13
P20	43.54	33.1	1.85	6.82	18.13
P30	46.13	35.4	2.29	7.76	7.93
M10	38.07	28.1	1.39	5.79	21.38
M20	45.45	35.8	1.30	7.47	16.94
M30	49.62	38.8	1.19	8.25	6.63
BC10	41.50	31.5	2.56	5.19	15.32
BC20	45.10	36.5	1.01	8.08	10.67
BC30	48.99	39.1	1.00	8.73	3.83
LR10	43.26	30.4	3.23	5.81	17.76
LR20	44.99	36.2	2.02	7.34	13.39
LR30	47.20	37.8	1.65	8.60	2.10

I campioni della pianta totale risultano un insieme di tutto questo. Le frazioni analizzate non si sono dimostrate significativamente differenti tra le quattro varietà, eccezion fatta per la digeribilità della NDF, con la varietà P significativamente maggiore rispetto alle altre a tutti i tempi di sviluppo valutati. Questo dato non è osservabile per i fusti analizzati separatamente, a testimonianza del grande impatto delle foglie sulla pianta intera. Occorre però osservare che l'andamento delle frazioni analizzate rispetta quello atteso, con un calo progressivo delle componenti proteiche e un aumento di quelle fibrose, lignificazione compresa (Tabella 9). Di conseguenza è bene ricordare le due parti costituenti la pianta in sé: la quota di fibra totale è infatti comprensiva delle due, ma una digeribilità così elevata è da ricondurre quasi esclusivamente alle foglie. Così come buona parte del contenuto proteico. Se se ne preserva l'integrità, un foraggio di medica può portare in dote i benefici di entrambe le parti che lo compongono: il tenore proteico e la rapida fermentescibilità delle foglie, e una buona quota di fibra indegradabile riconducibile ai fusti, con potenziali effetti positivi sulla fisiologia del rumine.

Tabella 9. Valori medi delle frazioni analizzate espressi in %SS delle diverse varietà a differenti giorni di crescita (10 – 20 – 30).

	PG	PSOL	NPN	NDF	NDIP	ADF	ADIP	ADL
P2A 10	29.21	10.44	8.69	24.34	8.56	19.86	1.84	4.80
P2A 20	26.32	11.14	9.90	30.31	6.44	23.10	1.35	5.61
P2A 30	21.94	6.35	5.57	32.43	6.06	24.88	1.15	7.34
M2A 10	31.47	11.95	11.63	23.67	7.93	21.67	1.19	5.79
M2A 20	23.12	8.49	7.71	28.97	6.92	23.46	0.90	7.04
M2A 30	20.41	7.29	7.03	32.63	5.69	25.85	0.85	8.08
BC2A 10	30.22	12.97	10.70	25.20	8.79	21.69	2.10	6.17
BC2A 20	24.07	8.37	8.18	28.17	7.11	24.92	0.96	7.83
BC2A 30	22.75	9.55	8.84	31.07	5.94	25.12	0.84	8.61
LR2A 10	28.35	10.62	9.97	25.48	8.49	20.86	2.67	5.61
LR2A 20	23.69	8.28	7.89	28.30	6.56	24.21	1.42	6.97
LR2A 30	19.53	6.87	5.84	31.61	5.00	24.85	1.14	8.53

4.4 PROVA 2008 E 2009

La prova condotta su campioni raccolti nel 2008 ha riguardato 8 varietà tagliate a 20 e 30 giorni per 3 mesi consecutivi, ovvero giugno, luglio ed agosto (Tabella 10).

Tabella 10. Valori medi con deviazione standard delle frazioni analizzate espressi in %SS delle varietà a differenti giorni di crescita (20 – 30) in diversi mesi (giugno, luglio, agosto).

Frazione	Giugno		luglio		agosto	
	20 giorni	30 giorni	20 giorni	30 giorni	20 giorni	30 giorni
PG	25.27 ± 1.43	20.46 ± 2.16	21.29 ± 1.76	17.85 ± 0.75	19.40 ± 1.29	16.64 ± 1.08
PSOL	11.27 ± 1.26	9.49 ± 2.12	8.92 ± 1.78	5.89 ± 0.59	5.66 ± 1.59	3.98 ± 0.58
NPN	10.19 ± 1.35	8.60 ± 2.11	7.70 ± 1.45	5.00 ± 0.85	4.84 ± 1.62	3.00 ± 0.68
NDF	38.72 ± 1.79	46.94 ± 2.23	43.01 ± 3.66	47.02 ± 2.62	40.54 ± 2.10	42.41 ± 2.24
NDIP	6.39 ± 0.74	4.98 ± 0.57	6.37 ± 0.53	5.75 ± 0.54	6.87 ± 0.52	5.93 ± 0.61
ADF	28.58 ± 1.33	33.60 ± 1.19	30.54 ± 2.73	31.87 ± 2.11	24.52 ± 1.56	26.45 ± 1.50
ADIP	1.11 ± 0.09	1.02 ± 0.10	1.09 ± 0.22	0.99 ± 0.21	0.83 ± 0.17	0.93 ± 0.08
ADL	6.79 ± 0.52	8.98 ± 0.91	8.45 ± 0.61	8.67 ± 0.99	7.28 ± 1.21	7.17 ± 1.18
dNDF 24h	49.46 ± 2.68	43.37 ± 8.97	52.39 ± 7.85	45.63 ± 4.34	53.45 ± 4.61	51.57 ± 4.66

La prima analisi statistica condotta è stata mirata ad individuare eventuali effetti varietali. Tuttavia, data l'assenza di significatività per tutti i parametri analizzati, la variabile varietà è stata scartata e si è proceduto con una seconda analisi statistica volta a verificare gli effetti di giorni di crescita (20 e 30) e mese di taglio (giugno, luglio, agosto) ed eventuali interazioni tra i due.

Tabella 11. Valori medi con deviazione standard e analisi statistica delle frazioni analizzate espressi in %SS delle diverse varietà a differenti giorni di crescita (20 – 30). Differenti lettere (a – b) indicano significatività ($P < 0.01$)

frazione	20 giorni		30 giorni	
PG	21.99	± 2.89 a	18.32	± 2.15 b
PSOL	8.61	± 2.78 a	6.45	± 2.65 b
NPN	7.58	± 2.64 a	5.54	± 2.70 b
NDF	41.20	± 3.09 b	45.39	± 3.18 a
NDIP	6.59	± 0.58 a	5.58	± 0.69 b
ADF	27.54	± 3.47 b	30.51	± 3.50 a
ADIP	0.98	± 0.22	0.98	± 0.14
ADL	7.51	± 1.07 b	8.27	± 1.28 a
dNDF 24h	51.77	± 5.51 a	46.86	± 7.02 b

Per quanto concerne i giorni di sviluppo, sono stati valutati tutti i campioni raccolti a 20 o 30 giorni (Tabella 11), indipendentemente dal mese di taglio. L'analisi ANOVA fattoriale ha mostrato un elevato grado di significatività per tutte le frazioni determinate, sia fibrose che proteiche, situazione simile a quanto osservato nella prova precedente. In questo caso però le varietà sperimentali considerate erano 8 e non 4 e la prova si è svolta in un più ampio arco di tempo. La stessa significatività si è osservata confrontando i diversi mesi, indipendentemente dai giorni di taglio (Tabella 12). Tuttavia l'interazione dei due parametri non si è distinta in modo significativo, eccezion fatta per i valori di NDF e ADL.

Tabella 12. Valori medi con deviazione standard e analisi statistica delle frazioni analizzate espressi in %SS delle diverse varietà a differenti mesi (giugno,luglio,agosto). Differenti lettere (a – b - c) indicano significatività ($P < 0.01$)

frazione	giugno	Luglio	Agosto
PG	22.87 ± 3.05 a	19.57 ± 2.21 b	18.02 ± 1.83 c
PSOL	10.38 ± 1.92 a	7.41 ± 2.02 b	4.82 ± 1.45 c
NPN	9.39 ± 1.90 a	6.35 ± 1.80 b	3.92 ± 1.53 c
NDF	44.48 ± 4.45 b	45.15 ± 3.67 a	41.47 ± 2.31 c
NDIP	5.40 ± 0.90 c	6.04 ± 0.61 b	6.40 ± 0.73 a
ADF	32.09 ± 2.69 a	31.25 ± 2.43 a	25.48 ± 1.78 b
ADIP	1.05 ± 0.10 a	1.03 ± 0.21 a	0.88 ± 0.14 b
ADL	7.89 ± 1.34 b	8.56 ± 0.80 a	7.22 ± 1.16 c
dNDF 24h	46.42 ± 7.13 b	49.01 ± 7.05 b	52.51 ± 4.58 a

