

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AGRICOLTURA, LE FORESTE, LA NATURA E L'ENERGIA – UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA (VITERBO)

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE

Programma di Azione Nazionale per l'Agricoltura Biologica e i Prodotti Biologici per gli anni 2008 e 2009 – Azione 2.2.

PROGRAMMA DI RICERCA: Studio della valenza nutrizionale ed ottimizzazione di pratiche d'impiego di derivati vegetali nell'alimentazione di ruminanti in produzione biologica (ACRONIMO DI PROGETTO NUTRI.FITO.BIO)

RELAZIONE TECNICO-SCIENTIFICA DI SINTESI SULLO STATO DI

AVANZAMENTO DEL PROGETTO

Gennaio 2011

1. Premesse

Il Programma di Ricerca in oggetto, coinvolge due Unità Operative (U.O.): il Dipartimento DAFNE dell'Università della Tuscia di Viterbo (DAFNE-UNITUS, Coordinatore Prof. B- Ronchi) e l'Istituto di Zootecnica dell'Università Cattolica del S. Cuore di Piacenza (IZ-UCSC, ref. sci. Dott. P. Bani). Il Programma è teso ad individuare in condizioni controllate (*e.g.* mediante saggi *"in vitro"* e quindi *"in vivo/ex vivo"*) e in condizioni di campo principi e composti d'origine vegetale, compatibili con il metodo d'allevamento biologico, in grado di risolvere o comunque mitigare alcune criticità nutrizionali (carenza in oligo-elementi e vitamine) intrinsecamente connesse con la conduzione biologica degli allevamenti da latte, in particolare per i piccoli ruminanti.

2. Quadro di riferimento progettuale

Il Programma s'inquadra all'interno del Reg. CE 889/2008 che prescrive le condizioni per sopperire alle esigenze nutrizionali di base degli animali, prevenendo malattie e dismetabolie, ricorrendo ad interventi alimentari d'origine vegetale conformi al Reg. citato. Il Programma si articola in due fasi di cui la prima (Fase 1), della durata di 6 mesi, ha riguardato prevalentemente le fasi di avvio, di raccolta informazioni su principi e formulati da testare e la sperimentazione in condizioni controllate. La Fase 2, della durata di mesi 12 fino alla chiusura del Programma di Ricerca, sarà prevalentemente incentrata sulla pianificazione e l'implementazione delle attività di sperimentazione *"on farm"* con relative azioni di dimostrazione e divulgazione dei risultati. In previsione di avviare e concludere la sperimentazione *"on farm"* nel corso dell'ultimo semestre del programma, la gestione delle attività propedeutiche a tale attività sperimentale, per questioni pratiche, è stata organizzata, già a livello progettuale, in 2 Work Packages (WP 2 e WP 3) comprendenti ciascuno diversi Task (T) di cui, nel seguito, verrà relazionato il relativo stato d'avanzamento. I risultati relativi all'implementazione del WP 1 del WP 2 (T.2.1 e T.2.2) sono già stati oggetto di una precedente relazione di stato avanzamento dei lavori a cui si rimanda per una lettura in chiave cronologica delle attività svolte e dei risultati conseguiti.

3. Completamento Fase 1 – saggi di degradabilità ruminale

Obiettivo di questa seconda parte di attività relativa all'azione di verifica *in vitro* dell'attività antiproteolitica di prodotti di origine vegetale era innanzitutto la verifica della possibilità di utilizzare sottoprodotti agricoli di basso costo, con un significativo contenuto in sostanze tanniche o potenzialmente dotati di oli essenziali e compatibili con il regime biologico di allevamento degli animali, per il contenimento della proteolisi ruminale. In particolare ci si è rivolti ai materiali vegetali provenienti dalle medesime specie da cui erano stati estratti i fitoestratti testati nella precedente fase: castagno e vite. Della prima essenza si sono utilizzate le foglie e le bucce dei frutti, ottenute da coltivazioni biologiche. Anche nel secondo caso ci si è approvvigionati da un viticoltore locale che opera in regime biologico e vinifica direttamente la propria uva. Si sono ottenute vinacce, prevalentemente da uva bonarda

e barbera, e da parte di queste sono stati separati manualmente i vinaccioli. A questi prodotti sono state associate le foglie di due specie di agrumi, limone e arancio, per la loro potenziale azione antibatterica. Le foglie sono state fornite da un'azienda siciliana in conversione. Tutti i materiali sono stati essiccati a 55 °C e macinati con mulino a coltelli dotato di griglia da 1 mm.

La metodologia sperimentale impiegata ricalca quella già descritta in occasione della prima relazione SAL a cui si rimanda per i dettagli operativi. In particolare, le prove *in vitro* sono state effettuate utilizzando un sistema di fermentazione costituito da una batteria di minifermentatori in vetro di capacità nominale di 100 ml. La tecnica prevede l'incubazione del campione (substrato) con liquido ruminale (inoculo) in presenza di un medium composto principalmente da una soluzione tampone e altre soluzioni volte a fornire fattori di crescita e creare un ambiente anaerobico favorevole alla crescita dei batteri ruminali.

