

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**

**FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA**

*DIPARTIMENTO DI SCIENZE ZOOTECNICHE ED ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI*



**TESI DI DOTTORATO**

IN

*Produzione e sanità degli alimenti di Origine Animale*

*XXIV CICLO*

***Riduzione delle emissioni azotate nell'allevamento della  
bufala da latte***

**Tutor:**

**Ch.mo** Prof. Antonio Di Francia

**Coordinatore:**

**Ch.ma** Prof.ssa Maria Luisa Cortesi

**Candidato:**

Dott. Giacomo Contò

Anni Accademici  
2008-2011

<b>1. IMPATTO AMBIENTALE</b> .....	4
<b>1.1. IMPATTO AMBIENTALE NEL SISTEMA ZOOTECNICO</b> .....	8
1.1.1 <i>BIOSSIDO DI CARBONIO</i> .....	9
1.1.2 <i>METANO</i> .....	11
<b>2. L'AZOTO NEL SISTEMA AGRICOLO</b> .....	21
2.1 L'AZOTO E IL SISTEMA COLTURALE: I FERTILIZZANTI .....	21
<b>3. L' AZOTO NEL COMPARTO ZOOTECNICO</b> .....	26
<b>3.1 EMISSIONE DI AZOTO</b> .....	26
<b>3.2 ESCREZIONE DI AZOTO</b> .....	31
3.2.1 <i>ESCREZIONI FECALI</i> .....	32
3.2.2 <i>ESCREZIONE DI AZOTO URINARIO</i> .....	34
3.2.3 <i>CICLO DELL'AZOTO ESCRETO</i> .....	36
<b>4. L'AZOTO NEL RUMINE</b> .....	40
4.1 DEGRADAZIONE RUMINALE DELLE PROTEINE.....	40
4.2 CINETICA DELLA DEGRADAZIONE RUMINALE DELLE SOSTANZE AZOTATE.....	44
4.3 CICLO DEI NITRATI/NITRITI NEL RUMINE .....	48
4.4 METABOLISMO PROTEICO .....	52
<b>5. PRINCIPALI EFFETTI DELL'INQUINAMENTO DA AZOTO</b> .....	54
5.1 EUTROFIZZAZIONE .....	54
<b>6. NORMATIVE ANTINQUINAMENTO</b> .....	59
6.1 <i>NORMATIVA NITRATI</i> .....	61
<b>7. SCOPO DELLA RICERCA E DISEGNO SPERIMENTALE</b> .....	66
<b>8. INDAGINE CONOSCITIVA</b> .....	67
8.1 INTRODUZIONE .....	67
8.2 MATERIALE E METODI .....	69
8.2.1 <i>STIMA DEI FABBISOGNI NUTRIZIONALI IN BASE AL LBN PRODOTTO</i> .....	71
8.2.2 <i>MODELLI STATISTICI</i> .....	72

8. 3. RISULTATI E DISCUSSIONI .....	73
8.4 CONCLUSIONI.....	79
<b>9. IMPIEGO DI METIONINA RUMINO PROTETTA NELLA DIETA DI BUFALÈ</b>	
<b>IN LATTAZIONE.....</b>	<b>81</b>
9.1 INTRODUZIONE .....	81
9.2. MATERIALE E METODI .....	84
9.2.1 ANIMALI.....	84
9.2.2 DIETE .....	85
9.2.3 CAMPIONAMENTO E ANALISI.....	86
9.2.4 ELABORAZIONE STATISTICA.....	91
9.3 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	92
9.4 CONCLUSIONI.....	105
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>106</b>

## 1. IMPATTO AMBIENTALE

Negli ultimi decenni, l'impatto sull'ambiente causato dalle diverse attività dell'uomo e dall'eccessivo sfruttamento delle risorse naturali sta portando sempre di più il nostro ecosistema a cambiamenti non solo riguardanti la biodiversità ma anche l'assetto climatico e meteorologico del pianeta.

La notevole diminuzione della biodiversità a causa dell'inquinamento e della deforestazione, ha portato secondo una valutazione nel Programma delle Nazioni Unite per l'ambiente (UNEP), alla scomparsa di circa il 24% di specie fra gli insetti (in particolare fra le farfalle), gli uccelli e i mammiferi dal territorio dei paesi dell'Unione Europea.

L'IUCN (*International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources*), negli ultimi anni, ha inserito nella propria lista rossa (specie a rischio di estinzione) un sempre maggior numero di specie animali e vegetali.