Nello specifico, si è osservato un calo progressivo di percentuale di azoto totale, sia tra 20 e 30 giorni che confrontando i 3 mesi di prova. Tuttavia l'assenza di significatività dell'interazione è dovuta probabilmente all'attenuarsi con il procedere dei mesi delle differenze tra i 20 e i 30 giorni. Nel mese di giugno questi sono infatti molto distanti tra loro, salvo poi riavvicinarsi nel mese di agosto. Questo probabilmente sta a significare che la situazione climatica causa effetti notevoli sul contenuto proteico di questi foraggi, a volte ancor più che la maturazione. Una situazione simile è riscontrabile anche per le frazioni NPN e PSOL, seppur con alcune differenze. Le dinamiche di calo in questo caso risultano diverse, e la maggior distanza tra i 20 e i 30 giorni si ha nel mese di luglio con le differenze minori nel mese di giugno. Meno costanti si sono dimostrate le frazioni fibrose e le quote proteiche legate ad esse. L'NDF si è attestato su valori più elevati nei campioni raccolti a 30 giorni in tutti i mesi considerati, rimanendo abbastanza costante tra i mesi di giugno e luglio, salvo poi calare nel mese di agosto. Per quanto riguarda i campioni raccolti a 20 giorni, si assiste ad un netto incremento dei valori nel mese di luglio, mentre si trova un calo nel mese di agosto. Come descritto in precedenza, i valori di NDF risultano significativamente diversi anche nell'interazione

tra giorni e mesi, ad indicare una netta differenza tra tutti i gruppi analizzati. Questo significa che la componente fibrosa del foraggio risulta influenzata tanto dalla maturazione quanto dalle condizioni climatiche. Fa riflettere il fatto che valori di NDF simili si ottengano con campioni tagliati a luglio a 20 giorni e ad agosto a 30 giorni. In altre parole si può osservare un forte effetto stagionale sull'accumulo di fibra nei dieci giorni di differenza tra le due raccolte. La quota di NDIP nei campioni a 20 giorni ha invece un andamento pressoché costante tra giugno e luglio, con una crescita nel mese di agosto. Una lieve crescita si assiste anche per i campioni a 30 giorni, sebbene l'incremento maggiore avvenga tra giugno e luglio. Curiosa è anche la dinamica dell'ADF. Le differenze tra i 20 e i 30 giorni, molto evidenti nel mese di giugno, diminuiscono a partire da luglio, seguendo poi lo stesso andamento ad agosto. Mentre l'NDF tra luglio ed agosto perde dai 3 ai 5 punti percentuali, l'ADF perde circa 6 punti percentuali. Questo significa una modificazione morfologica della fibra stessa, con probabili effetti positivi sulla digeribilità. L'ADIP invece non ha mostrato significatività confrontando i campioni a 20 e 30 giorni. Questo potrebbe significare un interessante indizio sui metodi di deposito di questa frazione proteica; probabilmente, la quota di azoto legata alla cellulosa viene tutta prodotta entro i primi 20 giorni di sviluppo. Anche la lignina segue un andamento simile a quello dell'ADF, e di conseguenza altrettanto interessante. Troviamo grandi differenze tra i campioni raccolti nel mese di giugno, che però si riducono con il procedere dei mesi. Nonostante questi trend evidenti, le differenze rimangono comunque statisticamente significative anche a livello di interazione giorni e mesi.

La digeribilità della fibra a 24 ore è risultata significativa sia per i giorni che per i mesi, ma non nella loro interazione. Questo è probabilmente dovuto all'aumento considerevole dei suoi valori nel mese di agosto dei campioni raccolti a 30 giorni. Aumento spiegabile dalla modifica

morfologica sopracitata: la quota di ADF rispetto a quella di NDF è considerevolmente ridotta, come in parte anche quella della lignina, mettendo a disposizione dei batteri ruminanti una fibra poco lignificata o “invecchiata” e quindi più potenzialmente digeribile, come poi è stato verificato dalla prova *in vitro*.

La prova del 2009 ha visto coinvolte le stesse varietà, raccolte a 30 giorni di sviluppo nel mese di giugno. In questa prova è stato effettuato il calcolo delle percentuali di foglie e fusti sul peso totale, permettendo di stimare le diverse percentuali delle frazioni sulla pianta totale (Tabella 13).

Tabella 13. Confronto dei valori medi di stima e analisi reale delle frazioni espressi in %SS. Percentuale di foglie e fusti sul peso totale della pianta

	P		M		LR		BC		MFA		MFD		D		G	
	stima	reale	stima	reale	Stima	reale	stima	reale	stima	reale	stima	reale	stima	reale	stima	reale
PG	20.15	19.75	20.13	20.82	22.54	24.38	20.23	20.92	19.59	19.42	18.60	17.13	20.83	22.10	20.21	19.17
NDIP	5.77	4.83	5.22	5.41	5.62	5.03	4.79	4.73	5.68	5.81	5.11	5.04	5.02	3.99	5.11	5.50
ADIP	1.42	0.90	1.66	1.20	1.82	0.95	1.36	1.01	1.27	0.99	1.53	1.01	1.82	1.10	1.61	1.33
% foglie	58.76		58.19		62.05		62.66		62.51		57.93		60.43		55.18	
% fusti	41.24		41.81		37.95		37.34		37.49		42.07		39.53		44.78	

Per le otto varietà analizzate il rapporto è in media di circa 60 : 40 per foglie e fusti rispettivamente, a testimonianza del grande impatto delle foglie sulla totalità della pianta quando raccolta nella sua integrità. Si è rivelato interessante il fatto che per alcune frazioni, come la PG, l'NDIP e l'ADIP la differenza tra valore stimato e valore effettivo sia decisamente ridotta, mentre per le altre frazioni le distanze aumentano. Questo fa pensare che ci sia un buon controllo genetico sul contenuto proteico totale della pianta, mentre come le frazioni fibrose sono composte dipende maggiormente da fattori riconducibili alla maturazione o alle condizioni stagionali, che possono quindi modificare il rapporto foglie : fusti incidendo sui valori della pianta intera. Anche questa prova ha dimostrato la diversa composizione di foglie fusti, con le prime ricche di proteina e di fibra poco lignificata, mentre la parte strutturale della pianta presentava una

situazione opposta, con basso contenuto proteico e un'elevata quantità di fibra indegradabile (Tabella 14).

Tabella 14. Valori medi delle frazioni analizzate espressi in %SS di foglie e fusti delle diverse varietà in studio

	P		M		LR		BC		MFA		MFD		D		G	
	foglie	fusti	foglie	fusti	foglie	fusti	foglie	fusti	foglie	fusti	foglie	fusti	foglie	fusti	foglie	fusti
PG	28.00	8.97	27.29	10.17	27.19	9.65	26.89	9.07	25.94	9.01	25.30	9.38	26.36	9.87	28.76	9.69
PSOL	10.90	3.34	9.45	4.15	9.38	3.63	9.46	3.25	7.57	3.45	6.59	4.20	7.88	3.71	9.41	3.56
NPN	8.32	2.77	7.35	3.77	7.67	3.37	7.67	3.12	6.71	3.20	6.00	3.87	6.15	3.39	8.36	3.10
NDF	19.00	55.54	18.86	59.29	21.30	59.02	18.49	56.52	18.68	60.62	19.34	60.04	18.59	57.72	20.16	59.36
NDIP	8.15	2.38	7.25	2.38	7.53	2.50	6.06	2.67	7.54	2.58	7.08	2.39	6.59	2.64	6.95	2.84
ADF	18.5	49.8	17	52.9	16.7	55.5	15.6	56.1	17.2	54.5	17.23	49.3	16.2	51.9	16.5	57.5
ADIP	1.55	3.66	1.13	2.45	0.91	3.32	0.97	2.02	0.92	1.85	1.08	2.15	1.22	2.77	0.88	2.51
ADL	4.51	8.82	5.77	8.18	5.19	7.51	5.44	7.01	4.94	8.55	5.89	9.26	5.99	8.01	5.46	8.48

Inoltre è notevole la differenza tra la quota proteica legata alla NDF e quella legata alla ADF, con la prima nettamente maggiore nelle foglie, e con la seconda più presente nei fusti. Come descritto in precedenza, questo è frutto delle diverse funzioni di queste proteine, coinvolte nel processo fotosintetico nelle foglie e nel sostegno meccanico nei fusti.

5. CONCLUSIONI

Per ciascun ciclo di alimentazione e per ogni singola vacca, il pH della regione medio – ventrale del rumine registrato ha raggiunto i valori massimi poco prima del pasto, per poi decrescere e toccare i valori minimi dopo approssimativamente 6 – 8 ore, come riportato da Dufield et al. (2004), a differenza delle circa 3 ore osservate da Marden et al. (2005). Durante le altre 18 ore circa, un calo graduale della produzione di acidi di fermentazione e l'aumento dell'assorbimento degli stessi (Whitelaw et al., 1970), insieme all'effetto della salivazione durante la fase di ruminazione (Mackawa et al., 2002), permette al pH di tornare a valori maggiori e vicini a quelli di partenza. Tutte le curve di pH hanno mostrato variazioni rispetto alla media, molto probabilmente a causa dei microambienti locali dovuti alle fluttuazioni del fluido ruminale e le sue interazioni con la frazione solida degli alimenti ingeriti.

Nonostante questo fosse l'andamento generale di ciascun animale, si sono osservate differenze sia ridotte che evidenti una volta confrontati tutti gli animali in prova. Per alcuni il pH medio era di poco superiore a 6.0 (6.11), per altri molto maggiore (6.51). Le stesse differenze si sono riscontrate per quanto riguarda le oscillazioni giornaliere del pH. Alcuni animali mantenevano un range ridotto (0.45 unità), mentre altri erano soggetti a variazioni più sostanziali (1.26). Occorre ricordare che tutti gli animali in prova erano alimentati con la stessa dieta, per cui le ragioni di queste differenze sono da ricercarsi altrove, come ad esempio l'attitudine alimentare, che riguarda il tempo speso nella masticazione piuttosto che nella ruminazione, o il numero di boli ingeriti o ruminati. Differenti possono risultare anche il tasso di passaggio dell'alimento o degli AGV nel rumine, oppure l'efficienza di assorbimento degli AGV stessi o del tampone salivare (Russell, 2002).

Discusso di queste differenze, occorre osservare che degli 8 animali in prova, 6 di questi, e cioè il 75%, presentavano composizioni della comunità microbica molto simili. Queste similarità sono state osservate grazie agli spettri ARISA, che rappresentano largamente la moltitudine di specie e ceppi batterici non ancora identificati o colturali. Tuttavia, quelle specie conosciute che si considerano essere affette da particolari valori o variazioni di pH, non si sono dimostrate differenti tra i diversi animali. Nonostante sia *Ruminococcus albus* che *R. flavefaciens* siano incapaci di crescere in un ambiente a pH < 6.0 in colture continue (Russell et al., 1980; Shi e Weimer, 1992), le analisi di PCR Real – Time condotte sui campioni di contenuto ruminale hanno rilevato livelli simili del genus *Ruminococcus* per tutte le vacche in prova (approssimativamente il 10.6% del numero totale di copie del gene 16S rRNA). L'abbondanza di questo genere è stata riscontrata anche in lavori precedenti in cui è stata utilizzata la stessa procedura con PCR Real – Time (Weimer et al., 2008), e in altri in cui era frequente la presenza di sequenze in librerie di cloni collegabili ad specie come *R.flavefaciens* (cellulosolitico), *R.bromii* e *callidus* (amilolitici) (Tajima et al., 2000). *Streptococcus bovis*, batterio considerato essere abbondante in condizioni di acidosi ruminale (Russell, 2002), manteneva livelli molto bassi in tutte le vacche (circa 0.01% del numero totale di copie del gene 16S rRNA). Questa ridotta presenza è in linea con valori riscontrati in altri studi condotti con l'ausilio di qPCR (Stevenson et al., 2007; Weimer et al., 2008), e l'assenza di *S.bovis* in librerie di cloni (Tajima et al., 2000). Una spiegazione parziale della mancanza di effetti di differenti dinamiche di pH su queste specie *in rumine* potrebbe includere una disparità a breve termine tra la grandezza delle popolazioni e la loro attività metaboliche durante il corso del ciclo alimentare. Ad esempio, sebbene i ruminococchi cellulosolitici possano cessare la loro crescita a pH < 6.0 (Russell et al., 1996), questi rimangono adesi alle particelle di cibo

anche a livelli di pH minori, per poi riprendere il loro sviluppo una volta che il pH si è ristabilito (Mouriño et al., 2001). Gli effetti del pH sui ruminococchi amilolitici non sono stati valutati.

