

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AGRICOLTURA, LE
FORESTE, LA NATURA E L'ENERGIA (DAFNE)**

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA

Via. S. C. de Lellis snc – 01100 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

Atto di concessione del finanziamento

D.M. 25/11/2012 n. 18512

RENDICONTAZIONE TECNICO-SCIENTIFICA

Gennaio 2013

Il Coordinatore

Prof. Bruno Ronchi

1. Premesse

Il Programma di Ricerca in oggetto, coinvolge due Unità Operative (UU.OO.): il Dipartimento DAFNE dell'Università della Tuscia di Viterbo (DAFNE-UNITUS, Coordinatore Prof. Bruno Ronchi) e l'Istituto di Zootecnica dell'Università Cattolica del S. Cuore di Piacenza (IZ-UCSC, referente scientifico Dott. Paolo Bani). Il Programma di ricerca 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, eccessiva degradazione ruminale della proteina alimentare) talora riscontrabili nella conduzione biologica degli allevamenti da latte, in particolare per i piccoli ruminanti.

2. Quadro di riferimento progettuale

Il Programma di ricerca s'inquadra all'interno delle prescrizioni del Reg. (CE) 889/2008 che prescrive le condizioni per sopperire alle esigenze nutrizionali di base degli animali, prevenendo malattie e dismetabolie, mediante interventi alimentari conformi al Regolamento citato.

Conformemente alla programmazione temporale delle attività preliminarmente delineata nel progetto positivamente selezionato in fase istruttoria e quindi finanziato ai sensi del D.M. 25/11/2012 n. 18512, l'implementazione del progetto stesso è stata articolata 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 18 fino, oltre il periodo di proroga concesso pari a mesi 6, alla chiusura del Programma di Ricerca, è prevalentemente incentrata sulla pianificazione e l'implementazione delle attività di sperimentazione "on farm" con relative azioni di dimostrazione e divulgazione dei risultati. La gestione delle attività del Programma di Ricerca in parola è stata condotta suddividendo le diverse attività preventivate in unità discrete definite Work-Packages (WPs)

Nella presente documento, pertanto, si relaziona in merito al complesso delle attività svolte e dei risultati ottenuti nel corso dell'implementazione dei Work-Packages previsti dal programma sperimentale:

WP1;

WP2 (T.2.1 e T2.2.2),

WP3 (task T3.1 e T3.2) e

WP4 (T4.1). I risultati relativi all'implementazione del e del sono già stati oggetto di precedenti relazioni parziali di stato avanzamento dei lavori

3. Stato d'avanzamento dei WPs previsti per il periodo I-III terzo semestre d'attività e risultati conseguiti

Work Package 1 (WP 1)

Conformemente all'obiettivo d'identificare alcune possibili fonti d'origine vegetale (estratti vegetali e fitoderivati) di oligoelementi e composti bio-attivi con valenza nutrizionale (Vitamina E) o pro-nutrizionale (tannini) e valutarne le potenzialità d'impiego per l'integrazione alimentare dei piccoli ruminanti in regime biologico, il WP è stato articolato in due gruppi di attività ascritte (Task):

T.1.1 Individuazione, scelta e caratterizzazione di sostanze ascrivibili alla categoria degli estratti vegetali e dei fito-derivati con valenza nutrizionale.

T.1.2 Individuazione, sulla base delle peculiarità delle aziende agro-zootecniche che saranno coinvolte nelle fasi d'implementazione "on farm" del progetto, delle modalità operative d'impiego e prima stesura dei protocolli d'uso di estratti vegetali e fitoderivati.

Nell'ambito del mercato nazionale dei prodotti "BIO", sono state ricercate aziende in grado di fornire prodotti e sotto-prodotti d'origine vegetale che possono essere utilizzati nella fase della sperimentazione on-farm con riferimento all'approvvigionamento per i ruminanti primariamente degli oligoelementi Iodio e Selenio, della Vitamina E, di tannini condensati per la modulazione della degradazione ruminale della proteina e, in seconda istanza, di acidi grassi polinsaturi ed eventuali altri composti bio-attivi.

Per quanto riguarda Selenio, Vitamina E ed eventualmente acidi grassi polinsaturi (e.g. a. grassi della serie n-3 quale il γ -linolenico), tra le diverse opzioni disponibili sul mercato nazionale, è stata individuata un'Azienda con sede in Umbria in grado di fornire sottoprodotti della lavorazione degli oli di semi dotati di certificazione biologica rilasciata da BioAgriCert, Organismo Tecnico Indipendente di Controllo e Certificazione Riconosciuto dal Ministero dell'Agricoltura. Tali prodotti sono tutti certificati con presenza di contaminanti fitosanitari inferiore a 0,01 ppm ed assenza di OGM. L'Azienda in questione, è stata selezionata quale potenziale fornitrice di fitoderivati anche in base all'esperienza pregressa della stessa maturata in rapporti commerciali con imprese mangimistiche produttrici di mangimi biologici che talora impiegano sottoprodotti dell'industria agro-alimentare per la formulazione di mangimi completi, nuclei ed altre tipologie commerciali di alimento zootecnico.

Una prima serie di prodotti trattati dall'Azienda ai fini di una valutazione di screening in vista dell'impiego "on-farm" con i relativi valori analitici essenziali per la formulazione dei protocolli applicativi, sono riepilogati in Tab. 1.

Tabella 1 – Tipologie di sottoprodotti dell'industria olearia e relativi valori analitici di riferimento per l'uso zootecnico.

Prodotto/Sottoprodotto	Elemento o composto d'interesse	Valori centesimali sul t.q. di riferimento per l'interazione dei piani alimentari**			
		U %	PG %	EE %	FG %
Pannello di mandorla*	Vitamina E, aa. gg. polinsaturi (PUFA)	4-9	18-22	6-12	8-12
Pannello di Canola (a basso contenuto di acido erucico e glucosinolati)	Selenio (forma inorganica/organica)	6-13	34	4-15	-

*U= umidità, PG= proteina grezza, EE= estratto etereo, FG=fibra grezza. *Sottoprodotti ottenuti da processi di estrazione meccanica a freddo senza utilizzo di solventi. ** Dati indicativi forniti dall'Azienda produttrice.*

Altre tipologie di sottoprodotti dell'estrazione meccanica dell'olio, quali il pannello di noce come fonte di acidi grassi polinsaturi (in particolare di a. γ -linolenico), pannello di cartamo, di lino e di zucca, sono allo studio per valutarne eventuali impieghi per la nutrizione in zootecnia biologica.

Per quanto riguarda l'approvvigionamento di fonti ricche in tannini condensati per la sperimentazione "in vitro" ed in vivo relativa all'impiego di modulatori della degradabilità ruminale della proteina vegetale, è stata individuata un'azienda italiana che produce formulati tannici di castagno vergine mediante processi di pretrattamento meccanico del legno, d'estrazione, pre-concentrazione ed essiccazione (fino ad un contenuto di tannini >75% in peso) totalmente esenti dall'impiego di solventi e additivi chimici. Tale prodotto è in attesa di un riconoscimento ministeriale per l'impiego in agricoltura- biologica ed è interesse dell'azienda eventualmente estendere la certificazione a formulati basati su tannini da impiegare in zootecnia biologica (ad oggi commercializzati solo per l'industria mangimistica rivolta al convenzionale).

Un'altra tipologia di tannini interessanti è stata individuata negli estratti tannici dei sottoprodotti della lavorazione dell'uva, principalmente dopo la vinificazione della stessa. Si tratta, in questa forma di estratti, di prodotti ad alto titolo in tannini condensati ampiamente impiegati in enologia.

Accanto ai sotto-prodotti enologici assumono un buon interesse anche i sottoprodotti alla coltivazione del castagno (foglie, ricci) e della successiva lavorazione dei frutti (buccia e pellicola interna). Altri prodotti potenzialmente interessanti sono stati considerate le foglie di agrumi, per il loro contenuto in oli essenziali che pure potrebbero modulare la microflora ruminale. Infine, risulta pure interessante un'alga atlantica, *Aschophyllum nodosum*, già impiegata in agricoltura biologica e non solo. La sua significativa componente polifenolica rende il prodotto di indubbio potenziale interesse, anche in vista di un possibile abbinamento ad altre fonti di tannino.

Per quanto riguarda i possibili fito-estratti e fitoderivati particolarmente ricchi in Iodio disponibili sul mercato nazionale, ci si è orientati verso le aziende che commercializzano estratti d'alga (e.g. *Fucus vesiculosus* L.) (Fig. 1) che presentano un titolo dell'elemento particolarmente alto, sia in forma libera che legata alle proteine vegetali (>200 µg I/g TQ), tale da consentirne l'impiego in quantità limitate nell'ambito dei piani di razionamento.



Figura 1 – immagine dell'alga bruna *Fucus vesiculosus* che viene comunemente commercializzata per l'integrazione alimentare umana di Iodio con il nome di "kelp".

Sono attualmente in corso verifiche con aziende nazionali del settore alimentare e erboristico per individuarne una o più in grado di fornire sia nella fase di sperimentazione che, eventualmente in quella applicativa, prodotti certificati "BIO", o tali da poter essere certificabili nel breve-medio periodo.

La formulazione di protocolli d'impiego per i fitoderivati individuati, non potrà prescindere dalle caratteristiche anche gestionali delle aziende presso cui sarà effettuata la sperimentazione "on farm" e, auspicabilmente, l'applicazione su più vasta scala. In coerenza con ciò, le aziende che saranno coinvolte nella seconda fase e già individuate, sono state oggetto di una prima caratterizzazione per definire in dettaglio alcuni aspetti, quali i piani alimentari in uso, la composizione ed il valore nutrizionale delle razioni, le eventuali integrazioni e alcuni descrittori dello stato nutrizionale degli animali (e.g. contenuto ematico di Iodio, Selenio, Vitamina E).

Per le procedure d'impiego sono allo studio alcuni scenari di dosaggio per fitoderivati ad alto tenore di Selenio, Iodio e Vitamina E, nonché di formulati ad alto contenuto in sostanze tanniche in considerazione delle indicazioni rinvenute nella letteratura scientifica di settore e delle risultanze delle sperimentazioni "in vitro" di cui al successivo **WP 2** nonché di ulteriori studi "ex vivo" in corso e da programmare prima delle verifiche sperimentali "on farm".

La predisposizione dei protocolli, la cui stesura definitiva sarà validata nel corso dell'implementazione della Fase 2 in base ai risultati che si otterranno con la sperimentazione "on farm", terrà conto del valore energetico della razione totale (inclusa l'integrazione con i fitoderivati), del tenore proteico complessivo con particolare riguardo al rapporto tra proteina degradabile nel rumine (RDP) e quella by-pass (RUP) (in particolar nel caso dell'impiego di tannini per modulare l'attività ruminale), apporto di sostanze eventualmente interferenti (e.g. glucosinolati per i pannelli di semi di crucifere) e intake minimo e/o ottimale per i principi d'interesse (Se, I, Vit E) atti a consentire di raggiungere il pieno soddisfacimento dei requisiti nutrizionali per la/le specie in studio (capra da latte o pecora da latte).

Work Package 2 (WP 2)

L'obiettivo specifico di questo WP è consistito nello screening sperimentale delle diverse tipologie d'integrazione della dieta per ruminanti rispetto alla funzionalità ruminale "in vitro", alla degradabilità della proteina ed agli effetti sul sistema immunitario di piccoli ruminanti da latte. I due task sviluppati nel presente WP sono stati:

T.2.1 Predisposizione di un piano sperimentale per lo screening degli estratti vegetali e dei fitoderivati 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.