Per cercare di arginare questi fenomeni in continuo aumento, le comunità internazionali hanno cercato di regolamentare le diverse attività e l'impatto che queste hanno sull'ambiente, stipulando trattati e convenzioni.

Nella prima conferenza internazionale mirata ai problemi ambientali, organizzata dalle Nazioni Unite nel 1972 a Stoccolma, l'ambiente è stato riconosciuto patrimonio comune dell'umanità. Da allora si sono moltiplicati gli accordi, le convenzioni ed i trattati internazionali per la protezione dell'ambiente, come la convenzione di Rio del 1992, in cui è stato stabilito che gli Stati membri sono responsabili della conservazione della diversità biologica nel loro territorio e dell'utilizzazione durevole delle loro risorse biologiche, o come il trattato di Kyoto del 1997, sulla riduzione dell'emissioni di gas serra nei paesi aderenti (ad eccezione degli USA e dei paesi in via di sviluppo).

Tra le diverse attività dell'uomo, l'agricoltura e la zootecnia hanno avuto fino a poco tempo fa un impatto ambientale quasi sempre negativo. L'obiettivo di massimizzare le produzioni ha infatti portato, nel settore agricolo, ad un uso indiscriminato di fertilizzanti, pesticidi e risorse idriche e in quello zootecnico, ad una tipologia di allevamento sempre più marcatamente intensivo e scarsamente attento alle ripercussioni a livello locale e globale di alte concentrazioni di animali in spazi ristretti.

La concentrazione di più allevamenti nella stessa area, l'uso scorretto degli alimenti e dei farmaci, un cattivo management associato ad una cattiva gestione dei reflui e del liquame, hanno così causato seri problemi di inquinamento verso i tre recettori ambientali:

- aria (composti dell'azoto, metano, idrogeno solforato, CO, CO<sub>2</sub> e polveri);
- acqua (composti dell'azoto e del fosforo);
- suolo (metalli pesanti, fosforo, sodio).

per cui è necessario valutare ogni punto del processo, allo scopo di limitare il più possibile l'impatto ambientale ed ottimizzare l'efficienza produttiva aziendale (Rotz, 2004).

Le sostanze inquinanti immesse nell'ambiente danno origine a diverse forme d'inquinamento: in particolare l'azoto (N) e il fosforo (P) nelle acque causano l'eutrofizzazione, mentre l'ammoniaca (NH<sub>3</sub>), il biossido di carbonio (CO<sub>2</sub>), il solfuro di idrogeno (H<sub>2</sub>S), il metano (CH<sub>4</sub>) e i composti dell'azoto (N<sub>x</sub>O) emessi in forma gassosa danno origine ad altri fenomeni, quali piogge acide, erosione del terreno, innalzamento della temperatura del globo terrestre (effetto serra) ed assottigliamento dello strato di ozono (Tamminga, 1992).

Le interazioni fra la zootecnia e l'ambiente variano in base al sistema di allevamento (intensivo, semiestensivo ed estensivo), al tipo di animali allevati (poligastrici e monogastrici), alle tecniche di allevamento e alle tecnologie impiegate.

Gli effetti diretti più importanti che la zootecnia ha sull'ambiente sono le immissioni delle escrezioni di urina, feci e le eruttazioni dei gas provenienti dalle fermentazioni ruminali e intestinali; mentre quelli indiretti sono l'impiego di risorse idriche ed energetiche connesse alla produzione degli alimenti, all'allevamento, all'industria di trasformazione e distribuzione.

Si stima che oltre il 50% del consumo energetico sotto forma di energia elettrica e di combustibili, nelle aziende bovine da latte, è connesso proprio alla produzione e alla conservazione di prodotti vegetali per l'alimentazione del bestiame (Kraatz et al., 2006).

Pimentel (2003), negli Stati Uniti Occidentali, riporta un consumo medio dell'85% di acqua dolce nel settore agricolo, principalmente impiegato per l'irrigazione con un consumo medio variabile dai 500 ai 2000 litri per kg di raccolto, incluse le colture destinate all'alimentazione animale, mentre il settore zootecnico impiega direttamente solo l'1.8% di quella usata in agricoltura.