La composizione della comunità batterica di 2 degli 8 animali è risultata differente dagli altri 6. A livello macroscopico, questi si distinguevano per il ridotto contenuto di grasso nel latte prodotto. L'esame dei profili ARISA ha rivelato che entrambe le vacche possedevano livelli molto più alti rispetto agli altri animali di diversi AL, in particolare AL 246. Il clonaggio e il sequenziamento di una porzione del gene 16S rRNA associato ha portato alla creazione di OTU246, che presentava un fortissimo grado di similarità con *M.elsdenii*, batterio riconosciuto essere presente in elevate quantità in condizioni di MDF (Latham et al., 1972). Le analisi condotte con PCR Real – Time sui campioni di contenuto ruminale, utilizzando primers specifici sia per OTU246 che per *M.elsdenii*, hanno mostrato che la presenza di entrambi era elevata nei due animali che presentavano MFD, e che i due batteri erano estremamente correlati ($r^2 = 0.99$). Questi dati confermano uno studio parallelo (Weimer et al., 2010) nel quale OTU246 era molto presente nelle sei vacche soggette alla MDF indotta, mentre pressoché assente negli animali che non presentavano depressione di grasso nel latte. Molto interessante risulta inoltre il fatto che due animali che non presentavano MFD o elevati valori di OTU246 in questo studio (n°1272 e n°2088), si trovavano in condizioni di depressione, con annessa la presenza di AL246, nello studio condotto circa 6 mesi prima (Weimer et al., 2010). Questo indica che vacche che mostrano MFD in diete che contengono sia carboidrati rapidamente fermentabili che monensin possono ristabilirsi da questa situazione anche in caso di esposizione continuata a monensin, e soprattutto che questo riassetto implica lo shift di popolazioni di alcuni OTU. I due studi insieme forniscono la prima prova molecolare di un' associazione tra la MFD e la presenza di *M.elsdenii* in rumine, in

accordo con le dimostrazioni fatte con studi *in vitro*. Tuttavia occorre ricordare che la presenza di questo OTU246 non è da considerarsi la causa assoluta della MFD, data la sua comparsa in alcuni casi solo in fasi avanzate della depressione (Weimer et al., 2010).

Un secondo AL (AL383) presentava picchi dell'ARISA ridotti in campioni ruminanti ricchi di OTU246. Lo stesso AL si dimostrava quasi assente anche in vacche che mostravano MFD quando alimentate con diete contenenti amidi velocemente fermentabili e monensin (Weimer et al., 2010). In questo studio, AL383 ha dimostrato di contenere almeno due distinti filotipi: una *Prevotella* sp. il cui contributo alle copie del gene ITS non variava in campioni differenti, e un ceppo non identificato che verosimilmente era il responsabile delle diverse aree dei picchi ARISA. Isolare e caratterizzare questo filotipo sconosciuto, ed indagare le sue interazioni con *M. elsdenii* potrebbe fornire un' indicazione fondamentale riguardo il meccanismo della MFD.

Il fatto che *M. elsdenii* sia una delle cause della MFD risulta molto interessante, alla luce della produzione da parte di questo batterio di *trans*-10 *cis*-12 CLA, un particolare prodotto della bioidrogenazione ruminale dell'acido linoleico in grado di inibire la sintesi di grasso da parte della ghiandola mammaria (Bauman et al., 2003; Kim et al., 2002). Tuttavia esistono tuttora controversie sulla produzione da parte di tutti i diversi ceppi di *M. elsdenii* di questo specifico composto, e la risoluzione di questo deve comportare lo studio di isolati del batterio in condizioni di presenza o assenza di MFD, così da valutare la produzione del CLA.

In ogni caso, la depressione di grasso nel latte si dimostra essere un problema complesso, così come le sue cause microbiche, che potrebbero riguardare anche la presenza o l'assenza di ulteriori specie, come probabilmente il non ancora identificato AL383.

Per quanto riguarda le diverse prove effettuate sulla medica, esse presentano alcuni punti chiave comuni. Nel corso del dottorato, sono stati analizzati circa 200 campioni di medica standard, ovvero prelevati da allevamenti o depositi. Questo significa che sono stati raccolti seguendo le metodiche tradizionali: una volta sfalciati, sono stati essiccati in campo e poi prelevati e trasportati. Questo sistema, come noto da diversi anni (Baldoni et al., 1982), causa una grossa perdita di materiale, ed in particolare di foglie. Da un punto di vista nutrizionale, questo si traduce in un calo sostanziale del contenuto proteico, ed un aumento della quota di NDF poco digeribile. In sostanza, si ha una perdita di valore nutritivo del foraggio. Il contenuto proteico totale di questi campioni di è attestato a valori di 12% sulla sostanza secca, mentre le piante analizzate nelle prove sperimentali, tagliate con forbici e raccolte a mano, presentavano in media valori non inferiori a 25% della sostanza secca. Queste differenze sono state riscontrate anche per la quota fibrosa, con valori di 56% contro 32% della sostanza secca per i campioni in prova. Quando in laboratorio viene analizzato un fieno di medica che presenti valori di PG di circa 16 – 18% della sostanza secca, questo viene considerato molto buono, quando in realtà la medica può sicuramente “offrire” di più. Al momento del razionamento, una medica con le caratteristiche medie riscontrate implica un adeguamento della razione stessa; i ridotti livelli proteici devono essere corretti con altri alimenti più ricchi, e di conseguenza anche più costosi. La stessa situazione si trova quando si calcolano le quote di fibra della razione. La medica non possiede tutte le caratteristiche necessarie per soddisfare i fabbisogni dell'animale di fibra efficace (Mertens, 1997), ed in genere la fibra di un fieno di medica è molto lignificata e scarsamente digeribile, a differenza della fibra di altre specie vegetali, biologicamente e morfologicamente differenti (Figura 18).

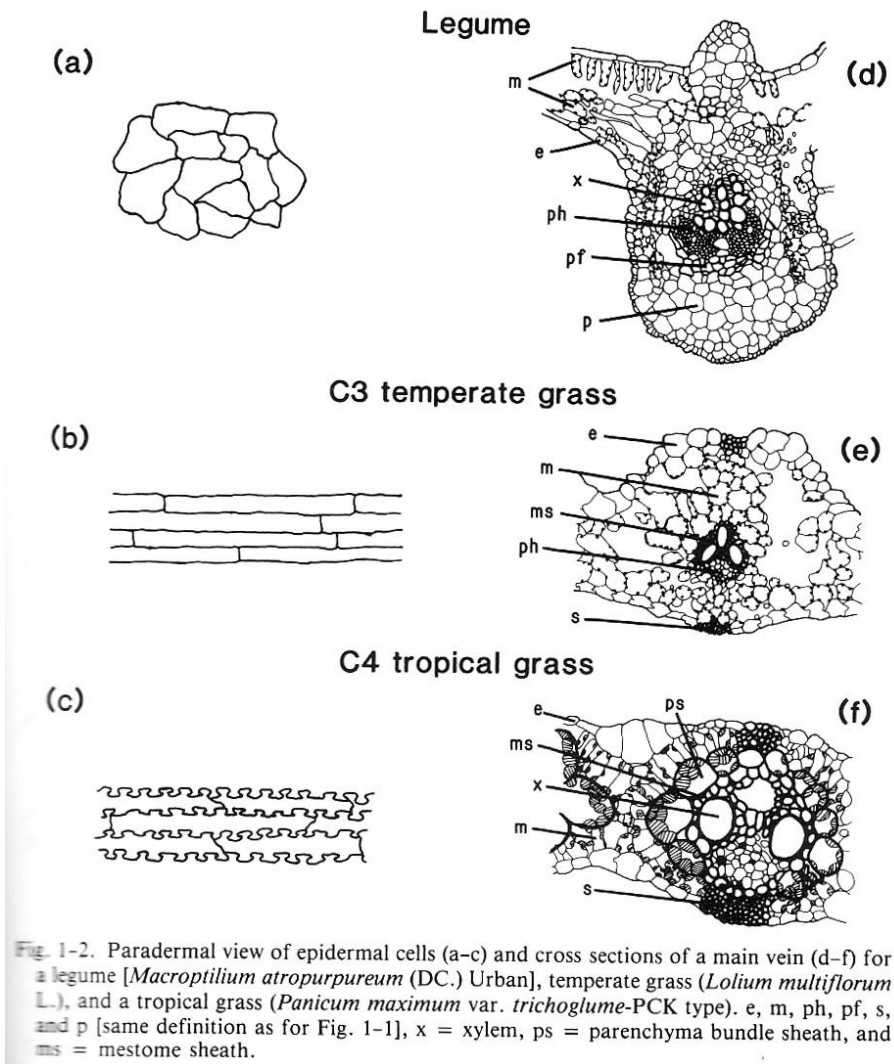


Figura 18. Rappresentazione della struttura della fibra di 3 specie vegetali diverse

Il che si traduce in livelli ridotti di energia per il rumine, data la difficoltà dei batteri cellulolitici di degradare un fieno con queste caratteristiche. Il nutrizionista dovrà pertanto inserire nella razione una maggior quota di carboidrati fermentabili nonché altre fonti di fibra, per mantenere le corrette funzionalità del rumine. Il fieno può essere lasciato molto lungo, rischiando però di incappare in problemi legati alla scelta dell'animale (Allen, 2006). Inoltre altre specie foraggere permettono di ottenere risultati migliori rispetto alla medica. Occorre però ricordare che la medica è la foraggiera per eccellenza, vista l'impossibilità di utilizzarla per la nutrizione umana o per altri scopi. E' altrettanto evidente che il sistema di raccolta utilizzato in queste prove non è applicabile a realtà produttive, ma rimane

comunque necessario migliorare il sistema di raccolta della medica, così da sfruttare appieno il potenziale di questa leguminosa. L'altro grande fattore che spesso non viene considerato adeguatamente è il rapporto tra resa di campo e qualità. L'agricoltura tradizionale punta quasi esclusivamente sulla resa, che significa lasciare crescere il foraggio più possibile. A questo punto occorre descrivere due possibili conclusioni. Le prove descritte in questa tesi, hanno permesso di evidenziare il diverso comportamento di una particolare varietà, chiamata P. Rispetto alle altre considerate questa varietà mantiene elevate caratteristiche nutrizionali anche in fasi di sviluppo avanzate, evidenti anche dal minor contenuto in lignina anche a 30 giorni di sviluppo.