Come substrato per le fermentazioni è stato impiegata dell'erba medica raccolta in campo in stadio di prefioritura, subito essiccata in stufa a 50 °C e quindi macinata con mulino a coltelli utilizzando una griglia da 1 mm. Tale substrato è stato impiegato in misura di 0,5 g di materiale tal quale per unità di fermentazione. Immediatamente prima dell'aggiunta dell'inoculo ruminale, nelle unità di fermentazione delle tesi sperimentali sono stati aggiunti i materiali vegetali oggetto di indagine, sotto forma di dispersione acquosa e in ragione del 10% del substrato (dose massima ritenuta praticamente utilizzabile nella pratica di allevamento). Le tesi di controllo negativo sono state allestite con solo inoculo ruminale, quindi senza alcun substrato, e con l'aggiunta dei tannini alle medesime dosi. Per ogni tesi, di controllo (senza substrato incubato) e non (con medica come substrato) ne è stata allestita una analoga, quindi con le medesima quantità di substrato e tannini) con l'ulteriore aggiunta di PEG (polietilenlicole) 6000. Il PEG viene suggerito per la sua capacità di bloccare i tannini inattivandoli e quindi isolare, per differenza tra le tesi con o senza PEG, l'effetto dovuto ai tannini da quelli attribuibili ad altri componenti degli additivi. I controlli hanno riguardato l'evoluzione del contenuto in ammoniaca, controllato dopo 6, 12 e 24 ore di incubazione.

I risultati relativi alle concentrazioni di ammoniaca sono illustrati nelle Figure 1-3 rispettivamente per il tempo di 6 ore (grafico 1), 12 ore (grafico 2) e 24 ore (grafico 3) di incubazione *in vitro*.

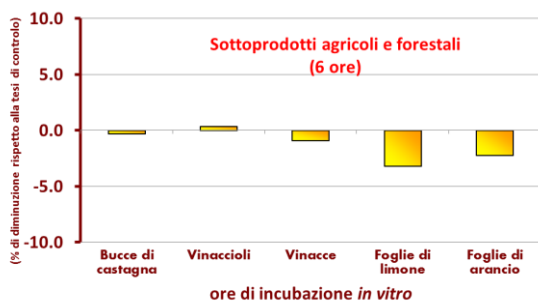


Figura 1 - Effetto dell'impiego di sottoprodotti agro-forestali sulla produzione di ammoniaca *in vitro* utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori si riferiscono al controllo effettuato dopo 6 ore di incubazione *in vitro* e sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi di controllo.

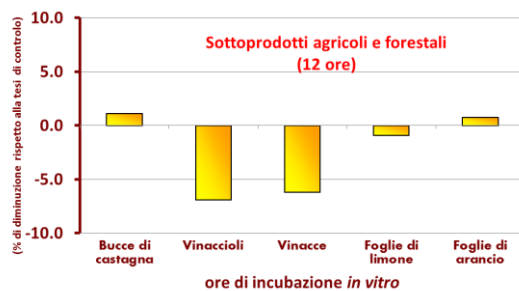


Figura 2 - Effetto dell'impiego di sottoprodotti agro-forestali sulla produzione di ammoniaca *in vitro* utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori si riferiscono al controllo effettuato dopo 12 ore di incubazione *in vitro* e sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi di controllo.

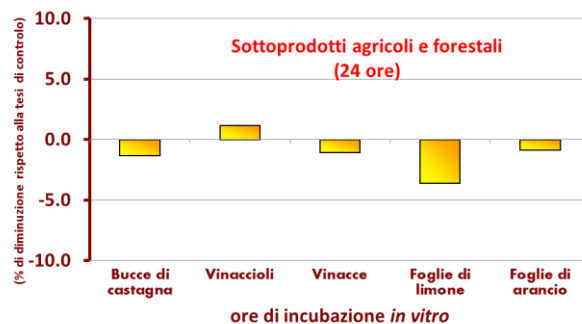


Figura 3 - Effetto dell'impiego di sottoprodotti agro-forestali sulla produzione di ammoniaca in vitro utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori si riferiscono al controllo effettuato dopo 24 ore di incubazione in vitro e sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi i controllo.

Da essi si evince chiaramente come nessuno dei prodotti testati abbia esercitato un'azione di contenimento della proteolisi microbica ruminale e sia invece stata prevalente l'apporto, sia pure contenuto, di ulteriore sostanza organica che ha aumentato leggermente la quota di ammoniaca liberatasi rispetto alla tesi di controllo. Questo è verosimilmente da attribuirsi in larga misura all'insufficiente contenuto in polifenoli di questi materiali, risultato anche inferiore alle previsioni, ma anche probabilmente alla minore disponibilità di queste sostanze rispetto agli estratti puri impiegati nel corso del primo semestre d'implementazione del Programma di Ricerca.

Considerati i risultati ottenuti, non si è ritenuto utile ricercare altri materiali analoghi anche se con un contenuto in tannini leggermente superiore. Si è invece valutato l'effetto di un'alga bruna già nota e impiegata in alimentazione animale, l'*Ascophyllum nodosum* che risulta ricca di polifenoli "tannino-simili". La metodologia sperimentale utilizzata è stata la medesima sopra descritta, impiegando l'alga - essiccata - alle medesime dosi dei tannini "puri", quindi allo 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 % dell'erba medica impiegata come substrato. I risultati relativi all'effetto sulla degradazione proteica sono illustrati nei grafici 5, 6 e 7, rispettivamente per il tempo di 6 ore (Fig. 4), 12 ore (Fig. 5) e 24 ore (Fig. 6) di incubazione *in vitro*. L'effetto è stato evidente a tutti i dosaggi superiori allo 0.5 %, e molto marcato soprattutto con le dosi del 2.0 e 4.0 % del substrato. Tuttavia, anche la dose dell'1% ha considerevolmente ridotto la produzione di ammoniaca, soprattutto a 6 e 24 ore.