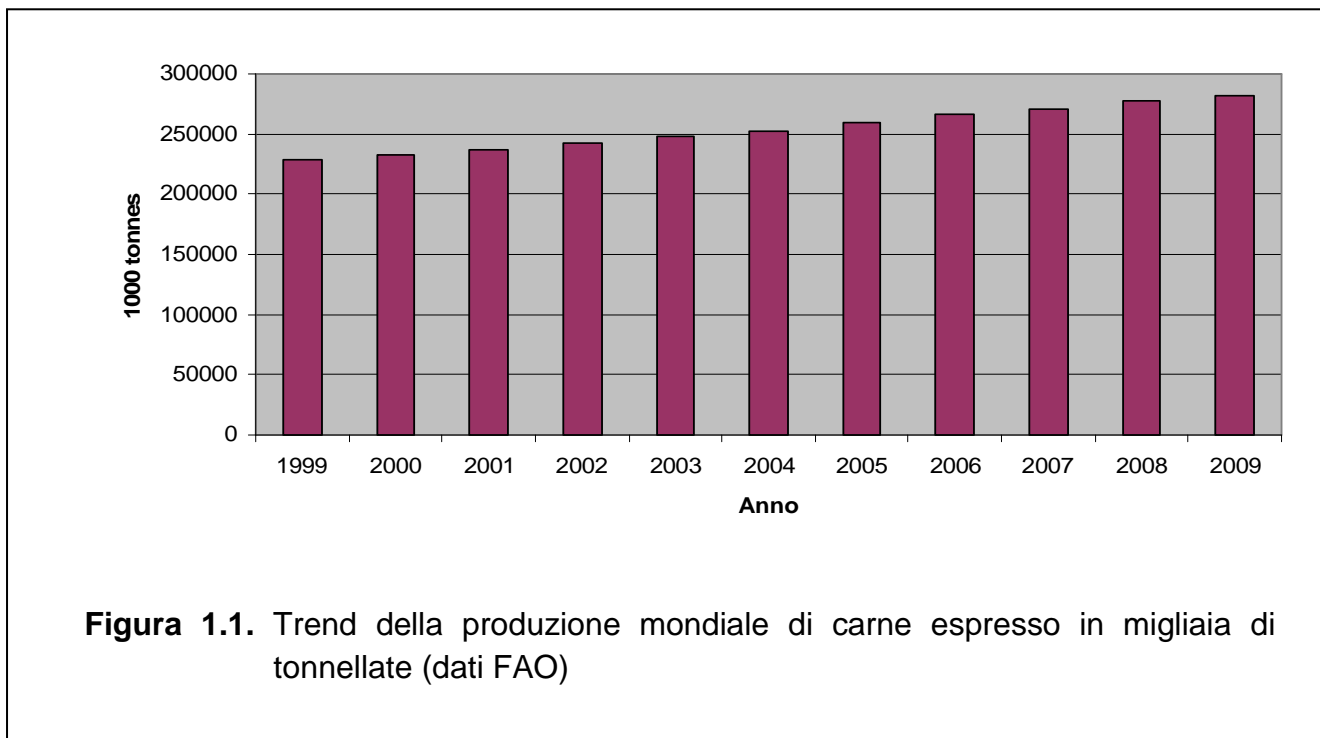
In Europa il consumo medio di acqua nel settore agricolo incide per il 24% del totale, mentre in alcune regioni dell'Europa meridionale, l'agricoltura incide per oltre l'80% sul consumo di acqua (*European Environment Agency* .EEA 2009).

Altri fenomeni connessi alle attività agro-zootecniche come l'erosione del suolo, la deforestazione e la desertificazione, sono dovuti principalmente alla continua ricerca di pascoli e terreni adibiti alle colture foraggere e alla soia.

Secondo la FAO (*Food and Agriculture Organization*) e la WB (*World Bank*) la domanda globale di prodotti animali continuerà a salire nel mondo, modificandosi velocemente sotto l'effetto della globalizzazione e delocalizzandosi dal terreno agrario (Naylor et al., 2005).

La crescente domanda di alimenti di origine animale nei paesi emergenti ha fatto sì che la produzione di carne sia quintuplicata da 27 a 147 milioni di tonnellate (Mt) tra il

1970 e il 2005. Nell'ultimo decennio dal 1999 al 2009, si è assistito ad un incremento della produzione di carne nel mondo del 18.6% pari a 52.4 Mt (fig.1.1).



Sebbene il ritmo di crescita stia ultimamente rallentando, la FAO, nel 2006, conferma che al 2030 la richiesta di carne potrebbe aumentare del 50% rispetto a quella attuale.

Questa attesa di aumento incontrollato, discende dai modelli di sviluppo consumistici registratisi nel secolo scorso nei paesi occidentali, con ripercussioni negative sui piccoli produttori sempre più marginalizzati e sull'ambiente. L'espansione delle coltivazioni intensive per la produzione di biocombustibili come la soia e la palma da olio, fenomeno esploso nel 2007, è un fattore dirompente nel quadro mondiale delle risorse agricole, che sottrae terre destinate alla produzione degli alimenti per l'uomo e dei mangimi per gli animali.