Questo significa che grazie al lavoro di miglioramento genetico e è possibile selezionare varietà che ritardano lo sviluppo, giungendo alla produzione di semi più tardi rispetto ai giorni totali tradizionali. Da un punto di vista nutrizionale, questo significa che i processi interni della pianta sono rallentati, permettendo a queste varietà di mantenere caratteristiche ottimali, sia nel contenuto proteico che fibroso, anche ad avanzate fasi di sviluppo. Questo favorirebbe l'ottenimento di alte rese di campo senza dover rinunciare alla qualità del foraggio. Tuttavia la realtà diffusa è diversa, probabilmente per via della scarsa diffusione o presenza in commercio di queste varietà, o per cause legate a procedure consolidate, e di conseguenza gli allevatori devono fare i conti con fieni di medica di bassa qualità, dovendo poi adattare la razione per necessità di risposta ai fabbisogni degli animali. Questa tesi vuole evidenziare la necessità di giungere ad un compromesso tra la quantità e la qualità del prodotto. La prova condotta nel medicaio nell'anno 2007 ha dimostrato che in certe condizioni la resa non dipende esclusivamente da quanto il foraggio viene lasciato crescere in campo, perché alcuni fattori ambientali incidono molto sullo sviluppo, e ciò che si modifica nella pianta dopo 3 settimane di

crescita non è tanto la quantità di materiale, quanto le sue caratteristiche, come il contenuto proteico o le componenti fibrose: il processo di lignificazione è inevitabile, in quanto rappresenta sia un sistema di difesa che la risposta alle necessità di sostegno strutturale. Pertanto aumenta la quota di fibra indegradabile e calano le frazioni solubili, cioè la qualità del foraggio cala pesantemente, con evidenti conseguenze nutrizionali.

Più in particolare, si è rivelato di grande interesse lo studio delle due parti che compongono la pianta di medica, ovvero foglie e fusti.

Le foglie sono un organo molto ricco di energia, gran parte della quale si trova in forma solubile. Anche il contenuto di fibra è molto particolare. E' da considerarsi infatti fibra giovanile e tenera, e pertanto rapidamente fermentescibile una volta giunta nel rumine. Questa fibra si trova per gran parte legata a proteine, rendendola un valido substrato per formazione di massa microbica, data la presenza contemporanea di scheletri carboniosi e gruppi azotati. Un risultato simile si ottiene inserendo nella razione amidi di rapida degradabilità e proteine, tuttavia è comune incappare in diverse problematiche. Per svilupparsi e produrre massa microbica i batteri hanno necessità di carbonio e gruppi ammonio. Se questi due composti giungono nel rumine da due fonti diverse, è lecito aspettarsi due tassi di degradabilità differenti. Pertanto, razioni bilanciate solo a livello quantitativo possono produrre squilibri a ruminanti, con una conseguente abbondanza di acidi di fermentazione, inutilizzabili per la produzione proteica e responsabili di abbassamento dei valori di pH. Inoltre, gli amidi vengono degradati da famiglie batteriche differenti da quelle cellulolitiche, con la conseguente produzione di acido propionico e non acetico. Pertanto, non solo si abbassa la quota di grasso nel latte – con risvolti economici negativi – ma si corre il rischio di abbassare il pH ruminale. Nel caso delle foglie di medica, la sorgente di scheletri carboniosi e azoto è la stessa, e ancor più si tratta di fibra, con il conseguente impiego fermentativo dei batteri cellulolitici.

Khafipour et al. (2009) hanno dimostrato che si possono riscontrare sintomi di acidosi ruminale subacuta anche in diete ricche di pellet di medica, ma solamente quando il rapporto pellet – fieno di medica era 1 o a favore del pellet; nelle diete non erano presenti altri foraggi; una situazione simile è facilmente risolvibile inserendo nella dieta altre fonti di fibra, data inoltre la scarsa quota di fibra efficace ascrivibile alla medica. Le foglie di conseguenza a livello ruminale si comportano come i concentrati, con la sostanziale differenza che la quota di carboidrati degradabili non è formata da amidi o zuccheri semplici, implicando l'azione di alcune specie batteriche che riducono il rischio di problemi ruminali.

La situazione dei fusti è differente, e molto simile a ciò che si osserva generalmente quando si analizza un campione vero e proprio di erba medica. Questo purtroppo è dovuto alla problematica descritta in precedenza, cioè la grande perdita della parte fogliare. Di grande interesse si è rivelato il contenuto di proteine legate alla ADF, maggiore nei fusti che nelle foglie. Queste proteine sono un ulteriore fattore di sostegno strutturale, e legandosi alla fibra ne aumentano le proprietà meccaniche. Hanno un tasso di degradabilità molto lento, ma comunque maggiore rispetto all'altro collante della parete vegetale che è la lignina. Come descritto nell'introduzione, gran parte della digeribilità potenziale di un alimento risiede nella superficie che mette a disposizione dei microorganismi, e la lignina è il principale fattore in grado di influenzare questo meccanismo, il processo di lignificazione è inevitabile in quanto necessario alla pianta, ma con alcuni accorgimenti è possibile ottenere un fieno non completamente lignificato. Tagliare il fieno ad uno stadio di sviluppo non troppo avanzato previene sicuramente queste problematiche, e come osservato permette di ottenere un materiale con livelli proteici buoni; tuttavia esiste una condizione da rispettare: la pianta deve essere soggetta a meno stress possibili, che siano climatici o idrici o biotici. In caso di stress

infatti la pianta reagisce velocizzando il processo di lignificazione, così da alzare i livelli di difesa. Questo processo è energeticamente molto dispendioso, per cui difficilmente la pianta sarà in grado di mantenere le sue caratteristiche migliori anche con il passare del tempo.

Infine, è importante ricordare che i laboratori di analisi dei foraggi hanno, ad oggi, la possibilità di caratterizzare a fondo i diversi aspetti nutritivi dei foraggi stessi, permettendo di stimare sempre più correttamente le peculiarità delle diverse matrici vegetali. Esistono diverse sigle e frazioni associate diverse volte a elementi o composti spesso non riscontrabili da un punto di vista biologico. Tuttavia queste frazioni sono state definite, insieme con le analisi necessarie alla loro determinazione, per spiegare, forse anche grossolanamente, il comportamento dei diversi composti quando somministrati come alimenti. La digeribilità della fibra è uno di questi. Ciò di cui i laboratori più avanzati sono dotati, sono strumenti in grado di stimare quanto e come un dato alimento verrà più o meno degradato nel rumine. Ovviamente si tratta di una stima, ma per chi si trova a dover formulare una razione, questo parametro è divenuto di fondamentale importanza. Digeribilità della fibra significa poter stimare quanta energia è a disposizione dei batteri cellulolitici, e quindi quanto acido acetico verrà prodotto nel rumine, oppure quale foraggio scegliere a parità di valori di NDF. Un foraggio poco digeribile potrebbe favorire la ruminazione, ma significa anche poca energia disponibile e quindi poca massa batterica prodotta e quindi ancora poca proteina a disposizione dell'animale. Tutte queste analisi, soprattutto quelle che riguardano la quantificazione delle frazioni fibrose, sono analisi in continua evoluzione, data la necessità di ottenere valori sempre più attendibili. Si è così introdotto l'utilizzo di alfa – amilasi per i campioni ricchi di amido, l'utilizzo di Sodio Solfito per eliminare la quota proteica, fondamentale per campioni che, come le foglie, presentano valori di NDIP > 35% NDF.

Risulta quindi altrettanto evidente la necessità di una standardizzazione di queste metodiche condivisa da tutti i laboratori di analisi (Fusaro et al., 2007). Sia per chi commissiona l'analisi, sia soprattutto per la credibilità del laboratorio stesso, dato che in caso di ring test, il campione analizzato è lo stesso. I valori ottenuti da queste analisi sono in genere inseriti nei modelli di razionamento, che li utilizzano per formulare le razioni. Poter procedere con analisi sempre più accurate, in concomitanza con il perfezionamento di questi modelli, permetterebbe di creare razioni migliori e ottimali.

In conclusione, questa tesi ha voluto verificare o dimostrare l'influenza di fattori chiave sulle fermentazioni ruminali della fibra. Il pH del rumine si è dimostrato fondamentale per il corretto funzionamento di questi metabolismi, essendo correlato con la possibilità dei batteri cellulolitici di lavorare nelle condizioni ottimali. Tuttavia, il pH da solo non è in grado di spiegare l'insorgere di alcune patologie, che si rispecchiano in sostanziali modifiche delle popolazioni microbiche ruminali. D'altra parte le caratteristiche del foraggio sono un altro punto chiave per lo svolgimento delle fermentazioni. Il grado di lignificazione, il contenuto proteico e la maturazione del foraggio sono fattori in grado di modificare il metabolismo della cellulosa, riducendo la superficie a disposizione dei batteri o l'energia necessaria per svilupparsi. I laboratori di analisi sono oggi in grado di stimare le caratteristiche nutritive dei foraggi, ma questo non è un processo ancora concluso, ma anzi in continua evoluzione.