T.2.2 Implementazione del piano sperimentale e verifiche mediante saggi "in vitro"

Per la valutazione degli effetti di Selenio, Vitamina E e Iodio sulla risposta del sistema immunitario, sono stati condotti test "in vitro" su cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) della capra da latte verificando i livelli di esposizione in grado di consentire la massima espressione della capacità proliferativa di tali cellule sottoposte a stimolazione mediante sostanze mitogene: Conavalina A (ConA, lectina isolata da *Canavalia ensiformis*) per i linfociti T ed il Pokeweed Mitogen (PWM - lectina estratta da radice di *Phytolacca americana*) per linfociti B. Tale sperimentazione è stata condotta dall'U.O. DAFNE-UNITUS secondo protocolli già messi a punto dal gruppo di lavoro.

Il sangue utilizzato per isolare le PBMC da sottoporre a saggio è stato ottenuto da otto capre di razza Saanen in lattazione, omogenee per peso, data e ordine di parto, allevate presso un'azienda a conduzione biologica situata in provincia di Viterbo.

Al fine d'individuare i livelli d'esposizione ottimali, sono stati utilizzati per i saggi principi attivi puri: Selenio inorganico (selenito e selenato di sodio), Selenio organico (seleno-metionina, seleno-cisteina e seleno-cistina), α -tocoferolo (Vit. E), Iodio inorganico (ioduro di sodio) e organico (tetraiodo-L-tironina, T4), quest'ultimo solo a scopo di verificare un eventuale effetto indiretto della somministrazione *in vivo* di Iodio attraverso la metabolizzazione tiroidea. E' stato scelto di testare i singoli principi puri piuttosto che gli estratti o alto tipo di preparato vegetale, per evitare la sovrapposizione di effetti interferenti dovuti ad altre sostanze eventualmente presenti assieme ai principi da testare. Ci si riserva comunque la possibilità, nel prosieguo del Programma, di verificare i dati ottenuti e qui nel seguito sintetizzati confrontandoli con quelli ottenuti con impiego diretto dei fitoestratti nei saggi di proliferazione cellulare "in vitro".

Selenio

L'esposizione a diverse forme di Selenio di PBMC ottenute da 4 capre in lattazione (Fig. 2), ha consentito di evidenziare come nella norma i valori massimi di proliferazione cellulare dopo stimolazione con ConA (Fig. 2 i-ii) e PWM (Fig. 2 iii-iv) si ottenga con livelli attorno a 150 $\mu\text{gSe/l}$ con minime variazioni tra le diverse forme. Verifiche effettuate su un secondo gruppo di 4 capre (dati non mostrati) ha consentito di validare il livello d'esposizione a 150 $\mu\text{gSe/l}$ come quello favorente la proliferazione cellulare senza tuttavia rinvenire differenze tra le diverse forme di del Selenio (organiche Vs inorganiche). In ultimo, è stato verificato l'effetto "in vitro" dell'esposizione delle PBMC ad altre due forme organiche di Selenio: seleno-cisteina e seleno-cistina. Anche questo secondo set di esperimenti, ha confermato che il livello di 150 $\mu\text{gSe/l}$ rappresenta una condizione ottimale per la proliferazione cellulare mentre non sono riscontrabili differenze significative della risposta cellulare riferibili alla diversa forma di Selenio testata.

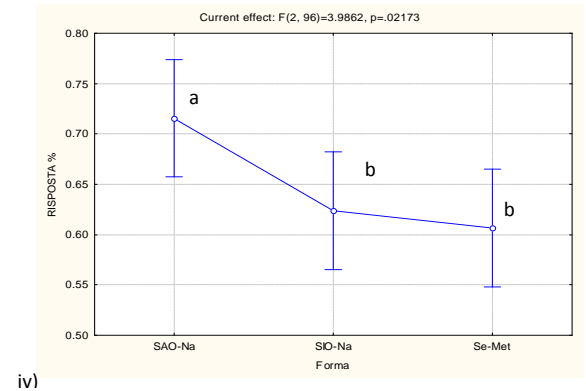
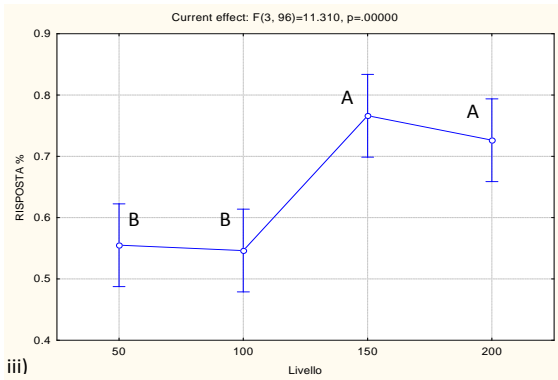
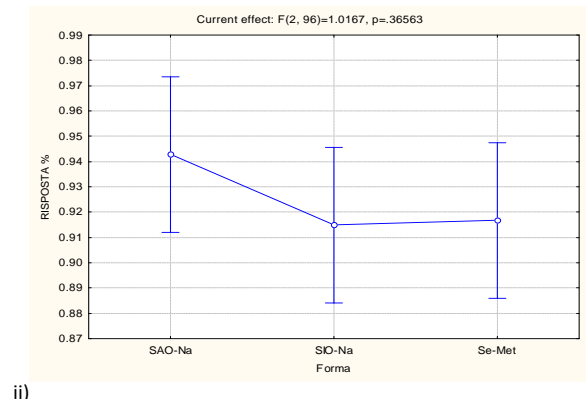
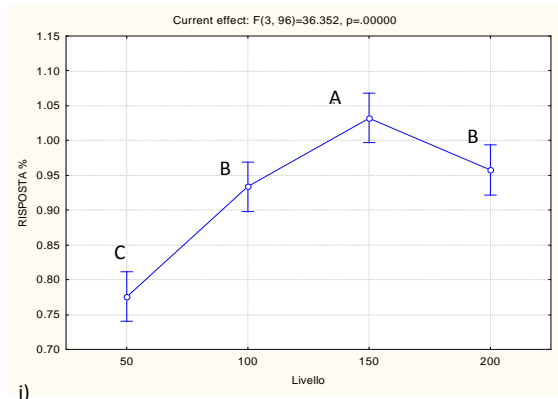


Fig. 2 – Risultati di saggi di proliferazione cellulare “in vitro” condotti esponendo PBMC caprine a differenti forme chimiche del Selenio (SAO-Na= selenato di sodio; SIO-Na = selenito di sodio; Se-Met= seleno-metionina) a quattro livelli d’esposizione (50, 100, 150 e 200 µgSe/l nel terreno di coltura). Le cellule sono state sottoposte a stimolazione con ConA (in alto) e con PWM (in basso) per 48h. Dati (media±ES) espressi come risposta percentuale rispetto al controllo. ^{A,B,C}p<0,01; ^{a,b,c}p<0,05.

Vitamina E

Un set di esperimenti di proliferazione cellulare “in vitro” su PBMC di capra, è stato allestito con lo scopo d’individuare eventuali dosaggi di Vitamina E (solubilizzata nel terreno di coltura con l’ausilio di etanolo allo 0,05%, presente anche nei controlli) in grado di massimizzare la risposta cellulare alla stimolazione con mitogeni. I risultati ottenuti su 8 capre, sono illustrati in Fig. 3. I risultati ottenuti dalla sperimentazione consentono di affermare che la migliore risposta cellulare alla stimolazione con i mitogeni è stata ottenuta con concentrazioni di 1,8 µg/ml e 1,2-1,8 µg/ml rispettivamente per la stimolazione delle cellule con ConA (Fig. 3i) e con PWM (Fig. 3ii). Nel caso della stimolazione con ConA, è stata osservata una chiara relazione dose-effetto per i livelli di Vitamina E 0,6, 1,2 e 1,8 µg/ml stante a denotare una risposta progressivamente crescente in prevalenza dei linfociti T a dosi crescenti della Vitamina.

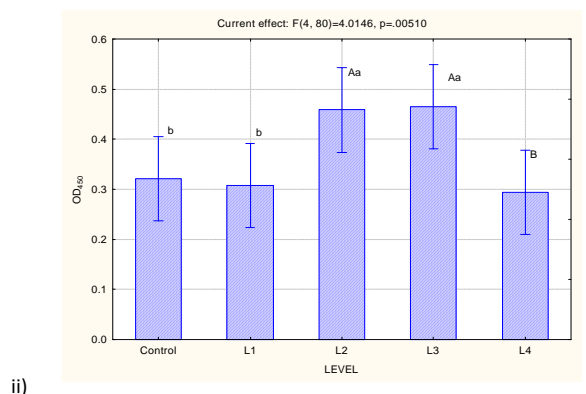
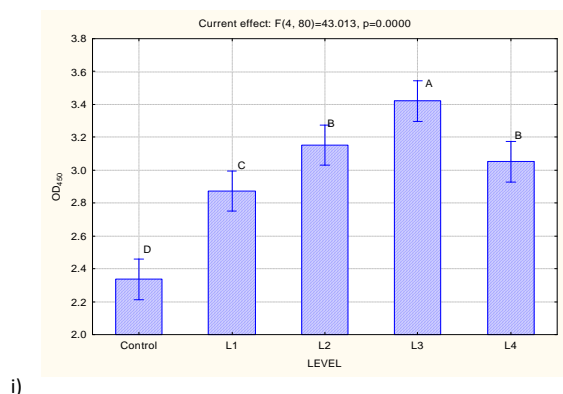
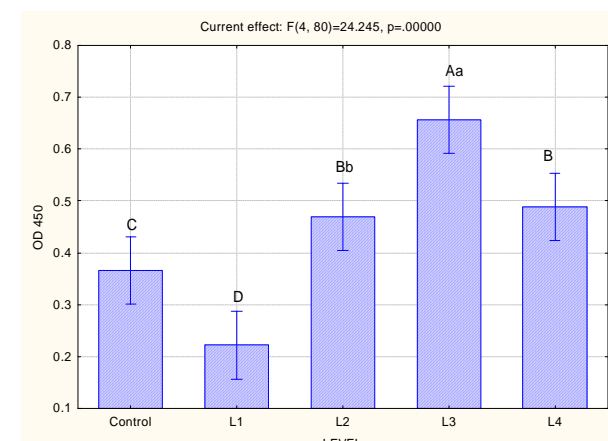
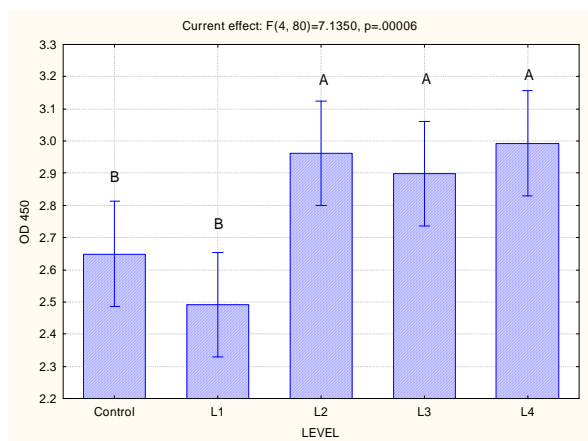


Figura 3 – Risultati dei test di proliferazione cellulare “in vitro” effettuati su PBMC ottenute da 8 capre da

latte donatrici. Le cellule sono state sottoposte a stimolazione con i) ConA e ii) PWM per 48h. Dati (media±ES) espressi come densità ottica a 450 nm. L1= 0,6 µg/ml; L2= 1,2 µg/ml; L3= 1,8 µg/ml e L4= 2,4 µg/ml. ^{A,B,C,D} p<0,01; ^{a,b} p<0,05.

