

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Veterinarie

Ciclo Ventinovesimo

Settore Concorsuale di afferenza: 0741

Settore Scientifico disciplinare: AGR 18

Studio dei fattori che influenzano la digeribilità della
fibra nella bovina da latte: approcci dinamici.

Presentata da: Dr.ssa Elena Bonfante

Coordinatore Dottorato

Prof. Arcangelo Gentile

Relatore

Prof. Andrea Formigoni

Esame finale anno 2017

Indice

INTRODUZIONE	5
1. LA FIBRA: DEFINIZIONE E DETERMINAZIONE ANALITICA	5
2. DIGERIBILITÀ DELLA FIBRA	15
2.1 Digeribilità ruminale	16
2.1.1. Fermentazioni e pH ruminale.....	17
2.2. Fattori che influenzano la digeribilità della fibra	20
2.2.1. Dimensioni delle particelle di fibra	22
2.2.2 NDF indigeribile (iNDF)	24
3. MODELLI DI RAZIONAMENTO	26
3.1 Modelli statici e modelli dinamici	27
3.2. Compartimentalizzazione	30
3.3. Obiettivi della modellizzazione dei processi digestivi.....	33
3.4. I principali modelli di razionamento	34
3.4.1. I modelli statunitensi: NRC, CNCPS-CPM.....	35
3.4.2. I modelli Europei: INRA e NorFor.....	38
4. MODELLI E CALCOLO DEI TASSI DI PASSAGGIO	40
SCOPO DELLA TESI	52
PARTE SPERIMENTALE	54
1. EFFETTO DI UNA DIETA COMPLETAMENTE PELLETTATA PER MANZE IN ACCRESCIMENTO	54
PROVE PRELIMINARI	54
RICERCA.....	60
2. EFFETTO DEL CONTENUTO DI uNDF DEL FIENO DI MEDICA SUL COMPORTAMENTO ALIMENTARE, DIGERIBILITÀ DELLA FIBRA E PERFORMANCE PRODUTTIVE DI VACCHE IN LATTAGIONE	77

3. CONFRONTO FRA DIGERIBILITÀ DELLA pdNDF OSSERVATA E QUELLA	
PREVISTA.....	93
CONCLUSIONI	97
BIBLIOGRAFIA	100

INTRODUZIONE

1. LA FIBRA: DEFINIZIONE E DETERMINAZIONE ANALITICA

In nutrizione con il termine fibra si indicano quei composti di origine vegetale indigeribili dagli enzimi prodotti dai mammiferi nel tratto gastro-intestinale. I ruminanti sono gli erbivori più specializzati nell'utilizzare gli alimenti fibrosi come fonte di energia, grazie alla simbiosi con i microrganismi che popolano il rumine (Van Soest, 1994). Sono infatti tali microrganismi a produrre gli enzimi in grado di idrolizzare i legami β 1-4 che legano i polisaccaridi che costituiscono la parete delle cellule vegetali (cellulosa ed emicellulosa). I prodotti della fermentazione di tali composti vengono assorbiti dalla parete ruminale e fungono da principale fonte di energia per l'animale.

L'analisi della fibra è uno dei principali temi di studio nell'ambito della nutrizione dei ruminanti, in quanto le diete destinate a tali specie sono spesso ricche di foraggi e la frazione fibrosa della razione influenza ampiamente l'ingestione di sostanza secca e le performance produttive degli animali (Jung, 1997).

La fibra corrisponde alla parete della cellula vegetale. La cellula vegetale è caratterizzata da una parete primaria più esterna e una secondaria più interna (Figura 1). Durante l'accrescimento la parete cellulare è quasi esclusivamente costituita dalla componente primaria che permette l'allungamento della cellula in quanto non presenta legami crociati. Quando l'accrescimento termina e inizia il processo di maturazione, comincia la formazione della parete secondaria e la graduale lignificazione (Jung, 1997).

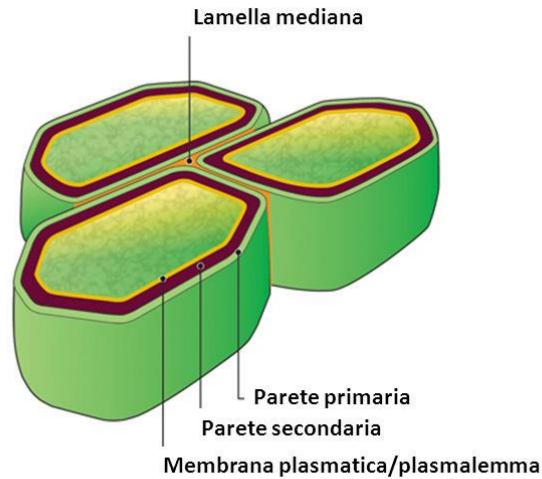


Figura 1. Struttura della parete della cellula vegetale.

La cellulosa è il polisaccaride principale che compone la parete secondaria. La cellulosa è un polimero del glucosio sotto forma di catene lineari; 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 2).

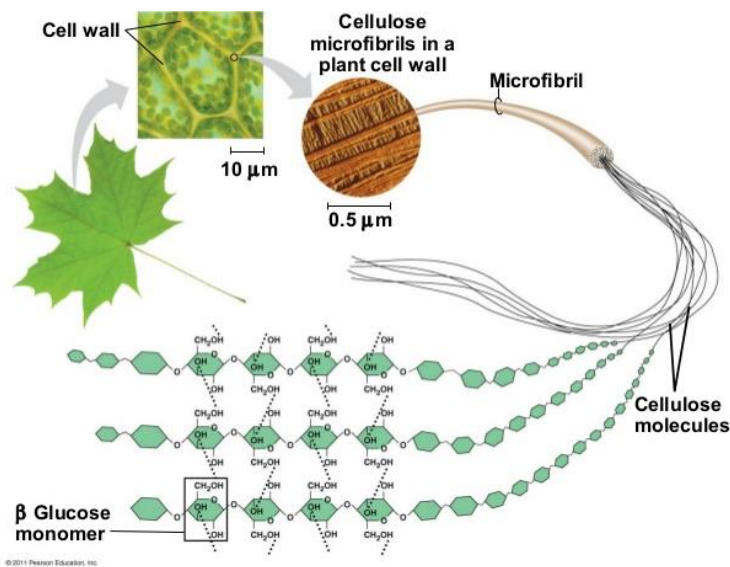


Figura 2. Composizione e organizzazione delle fibrille di cellulosa nella parete cellulare.

La parete cellulare è composta inoltre da altri due composti emicellulosa e pectine. L'emicellulosa è un polisaccaride ramificato caratterizzato dalla presenza di zuccheri neutri in grado di formare legami idrogeno con le fibrille di cellulosa. È questa interazione la forza che maggiormente che guida la formazione della parete cellulare. L'emicellulosa crea legami crociati con le fibrille di cellulosa impedendone l'aggregazione; questo da un lato può indebolire le resistenze meccaniche della parete cellulare ma dall'altro permette la sua continua espansione (Somerville et al., 2004). Le pectine sono invece contraddistinte per la presenza di acido uronico come componente maggioritario, sono anch'esse un polisaccaride; la loro funzione è associata al mantenimento della porosità della parete cellulare e all'adesione con le cellule adiacenti (Somerville et al., 2004).

La naturale evoluzione della cellula vegetale prevede la deposizione, nella sua parete, di lignina, un polimero organico ramificato costituito per la maggior parte da composti fenolici. Il processo, così detto di lignificazione, comincia a partire dalla parete primaria e gradualmente va ad interessare anche la parete secondaria (Terashima et al., 1993). La formazione e deposizione della lignina è sempre secondaria alla sintesi e deposizione degli altri polisaccaridi; ne consegue che i composti polisaccaridici non lignificati sono quelli sintetizzati più di recente (Figura 3; Jung e Allen, 1995; Jung, 1997). La lignina ha un ruolo di sostegno strutturale e definitivo (irreversibile); i batteri ruminanti, infatti, non sono in grado produrre enzimi capaci di rompere l'anello fenolico che contraddistingue i suoi precursori. Per questo motivo la lignina è definita come il più importante fattore limitante la digeribilità della parete cellulare (Van Soest, 1994). Alcuni funghi sono in grado di degradare la lignina grazie alla loro capacità di produrre perossidasi; tuttavia tali enzimi riescono a svolgere la loro azione in presenza di ossigeno, condizione incompatibile con l'ambiente ruminale (Lee et al., 1997).

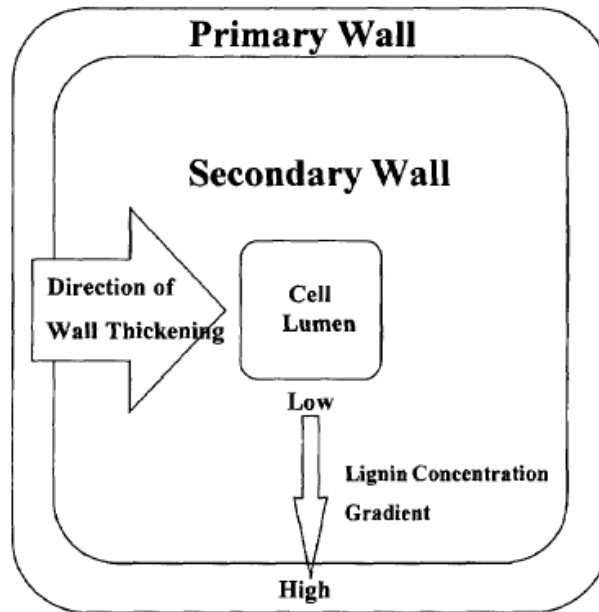


Figura 3. Rappresentazione schematica dello sviluppo della parete cellulare (dall'esterno verso l'interno) e della concentrazione della lignina (maggiore all'esterno; Jung e Allen, 1995).

La scienza della nutrizione animale è impegnata nel capire il ruolo della lignina e la sua interazione con gli altri composti della parete cellulare per i quali viene limitata la fermentazione da parte dei batteri e di conseguenza la produzione di nutrienti per l'animale.

Il processo di lignificazione si differenzia anche in base al tipo di pianta, in particolare all'organizzazione dei carboidrati che compongono la sua parete cellulare, alle condizioni climatiche in cui la pianta si trova a crescere (temperatura, presenza d'acqua; Donaldson, 2001). Non tutte le porzioni della pianta lignificano allo stesso modo. Le foglie, per esempio, contengono una quantità di lignina inferiore rispetto al fusto. Ulteriori differenze esistono anche tra leguminose e graminacee: la porzione fogliare delle leguminose contiene molta meno lignina rispetto alle foglie delle graminacee e la concentrazione di parete cellulare rimane sempre a livelli bassi indipendente dallo stadio di maturazione (Wilman e Altimimi, 1984). Al contrario la restante parte della

pianta delle leguminose presenta una concentrazione maggiore di lignina rispetto alle graminacee (Somerville et al., 2004).

Considerata la varietà di composti di cui è costituita la parete cellulare e come l'interazione tra di essi possa influenzarne la digeribilità, l'identificazione delle frazioni fibrose di un alimento diventa fondamentale per capire l'apporto nutrizionale che è in grado di fornire all'animale.

L'analisi delle frazioni fibrose ha permesso, negli anni, di distinguere sempre meglio le diverse componenti che costituiscono la parete cellulare fino ad arrivare a classificare le diverse frazioni fibrose in base al loro grado di digeribilità ruminale.

La determinazione della concentrazione della fibra in un alimento è l'obiettivo principale di tutte le analisi sulla fibra.

Il metodo più datato (attualmente ancora in uso) è quello di Weende nel quale la concentrazione della fibra è misurata come fibra grezza (crude fiber, CF). Tale metodo prevede di far bollire il campione in soluzione neutra e successivamente in soluzione acida. Il campione residuo è composto principalmente da cellulosa, qualche altro polisaccaride e lignina (Jung, 1997). Questo metodo sottostima largamente la reale concentrazione di parete cellulare del campione e il risultato dell'analisi si riferisce solo ad una parte dei polisaccaridi che la compongono, e alla lignina (Van Soest, 1994).

Nell'ambito della nutrizione dei ruminanti la determinazione delle fibra come "fibra neutro detersa" (NDF) di Van Soest, (1963) ha sostituito ampiamente il metodo di Weende. Anche questo metodo prevede un'estrazione in solvente neutro e sodio solfito, ed il residuo è considerato essere rappresentativo della parete cellulare. Lo stesso Van Soest (1994) riconosce come la determinazione dell'NDF sottostimi la concentrazione di fibra in quanto tutte le pectine (o quasi) vengono solubilizzate durante la procedura. Se si considerano, però le interazioni che possono persistere con le proteine e l'amido il

rischio è di una sovrastima del valore di NDF. Con gli anni sono state apportate delle modifiche alla metodica volte a ottenere una stima sempre più accurata del valore di NDF. Sono stati quindi aggiunti sodio solfito per distruggere i legami tra cellulosa e proteine (Van Soest e Wine, 1967) e l'enzima alfa-amilasi (stabile alle alte temperature) per alimenti ricchi di amido (aNDF; Mertens, 2002). Un'altra modifica fondamentale che è stata introdotta è la correzione per il contenuto di ceneri del campione (Mertens, 2002). Le ceneri contenute nei campioni di alimento non sono solubili in detergente neutro, quindi rimangono dopo la procedura e vengono calcolate come NDF. La correzione per le ceneri può dare dei risultati che differiscono considerevolmente rispetto alla semplice aNDF (Crocker et al., 1998); in campioni di foraggi puliti, per esempio, le ceneri contenute nel residuo aNDF è compreso tra 0.5 e 1.5 punti % sulla sostanza secca. Alimenti particolarmente contaminati possono far registrare una differenza che varia da 2 a 12 % (Mertens, 2015). La determinazione dell'NDF con la correzione per le ceneri porta alla definizione di un nuovo acronimo per indicare la fibra: aNDFom; questa sigla indica la NDF (fibra neutro detersa) ottenuta con l'uso di amilasi (a) e corretta per il contenuto di sostanza organica (om: organic matter).

La valutazione dell'NDF viene fatta in associazione alla fibra acido detersa (ADF), un residuo con basso contenuto di azoto che comprende lignina e cellulosa che può essere ottenuto estraendo il tessuto vegetale con soluzioni di acidi forti di detergenti quaternari. 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 indigeribile all'interno del rumine e dell'intestino, e che ostacola la 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.

Avendo questi dati a disposizione è poi semplice quantificare i diversi polisaccaridi che costituiscono la parete cellulare:

- le pectine e il contenuto delle cellule vegetali. Questi composti sono solubilizzati durante l'estrazione in detergente neutro (NDS); per questo vengono calcolati per differenza:

$$\text{NSC (\% della SS)} = 100 \% \text{ di SS} - (\text{NDF (\% della SS)});$$

- l'emicellulosa corrisponde alla differenza tra NDF e ADF;
- la cellulosa è calcolata come differenza tra ADF e ADL;
- La lignina corrisponde alla frazione ADL.

Il metodo Van Soest per la determinazione dell'NDF (Van Soest e Wine, 1967) è decisamente l'analisi più importante per la valutazione degli alimenti e per la nutrizione dei ruminanti (Mertens, 1993).

L'evoluzione successiva nello studio della valutazione della fibra è stata raggiunta con le valutazioni di Waldo, (1970) che suggerì come la cellulosa potesse essere distinta in una frazione digeribile e una indigeribile. Il concetto che la fibra contenesse una porzione completamente indigeribile è stato determinante per comprendere le dinamiche digestive; e fu lo stesso Waldo et al., (1972) a descrivere con formule matematiche (di primo-ordine) la digeribilità della fibra. In particolare si può distinguere:

- una frazione solubile, che è rapidamente e quasi completamente disponibile alla digestione batterica (pectine, fruttani, galattani, mannani e glucani);
- una frazione insolubile (NDF) che a sua volta comprende una porzione potenzialmente degradabile dai batteri cellulolitici e una quota completamente indegradabile (Huhtanen et al., 2006).

Come descritto in precedenza, la lignina è la frazione fibrosa che non è in grado di essere digerita dalla popolazione batterica che popola il rumine. A causa dei forti e permanenti legami che crea con gli altri polisaccaridi che compongono la parete cellulare, anche parte dell'NDF risulta indegradabile (iNDF).

La determinazione della frazione di fibra indigeribile è diventato un parametro determinante nella valutazione della qualità di un foraggio e le metodiche analitiche si sono evolute negli anni per raggiungere una stima che fosse più vicina al reale. Nonostante la sua importanza sia riconosciuta da tempo trova ad oggi ancora scarsa applicazione nelle nostre realtà produttive, sia per quanto riguarda la sua determinazione in laboratorio sia per l'utilizzo del dato nelle pratiche di razionamento.

Sono state sviluppate numerose equazioni per stimare la quota di NDF indigeribile degli alimenti, dato che risulta di particolare importanza quando si vuole stimare la quota di energia apportata dall'alimento nei modelli di razionamento. Quella maggiormente usata è stata l'equazione che prevede di moltiplicare il contenuto di lignina (ADL) per un fattore fisso di 2.4:

$$(1) \quad U = 2.4 \times (\text{Lig}/\text{NDF})$$

Questa formula è chiamata anche equazione *Chandler* (Chandler et al., 1980) ed è stata quella maggiormente usata per stimare la quota di fibra indigeribile nei modelli di razionamento dinamico CNCPS (Sniffen et al., 1992) e NRC (1996).

Studi più recenti (Raffrenato e Van Amburgh, 2011; Palmonari et al., 2016) hanno evidenziato l'imprecisione di tali stime e la necessità di condurre analisi dirette con metodiche in vitro o con sistemi rapidi NIRs.

Va detto che la determinazione della NDF indigeribile reale richiederebbe un tempo infinito, quindi, in realtà con le fermentazioni dei campioni in rumine o nei sistemi in vitro, la reale quota indigeribile non viene mai raggiunta. Perciò sono stati conati due diversi termini: “NDF indigeribile” (indigestible NDF, iNDF) per definire la reale quota di fibra indigeribile che si otterrebbe con un tempo di fermentazione esteso all’infinito (Mertens, 1993; Huhtanen et al., 2006); e “NDF indigerita” (undigested NDF, uNDF) che rappresenta la quota di NDF indigerita misurata in laboratorio (con tecniche in vitro o in situ) dopo un definito periodo di fermentazione (Cotanch et al., 2014).

Il tempo con il quale si raggiunge tale risultato è stato testato in numerosi studi e utilizzando diverse tecniche; l’obiettivo è quello di raggiungere un punto in cui il peso residuo non cambia significativamente aumentando le ore di fermentazione.

Inizialmente l’uNDF era misurata dopo 96 ore di fermentazione, tempo che si è poi esteso a 120 ore negli studi di Savian et al., (2007). Il modello raccomandato da Cornell e ad oggi il più utilizzato, prevede una fermentazione in vitro di 240 ore (10 giorni) utilizzando la metodica Tilley-Terry con le successive modifiche apportate da Raffrenato e Van Amburgh, (2010). Di per se la lunghezza della fermentazione non è fondamentale, ma dipende dalla tecnica di fermentazione. Per esempio, la tecnica di fermentazione *in situ* pubblicata da Huhtanen et al., (2007) prevede 288 ore per raggiungere un grado di fermentazione simile e così stimare la iNDF.

La determinazione della uNDF dovrebbe essere inclusa come analisi di routine nella valutazione della qualità dei foraggi. Infatti essa rappresenta una porzione di alimento uniforme e con una digeribilità nota (pari a zero); al contrario l’NDF non è altrettanto uniforme, infatti contiene pool multipli il cui grado di digeribilità dipende dal livello di lignificazione (Van Soest, 1994).

La determinazione dell’uNDF è importante per diversi motivi:

- permette di calcolare l'NDF potenzialmente degradabile ($pdNDF = NDF - uNDF$);
- la sua determinazione in tempi di fermentazione più brevi può essere usata per stimare la quota di NDF rapidamente e lentamente digerita e i rispettivi tassi di digestione (Raffrenato e Van Amburgh, 2010);
- la determinazione dei pool e dei tassi di degradazione a partire dal valore di uNDF può aiutare a spiegare il comportamento alimentare dell'animale e dell'alimento all'interno del rumine soprattutto quando la composizione chimica (NDF, ADF e ADL) è simile;
- la stima del pool lento dell'NDF, il suo tasso di degradazione e l'uNDF influenzano l'ingestione di sostanza secca e il passaggio dell'alimento fuori dal rumine;
- l'uNDF gioca un ruolo fondamentale nel mantenere un'adeguata quantità di alimento nel rumine;
- l'uNDF è indicativo della qualità degli alimenti, vista la sua stretta correlazione con la digeribilità della sostanza organica (Nousiainen et al., 2003).

Le metodiche analitiche per la valutazione delle frazioni fibrose e le tecniche di fermentazione in vitro e in vivo sono state sviluppate negli anni per comprendere sempre meglio il comportamento degli alimenti all'interno del rumine, il loro grado di degradazione e la loro capacità di lasciare il rumine in tempi più o meno brevi. La digeribilità della fibra, infatti, diventa un fattore critico quando si vuole valutare la qualità di un foraggio o di un sottoprodotto fibroso.

2. DIGERIBILITÀ DELLA FIBRA

La digeribilità è un fattore che ha un effetto determinante sulla qualità degli alimenti e sulla capacità della dieta di influenzare le performance produttive. In particolare, la digeribilità reale varia considerevolmente tra i diversi alimenti se confrontata con gli altri nutrienti come proteine, grasso e zuccheri. La digeribilità apparente della maggioranza dei nutrienti è rappresentata dalla scomparsa netta dei nutrienti al passaggio attraverso il tratto gastro-intestinale. Si parla di digeribilità apparente e non reale, in quanto ci possono essere delle perdite di nutrienti di derivazione endogena (residui di batteri, cellule di sfaldamento della parete intestinale o secrezioni intestinali) che si ritrovano nelle feci (Mertens, 2015).

La fibra ha caratteristiche uniche tra i diversi nutrienti perché non presenta residui di derivazione endogena (né l'animale né i microrganismi la sintetizzano). Perciò, per la fibra, i concetti di digeribilità apparente e reale coincidono.

Gli alimenti fibrosi rappresentano una porzione considerevole nella razione dei ruminanti; quindi le loro capacità produttive sono condizionate dalla capacità di ingerire e digerire la porzione fibrosa della dieta. La digeribilità dell'NDF influenza le performance degli animali indipendentemente dal contenuto di NDF nella dieta. Ricerche condotte utilizzando foraggi a diversa digeribilità ma simile concentrazione di NDF hanno riportato un aumento significativo di ingestione e produzione di latte (Grant et al., 1995; Dado e Allen, 1996; Oba e Allen, 2000).

Considerando che i mammiferi non hanno la capacità di sintetizzare enzimi in grado di degradare la fibra, ne consegue che i limiti alla digestione della fibra da parte dei microrganismi ruminali sono i fattori limitanti la produttività dei ruminanti (Allen e Mertens, 1988).

La digeribilità della fibra è un evento dinamico che avviene all'interno di un ecosistema complesso (il rumine) e che è influenzato da molteplici fattori legati alla dieta, ai microrganismi ruminanti e all'animale.

2.1 Digeribilità ruminale

Come già anticipato, la digestione della fibra (cellulosa ed emicellulosa) avviene principalmente all'interno del rumine grazie alla presenza di microrganismi specifici. I microrganismi che popolano il rumine sono rappresentati da batteri, protozoi e funghi. I batteri sono i più numerosi (10^{10} - 10^{12} cellule/grammo di contenuto ruminale) e possono essere categorizzati secondo diversi criteri (forma, dimensioni, struttura), il più importante dei quali è legato al principale substrato che sono in grado di fermentare (cellulose, emicellulosa, amido, zuccheri, intermedi degli acidi grassi, proteine, lipidi).

Perché inizi il processo digestivo, è necessario che i batteri aderiscano alla particella di fibra. Ciò avviene grazie alla presenza di strutture presenti sulla parete batterica (glicocalice) che interagiscono con la parete vegetale. Successivamente i batteri cominciano a sintetizzare e secernere enzimi che hanno la capacità di scindere (mediante reazioni di idrolisi) i complessi polimeri che compongono la parete vegetale in metaboliti semplici; questi saranno in parte utilizzati dagli stessi microrganismi come fonte di nutrimento e in parte assorbiti dalla parete ruminale e utilizzati dall'animale per le proprie esigenze produttive (Koike et al., 2009).