Conoscere meglio le dinamiche ruminali, e soprattutto le popolazioni batteriche in esso contenuto, così come poter ottenere foraggi di alta qualità, ricchi degli alimenti necessari ai microorganismi sono ad oggi le condizioni fondamentali a cui occorre rispondere per formulare razioni

sempre più accurate e di conseguenza aumentare l'efficienza delle bovine da latte.

6. Bibliografia

- Allen M. S., Voelker J. A., and Oba M., 2006.
Physically effective fiber and regulation of ruminal pH: More than just chewing.
p. 270–278 in *Production Diseases in Farm Animals*. N. P. Joshi and T. H. Herdt, ed.
Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Allen M.S. 1997.
Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement
for physically effective fiber.
J. Dairy Science. 80:1447-1462.
- Allen, M., J. A. Voelker, and M. Oba. 2006.
Physically effective fiber and regulation of ruminal pH: More than just chewing.
Production Diseases in Farm Animals. Pages 270-278.
- Allison M.J., 1969.
Biosynthesis of amino acids by ruminal microorganisms.
J. Animal Science. 29:797-807.
- Argillier O., Méchin V. , Barrière Y., 2000.
Inbred Line Evaluation and Breeding for Digestibility-Related Traits in Forage Maize.
Crop Science 40:1596-1600.
- Atalla R. H., Hackney J. M., Uhlin I., and Thompson N. S., 1993.
Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose.
Int. J. Biol. Macromol. 15:109–112.
- Baldoni R., Giardini L., 1982.
Coltivazioni erbacee
Patron Editore.
- Baumgard. L.H., 1999.
Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants.
Journal of Animal Science [0021-8812] Bauman yr:2000 vol:77 iss:E-Suppl pg:1.
- Beauchemin K. A., McAllister T. A., Dong Y., Farr B. I., Cheng K. J. 1994.
Effects of mastication on digestion of whole cereal grains by cattle.
Journal of Animal Science, Vol 72, Issue 1 236-246.
- Béguin P., and Alzari P. M., 1998.
The cellulosome of *Clostridium thermocellum*.
Biochem. Soc. Trans. 26:178–185.
- Béguin P., and Aubert J.P., 1994.
The biological degradation of cellulose.
FEMS Microbiol. Rev. 13:25–58.

- Béguin P., Millet J., and Aubert J.P., 1992.
Cellulose degradation by *Clostridium thermocellum*: from manure to molecular biology.
FEMS Microbiol. Lett. 100:523–528.
- Béguin, P., and Lemaire M., 1996.
The cellulosome: an exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose
degradation.
Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 31:201–236.
- Blouin F.A., Martin L.F., Rowland S.P. 1970.
Gel-Permeation Properties of Cellulose. Part IV: Changes in Pore Structure of Fibrous
Cotton Produced by Cross-Linking with Formaldehyde.
Textile Research Journal, Vol. 40, No. 11, 959-964.
- Burritt E. A., Bitter A. S., Street J. C., Anderson M. J. 1984.
Correlations of Phenolic Acids and Xylose Content of Cell Wall with In Vitro Dry
Matter Digestibility of Three Maturing Grasses.
Journal of Dairy Science Vol. 67 No. 6:1209-1213.
- Dale E. Barman, Mikko J., Griinari. 2003.
Nutritional Regulation Of Milk Fat Synthesis.
Annual Review of Nutrition. Vol. 23: 203-227.
- Dann H. M., Carter M. P., Cotanch K. W., Ballare C. S., Takano T. and Grant R. J.
2006.
Effect of Partial Replacement of Forage Neutral Detergent Fiber with By-Product
Neutral Detergent Fiber in Close-Up Diets on Periparturient Performance of Dairy
Cows.
J. Dairy Sci. 90:1789-1801.
- Dawn R. Dufield, George S., Wilson, Richard S., Glass , Christian S. 2004.
Selective site-specific fenton oxidation of methionine in model peptides: Evidence for a
metal-bound oxidant.
Journal of Pharmaceutical Sciences. Volume 93 Issue 5, Pages 1122 – 1130.
- Dawson R.M.C., and Kemp P., 1970.
Biohydrogenation of dietary fats in ruminants.
p. 504-518. in A.T. Phillipson (ed.) Physiology of digestion and metabolism in the
ruminant, Oriel Press, Newcastle upon Tyne, UK.
- 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.
- Doi M., Edwards S.F. 1988.
The theory of polymer dynamics.
- Edward A. Bayera, 1, Linda J. W. Shimonb, Shohamc Y., Lamedd R. 1998.
Cellulosomes-Structure and Ultrastructure. Journal of Structural Biology.
Volume 124, Issues 2-3, 15:221-234.

Fan L. T., Lee Y.H., Beardmore D.H. 1980.
Major chemical and physical features of cellulosic materials as substrates for enzymatic hydrolysis.
Chemistry and Materials Science. 01-117.

Felix C. R., Ljungdahl L. G. 1993.
The Cellulosome: The Exocellular Organelle of Clostridium.
Annual Review of Microbiology. Vol. 47: 791-819.

Fields M.W., Mallik S., and Russell J.B., 2000.
Fibrobacter succinogenes S85 ferments ball-milled cellulose as fast as cellobiose until cellulose surface area is limiting.
Applied Microbiology Biotechnology. 54:570-574.

Fisher M. M., and Triplett E. W., 1999.
Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities.
Appl. Environ. Microbiol. 63:4630–4636.

Felske A., and Osborn A. M. 2005.
DNA fingerprinting of microbial communities.
Pages 65–96 in Molecular Microbial Ecology. A. M. Osborn and C. J. Smith, ed. Taylor and Francis, New York, NY.

Formigoni A., Fustini M., Palmonari A., Brogna N., Fusaro I., 2009.
Foraggi essiccati e disidratati “disegnati” per un allevamento competitivo
Informatore Agrario, 2009.

Formigoni A., Palmonari A., Brogna N., Fustini M., Biagi G., Fusaro I., 2008.
La Qualita' Della Medica Cambia In Relazione All'intervallo Di Sfalcio
Atti XL Congr Naz , 22-24 Maggio 2008 Castel San Pietro Terme (BO) 41-45 vol 3 n 3.

Formigoni A., Palmonari A., Fusaro I., 2007.
Degradabilita' Della Fibra Sotto Esame.
Informatore Agrario 18/2007.

Formigoni A., Palmonari A., Fusaro I., 2007.
Più silomais nella razione se la fibra è ad alta degradabilità.
L'Informatore Agrario n. 18, 05/2007.

Formigoni A., Palmonari A., Fusaro I., Brogna N., Fustini M., 2007.
È essenziale nutrire il ruminante con fibra degradabile
L'Informatore Agrario n. 46 Supplemento Stalle da latte, 12/2007.

Fusaro I., Brogna N., Palmonari A., Biagi G., Sniffen C.J., Formigoni A., 2008.
Effects of genetic and water management on corn plants NDF digestibility.
Congresso ADSA ASAS, Indianapolis 2008.

Fusaro I., Palmonari A., Pezzi P., Gramenzi A., Manetta AC., Formigoni A., 2008.
Valutazione Qualitativa Degli Insilati Di Mais Proveniente Da Diverse Aree Italiane
LXII Congresso SISVET, San Benedetto del Tronto.

Fusaro I., Palmonari A., Raffrenato E., Gramenzi A., Van Amburgh M., Sniffen C.J., Formigoni A., 2007.

Evaluation Of Digestibility Of Neutral Detergent Fiber: Comparison Between Labs
LXI Congresso SISVET, Salsomaggiore Terme

Halliwell G., and Bryant M.P., 1968.

The cellulolytic activity of pure strains of bacteria from the rumen of cattle.

J. Gen. Microbiology. 32:441-448

Hartley R. D., Jones E. C. 1973.

Comparison of cell-walls of *Lolium multiflorum* with cotton cellulose in relation to their digestion with enzymes associated with cellulolysis.

Phytochemistry Volume 12, Issue 4, Pages 763-766.

Hobson P.N., Stewart C.S. 1997.

The rumen microbial ecosystem.

James B. Russell, C. Mantovani. 2002.

The Bacteriocins of Ruminant Bacteria and Their Potential as an Alternative to Antibiotics.

J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 4(4): 347–355.

Jeffrey L., Firkins. 1997.

Effects of Feeding Nonforage Fiber Sources on Site of Fiber Digestion.

Journal of Dairy Science Vol. 80 No. 7:1426-1437.

José A.M. Prates, Tarbouriech N., Charnock S.J. Carlos M.G.A. Luis M.A. Gideon J. Davies. 2001.

The Structure of the Feruloyl Esterase Module of Xylanase 10B from *Clostridium thermocellum* Provides Insights into Substrate Recognition.

Volume 9, Issue 12, 1183-1190.

Khafipour E., Krause D. O., Plaizier J. C. 2008.

A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation.

J. Dairy Sci.. 92:1060-1070.

Kim Y.H., Moon S-H. 2001.

Lactic acid recovery from fermentation broth using one-stage electro dialysis.

Journal of Chemical Technology & Biotechnology, Volume 76, Number 2, February, pp. 169-178(10).

Kim, Y. J., R. H. Liu, J. L. Rychlik, and J. B. Russell. 2002.

The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid.