Iodio

Adottando un simile approccio sperimentale di dosaggio “in vitro” a quelli sviluppati per il Selenio e la Vitamina E, sono stati allestiti alcuni esperimenti per verificare se e a che livello due differenti forme di Iodio (ioduro di sodio vs tetraiodo-L-tironina) possono avere effetto sulla capacità proliferativa “in vitro” delle PBMC caprine con stimolazione da ConA e PWM. I risultati ottenuti dalla sperimentazione “in vitro”, consentono di evidenziare che con entrambe le forme chimiche dell’elemento, la stimolazione di differenti categorie di linfociti (T vs B) mostra una certa sovrapposibilità (Figg. 5-6).

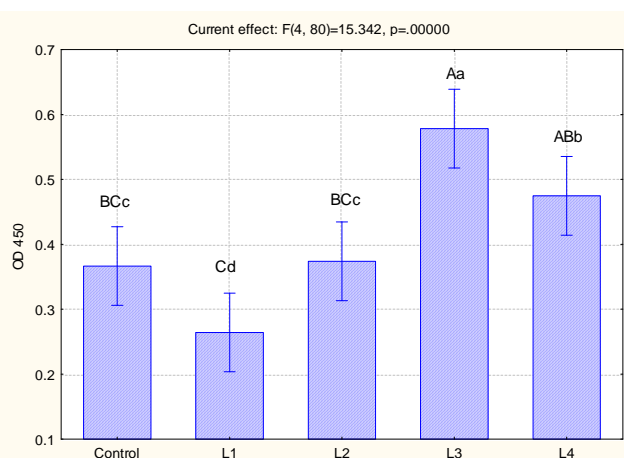
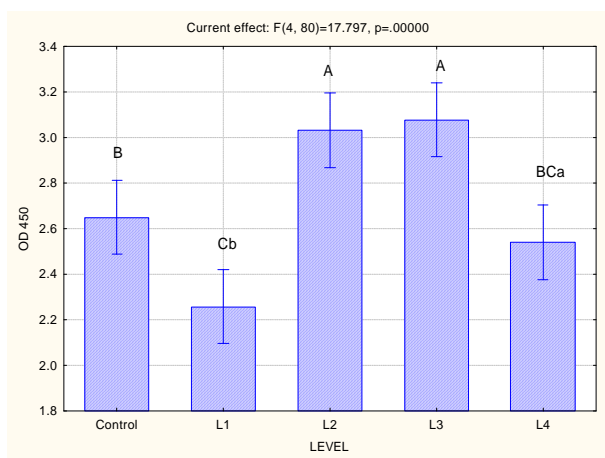


i)

ii)

Figura 4 – Risultati dei test di proliferazione cellulare “in vitro” effettuati su PBMC ottenute da 8 capre da latte donatrici a diverse concentrazioni di Iodio (come ioduro di sodio). Le cellule sono state stimolate con i) ConA e ii) PWM per 48 h. Dati (media±ES) espressi come densità ottica a 450 nm. L1= 1 µg/ml; L2= 2 µg/ml; L3= 4 µg/ml e L4= 8 µg/ml. ^{A,B,C,D} p<0,01; ^{a,b} p<0,05.

La stimolazione preferenziale dei linfociti B con ConA, ha consentito di ottenere un significativo incremento della proliferazione cellulare con concentrazioni di 2,4 e 8 µg/ml (Fig. 4i) e 25, 35 pgT4/ml (Fig. 5i) mentre la presenza di 4 µg/ml (Fig. 4ii) e 35 pg/ml di T4 (Fig. 5ii), appaiono essere le condizioni ottimali per la stimolazione delle PBMC con il PWM, che agisce preferenzialmente sui linfociti B.



i)

ii)

Figura 5 – Risultati dei test di proliferazione cellulare “in vitro” effettuati su PBMC ottenute da 8 capre da latte donatrici a diverse concentrazioni di tetraiodo-L-tironina (T4). Le cellule sono state stimolate con i) ConA e ii) PWM per 48h. Dati (media±ES) espressi come densità ottica a 450 nm. L1= 15 pg/ml; L2= 25

$\mu\text{g/ml}$; L3= 35 $\mu\text{g/ml}$ e L4= 45 $\mu\text{g/ml}$. ^{A,B,C,D} $p < 0,01$; ^{a,b} $p < 0,05$.

Sostanze tanniche

Al fine di valutare l'effetto del tannino estratto da castagno sulla cinetica di degradazione ruminale della proteina, le prove di degradabilità e produzione di gas "in vitro" sono stati condotti presso i laboratori dell'U.O. IZ-UCSC. Obiettivo di questa azione è la individuazione di estratti polifenolici o di (sotto)prodotti vegetali ricchi in tali componenti capaci di ridurre la degradazione proteica ruminale evitando tuttavia effetti marcatamente negativi in termini di digestione della sostanza organica complessiva della razione. Le prove sono state concepite tenendo conto dei seguenti aspetti:

- i) L'opportunità di verificare l'effettiva efficacia di diverse tipologie di tannini che in precedenti nostre esperienze avevano già fornito indicazioni circa il fatto che, pur riducendo entrambi la degradazione proteica ruminale, agirebbero tuttavia attraverso meccanismi differenti, aprendo quindi la prospettiva di una loro possibile azione sinergica;
- ii) L'opportunità di quantificare l'effetto dei polifenoli "per sé", senza l'effetto potenzialmente distorsivo di altri costituenti ad essi associati come accade nel caso di prodotti con un più basso titolo polifenolico, prima di passare a materiali di questo tipo, in genere economicamente più convenienti e più facilmente utilizzabili in zootecnia biologica.

Il lavoro sperimentale relativo alle prove "in vitro" fino ad oggi svolto e per il quale siano già disponibili i risultati ha riguardato i tannini di castagno (due prodotti ottenuti con differenti tecniche estrattive), di buccia di uva e di vinaccioli.

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 ruminanti. Le valutazioni della fermentescibilità si basano sulla misurazione della quantità di gas prodotto nel corso della fermentazione, strettamente correlata alla produzione di acidi grassi volatili. Il liquido ruminale è stato prelevato da due bovine non in lattazione e alimentate con una razione basata su fieno di graminacee (8 kg/capo/giorno), concentrato (1 kg/capo/giorno) e integrazione oligominerale e vitaminica. Il prelievo è stato effettuato al mattino a distanza di circa 6 ore dal pasto e movimentato sotto flusso di anidride carbonica. Come substrato per le fermentazioni è stata 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 mm. Tale substrato è stato impiegato in misura di 0,5 g di materiale tal quale / unità di fermentazione. Immediatamente prima dell'aggiunta dell'inoculo ruminale, nelle unità di fermentazione delle tesi sperimentali sono stati aggiunti i tannini, sotto forma di soluzione acquosa e in dosi pari a 0,0, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 % del substrato. I calcoli delle dosi effettive di prodotto da aggiungere è stata effettuata in base al contenuto in tannini totali degli stessi. 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 la medesima quantità di substrato e tannini) con l'ulteriore aggiunta di PEG (polietilenglicole) 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. Questo approccio, valido soprattutto per lo studio di foraggi e alimenti in genere contenenti tannini è stato comunque ritenuto interessante anche per estratti "puri" quali quelli utilizzati fino a questo momento in vista dell'impiego di prodotti e sottoprodotti che li contengano in dosi ovviamente inferiori. I controlli hanno riguardato l'evoluzione del contenuto in ammoniaca, controllato dopo 6, 12 e 24 ore di incubazione. Al termine delle fermentazioni tutto il contenuto in minifermentatori è stato filtrato: il filtro con il residuo è stato essiccato per il calcolo della digeribilità della sostanza secca ed è stato recuperato anche un campione di liquido per la eventuale valutazione del contenuto in proteine solubili. Il materiale solido

residuo è stato conservato in quanto si ritiene possibile effettuare sullo stesso anche la determinazione del contenuto in protidi grezzi, non prevista nel protocollo iniziale, almeno per le tesi che risulteranno di maggiore interesse in base ai dati di ammoniaca. Per ciascuna tesi sono state predisposte tre repliche. Altre tre repliche sono state allestite, con identici criteri, per la valutazione gli effetti sui processi di fermentazione dei carboidrati mediante la misurazione della produzione di gas – indicatore indiretto delle cinetiche di fermentazione ruminali – e della digeribilità della fibra (NDF). Per ogni tesi sono quindi stati allestiti 6 mini-fermentatori.

La produzione di gas è stata misurata a 2, 4, 6, 8, 12 e 24 ore dall'avvio della fermentazione. La fermentazione è stata interrotta dopo 24 ore immergendo le bottiglie in un bagno di acqua e ghiaccio. Il contenuto delle bottiglie è stato quindi filtrato e sciacquato ripetutamente. Il filtro con il materiale indigerito è stato essiccato e analizzato per il contenuto in sostanza secca. Per ogni bottiglia, i volumi cumulativi di gas ottenuti a ciascun tempo di incubazione (rapportati alla sostanza organica incubata), sono elaborati utilizzando la procedura NLIN del SAS, secondo il seguente modello:

$$Vol_t = b * (1 - e^{-ct})$$

dove: Vol_t = volume misurato al tempo t (ore); b = massima produzione potenziale di gas; c = velocità di produzione di gas; t = tempo (ore).

Gli estratti di castagno (Figg. 6 e 7) hanno comportato un marcato calo dei livelli di ammoniaca rispetto alle tesi di controllo a tutti i tempi. La dose massima impiegata (4%) del primo prodotto (Fig. 6) ha ridotto i livelli netti di ammoniaca di circa il 90% a 6 ore, del 70% a 12 e del 50% ancora a 24 ore. L'effetto è stato inoltre pressochè linearmente correlato alla quantità di modulatore utilizzato. Il secondo tipo di tannini di castagno (Fig. 7) ha avuto effetti analoghi ma più marcati in fase iniziale di fermentazione e leggermente più sfumati al termine della stessa. Ancora con riferimento alla massima dose di impiego, la produzione di ammoniaca è stata sostanzialmente annullata a 6 e 12 ore e ridotta di circa il 60% a 24 ore. In entrambi i casi il PEG non è stato in grado di contrastare efficacemente l'effetto dei polifenoli sulla degradazione proteica.

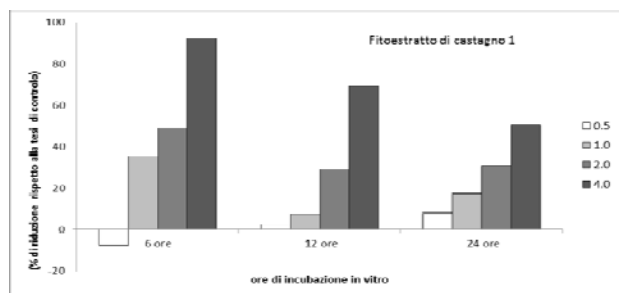


Figura 6 - Effetto dell'impiego di un estratto tannico di castagno (estratto n. 1) sulla produzione di ammoniaca "in vitro" utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi senza tannini.

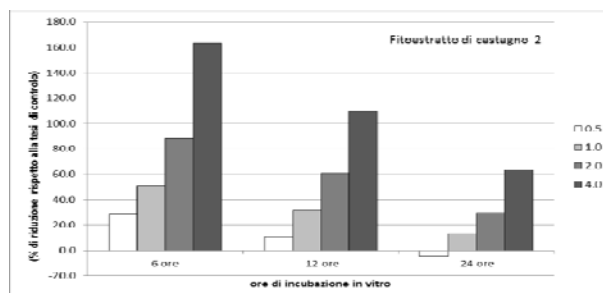


Figura 7 - Effetto dell'impiego di un estratto tannico di castagno (estratto n. 2) sulla produzione di ammoniaca "in vitro" utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi senza tannini.

