



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
VETERINARIE

Relazione finale del piano di ricerca dal titolo:

Strategie alimentari per la riduzione delle emissioni ambientali dell'allevamento bovino.

ACRONIMO: Liquid_Green_Gas_Solution (LGGs)

Introduzione e obiettivo generale del piano

Il tema della sostenibilità ambientale dell'agricoltura e dell'allevamento in particolare, è di estrema attualità. Rispetto al passato, grazie ai notevoli miglioramenti dell'efficienza dei sistemi di produzione, le emissioni di Greenhouse Gases (GHG) relative alla produzione di latte e carne bovina sono, per unità di prodotto, progressivamente e significativamente diminuite. Nonostante questi progressi, la richiesta di ridurre l'impronta ambientale della produzione di alimenti di origine animale è fra gli obiettivi che gli allevatori sono chiamati a perseguire oggi e nel futuro.

L'alimentazione degli animali gioca un ruolo "ambientale" molto importante per diversi motivi riconducibili, principalmente, ai seguenti punti:

- l'alimentazione rappresenta la maggiore voce di costo delle produzioni zootecniche, influenza il benessere, le risposte sanitarie, riproduttive e produttive degli animali, contribuendo in tal senso, a elevare l'efficienza produttiva, la sostenibilità economica e sociale e, in definitiva, ridurre l'intensità delle emissioni per unità di prodotto utile;

- la scelta di alimenti la cui produzione generi minori emissioni di CO₂ equivalenti, contribuisce a attenuare l'impronta ambientale delle produzioni zootecniche; a tal proposito si ricorda come il riutilizzo di co-prodotti derivanti da altre filiere produttive, l'adozione di piani di razionamento con livelli proteici più contenuti e equilibrati con gli apporti di energia, il razionale uso dei minerali, l'uso di foraggi e alimenti locali piuttosto che di importazione portino a benefici consistenti alla sostenibilità;

- l'inclusione di specifici additivi in alimentazione, a diverso titolo, sono capaci, unitamente a scelte di razionamento oculate, di modulare nei ruminanti le emissioni gassose e in particolare quelle di metano e azoto.

Date queste sintetiche premesse è importante indagare quali siano le migliori strategie alimentari che rendano più sostenibili le produzioni dei ruminanti. In tal senso, l'obiettivo di queste ricerche è stato quello di testare l'efficacia di una strategia nutrizionale di precisione per la produzione di latte, che mediante l'uso di mangimi liquidi appositamente formulati, permettesse di:

- ridurre le emissioni in atmosfera di metano (CH₄) e l'escrezione di azoto urinario, precursore di ammoniaca (NH₃) e protossido di azoto (N₂O);
- migliorare la sostenibilità degli allevamenti di bovine da latte senza modificare le caratteristiche del latte destinato alla caseificazione.

Come previsto dal piano di lavoro a suo tempo proposto, la ricerca si è articolata in cinque azioni i cui risultati sono oggetto della presente relazione.



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
VETERinarie

Azione n. 1 – Prove in vitro

Lo scopo di questa azione è stato quello di valutare, *in vitro*, l'efficacia di diversi additivi, sia singolarmente che in combinazione tra loro, per identificare il prodotto più efficace nella riduzione della emissione ruminale di metano. La sperimentazione è stata condotta nel laboratorio di Zootecnia del Dipartimento di scienze mediche veterinarie dell'Università di Bologna, utilizzando il sistema di fermentazione Gas Endeavour®; questo strumento è completamente automatizzato e permette di misurare in modo accurato il volume e il flusso di gas provenienti dai processi di fermentazione. Il sistema (si veda la figura 1) è composto da tre unità:

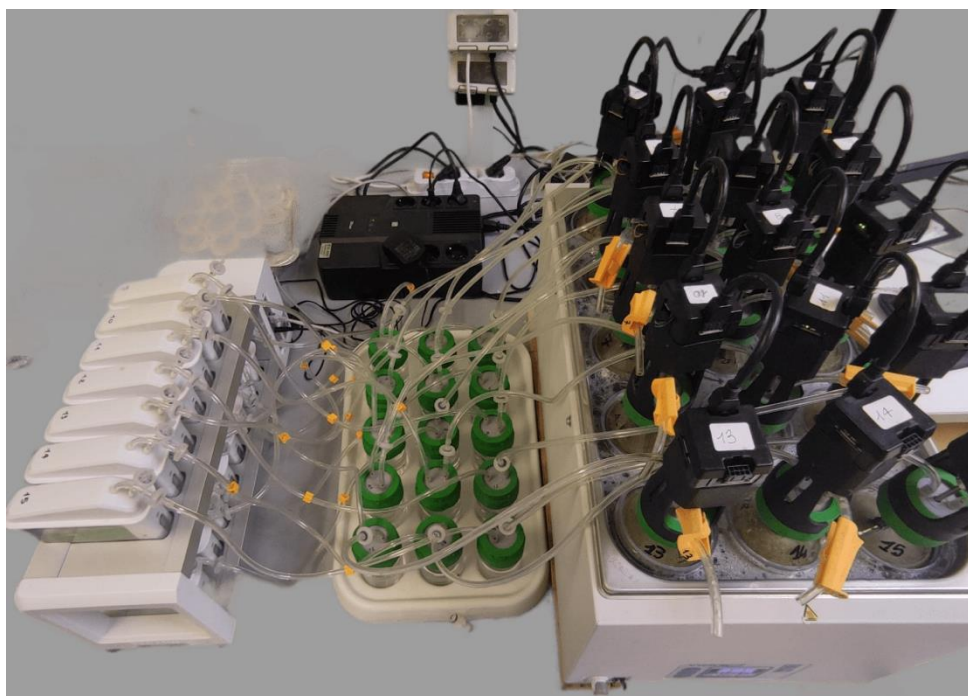


Figura 1. Immagine del Gas Endeavour®

Unità A: Unità di incubazione, composta da un bagno termostatico ad acqua che può ospitare fino a 15 bottiglie da 500 ml per la fermentazione (reattore). Ogni bottiglia è dotata di un agitatore a sospensione che opera in un ciclo alternato: 5 minuti di agitazione seguiti da 2 minuti di riposo, con velocità di 40 rpm per garantire una miscelazione delicata e continua del contenuto.

Unità B: Unità di assorbimento di anidride carbonica (CO₂), svolge la funzione di isolare il CH₄ prodotto dalla miscela dei gas generata durante la fermentazione. L'unità è costituita da 15 bottiglie da 250 ml, ciascuna contenente 80 ml di NaOH 3M. Questa soluzione permette di catturare efficacemente la CO₂ con un'efficienza di assorbimento superiore al 98%, consentendo così il passaggio alle unità di registrazione solo al CH₄.