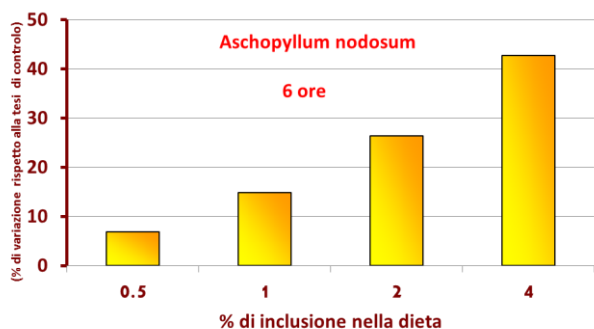


Figura 4 - Effetto dell'impiego di *Ascophyllum nodosum* sulla produzione di ammoniaca in vitro utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori si riferiscono al controllo effettuato dopo 6 ore di incubazione *in vitro* e sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi i controllo senza l'alga.

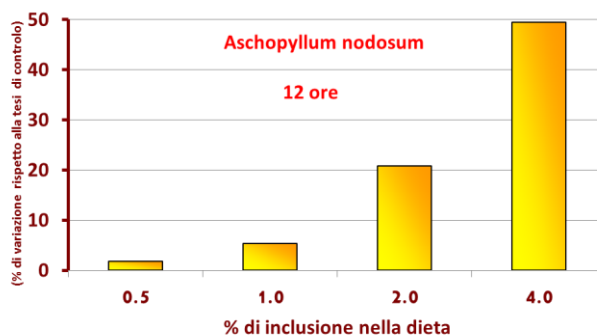


Figura 5 - Effetto dell'impiego di *Ascophyllum nodosum* sulla produzione di ammoniaca in vitro utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori si riferiscono al controllo effettuato dopo 12 ore di incubazione *in vitro* e sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi i controllo senza l'alga.

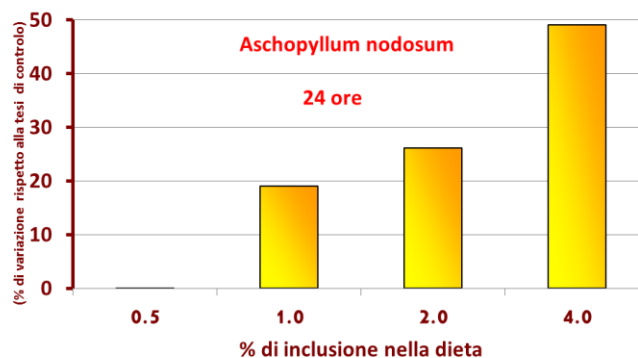


Figura 6 - Effetto dell'impiego di *Aschopyllum nodosum* sulla produzione di ammoniaca *in vitro* utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori si riferiscono al controllo effettuato dopo 24 ore di incubazione *in vitro* e sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi di controllo senza l'alga.

4. Stato d'avanzamento dei WPs previsti per la Fase 2 (secondo semestre d'attività) e risultati conseguiti

Work Package 2 (WP 2)

L'obiettivo specifico di questo WP è consistito nell'implementazione di prove preliminari delle diverse formulazioni della dieta per piccoli ruminanti rispetto alla funzionalità ruminale "*in vitro*", all'accrescimento degli animali *in vivo*, alla valutazione dei livelli ematici per i diversi principi e verifiche *ex vivo* relativamente alla capacità proliferativa e risposta a stressogeni (H₂O₂) per le PBM di capra:

T.2.3 Predisposizione di un piano sperimentale per lo screening dei derivati vegetali relativamente a: prove "in vitro" di degradabilità ruminale, prove "in vitro" ed "ex vivo" per la risposta immunitaria cellulo-mediata e prove in ambiente controllato di alimentazione con estratti vegetali e fitoderivati.

Prove di alimentazione sulla capra da latte

Per le finalità previste in fase progettuale, in particolare quelle relative allo sviluppo di idonee formulazioni per la supplementazione "*on farm*" di oligoelementi e vitamine nei piccoli ruminanti da latte allevati in regime biologico, è stato allestito un ciclo di prove sperimentali presso le strutture dell'Azienda Agraria Didattico Sperimentale "N. Lupori" dell'Università degli Studi della Tuscia di Viterbo.

Il ciclo di sperimentazione ha avuto uno sviluppo temporale articolato su 10 settimane suddivise in due prove:

prova I: 5 settimane di cui una settimana di acclimatazione e alimentazione con dieta di controllo e quattro settimane di alimentazione con diete a diverso titolo di Iodio e di Vitamina E;

prova II: una settimana di alimentazione con dieta di controllo e quattro settimane di alimentazione con diete (isoenergetiche e isoproteiche) a diverso livello d'inclusione di selenio e Iodio-Vitamina E (in dosaggio combinato).