Anche i tannini tratti dai residui della vinificazione sono risultati efficaci nel modulare la degradazione proteica, ma l'effetto è stato differente in funzione della materia prima di partenza. Quelli derivanti dalla sola buccia d'uva (Fig. 8) sono infatti risultati meno efficaci al tempo più breve (6 ore, calo del 40% circa dell'ammoniaca) ma hanno mantenuto un marcato effetto di contenimento dei livelli di ammoniaca fino al termine della fermentazione (calo del 20 – 25% fino alle 24 ore), mentre quelli da vinaccioli (Fig. 9) hanno avuto un effetto inizialmente molto marcato, con un calo di ammoniaca del 90% circa rispetto al controllo,

che si è mantenuto consistente anche a 12 ore (-60 %) ma si è notevolmente attenuato alle 24 ore (-10% circa).

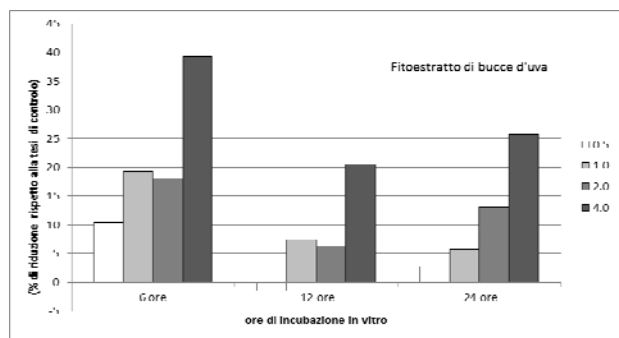


Figura 8 - Effetto dell'impiego di un estratto tannico di bucce d'uva sulla produzione di ammoniaca "in vitro" utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi senza tannini.

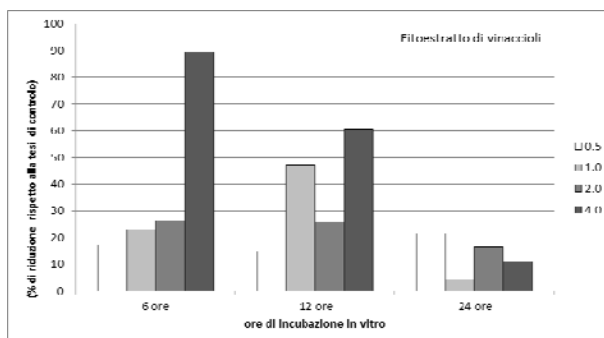


Figura 9 - Effetto dell'impiego di un estratto tannico di vinaccioli sulla produzione di ammoniaca "in vitro" utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi senza tannini.

In entrambi i materiali (bucce d'uva e vinaccioli) i tannini sono costituiti da forme condensate quindi con caratteristiche differenti rispetto a quelli di castagno. Quelli di vinaccioli paiono tuttavia più efficaci nel complessare le sostanze proteiche più facilmente degradabili, e forse solubili, rispetto a quelli ottenuti dalla buccia. In questi casi il PEG ha efficacemente contrastato l'azione complessante dei tannini contenendone molto gli effetti o addirittura aumentando i livelli di ammoniaca, verosimilmente in quanto può avere complessato anche i tannini naturalmente presenti nella medica impiegata come substrato.

Nelle successive Figg. 10-13 sono invece illustrati i risultati relativi alla produzione di gas "in vitro". Si può osservare come i tannini di castagno e dei sottoprodotti della vinificazione abbiano solo marginalmente ridotto la produzione di gas, con percentuali di riduzione non superiori al 5-6% e senza una stretta relazione con le dosi di tannino impiegate. Sotto questo profilo le differenze tra i diversi tannini sono risultate essere molto contenute.

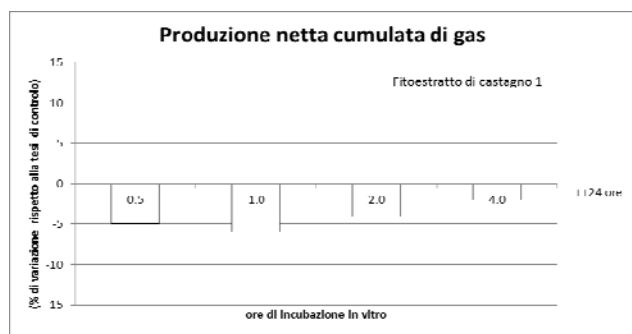


Figura 10 - Effetto dell'impiego di un estratto tannico di castagno (estratto n. 1) sulla produzione di gas "in vitro" utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi senza tannini.



Figura 11 - Effetto dell'impiego di un estratto tannico di castagno (estratto n. 2) sulla produzione di gas "in vitro" utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi senza tannini.

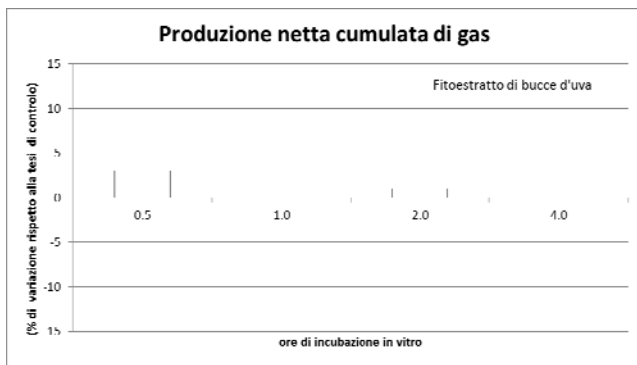


Figura 12 - Effetto dell'impiego di un estratto tannico di bucce d'uva sulla produzione di gas "in vitro" utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi senza tannini.

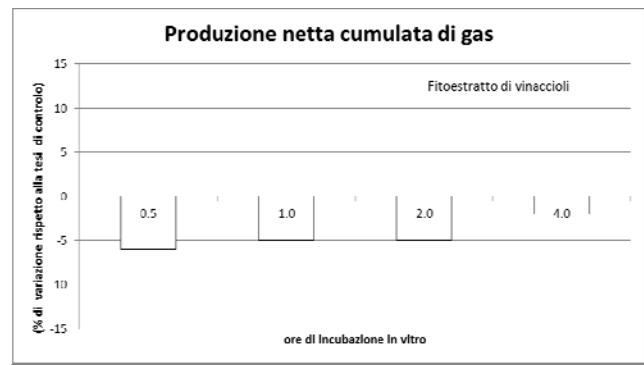


Figura 13 - Effetto dell'impiego di un estratto tannico di vinaccioli sulla produzione di gas "in vitro" utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi senza tannini.

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 ruminanti.

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 14-16 rispettivamente per il tempo di 6 ore, 12 ore e 24 ore di incubazione in vitro.

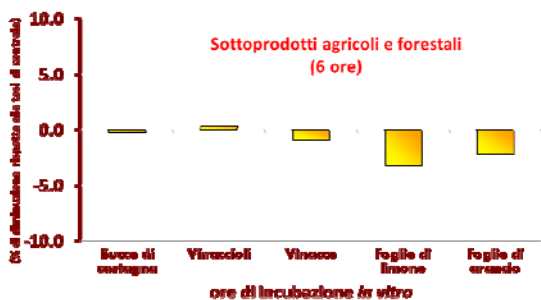


Figura 14 - Effetto dell'impiego di sottoprodotti agro-forestali sulla produzione di ammoniaca in vitro utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori si riferiscono al controllo effettuato dopo 6 ore di incubazione in vitro e sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi i controllo.

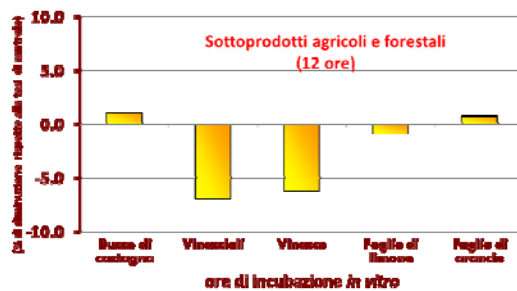


Figura 15 - Effetto dell'impiego di sottoprodotti agro-forestali sulla produzione di ammoniaca in vitro utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori si riferiscono al controllo effettuato dopo 12 ore di incubazione in vitro e sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi i controllo.

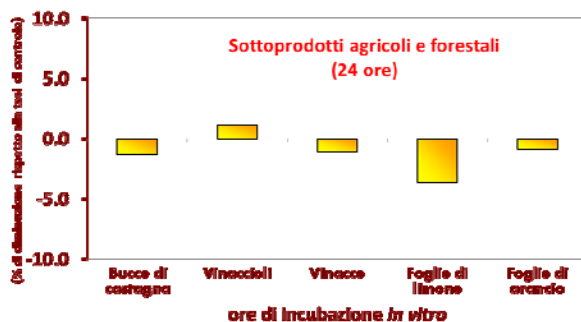


Figura 16 - Effetto dell'impiego di sottoprodotti agro-forestali sulla produzione di ammoniaca in vitro utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori si riferiscono al controllo effettuato dopo 24 ore di incubazione in vitro e sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi i 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, *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. 17), 12 ore (Fig. 18) e 24 ore (Fig. 19) 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.

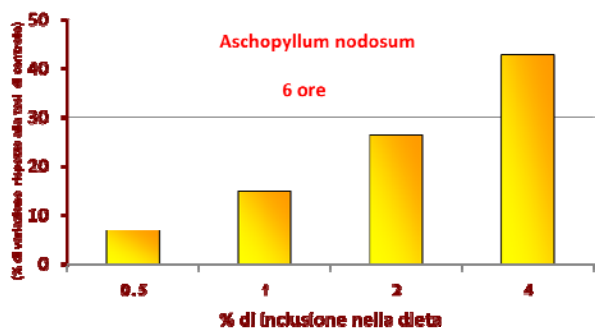


Figura 17 - Effetto dell'impiego di *Ascophyllum nodosum* sulla produzione di ammoniaca in vitro utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori si riferiscono al controllo effettuato dopo 6 ore di incubazione *in vitro* e sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi di controllo senza l'alga.

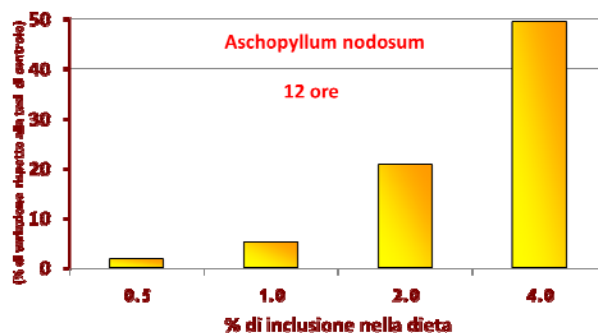


Figura 18 - Effetto dell'impiego di *Ascophyllum nodosum* sulla produzione di ammoniaca in vitro utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori si riferiscono al controllo effettuato dopo 12 ore di incubazione *in vitro* e sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi di controllo senza l'alga.

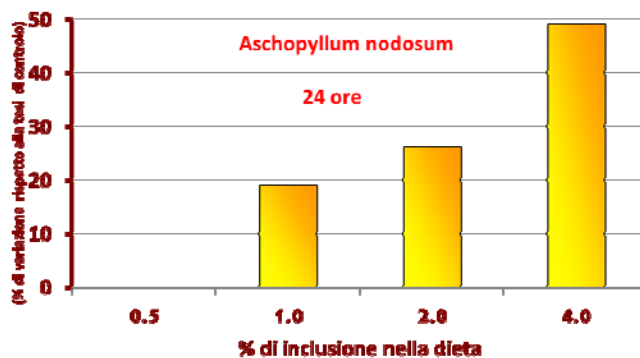


Figura 19 - Effetto dell'impiego di *Ascophyllum nodosum* sulla produzione di ammoniaca *in vitro* utilizzando come substrato erba medica essiccata. I valori si riferiscono al controllo effettuato dopo 24 ore di incubazione *in vitro* e sono espressi come rapporto percentuale rispetto alla tesi di controllo senza l'alga.