Unità C: Unità di registrazione e misurazione del gas. Questa unità misura il volume di gas rilasciato dall'unità di incubazione o dall'unità B ed è composta da 15 celle di misurazione (FCU), ciascuna con capienza di 100 ml e una risoluzione di 2 ml. Le celle sono collegate mediante tubi Tygon® alle bottiglie in fermentazione. Inoltre, l'unità è dotata di diversi sensori integrati che misurano

Via Tolara di Sopra, 50 | 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) | Italia

Indirizzo PEC: dimevet.dipartimento@pec.unibo.it



temperatura e pressione a ogni misurazione. Il funzionamento si basa sul principio dello spostamento del liquido e del galleggiamento, permettendo di monitorare flussi di gas ultra-bassi con elevata precisione. Un sistema di acquisizione dati integrato registra, visualizza e analizza i risultati, rendendoli facilmente accessibili tramite un software dedicato. Al termine della fermentazione il sistema consente di scaricare il report selezionando anche l'intervallo temporale desiderato (ad esempio: un minuto, 5 minuti, 15 minuti, ora o giorno).

Tutte le prove di fermentazione sono state realizzate seguendo la tradizionale metodica di Tilley e Terry (1963) modificata da Goering e Van Soest (1970) con quantità di substrati adattate alla capacità del reattore (500ml) e mantenendo invariato il rapporto (1:4) tra *liquor ruminale* e *medium* (500 ml). Per le fermentazioni, gli additivi liquidi sono stati direttamente aggiunti al *medium* mentre quelli solidi, sono stati prima miscelati con l'unifeed per ottenere una distribuzione omogenea.

Il protocollo di prelievo del *liquor* ruminale usato come inoculo, è stato standardizzato a seguito di diverse prove preliminari. In base a questi *test* iniziali, si è stabilito di prelevare il *liquor*, tre ore dopo il pasto principale, da 4 vacche in lattazione aventi tra i 150 e 200 giorni di mungitura. Il campione è stato raccolto tramite l'utilizzo di sonda esofagea in bottiglie preriscaldate da 500 ml. Per ogni fermentazione sono stati utilizzati tre replicati per il controllo e i vari trattamenti (Figura 2).

1 CTR	2 CTR	3 CTR
4 TRT1	5 TRT1	6 TRT1
7 TRT2	8 TRT2	9 TRT2
10 TRT3	11 TRT3	12 TRT3
13 TRT4	14 TRT4	15 TRT4

Figura 2. Rappresentazione schematica del sistema di fermentazione

Dopo aver verificato la perfetta correlazione tra produzione di metano a 24, 48 e 72 ore, ogni fermentazione è stata svolta per 24 ore. Come substrato si è sempre utilizzato unifeed essiccato a 65°C e macinato a 1 mm. Per la scelta dei dosaggi degli additivi da utilizzare si è fatto riferimento agli studi presenti in bibliografia e alle indicazioni dei fornitori. Per esaltare l'evidenza delle risposte *in vitro*, in accordo con quanto suggerito in letteratura i dosaggi degli additivi sono stati 5 volte superiori rispetto a quelli raccomandati *in vivo*. Successivamente sono stati eseguiti ulteriori test con dosaggi diversi.

La formula utilizzata per definire i dosaggi *in vitro* è stata la seguente:

$$(Y(g): 100 L = X: 0,5 L) * 5$$

Via Tolara di Sopra, 50 | 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) | Italia

Indirizzo PEC: dimevet.dipartimento@pec.unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
VETERINARIE

Dove:

Y = grammi/capo/die di additivo utilizzati in vivo

X= dosaggio da utilizzare in vitro

100 L= stima del volume ruminale

0.5 L= capacità del reattore

Fasi sperimentali *in vitro*

Lo studio ha previsto tre diverse fasi sperimentali. Nella prima sono stati testati i singoli additivi, nella seconda si sono state testate delle miscele di prodotti dimostratisi più efficaci (*blend*) e, infine, è stata valutata la produzione di CH₄ e la degradabilità della sostanza organica della dieta comprendente il mangime liquido sperimentale formulato di cui si parlerà più avanti.

In totale sono state effettuate 46 fermentazioni a fronte delle 39 inizialmente previste dal piano di lavoro.

Schema delle fasi di lavoro svolto *in vitro*.

	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Totale Prova
Fermentazioni, n°	30	19	1	46
Trattamenti testati, n°	30	15	2	47

Fase 1: In questa fase sono stati testati singolarmente 19 additivi per valutare la loro efficacia nel ridurre la liberazione di CH₄. La sintesi di queste fermentazioni è riportata in tabella.

Schema riassuntivo delle fermentazioni realizzate in fase 1 (dosaggio espresso in ml/L)

Fermentazione, n°	Additivo	Dosaggio Additivo
1	Acido Fosforico 75%	0,5
2	Acido Acetico 80%	0,5
3	Acido Citrico 80%	1,0
4	Acido Formico 59.5%	0,5
5	Acido Fumarico 80%	1,0
6	Acido Malico 80%	1,0
7	Acido Propionico 85%	0,5
8	Acido Propionico 85%	1,0
9	Olio essenziale Arancio	2,0
10	Olio essenziale Arancio	22,5
11	Olio essenziale Eucalipto	22,5
12	Olio essenziale Garofano	2,0
13	Olio essenziale Garofano	22,5
14	Olio essenziale Geranio	2,0
15	Olio essenziale Geranio	22,5
16	Olio essenziale Origano	2,0
17	Olio essenziale Origano	22,5
18	Olio essenziale Timo	2,0
19	Olio essenziale Timo	22,5
20	Olio essenziale Zenzero	2,0

Via Tolara di Sopra, 50 | 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) | Italia

Indirizzo PEC: dimevet.dipartimento@pec.unibo.it



21	Olio essenziale Zenzero	22,5
22	Glicole Propilenico 50%	22,5
23	Glicole Propilenico 50%	1500
24	Glicerolo	1500
25	Nitrato	200
26	Nitrato	500
27	Nitrato	100
28	Tannino Chestnut	1500
29	Tannino Chestnut liquido	1500
30	Tannino Quebracho	1500

Fase 2: Nella seconda fase, sono state testate diverse miscele (*blend*) di additivi con la finalità di individuare la composizione capace della maggior riduzione di CH₄. Complessivamente, sono state testate 9 combinazioni, anche a dosaggi diversi, in 17 differenti fermentazione.

Schema riassuntivo delle fermentazioni condotte nella fase 2 (dosaggio espresso in ml/L).