A differenza degli alimenti non fibrosi e della porzione solubile della fibra, la degradazione della parete vegetale (cellulosa ed emicellulosa) è di minore entità e avviene molto lentamente, e per questo motivo è stato ipotizzato che potesse essere refrattaria all'idrolisi (Chen et al., 1988; Chesson e Forsberg, 1997). Studi più recenti

hanno evidenziato come il fattore maggiormente limitante sia la superficie disponibile all'attacco ruminale e le caratteristiche dell'alimento stesso, che possono porre dei vincoli all'attacco dei microrganismi ai tessuti vegetali e quindi influenzare negativamente sia il tasso che l'entità della digestione dell'alimento (McAllister et al., 1994). Lo sviluppo di nuove tecniche di trasformazione degli alimenti (chimiche e fisiche), e la scelta della varietà di foraggi più appropriata possono contribuire a migliorare l'azione dei microrganismi ruminanti e di conseguenza la produttività dei ruminanti.

2.1.1. Fermentazioni e pH ruminale

I prodotti delle fermentazioni ruminanti sono rappresentati dalla massa microbica e dagli acidi grassi volatili (AGV): acido propionico, acido acetico, acido butirrico, principalmente. I diversi acidi grassi sono il risultato della fermentazione della sostanza organica. Gli AGV prodotti vengono assorbiti dalla parete ruminale in maniera molto efficiente grazie alla presenza delle papille ruminanti che estendono enormemente la superficie disponibile per l'assorbimento. Un adeguato equilibrio tra la sintesi di AGV, il loro assorbimento e l'effetto tampone della saliva permette di mantenere un ambiente stabile all'interno del rumine.

Gli acidi grassi volatili per essere assorbiti devono precedentemente essere protonati, in modo da non trovarsi con alcun gruppo carbossilico libero (Figura 4).

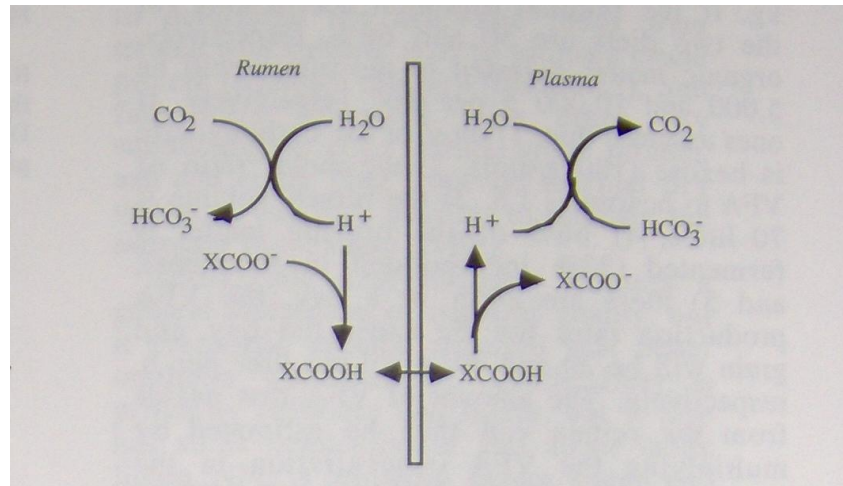


Figura 4. Sistema di assorbimento degli acidi grassi volatili attraverso l'epitelio ruminale.

Questo è facilitato dalla capacità dei bicarbonati presenti nella saliva, di donare protoni. Tale processo è limitato nelle diete povere di fibra. Si assiste, infatti, a scarsa salivazione e bassa diluizione del liquor ruminale, fino ad arrivare a un ingente accumulo di acidi, con conseguente calo del pH. Se l'animale non è stato adattato a un cambio di dieta simile, cioè se il rapporto tra foraggi e concentrati cambia troppo rapidamente, si può giungere a gravi disfunzioni ruminali. I concentrati sono 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 al pH acido rispetto ad altri batteri, e di conseguenza la loro attività continua con ulteriore accumulo di lattato che abbassa sempre di più il pH del rumine.

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 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 cellulolitici 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; Shi e Weimer, 1992). Alcuni enzimi extracellulari continuano comunque ad attaccare la cellulosa, ma l'idrolisi avviene molto lentamente (Weimer, 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 massima entità 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 (Mourino 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. Tuttavia, valori di pH attorno a 6.2 e 5.7 favoriscono l'attività di molti enzimi, e alcuni studi hanno dimostrato come si riducano le quantità di metano e ammoniaca prodotti nel rumine (Allen et al., 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.

2.2. Fattori che influenzano la digeribilità della fibra

Nonostante l'attuale tendenza a ridurre il rapporto foraggi:concentrati per incrementare la produttività delle bovine, la fibra rappresenta ancora un alimento fondamentale, dal quale non si può prescindere. Tuttavia gli alimenti fibrosi presentano dei limiti, come il maggior effetto ingombro, un maggior tempo di ritenzione nel rumine e la presenza di

una frazione indigeribile al suo interno che influenza l'entità e la velocità con cui la fibra viene digerita. Tutto questo va ad influenzare l'ingestione di sostanza secca, che rappresenta il principale fattore in grado di guidare la risposta produttiva degli animali. Si tratta quindi di individuare le strategie più efficaci per ottimizzare la digeribilità della porzione di fibra potenzialmente degradabile. È noto, infatti, come una maggiore digeribilità abbia un effetto positivo sull'ingestione di alimento e quindi sulla produttività (Oba e Allen, 1999).

La fermentazione della fibra potenzialmente digeribile è il risultato della competizione di due forze in gioco: il tasso di digeribilità e il tasso di passaggio fuori dal rumine come suggerito da Waldo et al., (1972). Il passaggio delle particelle di alimento al di fuori del reticolo-rumine è condizionato dalle sue dimensioni e dalla densità, ed aumenta al diminuire delle dimensioni e all'aumentare della densità delle particelle.

Le fermentazioni della fibra da parte dei batteri iniziano a partire dal lume interno (meno lignificato) della particella vegetale e proseguono in direzione centrifuga. Durante i processi fermentativi i batteri producono CO₂ che si insinua tra i tessuti vegetali conferendo galleggiabilità alla particella di fibra che rimane sospesa all'interno del rumine e continua ad essere digerita dai batteri (Allen, 1996). Gradualmente la porzione di fibra potenzialmente degradabile si riduce, i processi fermentativi diminuiscono e la particella di fibra finisce per essere composta principalmente da frazione indigeribile. La perdita di galleggiabilità e l'aumentata densità porta la particella verso il fondo dove è facilitato il passaggio al di fuori del rumine (Jung e Allen, 1995; Allen, 1996).

La digeribilità della fibra non è influenzata dalla quantità di NDF contenuta nell'alimento ma dalla frazione indigeribile e dalla velocità con cui la frazione potenzialmente digeribile viene degradata. Diminuire l'ingestione di fibra indigeribile

permette di aumentare la digeribilità dell'alimento e ridurre l'effetto ingombro nel rumine. L'effetto riempimento potrebbe essere ulteriormente diminuito aumentando il passaggio fuori dal rumine. Quest'ultimo è particolarmente influenzato dalle caratteristiche dell'alimento come la fragilità delle particelle, il tasso di digeribilità, dimensioni e peso specifico. È doveroso ricordare che, nel tentativo di accelerare il passaggio delle particelle al di fuori del rumine, allo scopo di diminuire l'effetto ingombro, ci può essere la perdita di fibra potenzialmente digeribile (Jung e Allen, 1995).

2.2.1. Dimensioni delle particelle di fibra

I ruminanti in natura, essendo un animale preda, al momento del pasto ingerisce quanto più alimento possibile, senza dedicare molto tempo alla masticazione. Una volta immagazzinato alimento a sufficienza e trovato un luogo tranquillo, lontano da predatori o altre fonti di stress, inizia la fase di ruminazione, caratteristica distintiva di queste specie. Anche in condizioni di allevamento intensivo, dove gli stress legati alla sopravvivenza vengono meno, i ruminanti hanno mantenuto lo stesso comportamento alimentare. Lo scopo della ruminazione è quello di rimandare l'alimento in bocca per essere ulteriormente masticato; quest'azione meccanica riduce le particelle di alimento, che una volta ritornate nel rumine risulteranno maggiormente esposte all'azione fermentativa dei batteri. La riduzione della dimensione delle particelle di fibra accelera, quindi, i processi fermentativi e ne facilita il passaggio fuori dal rumine, riduce l'effetto ingombro, e crea spazio per l'ingestione di nuovo alimento.

Un'altra funzione della ruminazione è quella di stimolare la produzione di saliva che imbibisce il bolo di alimento, facilitandone il passaggio lungo l'esofago; inoltre, una volta nel rumine funge da tampone naturale, facilita l'adesione dei batteri alle particelle

alimentari e aiuta a contrastare l'eccessivo abbassamento del pH dovuto alla produzione di acidi grassi volatili (AGV) in seguito alle fermentazioni ruminali.

La riduzione delle grandi particelle in porzioni più piccole è un requisito fondamentale per la fuoriuscita dal rumine; ed è stato identificato un limite (1.18-mm) sopra il quale esse vengono trattenute (Poppi et al., 1985).

Esiste una stretta relazione tra dimensione della fibra e digeribilità: la riduzione delle dimensioni delle particelle facilita la fermentazione; d'altra parte, la fermentazione ha un effetto, seppur limitato, sulla riduzione delle particelle (Murphy e Nicoletti, 1984; Wilson e Kennedy, 1996), ma soprattutto influenza il tasso di riduzione durante la masticazione in quanto rende il tessuto vegetale più fragile (Chai et al., 1984).

La tecnica di ridurre le dimensioni delle particelle di alimento è in uso da molto tempo come strategia efficace per promuovere l'ingestione di sostanza secca. Questo determina una riduzione del tempo che l'animale deve investire per la masticazione; inoltre l'alimento che raggiunge il rumine presenta una superficie più ampia per l'adesione dei batteri e accelera i processi fermentativi (Cherney et al., 1988). Tuttavia, particelle di piccole dimensioni hanno una minor capacità di trattenere i gas di fermentazione ed è più probabile che raggiungano il fondo del rumine e fuoriescano dall'orificio reticolo-omasale non completamente digerite (Allen, 1996).

La rottura della fibra è influenzata dalle caratteristiche anatomiche della pianta. Tessuti lignificati con un rapporto lignina:cellulosa basso, tipicamente graminacee, tendono a piegarsi piuttosto che a rompersi; mentre tessuti con un alto rapporto lignina:cellulosa hanno una maggior tendenza a rompersi. Di conseguenza le graminacee, meno lignificate tendono a rompersi in lunghi e sottili filamenti, mentre le più lignificate leguminose in frammenti più corti e larghi (Van Soest, 1994).

La dimensione della fibra ha una correlazione diretta con la ruminazione. Molti studi hanno dimostrato come una riduzione delle dimensioni della fibra porti ad una riduzione del tempo di ruminazione giornaliero (Teimouri Yansari et al., 2004; Yang e Beauchemin, 2006). Il tempo di ruminazione può incidere, a sua volta, sulla produzione di saliva e modificare la capacità tampone all'interno del rumine, soprattutto in razioni a basso contenuto di NDF. Diete con un ridotto contenuto di fibra grossolana, possono ridurre l'attività masticatoria, la produzione di saliva e l'effetto tampone nel rumine, portando ad una depressione del pH ruminale simile a ciò che avviene con una dieta sbilanciata a favore dei concentrati (Beauchemin et al., 2003).

La riduzione della lunghezza della fibra è sicuramente una strategia valida per aumentare l'ingestione e migliorare le performance dell'animale.

La scelta sulle dimensioni da adottare va fatta in relazione alla qualità dell'alimento, ricordando sempre di garantire un'adeguata ruminazione, segno di sanità dell'ambiente ruminale e benessere dell'animale.

2.2.2 NDF indigeribile (iNDF)

L'NDF indigeribile (iNDF) contenuta nella dieta sta suscitando sempre maggiore interesse come elemento da usare per misurare l'effetto ingombro della razione, fattore in grado di limitare l'ingestione di alimento. L'iNDF rappresenta la frazione di NDF che non può essere digerita nel rumine anche dopo infinite ore di permanenza al suo interno (Allen e Mertens, 1988; Van Soest, 1994). Ciò è dovuto alla presenza di forti legami tra l'NDF e un composto fenolico (la lignina) che, per la sua composizione chimica, non può essere degradata dai batteri ruminali. Ne consegue che l'entità con cui tale composto è presente, andrà ad influenzare la digeribilità dell'NDF contenuta nell'alimento e di conseguenza la sua qualità.

L'iNDF può essere stimata attraverso fermentazioni in vitro di 240 ore (uNDF₂₄₀; Palmonari et al., 2016) o fermentazioni in vivo per 288 ore (uNDF₂₈₈). Quest'ultima metodica è strettamente vincolata alla disponibilità di vacche con fistola ruminale e alle caratteristiche dei sacchetti utilizzati (Krizsan et al., 2012).

La considerazione dell'uNDF₂₄₀ come un fattore in grado di influenzare le performance e il comportamento alimentare degli animali non è stato ancora completamente studiato. Il contenuto di uNDF₂₄₀ dei foraggi cambia in base alla specie vegetale e all'interno della stessa specie ed è influenzato da molteplici fattori come l'ibrido, le condizioni di crescita e lo stadio di maturazione alla raccolta (Palmonari et al., 2014, 2016).

Di recente, studi condotti grazie alla collaborazione tra Cornell University, Miner Institute, e l'Università di Bologna hanno identificato l'uNDF₂₄₀ come una funzione del grado di riempimento del rumine assieme all'NDF lentamente degradabile e alla NDF rapidamente degradabile non ancora digerita. Lo spazio reso disponibile dal turn-over di tali componenti permette una maggior ingestione di alimento. La massa totale di uNDF₂₄₀ nel rumine può essere identificata come il livello base di riempimento che vincola il possibile flusso di NDF. È stata inoltre, suggerita la presenza di un livello massimo di uNDF₂₄₀ (0.39-0.48 % del PV) che non determini un limite all'ingestione di alimento e che garantisca un'adeguata funzionalità ruminale (Cotanch et al., 2014).

La frazione di uNDF₂₄₀ è usata per definire la qualità di un foraggio, in quanto strettamente correlata con la digeribilità della sostanza organica (Nousiainen et al., 2003). La digeribilità è infatti un parametro fondamentale, ed è ormai nota la sua influenza sull'ingestione di alimento e sulle performance produttive. Kendall et al., (2009) hanno osservato un miglioramento dell'ingestione e della produzione di latte con l'aumento della digeribilità dell'aNDFom. Anche Oba e Allen, (1999) hanno valutato la relazione tra la digeribilità dell'aNDFom (NDFD) e le performance degli animali e

hanno osservato che l'aumento di una unità di NDFD in vitro o in situ è associato con l'aumento di ingestione (0.17 kg/g), di latte prodotto (0.23 kg/g), e di latte corretto per il grasso al 4% (0.25 kg/g).

La stima dell'NDF indigeribile è diventata un indice importante per il corretto funzionamento dei modelli di razionamento, ed è andato a sostituire ufficialmente la stima che veniva fatta moltiplicando la lignina per un indice di 2.4. L'uNDF₂₄₀ è richiesto come punto terminale della fermentazione per permettere una stima accurata dell'NDF potenzialmente digeribile e dei suoi tassi di digeribilità lungo il digerente (Van Amburgh et al., 2015).

3. MODELLI DI RAZIONAMENTO

La volontà di comprendere sempre di più le dinamiche digestive degli animali, ha portato alla necessità di quantificare i processi che le regolano attraverso equazioni matematiche. Durante l'evoluzione dei modelli dinamici, il principale obiettivo è sempre stato quello di predire, nel modo più accurato possibile, le performance produttive degli animali e promuovere una maggiore efficienza alimentare.

La nascita e lo sviluppo di modelli matematici nei ruminanti è stata concomitante all'aumento degli studi in vivo sulla digeribilità della fibra, al fine di valutare la qualità dei foraggi (Mertens e Ely, 1979). Dal momento che non potevano essere misurati e valutati tutti i fattori rilevanti e le interazioni coinvolte sulla qualità dei foraggi in un unico esperimento, gli studiosi sono giunti alla conclusione che la modellizzazione e le simulazioni possono offrire un'ottima opportunità per definire il ruolo dell'animale e delle caratteristiche intrinseche alla pianta nella digestione della fibra.

Le dinamiche che stanno alla base dei processi digestivi coinvolgono il tasso di passaggio e di digestione dell'alimento assunto con la dieta. Ciò permette un costante turnover attraverso l'ingestione di nuovo alimento grazie alla fuoriuscita di materiale completamente o parzialmente digerito dal rumine. Il processo di turnover ha un effetto considerevole sulla popolazione microbica del rumine e sulla loro capacità produttiva. Poiché le interazioni tra digestione e passaggio sono particolarmente complesse, la modellizzazione di tali processi dinamici risulta di estrema importanza nel comprendere le funzioni gastrointestinali e l'efficienza alimentare nel loro complesso (Van Soest, 1994).

3.1 Modelli statici e modelli dinamici

I modelli sono rappresentazioni concettuali e matematiche dei sistemi, e attraverso il loro utilizzo si cerca di ottenere informazioni che permettano di capire il funzionamento del sistema in questione. L'obiettivo ultimo dello sviluppo dei modelli è quello di creare un sistema valido che possa essere applicato nella pratica. Si riconoscono essenzialmente quattro passaggi per la formazione di un modello: la comprensione, l'espressione matematica, la validazione e l'applicazione (Van Soest, 1994).

È possibile fare una distinzione tra due principali categorie di modelli: empirici e meccanicistici che possono essere definiti anche come modelli statici e dinamici, rispettivamente. Le caratteristiche principali che contraddistinguono questi due modelli sono riportati nella Figura 5 (Chalupa et al., 2003).

Feature	Production Model	Scientific Model
Purpose	Predict response	Understand process
Form	Response surface equations	Differential equations (state equations)
Parameters	Polynomial coefficients derived from data fitting	Biochemical reaction properties
Aggregation step	None; model derived from aggregated experiments	Chemical processes aggregated to organ and animal level functions
Solution process	Simple explicit solution of equations	Complex systems of differential equations requiring special software
Outputs	Computed indicators of adequacy of inputs and production cost measures	Steady state solutions to transactions in terms of scientifically significant indicators
Character	Empirical and static	Dynamic and Mechanistic

1. Adapted from Boston et al. (2000).

Figura 5. differenze principali tra i modelli statici e dinamici (Chalupa et al., 2003).

È opportuno sottolineare che tutti i modelli hanno un certo grado di empirismo; ciò che li differenzia è quindi il livello al quale sono empirici. I modelli empirici/statici sono descrizioni dirette dei dati osservati e sono in genere definiti stimando i parametri di una regressione multipla. Questi modelli sono costruiti principalmente con lo scopo di descrivere il comportamento di un sistema e dimostrare l'esistenza di una relazione tra variabili selezionate, ma senza tentare di spiegare la natura di tali relazioni. La struttura generale e il livello di dettagli è generalmente semplice. Questo tipo di modello non permette alcuna estrapolazione, cioè nessuna previsione fuori dell'intervallo dei dati utilizzati) e non aggiungono nulla alla conoscenza del sistema.

I modelli meccanicistici/dinamici tentano invece di spiegare le relazioni tra gli elementi del sistema modellizzato. Questi modelli si sono rivelati particolarmente utili in biologia, considerati i diversi livelli di organizzazione di un organismo vivente (strutture cellulari, cellule, tessuti, organi, individuo, popolazione, ecosistema). Un modello meccanicistico tenta di descrivere il sistema ad un certo numero di livelli al di

sotto di quello cui viene effettuata la stima. La natura delle connessioni tra i livelli di organizzazione inclusi nel modello dipendono dalla conoscenza dei processi coinvolti, accompagnati da ipotesi e assunzioni.

Un'altra differenza sta nella considerazione che viene data al tempo, assente come variabile nei modelli statici, invece variabile esplicita nei modelli dinamici.

Sono numerosi i modelli sviluppati per simulare gli eventi digestivi nel rumine. Alcuni di essi si occupano della quantificazione dei processi che intervengono durante le fermentazioni ruminali in modo più o meno completo; altri modelli di simulazione, più complessi, sono arrivati a descrivere il rumine nella sua globalità (Savian et al., 2007).

Secondo Mertens (1993) le prime valutazioni sui processi digestivi, che dipendono dal tempo di ritenzione, erano di tipo qualitativo e basate sull'interpretazione visiva delle curve di digeribilità, di difficile descrizione in quanto non lineari. Nello stesso lavoro Mertens sottolinea come Waldo sia stato il primo a suggerire un concetto innovativo che è stato alla base dello sviluppo di una nuova visione dei modelli matematici sulle dinamiche digestive, con la quale si voleva giungere ad una reale quantificazione dei processi in atto.

L'equazione di base suggerita da Waldo et al., (1972) è la seguente:

$$(2) \quad RD = kd / (kd + kp)$$

Dove RD rappresenta la digeribilità ruminale, kd è il tasso di degradazione degli alimenti all'interno del rumine e kp il tasso di passaggio dell'alimento dal rumine all'intestino.

È chiaro, quindi come la digeribilità della fibra all'interno del rumine sia il risultato della competizione tra processi digestivi e di passaggio fuori dal rumine.

Per questo la digeribilità dell’NDF viene descritta come un processo dinamico, nel quale fattori intrinseci ed estrinseci possono limitare la digestione (Mertens, 1993). I modelli dinamici non permettono soltanto la previsione dei valori nutrizionali per i foraggi al cambiare delle caratteristiche intrinseche dell’alimento o a cambiamenti nella dieta, ma permettono anche una migliore comprensione dei fattori che limitano la digestione.

3.2. Compartimentalizzazione

Com’è noto il razionamento dei bovini viene fatto non tanto per alimentare l’animale in se ma i microrganismi che popolano il rumine. I batteri ruminali e i loro prodotti di fermentazione insieme alle frazioni di alimento che sfuggono dalle fermentazioni ruminali sono fonte di nutrimento per coprire i fabbisogni di mantenimento e quelli produttivi. È stato quindi necessario creare un sistema che fosse in grado di descrivere le diverse frazioni che compongono l’alimento e i processi che regolano la loro degradazione nel rumine; inoltre tutto ciò deve essere associato ad un modello che descriva la crescita batterica (Chalupa et al., 2003).

Non è un caso che i modelli dinamici di razionamento si siano sviluppati in concomitanza con l’evoluzione delle tecniche di analisi degli alimenti, che hanno permesso di distinguere sempre meglio le frazioni di carboidrati e proteine sulla base della loro digeribilità nel rumine (figura 6).

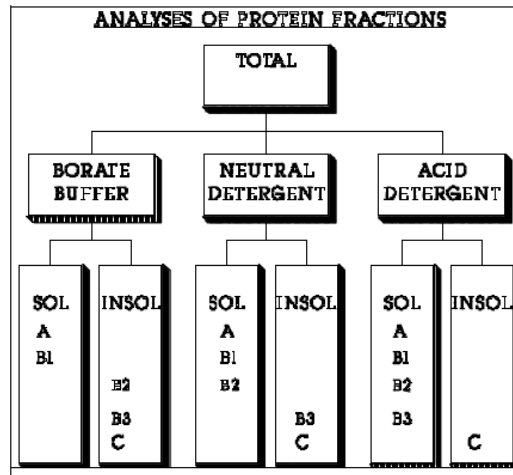


Figura 6. Caratterizzazione delle frazioni proteiche degli alimenti.

Ciò che caratterizza un modello meccanicistico è la sua capacità di guardare alla struttura del sistema che si sta investigando, dividerla nelle sue componenti chiave, e analizzare il comportamento dell'intero sistema valutando le diverse componenti e la loro interazione.