J. Appl. Microbiol. 24:976-983.

- Kiyoshi T., Araib S., Ogataa K., Nagaminea T., Matsuia M., Nakamuraa M., Rustam I. Aminovc, Bennod Y. 2000.
Mechanical Properties And Water Resistance Of An Acetylated Starch–Based Plastic.
Transactions of the ASAE. Vol. 45(4): 1051–1056
- Latham M. J., Storry J. E., Scarpe M.E. 1972.
Effect of Low-Roughage Diets on the Microflora and Lipid Metabolism in the Rumen.
Appl Environ Microbiol. 24(6): 871-877.
- Leschine S. B., 1995.
Cellulose Degradation in Anaerobic Environments.
Annu Rev Microbiol. 1995;49:399-426.
- Malcolm R., Brown Jr. 2000.
Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers.
Plant Physiology and Biochemistry, Volume 38, Issues 1-2, 57-67.
- Marchessault R.H. 1957.
Experimental Evaluation of the Lateral-Order Distribution in Cellulose.
Textile Research Journal, Vol. 27, No. 1, 30-41.
- Marchessault R.H., Sundararajan P.R. 1993.
The polysaccharides.
- Marden J. P., Bayourthe C., Enjalbert F., and Moncoulon R., 2005.
A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential of dairy cattle.
J. Dairy Sci. 88:277–281.
- Mertens D. R. 1997.
Creating a System for Meeting the Fiber Requirements of Dairy Cows.
Journal of Dairy Science Vol. 80 No. 7 1463-1481.
- 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.
- Allen. M.S. 1997.
Production in the Rumen and the Requirement for Physically Effective Fiber.
Journal of Dairy Science Vol. 80 No. 7 1447-1462.
- Miriam L. Kelly, Julie R. Berry, Debra A. Dwyer, Griinari J.M., Yvan Chouinard P., Van Amburgh M.E., Barman D.E. 1998.
Dietary Fatty Acid Sources Affect Conjugated Linoleic Acid Concentrations in Milk from Lactating Dairy Cows.
The Journal of Nutrition Vol. 128 No. 5 May 1998, pp. 881-885.
- Miron J., Yosef E., Ben-Ghedalia D. 2001.
Composition and in Vitro Digestibility of Monosaccharide Constituents of Selected Byproduct Feeds.
J. Agric. Food Chem. 49 (5), 2322–2326.

- Mourino, F., R. Akkarawongsa, and P. J. Weimer. 2001.
Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganism in vitro.
J. Dairy Sci. 84:848-859.
- Palmonari A., Brogna N., Rossi G., Fusaro I., Biagi G., Formigoni A., 2008.
Plant maturity and genetic influences on in vitro NDF digestibility of alfalfa.
Congresso ADSA ASAS, Indianapolis.
- Palmonari A., Fusaro I., Brogna N., Giammarco M., Biagi G., 2007.
Comparison Between Two Different Methods To Establish The Degradability Of Ndf: Tilley And Terry And Ankom Daisy System. Lxi Congresso SISVET, Salsomaggiore Terme
- Palmonari A., Stevenson D.M., Mertens D.R., Cruywagen C.W., Weimer P.J., 2010.
pH Dynamics and Bacterial Community Composition in the Rumen of Lactating Dairy Cows
American Journal Dairy Science, January 2010.
- Palmonari A., Stevenson D.M., Mertens D.R., Cruywagen C.W., Weimer P.J., 2010.
pH Dynamics and Bacterial Community Composition in the Rumen of Lactating Dairy Cows
ADSA ASAS Meeting Proceedings, JULY 12-16 2009 Montreal CANADA
- Perry W., Clark Armentano L. E. 1993.
Effectiveness of Neutral Detergent Fiber in Whole Cottonseed and Dried Distillers Grains Compared with Alfalfa Haylage.
Journal of Dairy Science Vol. 76 No. 9:2644-2650.
- Raffrenato E., Formigoni A., Fusaro I., Brogna N., Palmonari A., Van Amburgh M.E., and Sniffen C.J., 2007.
Effects Of Irrigation System And Level Of Water On Corn Silage Hybrid Ndf Digestibility In Northern Italy
Annual Meeting. American Dairy Science Association-Canadian Society of Animal Science-American Society of Animal Science. San Antonio, Texas
- Randall S. Pegden, Marilyn A. Larson, Richard J. Grant, Morrison M. 1998.
Adherence of the Gram-Positive Bacterium *Ruminococcus albus* to Cellulose and Identification of a Novel Form of Cellulose-Binding Protein Which Belongs to the Pil Family of Proteins.
Journal of Bacteriology. Vol. 180, No. 22 0021:5921-5927.
- Robson L. M., and Chambliss G. H., 1989.
Cellulases of bacterial origin.
Enzyme Microb. Technol. 11:626-644.
- Russell J.B., and Chow J.M. 1993.
Another theory for the action of rumen buffer salts: decreased starch fermentation and propionate production.
J. Dairy Science. 76:826-830.

- Russell, J. B. 2002.
Rumen Microbiology and its Role in Ruminant Nutrition.
- Russell, J. B., Dombrowski D. B. 1980.
Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:604-610.
- Schwarz. 2001.
The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria.
Applied Microbiology and Biotechnology. Volume 56, Numbers 5-6: 634-649.
- Shi Y., Weimer P. J. 1992.
Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture.
Appl Environ Microbiol. 58(8): 2583-2591.
- Stevenson, D. M., Weimer P. J. 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 75:165-174.
- Tajima, K., Shozo A., Ogata K., Nagamine T., Matsui H., Nakamura M., Aminov R., Benno Y. 2000.
Rumen bacterial community transition during adaptation to a high-grain diet.
Anaerobe 6:273-284.
- Terry, R. A., Tilley J. M. A., Outen G. E. 1929.
Effect of pH on the cellulose digestion under vitro conditions.
J. Sci. Food Agric. 20:317-320.
- Ulyatt M.J., Whitelaw F.G., Watson F.G. 1970.
The effect of diet on glucose entry rates in sheep.
J. Agric Sci Camb.
- Van Soest, P. J.1994.
Nutritional ecology of the ruminant. Second edition
- Wallace R. J., McKain N., Shingfield K. J., Devillard E.. 2007.
Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria.
J. Lipid Res. 48:2247-2254.
- Weimer P. J. 1993.
Effect of dilution rate and pH on the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85 in cellulose-fed continuous culture.
Arch. Microbiol. 160:288-294.
- Weimer P. J. 1996.
Why don't ruminal bacteria digest faster?
J. Dairy Sci. 79:1496-1500.

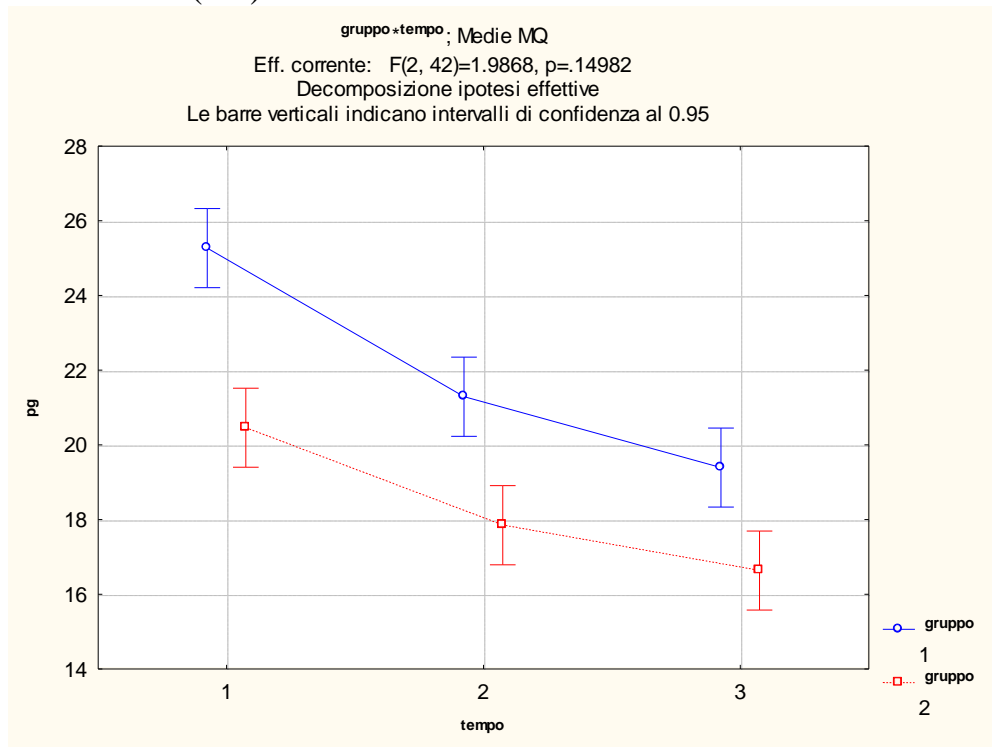
- Weimer P. J., Stevenson D. M., Mertens D. R. 2010.
Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat depressing conditions.
J. Dairy Sci. 93:265-278.
- Weimer P.J., Stevenson D.M., Mertens D.R., Thomas E.E., 2008.
Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations.
Appl. Microbiology Biotech. 80:135-145
- Welkie, D. G., Stevenson D. M., Weimer P. J. 2009.
ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle.
Anaerobe.2009.07.002.
- Wells J.E., Russell J.B., Shi Y., and Weimer P.J., 1995.
Cellodextrin utilization by the cellulolytic ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* and its potential role in the growth of nonadherent bacteria.
Applied Environ. Microbiology. 61:1757-1762.
- Wolin M.J., 1975.
Interactions between the bacterial species in the rumen.
p.134-148. in I.W. McDonald and A.C.I. Warner (ed.), Digestion and metabolism in the ruminant. Univ. New England Pub. Unit, Armidale, Australia.
- Wu Z., Lee Y.Y. 2005.
Inhibition of the enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol.
Biotechnology Letters. Volume 19, Number 10 / October, 1997. 977-979.