Per le prove sperimentali, sono state selezionate 20 capre di razza Saanen di età compresa tra 10 e 11 mesi in buone condizioni di salute e dal peso omogeneo provenienti da un'azienda sita in provincia di Viterbo. Le capre, a gruppi di quattro, sono state alloggiare in box separati ed attrezzati con erogatori a tazza di acqua potabile e mangiatoie a cattura per piccoli ruminanti. Per l'intero ciclo sperimentale è stato rispettato lo schema riportato in Tabella 1.

I livelli d'inclusione (in g/capo/die) per i derivati vegetali selezionati nel corso della Fase 1 del programma sperimentale (WP1 e WP 2 T.2.1 e T.2.2, cfr. precedente relazione SAL) e per i concentrati impiegati nella formulazione delle diverse diete sono riportati in Tabella 2.

Tabella 1 – Peso iniziale e assegnazioni controllo/trattamento per i gruppi di capre sottoposte a prove d'alimentazione con inclusione di pannello di girasole, laminaria e lievito selenizzato.

Gruppo	Peso iniziale*	Assegnazione Prova I	Assegnazione Prova II
1	29,1±7,5	Controllo	Controllo
2	27,2±3,8	LAM-1	SE-1
3	26,8±2,9	SUNF-1	SLS-1
4	26,8±1,8	LAM-2	SE-2
5	26,8±1,7	SUNF-2	SLS-2

* per gruppo (media±DS)

Tabella 2 – Formulazioni (g/capo/die) dei concentrati utilizzati nelle prove di alimentazione su capre da latte.

	Pannello di girasole (VitE)*	Laminaria (I)*	Lievito selenizzato (Se)**	Mais***	Orzo***	Soia***
Controllo	-	-	-	230	150	120
LAM-1	-	0,80	-	230	150	120
LAM-2	-	1,60	-	230	150	120
SUNF-1	90	-	-	200	150	60
SUNF-2	180	-	-	150	150	20
SE-1	-	-	0,11	230	150	120
SE-2	-	-	0,22	230	150	120
SLS-1	90	0,80	-	200	150	60
SLS-2	180	1,60	-	150	150	20

*prodotti commerciali con certificazione biologica; ** prodotto commerciale non certificato biologico; ***sfarinati.

I livelli d'inclusione per il pannello di girasole biologico¹, la laminaria² ed il lievito selenizzato sono stati determinati tenendo conto dei rispettivi tenori in VitE, iodio e selenio e dei dosaggi reperiti in prove sperimentali già pubblicate senza oltrepassare eventuali limiti regolamentari. Per la supplementazione in selenio, s'è scelto di utilizzare il lievito selenizzato disponibile in commercio in quanto non è stato possibile individuare fitoderivati biologici alternativi che, per tenere dell'elemento, potessero consentire di formulare diete isoenergetiche ed isoproteiche. Nella migliore delle condizioni verificate nel corso della Fase 1 del Programma di Ricerca, infatti, è stato possibile reperire sul mercato della nutraceutica umana un prodotto biologico (noce del Brasile) il cui tenore in Se (6,18 mg/kg), per quanto elevato rispetto ai convenzionali alimenti zootecnici, è risultato essere troppo basso per raggiungere i dosaggi desiderati. Il razionamento è stato ottimizzato per la totale copertura dei fabbisogni energetici e proteici per la categoria degli animali in sperimentazione ed è consistito nella somministrazione, due volte al giorno, di 250 g/capo di mix di concentrati con (trattamenti) e senza (controllo) l'inclusione di pannello di girasole, laminaria o lievito selenizzato (cfr. Tab. 2).

Durante l'intero ciclo sperimentale, in occasione della somministrazione mattutina di concentrati, sono stati somministrati anche 400 g/capo di fieno d'erba medica di I taglio mentre *ad libitum* è stato somministrato fieno di loietto. Mais, orzo, soia e pannello di girasole sono stati controllati per la presenza di micotossine (aflatossine, ocratossina A, zearalenone e deossivalenone) mediante metodo immunoaffinità-HPLC e in tutti i casi i valori riscontrati si collocavano al di sotto del limite di rilevabilità dei rispettivi metodi. Con cadenza settimanale, prima del razionamento mattutino, sono stati effettuati i prelievi ematici alla giugulare mentre alla fine di ogni prova sperimentale è stato determinato il peso individuale. Le diverse formulazioni somministrate ai gruppi trattamento non hanno avuto effetti significativi sull'accrescimento ponderale degli individui (Tab. 3), denotando da un lato l'omogeneità del valore nutrizionale (energetico/proteico) delle formulazioni testate e dall'altro l'assenza di effetti indesiderati ascrivibili alle componenti incluse nella dieta (panello di girasole, laminaria e lievito selenizzato). Non sono state rilevate altresì differenze significative in termini di incremento medio ponderale giornaliero né per la prima prova (range: 0,11 - 0,14 kg/die) e né per la seconda prova (range: 0,14-0,16 kg/die). Al fine di valutare possibili effetti dei trattamenti alimentari con pannello di girasole, laminaria e lievito selenizzato per la supplementazione di Vitamina E, iodio e selenio (organico) sulla risposta immunitaria delle capre in studio, a seguito dei prelievi ematici settimanali sono state effettuate saggi di proliferazione in vitro sulla componente mononucleata del sangue periferico (PBMC) secondo protocolli già utilizzati nel corso del presente Programma di Ricerca (Fase 1).

¹ Fornito da Organic Oils SpA, Mugnano di Perugia, N. certificazione 0401/2009 Cod. Controllo IT BAC 104064.