Tale compartimentalizzazione ha coinvolto:

- il tratto gastro intestinale, suddiviso in rumine, piccolo intestino e grosso intestino; ognuno caratterizzato da un tasso di ritenzione e digestione differente. Le fermentazioni batteriche avvengono nel rumine e nel grosso intestino, mentre il piccolo intestino è caratterizzato da reazioni enzimatiche per la degradazione degli alimenti;
- il contenuto del rumine che presenta tre diverse componenti con diverse caratteristiche di flusso: liquido, particelle in grado di lasciare il rumine e particelle ritenute;
- gli alimenti, distinti il più possibile nelle componenti che li costituiscono, e in particolare, nella loro cinetica digestiva suddivise in: rapidamente, lentamente degradabili e indegradabili;

Non tutte le componenti dell'alimento vengono degradate o passano il tratto gastrointestinale allo stesso modo. Gli alimenti solubili si dissolvono e lasciano il rumine ad un tasso pari a quello dei liquidi. I concentrati e le piccole particelle di fibra riescono a lasciare il rumine più rapidamente rispetto alle particelle più grandi. I modelli che simulano i processi ruminali devono tenere conto dei differenti tassi di passaggio e degradazione (Mertens, 2005).

Da un punto di vista modellistico, i compartimenti sono definiti dalla loro unicità dei loro processi cinetici. Per essere accurati, le particelle ritenute e le particelle pronte a lasciare il rumine dovrebbero essere descritte come compartimenti separati, considerando che entrambe sono all'interno dell'ambiente ruminale. Per descrivere propriamente le particelle di alimento, oltre alla loro dimensione, sono prese in considerazione e proprietà cinetiche che regolano la fuoriuscita dal rumine, in quanto le piccole particelle intrappolate nel materasso ruminale hanno una probabilità diversa di uscire dal rumine rispetto a quelle localizzate sul fondo in prossimità dell'ostio reticolo-omasale.

Le particelle di alimento sono distinte anche matematicamente; sono necessarie, infatti, diverse equazioni per descriverne il processo di digestione e passaggio. Allo stesso modo, la frazione digeribile e indigeribile può essere contenuta nella stessa particella di alimento, nonostante ciò, ognuna richiede un compartimento separato per descrivere la propria singolare cinetica di digestione e passaggio (Mertens, 2005).

Infatti, il principale problema che si incontra del tentativo di descrivere la cinetica dei processi digestivi è che il residuo rimasto ad ogni tempistica di fermentazione è un misto di materiale digerito e indigerito (Mertens, 1993). Studi precedenti hanno dimostrato che la dNDF dei foraggi può essere suddivisa in due diverse frazioni (Van Soest et al., 2005); entrambe seguono un andamento di primo ordine ma con diversi

tassi di digeribilità, e sono definiti come frazione rapidamente o lentamente degradabile (fast o slow pool; Raffrenato e Van Amburgh, 2010). Questo concetto è stato sottolineato da Mertens, il quale ha indicato come la digeribilità predetta dai modelli fosse molto più accurata quando la pdNDF era considerata come la somma di due diverse frazioni (Mertens, 1973, 1977; Mertens e Ely, 1979). Studi successivi hanno confermato questo concetto per i foraggi e in sottoprodotti fibrosi (Raffrenato and Van Amburgh, 2010; Cotanch et al., 2014) sottolineando come la misura dei diversi pool e tassi di degradazione possano essere usati per spiegare meglio il comportamento alimentare degli animali e per confrontare i foraggi, soprattutto quando appaiono simili nella loro composizione chimica.

3.3. Obiettivi della modellizzazione dei processi digestivi

I modelli nascono con l'obiettivo di principale di comprendere meglio e in maniera più approfondita i processi che regolano un sistema. Gli obiettivi per la creazione di un modello che descriva i tassi e l'entità della digestione sono molteplici. Innanzitutto, può essere usato per simulare degli aspetti del sistema che non sono ben conosciuti e che si vogliono approfondire. Questi modelli sono basati su ipotesi meccanicistiche sul funzionamento del sistema sviluppato dal modellista. Per essere utili questi modelli devono descrivere il sistema reale ad un livello di accuratezza accettabile. All'aumentare della complessità del modello solitamente corrisponde un aumento dell'accuratezza della descrizione del sistema grazie alla capacità di dare risposta ad un maggior numero di variabili che ne influenzano il funzionamento. Per essere universalmente applicabile, un modello dovrebbe riuscire a predire in maniera accurata anche in situazioni estreme, o quando le condizioni sperimentali sono varie.

Il secondo obiettivo della modellizzazione è di predire le risposte del sistema, in maniera empirica; in sintesi, quali sono i risultati attesi considerando la razione fornita ad una determinata categoria di animali.

Il terzo obiettivo è quello di sviluppare strategie per controllare od ottimizzare il sistema. Nello specifico si tratta di trovare la soluzione migliore che mi permetta di soddisfare i fabbisogni dell'animale con il contemporaneo obiettivo di ottimizzare i costi alimentari (Mertens, 2005)

3.4. I principali modelli di razionamento

I modelli di razionamento oggi più conosciuti sono quelli americani CNCPS (Cornell Net Charbohydrate e Protein System) e NRC (National Research Council), e quelli europei: INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) francese e NorFor (Nordic Feed Evaluation System; nordEuropeo). Come precedentemente affermato i modelli di razionamento possono avere un diverso grado di complessità in relazione ai livelli del sistema che sono stati presi in considerazione e delle equazioni formulate per descriverli.

I modelli dinamici sono in grado di prevedere il tasso di degradazione degli alimenti nel rumine, il passaggio dell'alimento non degradato nell'intestino e la quantità di energia e proteina metabolizzabile (ME e MP) a disposizione dell'animale per la soddisfazione dei fabbisogni specifici (Sniffen et al., 1992). Taluni modelli considerano anche le interazioni tra alimenti e descrivono la dinamica di fermentazione nel rumine; inoltre i risultati sono modulati in base allo stato fisiologico dell'animale o del gruppo di animali che vengono presi in considerazione.

3.4.1. I modelli statunitensi: NRC, CNCPS-CPM

L’NRC (National Research Council) è un’organizzazione nazionale che è stata fondata dall’Accademia Nazionale della Scienza nel 1916. L’obiettivo è sempre stato quello di fornire al settore zootecnico dell’allevamento bovino le più recenti informazioni riguardo i fabbisogni degli animali, le caratteristiche degli alimenti e nuove strategie per implementare la formulazione delle razioni così da soddisfare i fabbisogni degli animali e ridurre al minimo le escrezioni (NRC, 2001).

A partire dal 1944, l’NRC ha pubblicato sei edizioni del libro “Nutrient Requirement of Dairy Cattle”; la settima e ultima edizione è stata pubblicata nel 2001.

Il lavoro degli autori è volto a creare una raccolta con tutte le più recenti pubblicazioni nel settore della nutrizione e con le quali valutare lo stato dell’arte della ricerca e così definire i fabbisogni delle diverse categorie di animali. Il manuale si presenta suddiviso in 16 capitoli che approfondiscono le principali tematiche inerenti la nutrizione e l’alimentazione delle bovine da latte. Più che essere un modello di razionamento vero e proprio, il modello NRC può essere considerato una piattaforma di valutazione di una razione e la sua capacità di soddisfare i fabbisogni stabiliti (NRC, 2001).

Il maggior limite dell’NRC è che i suoi aggiornamenti avvengono ad intervalli molto dilatati, ad oggi l’ultima versione risale a 16 anni fa.

Il modello CNCPS (Cornell Net Carbohydrate and Protein System) venne presentato ufficialmente per la prima volta nella rivista internazionale Journal of Animal Science nel 1992 (Russell et al., 1992). I primi tentativi di definire un modello che descrivesse la fisiologia del ruminante risalgono alla fine degli anni ‘70 presso l’Università Cornell (Ithaca, NY). In quegli anni il gruppo di lavoro composto da Danny Fox, Charlie Sniffen e Roy Black riconosce che l’attuale modello sulla nutrizione dei ruminanti,

nello specifico l'NRC mancava di integrazione tra l'animale e l'ambiente in cui vive e tra le funzioni fisiologiche e i processi metabolici (Chalupa et al., 2003).

Ciò che più contraddistingue il CNCPS è la dettagliata suddivisione delle frazioni di carboidrati e proteine, i tassi di degradazione ruminale delle frazioni di alimento e i pool batterici.

L'aspetto innovativo del modello riguardava i criteri usati per il suo sviluppo, che includevano: i dati relativi agli animali, all'ambiente di stalla, alla composizione analitica dei foraggi che deve essere testata con accurate analisi di laboratorio; obiettivo del modello era quello di basarsi esclusivamente su ricerche pubblicate. Fin dalla sua prima pubblicazione il CNCPS è stato definito uno strumento che può essere usato a scopo di ricerca ma anche come guida pratica per costruire e bilanciare una razione (Russell et al., 1992).

Il CNCPS è una combinazione di approcci empirici e meccanicistici volta a descrivere: l'ingestione di alimento; le fermentazioni ruminali di proteine e carboidrati; digeribilità e assorbimento intestinale; utilizzazione dei nutrienti per il mantenimento, la crescita, la lattazione e la gravidanza; le riserve corporee; l'escrezione dei nutrienti.

Successivamente, con l'avanzare della ricerca è stata valutata la necessità di sviluppare un sotto-modello che descrivesse la crescita batterica nel rumine. Nei ruminanti, infatti, i nutrienti apportati con la razione vengono utilizzati dai batteri che li sfruttano per replicarsi e produrre nuova proteina microbica. La proteina microbica, nella sua combinazione di amminoacidi (AA), è del tutto paragonabile con le proteine animali e rappresentano un apporto fondamentale per l'animale di AA essenziali. Il modello che descrive la crescita batterica è stato sviluppato da Jim Russel (Russell et al., 1992) e considera la richiesta di energia per il mantenimento e per l'accrescimento ad un tasso che è in relazione con il tasso di degradazione dei carboidrati. Ciò ha reso necessario la

suddivisione dei batteri in base al substrato che sono in grado di fermentare (carboidrati fibrosi e non fibrosi). I batteri che fermentano i carboidrati fibrosi hanno un minor fabbisogno di mantenimento ma crescono ad una velocità inferiore rispetto ai batteri che fermentano i carboidrati non fibrosi. I batteri che degradano la fibra usano l'ammoniaca come fonte di azoto mentre l'accrescimento dei batteri che fermentano i carboidrati non fibrosi è aumentato in presenza di peptidi.

I primi articoli ufficiali descrivono le sezioni del CNCPS sulle fermentazioni ruminanti (Russell et al., 1992), sulla disponibilità di carboidrati e proteine (Sniffen et al., 1992), e sui fabbisogni degli animali e l'adeguatezza della dieta (Fox et al., 1992). Un anno dopo viene pubblicato un modello sugli amminoacidi (O'Connor et al., 1993). In seguito è stato aggiunto il calcolo della proteina ideale sulla scorta degli studi condotti in Francia (Rulquin et al., 1993).

Negli anni l'attività di ricerca è continuata con l'obiettivo di dare risposta a domande ancora in sospeso e riuscire a quantificare un numero sempre maggiore di processi. L'ultima versione disponibile vede l'inclusione di un sotto-modello sui protozoi e il flusso di azoto che considera l'intero tratto gastrointestinale e un nuovo sistema per descrivere il metabolismo dell'azoto dopo l'assorbimento come il ciclo dell'urea e l'apporto di AA (Higgs e Van Amburgh, 2016).

Anche la piattaforma informatica sul quale è impostato il modello è cambiata molto nel corso degli anni, passando da un semplice foglio di calcolo delle prime tre versioni ad uno strumento visual-basic nelle successive. Solo recentemente il modello ha subito un ulteriore sviluppo utilizzando Vensim (SAS Institute Inc., Cary NC), uno strumento in grado di simulare le dinamiche dei flussi dei nutrienti nei diversi tratti del digerente.

Possiamo concludere che il sistema NRC rappresenti una guida alla definizione dei fabbisogni e che basa lo sviluppo delle sue equazioni su ricerche già esistenti. Il

modello che ne è derivato ha un carattere prevalentemente statico. Il CNCPS, invece è un modello a prevalente carattere dinamico che vuole essere uno strumento di campo per la formulazione di razioni bilanciate. Le ricerche in questo caso vengono pensate e progettate per implementare parti del sistema che non sono state ancora del tutto esplorate e quantificate.

Inizialmente la parte del modello CNCPS riguardante le bovine da latte era stata utilizzata per sviluppare un sistema per il bilanciamento delle razioni da poter essere utilizzato in campo, il CPM-Dairy. Il sistema è stato il prodotto della collaborazione tra l'Università Cornell, l'Università della Pennsylvania e il centro di ricerca privato Miner Institute, a partire dal 1998. Il software è ancora disponibile ma l'ultimo aggiornamento risale alla versione 3.0 (Tedeschi et al., 2008); dopodiché la collaborazione tra le tre strutture è venuta meno e le successive evoluzioni del CNCPS non sono più state incluse.

3.4.2. I modelli Europei: INRA e NorFor

L'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) è un'istituzione Francese che da anni si occupa di sviluppare ricerche nel settore agronomico e zootecnico. A livello Europeo ha definito le basi della nutrizione animale grazie alla definizione dei loro fabbisogni. A contraddistinguere il sistema francese è la definizione dell'energia apportata dagli alimenti come Unità Foraggiere Latte e Carne. La stessa unità veniva usata per definire anche i fabbisogni di mantenimento e produzione. Le UFL ha un contenuto di energia netta pari a 1700 Kcal, mentre quella carne (UFC) ha un valore di 1820 Kcal). Questa era l'unità di misura utilizzata per quantificare i fabbisogni di mantenimento, attività, accrescimento, gravidanza (dal 6° mese) e produzione di latte (dipende da grasso e proteina). Come per l'NRC americano manca la stima dei

fabbisogni per le condizioni climatiche e per variazioni di peso. Il sistema prevede degli aggiustamenti dei fabbisogni in base al tipo di stabulazione (libera o fissa), ai kg di grasso nel latte e di proteina, e all'età dell'animale (fabbisogni di accrescimento).

Seppur concettualmente corretto, il sistema INRA si è mantenuto particolarmente statico nel valutare la composizione degli alimenti, nella definizione dei fabbisogni e dei nutrienti apportati in rumine e intestino per animali ad elevata produzione. Risulta quindi di scarsa utilità nella pratica di razionamento in stalle con produzioni molto elevate di latte.

Il NorFor (Nordic Feed Evaluation System) è un sistema nato dallo sviluppo di un progetto nel 2001 che ha visto partecipare associazioni di allevatori di Danimarca, Norvegia, Islanda e Svezia. L'obiettivo generale era quello di creare un sistema di valutazione degli alimenti che fosse uguale e comune ai quattro paesi al fine di facilitare la comunicazione tra gli allevatori, i nutrizionisti e il settore dell'industria. Inoltre voleva essere uno strumento attraverso cui diffondere le ricerche fatte e le conoscenze acquisite all'interno degli stati coinvolti e a livello internazionale.

Così è stato commissionato il compito di sviluppare questo sistema ad un gruppo di ricercatori esperti nel settore dei ruminanti.

Il NorFor è nato come progetto pluriennale (2002-2006) per creare un nuovo sistema che ha previsto una fase di confronto con i sistemi già presenti negli Stati Uniti. Il lavoro comprendeva la validazione del sistema con dati provenienti dai paesi del Nord Europa. Inoltre il progetto si è potuto sviluppare grazie alla collaborazione con centri di ricerca ed università l'industria e i laboratori privati (Volden et al., 2011).

Il NorFor è un sistema statico e semi-meccanicistico, basato su ricerche scientifiche, che è in grado di prevedere l'apporto di nutrienti e i fabbisogni di mantenimento, produzione di latte, accrescimento e gravidanza dei bovini. È composto da cinque parti

principali: (1) una sezione che descrive le caratteristiche degli animali e degli alimenti; (2) un modello per la simulazione dei processi che avvengono nel rumine e nell'intestino; (3) un modulo per la previsione dell'ingestione; (4) una sezione per la descrizione delle caratteristiche fisiche della dieta, (5) una sezione di output che descrive i nutrienti apportati, il bilancio tra di essi e le risposte produttive attese (Figura 6).

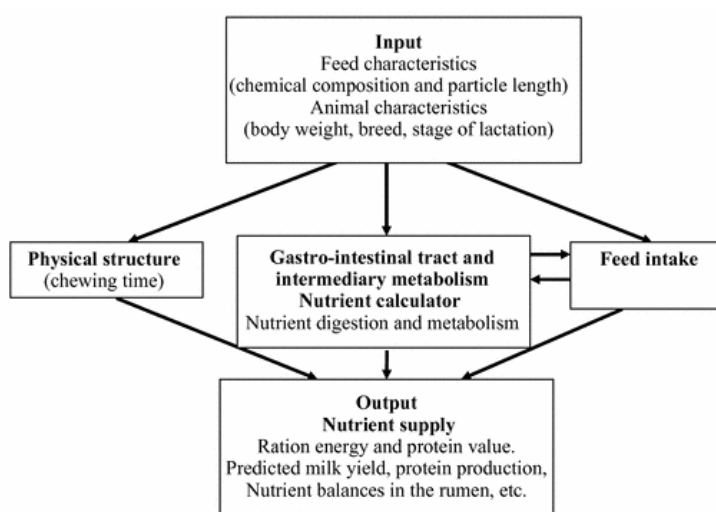


Figura 7. Schema che descrive l'organizzazione del modello NorFor.

4. MODELLI E CALCOLO DEI TASSI DI PASSAGGIO

Nei ruminanti il passaggio dell'alimento attraverso il tratto digestivo è un processo complesso che comprende attività di ritenzione selettiva, rimescolamento, separazione, e infine fuoriuscita di particelle e liquido dal rumine prima che riesca a raggiungere il piccolo e grosso intestino. Inoltre il contenuto ruminale si comporta come se fossero presenti almeno altri tre compartimenti con diverse capacità di fuoriuscire dal rumine: i liquidi, le particelle pronte a lasciare il rumine e le particelle ritenute. Gli alimenti solubili fuoriescono dal rumine più rapidamente delle particelle grandi, che sono invece

trattenute e sottoposte ulteriormente all'attività ruminativa. I modelli che studiano il sistema rumine devono tenere in considerazione queste differenze nel tasso di passaggio (Dijkstra et al., 2005).

Il rumine rappresenta l'organo chiave nel determinare la risposta dell'animale alle variazioni della dieta. Per ottimizzare quindi i processi digestivi che avvengono nel rumine è necessario descrivere, attraverso formule matematiche, la risposta dell'organo alla dieta.

I modelli di razionamento ad oggi conosciuti hanno sviluppato una propria equazione per la determinazione dei tassi di passaggio. Tali equazioni sono il risultato dell'osservazione del comportamento delle ingesta in vivo durante le prove sperimentali attraverso diverse tecniche: l'uso dei marker (Udén et al., 1980; Mader et al., 1984), in associazione all'applicazione di una fistola duodenale (Harmon e Richards, 1997) o ruminale con prelievo del materiale a livello dell'ostio reticolo-omasale (Huhtanen et al., 1997).

Nel rumine i tassi di degradazione e passaggio sono usati per calcolare la digestione e la fermentazione dei nutrienti. Per avere una corretta stima della digestione è necessario una corretta stima dei tassi di passaggio dell'alimento (Allen e Mertens, 1988) e delle sue caratteristiche intrinseche ed estrinseche.

Per i tassi di degradazione della fibra, **NorFor** prende in considerazione non solo le caratteristiche intrinseche delle frazioni fibrose ma anche i fattori che influenzano l'ambiente ruminale (Hoover, 1986; Soest, 1994).

Le frazioni di alimento che escono non digerite dal rumine sono classificate in quattro fasi diverse:

1. liquida (r_{kpl});
2. particelle di amido e proteine dei foraggio (r_{kpr});

3. particelle di concentrato (r_kpc);
4. NDF nelle particelle di foraggio (r_kpNDFr).

Le equazioni che vengono utilizzate dal sistema NorFor per il calcolo del tasso di passaggio dei liquidi e delle frazioni proteiche ed amilacee dei foraggi sono quelle identificate da Sauvant et al., (1995):

$$(3) \quad r_{Kpl} = 2.45 + (0.055 * (DMI * 1000) / (BW^{0.75})) + (0.0004 * \text{Forage intake}^2)$$

$$(4) \quad r_{Kpr} = 0.35 + (0.022 * (DMI * 1000) / (BW^{0.75})) + (0.0002 * \text{Forage intake}^2)$$

queste equazioni tengono in considerazione gli stessi fattori:

DMI: dry matter intake = ingestione di sostanza secca in kg; BW: body weight = peso vivo in kg (considerato come $BW_{kg}^{0,75}$ = peso vivo metabolico); Forage intake: ingestione di foraggi in % della sostanza secca.

Il tasso di passaggio della frazione proteica e amilacea dei concentrati (r_kpc) è calcolata con un'equazione modificata del sistema NRC (2001):

$$(5) \quad r_{kpc} = 2.504 + (0.1375 * (DMI * 1000) / BW) - (0.02 * \text{Concentrate intake})$$

dove **DMI**: dry matter intake = ingestione di sostanza secca in kg; **BW**: body weight = peso vivo in kg (considerato come $BW_{kg}^{0,75}$ = peso vivo metabolico); Concentrate Intake = ingestione di concentrati, in % sulla SS. Questa equazione, a differenza delle due precedenti usa come variabile il peso vivo in kg (non il peso vivo metabolico).

L'equazione originaria usata da NRC per il calcolo del tasso di passaggio dei concentrati è la seguente:

$$(6) \quad Kp_c = 2.904 + (1.375 \times DMI) - (0.02 \times \text{Concentrate Intake})$$

dove kp_c è il tasso di passaggio dei concentrati, %/h; DMI rappresenta l'ingestione di sostanza secca in % del peso vivo; e Concentrate intake, l'ingestione di concentrati in % sulla SS.

La modifica fatta dal NorFor riguarda il fattore addizionale che è stato abbassato poiché considerato sovrastimare il passaggio delle particelle di concentrato.

Gli autori del sistema NorFor hanno valutato che l'equazione (6) non considerava la frazione NDF presente all'interno delle particelle di concentrato, nonostante sia una porzione importante da valutare nel calcolo della digeribilità complessiva di NDF nel rumine; ciò determina una sottostima della digeribilità della pdNDF apportata dai concentrati. Per questo motivo hanno creato un'altra equazione specifica:

$$(7) \quad kp_NDFc = (r_Kpc) * 0.43$$

dove kp_NDFc è il tasso di passaggio all'esterno del rumine della frazione NDF contenuta nei concentrati, %/h; r_kpc è il tasso di passaggio dei concentrati fuori dal rumine, %/h.

Ciò comporta una riduzione del 57% del tasso di passaggio dei concentrati quando viene presa in considerazione la loro frazione NDF.

Per il calcolo del tasso di passaggio dell'NDF presente nei foraggi, il sistema NorFor tiene in considerazione l'ingestione complessiva di NDF (g) per kg di peso vivo.

$$(8) \quad r_{kpNDFr} = 0.480 + (1.5106 / (1 + (((DMI * NDF) / (BW * 7.484))^{-3.198})))$$

dove r_{kpNDFr} è il tasso di passaggio della frazione pdNDF contenuta nelle particelle di foraggio, %/h; NDF è il contenuto di NDF della dieta, g/kg SS; DMI è l'ingestione di sostanza secca, kg/g; e BW è il peso vivo dell'animale, kg.