Questa espansione, inoltre, accelera notevolmente la deforestazione a causa della sempre maggiore richiesta di terre agricole. Secondo Cathy Whitlock (2004) ogni anno in

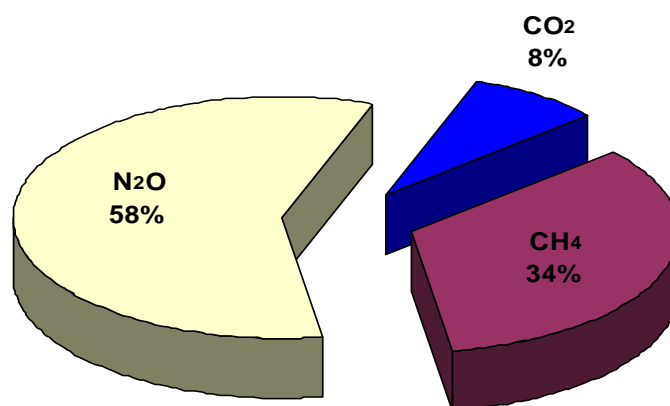
Amazzonia, le pratiche di taglio di legname e gli incendi accidentali distruggono le foreste in uguale o forse maggiore misura della deforestazione; nel 2005 la FAO ha stimato una perdita annua di 13 milioni di ettari di foreste naturali.

### 1.1. IMPATTO AMBIENTALE NEL SISTEMA ZOOTECNICO

All'allevamento del bestiame, ed alle attività ad esso connesse, è attribuita l'emissione di considerevoli quantità dei tre principali gas ad effetto serra:

- biossido di carbonio (CO<sub>2</sub>)
- metano (CH<sub>4</sub>)
- protossido di azoto (N<sub>2</sub>O).

Secondo stime della FAO (Steinfeld et al., 2006) il settore zootecnico è responsabile del 18% delle emissioni di natura antropica, corrispondenti all'80% di quelle del mondo agricolo, (in figura 1.2 sono riportate le percentuali sul totale delle emissioni di origine antropica dei principali gas serra prodotti dal settore zootecnico.)



**Figura 1.2.** Contributo del comparto zootecnico sull'emissioni di gas serra di origine antropica



Delle emissioni attribuite al settore zootecnico, contrariamente all'opinione comune, il 70% è imputato ai sistemi di allevamento di tipo estensivo ed il restante 30% a quelli di tipo intensivo.

L'agricoltura è responsabile per il 50% della produzione di metano (produzione zootecnica e risaie) e per oltre il 75 % del protossido d'azoto (principalmente dall'impiego di fertilizzanti) emessi da attività umane (FAO, 2011).

### *1.1.1. BIOSSIDO DI CARBONIO*

Solitamente nei media, i cambiamenti climatici sono associati alle emissioni di CO<sub>2</sub> che rappresentano i  $\frac{3}{4}$  delle emissioni di gas ad effetto serra. Questo fatto, ha condotto l'opinione pubblica e la ricerca a prestare un'attenzione minore agli altri gas ad effetto serra ed agli altri settori responsabili della loro produzione. Rispetto all'anidride carbonica, l'efficacia negativa del metano è superiore di 21 volte e quella del protossido di azoto di ben 300 volte.

I paesi in via di sviluppo incidono solo per il 36% sulle emissioni di CO<sub>2</sub>, ma producono più del 50% di protossido d'azoto, e circa i  $\frac{2}{3}$  del metano.

Per quanto riguarda la CO<sub>2</sub>, l'allevamento del bestiame concorre soltanto per l' 8% alle emissioni di natura antropica: trattasi di emissioni causate dalla deforestazione - soprattutto quella Amazzonica - per dare spazio a nuove superfici a pascolo o a coltivazione di soia e cereali impiegati per fare mangimi, dalla degradazione e dalla desertificazione di territori per il pascolamento eccessivo, dall'uso dei combustibili fossili per coltivazioni finalizzate all'alimentazione animale, per la mangimistica e per la trasformazione.