Fermentazione, n°		Composizione Blend	Dosaggio
1	Blend 1	Tannino Chestnut ; Mix Oli essenziali	196
2	Blend 1	Tannino Chestnut ; Mix Oli essenziali	500
3	Blend 1	Tannino Chestnut ; Mix Oli essenziali	1000
4	Blend 2	Tannino Chestnut ; Olio essenziale Origano	262
5	Blend 3	Olio essenziale Origano ; Olio essenziale Timo	22,5
6	Blend 4	Olio ess. Origano ; Olio ess. Timo e Tannino Chestnut	1522,5
7	Blend 5	Tannino Chestnut ; Acido Propionico 85%	1512
8	Blend 6	Tannino Chestnut ; Nitrato di calcio ; Glic. Prop. 50%	500
9	Blend 6	Tannino Chestnut ; Nitrato di calcio ; Glic. Prop. 50%	2000
10	Blend 6	Tannino Chestnut ; Nitrato di calcio ; Glic. Prop. 50%	9000
11	Blend 7	Tannino Chestnut ; Glicole Propilenico 50%	1800
12	Blend 8	Tannino Chestnut ; Nitrato di calcio	1625
13	Blend 8	Tannino Chestnut ; Nitrato di calcio	3250
14	Blend 8	Tannino Chestnut ; Nitrato di calcio	6500
15	Blend 9	Miscela tannini Chestnut+ acidi organici	1500

Fase 3: L'ultima fase *in vitro* ha avuto lo scopo di valutare l'effetto del mangime sperimentale addizionato di additivi oltre che sulla produzione di metano anche sulla degradabilità della sostanza organica; per questo è stato utilizzato lo schema seguente:

Trattamento	Replicati, n°
Unifeed Controllo ²	6
Unifeed Trattato ³	6

² Unifeed CTR: Dieta con mangime liquido senza additivo (Liquid Milker)

³ Unifeed TRT: Dieta con inclusione di mangime liquido con additivi (Red-Met vs3 EXP)

Risultati

Via Tolara di Sopra, 50 | 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) | Italia

Indirizzo PEC: dimevet.dipartimento@pec.unibo.it



L'analisi statistica dei risultati è stata eseguita utilizzando il software JMP, versione 17 utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) e il test *t* di Student per valutare la differenza di produzione del CH₄ registrata tra i trattamenti e i rispettivi controlli.

Fase 1: I risultati della fase 1, evidenziano come la maggior parte degli additivi abbia avuto, *in vitro*, un'influenza positiva sulla riduzione della produzione di CH₄ rispetto al controllo. In particolare, è emerso che 13 trattamenti hanno ridotto la produzione di metano di almeno il 10%, mentre altri 5 hanno mostrato un effetto minore

Fase 2: In questa fase si sono testate diverse combinazioni di additivi. I risultati hanno mostrato significative variazioni nell'efficacia delle diverse combinazioni, con riduzioni percentuali del metano che sono variate dal 12,05% al 66,19% rispetto ai controlli.

Fase 3:

In relazione ai risultati ottenuti dalle fermentazioni sia degli additivi singoli e dei diversi *blend* e fatte, insieme ai responsabili della ditta EDF Man, le opportune considerazioni di ordine economico e di fattibilità di un prodotto commerciale da utilizzare negli allevamenti, è stato formulato un mangime liquido che è stato dapprima testato in fermentazioni *in vitro* per valutare il suo effetto sulla potenziale riduzione di metano e sulla degradabilità della sostanza organica e successivamente in vivo per confermare la sua efficacia. Questo mangime è stato denominato Red-Met vs3 EXP.

I risultati di tali fermentazioni riportati hanno evidenziato un effetto positivo sulla riduzione di metano che si è attestata a valori inferiori del 20,14% rispetto al controllo; la degradabilità della sostanza organica non è stata influenzata.

Valutazione della degradabilità della sostanza organica del piatto unico con l'uso di mangime Liquid Milker e Red-Met vs3 EXP.

Trattamento	Replicati, n°	ml CH ₄ , 24h	D.S.	% CH ₄	dOM, %ss
Unifeed con Liquid Milker	6	212,84	34,43		62,60
Unifeed con Red-Met vs3 EXP	6	169,98	28,56	-20,14	61,51

Azione 2: Valutazione *in vivo* dell'impiego di mangime liquido addizionato di additivi.

Obiettivi di questa parte progettuale sono stati quelli di:

- a- valutare, in bovine da latte mantenute in condizioni controllate individualmente, l'effetto dell'impiego del mangime Red-Met vs3 EXP;
- b- confrontare le emissioni di metano attraverso le tecniche *laser* e *sniffers* in uso presso la stalla sperimentale dell'università.

La stalla, sita ad Ozzano nell'Emilia (BO), alleva circa 100 capi in lattazione e 80 capi fra asciutte e rimonta. Gli animali presenti in azienda sono di razza Frisona italiana. La stalla è dotata di robot di



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
VETERINARIE

mungitura e le bovine sono munte circa 3,1 volte al giorno. Dopo ogni mungitura le bovine sono pesate. Gli animali sono dotati di podometrie di ruminometri (RuminAct®).

Nell'azione 2 sono state utilizzate 16 vacche in lattazione, omogenee in peso, numero di lattazioni, produzione e tempi di ruminazione.

Ogni bovina è stata dotata di pH metri reticolari (Smaxtech®, Smaxtec Animal Care, Austria) che consentono la rilevazione in continuo del pH del liquor ruminale che transita attraverso il reticolo. Durante questa fase sperimentale le bovine sono state stabulate in posta fissa dotata di pavimento morbido in gomma, al quale era aggiunta paglia tre volte al giorno per garantire buone condizioni di comfort e di pulizia. Ogni postazione è dotata di una mangiatoia individuale su bilancia che misura, automaticamente, il consumo di alimento. Ogni posta è anche dotata di un abbeveratoio che consente di misurare giornalmente il consumo individuale di acqua. La mungitura di queste bovine è stata eseguita tre volte al giorno (ore 6:00, 14:00 e 22:00).

La misurazione delle emissioni di metano è stata effettuata con due differenti strumenti (*laser* e *sniffer*) durante la mungitura. La metodica *laser* prevede l'impiego di un rilevatore *laser* (Laser Methane-Mini, Crown LTD, UK) il cui fascio è manualmente indirizzato sul musello della bovina per rilevare le concentrazioni di metano nell'espirsto. I dati rilevati sono immediatamente registrati e immagazzinati da uno *smartphone* collegato via *Bluetooth*, garantendo un buon controllo di misurazione se l'operatore è ben addestrato.