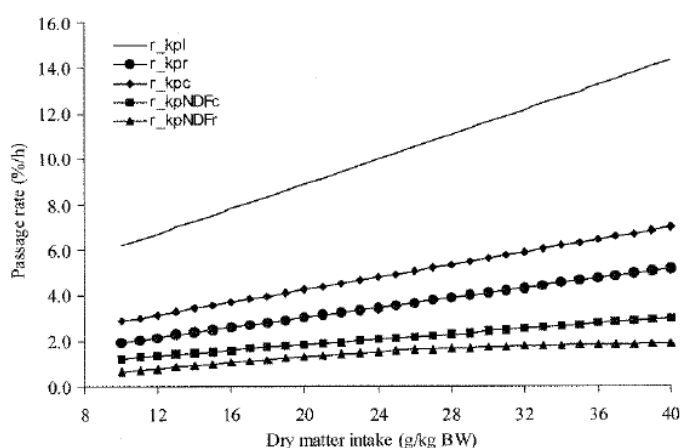


Figura 8. Tasso di passaggio (%/h) dei liquidi (r_{kpl}); proteine ed amido dei foraggi (r_{kpr}); proteine e amido dei concentrati (r_{kpc} ; NDF nei concentrati (r_{kpNDFc}); e NDF da foraggi (r_{kpNDFr}) a diversi livelli di ingestione di sostanza secca (g/kg PV)

La figura 7 mostra come il tasso di passaggio delle diverse frazioni di alimento cambia al variare del livello di ingestione di alimento (tutte le equazioni hanno il dato di ingestione come variabile) e come le diverse frazioni di uno stesso alimento vengano considerate entità separate, ognuna con un proprio comportamento, tanto da richiedere delle equazioni specifiche per il loro calcolo.

Nel sistema NorFor la degradazione ruminale della NDF potenzialmente degradabile dei foraggi è stimata attraverso un modello a due compartimenti (Allen and Mertens, 1988) che comprende una porzione “non-escapable” e una “escapable”. La porzione

“non-escapable” rappresenta le particelle di grandi dimensioni che non sono in grado di lasciare il rumine, mentre la porzione “escapable” comprende le piccole particelle che sono potenzialmente in grado di lasciare il rumine. Il modello NorFro tiene in considerazione la ritenzione selettiva esercitata nei confronti delle particelle più grandi ed è in grado di fornire una previsione più accurata e precisa della digeribilità della pdNDF nel rumine rispetto al modello che considerano un solo compartimento (Huhtanen and Kukkonen, 1995). A tale scopo sono stati individuati due diversi tassi di passaggio: uno che stima il passaggio dalla porzione “non-escapable” a quella “escapable” (Eq. 9)

$$(9) \quad r_{kp1} = 100 / (100 / r_{kpNDFr} \times 0.4)$$

dove r_{kp1} è il tasso di passaggio della pdNDF dalla porzione non escapable a quella escapable (%/h); e r_{kpNDFr} è il tasso di passaggio della pdNDF dei foraggi fuori dal rumine (Eq. 8).

Il passaggio della pdNDF dalla porzione escapable fuori dal rumine è espressa dall'equazione 10:

$$(10) \quad r_{kp2} = 100 / (100 / r_{kpNDFr} \times 0.6)$$

dove r_{kp1} è il passaggio della pdNDF dalla porzione escapable fuori dal rumine (%/h); e r_{kpNDFr} è il tasso di passaggio della pdNDF dei foraggi fuori dal rumine (Eq. 8).

Per il calcolo della digeribilità della pdNDF nel rumine è coinvolto un terzo fattore di correzione che tiene conto del rapporto tra carboidrati rapidamente e lentamente degradabili nella dieta (RLI = rumen load index, g/g di NDF). Questo è stato fatto alla

luce di numerosi studi che sottolineano come un elevato livello di carboidrati fermentescibili in razione possa avere un impatto negativo sulla digeribilità della fibra all'interno del rumine (Khalili and Huhtanen, 1991; Huhtanen and Jaakkola, 1993)

Il fattore di correzione del tasso di degradabilità della NDF (kdNDF) è descritto nell'equazione 11:

$$(11) \quad \text{corr_NDF_fac} = 0.4561 + 0.5431 / (1 + e^{(0.7657 - \text{RLI} / -0.1589)})$$

dove corr_NDF_fac è il fattore di correzione del kdNDF (0-1); e RLI è il rapporto tra carboidrati rapidamente e lentamente degradabili nella dieta.

Dallo sviluppo del modello di digeribilità a due compartimenti e del fattore di correzione della kdNDF, nel sistema NorFor la digeribilità della pdNDF nel rumine (rd_pdNDFr) è calcolata come:

$$(12) \quad \text{rd_pdNDFr} = \sum_j \text{DMI}_j \cdot \text{NDF}_j \cdot \frac{\text{pdNDF}_j}{1000} \cdot \left(\frac{\text{kdNDF}_j \cdot \text{corrNDF_fac}}{(\text{kdNDF}_j \cdot \text{corrNDF_fac}) + r_kp1} \right) \cdot \left(1 + \frac{r_kp1}{(\text{kdNDF}_j \cdot \text{corrNDF_fac}) + r_kp2} \right)$$

dove rd_pdNDFr è la degradazione ruminale della pdNDF nei foraggi, g/giorno; DMI_i è la SSI degli alimenti i=1...n, kg/g; NDF_i è l'NDF contenuto negli alimenti i=1...n, g/kg SS; pdNDF_i è il contenuto di pdNDF contenuto negli alimenti i=1...n, g/kg NDF; kdNDF_i è il tasso di degradazione della pdNDF negli alimenti i=1...n, %/h; corr_NDF_fac è il fattore di correzione del tasso di degradazione dell'NDF (Eq. 11); r_kp1 è il tasso di rilascio della pdNDF dalla porzione non escapable a quella escapable

(Eq. 9); r_{kp2} è il tasso di passaggio della pdNDF dalla frazione escapable fuori dal rumine (Eq. 10).

Nel sistema CNCPS le equazioni per descrivere i tassi di passaggio sono tre, e corrispondono alle tre diverse categorie di alimenti: foraggi, concentrati e liquidi secondo quanto descritto da Seo et al., (2006):

$$(13) \quad Kp \text{ foraggi} = (2.365 + 0.0214 F\%BW + 0.0734 C\%BW + 0.069 FDMI)/100$$

$$(14) \quad Kp \text{ concentrati} = (1.169 + 0.1375 F\%BW + 0.1721 C\%BW)/100$$

$$(15) \quad Kp \text{ liquidi} = (4.524 + 0.0223 F\%BW + 0.2046 C\%BW + 0.344 FDMI)/100$$

Le variabili prese in considerazione per il calcolo delle equazioni (9,10 e 11) sono:

1. $F\%BW = \text{forages intake (\%/BW)} = \text{ingestione di foraggio (\%/PV)}$;
2. $C\%BW = \text{concentrates intake (\%/BW)} = \text{ingestione di concentrati (\%/PV)}$;
3. $FDMI = \text{forage dry matter intake (kg/d)} = \text{ingestione di sostanza secca da foraggi (kg/d)}$.

A differenza del k_p dei concentrati, l'ingestione di sostanza secca da foraggi è un parametro significativo nel calcolo del tasso di passaggio dei foraggi e dei liquidi. Tale effetto è particolarmente impattante sul tasso di passaggio dei liquidi come si può evincere dal fattore per cui è moltiplicato (0.069 vs 0.344 nel k_p dei foraggi e dei liquidi, rispettivamente). All'aumentare dell'ingestione di foraggio, la masticazione e la ruminazione aumentano (Welch, 1982). A questo segue un aumento della secrezione di saliva e un aumento del tasso di passaggio dei liquidi (Evans, 1981; Goetsch e Owens, 1986). Questo effetto non dipende solo dal contenuto di foraggio come % del peso vivo,

ma anche dal suo contenuto in termini assoluti nella dieta, dal momento che L'ingestione di sostanza secca da foraggi (FDMI) rimane significativo quando viene inclusa la variabile "F%BW" nell'equazione del tasso di passaggio di foraggi e liquidi. Il motivo per il quale la variabile "FDMI" non è significativa per l'equazione del tasso di passaggio dei concentrati non è del tutto chiarita. Tuttavia, ciò sottolinea il fatto che il meccanismo che regola il passaggio delle particelle fuori dal rumine è diverso tra concentrati e foraggi (Seo et al., 2006a).

In seguito a numerose simulazioni con diversi livelli di ingestione di sostanza secca è apparso chiaro come tale parametro fosse direttamente correlato con tutte le equazioni del kp, in particolar modo con quella che descrive il passaggio dei liquidi. Tuttavia sono gli stessi autori che sottolineano la necessità di ulteriori studi che portino alla definizione di equazioni maggiormente accurate nel predire il tasso di passaggio, in particolare dei liquidi. Questo può essere raggiunto con l'inclusione di variabili che tengano conto delle caratteristiche fisiche delle particelle di alimento. Infatti, le dimensioni delle particelle e la loro densità sono riconosciute essere i fattori che maggiormente influenzano la distribuzione delle particelle e la loro probabilità di lasciare il rumine (Kaske et al., 1992; Van Soest, 1994; Hristov et al., 2003).

L'utilizzo del modello in campo ha permesso di identificare alcuni limiti in particolare è stata osservata una sottostima del livello di energia e proteina metabolizzabile fornita da diete ad alto contenuto di foraggi e a un ridotto livello di ingestione. Il tasso di passaggio dei foraggi, secondo l'equazione di Seo, era 0.04 h^{-1} con un minimo di 0.013 h^{-1} e un massimo di 0.074 h^{-1} . In seguito a un'estesa meta-analisi è stato dimostrato che il tasso di passaggio dei foraggi previsto dall'equazione di Seo è troppo rapido e andrebbe a sottostimare la digeribilità della fibra nel rumine (Krizsan et al., 2010). Questo ha portato alla necessità di individuare un'equazione alternativa. La nuova

versione del CNCPS (v6.5) comprende l'equazione formulata dal sistema NorFor (Eq. 8).

Il confronto delle due equazioni ha evidenziato una notevole differenza nel tasso di passaggio dei foraggi. Attraverso l'uso di un database comune, Van Amburgh et al., (2015) hanno valutato che il k_p medio previsto dall'equazione di Seo et al., 2006 è stato di $4.8\% \text{ h}^{-1}$ mentre quello calcolato dall'equazione NorFor è stato dell' $1.7\% \text{ h}^{-1}$. Il minor tasso di passaggio fuori dal rumine ottenuto con l'equazione proposta da NorFor permette un maggior tempo di ritenzione del foraggio all'interno del rumine e quindi un aumento della digeribilità dell'NDF; di conseguenza si avrà un maggior apporto di energia e proteina metabolizzabile ottenuto da questi alimenti.

Il sistema NRC (2001), utilizza diverse equazioni per descrivere i tassi di passaggio, che sono più semplici rispetto ad altri sistemi. Le equazioni sono tre e si riferiscono a tre diverse categorie di alimenti: concentrati, foraggi secchi e foraggi umidi. Le stesse variabili che compongono le equazioni sono limitati: DMI (ingestione di sostanza secca in percentuale sul peso vivo), concentrate intake (ingestione di concentrato in % della sostanza secca), NDF intake, (ingestione di NDF in % della sostanza secca). Con questi tre elementi sono state elaborate le seguenti equazioni:

$$(16) \quad \text{Concentrati: } k_p = 2.904 + (1.375 \times \text{DMI}) - (0.020 \times \text{Concentrate Intake})$$

$$(17) \quad \text{Foraggi secchi: } k_p = 3.362 + (0.479 \times \text{DMI}) - (0.017 \times \text{Concentrate Intake}) \\ - (0.007 \times \text{NDF intake})$$

$$(18) \quad \text{Foraggi umidi: } k_p = 3.054 + (0.614 \times \text{DMI})$$

I limiti dei kp di NRC riguardano il fatto che gli studi che sono stati usati per la loro elaborazione hanno usato solo terre rare come marker. Ciò può limitare le condizioni nelle quali tali equazioni possono essere applicate; inoltre non è prevista un'equazione per il tasso di passaggio dei liquidi (Seo et al., 2006a). Nella sua valutazione del sistema NRC, Seo et al., (2006b) identificò un errore nel kp dei foraggi, il segno davanti al coefficiente di regressione per il contenuto di concentrati nella dieta era invertito, e dovrebbe essere positivo.

Un altro gruppo di lavoro, che vede tra i maggiori protagonisti Krizsan, Ahvenjarvi e Huhtanen, ha approfondito la valutazione dei tassi di passaggio dei foraggi. Attraverso una meta-analisi sono stati raggruppati gli studi che hanno valutato i flussi di alimento usando l'iNDF come marker interno ed è stato studiato l'effetto delle caratteristiche estrinseche e il tipo di foraggio sul tasso di passaggio (kp) nei ruminanti. Dall'analisi dei dati raccolti sono state create due equazioni, una che fitta meglio il modello quando il tipo di foraggio non è incluso (Eq. 19) e una che tiene conto del tipo di foraggio maggiormente rappresentato nella razione (Eq 20).

$$(19) \quad Kp (\%/h) = 1.19 + 0.0879 \times \text{NDF intake} + 0.792 \times \text{prop of concentrate NDF of total NDF} + 1.21 \times \text{diet iNDF:NDF ratio}$$

dove NDF intake è l'ingestione di NDF in grammi per kg di PV; prop of concentrate NDF of total NDF rappresenta la frazione NDF derivata dai concentrati in proporzione all'NDF totale; diet iNDF:NDF ratio è il rapporto tra iNDF e NDF della dieta.

$$(20) \quad Kp (\%/h) = F + 1.54 + 0.0866 \times \text{NDF intake}$$

dove NDF intake è l'ingestione di NDF in grammi per kg di PV e F è il fattore di aggiustamento dell'intercetta che considera il tipo di foraggio prevalente nella dieta. In particolare il valore F per l'insilato d'erba, l'erba fresca, medica e mais insilati e medica fieno o insilato sono rispettivamente 0.00, -0.91, +0.83 e +0.24.

Appare chiaro che i sistemi di razionamento sono in continua evoluzione. Le attività di ricerca hanno l'obiettivo di implementare le conoscenze sui processi digestivi al fine di arrivare a stimare sempre più accuratamente, attraverso equazioni matematiche, le quote di nutrienti disponibili alla crescita batterica e con essa la disponibilità finale di nutrienti per la bovina.

SCOPO DELLA TESI

Ciò che si evince dalla parte introduttiva è che sono molteplici i fattori in grado di influenzare la digeribilità degli alimenti all'interno del tratto gastro intestinale dei ruminanti, in particolare nel rumine. Dall'entità con cui i nutrienti vengono degradati nel rumine, dipende la crescita dei microrganismi ruminali e di conseguenza l'apporto di nutrienti all'animali che li utilizzerà per soddisfare i fabbisogni, propri della fase produttiva in cui si trova.

Gli studi condotti in particolare sulle fibre hanno permesso di definire meglio i fabbisogni dei batteri ruminali e prevedere in maniera sempre più accurata le performance produttive degli animali anche attraverso l'uso di modelli dinamici .

Elemento distintivo dei modelli dinamici di razionamento rispetto a quelli statici, è la predizione della degradabilità ruminale (RD) dei glucidi e delle proteine per ottenere una stima della crescita del microbiota e prevedere le quantità di nutrienti *escape* dalle fermentazioni.

I diversi sistemi di razionamento (NRC, CNCPS, NorFor) propongono le proprie equazioni sul tasso di passaggio degli alimenti fuori dal rumine. Questo dato influenza il tempo in cui l'alimento è trattenuto all'interno del rumine e quindi l'attività fermentativa esercitata dai batteri ruminali. Seppur con diversi approcci, gli autori dei diversi sistemi, riconoscono la necessità di aumentare l'accuratezza delle equazioni, soprattutto attraverso l'inclusione di variabili legate alle caratteristiche fisiche delle particelle di alimento.

Lo scopo della tesi è stato quello di studiare alcuni fattori in grado di influenzare la digeribilità della fibra, in particolare la dimensione delle particelle di fibra e il contenuto di uNDF₂₄₀ nei foraggi in razioni destinate all'alimentazione dei ruminanti.

Al termine delle ricerche effettuate è stato fatto un confronto tra la digeribilità osservata e la digeribilità prevista dai modelli di razionamento attualmente più utilizzati per valutare l'accuratezza delle equazioni in essi contenute. In particolare sono stati valutati il sistema CNCPS v.6.5, che conteneva le equazioni di Seo et al., (2006c); il sistema CNCPS v. 6.5.5 con l'introduzione dell'equazione del tasso di passaggio della pdNDF dei foraggi (Eq.8); e il sistema NorFor (2011).

PARTE SPERIMENTALE

1. EFFETTO DI UNA DIETA COMPLETAMENTE PELLETTATA PER MANZE IN ACCRESCIMENTO

PROVE PRELIMINARI

La prova ufficiale è stata preceduta da due prove preliminari che avevano lo scopo di testare l'appetibilità di una dieta completamente pellettata nei grandi ruminanti; è stato valutato inoltre il suo effetto su ingestione, tempi di ruminazione e digeribilità della fibra.

Materiali e metodi Parte 1

Nella prima prova preliminare sono state usate 8 manze gravide, omogenee per età e peso (587 ± 43 kg; 23.2 ± 1.4 mesi). Gli animali sono stati stabulati su cuccette ricoperte di paglia lunga; gli animali hanno sempre avuto libero accesso all'acqua.

Gli ingredienti usati per la formazione del pellet e la sua composizione sono riportate in Tabella 1.

Tabella 1. Ingredienti e composizione chimica del pellet nella prova preliminare.

Composizione del pellet	
INGREDIENTI (%/SS)	
Fieno di primo taglio	37.5
Paglia	26.0
Girasole f.e.	18.0
Mais	14.0
Sale	3.0
Melasso di canna	1.0
Integratore minerale	0.5
COMPOSIZIONE CHIMICA (%/SS)	
Sostanza Secca	92.75
Umidità	7.25
Ceneri	10.53
Proteina greggia	14.80
NDF	58.41
ADF	38.30
ADL	15.69

In queste due prove preliminari i foraggi (fieno di primo taglio e paglia) erano già pellettati al momento della formazione del prodotto, quindi gli alimenti fibrosi avevano già subito un processo di riduzione delle particelle. Il prodotto finale aveva un diametro di 8 mm.

Nel primo periodo gli animali sono stati alimentati con una dieta unifeed (fieno di primo taglio 49%; paglia 33%; colza farina 16%, NaCl 1%; integratore minerale 1%) considerando un'ingestione media di 13 kg capo giorno. Nei due periodo successivi l'unifeed è stato sostituito con una dieta a base di pellet e fieno lungo. Il prodotto pellettato è stato somministrato in associazione a fieno lungo per evitare cambiamenti

bruschi della dieta. Gradualmente il pellet è stato aumentato a discapito del fieno, secondo lo schema riportato in Tabella 2.

Tabella 2. Organizzazione e durata dei periodi della prova preliminare per testare la dieta pellettata: Parte 1.

Parte 1	Pellet (kg/capo/giorno)	Fieno (kg/capo/giorno)
Periodo 1 (14 giorni)	2.3	10.6
Periodo 2 (7 giorni)	12.0	6.0
Periodo 3 (7 giorni)	16.0	2.0

L'alimento è stato somministrato quotidianamente secondo le quantità descritte in tabella 2. Ogni giorno sono stati allontanati e pesati i residui presenti in mangiatoia ed è stata calcolata l'ingestione media di alimento. Ogni animale era dotato di un collare per la rilevazione dei tempi di ruminazione (Ruminact).

Nella Parte 1, alla fine del secondo e del terzo periodo sono state prelevate le feci (ogni 4 ore nell'arco delle 24 ore per ridurre la variabilità giornaliera) di ogni animale per valutare la digeribilità apparente della fibra.

Le feci e il pellet sono stati sottoposti ad analisi chimiche e a fermentazione in vitro per 240 ore. Quest'ultima analisi ha permesso la determinare della quota di uNDF, dato utilizzato come marker per la valutazione della digeribilità degli alimenti.

I dati ottenuti sono stati messi a confronto con quelli del periodo 1 nel quale gli animali hanno assunto la dieta sotto forma di unifeed.

Risultati Parte 1

I risultati della prima parte preliminare (Tabella 3) hanno fatto registrare un aumento dell'ingestione durante la somministrazione del pellet (11.2 vs. 15.9 kg SS/g); tuttavia

non ci sono state differenze di ingestione all'aumentare dell'inclusione di pellet rispetto al fieno lungo, tra il periodo 2 e 3 (15.9 kg SS/g).

Tabella3. Risultati della prova preliminare per testare la dieta pellettata: ingestione di sostanza secca e tempi di ruminazione.

Periodi		1°	2°	3°
Giorni di prova	n.	14	7	7
Fieno lungo	Kg/s.s./g	10.6	6.0	2.0
Fieni/paglia-pellet	Kg/s.s./g	...	7.8	10.3
Mangimi-pellet	Kg/s.s./g	2.3	4.2	5.7
Totale	Kg/s.s./g	11.2	15.9	15.9
Tempo Ruminazione	min/g	594	463	299

Il dato della ruminazione ha fatto registrare un calo repentino al momento dell'inclusione del pellet in razione, sia nel periodo 2 che nel periodo 3 (Grafico 1).

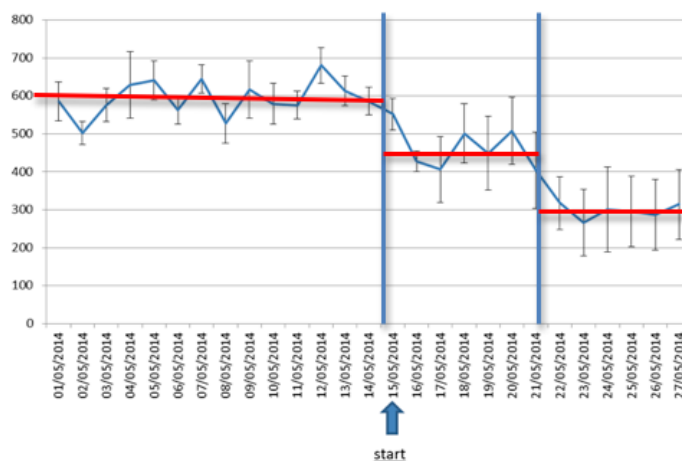


Grafico 1. Tempo medio di ruminazione degli animali coinvolti nella prova preliminare Parte 1 nei tre periodi sperimentali; "Start" corrisponde con l'inizio della somministrazione del pellet nel periodo 2.

I risultati di digeribilità della fibra hanno fatto evidenziare un aumento della quantità di NDF e pd NDF ingerita con la dieta pellettata rispetto alla dieta unifeed. Tuttavia, la quota di pdNDF digerita quando il pellet era incluso nella dieta è risultata inferiore

rispetto al periodo in cui veniva assunto l'unifeed (TTdpdNDF = 80.5, 53.4, 57.0 %pdNDF nel periodo 1, 2, 3, rispettivamente)

Materiali e Metodi Parte 2

Nella seconda prova preliminare (Parte 2) sono state utilizzate 16 manze gravide (18.6 ± 2 mesi d'età); le manze sono state stabulate in box collettivo, su lettiera costituita da paglia pellettata.

La composizione del pellet era la stessa della Parte 1. Il pellet è stato somministrato in associazione al fieno lungo secondo lo schema riportato in tabella 4. In questo caso la quantità di pellet somministrato è aumentata gradualmente fino a costituire l'unica componente della razione. L'obiettivo era quello di valutare l'appetibilità di una razione completamente pellettata in assenza di altri fonti di foraggi lunghi a disposizione, e la risposta dell'animale in termini di tempi di ruminazione. Il tempo di ruminazione è stato scelto come indicatore dello stato di benessere dell'animale e sanità dell'ambiente ruminale (minimo = 300 min/g).

Tabella 4. Organizzazione e durata dei periodi della prova preliminare per testare la dieta pellettata, Parte 2.

Parte 2	Pellet (kg/capo/giorno)	Fieno (kg/capo/giorno)
Periodo 1 (7 giorni)	12.0	6.0
Periodo 2 (7 giorni)	16.0	2.0
Periodo 3 (3 giorni)	18.0	0.0

Risultati Parte 2

In questa seconda parte è stato confermato il calo della ruminazione in risposta all'aumento della quantità di pellet in razione. Al momento della somministrazione di

solo pellet la diminuzione della ruminazione è stata marcata (235 ± 107 min/g; Tabella 5), tanto da decidere di sospenderne la somministrazione. Infatti il 80 % degli animali presentava una ruminazione inferiore ai 300 min/g.

Tabella 5. Risultati della prova preliminare ‘Parte 2’ per testare la dieta pellettata: ingestione di sostanza secca e tempi di ruminazione (Media e Deviazione Standard).