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 cellulosa-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 2.

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) e per i concentrati impiegati nella formulazione delle diverse diete sono riportati in Tabella 3.

Tabella 2 – 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 3 – 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 tenore 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. 3).

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 deossinivaleno) mediante metodo immunoaffinità-HPLC e in tutti i casi i valori riscontrati si collocavano al di sotto del limite di rilevanza 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. 4), 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).

Tabella 4 – 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	<i>P</i> <0.01
2 (LAM-1 / SE-1)	26,8 ± 1,7	30,6 ± 1,9	35,3 ± 1,5	<i>P</i> <0.01
3 (SUNF-1 / SLS-1)	29,1 ± 7,5	34,1 ± 7,5	39,6 ± 8,2	<i>P</i> <0.01
4 (LAM-2 / SE-2)	27,2 ± 3,8	32,4 ± 3,0	37,3 ± 2,5	<i>P</i> <0.01
5 (SUNF-2 / SLS-2)	26,8 ± 1,8	31,1 ± 2,5	35,9 ± 4,0	<i>P</i> <0.01
GRUPPO/TRATTAMENTO*		<i>ns</i>	<i>ns</i>	

*Significatività 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 Concanavalina 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. 20) ha esitato in un significativo incremento (*p*<0,01) della capacità proliferativa delle PBMC stimolate con PWM (selettivo

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.

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.

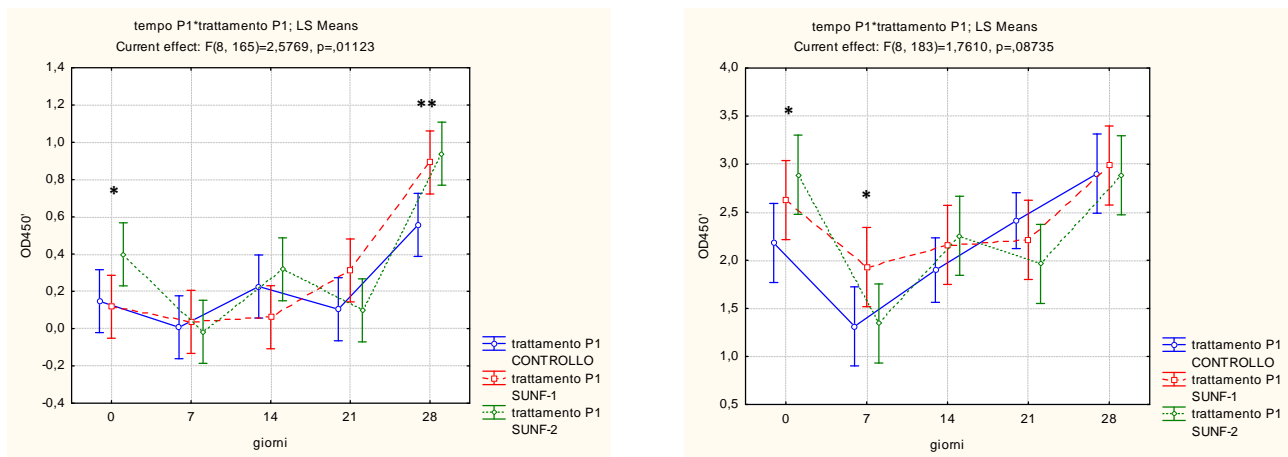


Figura 20 - Capacità proliferativa *in vitro* delle PBMC di capra alimentate con dieta di controllo o diete a diverso livello d'inclusione di pannello di girasole biologico. A destra stimolazione con PWM, a sinistra stimolazione con ConA. Dati (media±DS) espressi in unità di densità ottica a 450 nm. ** 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.

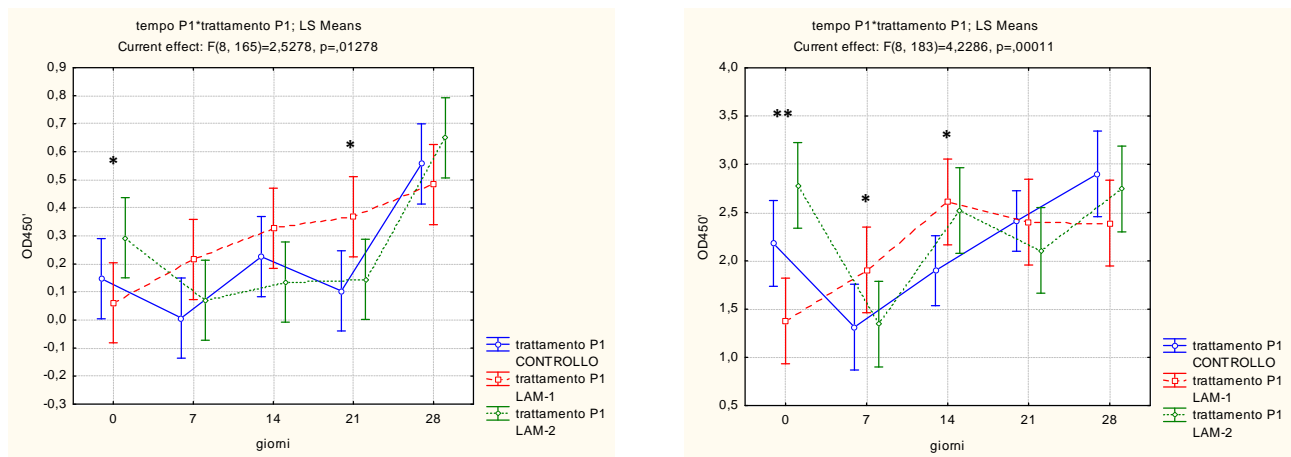


Figura 8 – Capacità proliferativa *in vitro* delle PBMC di capra alimentate con dieta di controllo o diete a diverso livello d'inclusione di pannello di girasole biologico. A destra stimolazione con PWM, a sinistra stimolazione con ConA. Dati (media±DS) espressi in unità di densità ottica a 450 nm. ** 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. 21).

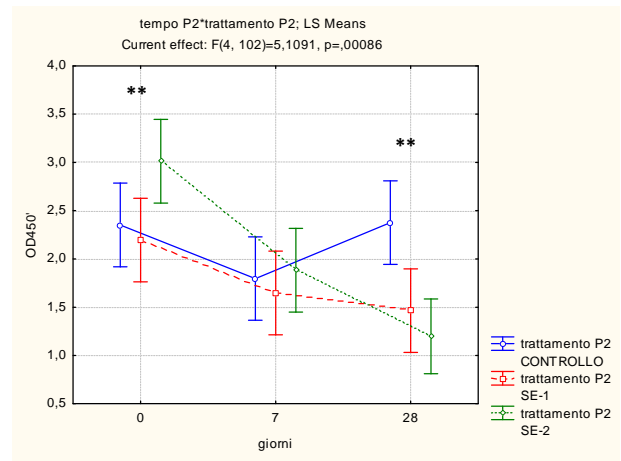
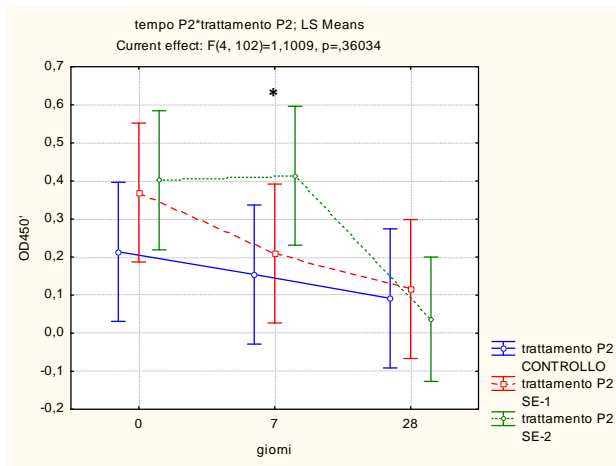


Figura 21 – Capacità proliferativa *in vitro* delle PBMC di capra stimolate con PWM (a sinistra) e ConA (a destra) dopo alimentazione per 28 giorni con dieta di controllo e diete contenenti lievito selenizzato a diverso livello d’inclusione (SE-1 e SE-2) Dati (media±DS) espressi in unità di densità ottica 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 (H_2O_2) 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. 22), 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.

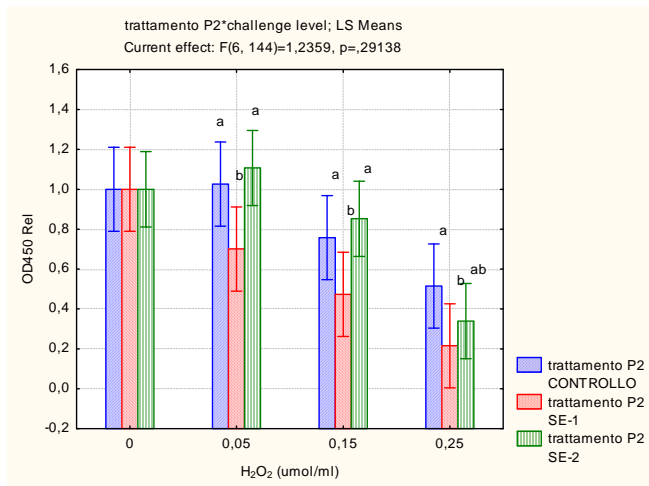


Figura 22 – Capacità proliferativa *in vitro* delle PBMC di capre alimentate con dieta di controllo o dieta includente lievito selenizzato a due livelli (SE-1 e SE-2) stimolate con ConA in presenza di livelli crescenti di perossido d’idrogeno. Dati (media±DS) espressi in unità di densità ottica relativa rispetto al saggio senza H_2O_2 . ^{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. 23). 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 mg/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.

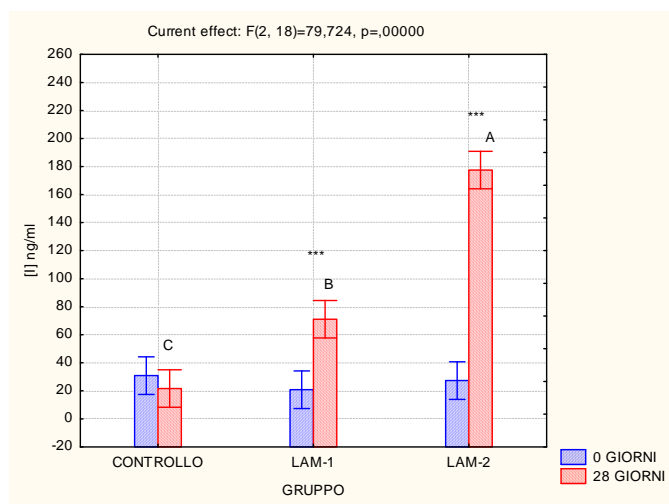


Figura 23 – Livelli plasmatici di iodio (media \pm DS) in capre alimentate con dieta di controllo o diete a diverso livello d’inclusione di laminaria (LAM-1 e LAM-2) in sperimentazione fino a 28 giorni di sperimentazione. Dati espressi come media \pm ES. ^{A,B,C} significatività delle differenze ($p < 0,01$) 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)

L’obiettivo specifico di questo WP è consistito nello sviluppo e adattamento “on farm” delle strategie d’intervento alimentare basate sull’impiego di estratti vegetali e fitoderivati atte a superare le criticità del sistema d’allevamento dei ruminanti da latte in biologico. Conformemente a tale obiettivo, quindi, è stata selezionata un’azienda di capre da latte di razza Saanen, sita nella Provincia di Viterbo che per strutturazione e disponibilità dimostrata da parte dell’allevatore ha consentito di programmare una prova di alimentazione con supplementazione di fitoestratti e fitoderivati. Quale ambito della sperimentazione, è stato scelto il periodo del peri-parto, che particolarmente nell’allevamento delle specie lattifere, è notoriamente critico.