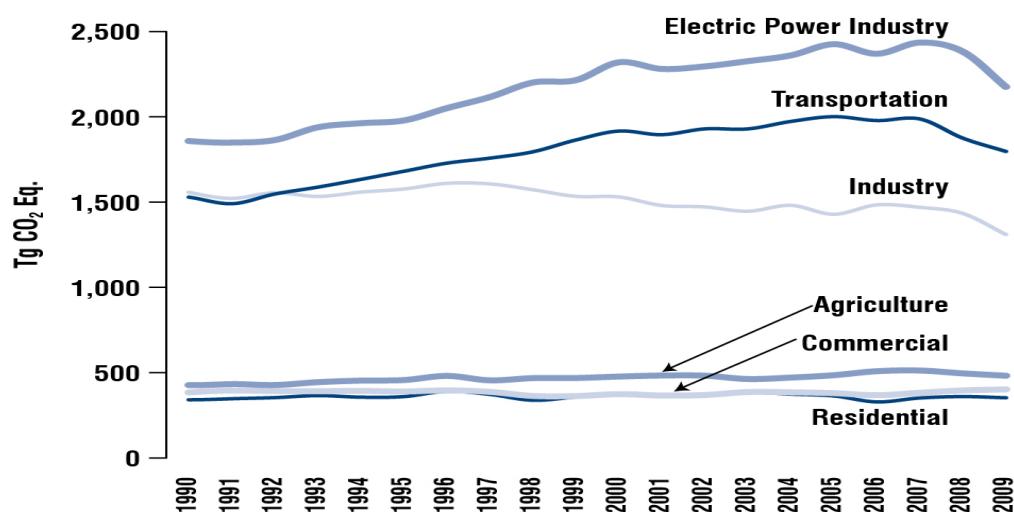
Il comparto zootecnico intensivo è quello che ha un maggiore impatto sull'emissione di CO<sub>2</sub> a causa soprattutto dell'impiego dei mangimi prodotti dall'industria mangimistica e del trasporto.

La produzione di CO<sub>2</sub> è, inoltre, correlata positivamente al consumo energetico, poiché è il principale prodotto secondario ottenuto nel processo di produzione energetica.

Quindi tanto maggiore è il consumo energetico, tanto maggiore sarà il rilascio nell'ambiente di CO<sub>2</sub>, la cui concentrazione nell'atmosfera è aumentata del 35%, dal periodo della rivoluzione industriale al 2005. I fattori più importanti responsabili dell'aumento di questo gas nell'atmosfera sono:

- la produzione di energia, soprattutto quella che utilizza i combustibili fossili, responsabile per il 64%,
- la deforestazione, responsabile per il 34%.

Dal punto di vista ambientale questo gas, classificato come gas serra, è responsabile dell'innalzamento della temperatura terrestre e nel mondo la sua produzione è stimata a 30,113 Mt, (<http://unstats.un.org>). Nel 2009 negli Stati Uniti l'83% dei gas serra prodotti dalle attività umane era rappresentato dal biossido di carbonio, il 10% dal metano, mentre il rimanente 7% era costituito principalmente da ossidi di azoto (EPA, 2009) (*Environmental Protection Agency*). Nel grafico (fig. 1.3) sono riportate le emissioni di CO<sub>2</sub> in Tg (1Tg = teragrammo = 10<sup>12</sup> grammi) nei diversi settori. L'attività industriale (energia+industria) incide per il 29%, quella del trasporto per il 27% circa, mentre l'agricoltura, come si nota, ha un effetto diretto molto basso rispetto ai primi tre.



**Figura 1.3.** Emissione di CO<sub>2</sub> negli Stati Uniti dal 1990 al 2009, (www.epa.gov).

### 1.1.2 METANO

Il metano (CH<sub>4</sub>) è un idrocarburo presente in natura allo stato gassoso, di origine sia naturale che antropica, che si forma in ambienti fortemente anaerobi (privi di ossigeno) per reazione di riduzione tra carbonio e idrogeno.

Dal punto di vista ambientale questo gas è classificato come gas serra (GHG, greenhouse gas), ovvero modifica la capacità dell'atmosfera di trattenere più o meno calore, ed è responsabile dell'innalzamento globale della temperatura terrestre.

Nella lista dell'IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*) il metano risulta essere il secondo GHG più abbondanti nell'atmosfera terrestre (tab.1.1).