Periodo	Pellet:Fieno, Kg/g	Giorni	Ruminazione, minuti/giorno	D.S.
1	12:6	7	544	53
2	16:2	7	409	85
3	18:0	3	235	107

Discussione

I risultati ottenuti nella parte preliminare hanno evidenziato come una razione completamente pellettata mantenga la sua appetibilità per gli animali, visti gli elevati livelli di ingestione registrati. I tempi di ruminazione hanno subito una diminuzione all'aumento dell'inclusione di pellet, fino a livelli eccessivamente bassi quando la somministrazione di pellet non era accompagnata da fieno lungo. Queste valutazioni hanno permesso di apportare delle modifiche alla produzione del pellet per ottenere un prodotto con una fibra maggiormente strutturata al suo interno. Il diametro del pellet è passato da 0.8 a 10.0 mm e la fonte di fibra è stata inclusa nel pellet a partire da alimenti fibrosi non pellettati ma pre-trinciati.

RICERCA

MATERIALI E METODI

Animali e Trattamenti

Sono state selezionate otto manze uniformi per età (336 ± 30 giorni), peso corporeo (346 ± 35 kg) e sono state suddivise in due gruppi omogenei. Lo studio, della durata di 12 settimane (4 periodi di 3 settimane) è stato organizzato come un cross-over ripetuto. Agli animali è stato lasciato un periodo di adattamento alla dieta e al nuovo ambiente, a cui è seguito un periodo sperimentale di una settimana (settimana sperimentale) dedicate alla raccolta dati e dei campioni stabiliti dal protocollo sperimentale.

La composizione della dieta sperimentale era la stessa, l'unica differenza era legata alle dimensioni delle particelle di fibra (Tabella 1 e 2). Il primo trattamento (**TMR**) è stato preparato come piatto unico (unifeed) con un carro miscelatore orizzontale (Zago 13- m^3 , ZAGO srl, PD, Italia). Il secondo trattamento (**P**) è stato prodotto inizialmente come unifeed, con foraggi (fieno 1T e paglia) trinciati ad una lunghezza teorica di 12-mm, miscelati con gli altri ingredienti (farina di mais, farina di estrazione di girasole, NaCl) e pellettata (8-mm di diametro).

Raccolta dei dati e campionamenti

Per tutta la durata della prova le manze sono state stabulate in posta fissa su cuccette dotate di materasso con uno strato superficiale di segatura per aumentarne la morbidezza. La somministrazione dell'alimento veniva fatta una volta al giorno alle ore 08:30; la quantità di unifeed fornita e il residuo del giorno successive veniva pesato quotidianamente per ogni animale. L'alimento è stato fornito *ad libitum* prendendo

come riferimento l'alimento residuo del giorno precedente che doveva essere almeno il 10% in più rispetto a quanto ingerito. I campioni di alimenti e dei residui sono stati fatti 2 volte alla settimana per effettuare l'analisi chimico-fisica. Ogni posta era dotata di abbeveratoio dotati di contatori, così la quantità di acqua assunta è stata registrata quotidianamente.

I minuti di ruminazione giornalieri sono stati registrati, per ogni manza, con l'ausilio di un collare dotato di sensore acustico che registra il passaggio del bolo lungo l'esofago (RuminAct®, SCR Heatime, Israele).

Il pH e la temperature ruminale sono stati raccolti per tutta la durata della prova usando un bolo ruminale dotato di sensori per la rilevazione di tali parametri (SmaXtech®, Animal Care, Austria), che venivano trasmessi tramite Wi-Fi ad un ricevitore e registrati ogni 10 minuti.

Le manze sono state pesate all'inizio della prova e al termine di ogni periodo sperimentale.

I campioni di feci sono stati raccolti ogni 6 ore il giorno 5 (a partire dalle ore 00:00) e il giorno 6 (a partire dalle ore 03:00) della settimana sperimentale. Gli otto campioni raccolti da ogni manza sono stati uniti a creare un unico campione che fosse rappresentativo delle 24 ore e tenesse conto delle variazioni giornaliere. I campioni raccolti sono stati poi processati ed analizzati chimicamente.

Analisi dei campioni e calcoli effettuati

I campioni di alimenti e feci sono stati essiccati in una stufa ventilata (M700-VF, MPM instrument, Bernareggio, IT) a 65°C per 48 ore per la determinazione della sostanza secca del campione. La dimensione delle particelle di fibra è stata determinate usando un separatore (Ro-Tap®; WS Tyler, Mentor, OH) dotato di 6 diversi setacci con maglie

a diametro decrescente (6.70, 4.75, 3.35, 2.36, 1.18, 0.15 mm) e un fondo per la raccolta della porzione più fine del campione. La frazione trattenuta dal setaccio con maglie di 1.18-mm di diametro o maggiore è stata usata per calcolare il fattore di fibra efficace (pef, physical effective factor) della dieta.

Per poter essere analizzate gli alimenti, le diete e le feci sono state macinate ad 1-mm in un mulino Cyclone (modello SM100; Resch GmbH, Haan, Germany). I campioni di alimento sono stati analizzati per il contenuto di ceneri, determinate in seguito a 4 ore di combustione in muffola a 550°C (Vulcan 3-550, Dentsply Neytech, Burlington, NJ); aNDFom, secondo la metodica indicata ma , con l'aggiunta di sodio solfito; ADF, ADL e CP (AOAC, 1990; metodica 976.06 e 984.13).

È stata valutata la digeribilità in vitro a 24 e 240 ore (IVNDFD24h e IVNDFD240h) usando la metodica Tilley e Terry modificata (Tilley e Terry, 1963; Robertson e Van Soest, 1981). Il liquido ruminale è stato raccolto da due vacche in lattazione, alimentate con una dieta a base di fieno (latte prodotto: 33.2 ± 1.7 kg/d. GIM: 251 ± 2), attraverso la fistola ruminale. Il liquor è stato mescolato e inserito in una bottiglia termoresistente (PYREX, SciLabware, Staffordshire, UK). Una volta in laboratorio è stato filtrato attraverso 4 strati di tela da formaggio sotto un flusso costante di CO₂. In precedenza sono state preparate delle fiasche da 150-ml contenenti 0.5 g di campione macinato e 40 ml di buffer, come descritto da Goering e Van Soest (1970). Le fiasche sono state posizionate in un bagno di acqua calda (39.3°C) sigillate e in condizioni di anaerobiosi, prima dell'inserimento di 10-ml di liquido ruminale. Ogni campione è stato analizzato in tre repliche, in due diverse fermentazioni in vitro. La preparazione dei campioni, le vacche donatrici il liquor ruminale e la loro dieta erano le stesse in entrambe le repliche. Alla fine della fermentazione, il contenuto di ogni beuta è stato analizzato per la determinazione dell'aNDFom nel residuo di fermentazione, poi filtrato attraverso il

fondo di crogiuoli (porosità: 40- μ m). Successivamente I residui sono stati trattati secondo la procedura descritta da Goering e Van Soest, (1970), dopo 3 ore in una stufa ventilata (105°C), è stato registrato il peso a caldo del crogiolo. La determinazione delle ceneri è stata fatta dopo un passaggio in muffola per 3 ore a 495°C, dopodiché è stato registrato nuovamente il peso a caldo del crogiolo.

La digeribilità è stata calcolata come descritto nell'equazione 17:

$$(21) \quad IVNDFD, \% aNDFom = [1 - (aNDFomr - aNDFomb) / aNDFomi] * 100$$

dove $aNDFom_r$ è l' $aNDFom$ residuo, $aNDFom_b$ è la correzione per il campione bianco, e l' $aNDFom_i$ rappresenta l' NDF iniziale. Tutti i dati descritti sono espressi in grammi. L' NDF indigerita ($uNDF$) è stata determinata dopo 240 ore di fermentazione in vitro, e calcolata usando l'equazione 18:

$$(22) \quad uNDF_{240}, \% DM = (100 - IVNDFD_{240h}) * aNDFom / 100$$

dove $aNDFom$ è il contenuto di $aNDFom$ del campione sulla sostanza secca. L' NDF potenzialmente digeribile è stata calcolata come differenza tra $aNDFom$ e $uNDF_{240}$ come percentuale sulla sostanza secca. Infine il calcolo della digeribilità totale della $pdNDF$ è stato fatto come descritto dall'equazione 19:

$$(23) \quad TTdpdNDF, \% pdNDF = 100 - (uNDF_{240} \text{ dieta} / \text{feci}) * (pdNDF \text{ feci} / \text{dieta}) * 100$$

dove $uNDF_{240} \text{dieta} / \text{feci}$ è il rapporto tra l' $uNDF_{240}$ della dieta e delle feci e $pdNDF \text{ feci} / \text{dieta}$ rappresenta il rapporto tra $pdNDF$ delle feci e quella della dieta.

La durata della fermentazione è stata scelta in base a precedenti studi che indicano le 240 ore come tempo per raggiungere la massima digeribilità della fibra in vitro (Fox et al., 2004; Raffrenato e Van Amburgh, 2011; Palmonari et al., 2014, 2016). Durante la fermentazione, il liquido ruminale e il buffer sono stati reinoculati dopo 120 ore per mantenere un'adeguata attività microbica durante l'intero processo, come descritto da (Palmonari et al., 2014). Il volume finale di 100 ml è stato poi analizzato per la determinazione dell'aNDFom come descritto in precedenza.

I dati di ruminazione giornaliera rapportati a diversi parametri (ruminazione/ingestione di sostanza secca, ruminazione/aNDFom ingerita, ruminazione/aNDFom da foraggi ingerita, ruminazione/peNDF ingerita) sono stati usati per fare delle considerazioni sul comportamento alimentare degli animali.

I dati relativi al pH ruminale sono stati usati per determinare il pH medio giornaliero, l'area sotto la curva (l'area tra il pH osservato e una linea all'altezza del pH 5.8 e 5.5), e il tempo (min/g) in cui il pH è rimasto al di sotto di 5.8 e 5.5. Il valore 5.8 e 5.5 sono stati scelti come soglia per la determinazione di una situazione di acidosi subacuta (SARA), o acidosi conclamata, rispettivamente. La durata (min/g) e l'area totale (pH x min, area sotto la curva) in cui il pH era sotto una o entrambe le soglie definite sono state calcolate per definire la presenza e la gravità dell'acidosi. L'area sotto la curva è stata calcolata aggiungendo il valore assoluto della deviazione negativa dal pH 5.5 e 5.8 per ciascun intervallo di 10-min (Dohme et al., 2008).

Il peso vivo (PV) è stato usato per calcolare l'incremento medio giornaliero (IMG) utilizzando la formula riportata di seguito:

$$(\text{peso finale (kg)} - \text{peso iniziale (kg)}) / \text{lunghezza del periodo (g)}$$

il calcolo è stato fatto alla fine di tutti e quattro i periodi.

L'efficienza alimentare è stata calcolata calcolando la quantità di alimento consumato diviso per la differenza di peso tra fine e inizio periodo (indice di conversione alimentare, ICA).

Analisi statistica

I dati raccolti durante la terza settimana di ogni periodo (settimana sperimentale) sono stati analizzati usando il software di statistica JMP-12 (SAS Institute Inc., Cary NC). L'ingestione di sostanza secca (ISS), l'acqua assunta, il tempo di ruminazione, il pH e la temperatura ruminale, e la digeribilità dell'NDF sono stati analizzati con un modello misto a misura ripetute. Il trattamento (T), il periodo (P), il giorno (G) trattamento x periodo (TP), trattamento x giorno (TG) sono stati usati come effetti fissi e le manze (M) come effetto casual. Il modello usato è riportato di seguito:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + D_k + H_l + TP_{ij} + TD_{ik} + e_{ijkl}$$

L'IMG e ICA sono stati analizzati usando un post hoc di Tukey.

I dati sono stati considerati significativi con un valore di $P < 0.01$.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Caratteristiche della dieta, dimensioni delle particelle di fibra e ingestione

Le due diete usate durante l'esperimento erano simili per composizione chimico centesimale (Tabella 6). Il contenuto di proteina (CP % della SS) è risultato più basso rispetto ai fabbisogni stabiliti da NRC (2001) per manze da 300 kg di peso vivo. Va specificato che le diete sono state formulate utilizzando il sistema CNCPS (Higgs et al., 2015; Van Amburgh et al., 2015), per il quale il fabbisogni di ME e MP risultavano

coperti (656.4 grammi/g e 16.1 Mcal/d, rispettivamente, con un livello di ingestione pari a 8.4 kg/g).

Tabella 6. Ingredienti e composizione chimica della dieta pellettata (P) e della dieta unifeed (TMR) somministrata alle manze *ad libitum*; le diete sono state formulate per avere la stessa composizione chimica e diverse caratteristiche fisiche (valutato come fattore di fibra efficace (pef) e NDF fisicamente efficace (peNDF)).

Item	Trattamenti		SEM
	P	TMR	
Ingredienti, % STQ			
Fieno di erba	41.8	41.8	-
Paglia di Orzo	27.4	27.4	-
Farina di Mais	16.4	16.4	-
Farina di semi di girasole	13.7	13.7	-
Sale (NaCl)	0.7	0.7	-
Composizione chimica, % SS			
SS, % stq	92.0	88.0	1.02
Proteina Grezza	8.7	9.0	0.36
Ceneri	9.6	7.9	0.38
aNDFom ¹	58.8	60.2	0.66
ADF	40.7	41.4	0.80
ADL	8.1	8.4	0.42
IVNDFD 24h ²	45.3	46.2	1.50
IVNDFD 240h ²	78.4	77.3	0.73
uNDF ₂₄₀ ³	12.4	14.1	0.61
Amido	15.7	15.6	1.07

¹aNDFom = NDF trattata con alfa-amilasi e sodio-solfito, corretta per il contenuto di ceneri.

²IVNDFD = digeribilità in vitro dell'NDF.

³uNDF₂₄₀ = NDF indigerita, stimata mediante fermentazione in vitro a 240-h.

Le due diete avevano una diversa distribuzione delle particelle di fibra (Tabella 7). La quantità di particelle trattenute dal setaccio da 1.18 mm è stato maggiore nella dieta unifeed rispetto alla dieta pellettata (66.12 % e 20.12%, rispettivamente). Il limite usato per distinguere le particelle più resistenti al passaggio fuori dal rumine e in grado di stimolare la ruminazione è stato di 1.18 mm (Cardoza, 1985; Poppi et al., 1985; Mertens, 2000). La peNDF era rispettivamente 39.78 e 11.82 % della SS nell'unifeed e nella dieta pellettata. Il calcolo della peNDF è importante per determinare la quota di particelle che vengono trattenute nel rumine. Il minimo livello raccomandato di peNDF è di 21 % della SS (Mertens, 2000) definito dall'autore in base a delle precedenti ricerche nelle quali un valore di 19.7% di peNDF era necessario per mantenere un livello di grasso nel latte di frisone a 3.4 %; e che era necessario il 22.3 % di peNDF per mantenere un pH medio nel rumine di 6.0 (Mertens, 1997).

In tal senso i valori di peNDF registrati per la dieta unifeed erano più che sufficienti a garantire una buona attività masticatoria, produzione di saliva e ottimali condizioni nel rumine. Dal momento che lo studio è stato fatto su manze in accrescimento, le osservazioni si sono limitate ai tempi di ruminazione e al pH del rumine.

Tabella 7. Caratteristiche fisiche e distribuzione delle particelle della diete pallet (P) e unifeed (TMR) somministrate a manze *ad libitum*; le diete sono state formulate per avere la stessa composizione chimica ma caratteristiche fisiche differenti (valutate con fattore di fibra efficace e NDF fisicamente efficace).

Item	Trattamenti		SEM	P-value
	P	TMR		
Distribuzione delle particelle, % ¹				
6.70, mm	0	4.86	0.28	<0.01
4.75, mm	0	8.95	0.58	<0.01
3.35, mm	1.19	11.78	0.39	<0.01
2.36, mm	4.29	12.15	0.28	<0.01
1.18, mm	14.62	28.36	0.34	<0.01
0.15, mm	60.66	31.11	0.94	<0.01
Pan	19.23	2.77	0.27	<0.01
Fattore di fibra efficace (pef) ²	20.1	66.1	5.90	<0.01
NDF fisicamente efficace ³ , % of SS	11.8	39.8	3.58	<0.01

¹ La distribuzione delle particelle è stata misurata con il Tyler Ro-Tap (W. S. Tyler, Mentor, OH).

² pef (physical effectiveness factor): determinato come proporzione di fibra trattenuta da un setaccio con fori di 1.18 mm di diametro.

³ NDF fisicamente efficace: calcolata come il prodotto tra il contenuto di NDF della dieta sulla SS e il fattore di fibra efficace.

Un effetto legato al trattamento è stato individuato sul dato di ingestione di sostanza secca (Tabella 8). Le differenze sono state osservate già a tre ore dopo la somministrazione di alimento (2.7 vs. 3.25 kg nel trattamento P e TMR, $P < 0.01$). L'ingestione media giornaliera più elevata è stata registrata durante la somministrazione di pellet (10.80 vs. 8.40 kg; $P < 0.01$). Tale differenza è rimasta significativa (2.88 vs. 2.23 % del PV; $P < 0.01$) anche quando l'ingestione di SS è stata normalizzata per il peso vivo dell'animale. L'ingestione è risultata più elevata rispetto a quanto definito dall'NRC (2001) per manze di 300 kg. Questo rilievo non si trova in linea con quanto

viene riportato in bibliografia, cioè che il ridotto contenuto di proteina della razione può impattare negativamente l'ingestione di alimento (Tedeschi et al., 2000). Questo può in parte compensare il ridotto livello di proteina in razione, in quanto la maggiore ingestione ha permesso comunque il consumo di una quantità di proteina (756 vs. 972 grammi di CP nella dieta TMR e P, rispettivamente) del tutto simile o maggiore rispetto alle raccomandazione NRC (2001).

L'ingestione di acqua (L/d) è stata maggiore per la dieta P (55.0 vs. 45.0 L; $P < 0.01$), ma la differenza si annulla quando rapportata all'ingestione di sostanza secca. Questo suggerisce che l'assunzione di acqua è correlata con l'ingestione di sostanza secca piuttosto che con le caratteristiche fisiche della razione.

L'ingestione di aNDFom (kg/g e % PV) è stata più alta nel trattamento P rispetto a quello TMR (6.34 vs. 5.03 kg/g, 1.70 vs. 1.35 % PV; $P < 0.01$); lo stesso per l'ingestione di uNDF (kg/g e % PV; 1.33 vs. 1.18 kg/g, 0.36 vs. 0.32 % PV; $P < 0.01$).

L'ingestione di peNDF è stata più elevata per la dieta TMR (3.45 vs. 1.21 kg/g e 0.92 vs. 0.32 % PV; $P < 0.01$). I risultati del presente studio confermano che un aumento della dimensione delle particelle di fibra ha un effetto negativo sull'ingestione di sostanza secca, come definito in altre ricerche (Allen, 2000; Kononoff et al., 2003; Kammes e Allen, 2012). La riduzione della dimensione delle particelle di fibra potrebbe essere considerata una strategia per limitare l'effetto riempimento nel rumine-reticolo qualora la composizione della fibra fosse un limite al raggiungimento di un'adeguata ingestione per coprire i fabbisogni di energia (Montgomery e Baumgardt, 1965).

Il rapporto tra ingestione di uNDF_{240h} e PV (0.36 vs. 0.32 % PV nella dieta P e TMR, rispettivamente) era simile ai valori riportati da altri autori (Cotanch et al., 2014). In quello studio, condotto con vacche in lattazione, il rapporto era 0.36 per diete a base di fieno di graminacee e 0.48 per diete contenenti fieno di medica. Basandosi su questi dati

è possibile ipotizzare un fabbisogno minimo di uNDF_{240h} per garantire salute e funzionalità del ruminante.

Tabella 8. Risultati di ingestione delle manze (media giornaliera) alimentate ad libitum con dieta sotto forma di pellet (P) o unifeed (TMR)

Item	Trattamenti		SEM	P-value
	P	TMR		
SS Ingerita				
Dopo 3h, kg/g	2.70	3.25	0.439	<0.01
Dopo 24h, kg/g	10.80	8.40	0.451	<0.01
% del PV	2.88	2.23	0.100	<0.01
Ingestione aNDFom¹				
kg/g	6.34	5.03	0.267	<0.01
% del PV	1.69	1.34	0.059	<0.01
Ingestione uNDF₂₄₀²				
kg /g	1.33	1.18	0.059	<0.01
% del PV	0.36	0.32	0.013	<0.01
Ingestione peNDF³				
kg /g	1.21	3.45	0.118	<0.01
% del PV	0.32	0.92	0.024	<0.01
Ingestione di Acqua				
L/g	55.00	45.00	3.229	<0.01
L/kg di SSI	5.01	5.13	0.245	0.31

¹aNDFom = NDF trattata con alfa-amilasi e sodio-solfito, corretta per il contenuto di ceneri.

²uNDF₂₄₀ = NDF indigerita, stimata mediante fermentazione in vitro a 240-h.

³ NDF fisicamente efficace: calcolata come il prodotto tra il contenuto di NDF della dieta sulla SS e il fattore di fibra efficace.

Performance degli animali

L'incremento medio giornaliero (IMG) era simile nei due trattamenti (1.1 vs. 1.0 kg nella dieta P e TMR, rispettivamente; $P = 0.94$); considerato normale per la razza, età,

sesso e taglia degli animali usati nello studio, anche se riferito ad un periodo di tempo limitato. Il valore ottimale di IMG per manze in accrescimento è di 0.8 kg/g (NRC, 2001); valori più alti sono associati con ritardi dell'età al concepimento e al primo parto. Al contrario, altri autori (Gardner et al., 1977) riportano che elevati IMG (1.1 kg/g) non sono associati a problemi riproduttivi, ma ad una riduzione di produzione, principalmente in prima lattazione. Ancora, altri studi descrivono invece l'assenza di effetti negativi sulla produzione di latte per IMG di 0.9-1 kg/g (Van Amburgh et al., 1998).

L'indice di conversione alimentare (ICA) era simile nei due trattamenti (11.0 vs. 10.6 kg nella dieta P e TMR, rispettivamente; $P = 0.33$).

Tempi di Ruminazione e pH Ruminale

I tempi di ruminazione e le caratteristiche dell'ambiente ruminale sono riportati in Tabella 9. Le manze, durante la somministrazione della dieta P e TMR, ruminavano rispettivamente 241 e 507 min/g ($P < 0.01$). I tempi di ruminazione sono diminuiti durante la somministrazione del pellet (-52%), come atteso dalla ridotta dimensione della fibra. Questo effetto sulla ruminazione è stato osservato anche quando correlato con l'ingestione di SS, aNDFom, aNDFom da foraggi (23.3 vs. 58.5 min/kg; 41.0 vs. 94.0 min/kg; 23.0 vs. 58.5 min/kg in P e TMR rispettivamente; $P < 0.01$). il tempo di ruminazione è un parametro strettamente correlato con le caratteristiche fisiche e chimiche della dieta (Grant et al., 1990). In questo studio la differenza del tempo di ruminazione può essere collegata con la differenza in pef (physical effectiveness factor) delle diete (20.12 e 66.12 % per P e TMR, rispettivamente). Questa correlazione è stata riportata anche in altri studi (Woodford e Murphy, 1988; Mertens, 2000; Krause et al., 2002). Altri autori (Teimouri Yansari et al., 2004) hanno evidenziato un effetto diretto

della riduzione delle particelle di fibra su masticazione, tempi di ruminazione, e pH ruminale; tuttavia, tale studio è stato condotto in vacche in lattazione alimentate con una dieta a base di medica. Nel presente studio la riduzione dei tempi di ruminazione non ha avuto effetto sul pH ruminale. I valori registrati sono stati simile tra i due trattamenti (6.10 vs. 6.11 in P e TMR, rispettivamente; $P = 0.79$). come riscontrato da altri autori, questo effetto può essere legato alla composizione della razione, povera di amido, ricca di fibra e con un livello adeguato di uNDF (Yang e Beauchemin, 2007; Cotanch et al., 2014).

Tabella 9. Tempi di ruminazione e condizioni del rumine delle manze (media giornaliera) alimentate ad libitum con dieta sotto forma di pellet (P) o unifeed (TMR).