La metodica *sniffer*, si basa sull'uso di un apparato di misurazione in continuo del metano emesso dalle bovine quando sono nella stazione di mungitura, anche in assenza di un operatore. La strumentazione utilizzata nella ricerca (MooLogger, Tecnosens SPA, Brescia, Italia) consta di una pompa ad aspirazione continua, di una sonda installata nel punto di prelievo dell'aria ambientale (si veda figura 3) e di un tubo in poliuretano che conduce l'aria in una centralina di misurazione. All'interno della centralina di misurazione sono presenti due sensori NIRS che misurano la concentrazione di metano e di anidride carbonica. I dati sono quindi stoccati dal sistema. Il punto di prelievo dell'aria corrisponde alla parte apicale della mangiatoia di somministrazione del concentrato nel robot di mungitura. La sonda è localizzata a circa 30 cm di distanza dal musello della vacca impegnata nell'assunzione del concentrato durante la mungitura. In figura 3, la mangiatoia è priva delle lamiere metalliche di copertura descritte, rimosse temporaneamente per mostrare l'interno. L'aspirazione dell'aria e la determinazione della concentrazione di metano è effettuata dallo *sniffer* in maniera continuativa, secondo per secondo, nel corso delle 24 ore giornaliere. Per tale ragione, il rapporto dell'attività settimanale dal robot di mungitura è stato utilizzato per discriminare la presenza o assenza delle bovine all'interno della stazione. Le misurazioni condotte nei periodi di assenza delle bovine sono state elaborate al fine di ottenere una media giornaliera del livello basale della concentrazione di metano in ambiente. Tale valore è stato detratto alle misurazioni registrate con la presenza delle bovine in robot durante la mungitura. In tal modo è stato possibile distinguere, durante l'intera mungitura, gli istanti in cui erano visualizzabili dei picchi di emissione attribuibili alla rilevazione di un atto eruttativo. Tali momenti sono stati impiegati nel calcolo di un valore medio della concentrazione di metano rilevata per ciascuna mungitura.



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
VETERINARIE



Figura 3. Sonda di aspirazione e dello *sniffer* applicata nella mangiatoia del robot di mungitura.

Un esempio dei valori di metano rilevati dal sistema è riportato in figura 4. Il metano rilevato, la media giornaliera del valore basale e il picco di misurazione valido sono rispettivamente raffigurati dalla curva in verde, dalle linee verticali tratteggiate e dalla sagoma in rosso.

La messa a punto di un sistema che consentisse di gestire l'elevato numero di informazioni generate dai robot di mungitura ed in particolare dalle rilevazioni delle emissioni da parte degli *sniffers* è stata molto laboriosa non essendo disponibile alcun programma predefinito.

Diversi ricercatori del DIMEVET con elevate competenze informatiche hanno quindi messo a punto uno specifico *script* con il linguaggio di programmazione Python (Python Software Foundation, USA). Grazie a tale *script*, a cadenza settimanale, viene automaticamente prodotto un rapporto delle singole mungiture eseguite con le relative statistiche (durata complessiva degli istanti di misurazione, concentrazione media di metano e di anidride carbonica, produzione di latte, percentuale di proteina, grasso e lattosio e peso della bovina), eventualmente accompagnate da note di errore per le elaborazioni anomale.

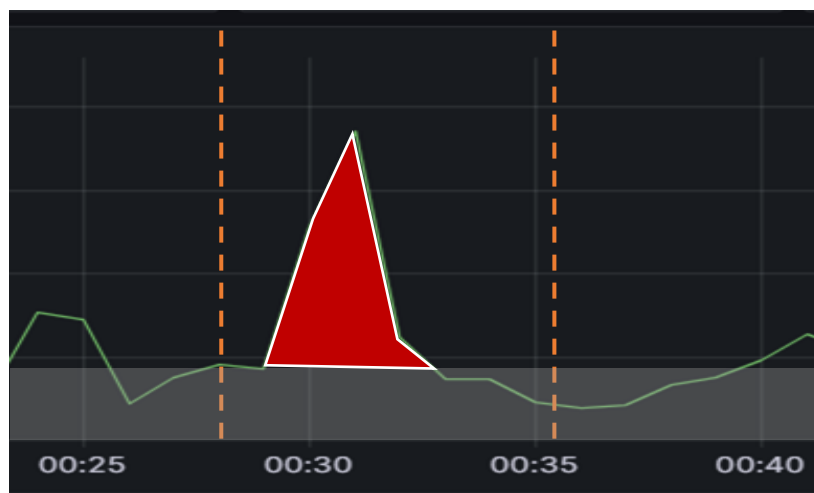


Figura 4. Esempio di identificazione degli istanti di misurazione valida a partire dal metanogramma.



Il gruppo di controllo è stato alimentato con unifeed standard mentre al gruppo trattato è stata somministrata una razione aggiunta del mangime liquido Red-Met vs3 EXP a due diversi dosaggi. Il primo dosaggio è stato utilizzato nelle prime 8 bovine e il secondo nelle successive.

La durata di ciascuna fase è stata di 5 settimane. In particolare, la prima settimana è stata di adattamento delle bovine alla legatura; le due settimane successive (periodo di controllo) sono state dedicate alle varie misurazioni previste dal protocollo sperimentale mentre le bovine erano alimentate con la razione di controllo e, infine, nelle ultime 2 settimane le vacche sono state alimentate con la razione comprendente il mangime liquido sperimentale (periodo di trattamento). Nel secondo periodo di ricerca il supplemento del mangime sperimentale è stato aumentato per valutare se l'efficacia potesse essere migliore.

In totale sono stati effettuati 80 campioni di alimenti e delle razioni, 32 campioni di latte, 32 campioni di feci e 32 di urine.

Composizione delle diete sperimentali (kg s.s /consumata/capo/giorno).

Alimenti/Tesi	Controllo	Trattamento 1, Dose 1	Trattamento 2, Dose 2
Medica fieno	8.2	8.2	8.2
Paglia	2	2	2
Frumento fieno	1.3	1.3	1.3
Mais/sorgo fiocco	7.2	7.2	7.2
Mangime Carro	6.5	6.5	6.5
Mangime liquido	0.92
Mangime liquido con additivo	...	0.46	0.92
Mangime robot	3.4	3.4	3.4

Composizione analitica delle diete sperimentali (dati medi di 40 analisi; dati espressi in % della sostanza secca).

Parametro	Controllo	Trattamento 1, dose1	Trattamento 2, Dose 2
Proteine Grezze	14.69	14.56	13.45
Amido	20.12	21.00	20.94
aNDFom	37.13	38.38	41.09
ADF	26.19	27.48	28.41
uNDF240	13.82	14.38	14.90
pdNDF240	23.31	24.00	26.19
Lipidi grezzi	3,52	3,51	3,48
Ceneri	7.39	7.00	6.71

È stata valutata la correlazione tra le emissioni di metano misurate con *sniffers* (Moologger, Tecnosens, Italia) e Laser (Laser Methane Mini, Cowcron, UK) misurate simultaneamente.

In totale sono state raccolte 135 registrazioni, ma 77 sono state scartate a causa del tempo insufficiente trascorso con il musello all'interno della mangiatoia del robot.

Per studiare la relazione tra i due metodi di misurazione (*laser e sniffers*) è stata utilizzata la regressione lineare con analisi di correlazione di Pearson. Sono state analizzate 58 registrazioni in totale. Il *laser* ha registrato $97,11 \pm 40,63$ ppm*m, mentre lo *sniffer* ha registrato $2,31 \pm 1,11$ mcg/s.



Tra i due dispositivi è stato rilevato un R^2 del 51% (RSQME = 26,61; $P < 0,01$) e una correlazione del 71% (Covarianza 29,61).