**Tabella 1.1.** Concentrazione dei gas serra e il loro incremento dal 1998 al 2005. Dati IPCC pubblicati nel 2007

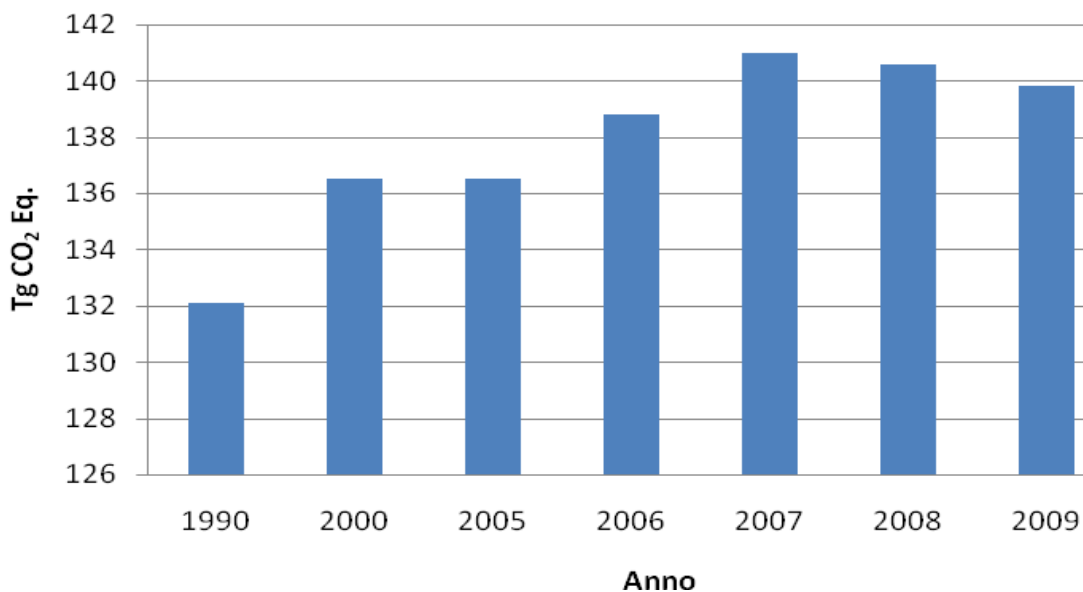
<b>Frazioni molari e le loro variazioni</b>		
<b>Composti</b>	<b>2005</b>	<b>Cambiamenti dal 1998</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>	379 ± 0.65 µmol/mol	+13 µmol/mol
<b>CH<sub>4</sub></b>	1,774 ± 1.8 nmol/mol	+11 nmol/mol
<b>N<sub>2</sub>O</b>	319 ± 0.12 nmol/mol	+5 nmol/mol
<b>CFC-11</b>	251 ± 0.36 pmol/mol	-13

Ogni sostanza è caratterizzata da un proprio potenziale di riscaldamento globale denominato GWP (Global Warming Potential). Il GWP è rappresentato dall'effetto combinato del tempo di permanenza di ogni gas nell'atmosfera e la loro capacità di assorbire le radiazioni infrarosse emessa dalla Terra.

Per convenzione si fa riferimento ad un orizzonte temporaneo di 100 anni mentre le quantità sono riportate in Tg CO<sub>2</sub> equivalenti (l'anidride carbonica pur avendo un GWP non elevato, è tuttavia molto più abbondante in atmosfera rispetto ad altri gas a maggior potenziale serra ed è per questo considerato uno dei maggiori responsabili dell'effetto serra).

Il metano ha un potenziale di riscaldamento globale 21 volte superiore (IPCC, 1996) a quello dell'anidride carbonica per un orizzonte temporaneo di 100 anni, ed è responsabile per circa il 15% sul riscaldamento globale contro un 55% causato dalla CO<sub>2</sub> (Johnson et al., 1991); inoltre è anche responsabile dell'assottigliamento dello strato di ozono (Tamminga, 1992).

La sua concentrazione nell'atmosfera è aumentata in modo esponenziale negli ultimi tre secoli. Questo incremento è ben correlato all'aumento della popolazione e conseguentemente ad attività quali l'agricoltura e la zootecnia (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Andamento dell'emissione di CH<sub>4</sub> nel settore zootecnico espresso in CO<sub>2</sub> Eq. (EPA, 2009)

Secondo (Rodhe, 1990) tra il 1980 al 1990 la concentrazione atmosferica del metano è aumentata di circa l'1% l'anno.