7. APPENDICE

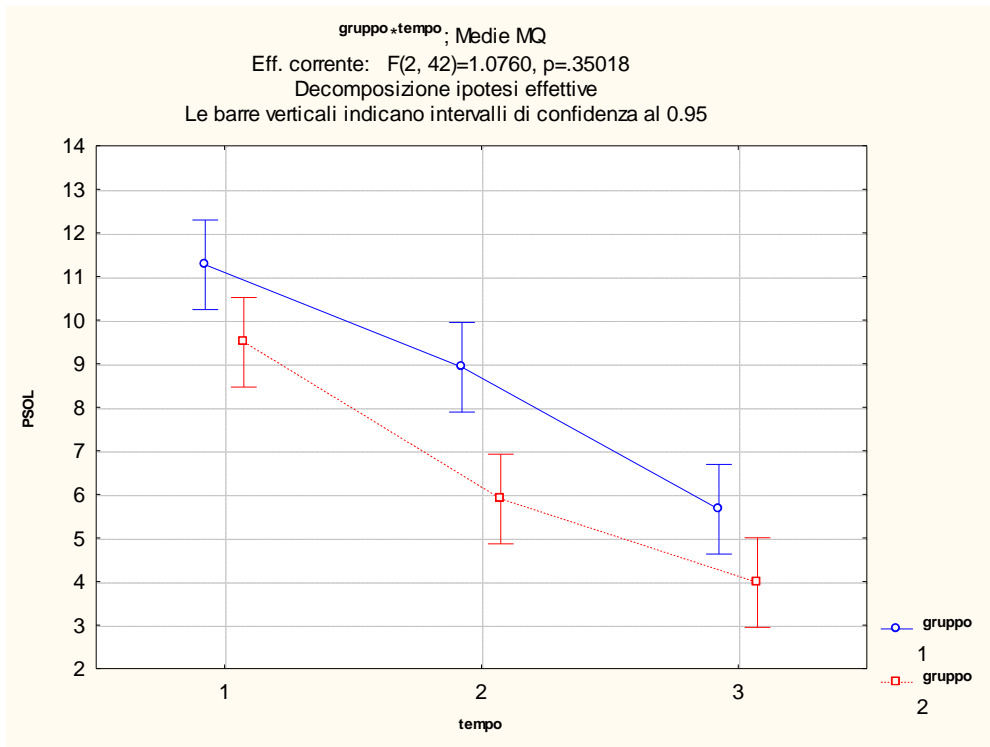
7.1 Prova medica 2008

Andamento delle quote delle diverse frazioni analizzate. Gruppo 1 = campioni a 20 giorni, Gruppo 2 = campioni a 30 giorni. Tempo 1 = giugno, Tempo 2 = Luglio, Tempo 3 = agosto. Nel grafico è riportato il valore di p che indica presenza o assenza di significatività.

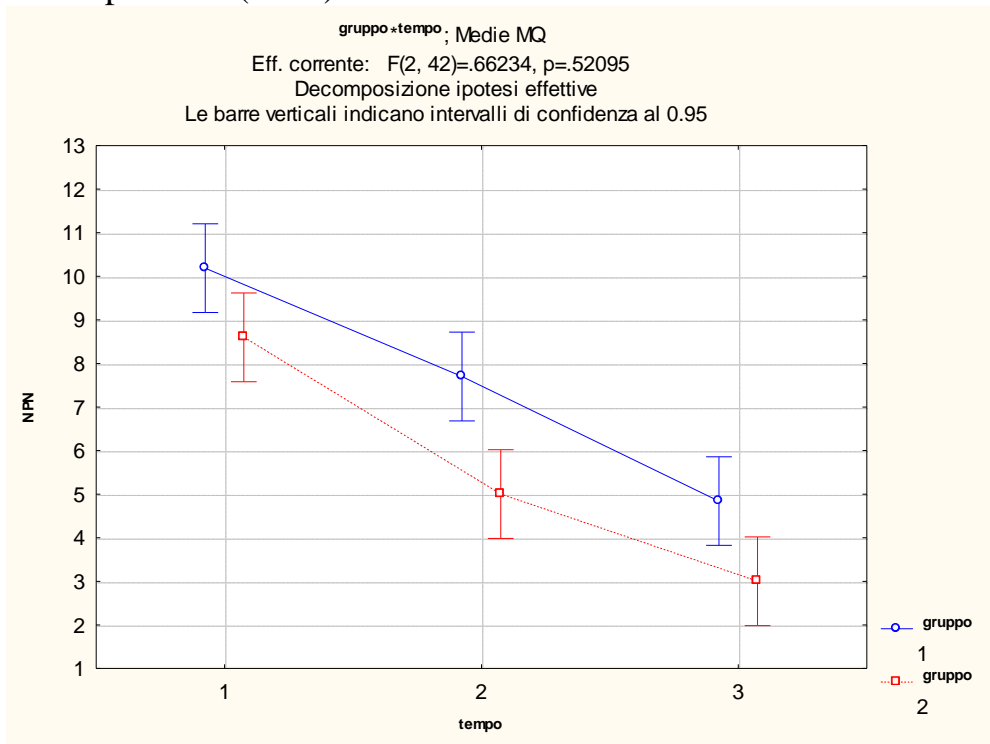
Proteina Grezza (PG)



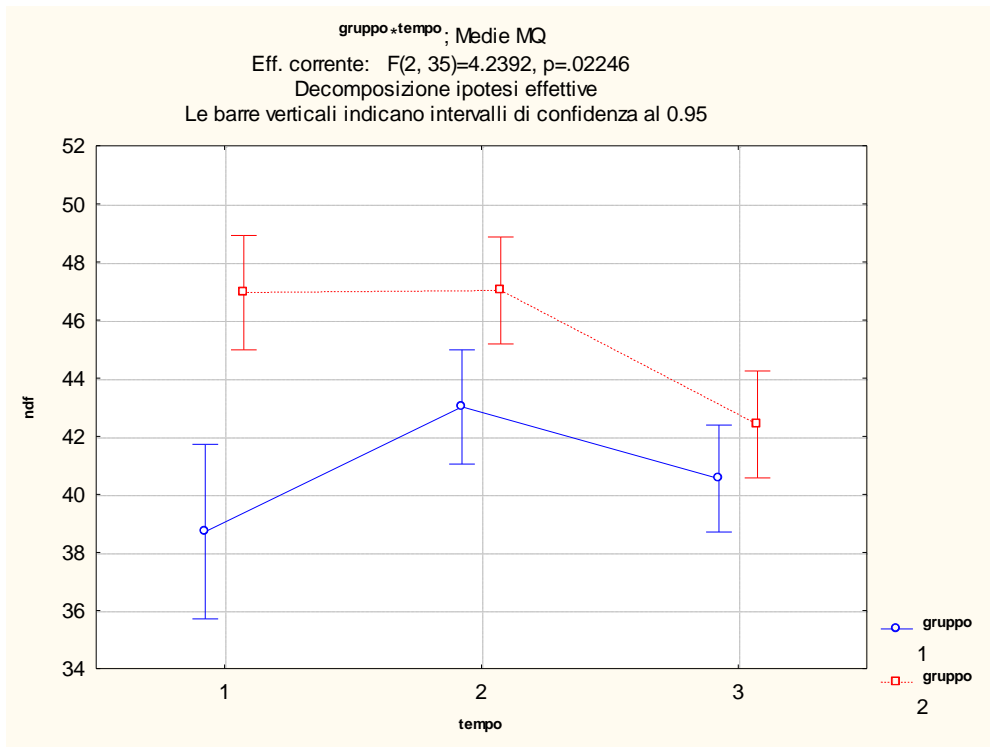
Proteina Solubile (PSOL)



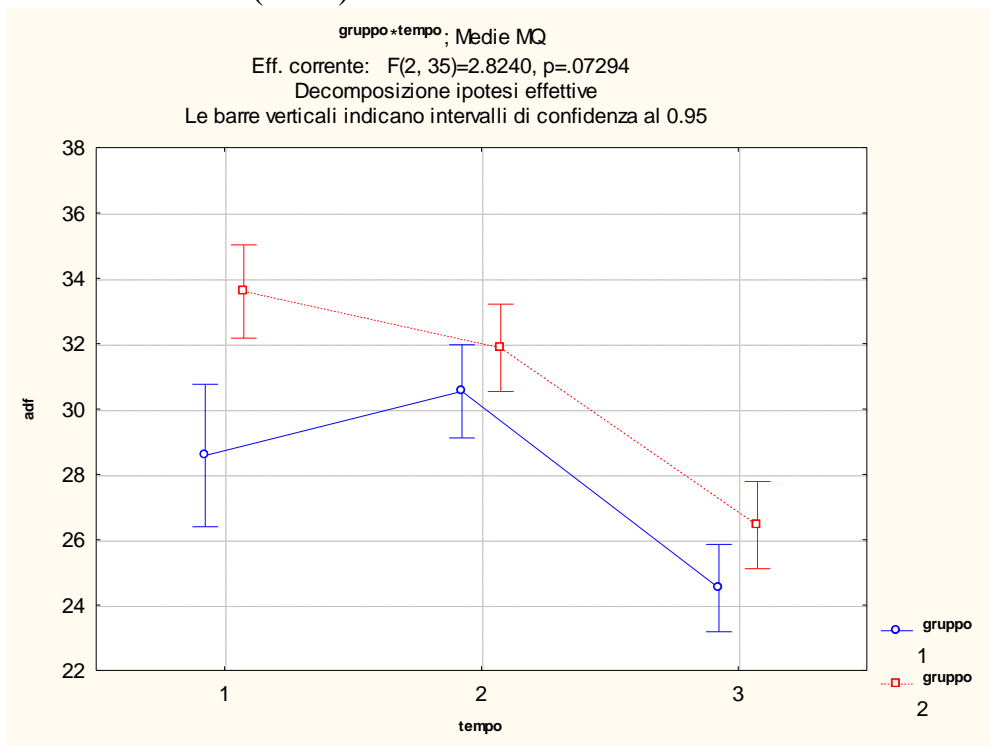
Azoto non proteico (NPN)