Tale WP, la cui implementazione complessiva ha durata di mesi 8, si articola in due gruppi di attività principali (Task):

T.3.1 Analisi di contesto aziendale e sviluppo di specifici piani sperimentali “on farm”.

Al fine di valutare accuratamente il valore nutrizionale delle materie prime, dei formulati commerciali (mangimi completi) e delle integrazioni utilizzate in azienda per il razionamento in biologico della capra da latte, sono stati prelevati campioni rappresentativi della razione e delle diverse componenti del piano alimentare aziendale per l’alimentazione delle capre nell’ultima fase di gestazione. Al fine di determinare il valore nutritivo, su tali campioni sono state effettuate:

1) analisi centesimali: proteine grezze (PG), lipidi grezzi (LG) e ceneri secondo le metodiche AOAC 2001.12, 978.04, 920.39 e 930.05, (AOAC, 2000), fibra grezza (FG) secondo il metodo Weende, e le frazioni fibrose NDF (Goering & Van Soest, 1970) ADF e ADL (Van Soest *et al.*, 1991);

2) quantificazione delle vitamine liposolubili e del contenuto in oligoelementi Se e I. Per la determinazione delle vitamine liposolubili si è fatto ricorso al metodo pubblicato da Mestre Prate *et al.*, (2006) precedentemente adattato e validato per la quantificazione degli isomeri del tocoferolo (TCF) in campioni di unifeed. La determinazione del selenio è stata condotta mediante tecnica di Assorbimento Atomico con

atomizzazione a fornetto di grafite e lo iodio (ioduro) è stato determinato mediante metodo spettrofotometrico (Mahesh *et al.*, 1992).

T.3.2 Sviluppo piani sperimentali “*on farm*” e conduzione delle prove di somministrazione dei formulati contenenti estratti vegetali e fitoderivati.

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. 24) e la mungitura viene effettuata meccanicamente con impianto lineare a 12 posti a linea bassa.



Figura 24 – 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. 5).

Tabella 5 – 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 etero; 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.

In base alle verifiche effettuate sulla razione correntemente utilizzata dall'azienda in studio nel pre-parto ed ai risultati preliminari ottenuti per iodio (sotto forma di Laminaria), vitamina E (sotto forma di pannello di girasole), selenio (sotto forma di lievito selenizzato) e tannini nel corso delle attività sperimentali completate nella Fase 1 (WP1 e WP2) è stato possibile formulare tre diete con integrazione, alternative a quella corrente d'uso aziendale (CONTROLLO) (Tab. 6).

Tabella 6 – Formulazione delle diete per capre da latte (g/capo/die) utilizzate nella prove di alimentazione “on farm”.

Dieta	Pannello di girasole ^{3*}	Laminaria ^{4*}	Lievito selenizzato ^{5**}	Tannino ^{6**}	Mais ^{***}	Orzo ^{***}	Soia ^{***}	PB	FL
CONTROLLO	-	-	-	-	300	180	120	200	1500
TAN	-	-	-	50	300	180	120	200	1500
LSe+LAM	-	0,51	0,18	-	300	180	120	200	1500
SUNF+LAM	108	0,51	-	-	300	180	12	200	1500

*prodotti commerciali con certificazione biologica; ** prodotto commerciale non certificato biologico; ***schiacciati in miscela.

PB = polpe id barbabietola; FL = fieno di *Lolium multiflorum*; CONTROLLO = dieta aziendale pre-parto; TAN = dieta con addizione di tannino al 2%; LSe+LAM = dieta con integrazione di lievito selenizzato e Laminaria per la co-supplementazione in selenio e iodio; SUNF+LAM = dieta con integrazione di pannello di girasole e Laminaria per la co-supplementazione in Vitamina E e iodio.

La formulazione delle differenti diete (isoenergetiche e isoproteiche) ha consentito di incrementare i livelli di Vitamina E, iodio e selenio rispetto alla razione aziendale pre-parto (Tab. 7). Grazie all'elevata concentrazione di iodio e selenio nei prodotti impiegati (Laminaria e lievito selenizzato) è stato possibile incrementare il tenore dei due elementi di un fattore superiore a tre.

Tabella 7 – Composizione e valore nutritivo delle diete sperimentali utilizzate nella prova di alimentazione “on farm”.

DIETA	SS Kg/die	CEN Kg/die	PG Kg/die	EE Kg/die	NDF Kg/die	ADF Kg/die	ADL Kg/die	CNS Kg/die	EM Mcal/die	UFL/ die	VitE mg/die	I mg/die	Se mg/die
CONTROLLO	2,03	0,16	0,27	0,06	0,92	0,63	0,13	0,72	5,2	1,8	40,7	2,28	0,18
TAN*	2,03	0,16	0,27	0,06	0,92	0,63	0,13	0,72	5,2	1,8	40,7	2,28	0,18
LSe+LAM	2,03	0,16	0,27	0,06	0,92	0,63	0,13	0,72	5,2	1,8	40,7	7,02	0,97
SUNF+LAM	2,14	0,16	0,28	0,07	1,02	0,71	0,15	0,70	5,0	1,8	63,7	6,90	0,20

*alla dieta di controllo è stato aggiunto il tannino in ragione del 2% in peso. SS = sostanza secca; CEN = ceneri; PG = protidi grezzi; EE = estratto etereo; FG = fibra grezza; NDF = fibra neutro deterosa; ADF = fibra acido deterosa; ADL = lignina acido deterosa; CNS = carboidrati non strutturali; EM = energia metabolizzabile; UFL = unità foraggiere latte; VitE = Vitamina E; I = iodio; Se = selenio.

Per contro, nel caso della Vitamina E, la dieta SUNF+LAM è risultata incrementata in Vitamina E solo del 50% rispetto alla dieta di controllo. Ciò è stato dettato dall'elevato tenore di grassi grezzi del pannello di girasole, che ne ha sconsigliato livelli d'inclusione superiori a quello testato.

Di comune accordo con l'allevatore, 32 capre nell'ultima fase di gestazione sono state selezionate all'interno di 4 differenti gruppi già formati della consistenza ciascuno di 24-26 capre (Fig. 25A). Gli animali selezionati (parità media per gruppo 1,75) sono stati quindi dotati di collare e targhetta identificativa (numerazione progressiva: da 01 a 32) per consentirne il rapido riconoscimento. I quattro gruppi di capre sono stati quindi alimentati con le diverse diete rappresentate in Tabella 7, somministrate in due momenti della giornata (post-mungitura, mattina e sera).

³ *Laminaria digitata* disidratata in polvere (LAM 20/50) fornita dalla Thorverk Inc. (Islanda), certification Quality Assurance International n. C0030838-CORHPC-2, n. C0030838-NOPHPC-4, n. C0030838-CORWCP-2 e n. C0030838-NOPWCP-4.

⁴ Fornito da Organic Oils SpA, Mugnano di Perugia, N. certificazione 0401/2009 Cod. Controllo IT BAC 104064.

⁵ SELPLEX 2300 Altech UK, gentilmente fornito dalla ditta Sepron srl, Roma.

⁶ Saviotan Feed, gentilmente fornito dalla ditta Gruppo Mauro Saviola srl, Piancastagnaio, Siena.

La somministrazione dell'integrazione con selenio/iodio (dieta LSe+LAM) e Vitamina E/iodio (dieta SUNF+LAM) è avvenuta giusto prima della distribuzione in mangiatoia dei concentrati della razione (miscela di schiacciati) utilizzando miscele di sfarinati (mais/orzo/soia o mais/orzo/panello di girasole/soia) contenenti le sostanze (Vit E + I e Se) (Fig. 25B) opportunamente pre-dosati e omogeneizzati presso i laboratori dell'Università della Tuscia. Nella distribuzione degli schiacciati per le diete SUNF+LAM e LSe+LAM, è stato tenuto conto dell'apporto degli sfarinati (100 g/capo/die). Per il tannino, invece, quest'ultimo è stato direttamente addizionato durante la formazione della miscela degli schiacciati aziendali (Fig. 25C) e distribuito contestualmente in mangiatoia.

L'alimentazione con le diverse diete sperimentali ha avuto la durata di 4 settimane (dal 8 marzo 2012 al 7 aprile 2012) durante le quali sono stati effettuati prelievi ematici (pre-trattamento, seconda e quarta settimana di sperimentazione) e, per le capre nel *post-partum*, prelievi individuali di latte durante la mungitura mattutina. Nelle tre settimane successive al razionamento controllato (settimane 5 e 7 di sperimentazione), sono stati effettuati ulteriori prelievi ematici al fine di studiare eventuali effetti del razionamento sperimentale nel post-trattamento.



Figura 25. (A) Gruppi sperimentali di capre in tarda gestazione; (B) integrazione di sfarinati contenente Vitamina E, selenio e iodo predosati; (C) miscelazione di schiacciati aziendali con addizione di tannino in polvere.

Work Package 4 (WP 4)

Tra i diversi obiettivi di questo WP il principale consta nella validazione di protocolli applicabili a scala aziendale mediante studio d'indicatori di salute e benessere animale e di qualità della produzione.

T.4.1 Controlli sui gruppi sperimentali relativamente a parametri del metabolismo, della produzione, della salute e del benessere animale.

Al fine di valutare possibili effetti dei trattamenti alimentari con pannello di girasole, laminaria, lievito selenizzato per la supplementazione di Vitamina E, iodio e selenio (organico) e di tannino sulla risposta immunitaria e sui parametri metabolici delle capre in studio, sono stati effettuati dei prelievi ematici sia nella fase di trattamento che in quella successiva. Su aliquote di tessuto ematico, sono stati condotti saggi di proliferazione *in vitro* per la componente mononucleata del sangue periferico (PBMC), secondo protocolli già utilizzati nel corso del presente Programma di Ricerca (Fase 1). Aliquote di plasma ematico sono state inoltre conservate a -18°C per la successiva determinazione del profilo metabolico e per la quantificazione di iodio, Vitamina E e selenio. La stimolazione delle PBMC è stata condotta utilizzando due diversi mitogeni, Pokeweed Mitogen (PWM) e Concaalina A (ConA) (Sigma, Italia) che stimolano in maniera differenziale le diverse componenti cellulari presenti (linfociti T e linfociti B+T, rispettivamente). La stimolazione con i due differenti mitogeni, ha consentito di rilevare effetti interessanti attribuibili ai trattamenti (Fig. 26).