Le principali fonti di emissione di metano nell'atmosfera correlate all'attività umana includono:

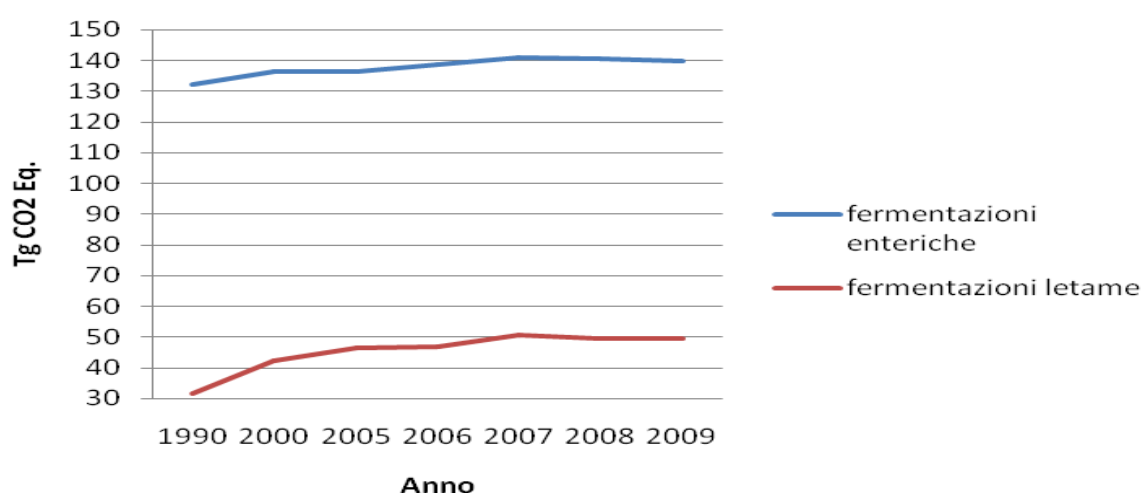
- la produzione di combustibili fossili,
- l'allevamento (fermentazione enterica e gestione del letame),
- la coltivazione del riso,
- la combustione della biomassa,
- la gestione dei rifiuti.

In tabella 1.2 sono riportate le emissioni di metano nell'ultimo decennio, di queste oltre il 50% sono di origine antropica.

**Tabella 1.2.** Fonti di emissione di CH<sub>4</sub> negli USA espressi in Tg CO<sub>2</sub> equivalenti

Fonti	1990	2000	2005	2006	2007	2008	2009
<b>Emissioni di gas naturali</b>	190	209	190	218	205	212	221
<b>Fermentazioni enteriche</b>	132	137	137	139	141	141	140
<b>Discariche</b>	147	112	113	112	111	116	118
<b>Estrazione del carbone</b>	84.1	60.4	56.9	58.2	57.9	67.1	71
<b>Gestione dei reflui zootecnici</b>	31.7	42.4	46.6	46.7	50.7	49.4	49.5
<b>Sistemi petroliferi</b>	35.4	31.5	29.4	29.4	30	30.2	30.9
<b>Trattamento delle acque reflue</b>	23.5	25.2	24.3	24.5	24.4	24.5	24.5
<b>Foreste e Terra</b>	3.2	14.3	9.8	21.6	20	11.9	7.8
<b>Risaie</b>	7.1	7.5	6.8	5.9	6.2	7.2	7.3

L'incremento dell'emissione di metano causato dalle fermentazioni enteriche è stato di +7.7 Tg CO<sub>2</sub> equivalenti dal 1990 al 2009 pari ad un aumento di circa il 5.51%, mentre per le fermentazioni del letame si è avuto un incremento di 17.8 Tg CO<sub>2</sub> equivalenti, pari al 35.96% (fig. 1.5).



**Figura 1.5.** Emissioni di metano dalle fermentazioni enteriche e dalle fermentazioni del letame espresse in Tg CO<sub>2</sub> Eq.

I livelli di emissione possono variare notevolmente da un paese o da una regione ad un'altra, in base a molti fattori quali: le caratteristiche di produzione industriale ed agricola, il clima, le fonti di energia e il loro utilizzo e le pratiche di gestione dei rifiuti.

Ad esempio, la temperatura e l'umidità hanno un effetto significativo sul processo di digestione anaerobica, che è uno dei processi biologici fondamentali di emissioni di metano. Inoltre, l'implementazione di tecnologie per catturare e utilizzare il metano da fonti come le discariche, le miniere di carbone e i sistemi di gestione del letame, influenza i livelli di emissione di questo gas.

Il comparto zootecnico contribuisce per circa il 20% alle emissioni di CH<sub>4</sub> di origine antropica, proveniente dalle fermentazioni enteriche; mentre un 7% ha origine dalla gestione dei reflui (*Environmental Protection Agency, EPA, 2009*).