	Trattamenti		SEM	P-value
	P	TMR		
Ruminazione				
Tempo, min/g	241.00	507.00	17.20	<0.01
Tempo/ISS al giorno, min/kg	23.30	58.50	1.86	<0.01
Tempo/ingestione di NDF, min/kg	41.00	94.00	1.56	<0.01
Tempo/ingestione di NDF da foraggi, min/kg	23.00	58.50	0.96	<0.01
Condizioni del rumine¹				
pH medio del rumine	6.10	6.11	0.07	0.79
Temperatura media del rumine, °C	38.87	38.84	0.07	0.34
Tempo con pH < 5.8, min/g	188.00	176.00	124.90	0.33
Tempo con pH < 5.5, min/d	3.40	4.60	5.58	0.67
Area sotto pH 5.8, minx unità pH /g	24.40	22.80	15.60	0.51
Area sotto pH 5.5, minx unità pH /g	0.21	0.31	0.34	0.59

¹ valori di pH considerati in riferimento a Kleen et al., (2003).

La fibra corta, così come una ridotta ruminazione e produzione di saliva, sono solitamente associate con problemi metabolici come la comparsa di acidosi ruminale sub-acuta (SARA). La sua definizione si basa sui valori di pH del liquido ruminale

(Plaizier et al., 2008). Per il nostro studio sono state identificate due diverse soglie di pH non ottimale: $\text{pH} < 5.8$ come indice di alterazione e depressione dei batteri fibrolitici (inizio di SARA), e $\text{pH} < 5.5$ come limite per definire la presenza di SARA, come stabilito da Kleen et al., (2003). Nel nostro studio, il valore medio di pH (registrato ogni 10 minuti) è stato > 6.0 per tutte le settimane sperimentali. Inoltre, i valori di pH espressi come minuti sotto la soglia critica di pH (5.5 e 5.8) o come area sotto la curva, non hanno evidenziato nessuna differenza significativa tra i due trattamenti e non hanno indicato nessun rischio di SARA, definita come molto probabile quando il pH ruminale rimane al di sotto della soglia 5.5 per almeno 180 min/g (Kleen et al., 2003; Plaizier et al., 2008).

Digeribilità dell’NDF

I dati riportati in Tabella 10 riportano le analisi chimiche delle feci e i relativi calcoli della digeribilità della fibra nel tratto gastrointestinale.

La composizione chimica delle feci nei due trattamenti mostra dati simili di aNDFom, ADF e ADL; tuttavia, l’uNDF_{240h} contenuta nelle feci era maggiore nel trattamento TMR rispetto al P (52.12 vs. 47.38 % SS; $P < 0.01$). Di conseguenza il contenuto di pdNDF era più basso con la dieta TMR rispetto alla P (17.14 vs. 22.18 % SS; $P < 0.01$).

La digeribilità in vitro dell’NDF (**IVNDFD**) è stata valutata a due diversi tempi (24h e 240h). La IVNDND24h si è mantenuta simile nei due trattamenti (11.41 vs. 10.70 % di aNDFom in P e TMR, rispettivamente; $P = 0.51$), mentre la IVNDFD240h era più elevata durante la somministrazione della dieta pellettata rispetto alla dieta TMR (31.82 vs. 24.72 % di aNDFom; $P < 0.01$). Se consideriamo la IVNDFD24h come la frazione di aNDFom rapidamente degradabile, la differenza riscontrata per il dato di IVNDFD240h ipoteticamente, potrebbe essere associata alla frazione di fibra

lentamente degradabile. Date queste premesse, i risultati ottenuti suggeriscono che la dimensione delle particelle di fibra ha influenzato la digeribilità della porzione di aNDFom lentamente degradabile, mentre non ha avuto alcun effetto sulla frazione rapidamente degradata.

La porzione lentamente degradabile contenuta nelle feci rappresenta il materiale fibroso che non è stato digerito nel tratto gastro-intestinale. Dal momento che questa frazione era più bassa con il trattamento TMR, ci si aspetterebbe una maggiore digeribilità totale; infatti, la digeribilità lungo tutto il tratto gastro-intestinale della aNDFom potenzialmente degradabile (TTdpdNDF) è stato più elevato per il trattamento TMR rispetto al pellet (90.25 vs. 86.82 % di pdNDF, $P < 0.01$). Le osservazioni ottenute da questo studio sono in linea con lo studio di Kammes e Allen, (2012), nel quale gli animali erano alimentati con una dieta a base di foraggi trinciati a due diverse lunghezze (19 vs. 10 mm). Nel loro studio il calcolo della TTdpdNDF è risultato 90.6 e 88.7 % per la dieta con fibra lunga e corta, rispettivamente, anche se non sono state osservate differenze significative. Nel presente studio, la tecnica di produzione del pellet può avere avuto un effetto sulla struttura delle particelle di fibra e sulla loro densità, determinando un aumento del loro tasso di passaggio.

Tabella 10. Composizione chimica delle feci e digeribilità della fibra di manze alimentate, ad libitum, con dieta sotto forma di pellet (P) o unifeed (TMR).

Item	Trattamenti		SEM	P-value
	P	TMR		
Composizione chimica ¹ , % della SS				
aNDFom	69.59	69.21	0.397	0.26
ADF	57.13	54.94	0.454	0.24
ADL	26.82	27.88	0.707	0.26
uNDF ₂₄₀	47.38	52.12	0.748	<0.01
pdNDF	22.18	17.14	0.817	<0.01
Digeribilità dell’NDF, % della aNDFom				
IVNDFD 24h ²	11.41	10.70	0.724	0.51
IVNDFD 240h ²	31.82	24.72	1.128	<0.01
TTdpdNDF ³ , % of pdNDF	86.82	90.25	0.652	<0.01

¹aNDFom = NDF trattata con alfa-amilasi e sodio-solfito, corretta per il contenuto di ceneri, uNDF₂₄₀ = NDF indigerita, stimata mediante fermentazione in vitro a 240-h, pdNDF = NDF potenzialmente degradabile.

²IVNDFD = digeribilità in vitro dell’NDF.

³TTdpdNDF = digeribilità dell’NDF potenzialmente degradabile in tutto il tratto digestivo.

Le dimensioni delle particelle di fibra influenzano diversi aspetti della funzionalità ruminali e della cinetica di digestione. Il tasso di passaggio delle particelle di alimento è collegata alla loro dimensione e densità. La relazione, dinamica, tra questi due fattori definisce il loro passaggio nel sacco ventrale e la loro conseguente uscita dal rumine (Sutherland, 1988). Per come è stato organizzato lo studio, la dimensione delle fibra era maggiore nella dieta TMR. Questa differenza di dimensioni può aver determinato un aumento del tempo di ritenzione nel rumine, e di conseguenza un aumento dell’esposizione all’attività fermentativa (Sejrsen et al., 2006). Mentre le particelle più piccole della dieta pellettata potrebbero aver teoricamente aumentato la superficie di

esposizione all'attacco batterico, e quindi alla loro attività degradativa, ma la stessa dimensione ridotta delle particelle può aver aumentato il tasso di passaggio fuori dal rumine, limitandone il potenziale di degradazione (Kaske et al., 1992; Lammers et al., 1996).

2. EFFETTO DEL CONTENUTO DI uNDF DEL FIENO DI MEDICA SUL COMPORTAMENTO ALIMENTARE, DIGERIBILITÀ DELLA FIBRA E PERFORMANCE PRODUTTIVE DI VACCHE IN LATTAZIONE.

MATERIALI E METODI

Animali e disegno sperimentale

Sono state selezionate otto vacche in lattazione di razza frisona (n. parti = 3.36 ± 0.92 , 101 ± 38 giorni in mungitura e 662 ± 42 kg PV) e sono state raggruppate per numero di parti, produzione di latte, e giorni in mungitura per creare 4 gruppi omogenei. Il disegno sperimentale adottato è stato un quadrato latino 4 x 4 con periodi della durata di 21 giorni: 14 giorni di adattamento e 7 giorni per la raccolta dei dati sperimentali. Le razioni sono state formulate seguendo gli standard normalmente utilizzati nella zona di produzione del Parmigiano Reggiano, usando soltanto foraggi essiccati (Tabella 11; Mordenti et al., 2015). Le diete sono state create utilizzando NDS Professional (R.U.M.& N Sas, Reggio Emilia), un programma che utilizza le equazioni del Cornell Net Carbohydrate e Protein System (CNCPS v.6.5; Van Amburgh et al., 2015). I foraggi inclusi nella razione sono stati finemente trinciati per evitare che gli animali potessero selezionare l'alimento. La lunghezza delle particelle di foraggio era inferiore ai 2 cm.

Tabella 11. Composizione chimica dei foraggi inclusi nelle diete

Item	Medica Fieno Alta Digeribilità (HD)	Medica Fieno Bassa Digeribilità (LD)	Paglia di Frumento
DM	92.7	91.9	91.5
CP, % della SS	20.5	18.5	4.6
aNDFom ¹ , % della SS	36.7	44.5	72.0
ADF, % della SS	30.1	36.1	49.2
ADL, % della SS	7.1	7.5	9.7
IVNDFD ² 24h, % di NDF	40.2	31.2	34.9
uNDF ₂₄₀ , ³ % della SS	15.7	18.5	32.3
uNDF ₂₄₀ ³ / ADL	2.21	2.47	3.33

¹aNDFom = NDF trattata con alfa-amilasi e sodio-solfito, corretta per il contenuto di ceneri.

²IVNDFD = digeribilità in vitro dell'NDF % di aNDFom.

³uNDF₂₄₀ = NDF indigerita, stimata mediante fermentazione in vitro a 240-h.

Le quattro diete sperimentali erano bilanciate per il contenuto in amido e proteina (CP), mentre differivano per il tipo di foraggio incluso e per il contenuto in uNDF₂₄₀ (Tabella 12).

I trattamenti creati sono stati definiti come:

- elevato contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica ad elevata digeribilità (Hu-HD);
- basso contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica ad elevata digeribilità (Lu-HD);
- elevato contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica a bassa digeribilità (Hu-LD);
- basso contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica a bassa digeribilità (Lu-LD).

Tabella 12. Ingredienti e composizione chimica delle diete sperimentali.

Item, % della SS	Trattamenti ^a			
	Hu-HD	Lu-HD	Hu-LD	Lu-LD
Medica fieno (HD)	46.8	36.8	---	---
Medica fieno (LD)	---	---	38.8	30.1
Frumento paglia	8.6	8.6	8.6	8.6
Mais granella mix ¹	35.3	35.3	35.3	35.3
Soia Buccette	4.0	11.0	8.0	15.4
Soia farina di estrazione, 44% PG	3.0	6.0	7.0	8.3
Melasso canna-barbabietola	0.5	0.5	0.5	0.5
Minerli e vitamine premix ²	1.8	1.8	1.8	1.8
Foraggi, % della SS	55.4	45.4	47.4	38.7
Composizione chimica, % della SS				
PG	14.3	14.2	14.5	14.9
aNDFom ³	31.7	32.3	34.4	35.2
Amido	23.1	22.6	22.7	22.9
Zuccheri	5.9	5.3	5.2	4.6
Ceneri	6.8	6.6	6.4	6.4
Ca	0.96	0.98	0.97	0.97
P	0.48	0.47	0.47	0.48
uNDF ₂₄₀ ⁴ , % di aNDFom	35.2	29.1	32.0	27.0
uNDF ₂₄₀ % della SS	10.8	9.4	11.0	9.5
IVNDFD ⁵ 24h, % di aNDFom	46.2	48.9	43.8	44.6
Dimensione particelle % stq				
>19 mm	0.7	0.4	0.3	0.2
19-8 mm	16.8	13.5	12.5	9.7
8-1.18 mm	41.3	39.4	36.1	34.2
Pan	41.2	46.8	51.2	55.9
peNDF ⁶	12.9	12.8	11.6	11.2

¹Mais granella mix: 50% farina fine, 50% fiocchi.

²Miscela di minerali e vitamine: 4.4% Ca, 2.3% P, 6 % Na, 2.5 % Mg, 130 mg/Kg di Zn, 120 mg/Kg di Mn, 10 mg/Kg di Cu, 5 mg/Kg I, 0.15 mg/Kg di Se, 1 mg/Kg di Co, 40000 IU/Kg di vitamina A, 4000 IU/Kg di vitamina D3, e 40 mg/Kg di vitamina E.

³aNDFom = NDF trattata con alfa-amilasi e sodio-solfito, corretta per il contenuto di ceneri.

⁴uNDF₂₄₀ = NDF indigerita, stimata mediante fermentazione in vitro a 240-h.

⁵IVNDFD = digeribilità in vitro dell'NDF % di aNDFom.

⁶peNDF = NDF fisicamente efficace: calcolata come il prodotto tra il contenuto di NDF della dieta sulla SS e il fattore di fibra efficace (Mertens, 1997).

Il fieno di medica era il foraggio maggiormente rappresentativo in razione. Le differenze per quanto riguarda la frazione fibrosa sono state bilanciate mediante l'utilizzo di buccette di soia, caratterizzate da un ridotto contenuto di uNDF₂₄₀ e sono una buona fonte di fibra che permette di modulare il contenuto di uNDF₂₄₀ minimizzando l'effetto sugli altri componenti della razione.

Le vacche sono state stabulate in posta fissa dotata di mangiatoie individuali. L'unifeed veniva preparato (carro miscelatore Zago; PD) e somministrato una volta al giorno (0800 h) per garantire un'ingestione *ad libitum* (1.08 x ingestione prevista). Le vacche venivano munte due volte al giorno (0080 e 1900 h) in una sala di mungitura 5 + 5 e si allontanavano dalla mangiatoia per un periodo <30 min/mungitura. La quantità di alimento somministrato e il residuo è stato pesato quotidianamente per ogni animale.

L'acqua era a disposizione dell'animale a volontà e il consumo è stato registrato quotidianamente.

Il peso dell'animale è stato registrato due volte al giorno dopo la mungitura (bilancia Afiweight, Afikim, Israele). L'ingestione di sostanza secca è stata determinata registrando il peso dell'alimento che veniva fornito e quello residuo durante tutti i periodi sperimentali. I campioni di alimento e i residui sono stati campionati quotidianamente e un sotto-campione veniva essiccato in stufa a 105 °C per 24 h per la

determinazione della sostanza secca. La produzione di latte è stata registrata ogni giorno (Afimilk Information Management System; Afikim, Israel). Il latte di ogni vacca è stato campionato per tre mungiture consecutive nei giorni 17 e 18 di ogni periodo, è stato conservato (Bronolab-W II Liquido di conservazione; D & F Control Systems, Inc., Dublin, CA), e in seguito analizzati per grasso, proteine vere e lattosio con metodica infrarossi (Associazione Provinciale Allevatori Bologna; Foss 4000; Foss Technology). L'efficienza alimentare (kg/kg) è stata calcolata come latte/ISS, 3.5% FCM/ISS, latte corretto per i solidi/ISS dal giorno 15 al giorno 21 di ogni periodo.

Il tempo di ruminazione è stato misurato utilizzando Hi-Tag rumination monitoring system (SCR Engineers Ltd., Netanya, Israel). Il software associato ai collari della ruminazione (Data Flow Software, SCR Engineers Ltd.) analizza il tempo di ruminazione come minuti in 2 ore con una risoluzione di 2 minuti (Schirmann et al., 2009), e calcola i tempi di ruminazione nelle ultime 24 ore. Inoltre, a tutte le vacche è stato misurato il pH del liquor ruminale tramite l'applicazione di un bolo wireless nel rumine reticolo (SmaXtec Animal Care Sales GmbH, Graz, Austria) il cui uso è stato validato in vacche in lattazione (Klevenhusen et al., 2014). I boli (3.5 cm di diametro, 12 cm di lunghezza e 210 g di peso) sono stati inseriti manualmente attraverso l'esofago il giorno 14 del primo periodo sperimentale. In precedenza i boli sono stati calibrati con un buffer a pH 7 usando le istruzioni fornite dalla ditta produttrice. Il bolo è in grado di misurare temperatura e pH ogni 10 min e di trasmettere i dati in tempo reale ad una stazione di base usando una banda ISM (433 MHz). Due antenne posizionate all'interno della stalla e in sala di mungitura erano in grado di registrare i segnali inviati dal bolo. I dati di pH sono stati raccolti e stoccati in un software fino al termine dell'esperimento. I dati di pH raccolti nei giorni dal 15 al 21 di ogni periodo sono stati usati per calcolare il

pH medio (min/g) e i minuti al giorno in cui il pH è rimasto sotto a due livelli soglia (5.5 e 5.8).

Gli ingredienti della razione sono stati analizzati e stoccati all'inizio della prova in quantità tali da garantire la presenza di alimento sufficiente a soddisfare i fabbisogni degli animali per l'intera prova, così da ridurre al minimo la variabilità della dieta. Durante la settimana sperimentale di ogni periodo, le diete sono state campionate ogni giorno e analizzate per valutarne la composizione chimica secondo le seguenti metodiche: PG, aNDFom e ADF secondo la metodica definita da Mertens (2002) e il metodo 973.18 AOAC. L'amido è stato determinato usando il metodo ufficiale AOAC (AOAC 996.11), mentre per i grassi è stata utilizzata la metodica 920.390020 AOAC.

I campioni di feci (500 g) sono stati fatti ogni 15 ore, dal giorno 11 al giorno 15 di ogni periodo sperimentale così da ottenere 8 campioni per ogni vacca per ogni periodo, rappresentativi delle 24 ore. I campioni sono stati stoccati a -20°C. I campioni di unifeed, sul tal quale, sono stati usati per determinare la distribuzione delle particelle di alimento con il Penn State Particle Separator (PSPS; Lammers et al., 1996) e il fattore di fibra efficace (physical effectiveness factor, pef) mediante l'uso del separatore Ro-Tap (W.S. Tyler, Mentor, OH). Successivamente è stata calcolata l'NDF fisicamente efficace (physical effective NDF, peNDF) moltiplicando il fattore pef per il contenuto di NDF in % sulla SS (Mertens, 1997). La digeribilità in vitro (24 e 240 ore) dell'aNDFom dei foraggi e dei campioni di unifeed preventivamente macinati (1 mm; Wiley mill; Artur H. Thomas, Philadelphia, PA) è stata determinata utilizzando una fermentazione in vitro (sistema Tilley e Terry) in un buffer contenente liquido ruminale (Goering e Van Soest, 1970).

Digeribilità della fibra

Gli ingredienti e le diete sono state analizzate per determinare la digeribilità in vitro a 24 e 240 ore in accordo con le procedure descritte da Palmonari et al., (2016). In seguito la digeribilità è stata calcolata come:

$$(21) \quad \text{IVNDFD, \% aNDFom} = [1 - (\text{aNDFom}_r - \text{aNDFom}_b) / \text{aNDFom}_i] * 100$$

dove aNDFom_r è l'aNDFom residuo, aNDFom_b è il campione bianco, e aNDFom_i il contenuto di aNDFom iniziale. Tutti i termini descritti sono stati espressi in grammi. La aNDFom indigeribile è stata determinata dopo 240 ore di fermentazione in vitro e calcolata come:

$$(22) \quad \text{uNDF}_{240, \% \text{DM}} = (100 - \text{IVNDFD}_{240\text{h}}) * \text{aNDFom} / 100$$

dove aNDFom è la aNDFom contenuta nel campione (% sulla SS), e IVNDFD_{240h} è la digeribilità in vitro a 240 ore della frazione aNDFom.

Per la fermentazione a 240 ore il buffer e il liquido ruminale sono stati re-inoculati dopo 120 h per mantenere attiva l'attività microbica durante l'intero processo, come descritto da Palmonari et al., (2014).

La digeribilità della pdNDF lungo tutto il tratto digerente è stata calcolata secondo Ferraretto et al., (2015).

In breve, la uNDF_{240} è stata usata come marker interno e ha permesso di calcolare la digeribilità come:

$$(23) \quad \text{TTdpNDF, \% pdNDF} = 100 - (\text{uNDF}_{240} \text{ dieta} / \text{feci}) * (\text{pdNDF feci} / \text{dieta}) * 100$$

dove, sia pdNDF che uNDF₂₄₀ sono espresse in % sulla SS.

ANALISI STATISTICA

I dati di ingestione, consumo d'acqua, quantità e qualità del latte prodotto, efficienza alimentare e peso vivo sono stati analizzati utilizzando un mixed model a misure ripetute con SAS (versione 9.1, Statistical Analysis System, Institute Inc., Cary, NC). Sono stati considerati i dati giornalieri (ISS e latte prodotto, ecc.) raccolti durante la settimana sperimentale. Il trattamento il periodo e i giorni sono stati considerati come effetti fissi, mentre gli animali come effetto random. Per i valori risultati significativi al *F*-Test ($P \leq 0.05$) le differenze sono state analizzate con un test di Tukey's.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I quattro trattamenti sono stati formulati per avere due diversi contenuti di uNDF₂₄₀ in razione (10.8 e 11.0 % della SS per le diete Hu e 9.5 e 9.4 % della SS nelle diete Lu); ciò è stato possibile utilizzando due fieni di medica diversi per NDFD e uNDF₂₄₀. I due fieni di medica erano diversi per il contenuto di IVNDFD24h (40.2 e 31.2 % aNDFom, per HD e LD, rispettivamente), di uNDF₂₄₀ (15.7 e 18.5 % della SS, per HD e LD) e di aNDFom totale (36.7 e 44.5 % della SS per HD e LD, rispettivamente; Tabella 11).

Le diete che contenevano medica HD hanno avuto una IVNDFD24h di 46.2% e 48.9% dell'aNDFom (HD-Hu e HD-Lu, rispettivamente). Com'era atteso, le diete LD hanno fatto registrare una IVNDFD24h inferiore (43.8 e 44.6% aNDFom per LD-Hu e LD-Lu, rispettivamente; Tabella 12). Il rapporto uNDF₂₄₀:ADL tra i diversi fieni di medica è stato simile a quanto osservato in studi precedenti (Palmonari et al., 2014) con simili condizioni di accrescimento.

Tutte le diete avevano una ridotta dimensione delle particelle di fibra (Tabella 12). Ciò ha permesso di ridurre al minimo la selezione da parte degli animali, nonostante siano stati usati foraggi secchi (Fustini et al., 2016). È tipico per queste razioni che meno dell'1 % delle particelle sia superiore a 19 mm e che una maggior % sia trattenuta dagli altri setacci intermedi (8 – 1.18 mm) o finisca sul fondo. La peNDF della dieta è stata 12.9, 12.8, 11.6 e 11.2% della SS per il trattamento HD-Hu, HD-Lu, LD-Hu e LD-Lu, rispettivamente. Questi valori sono più bassi rispetto a quello raccomandato da Mertens (21.0% della SS; 1997). In un precedente studio Fustini et al., (2010) hanno dimostrato che in una razione tipica della regione del Parmigiano Reggiano, l'inclusione di paglia può mantenere a livelli accettabili il tempo di ruminazione ed il pH anche con bassi valori di peNDF. Per questo motivo tutte le razioni includevano l'8.6% di paglia (sulla SS). Il calcolo della peNDF moltiplicando l'NDF della dieta per la percentuale di particelle di dimensioni superiori a 1.18 mm (determinate tramite Ro-Tap) sottostima il valori di peNDF in razioni che contengono paglia (Fustini et al., 2011). Ne consegue che la paglia, pur facendo rilevare un basso valore di peNDF, può mantenere comunque un potenziale di stimolare la masticazione, per kg di NDF, superiore ad altri foraggi della stessa dimensione. La composizione della dieta in termini di PG, NDF, amido e minerali sono state in linea con le razioni teoriche (Tabella 12).