² *Laminaria digitata* disidratata in polvere (LAM 20/50) fornita dalla Thorverk Inc. (Islanda), certificazioni Quality Assurance International n. C0030838-CORHPC-2, n. C0030838-NOPHPC-4, n. C0030838-CORWCP-2 e n. C0030838-NOPWCP-4.

Tabella 3 – Effetto della durata delle prove e dei trattamenti sulla variazione del peso delle capre (media±DS per gruppo)

Gruppo	Peso iniziale (kg)	Peso al 35° giorno (kg)	Peso al 69° giorno (kg)	TEMPO*
1 (Controllo)	26,8 ± 2,9	31,2 ± 3,0	35,6 ± 4,7	$P<0.01$
2 (LAM-1 / SE-1)	26,8 ± 1,7	30,6 ± 1,9	35,3 ± 1,5	$P<0.01$
3 (LAM-2 / SE-2)	29,1 ± 7,5	34,1 ± 7,5	39,6 ± 8,2	$P<0.01$
4 (LAM-1 / SE-1)	27,2 ± 3,8	32,4 ± 3,0	37,3 ± 2,5	$P<0.01$
5 (LAM-2 / SE-2)	26,8 ± 1,8	31,1 ± 2,5	35,9 ± 4,0	$P<0.01$
GRUPPO/TRATTAMENTO*		<i>ns</i>	<i>ns</i>	

*Significativita' degli effetti "gruppo/trattamento" e "tempo" sul peso; $ns p>0,05$.

La stimolazione delle PBMC è stata condotta utilizzando due diversi mitogeni, Pokeweed Mitogen (PWM) e Conavalina A (ConA) (Sigma, Italia) che stimolano in maniera differenziale le componenti cellulari presenti. Il trattamento con il pannello di girasole (prova 1, trattamenti SUNF-1 e SUNF-2)(Fig. 7) ha esitato in un significativo incremento ($p<0,01$) della capacità proliferativa delle PBMC stimolate con PWM (selettivo per i linfociti B) dopo 28 giorni e a tutti e due i dosaggi saggiati mentre, nel caso di stimolazione con ConA (linfociti B e T), non sono emerse differenze di rilievo rispetto al controllo.

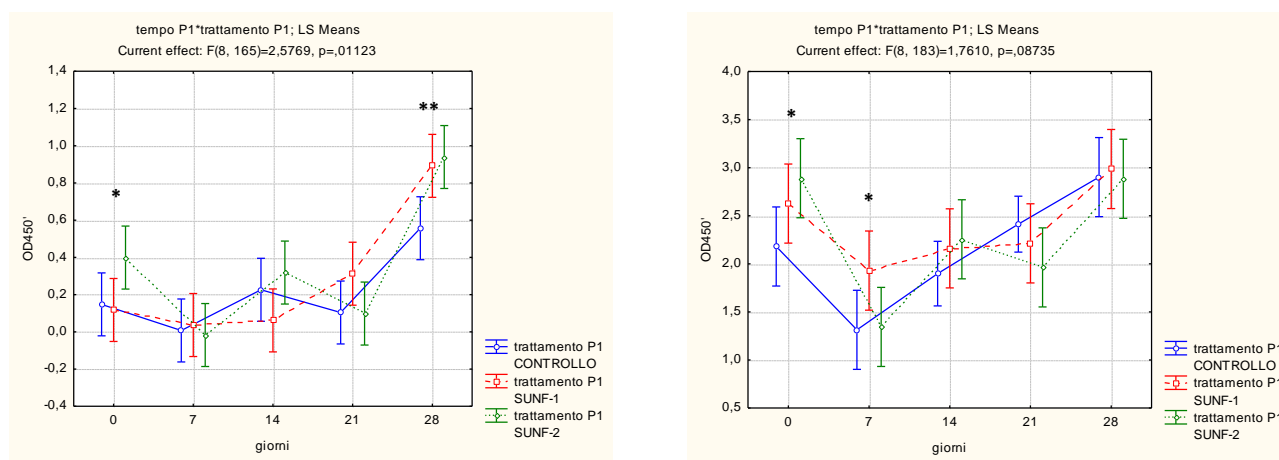


Figura 7 - Capacità proliferativa *in vitro* delle PBMC di capra alimentate con dieta di controllo o diete a diverso livello d'inclusione di pannello di girasole biologico. A destra stimolazione con PWM, a sinistra stimolazione con ConA. Dati (media±DS) espressi in unità di densità ottica a 450 nm. ** $p<0,01$; * $p<0,05$

Per i gruppi trattati con laminaria (prova 1, trattamenti LAM-1 e LAM-2), a 28 dall'inizio delle prove d'alimentazione, non sono state registrate differenze significative nella capacità proliferativa delle PBMC sia nel caso di stimolazione con PWM che con la ConA.