Tutti i dati ottenuti in questa fase sperimentale, sono stati analizzati mediante il software statistico (JMP v17) applicando un modello misto che teneva in considerazione il trattamento dietetico (CTR, TRT dose 1 e 2) e l'unità sperimentale (singolo animale), le rilevazioni giornaliere sono state considerate dal modello come misure ripetute.

Sintesi dei risultati ottenuti nella fase 2 della ricerca.

Parametro	CTR	TRT Dose 1	TRT Dose 2	SE	p-value
Peso vivo, kg	679	710	707	28.74	0.48
Ingestione Mangime al Robot, kg/SS/d.	2.68	2.70	2.72	0.58	0.95
Ingestione di Unifeed, kg/SS/d.	26.26B	27.00B	27.49B	1.38	0.05
Ingestione totale, kg/SS/d.	28.94C	29.70B	30.21C	1.27	0.04
Ruminazione, min/d.	512	499	485	31.48	0.53
Latte, kg/capo/d.	45.38B	45.70AB	46.16A	1.4	0.05
Grasso, %	3.62	3.58	3.60	0.19	0.13
Proteina, %	3.18	3.29	3.20	0.06	0.87
Lattosio, %	4.83	4.81	4.82	0.06	0.88
Cellule somatiche n/ml	372	288	255	187	0.65
Urea, mg/dl	19.04	20.55	20.54	1.09	0.32
Azoto urinario, g/d	151.49	164.33	161.33	7.2	0.32
Metano emesso stimato con Laser, g/d	564A	501B	478C	31.71	0.05
Metano emesso stimato con Sniffer, g/d	472	461	453	14,71	0.36
Sostanza secca feci, % s.t.q.	16.28	16.75	15.65	0.2	0.18
Sostanza organica feci, %ss	88.28	88.75	88.65	0.2	0.18
Proteine grezze feci, %ss	15.52	15.42	15.37	0.22	0.63
Amido Feci, %ss	2.14	2.15	2.12	0.16	0.94
aNDFom, feci, %ss	62.58	62.92	62.78	0.42	0.72
ADF feci, %ss	46.78	46.54	46.66	0.42	0.83
ADL feci, %ss	19.88	20.23	20.21	0.44	0.58
uDNF feci, %ss	35.9	36.88	37.02	0.92	0.37
Digeribilità Sostanza organica, %	62.83	62.43	61.43	0.97	0.29
Digeribilità Proteina grezza, %	58.58	55.22	53.53	1.54	0.02
Digeribilità Amido, %	95.77	95.02	95.87	0.38	0.85
Digeribilità aNDFom, %	34.39C	36.59B	38.03A	1.49	0.04
Digeribilità pdNDF, %	30.53B	31.13AB	33.43A	1.5	0.05
pH medio giornaliero	6.06	6.03	5.96	0.09	0.50
pH minimo giornaliero	5.47	5.48	5.57	0.11	0.55
pH massimo giornaliero	6.40	6.35	6.33	0.10	0.67
pH < 5.8, minuti/giorno	146	257	342	185	0.48



Dai risultati ottenuti nella fase 2 delle ricerche è stato possibile confermare che il mangime liquido Red-Met vs3 EXP non ha modificato la capacità di ingestione e ha prodotto un calo della liberazione di metano che, tuttavia, è risultata evidente solo con le rilevazioni *laser*. La mancanza di significatività delle differenze di emissione registrate con *sniffers* è dovuta al basso numero di rilievi effettuati durante questa sperimentazione; tuttavia anche con la tecnica *sniffers*, in valore assoluto, si è potuto osservare una diminuzione delle emissioni di metano con l'uso del mangime liquido Red-Met vs3 EXP.

Azione n. 3 – Prove in stalla

Come programmato nel disegno progettuale, obiettivo di queste prove è stato quello di valutare, in bovine da latte nelle normali condizioni di allevamento, l'azione dei mangimi liquidi sperimentali.

La ricerca, della durata di 120 giorni, è stata condotta presso la stalla sperimentale dell'università già precedentemente descritta. Per la ricerca sono state impiegate di 96 bovine in lattazione suddivise in 2 gruppi, (46 bovine nel gruppo di controllo e 50 in quello trattato) omogenei per peso vivo (645 kg in media), numero di lattazioni (2,1 in media), giorni di lattazione (179 in media), tempi di ruminazione, produzione (40 kg/capo/d in media) e qualità del latte.

Il gruppo di controllo è stato alimentato con unifeed standard che ha previsto l'impiego di mangime liquido senza additivi (Liquid Milker) mentre al gruppo trattato è stata somministrata una razione bilanciata con l'aggiunta del mangime liquido addizionato di additivi (Red-Met vs3 EXP). La durata della prova è stata di 120 giorni.

I consumi medi di alimento per gruppo sono stati calcolati misurando le quantità giornaliere scaricate e i residui. Le analisi delle razioni scaricate e dei residui hanno consentito di valutare il consumo medio giornaliero di sostanza secca. I dati di carico e scarico sono stati precisamente raccolti grazie al sistema Algomilk di cui è dotato il carro miscelatore in uso presso la struttura. Dopo 40, 80 e 120 giorni dall'inizio, sono stati raccolti campioni individuali di latte che sono stati analizzati per le caratteristiche compositive. Negli stessi tempi sono stati prelevati campioni di urine e feci per valutare la digeribilità apparente della sostanza organica e le escrezioni azotate.

Razioni (kg di sostanza secca/giorno) consumate nel corso della fase 3 delle ricerche.

Alimenti	Controllo	Trattato
Medica fieno	6,20	6,35
Paglia di grano	1,81	1,82
Fruento fieno	1,32	1,31
Mais/sorgo fiocco	7,15	7,30
Mangime Carro	6,30	6,40
Mangime liquido senza additivo	0,92	...
Mangime liquido con additivo	...	0,93
Mangime robot	3,41	3,41
Sostanza secca consumata	27,29	27,47

Composizione analitica delle razioni utilizzate nella fase 3 delle ricerche (medie di 30 determinazioni).

Parametro	Controllo	Trattato
-----------	-----------	----------



Sostanza secca, % s.t.q.	85,51	84,98
Proteina grezza, % s.s.	14.56	15.05
Amido, % s.s.	22.98	22.46
aNDFom, % s.s.	35.83	35.19
ADF, % s.s.	24.36	25.42
uNDF240, % s.s.	11.96	12.38
pdNDF240, % s.s.	23.87	22.81
Lipidi grezzi, % s.s.	3.48	3.98
Ceneri, % s.s.	7.45	6.98

Le emissioni di metano sono state registrate giornalmente e individualmente durante la mungitura tramite i sensori collocati nelle mangiatoie dei robot, secondo quanto già descritto.

Con l'uso degli sniffers sono state rilevate 36307 emissioni; di queste, ad una prima analisi operata grazie allo *script* all'uopo preparato cui si è fatto precedentemente cenno, 29386 rilevazioni sono state ritenute valide per la stima del metano emesso. Ciò significa che il numero di rilevazioni non valide è stato del 19,1% rispetto alle mungiture effettuate.