L'ingestione di sostanza secca è riportata in Tabella 13. La medica più digeribile ha permesso una maggiore ingestione, indipendentemente dal rapporto foraggi concentrati della dieta (29.7, 29.2, 24.5 e 24.5 kg/g, $P < 0.01$, per HD-Hu, HD-Lu, LD-Hu e LD-Lu, rispettivamente). L'ingestione di SS è aumentata di 0.61 kg per ogni punto in più di IVNDFD24h della medica. Una possibile spiegazione può essere legato al principale foraggio utilizzato in questo studio. Come definito da (Allen, 2000), l'effetto riempimento delle leguminose è solitamente inferiore rispetto alle graminacee

indipendentemente dalla digeribilità della fibra. Questa differenza è legata alla più rapida digeribilità della fibra e alla maggior fragilità delle particelle che caratterizzano le leguminose; ciò riduce il tempo di ritenzione nel rumine e permette una maggiore ingestione di alimento (Huhtanen et al., 2007; Mertens, 2007; Kammes e Allen, 2012).

Come per l'ingestione di SS, l'assunzione di acqua è stata influenzata dalla digeribilità della fibra ed è stata maggiore con livelli più alti di digeribilità dell'NDF ($P < 0.01$). Questa differenza è stata osservata quando il consumo di acqua è stato messo in relazione con l'ingestione di SS, suggerendo un effetto simile legato all'ingestione anche con diete diverse (Tabella 13).

Tabella 13. Effetto della digeribilità dei foraggi e del contenuto di NDF indigeribile nella dieta sull'ingestione di alimento e acqua.

Ingestione Giornaliera	Trattamenti ^a				SEM	P value		
	Hu-HD	Lu-HD	Hu-LD	Lu-LD		HD vs. LD	Hu vs. Lu	I ¹
Sostanza secca, kg/g	29.7	29.2	24.5	24.5	0.4	<0.01	0.89	0.99
Sostanza secca, % PV	4.42	4.27	3.68	3.67	0.05	<0.01	0.71	0.47
aNDFom ² , kg/g	9.39	9.81	8.77	9.07	0.17	<0.05	0.51	0.86
aNDFom ² , % PV	1.36	1.38	1.26	1.29	0.02	<0.05	0.45	0.96
uNDF ₂₄ ³ , kg/g	5.05	5.01	4.93	5.02	0.09	0.79	0.90	0.79
uNDF ₂₄ ³ , % PV	0.75	0.73	0.74	0.75	0.01	0.81	0.93	0.85
uNDF ₂₄₀ ⁴ , kg/g	3.21	2.74	2.70	2.33	0.04	<0.01	<0.01	0.79
uNDF ₂₄₀ ⁴ , % PV	0.48	0.40	0.40	0.35	0.01	<0.01	<0.01	0.46
Acqua, L/g	169	173	164	163	2	<0.01	0.64	0.52
Acqua, L/kg ISS	5.8	6.0	6.7	6.7	0.1	0.10	0.58	0.74

^a Hu-HD = elevato contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica ad elevata digeribilità; Lu-HD = basso contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica ad elevata digeribilità; Hu-LD = elevato contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica a bassa digeribilità; Lu-LD = basso contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica a bassa digeribilità.

¹ I = effetto dell'interazione tra i trattamenti.

² aNDFom = NDF trattata con alfa-amilasi e sodio-solfito, corretta per il contenuto di ceneri.

³ uNDF₂₄ = NDF indigerita, stimata mediante fermentazione in vitro a 24-h.

⁴ uNDF₂₄₀ = NDF indigerita, stimata mediante fermentazione in vitro a 240-h.

L'ingestione giornaliera di $uNDF_{240}$ è stata influenzata sia dalla digeribilità dal livello di inclusione dei foraggi ($P < 0.01$), e il valore più elevato è stato osservato per il trattamento HD-Hu. La digeribilità dei foraggi (HD vs LD) ha influenzato anche l'ingestione di $aNDF_{om}$ ($P < 0.01$). la frazione di $aNDF_{om}$ digerita in vitro a 24 ore corrisponde alla frazione di fibra rapidamente digerita. Determinando la $IVNDFD_{24h}$ è possibile misurare la fibra indigerita dopo 24 ore di fermentazione ($uNDF_{24}$). I quattro trattamenti hanno avuto lo stesso livello di ingestione per quella frazione, espressa come quantità o come percentuale del PV (Tabella 13). La porzione di $aNDF_{om}$ che è rapidamente digerita nel rumine esercita un effetto riempimento molto inferiore rispetto alla frazione lentamente degradabile o indegradabile. Come suggerito da Huhtanen et al., (2016), la fibra è trattenuta nel rumine fintanto che la porzione potenzialmente degradabile è attivamente fermentata. Quando il rapporto $pdNDF:iNDF$ raggiunge il punto critico, le particelle hanno una maggiore probabilità di lasciare il rumine per un aumento del loro peso specifico e della densità. Questa dinamica particolare dei processi digestivi può spiegare i risultati di questo studio. Infatti, l'ingestione di SS non è stata limitata solo dal contenuto di $uNDF_{240}$, ma dalla combinazione tra $uNDF_{240}$ e la quantità di fibra lentamente e rapidamente degradata che insieme vanno ad influenzare il rapporto $pdNDF:iNDF$ nel rumine. Questo effetto può essere maggiormente evidente nel presente studio considerando che la medica è stato il foraggio maggiormente rappresentato; infatti, Kammes e Allen, (2012) affermano che il tasso di riduzione delle particelle di fibra è più veloce per le leguminose rispetto alle graminacee, determinando un effetto riempimento inferiore e una minore fibra efficace.

La produzione di latte non è stata differente ($P > 0.05$) tra le diete, probabilmente legato alla ridotta durata della prova (Tabella 14). Il grasso del latte, com'era atteso, è stato più alto per le vacche alimentata con diete LD, e le proteine sono state inferiori negli

animali che hanno assunto le diete Hu. Il valore di latte corretto per il contenuto di grasso FCM è stato tendenzialmente più alto per le vacche che assumevano le diete Lu.

Tabella 14. Produzione media giornaliera di latte e composizione per i diversi trattamenti.

Item	Trattamenti ^a				SEM	P value		
	Hu-HD	Lu-HD	Hu-LD	Lu-LD		HD vs. LD	Hu vs. Lu	I ¹
Latte, kg/g	41.2	40.0	39.1	39.2	0.5	0.09	0.49	0.84
Grasso, %	3.48	3.39	3.57	3.51	0.02	<0.01	<0.01	0.74
Proteine, %	3.26	3.29	3.28	3.29	0.01	0.67	<0.01	0.03
Lattosio, %	4.94	4.95	4.91	5.05	0.01	<0.01	<0.01	<0.01
FCM1, kg/s	37.8	36.5	34.8	36.0	0.2	0.11	0.09	0.75
FCM/ISS, kg/kg	1.27	1.25	1.42	1.47	0.18	0.13	0.22	0.71

^aHu-HD = elevato contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica ad elevata digeribilità; Lu-HD = basso contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica ad elevata digeribilità; Hu-LD = elevato contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica a bassa digeribilità; Lu-LD = basso contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica a bassa digeribilità.

¹ I = effetto dell'interazione tra i trattamenti.

Il tempo di ruminazione (min/g) è diminuito nelle diete ad elevato contenuto di uNDF₂₄₀ (Tabella 15), come atteso considerato il maggiore livello di ingestione di queste diete. Nonostante le diete Lu abbiano fatto registrare un tempo di ruminazione più elevato (min/uNDF₂₄₀ e min/kg peNDF), il pH medio è stato più basso e il tempo in cui il pH è rimasto sotto i livelli soglia più elevato; questo può essere il risultato della maggiore ingestione di concentrati registrata con queste diete.

Le diete HD hanno fatto registrare un maggior tempo di ruminazione rispetto alle diete LD (487, 499, 390 e 410 min/g, $P < 0.01$, per HD-Hu, HD-Lu, LD-Hu, e LD-Lu, rispettivamente). Questo effetto può essere collegato alla maggiore ingestione di SS delle diete HD vista la consolidata relazione positiva tra elevata ingestione e tempi di

ruminazione (Schirmann et al., 2012). Non è stata individuata nessuna differenza quando la ruminazione è stata calcolata in funzione dell'ingestione di SS.

Il pH medio giornaliero non è stato diverso tra i vari trattamenti ($P > 0.05$; Tabella 15). La tendenza del pH ad essere diverso ($P = 0.10$) tra le diete Hu e Lu potrebbe suggerire un effetto positivo dell'inclusione di foraggi sul pH medio nel rumine. Inoltre, il tempo (min/g) in cui il pH è stato < 5.8 è stato maggiore con le diete Lu rispetto a quelle Hu (674, 903, 733 e 904 min/g, $P < 0.01$, per HD-Hu, HD-Lu, LD-Hu, e LD-Lu, rispettivamente). Non sono state osservate differenze ($P > 0.05$) tra i trattamenti HD e LD per quanto riguarda il pH, il pH < 5.8 e il pH < 5.5 (min/g). Il tempo trascorso a pH < 5.8 è stato maggiore con le diete Lu rispetto alle diete Hu; ciò suggerisce il ruolo importante della quantità di foraggi in razione per limitare le fluttuazioni di pH, non legato solamente ai tempi di ruminazione *per se* (Kmicikewycz e Heinrichs, 2015).

Tabella 15. Valori medi di ruminazione e pH ruminale nei diversi trattamenti.

Misure	Trattamenti ^a				SEM	P value		
	Hu-HD	Lu-HD	Hu-LD	Lu-LD		HD vs. LD	Hu vs. Lu	I ¹
Ruminazione, min/g								
Totale	487	499	390	410	6	<0.01	0.13	0.71
ISS, kg	16.7	17.3	16.3	17.2	0.1	0.70	0.20	0.60
aNDFom ² ingerita, kg	50.4	55.4	43.7	50.1	0.9	<0.01	0.70	0.24
uNDF ₂₄₀ ³ ingerita, kg	155	184	148	181	3	0.44	<0.01	0.56
peNDF ⁴ ingerita, kg	129	135	141	156	2	0.23	<0.05	0.41
pH medio giornaliero	5.81	5.72	5.77	5.71	0.02	0.69	0.10	0.79
pH < 5.8 , min/g	674	903	733	904	1	0.69	<0.01	0.98
pH < 5.5 , min/g	122	329	257	323	38	0.52	0.06	0.61
AUC ⁵								
<5.8, unità di pH \times min/g	126	235	219	237	26	0.51	0.10	0.78
<5.5, unità di pH \times min/g	14	50	77	52	16	0.47	0.41	0.68

^aHu-HD = elevato contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica ad elevata digeribilità; Lu-HD = basso contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica ad elevata digeribilità; Hu-LD = elevato contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica a bassa digeribilità; Lu-LD = basso contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica a bassa digeribilità.

¹ I = effetto dell'interazione tra i trattamenti.

² aNDFom = NDF trattata con alfa-amilasi e sodio-solfito, corretta per il contenuto di ceneri..

³ uNDF₂₄₀ = NDF indigerita, stimata mediante fermentazione in vitro a 240-h.

⁴ peNDF = NDF fisicamente efficace: calcolata come il prodotto tra il contenuto di NDF della dieta sulla SS e il fattore di fibra efficace (Mertens, 1997).

⁵ AUC = area under curve (area sotto la curva), calcolata come: [area sotto il limite di pH (5.8 o 5.5) e sopra il profilo di pH delle vacche].

La composizione chimica delle feci e la digeribilità della pdNDF lungo tutto il tratto digestivo sono riportate in Tabella 16. La sostanza secca e le composizione fibrose sono simili nei diversi trattamenti ($P > 0.05$). La digeribilità totale sia della aNDFom (55.4, 61.1, 59.6 e 64.9% aNDFom, $P < 0.01$, per HD-Hu, HD-Lu, LD-Hu, ae LD-Lu, rispettivamente) che della pdNDF sono state diverso tra i trattamenti Hu e Lu, e in particolare più elevati per quest'ultimo (85.5, 86.1, 87.6 e 88.9 % pdNDF, $P < 0.01$, per HD-Hu, HD-Lu, LD-Hu, e LD-Lu, rispettivamente). In generale, la pdNDF è stata ben digerita in tutti i trattamenti, a conferma della capacità del rumine di trattenere la fibra potenzialmente digeribile. È possibile che la più bassa digeribilità della medica LD sia stata compensata dal più elevato contenuto di buccette di soia nelle diete LD. Un altro motivo può essere la minore ingestione nelle diete LD, a indicare che le particelle di fibra sono state per più tempo nel rumine determinando valori più elevati di digeribilità.

Tabella 16. Composizione chimica dei campioni di feci e digeribilità totale della fibra.

Misure	Trattamenti ^a				SEM	P value		
	Hu-HD	Lu-HD	Hu-LD	Lu-LD		HD vs. LD	Hu vs. Lu	I ¹
SS, %	15.4	15.7	15.1	15.4	0.3	0.23	0.29	0.98
aNDFom ² , % sulla SS	56.9	57.3	57.5	59.0	0.7	0.18	0.09	0.42
ADF, % sulla SS	39.7	38.6	40.3	40.8	0.5	0.55	0.02	0.18
ADL, % sulla SS	13.5	12.6	13.5	12.9	0.3	0.02	0.53	0.68
uNDF ₂₄₀ ³ , % aNDFom ²	79.1	75.0	79.5	77.2	0.9	<0.01	0.17	0.30
TTNDFD ⁴ , % aNDFom ²	55.4	61.1	59.6	64.9	0.6	0.20	<0.01	0.62
TTpdNDFD ⁵ , % pdNDF	85.5	86.1	87.6	88.9	0.7	0.12	<0.01	0.59

^aHu-HD = elevato contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica ad elevata digeribilità; Lu-HD = basso contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica ad elevata digeribilità; Hu-LD = elevato contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica a bassa digeribilità; Lu-LD = basso contenuto di uNDF₂₄₀, fieno di medica a bassa digeribilità.

¹ I = effetto dell'interazione tra i trattamenti.

² aNDFom = NDF trattata con alfa-amilasi e sodio-solfito, corretta per il contenuto di ceneri..

³ uNDF₂₄₀ = NDF indigerita, stimata mediante fermentazione in vitro a 240-h.

⁴TTNDFD = Digeribilità totale della frazione aNDFom.

⁵ TTNpdDFD = Digeribilità totale della NDF potenzialmente digeribile.

Considerando i risultati del presente studio, sembra che l'effetto riempimento della dieta sia legato al tasso di degradazione della pdNDF, piuttosto che dall'ingestione di uNDF₂₄₀ *per se*. Questi dati confermano indirettamente la capacità del ruminante di trattenere le particelle di fibra ricche in fibra potenzialmente degradabile, che rimangono quindi nella fase di galleggiamento. Bayant et al., (2010) hanno un tasso di passaggio particolarmente lento per le particelle degradabili, anche se tagliate finemente (< 1.25 mm). Quest'osservazione potrebbe essere correlata con la galleggibilità di tali

particelle e il gas prodotto durante i processi fermentativi. Le particelle di alimento hanno una maggiore probabilità di lasciare il rumine quando raggiungono una dimensione critica (dovuta all'attività masticatoria) e un peso specifico. È stato riportato che il tasso di passaggio di materiale indigeribile è più veloce rispetto a quello della frazione potenzialmente degradabile (Krizsan et al., 2010) e questo conferma che il maggiore effetto riempimento dei foraggi può essere collegato con il tasso di fermentazione della pdNDF.

3. CONFRONTO FRA DIGERIBILITÀ DELLA pdNDF OSSERVATA E QUELLA PREVISTA.

I dati relativi alla stima della pdNDF misurata nelle ricerche effettuate, sono state confrontate con le predizioni dei modelli di razionamento attualmente in uso, CNCPS e NorFor. In particolare sono stati inseriti tutti i dati richiesti dal modello, relativi ai singoli animali, ambiente e alimenti, per valutare la previsione della digeribilità della pdNDF. Per fare questo è stato utilizzato un programma di razionamento (Dinamilk, Fabermatica, IT) che presenta al suo interno le equazioni CNCPS V. 6.5 relative ai tassi di passaggio di Seo et al., (2006c; Eq. 13) e quella utilizzata nella versione 6.5.5 del CNCPS (Eq. 8; Van Amburgh et al., 2015). Inoltre è stata effettuata una simulazione, mediante l'utilizzo di un foglio di calcolo, per valutare la previsione della digeribilità della pdNDF secondo l'equazione di NorFor (Eq 12). A tale scopo è stata usata, per ogni animale, la media ottenuta dai dati raccolti durante la settimana sperimentale. La digeribilità ottenuta con i diversi modelli è stata inserita in un database nel quale sono stati aggiunti i dati della digeribilità osservata, per singolo animale nel periodo (tabella 17). La digeribilità osservata corrisponde alla digeribilità totale (TTdpdNDF) ridotta del 5% che rappresenta la frazione di fibra che viene digerita nell'intestino.

Tabella 17. Dati utilizzati per confrontare la digeribilità osservata con quella stimata dai modelli di razionamento attualmente in uso secondo le equazioni sul tasso di passaggio di Seo et al (2006c), CNCPS v.6.5.5 (2015) e NorFor (2011) compresa di fattori di correzione.

	N	Mean	Std Dev	Min	Max
Peso Vivo	46	565.11	145.04	347	794
SSI	46	21.05	8.80	7.8	35.4
Digeribilità ruminale della pdNDF					
Osservata	46	83.46	2.55	78.53	88.7
Seo et al., (2006)	46	58.15	5.85	49	67
CNCPS v 6.5.5	46	73.04	4.70	66	79
NorFor (2011)	46	87.30	2.40	84	90.7

L'obiettivo dell'analisi è stato quello di valutare la differenza esistente tra la digeribilità osservata e quella predetta dagli attuali modelli di razionamento per identificare la migliore stima.

I dati sono stati analizzati con il software JMP-12 (SAS Institute Inc., Cary NC) utilizzando un test per coppie corrispondenti (Matched Pairs). L'analisi è stata effettuata prima sul database completo e successivamente per singola ricerca. I valori sono stati considerati significativi con $P < 0.01$.

I risultati ottenuti sono presentati in Tabelle 18. Tutti i confronti che sono stati effettuati hanno fatto registrare una differenza significativa, in termini assoluti ($P < 0.01$). Valutando le differenze numeriche si può notare come la digeribilità calcolata secondo NorFor si avvicini maggiormente alla digeribilità osservata, come si può evincere dalla differenza in termini assoluti (3.83 vs. 10.42 e 25.31 per NorFor, CNCPS v6.5.5 e Seo et al., 2006, rispettivamente). Inoltre, anche la correlazione risulta maggiore nel confronto tra digeribilità osservata e NorFor ($R^2 = 0.32$) rispetto a CNCPS V.6.5.5 e Seo et al., (2006; $R^2 = -0.06$ e -0.05 , rispettivamente). Andando ad analizzare le singole

ricerche si sono confermate le considerazioni generali che vedono una maggiore vicinanza dei valori osservati con quelli stimati dal modello NorFor. In particolare, nella ricerca “Digeribilità”, le differenze rispetto alla digeribilità osservata sono risultate pari a 2.52, 6.98 e 21.25 rispetto alla digeribilità NorFor, CNCPS v.6.5.5 e Seo et al., 2006, rispettivamente. Le differenze rispetto alla digeribilità osservata sono state più elevate nell’ambito della prova pellet (6.30, 16.86, 32.92 per la digeribilità NorFor, CNCPS v.6.5.5 e Seo et al., 2006, rispettivamente). Tuttavia, nella ricerca “Manze”, la correlazione è stata nettamente superiore rispetto alla ricerca “Digeribilità” per tutti i confronti fatti rispetto ai valori di digeribilità osservati ($R^2 = 0.90, 0.75$ e 0.86 in NorFor, CNCPS v.6.5.5 e Seo et al., 2006 nella ricerca “Manze” e $R^2 = 0.46, 0.10$ e 0.07 in NorFor, CNCPS v.6.5.5 e Seo et al., 2006 nella ricerca “Digeribilità”).

Tabella 18. Confronto per coppie corrispondenti tra la digeribilità della pdNDF osservata e quelle predette dai modelli di razionamento CNCPS che utilizza le equazioni di Seo et al., (2006c), il CNCPS v 6.5.5 e il sistema NorFor (2011).

Prove	N	Digeribilità Ruminale pdNDF, %				Differenza vs. Osservato			Errore Std			Correlazione			P- value		
		Osservato	Seo et al., 2006	CNCPS v.6.5.5	Nor For	Seo et al., 2006	CNCPS v.6.5.5	Nor For	Seo et al., 2006	CNCPS v.6.5.5	Nor For	Seo et al., 2006	CNCPS v.6.5.5	Nor For	Seo et al., 2006	CNCPS v.6.5.5	Nor For
Ricerche	46	83.46	58.15	73.04	87.30	25.31	10.42	3.83	0.96	0.81	0.43	-0.05	-0.06	0.32	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Ricerca 'Digeribilità'	30	83.18	61.93	76.20	85.70	21.25	6.98	2.52	0.71	0.57	0.43	0.07	0.10	0.46	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Ricerca 'manze'	16	83.98	51.06	67.13	90.29	32.92	16.86	6.30	0.35	0.44	0.54	0.86	0.75	0.90	< 0.01	< 0.01	< 0.01

CONCLUSIONI

Da molto tempo è noto che i ruminanti sono altamente specializzati nella digestione della fibra a livello ruminale; in particolare, in condizioni di ottima funzionalità digestiva, sono le pareti cellulari dei foraggi ad essere trattenute per lungo tempo (35-65 ore) nel rumine dove possono essere ampiamente degradate dai batteri cellulolitici.

Nonostante queste conoscenze, la stima della degradabilità ruminale delle porzioni potenzialmente degradabili delle fibre è stata notevolmente sottostimata da taluni modelli dinamici di razionamento; la ragione risiede nel fatto che gli studi relativi alla misura della velocità di passaggio delle fibre (realizzate con l'utilizzo di marker costituiti da terre rare) era sostanzialmente inesatta.

Studi più recenti realizzati da Krizsan, Ahvenjarvi e Huhtanen, con tecniche di evacuazione post ruminale delle digesta hanno sostanzialmente rivisto gli assunti relativi alle percentuali di fibre digerite nel rumine. Le tecniche di valutazione in vivo della digeribilità della pdNDF utilizzando come marker l'uNDF₂₄₀ hanno consentito di valutare in campo questo parametro.

Gli studi oggetto di questa tesi si sono proposti di valutare come la digeribilità della fibra della razione potesse essere utilizzata in funzione di una diversa granulometria della dieta e di tassi più o meno rapidi di degradazione oraria (kd, %/h) di foraggi di medica.

Lo studio sul pellet ha dimostrato che la riduzione delle dimensioni della fibra è una strategia che può essere usata per aumentare l'ingestione di sostanza secca nei giovani ruminanti. Le dimensioni ridotte delle particelle di fibra hanno portato ad una riduzione dei tempi di ruminazione, senza alterazioni sul pH ruminale.

Come atteso la differenza nella dimensione della fibra dei due diversi trattamenti ha avuto effetto sul tasso di passaggio fuori dal rumine, che è aumentato durante la dieta pellet. Di conseguenza la TTdpdNDF, seppur elevata in entrambi i trattamenti, è stata maggiore durante il trattamento TMR in seguito alla fibra più lunga in esso contenuta.

I risultati dello studio sull'uNDF suggeriscono che la SSI è influenzata ampiamente dalla digeribilità dei foraggi utilizzati in razione (quando questi rappresentano più del 50% della razione e con una maggiore inclusione di fieno di medica) e non solamente dall'ingestione di uNDF₂₄₀. La dieta HD-Hu ha portato una maggiore produzione di latte e valori di pH più elevati. Quando la peNDF della dieta è bassa, il tempo di ruminazione può essere mantenuto a buoni livelli attraverso una maggiore ingestione di sostanza secca. Quando si somministra una razione a secco che comprende medica e paglia finemente macinati, il livello di uNDF₂₄₀ consigliato, per mantenere condizioni ruminali ottimali, dovrebbe essere di circa 0.48% del PV, mentre il livello minimo accettabile dovrebbe essere superiore allo 0.40 %.

La somministrazione di razioni a basso livello di peNDF può essere accettata solo quando il contenuto di aNDFom da foraggio rimane al di sopra di 24- 25 % della SS della razione. L'aggiunta di buccette di soia per bilanciare il contenuto di aNDFom non sembra essere una via efficace per ridurre il rischio di acidosi subclinica (come valutato dal pH ruminale), anche con livelli contenuti di amido nella razione (<24% della SS).