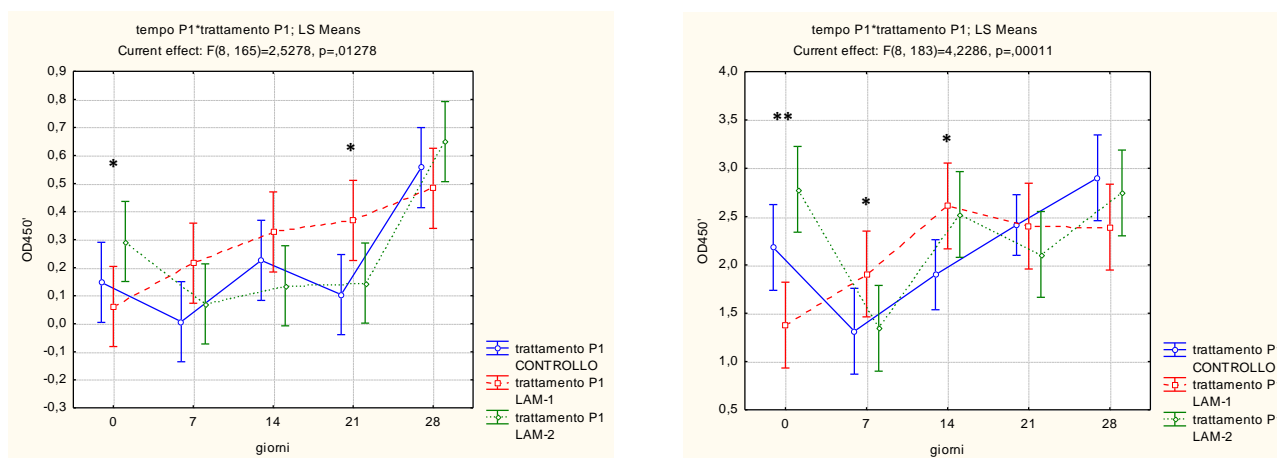


Figura 8 – Capacità proliferativa *in vitro* delle PBMC di capra alimentate con dieta di controllo o diete a diverso livello d'inclusione di pannello di girasole biologico. A destra stimolazione con PWM, a sinistra stimolazione con ConA. Dati (media±DS) espressi in unità di densità ottica a 450 nm. ** $p<0,01$; * $p<0,05$.

Dopo 28 giorni di trattamento con lievito selenizzato (prova 2. trattamenti SE-1 e SE-2) non sono state registrate differenze significative nella capacità proliferativa delle PBMC di capra stimolate con PWM mentre a seguito di stimolazione in vitro con la ConA le PBMC di capre trattate hanno mostrato una ridotta risposta proliferativa, se comparate con il controllo (Fig. 9).

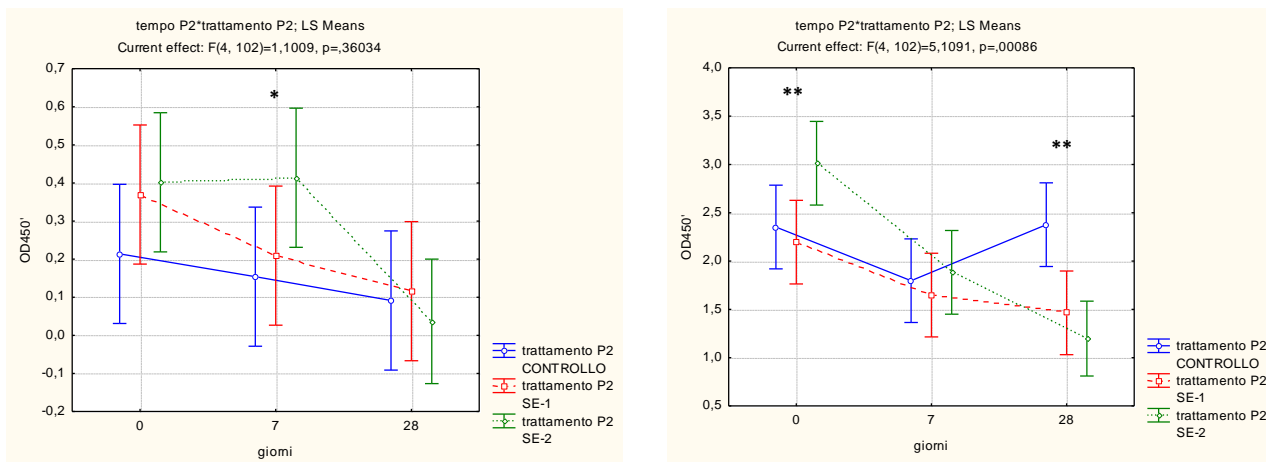


Figura 9 – Capacità proliferativa *in vitro* delle PBMC di capra stimolate con PWM (a sinistra) e ConA (a destra) dopo alimentazione per 28 giorni con dieta di controllo e diete contenenti lievito selenizzato a diverso livello d’inclusione (SE-1 e SE-2) Dati (media±DS) espressi in unità di densità ottica a 450 nm; *p<0,01; **p<0,05.

Al fine di verificare se tale risultato fosse associabile ad una diversa resistenza delle PBMC degli animali trattati con lievito selenizzato a stress ossidativo, sono stati approntati saggi di stimolazione in vitro con ConA in presenza di concentrazioni differenti di perossido d’idrogeno (H₂O₂) quale agente stressogeno.

Sebbene lievi differenze sono state osservate a tutti i dosaggi di acqua ossigenata tra le PBMC di animali del gruppo SE-1 e il controllo (Fig. 10), il trattamento con lievito selenizzato al livello d’inclusione più alto (SE-2) non ha esitato in differenze significative della risposta cellulare rispetto ai controlli per tutte le concentrazioni dello stressogeno testate.