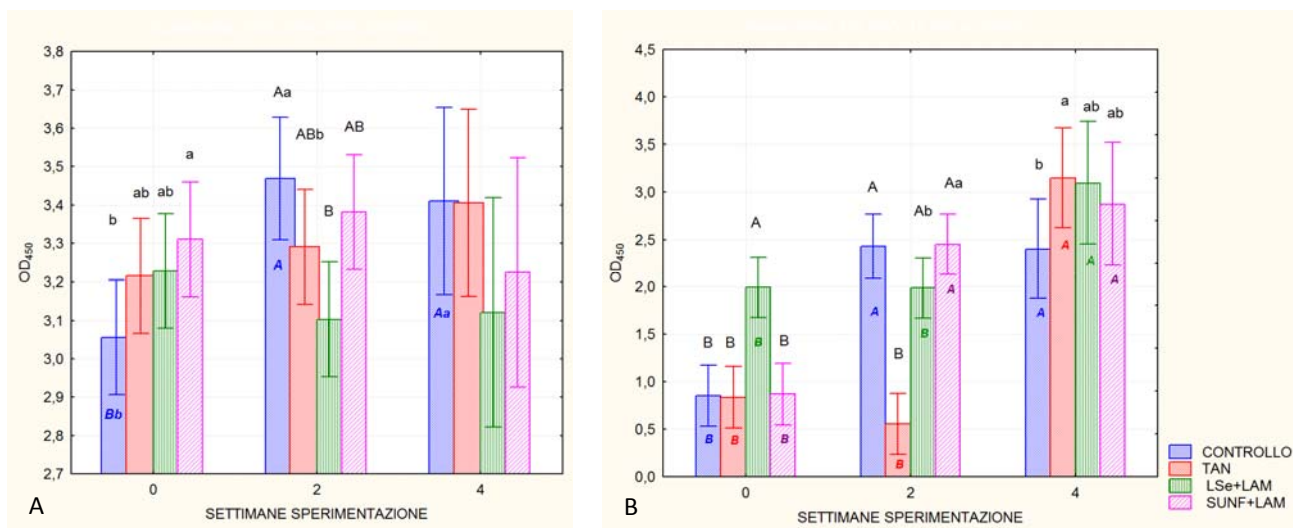


Figura 26. Capacità proliferativa *in vitro* delle PBMC di capre alimentate con dieta aziendale (CONTROLLO) o diete con inclusione di pannello di girasole e laminaria (SUNF+LAM), di tannino (TAN) e lievito selenizzato (LSe). Cellule stimolate con Con A (grafico A) e con PWM (grafico B). Dati (media±ES) espressi in unità di densità ottica a 450 nm. Significatività delle differenze: ^{A,B}p<0,01; ^{a,b}p<0,05 entro settimana di sperimentazione; ^{A,B}p<0,01; ^{a,b}p<0,05 entro trattamento.

Nel caso della stimolazione con la ConA (Fig. 26A), rispetto alle capre di controllo, i differenti trattamenti non sembrano aver esercitato effetti significativi sulla capacità proliferativa dei linfociti T. Le differenze registrate tra trattamenti e controlli, entro settimana, sono pertanto da attribuirsi essenzialmente alla variazione subita dai controlli nel corso della sperimentazione. E' tuttavia da rilevare un trend positivo, sebbene non significativo, nella capacità proliferativa per le PBMC delle capre trattate con tannino (gruppo TAN). Per quanto riguarda la popolazione dei linfociti B e T (stimolati dal mitogeno PWM), oltre a mostrare per il gruppo CONTROLLO un trend simile a quanto osservato nel caso della stimolazione con ConA, questa ha subito significativi incrementi in termini di capacità proliferativa già dopo due settimane di trattamento con Vitamina E più iodio (gruppo SUNF+LAM) e comunque dopo le quattro settimane di supplementazione con lievito selenizzato (gruppo LSe) o di trattamento con tannino (gruppo TAN) (Fig. 26B). I controlli nella fase di post-trattamento (dalla quarta alla settima settimana della sperimentazione "on farm") hanno consentito di evidenziare una lieve ma significativa riduzione della capacità proliferativa delle PBMC stimolate con la ConA (Fig. 27A) alla 7 settimana per le capre alimentate con tannino e lievito selenizzato mentre non sono state rilevate significative differenze tra la quarta e la settima settimana nel caso del trattamento con pannello di girasole e Laminaria (gruppo SUNF+LAM).

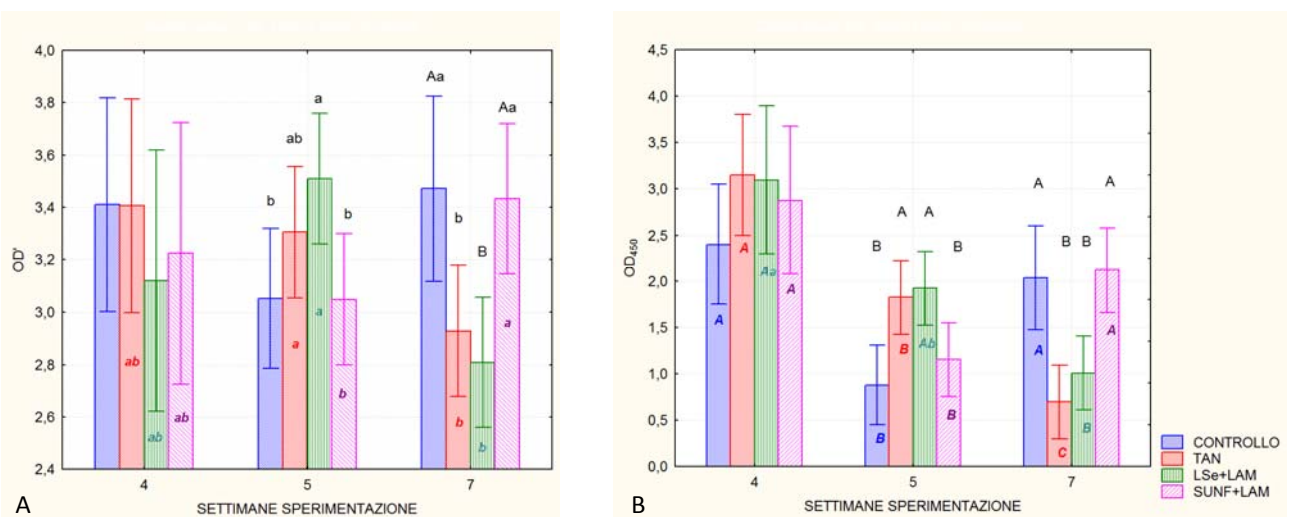


Figura 27. Verifica in post-trattamento della capacità proliferativa *in vitro* delle PBMC di capre alimentate

nel pre-parto con dieta aziendale (CONTROLLO) o diete con inclusione di pannello di girasole e laminaria (SUNF+LAM), di tannino (TAN) e lievito selenizzato (LSe). Cellule stimale con Con A (grafico A) e con PWM (grafico B). Dati (media±ES) espressi in unità di densità ottica a 450 nm. Significatività delle differenze: ^{A,B}p<0,01; ^{a,b}p<0,05 entro settimana di sperimentazione; ^{A,B}p<0,01; ^{a,b}p<0,05 entro trattamento.

All'interno delle PBMC, la popolazione dei linfociti B e T ha mostrato un chiaro decremento della capacità proliferativa per quel che riguarda gli animali trattati in precedenza con tannino e lievito selenizzato+Laminaria (gruppi TAN e LSe) mentre, a parte una sensibile riduzione registrata alla 5° settimana, il potenziale proliferativo è risultato invariato tra la fine del trattamento e la fine della sperimentazione (Fig. 27B) nel caso del trattamento con pannello di girasole e Laminaria. Un simile andamento è stato comunque riscontrato per il gruppo CONTROLLO. Sono tutt'ora in corso di completamento le indagini circa l'effetto della somministrazione del pannello di girasole, Laminaria, lievito selenizzato e tannino sui livelli plasmatici di Vitamina E, selenio, iodio ed i profili metabolici. L'insieme di queste informazioni potrà consentire di interpretare più esaurientemente le evidenze ottenute circa la risposta immunitaria cellulo-mediata.

Al fine di verificare eventuali interazioni tra la somministrazione nel pre-parto dei diversi principi attivi oggetto di studio (Vitamina E, iodio, selenio) e del tannino e la qualità del latte delle capre oggetto di sperimentazione, sono stati raccolti in occasione della mungitura mattutina campioni individuali di latte (Fig. 28). I campioni raccolti su base settimanale sono stati trasferiti presso il laboratorio dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale per le Regioni Lazio e Toscana (Roma) per l'analisi composizionale e del contenuto in cellule somatiche e carica batterica totale.



Figura 28. Prelievo di campioni individuali di latte presso l'azienda di capre da latte oggetto della sperimentazione "on farm".

Come si può evincere dalla Tabella 8, il trattamento ha avuto effetto significativo sulla percentuale di grasso e di proteina ma anche sulle caratteristiche igienico-sanitarie del latte.

Tabella 8. Dati medi (±deviazione standard) relativi ai parametri determinati su campioni individuali di latte di capre trattate in pre-parto con diete sperimentali.

	Gruppo sperimentale				Effetto	
	CONTROLLO	TAN	LSe+LAM	SUNF+LAM	Tempo di prelievo	Trattamento
N	18	21	28	24		
GRASSO (%)	3,98 ± 2,62	2,91 ± 2,19	2,02 ± 0,89	2,33 ± 1,44	n.s.	***
PROTEINE (%)	3,45 ± 0,90	3,75 ± 1,34	3,16 ± 0,69	3,18 ± 0,61	***	*
LATTOSIO (%)	4,40 ± 0,40	4,43 ± 1,00	4,67 ± 0,23	4,65 ± 0,36	n.s.	n.s.
RESIDUO (%)	8,50 ± 1,06	8,80 ± 0,54	8,59 ± 0,73	8,59 ± 0,91	***	n.s.
ACIDITA' (°SH)	8,71 ± 0,51	8,67 ± 0,60	8,55 ± 0,59	8,70 ± 0,37	***	n.s.
ACIDITA' (pH)	6,48 ± 0,14	6,42 ± 0,25	6,49 ± 0,05	6,59 ± 0,43	n.s.	n.s.
CRIOSCOPIA (C°)	0,550 ± 0,021	0,548 ± 0,018	0,552 ± 0,016	0,549 ± 0,019	***	n.s.
SSC (x1000/ml)	3045 ± 5878	1633 ± 2628	421 ± 513	729 ± 1009	*	**

CBT (x1000UFC/ml)	1780 ± 1757	1001 ± 1275	825 ± 1390	865 ± 1356	*	*
----------------------	-------------	-------------	------------	------------	---	---

CONTROLLO = gruppo di capre alimentate con dieta aziendale pre-parto; TAN = gruppo di capre alimentate con supplemento di tannino; LSe+LAM = gruppo di capre alimentate con supplemento di lievito selenizzato e Laminaria; SUNF+LAM = gruppo di capre alimentate con supplemento di Vitamina E e iodio sotto forma, rispettivamente, di pannello di girasole e Laminaria. Significatività: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. = $> 0,05$.

Con particolare riferimento al tenore in grasso del latte (Fig. 29A), in occasione del I e IV prelievo non sono state riscontrate differenze tra gruppi trattati e gruppo di controllo. Solo nel caso degli animali trattati con tannino è stato osservato un tenore di grasso significativamente superiore in occasione del secondo prelievo, in parziale sovrapposizione a quanto osservato per il gruppo di controllo. Il tenore in proteina del latte è risultato significativamente maggiore in tutti i trattamenti rispetto al controllo in occasione del primo prelievo (Fig. 29A). Nei tre successivi prelievi non sono state rilevate differenze significative nel tenore in proteina tra trattamenti e controllo sebbene sia da rilevare che, per il gruppo trattato con tannino (TAN), il trend negativo di questo parametro è apparso ritardato di una settimana rispetto a quello degli altri due trattamenti (SUNF+LAM e LSe+LAM).