Nell'insieme i risultati hanno evidenziato che:

-l'utilizzo di razioni ricche di foraggi a granulometria ridotta non compromette lo stato di salute delle manze e consente comunque che la pdNDF sia molto intensamente digerita; tali risultati avvalorano l'ipotesi che la granulometria dei foraggi giustifica solo in parte la capacità di ritenzione selettiva del rumine che si manterrebbe in funzione

anche di altri fattori come ad esempio il peso specifico delle particelle e la loro capacità di flottare nel liquor ruminale;

- nelle bovine in lattazione l'utilizzo di foraggi caratterizzati da un contenuto di fibra più rapidamente degradabile e meno ricchi di uNDF consente soprattutto di esaltare l'ingestione di sostanza secca oltre che la produzione di latte; la digeribilità complessiva della fibra non è invece sostanzialmente mutata in funzione del parametro "costante di degradabilità oraria" della pdNDF del foraggio; ancora una volta il risultato può essere spiegato alla luce della grande capacità di ritenzione selettiva del rumine nei confronti della fibra dei foraggi;

- le equazioni proposte dal sistema di razionamento NorFor appaiono più adeguate nel predire l'utilizzo in vivo della fibra.

BIBLIOGRAFIA

Allen, and Mertens. 1988. Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes..
J. Nutr. 118:261–270.

Allen, M.S. 1996. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. J.
Anim. Sci. 74:3063–3075.

Allen, M.S. 2000. Effects of Diet on Short-Term Regulation of Feed Intake by Lactating
Dairy Cattle. J. Dairy Sci. 83:1598–1624.

Allen, M.S., J.A. Voelker, M. Oba, and others. 2006. Physically effective fiber and
regulation of ruminal pH: More than just chewing. Prod. Dis. Farm Anim. NP Joshi TH
Herdt Ed Wagening. Acad. Publ. Wagening. Neth. 270–278.

AOAC, W.H. 1990. Official methods of analysis. Arlingt. VA.

Beauchemin, K.A., W.Z. Yang, and L.M. Rode. 2003. Effects of particle size of alfalfa-
based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production.
J. Dairy Sci. 86:630–643.

Cardoza, R.C. 1985. Threshold Size and Factors Affecting Fecal Particle Weight
Distribution.

Chai, K., Kennedy, P. M. & Milligan, L. P. (1984). Reduction in particle size during
rumination in cattle. Canadian Journal of Animal Science 64, Suppl. 339-340.

Chalupa, W., R. Boston, and K. Square. 2003. Development of the CNCPS and CPM

models: the Sniffen affect. Pages 15–24 in Proceedings of Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers.

Chandler, J.A., W.J. Jewell, J.M. Gossett, P.J. Van Soest, and J.B. Robertson. 1980. Predicting methane fermentation biodegradability. Page in Biotechnol. Bioeng. Symp.:(United States). Cornell Univ., Ithaca, NY.

Chen, H., G.L. Rubenthaler, and E.G. Schanus. 1988. Effect of apple fiber and cellulose on the physical properties of wheat flour. *J. Food Sci.* 53:304–305.

Cherney, J.H., D.J.R. Cherney, and D.R. Mertens. 1988. Fiber Composition and Digestion Kinetics in Grass Stem Internodes as Influenced by Particle Size¹. *J. Dairy Sci.* 71:2112–2122.

Chesson, A., and C.W. Forsberg. 1997. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. Springer.

Cotanch, K.W., R.J. Grant, M.E. Van Amburgh, A. Zontini, M. Fustini, A. Palmonari, and A. Formigoni. 2014. Applications of uNDF in Ration Modeling and Formulation.

Crocker, L.M., E.J. DePeters, J.G. Fadel, S.E. Essex, H. Perez-Monti, and S.J. Taylor. 1998. Ash content of detergent fibers in feeds, digesta, and feces and its relevance in fiber digestibility calculations. *J. Dairy Sci.* 81:1010–1014.

Dado, R.G., and M.S. Allen. 1996. Enhanced intake and production of cows offered ensiled alfalfa with higher neutral detergent fiber digestibility. *J. Dairy Sci.* 79:418–428.

Dijkstra, J., J.M. Forbes, and J. France. 2005. Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. CABI.

Dohme, F., T.J. DeVries, and K.A. Beauchemin. 2008. Repeated Ruminant Acidosis Challenges in Lactating Dairy Cows at High and Low Risk for Developing Acidosis: Ruminant pH1. *J. Dairy Sci.* 91:3554–3567.

Donaldson, L.A. 2001. Lignification and lignin topochemistry—an ultrastructural view. *Phytochemistry* 57:859–873.

Evans, E. 1981. An evaluation of the relationships between dietary parameters and rumen solid turnover rate. *Can. J. Anim. Sci.* 61:97–103.

Ferraretto, L.F., A.C. Fonseca, C.J. Sniffen, A. Formigoni, and R.D. Shaver. 2015. Effect of corn silage hybrids differing in starch and neutral detergent fiber digestibility on lactation performance and total-tract nutrient digestibility by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:395–405.

Fox, D.G., C.J. Sniffen, J.D. O'Connor, J.B. Russell, and P.J. Van Soest. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirements and diet adequacy. *J. Anim. Sci.* 70:3578–3596.

Fox, D.G., L.O. Tedeschi, T.P. Tylutki, J.B. Russell, M.E. Van Amburgh, L.E. Chase, A.N. Pell, and T.R. Overton. 2004. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 112:29–78.

Fustini, M., A. J. Heinrichs, A. Palmonari, e A. Formigoni. 2016. Farm characteristics e TMR particle size issues on Parmigiano Reggiano farms in Northern Italy. *Prof. Anim. Sci.* 32:869–873.

Fustini, M., A. Palmonari, G. Canestrari, e A. Formigoni. 2010. Balancing carbohydrate

in dry rations for dairy cows. Pages 301–302 in Proc. International Symposium on Energy e Protein Metabolism e Nutrition. Parma, Italy. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.

Fustini, M., A. Palmonari, E. Bucchi, A.J. Heinrichs, and A. Formigoni. 2011. Chewing and ruminating with various forage qualities in nonlactating dairy cows. *Prof. Anim. Sci.* 27:352–356.

Gardner, R.W., J.D. Schuh, and L.G. Vargus. 1977. Accelerated Growth and Early Breeding of Holstein Heifers¹. *J. Dairy Sci.* 60:1941–1948.

Goering, H.K., and P.J. Van Soest. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, pcedures, and some applications). USDA Agr Handb.

Goetsch, A.L., and F.N. Owens. 1986. Effects of dietary nitrogen level and ileal antibiotic administration on digestion and passage rates in beef heifers. I. High-concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 62:830–843.

Grant, R.J., V.F. Colenbrander, and J.L. Albright. 1990. Effect of Particle Size of Forage and Rumen Cannulation upon Chewing Activity and Laterality in Dairy Cows¹. *J. Dairy Sci.* 73:3158–3164.

Grant, R.J., S.G. Haddad, K.J. Moore, and J.F. Pedersen. 1995. Brown Midrib Sorghum Silage for Midlactation Dairy Cows¹. *J. Dairy Sci.* 78:1970–1980.

Harmon, D.L., and C.J. Richards. 1997. Considerations for gastrointestinal cannulations in ruminants.. *J. Anim. Sci.* 75:2248–2255.

Higg R.J., and M.E. Van Amburgh. 2016. Evolution of the CNCPS - Development of

V7. Pages 125-142 in Proceedings Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers.

Hoover, W.H. 1986. Chemical Factors Involved in Ruminant Fiber Digestion. *J. Dairy Sci.* 69:2755–2766.

Hristov, A.N., S. Ahvenjärvi, T.A. McAllister, and P. Huhtanen. 2003. Composition and digestive tract retention time of ruminal particles with functional specific gravity greater or less than 1.02. *J. Anim. Sci.* 81:2639–2648.

Huhtanen, P., S. Ahvenjärvi, M.R. Weisbjerg, and P. Nørgaard. 2006. Digestion and passage of fibre in ruminants. *Rumin. Physiol. Dig. Metab. Impact Nutr. Gene Expr. Immunol. Stress Ed K Sejrsen T Hvelplund MO Nielsen* 87–135.

Huhtanen, P., U. Asikainen, M. Arkkila, and S. Jaakkola. 2007. Cell wall digestion and passage kinetics estimated by marker and in situ methods or by rumen evacuations in cattle fed hay 2 or 18 times daily. *Anim. Feed Sci. Technol.* 133:206–227.

Huhtanen, P., P.G. Brotz, and L.D. Satter. 1997. Omasal sampling technique for assessing fermentative digestion in the forestomach of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 75:1380–1392.

Huhtanen, P., E. Detmann, and S.J. Krizsan. 2016. Prediction of rumen fiber pool in cattle from dietary, fecal, and animal variables. *J. Dairy Sci.* 99:5345–5357.

Huhtanen, P., and S. Jaakkola. 1993. The effects of forage preservation method and proportion of concentrate on digestion of cell wall carbohydrates and rumen digesta pool size in cattle. *Grass Forage Sci.* 48:155–165.

Huhtanen, P., and U. Kukkonen. 1995. Comparison of methods, markers, sampling sites and models for estimating digesta passage kinetics in cattle fed at two levels of intake. *Anim. Feed Sci. Technol.* 52:141–158.

Jung, H.G., and M.S. Allen. 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* 73:2774–2790.

Jung, H.-J.G. 1997. Analysis of forage fiber and cell walls in ruminant nutrition. *J. Nutr.* 127:810S–813S.

Kammes, K.L., and M.S. Allen. 2012. Nutrient demand interacts with grass particle length to affect digestion responses and chewing activity in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:807–823.

Kaske, M., S. Hatiboglu, and W.V. Engelhardt. 1992. The influence of density and size of particles on rumination and passage from the reticulo-rumen of sheep. *Br. J. Nutr.* 67:235–244.

Kendall, C., C. Leonardi, P.C. Hoffman, and D.K. Combs. 2009. Intake and milk production of cows fed diets that differed in dietary neutral detergent fiber and neutral detergent fiber digestibility. *J. Dairy Sci.* 92:313–323.

Khalili, H., and P. Huhtanen. 1991. Sucrose supplements in cattle given grass silage-based diet. 2. Digestion of cell wall carbohydrates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 33:263–273.

Kleen, J.L., G.A. Hooijer, J. Rehage, and J.P.T.M. Noordhuizen. 2003. Subacute Ruminal Acidosis (SARA): a Review. *J. Vet. Med. Ser. A* 50:406–414.

Klevenhusen, F., P. Pourazad, S.U. Wetzels, M. Kumar, A. Khol-Parisini, and Q. Zebeli. 2014. Technical note: Evaluation of a real-time wireless pH measurement system relative to intraruminal differences of digesta in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 92:5635–5639.

Kmicikewycz, A.D., and A.J. Heinrichs. 2015. Effect of corn silage particle size and supplemental hay on rumen pH and feed preference by dairy cows fed high-starch diets. *J. Dairy Sci.* 98:373–385.

Koike, S., Y. Kobayashi, and others. 2009. Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions. *Asian-Aust J Anim Sci* 22:131–138.

Kononoff, P.J., A.J. Heinrichs, and H.A. Lehman. 2003. The effect of corn silage particle size on eating behavior, chewing activities, and rumen fermentation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:3343–3353.

Krause, K.M., D.K. Combs, and K.A. Beauchemin. 2002. Effects of Forage Particle Size and Grain Fermentability in Midlactation Cows. II. Ruminal pH and Chewing Activity. *J. Dairy Sci.* 85:1947–1957.

Krizsan, S.J., S. Ahvenjärvi, and P. Huhtanen. 2010. A meta-analysis of passage rate estimated by rumen evacuation with cattle and evaluation of passage rate prediction models. *J. Dairy Sci.* 93:5890–5901.

Krizsan, S.J., L. Nyholm, J. Nousiainen, K.-H. Südekum, and P. Huhtanen. 2012. Comparison of in vitro and in situ methods in evaluation of forage digestibility in ruminants. *J. Anim. Sci.* 90:3162–3173.

Lammers, B.P., D.R. Buckmaster, and A.J. Heinrichs. 1996. A Simple Method for the

- Analysis of Particle Sizes of Forage and Total Mixed Rations. *J. Dairy Sci.* 79:922–928.
- Lee, D., K. Meyer, C. Chapple, and C.J. Douglas. 1997. Antisense suppression of 4-coumarate: coenzyme A ligase activity in *Arabidopsis* leads to altered lignin subunit composition.. *Plant Cell* 9:1985–1998.
- Mader, T.L., R.G. Teeter, and G.W. Horn. 1984. Comparison of forage labeling techniques for conducting passage rate studies. *J. Anim. Sci.* 58:208–212.
- McAllister, T.A., H.D. Bae, G.A. Jones, and K.J. Cheng. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen.. *J. Anim. Sci.* 72:3004–3018.
- Mertens, D. 2007. Grass forages: Dynamics of digestion in the rumen. Page 6 in *Ruminant Nutrition Conference Proceedings*.
- Mertens, D.R. 1973. *Application of Theoretical Mathematical Models to Cell Wall Digestion and Forage Intake in Ruminants*. University Microfilms.
- Mertens, D.R. 1977. Dietary fiber components: relationship to the rate and extent of ruminal digestion. Pages 187–192 in *Federation Proceedings*.
- Mertens, D.R. 1993. Kinetics of cell wall digestion and passage in ruminants. *Forage Cell Wall Struct. Dig.* 535–570.
- Mertens, D.R. 1997. Creating a System for Meeting the Fiber Requirements of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 80:1463–1481.
- Mertens, D.R. 2000. Physical effective NDF and its use in formulating dairy rations. Page in *Presented at the 11th Florida Ruminant Nutrition Symposium*.

Mertens, D.R. 2002. Gravimetric Determination of Amylase-Treated Neutral Detergent Fiber in Feeds with Refluxing in Beakers or Crucibles: Collaborative Study. Accessed March 4, 2015.

Mertens, D.R. 2005. Rate and extent of digestion. *Quant. Asp. Rumin. Dig. Metab.* 2:13–47.

Mertens, D.R. 2015. Underlying Fiber Concepts and Definitions. Pages 125-136 in *Proceedings Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers.*

Mertens, D.R., and L.O. Ely. 1979. A Dynamic Model of Fiber Digestion and Passage in the Ruminant for Evaluating Forage Quality. *J. Anim. Sci.* 49:1085–1095.

Montgomery, M.J., and B.R. Baumgardt. 1965. Regulation of Food Intake in Ruminants. 1. Pelleted Rations Varying in Energy Concentration^{1,2}. *J. Dairy Sci.* 48:569–574.

Mordenti, A.L., N. Brogna, F. Merendi, G. Canestrari, M. Dall’Olio, G. Biagi, and A. Formigoni. 2015. Effect of feeding whole soybean and linseed on milk and parmigiano reggiano cheese lipid fraction. *Prog. Nutr.* 17:220–230.

Mourino, F., R. Akkarawongsa, and P.J. Weimer. 2001. Initial pH as a Determinant of Cellulose Digestion Rate by Mixed Ruminal Microorganisms In Vitro¹. *J. Dairy Sci.* 84:848–859.

Murphy, M.R., and J.M. Nicoletti. 1984. Potential Reduction of Forage and Rumen Digesta Particle Size by Microbial Action¹. *J. Dairy Sci.* 67:1221–1226.

Nousiainen, J., M. Rinne, M. Hellämäki, and P. Huhtanen. 2003. Prediction of the

digestibility of the primary growth of grass silages harvested at different stages of maturity from chemical composition and pepsin-cellulase solubility. *Anim. Feed Sci. Technol.* 103:97–111.

NRC. 1996. *Nutr. Requir. Beef Cattle* 7:242.

NRC, 2001. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7th Rev Ed 381.

Oba, M., and M.S. Allen. 1999. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:589–596.

Oba, M., and M.S. Allen. 2000. Effects of brown midrib 3 mutation in corn silage on productivity of dairy cows fed two concentrations of dietary neutral detergent fiber: 1. Feeding behavior and nutrient utilization. *J. Dairy Sci.* 83:1333–1341.

O'Connor, J.D., C.J. Sniffen, D.G. Fox, and W. Chalupa. 1993. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV. Predicting amino acid adequacy. *J. Anim. Sci.* 71:1298–1311.

Palmonari, A., M. Fustini, G. Canestrari, E. Grilli, and A. Formigoni. 2014. Influence of maturity on alfalfa hay nutritional fractions and indigestible fiber content. *J. Dairy Sci.* 97:7729–7734.

Palmonari, A., A. Gallo, M. Fustini, G. Canestrari, F. Masoero, C.J. Sniffen, and A. Formigoni. 2016. Estimation of the indigestible fiber in different forage types. *J. Anim. Sci.* 94:248–254.

Plaizier, J.C., D.O. Krause, G.N. Gozho, and B.W. McBride. 2008. Subacute ruminal

acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *Vet. J.* 176:21–31.

Poppi, D.P., R.E. Hendricksen, and D.J. Minson. 1985. The relative resistance to escape of leaf and stem particles from the rumen of cattle and sheep. *J. Agric. Sci.* 105:9–14.

Raffrenato, E., and M.E. Van Amburgh. 2010. Development of a mathematical model to predict sizes and rates of digestion of a fast and slow degrading pool and the indigestible NDF fraction. Pages 52–65 in *Proc. Cornell Nutr. Conf, Syracuse, NY.*

Raffrenato, E., and M.E. Van Amburgh. 2011. Technical note: Improved methodology for analyses of acid detergent fiber and acid detergent lignin. *J. Dairy Sci.* 94:3613–3617.

Robertson, J.B., and P.J. Van Soest. 1981. The detergent system of analysis and its application to human foods. *Anal. Diet. Fiber Food* 3:123.

Rulquin, H., P.M. Pisulewski, R. Vérité, and J. Guinard. 1993. Milk production and composition as a function of postruminal lysine and methionine supply: a nutrient-response approach. *Livest. Prod. Sci.* 37:69–90.

Russell, J.B., and D.B. Dombrowski. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture.. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:604–610.

Russell, J.B., J.D. O'Connor, D.G. Fox, P.J.V. Soest, and C.J. Sniffen. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation.. *J. Anim. Sci.* 70:3551–3561.

Sauvant, D., J. Dijkstra, and D. Mertens. 1995. Optimisation of ruminal digestion: a modelling approach. *Recent Dev. Nutr. Herbiv.* 165.

Savian, T.V., J.A. Muniz, L.H. de Aquino, and D.F. Ferreira. 2007. Comparison of two mathematical models in the description of in situ degradability. *Rev. Bras. Ciênc. Veterinária* 14.

Schirmann, K., N. Chapinal, D.M. Weary, W. Heuwieser, and M.A.G. Von Keyserlingk. 2012. Rumination and its relationship to feeding and lying behavior in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:3212–3217.

Sejrsen, K., T. Hvelplund, and M.O. Nielsen. 2006. *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress.* Wageningen Academic Pub.

Seo, S., L.O. Tedeschi, C. Lanzas, C.G. Schwab, and D.G. Fox. 2006a. Development and evaluation of empirical equations to predict feed passage rate in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 128:67–83.

Seo, S., L.O. Tedeschi, C.G. Schwab, B.D. Garthwaite, and D.G. Fox. 2006b. Evaluation of the Passage Rate Equations in the 2001 Dairy NRC Model. *J. Dairy Sci.* 89:2327–2342.

Seo, S., L.O. Tedeschi, C.G. Schwab, B.D. Garthwaite, and D.G. Fox. 2006c. Evaluation of the passage rate equations in the 2001 dairy NRC model. *J. Dairy Sci.* 89:2327–2342.

Shi, Y., and P.J. Weimer. 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. 58:2583–2591.

Sniffen, C.J., J.D. O'Connor, P.J. Van Soest, D.G. Fox, and J.B. Russell. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* 70:3562–3577.

Somerville, C., S. Bauer, G. Brininstool, M. Facette, T. Hamann, J. Milne, E. Osborne, A. Paredez, S. Persson, T. Raab, and others. 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306:2206–2211.

Sutherland, T.M. 1988. Particle separation in the forestomachs of sheep.

Tedeschi, L.O., W. Chalupa, E. Janczewski, D.G. Fox, C. Sniffen, R. Munson, P.J. Kononoff, and R. Boston. 2008. Evaluation and application of the CPM Dairy Nutrition model. *J. Agric. Sci.* 146:171–182.

Tedeschi, L.O., D.G. Fox, and J.B. Russell. 2000. Accounting for the effects of a ruminal nitrogen deficiency within the structure of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System.. *J. Anim. Sci.* 78:1648–1658.

Teimouri Yansari, A., R. Valizadeh, A. Naserian, D.A. Christensen, P. Yu, and F. Eftekhari Shahroodi. 2004. Effects of Alfalfa Particle Size and Specific Gravity on Chewing Activity, Digestibility, and Performance of Holstein Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 87:3912–3924.

Terashima, N., K. Fukushima, L.F. He, and K. Takabe. 1993. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. *Forage Cell Wall Struct. Dig.* 247–270.

Tilley, J.M.A., and R.A. Terry. 1963. A Two-Stage Technique for the in Vitro

Digestion of Forage Crops. *Grass Forage Sci.* 18:104–111.

Udén, P., P.E. Colucci, and P.J. Van Soest. 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *J. Sci. Food Agric.* 31:625–632.

Van Amburgh, M.E., D.M. Galton, D.E. Bauman, R.W. Everett, D.G. Fox, L.E. Chase, and H.N. Erb. 1998. Effects of three prepubertal body growth rates on performance of Holstein heifers during first lactation. *J. Dairy Sci.* 81:527–538.

Van Amburgh, M.E., A. Foskolos, and R.J. Higgs. 2015. Balancing diets with the CNCPS v6.5 - What's changed and implications for use. Pages 115-122 in Proceedings Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers.

Van Soest, P. und, and R.H. Wine. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 50:50–55.

Van Soest, P.J., and others. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin.. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 46:829–835.

Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press.

Van Soest, P.J., M.E. Van Amburgh, J.B. Robertson, and W.F. Knaus. 2005. Validation of the 2.4 times lignin factor for ultimate extent of NDF digestion, and curve peeling rate of fermentation curves into pools. Pages 24–26 in Proceedings Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers.

Volden, H., N.I. Nielsen, M. Aakerlind, and A.J. Rygh. 2011. System evaluation. Springer.

Waldo, D.R., and others. 1970. Factors influencing the voluntary intake of forages. Page in Proceedings natn. Conf. Forage Qual. Eval. Util., Univ. Nebraska, 1969.

Waldo, D.R., L.W. Smith, and E.L. Cox. 1972. Model of Cellulose Disappearance from the Rumen. *J. Dairy Sci.* 55:125–129.

Weimer, P.J. 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster?. *J. Dairy Sci.* 79:1496–1502.

Welch, J.G. 1982. Rumination, particle size and passage from the rumen. *J. Anim. Sci.* 54:885–894.

Wilman, D., and M.A. Altimimi. 1984. The in-vitro digestibility and chemical composition of plant parts in white clover, red clover and lucerne during primary growth. *J. Sci. Food Agric.* 35:133–138.

Wilson, J.R., and P.M. Kennedy. 1996. Plant and animal constraints to voluntary feed intake associated with fibre characteristics and particle breakdown and passage in ruminants. *Crop Pasture Sci.* 47:199–225.

Woodford, S.T., and M.R. Murphy. 1988. Effect of Forage Physical Form on Chewing Activity, Dry Matter Intake, and Rumen Function of Dairy Cows in Early Lactation. *J. Dairy Sci.* 71:674–686.

Yang, W.Z., and K.A. Beauchemin. 2006. Physically Effective Fiber: Method of Determination and Effects on Chewing, Ruminal Acidosis, and Digestion by Dairy

Cows. *J. Dairy Sci.* 89:2618–2633.

Yang, W.Z., and K.A. Beauchemin. 2007. Altering Physically Effective Fiber Intake Through Forage Proportion and Particle Length: Chewing and Ruminal pH. *J. Dairy Sci.* 90:2826–2838.