Tutti i dati raccolti sono stati quindi analizzati mediante un software statistico (JMP v17) applicando un modello misto che teneva in considerazione il trattamento dietetico (Controllo e Trattato) e l'unità sperimentale (singolo animale all'interno del gruppo); le rilevazioni giornaliere sono state considerate dal modello come misure ripetute.

Risultati sintetici ottenuti nella fase 3 della ricerca.

Gruppo	Controllo	Trattato	SE	p-value
Metano emesso (Sniffer), g/giorno	469	434	25.69	<.01
Latte, kg/capo/giorno	41.35	40.93	1.29	0.66
Grasso, %	4.12	4.10	0.02	0,42
Proteina, %	3.47	3.48	0.04	0.31
Lattosio, %	4.87	4.84	0.01	0,25
Cellule somatiche (n°/100 ml *1000)	271	239	168	0.58
Urea, mg/dl	25.35	18.10	1.14	<.01
Azoto urinario, g/d	201.05	148.26	8.5	<.01
Sostanza secca delle Feci, %stq	13,83	13,50	0,15	0,28
Sostanza Organica, feci	88.7	87.55	0.32	0.02
Proteina grezza, feci, % s.s.	15.12	16.97	0.25	0.02
Amido, feci, % s.s.	3.3	3.47	0.12	0.3
aNDFom, feci, % s.s.	55.83	59.96	0.97	0.05
ADF, feci, % s.s.	43.67	42.42	0.52	0.10
ADL, feci, % s.s.	19.09	18.29	0.45	0.23
uDNF, feci, % s.s.	33.71	31.62	0.46	<.01
Digeribilità Sostanza Organica, %	65.93	62.73	0.5	<.01



Digeribilità della proteina, %	60.68	55.69	1.1	<.01
Digeribilità Amido, %	94.91	93.92	0.23	<.01
Digeribilità aNDFom, %	41.73	37.69	0.89	<.01
Digeribilità pdNDF, %	62.64	58.16	1.38	0.03

I risultati ottenuti nella fase 3 delle ricerche offrono interessanti indicazioni di seguito sinteticamente discussi:

- 1- l'utilizzo di mangime liquido addizionato di additivi (Red-Met vs3 EXP) non ha modificato l'appetibilità delle razioni; la sostanza secca consumata si è, infatti, attestata su valori del tutto analoghi fra i gruppi sperimentali (27,29 vs 27,49 rispettivamente nei gruppi controllo e trattato);
- 2- l'impiego di mangime Red-Met vs3 EXP ha ridotto significativamente l'emissione di metano misurata con *sniffers*; le differenze si sono attestate su valori inferiori del 21,2% rispetto agli animali di controllo;
- 3- il mangime liquido utilizzato ha ridotto significativamente anche l'escrezione di azoto ureico nel latte (-20,7%) e nelle urine (-26,3% circa);
- 4- il mangime liquido addizionato ha ridotto significativamente la digeribilità apparente delle proteine delle razioni e della fibra. Tale risultato, evidente dalle analisi delle feci, non ha tuttavia compromesso le risposte produttive e qualitative del latte che sono state del tutto analoghe fra i gruppi sperimentali;
- 5- sulla scorta dei dati disponibili in bibliografia si può ipotizzare che il mangime liquido Red-Met vs3 EXP abbia ridotto la degradabilità ruminale delle proteine alimentari riducendo altresì la digeribilità intestinale delle quote escape; ciò giustifica l'aumento del contenuto di proteine grezze delle feci. L'azoto fecale è molto meno impattante di quello urinario relativamente alla liberazione di prodotti azotati in atmosfera data la sua maggiore resistenza all'azione dei batteri proteolitici.

Azione n. 4 - Prove di caseificazione e analisi dei formaggi

Obiettivo dell'azione è stato quello di verificare l'effetto dell'uso del mangime sperimentale utilizzato nella fase 3 delle ricerche sui prodotti derivati del latte. Lo scopo è stato capire se ci potessero essere dei riflessi sulle caratteristiche del prodotto che chiude la filiera giungendo al consumatore.

Il latte prodotto dai due gruppi sperimentali nell'azione 3 è stato raccolto separatamente e una parte di esso utilizzato per la produzione di formaggi (8 formaggelle da 1,5kg ciascuna per ciascuna tesi) poi analizzate chimicamente e valutate per il profilo sensoriale mediante analisi qualitativa-descrittiva (QDA, impiegando un panel di giudici, addestrato e selezionato secondo le norme ISO 8586:2014 I giudici hanno valutato eventuali differenze visive, olfattive, aromatiche, gustative e tattili delle formaggelle

In tabella sono riportate le caratteristiche dei latti di massa utilizzati per le caseificazioni.

Caratteristiche dei latti utilizzati per la produzione dei formaggi.

Gruppo	Grasso, %	Proteine, %	Lattosio, %	Cellule somatiche, n/100ml	Urea, mg/100ml
Controllo	3.66	3.42	4.81	267	24.5



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
VETERINARIE

Trattato	3.64	3.40	4.84	193	22.3
----------	------	------	------	-----	------

In tabella è riportata la composizione media delle formaggelle ottenute dai latti prodotti dai due gruppi sperimentali descritti nell'azione 3 del presente report.

Composizione delle formaggelle (medie \pm DS di 8 campioni per gruppo)

Gruppo		Controllo	Trattato
Umidità	% s.t.q.	29,2 \pm 1,03	29,2 \pm 1,3
Proteina grezza	% s.s.	27,7 \pm 0,09	27,9 \pm 0,39
Lipidi grezzi	% s.s.	27,8 \pm 1,71	26,8 \pm 2,6
Ceneri	% s.s.	<u>3,4 \pm 0,14</u>	<u>3,7 \pm 0,14</u>

Un panel di giudici ha valutato i campioni in doppio (8 C-controllo e 8 T-Trattato) utilizzando una scheda descrittiva specifica per i formaggi vaccini a breve stagionatura. Tutti i descrittori sono stati valutati impiegando una scala continua strutturata con valori compresi tra 1 e 10 (1= assenza di sensazione, 10= massima intensità della sensazione). I descrittori analizzati, sono stati i seguenti:

Descrittori visivi: colore, presenza/assenza microcchiatura.

Descrittori olfattivi: odore burro-panna, odore siero-yogurt-tosone, odori anomali (propionico, butirrico, cavolo, ecc).

Descrittori gustativi: dolce, acido, amaro.

Descrittori aromatici: aroma burro-panna, aroma siero-yogurt-tosone, aroma vegetale (erba, prato, ecc), aromi anomali (propionico, butirrico, cavolo, ecc)

Descrittori tattili: umidità, elasticità

I campioni sono stati porzionati in provini della dimensione di circa 8 x 1,5 x 1,5 cm e ad ogni giudice per ogni campione per ogni replica sono stati serviti 2 provini alla temperatura di servizio di 16°C \pm 2°.