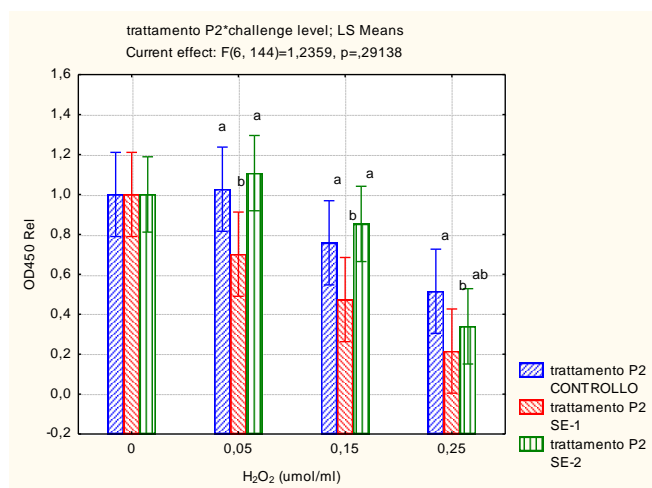


Figura 10 – Capacità proliferativa *in vitro* delle PBMC di capre alimentate con dieta di controllo o dieta includente lievito selenizzato a due livelli (SE-1 e SE-2) stimolate con ConA in presenza di livelli crescenti di perossido d’idrogeno. Dati (media±DS) espressi in unità di densità ottica relativa rispetto al saggio senza H₂O₂. ^{a,b}p<0,05.

L’effetto dell’inclusione di laminaria nella dieta per capre da latte per la supplementazione di iodio è stato valutato mediante analisi del contenuto in iodio totale (incluse le forme organiche – ormoni tiroidei) previa mineralizzazione del campione e saggio catalitico specifico per tale elemento.

A 28 giorni dall’inizio del trattamento con laminaria a due livelli d’inclusione (corrispondenti a 2 e 4 mg/capo/die oltre il livello presente nella dieta), è stato possibile osservare un significativo incremento del titolo plasmatico di iodio in entrambi i trattamenti (Fig. 5). Infatti, nel caso nel trattamento con 2 mg/capo/die il livello plasmatico dello iodio ha

subito in media un incremento del 250% rispetto al controllo ($71,1 \pm 22,4$ ng/ml e $21,6 \pm 8,2$ ng/ml, rispettivamente) mentre al livello più alto d'inclusione di laminaria nella dieta (corrispondente a 4 mgI/capo/die) è stato osservato un titolo plasmatico medio di iodio 8,4 volte superiore rispetto al controllo ($177,5 \pm 15,6$ ng/ml e $21,6 \pm 8,2$ ng/ml, rispettivamente). Per contro, prima dei trattamenti (tempo "0") i livelli plasmatici di iodio nei tre gruppi non sono risultati significativamente differenti.

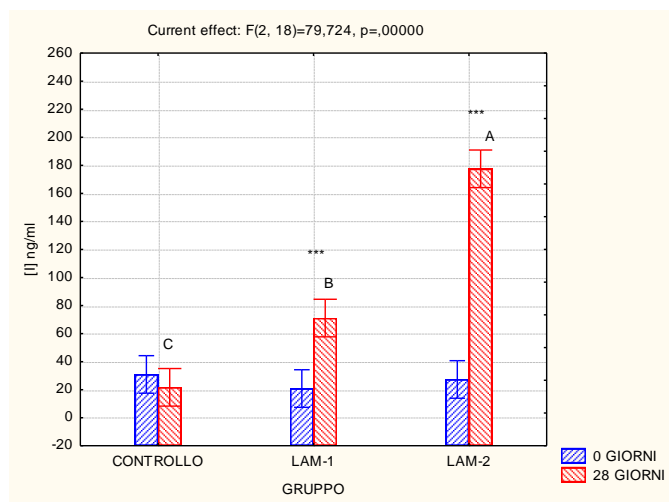


Figura 11 – Livelli plasmatici di iodio (media±DS) in capre alimentate con dieta di controllo o diete a diverso livello d'inclusione di laminaria (LAM-1 e LAM-2) in sperimentazione fino a 28 giorni di sperimentazione. Dati espressi come media±ES. ^{A,B,C} significatività delle differenze ($p < 0,01$) tra i gruppi (Controllo, LAM-1 e LAM-2) entro giorno del controllo (0 e 28 giorni); *** significatività delle differenze ($p < 0,001$) tra controlli (a 0 e 28 giorni) entro gruppo (Controllo, LAM-1 e LAM-2).

Sono tutt'ora in corso di completamento le indagini circa l'effetto della somministrazione del pannello di girasole e del lievito selenizzato sui livelli plasmatici di Vitamina E e di selenio.

Work Package 3 (WP 3)

Conformemente all'obiettivo di sviluppare per l'applicazione "on farm" delle strategie d'intervento alimentare basate sull'impiego di estratti vegetali e fitoderivati atte a superare le criticità nutrizionali del sistema d'allevamento dei ruminanti da latte in biologico (carenza di oligoelementi e composti bio-attivi con valenza nutrizionale -Vitamina E- o pro-nutrizionale -tannini-) è stato implementato il seguente task:

T.3.1 Analisi di contesto per un'azienda selezionata di piccoli ruminanti da latte e sviluppo di specifici piani sperimentali "on farm".