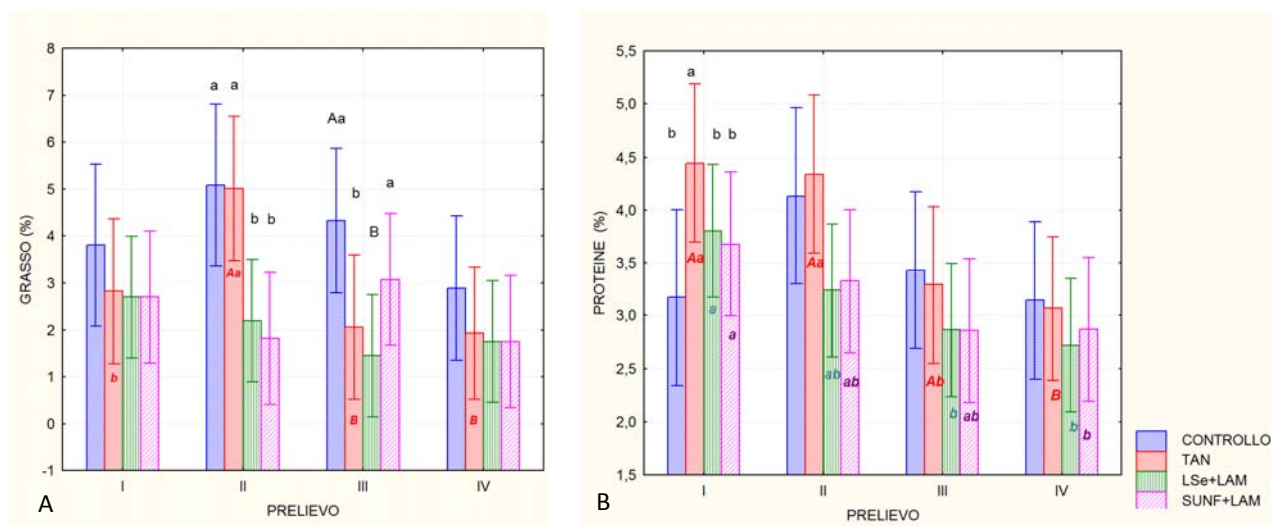


Figura 29. Verifica in post-trattamento del contenuto in grasso (A) e proteine (B) del latte di capre alimentate nel pre-parto con dieta aziendale (CONTROLLO) o diete con inclusione di pannello di girasole/laminaria (SUNF+LAM), di tannino (TAN) e lievito selenizzato/Laminaria (LSe+LAM). Dati (media±ES) espressi in unità di densità ottica a 450 nm. Significatività delle differenze: ^{A,B} $p < 0,01$; ^{a,b} $p < 0,05$ entro settimana di sperimentazione; ^{A,B} $p < 0,01$; ^{a,b} $p < 0,05$ entro trattamento.

Il contenuto in cellule somatiche del latte (SSC) prelevato in occasione dei quattro controlli in mungitura, è risultata significativamente più elevata per il gruppo di controllo e per le capre alimentate nel pre-parto con dieta addizionata di tannino solo nei campioni del secondo prelievo (Fig. 30A). La conta delle cellule somatiche nei campioni di latte delle capre alimentate nel pre-parto con diete arricchite di Vitamina E/iodio (gruppo SUNF+LAM) e selenio organico/iodio (gruppo LSe+LAM) è risultata relativamente costante nel corso dell'intero ciclo di controllo con valori medi inferiori ad 1×10^6 cellule/ml.

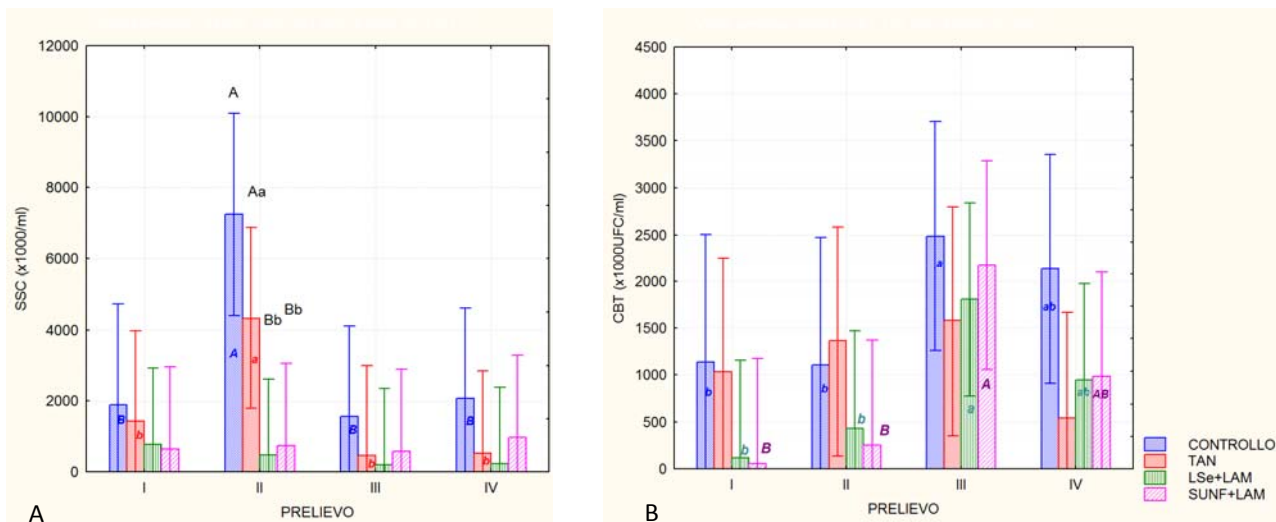


Figura 30. Verifica in post-trattamento del contenuto in cellule somatiche (SCC)(A) e della carica microbica totale (CBT)(B) del latte di capre alimentate nel pre-parto con dieta aziendale (CONTROLLO) o diete con inclusione di pannello di girasole/laminaria (SUNF+LAM), di tannino (TAN) e lievito selenizzato/Laminaria (LSe+LAM). Dati (media±ES) espressi in unità di densità ottica a 450 nm. Significatività delle differenze: ^{A,B}p<0,01; ^{a,b}p<0,05 entro settimana di sperimentazione; ^{A,B}p<0,01; ^{a,b}p<0,05 entro trattamento.

Per quanto riguarda la carica microbica del latte (CBT) è da registrare che, sebbene non siano state rilevate significative differenze tra trattamenti e controllo sull'intero ciclo di prelievi, i campioni di latte relativi al I e II prelievo del trattamento in pre-parto con Vitamina E/iodio hanno mostrato un livello di carica batterica totale significativamente inferiore rispetto a quanto registrato in occasione del III prelievo.

Sintesi dei risultati e considerazioni conseguiti

- 1) Sulla base dei risultati disponibili che saranno utilizzati per formulare diete per piccoli ruminanti da latte arricchite di Selenio, Vitamina E, iodio e composti tannici partendo da fitoderivati individuati nel corso di questa prima fase, si può affermare che:
 - un livello di Selenio nel mezzo di coltura di 150 µgSe/l rappresenta un valore che garantisce la piena potenzialità di risposta "in vitro" del sistema cellulare testato (PBMC di capra), apparentemente senza differenze significative ascrivibili alla forma chimica in cui l'elemento è stato impiegato (selenato, selenito, seleno-metionina, seleno-cisteina e seleno-cistina); sulla scorta dei dati rinvenuti consultando la letteratura di settore, con particolare riferimento ai piccoli ruminanti, il livello ematico di 150 µgSe/l sembra un obiettivo raggiungibile mediante opportuni interventi alimentari;
 - le verifiche effettuate "in vitro" hanno consentito d'individuare, nel mezzo di coltura delle PBMC di capra, un livello di Vitamina E pari a 1,8 µg/ml come ottimale per la stimolazione dei preferenzialmente dei linfociti T e 1,2-1,8 µg/ml per quella dei linfociti B mediate, rispettivamente, dai mitogeni ConA e PWM; anche in questo caso la letteratura disponibile consente di prevedere il raggiungimento di tali livelli "in vivo" mediante idonei interventi alimentari volti ad integrare la razione con fitoderivati ad elevato titolo di Vitamina E;
 - la presenza di Iodio sottoforma di ione ioduro (f. inorganica) e sottoforma di ormone tiroideo T4 alle concentrazioni nel mezzo di coltura delle PBMC di capra di 2-4 µg/ml e 35 pg/ml rispettivamente, incrementa significativamente la capacità proliferativa di diverse popolazioni linfocitarie (Linfociti T e B) indicando che interventi alimentari tesi a migliorare la disponibilità di Iodio per la capra da latte possono produrre benefici in termini di risposta immunitaria cellulo-

mediata; in vista dell'applicazione "ex vivo" e poi "on farm", tali risultati appaiono riproducibili mediante idonea integrazione alimentare con fitoderivati ricchi in Iodio;

- gli estratti tannici testati hanno marcatamente ridotto la produzione di ammoniaca "in vitro", in misura largamente dose-dipendente sebbene le modalità di azione dei tannini ottenuti da fonti diverse non sono apparse esattamente sovrapponibili, per cui si intravede la possibilità impiego combinato di tipi diversi di tannino al fine di sfruttare utili sinergie tra le differenti forme chimiche;
 - l'effetto deprimente sull'attività ruminale nel suo complesso, che spesso si attribuisce ai tannini, è risultato contenuto entro limiti più che accettabili, almeno in base ai risultati delle prove di gas production. E' tuttavia necessario attenderne la conferma dai risultati relativi alla digeribilità della sostanza secca e della fibra, attualmente in corso e che saranno disponibili in tempi molto brevi.
- 2) Sulla base dei risultati ottenuti nel corso del secondo semestre d'attività che possono essere 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.

- 3) Sulla base dei risultati ottenuti nel corso del terzo semestre d'attività di progetto, possono essere tratte le seguenti considerazioni conclusive:
- la supplementazione con Vitamina E, iodio e selenio e l'aggiunta di tannino, condotte secondo il protocollo sviluppato e dettagliato nella presente relazione, sono risultati perfettamente integrabili nella regolare attività di gestione dell'allevamento della capra da latte;
 - 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 nelle capre da latte in tarda gestazione, non hanno determinato effetti negativi sulla risposta immunitaria cellulo-mediata che, alla fine del periodo di trattamento, è risultata simile o leggermente superiore al controllo (nel caso di stimolazione con PWM); tali risultanze confermano quanto osservato nelle precedenti fasi della sperimentazione *in vitro* ed *in vivo* previste dal programma di ricerca.
 - anche l'impiego di tannino in ragione del 2% sul totale dei concentrati utilizzati nel razionamento in pre-parto, non ha esercitato effetti negativi sulla capacità proliferativa delle PBMC di capra;
 - l'effetto del razionamento sperimentale per la supplementazione in Vitamina E, iodio e selenio sembra aver esercitato un lieve effetto depressivo sul tenore di grasso del latte che tuttavia non è stato riscontrato in tutti i controlli. Per contro, il trattamento con tannino ha esercitato un interessante effetto positivo sul tenore proteico del latte, particolarmente nei controlli immediatamente successivi alla fine del periodo sperimentale (dal parto alla prima settimana di lattazione); tale effetto è imputabile alla modulazione della degradazione proteica ruminale, fenomeno adeguatamente testimoniato nella letteratura di settore in merito a diverse tipologie di composti polifenolici;
 - i risultati preliminari hanno evidenziato un significativo effetto sul contenimento del tenore in cellule somatiche nel latte di capra, da attribuirsi al trattamento alimentare con i diversi fitoderivati apportanti Vitamina E, selenio e iodio;
 - ai livelli testati nelle prove "*on farm*", la supplementazione con Vitamina E/iodio e selenio/iodio nel pre-parto, sembra aver esercitato un effetto positivo, benché non significativo, nella riduzione della carica microbica totale del latte di capra.

Nel complesso, le risultanze preliminarmente ottenute nel corso della prova "*on farm*", consentono di affermare che la supplementazione in Vitamina E, iodio e Selenio e l'impiego del tannino utilizzando diversi fito-derivati è risultata applicabile a scala aziendale con risultati interessanti in termini di funzionalità del sistema immunitario della capra da latte nel pre-parto e di caratteristiche qualitative del prodotto.