L'elaborazione dei dati è stata effettuata utilizzando il pacchetto statistico IMB SPSS vers.29.0. Oltre alla statistica descrittiva (media, deviazione standard), per il confronto fra i valori medi ottenuti tra campioni dei due trattamenti è stato applicato il test T di Student per campioni indipendenti (α 0,05). Per le rappresentazioni grafiche si sono impiegati gli spider web di Excel.

Risultati

Test descrittivo

Il test è stato svolto da 8 giudici, i campioni sono stati presentati in modalità blind, conordine di assaggio randomizzato tra i giudici e fra le diverse sessioni.

Statistiche descrittive (media e deviazione standard) e significatività al test di T per campioni indipendenti (α 0.05) per formaggelle Lotto T e Lotto C.

Descrittori	LOTTO T		LOTTO C		Sig.
	media	dev.st.	media	dev. st.	
Colore	4,3	0,7	4,5	0,6	n.s
Odore burro, panna	5,5	0,8	5,6	0,7	n.s.

Via Tolara di Sopra, 50 | 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) | Italia

Indirizzo PEC: dimevet.dipartimento@pec.unibo.it



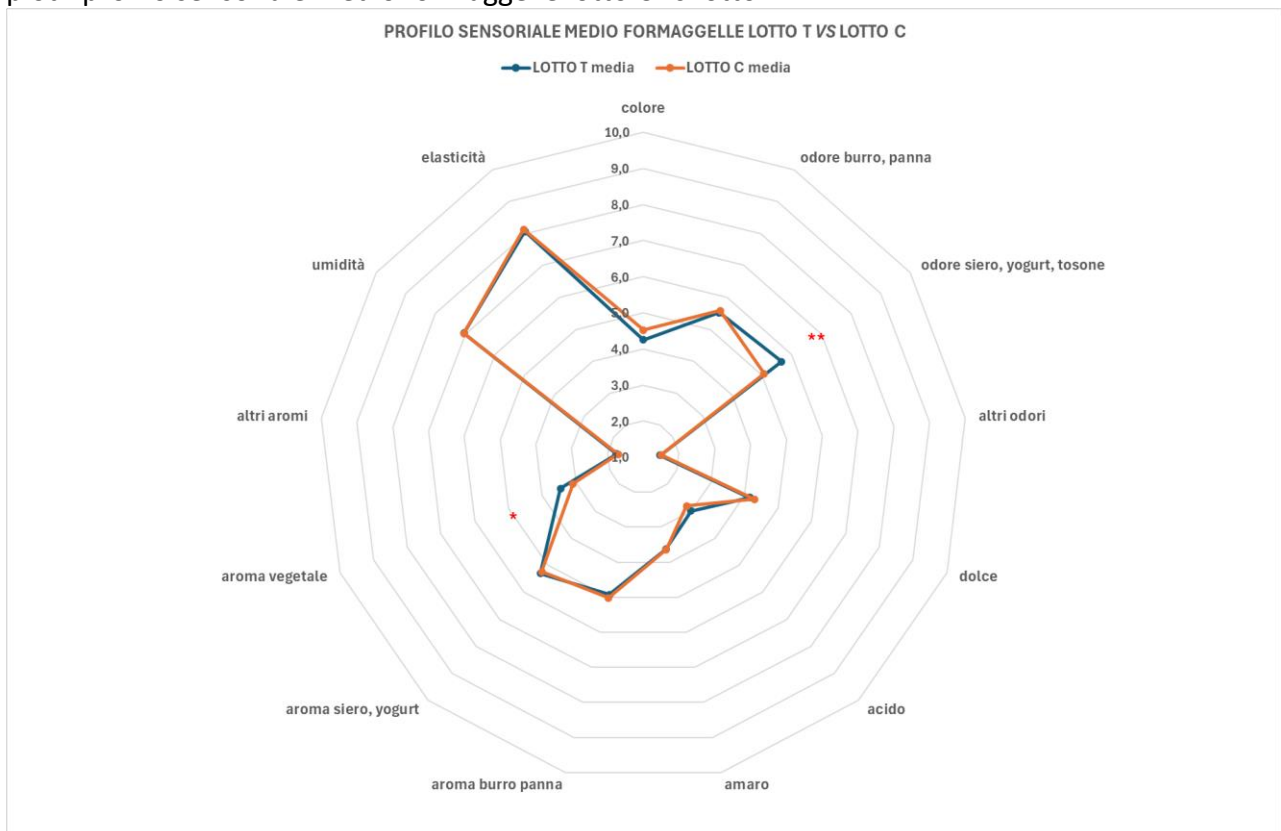
ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
VETERINARIE

Odore siero, yogurt, tosone	5,7	0,9	5,1	1,0	**
Altri odori	1,5	0,5	1,5	0,5	n.s.
Dolce	4,2	0,7	4,3	0,6	n.s.
Acido	3,0	0,8	2,8	0,7	n.s.
Amaro	3,6	0,8	3,6	0,8	n.s.
Aroma burro panna	4,9	0,8	5,0	0,7	n.s.
Aroma siero, yogurt, tosone	5,3	0,8	5,2	0,8	n.s.
Aroma vegetale	3,5	0,9	3,1	0,7	*
Altri aromi	1,8	0,6	1,7	0,5	n.s.
Umidità	7,0	0,7	7,0	0,5	n.s.
Elasticità	8,1	0,7	8,1	0,8	n.s.

Significatività: n.s. nessuna differenza statisticamente significativa fra le differenze delle medie; * differenza statisticamente significativa fra le differenze delle medie per $p < 0.05$; ** differenza statisticamente significativa fra le differenze delle medie per $p < 0.01$.

Nel grafico viene riportato lo spider plot, che descrive il profilo sensoriale medio dei due lotti: spider plot - profilo sensoriale medio formaggelle lotto C vs lotto T



Statistiche descrittive (media e moda) per presenza/assenza di micro occhiatura per formaggelle Lotto T e Lotto C.

Via Tolara di Sopra, 50 | 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) | Italia
Indirizzo PEC: dimevet.dipartimento@pec.unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
VETERINARIE

Descrittore	LOTTO T		LOTTO C	
	Media	Moda	Media	Moda
Micro occhiatura*	1,6	2,0	1,4	1,0

*Valori pari a 1= presenza microocchiatura; valori pari a 2= assenza di microocchiatura

Nel confronto fra i valori medi delle due tesi e dal grafico si può osservare che i profili risultano sovrapponibili per la maggior parte dei descrittori, fatta eccezione per l'odore di siero, yogurt, tosone e per l'aroma di vegetale riconducibile principalmente alla nota di erba fresca. Il punteggio attribuito per l'indicatore odore siero, tosone risulta più elevato per il lotto T (5,7) rispetto al lotto C (5,1). Per l'aroma vegetale, il lotto T presenta valori superiori al livello poco intenso (3,5) mentre il lotto C pari al livello poco intenso (3,1). Le differenze fra le medie per odore siero, tosone tra i due lotti al test di T sono risultate statisticamente significative per $p < 0,01$, così pure per l'aroma vegetale a livello $p < 0,05$.