Ai fini della sperimentazione on farm di formulazioni a diverso tenore di iodio/selenio/Vitamina E, è stato acquisito il quadro informativo relativo ad un'azienda ad indirizzo misto cerealicolo-foraggero-zootecnico sita in provincia di Viterbo. L'azienda alleva capre di razza Saanen la cui produzioni in latte è destinata alla trasformazione diretta in caseificio aziendale. L'allevamento delle capre è a stabulazione fissa, con lettiera di paglia rinnovata giornalmente (Fig. 12) e la mungitura viene effettuata meccanicamente con impianto lineare a 12 posti a linea bassa.



Figura 12 – Rilievo fotografico presso l'azienda di capre da latte, sita in provincia di Viterbo e selezionata per le prove "on farm".

L'alimentazione degli animali in produzione si basa sulla somministrazione di ca. 0,4 kg/capo/die di fioccolato mais/soia/orzo/favino e 0,6 kg/capo/die di mangime pellettato per capre in lattazione oltre a fieno di medica (2 kg/capo/die) e fieno di loietto somministrato *ad libitum*. Per le diverse tipologie d'alimento, sono stati acquisiti campioni rappresentativi sui quali è stata condotta l'analisi centesimale (Tab. 4).

Tabella 4 – Risultati (dati in % SS) dell'analisi centesimale condotta su campioni rappresentativi di mangimi ed alimenti impiegati nel razionamento della capra da latte presso un'azienda selezionata per l'implementazione della parte di sperimentazione "on farm".

Mangime/Alimento	SS%	CEN	PG	EE	FG	NDF	ADF	ADL
Mangime pellettato	87,1	8,7	17,7	4,0	8,5	11,2	7,2	1,3
Fioccolato	88,4	2,4	13,4	6,6	3,6	16,3	9,2	3,5
Fieno medica	86,2	7,6	13,6	0,9	37,7	46,7	39,8	11,6
Fieno loietto	88,1	6,2	4,4	0,9	32,2	56,6	37,1	8,6

SS= sostanza secca; CEN=ceneri; PG= protidi grezzi; EE= estratto etereo; FG= fibra grezza; NDF= fibra neutro detersa; ADF=fibra acido detersa; ADL=lignina acido detersa.

Sui campioni acquisiti sono in corso di completamento le determinazioni relative alle concentrazioni di selenio, iodio e Vitamina E per poter definire il livello di questi nutrienti nella dieta degli animali in produzione e definire una o più diete alternative includenti uno o più prodotti testati in vivo presso l'Azienda Didattico Sperimentale dell'Università della Tuscia.

Sintesi dei risultati e considerazioni conclusive

Sulla base dei risultati ottenuti nel corso del secondo semestre d'attività che saranno utilizzati per formulare diete per piccoli ruminanti da latte arricchite di selenio, Vitamina E, si può affermare che:

- i risultati fin qui ottenuti mediante saggi *in vitro* depongono a favore della possibilità concreta di contenere l'eccessiva degradazione delle proteine nei prestomaci mediante la somministrazione di polifenoli in forma di estratti purificati. Tuttavia gli estratti purificati non sono attualmente ammessi nell'alimentazione animale in zootecnia biologica. Stante le procedure estrattive impiegate per alcuni estratti di castagno, tecnologia applicabile anche i sottoprodotti della vinificazione, potrebbe essere opportuno rivedere lo stato regolamentare per un loro impiego in biologico;
- i sottoprodotti agricoli e forestali testati nei saggi di degradabilità *in vitro*, contenenti dosi significative ma non particolarmente elevate di sostanze tanniche, non si sono rivelati in grado di contenere significativamente la degradazione proteica operata dalla microflora ruminale mentre per *Ascophyllum nodosum* è stata verificata una ridotta la produzione di ammoniaca *in vitro*, in misura dose-dipendente, che desta interesse per le sue possibili azioni di modulazione del metabolismo microbico ruminale;
- i livelli d'inclusione testati *in vivo* di laminaria, pannello di girasole e lievito selenizzato per la supplementazione rispettivamente di iodio, Vitamina E e selenio in giovani capre da latte, non hanno determinato, anche ai dosaggi più elevati tra quelli testati, effetti negativi sul peso finale dei gruppi trattati rispetto al controllo né, tantomeno, sui tassi medi d'accrescimento giornaliero;
- gli interventi alimentari con laminaria e pannello di girasole non hanno dato esito ad effetti negativi sulla capacità proliferativa delle PBMC caprine ad indicarne un possibile utilizzo "on farm" anche ai dosaggi maggiori testati;
- i risultati preliminari, invece, indicano che a tutti i dosaggi testati, l'inclusione di lievito selenizzato nella dieta della capra, comporta un certo grado di riduzione della capacità proliferativa delle PBMC dopo 28 giorni di trattamento. Tale risultato sarà oggetto di ulteriori approfondimenti al fine di escludere altri possibili fattori intrinseci nel prodotto testato (lievito selenizzato commerciale);

- in relazione all'inclusione di laminaria (a 0,8 e 1,6 g/capo/die) nella dieta delle capre in studio, è stato osservato un significativo incremento del tenore di iodio totale ematico rispetto ai controlli già al dosaggio inferiore (2 mgI/capo/die). L'inclusione nella dieta di "Laminaria organic" appare una strategia valida per la supplementazione in iodio con possibili riflessi positivi su salute, benessere animale e valore nutrizionale del latte di capra.