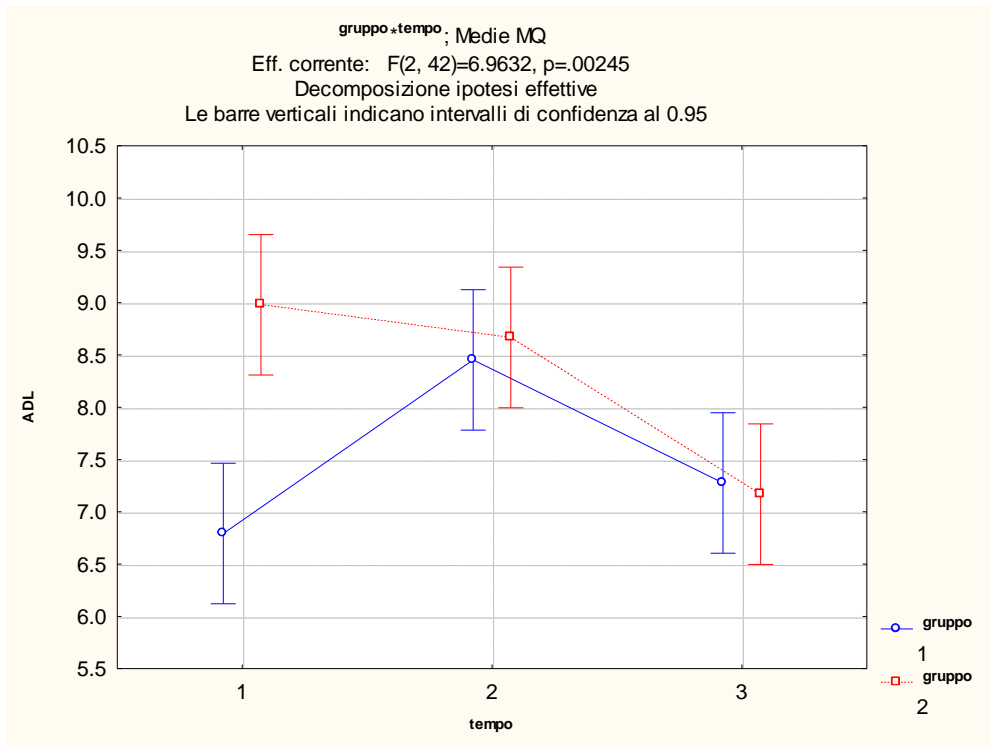
Fibra Neutro Detersa (NDF)



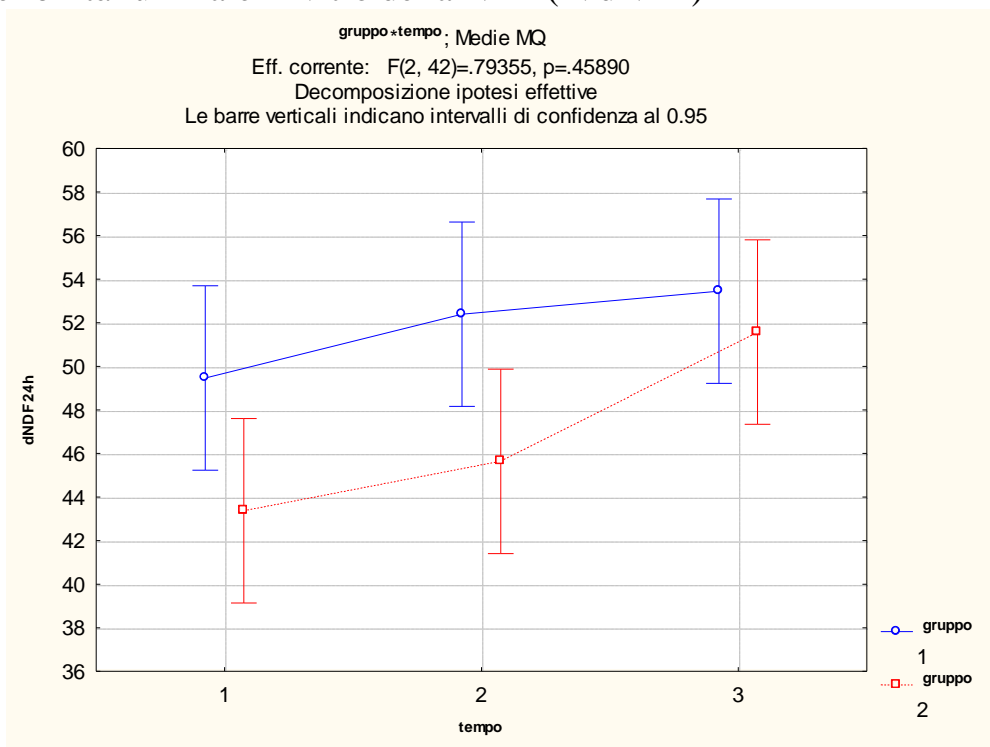
Fibra Acido Detersa (ADF)



Lignina Acido Detersa

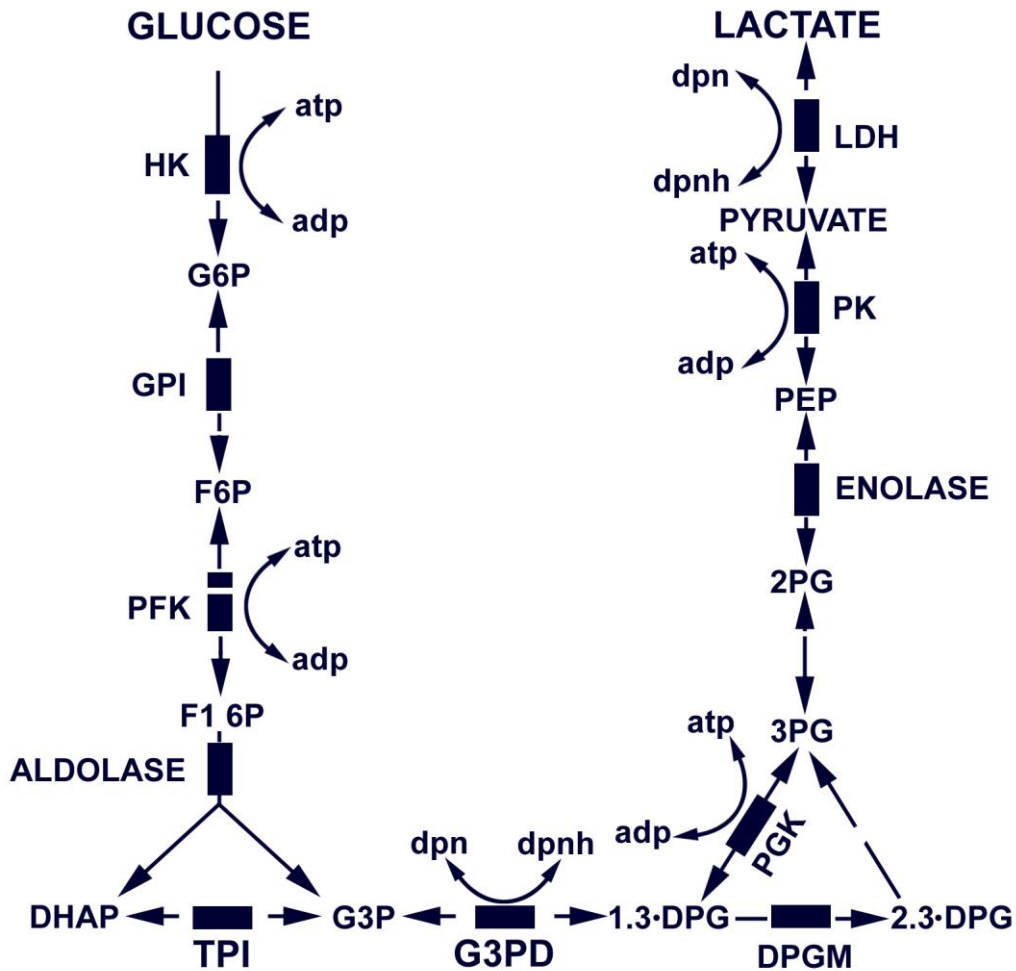


Digeribilità ruminale in vitro della NDF (IVdNDF)



7.2 METABOLISMI RUMINALI

Fermentazioni anaerobiche del glucosio secondo la via EMP



The Embden -Meyerhof of pathway. Recognized enzyme defects are indicated by solid bars. HK = hexokinase, GPI = glucose phosphate isomerase, PFK = phosphofructokinase, TPI = triose phosphate isomerase, G3PD = glucose-3-phosphate dehydrogenase, PGK = phosphoglycerate kinase, DPGM = 2,3-diphosphoglycerate mutase, PK = pyruvate kinase, and LDH = lactate dehydrogenase.



Specie batteriche con substrati preferenziali e prodotti.

Species	Products	Primary Niches
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	S, F, A	CU
<i>Ruminococcus albus</i>	A, F, E	CU
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	S, F, A	CU
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	B, F, L, A	CU, HCU, ST, PC, SU
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	S, F, A	ST
<i>Selenomonas ruminantium</i>	L, A, P, B, H ₂	SU, ST, L
<i>Prevotella sp.</i>	S, A, F, P	ST, HCU, PC, B GL, PT
<i>Succinomonas amylolytica</i>	S, A, P	ST
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	S, A, F, L	MD
<i>Streptococcus bovis</i>	L, A, F, E	ST, SU
<i>Eubacterium ruminantium</i>	A, F, B, L	MD, SU
<i>Megasphaera elsdenii</i>	P, A, B, Br	L, MD, AA
<i>Lachnospira multiparus</i>	L, A, F	PC, SU
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	A, S, P	GY, L
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	Br, A	PEP, AA
<i>Clostridium aminophilum</i>	A, B	AA, PEP
<i>Clostridium sticklandii</i>	A, Br, B, P	PEP, AA
<i>Wolinella succinogenes</i>	S	MAL, FUM
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	CH ₄	H ₂ , CO ₂ , F

A = acetato, B = butirato, P = propionato, F = formato, L = lattato, E = etanolo, Br = acidi grassi volatili a catena ramificata, CU = cellulosa, HCU = emicellulosa, ST = amido, SU = zuccheri semplici, MD = maltodestrine, AA = aminoacidi, GY = glicerolo, PT = proteine, PEP = peptidi, PC = pectine, MAL = malato, FUM = fumarato, βGL = β glucani

Attacco e digestione della cellulosa da parte di batteri ruminali
Tratte da H.J.-G. Jung et al., Neth. J. Agric. Sci. 52:11 (2004)