Le formaggelle delle due tesi presentano entrambe un colore giallo paglierino, per il lotto C si evidenzia una maggior presenza di micro occhiatura. I due lotti hanno entrambi note olfattive di burro e panna abbastanza intense (tesi C 5,6 e tesi T 5,5). In bocca prevale il sapore dolce (tesi C 4,3 e tesi T 4,2) su quello amaro (3,6) e acido (tesi T 3,0 e tesi C 2,8).

All'esame aromatico l'aroma di burro panna si attesta pari al valore medio della scala (tesi C 5,0 e tesi T 4,9), mentre leggermente superiore a "abbastanza intenso" risulta la nota lattica acida riconducibile a siero e tosone (tesi T 5,3 e tesi C 5,2). Le due tesi sia per odore che per aroma non presentano off-flavour, infatti, i descrittori altri odori e altri aromi si attestano su valori di poco superiori a 1 (per niente intenso). Per quanto riguarda la struttura dei due lotti per i descrittori di umidità ed elasticità le due tesi presentano profili perfettamente coincidenti: evidenziando un'elevata umidità (7,0) paragonabile sulla scala a quella dell'albume d'uovo ed una elasticità molto elevata pari a 8,1, di poco inferiore al riferimento del "wurstel da cocktail".

In definitiva i profili sensoriali medi delle formaggelle di latte vaccino delle due tesi (C e T) sono risultati sovrapponibili per gli aspetti visivi, gustativi, tattili e per la maggior parte dei descrittori olfattivi e aromatici. Sono emerse differenze statisticamente significative esclusivamente tra le due tesi per le caratteristiche odore "siero/tosone" ($p < 0,01$) e per l'aroma di "vegetale-erba fresca" ($p < 0,05$). Le formaggelle del lotto T presentano una nota olfattiva lattica acida come siero/tosone e una nota aromatica vegetale superiore al lotto C.

Azione n. 5 - Impronta carbonica del mangime complementare

Obiettivo di questa azione è stato valutare l'impronta carbonica del mangime complementare Red-Met vs3 EXP ottenuto nel progetto, ossia il potere di riscaldamento globale (GWP) in kg di CO₂ equivalenti, associato alla produzione di un chilogrammo di mangime.

Per completezza sono state valutate anche l'impronta carbonica del mangime liquido di controllo (sulla base delle composizioni indicate) e delle due razioni utilizzate nell'azione 3.

In considerazione dell'impossibilità di raccogliere con questionario i dati produttivi di ciascuna materia prima costituente i diversi mangimi, si è impiegata come fonte dati di CO₂ equivalenti associati al kg di prodotto la banca dati AGRIBALYSE 3.1.1: questo è un database francese che fornisce i valori di impronta carbonica (IC) per il settore agricolo e alimentare. Il database

Via Tolara di Sopra, 50 | 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) | Italia

Indirizzo PEC: dimevet.dipartimento@pec.unibo.it



comprende gli IC di 2517 prodotti agricoli e alimentari prodotti e/o consumati in Francia. I dati raccolti provengono da una rete di istituzioni di ricerca consorziate e dalla collaborazione con Ecoinvent (<https://ecoinvent.org/>). Il supporto software impiegato è stato open LCA (<https://www.openlca.org/>).

Il tannino liquido di castagno non è presente nella banca dati, e per il valore di GW associato a questo prodotto si è utilizzato il valore riportato da Ding et al ¹ che hanno condotto studi di Life Cycle Assessment per diversi processi di estrazione del tannino da legno di abete rosso.

L'impronta carbonica delle due formulazioni, espresse sul kg di prodotto tal quale, risulta sovrapponibile; quindi, ci si può attendere che la sostituzione tra i due mangimi liquidi non vada ad influenzare quello che può essere il contributo di questa componente della razione all'impronta carbonica dell'alimentazione delle lattifere, quindi del latte.

Utilizzando la medesima banca dati e i risultati per i due mangimi liquidi, è stata calcolata l'impronta carbonica delle razioni somministrate alle bovine nell'azione 3.

In generale si può affermare che il mangime complementare Red-Met vs3 EXP messo a punto e testato nel progetto ha una impronta carbonica che non differisce dal prodotto di linea che andrebbe a sostituire, tanto meno ha influenzato l'IC della razione in cui è stato inserito.

Considerazioni finali

Le ricerche condotte nell'ambito del progetto **Liquid_Green_Gas_Solution** hanno consentito di:

- a- mettere a punto un sistema *in vitro* funzionale per valutare l'efficacia di additivi alimentari utili, in particolare, a studiare come modulare le emissioni di metano di origine ruminale;
- b- l'utilizzo di mangime liquido addizionato del *blend* di additivi individuati come efficaci con le prove *in vitro*, non ha modificato l'appetibilità delle razioni che si è attestata nella prova *in vivo* su valori del tutto analoghi fra i gruppi sperimentali (27,29 vs 27,49 rispettivamente nei gruppi controllo e trattato);
- c- l'impiego di mangime liquido addizionato con additivi ha ridotto significativamente l'emissione di metano enterico delle bovine misurata con *sniffers*; le differenze si sono attestate su valori del 21, 17%; tali risultati sono in linea con le risposte osservate nelle prove *in vitro*;
- d- il mangime liquido addizionato di additivi utilizzato ha ridotto, in accordo con le attese, significativamente l'escrezione di azoto ureico nel latte (-20,7%) e nelle urine (-26,3% circa);
- e- il mangime liquido addizionato di additivi, al contrario di quanto osservato *in vitro*, ha ridotto significativamente la digeribilità apparente delle proteine delle razioni e della fibra senza tuttavia compromettere le risposte produttive e qualitative del latte che sono state del tutto analoghe fra i gruppi sperimentali;
- f- le caratteristiche sensoriali dei formaggi ottenuti dai lattini prodotti dai gruppi sperimentali hanno presentato differenze assolutamente modeste e tali da non essere considerate pregiudizievoli per la qualità dei formaggi ottenuti con l'impiego di mangime liquido addizionato con additivi;

¹ Ding T, Bianchi S, Ganne-Chédeville C, Kilpeläinen P, Haapala A, Rätty T (2017). Life cycle assessment of tannin extraction from spruce bark. iForest 10: 807-814. – doi: 10.3832/ifer2342-010



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE MEDICHE
VETERINARIE

- g-** il mangime liquido Red-Met vs3 EXP nella sua formulazione presenta una impronta carbonica sovrapponibile al prodotto che andrebbe a sostituire nella razione (controllo) e pertanto non si evidenzia un suo possibile effetto sull'IC della razione in cui è stato inserito.