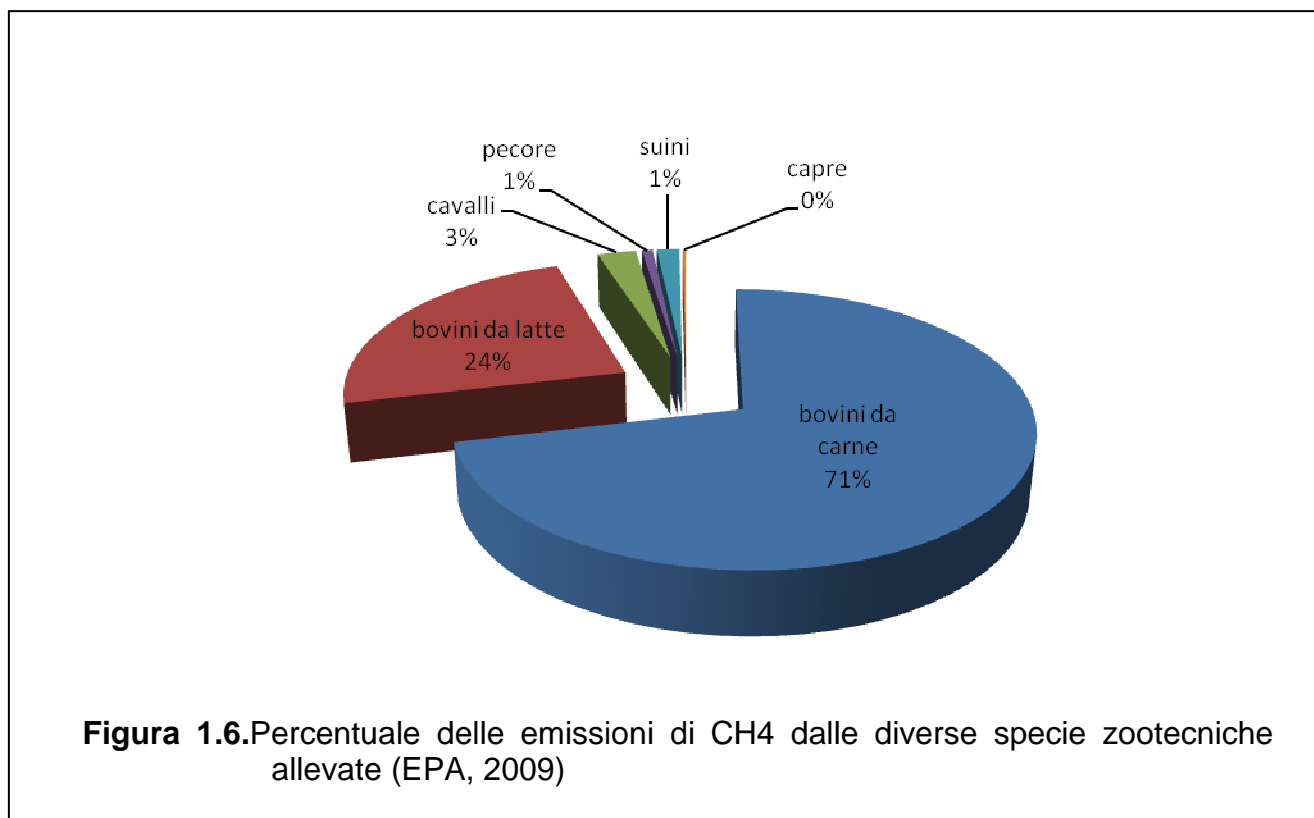
Secondo Steinfeld et al. (2006), la zootecnia contribuisce alla produzione del 35-40% circa del metano di origine antropica e l'80% di queste emissioni sarebbe legata a sistemi di allevamento di tipo estensivo.

Le emissioni di CH<sub>4</sub> che si originano dalle fermentazioni delle deiezioni animali deriverebbero per il 43% circa da reflui bovini, per il 48% da reflui suini e per il 9% circa da avicoli, bufali e piccoli ruminanti (Steinfeld et al., 2006).

Massè et al. (2003) hanno rilevato una produzione di CH<sub>4</sub> per litro di liquame bovino ad una temperatura di 15°C, variabile da 0.33 a 3.77 litri, evidenziando una correlazione negativa tra la quantità di sostanza secca contenuta nelle deiezioni e la produzione di metano, in quanto quest'ultima dipende anche da altri fattori, quali la razione somministrata, le temperature ambientali, l'umidità e il tempo di stoccaggio.

Secondo Tamminga (1992) fra i ruminanti, i bovini da latte e da carne, sono i maggiori produttori di metano e si stima che contribuiscano per circa il 74% delle emissioni nel settore zootecnico; il rimanente 26% è dovuto: agli ovini (9%), ai bufali (6%), ai

ruminanti selvatici e alle altre specie (3-8%). Secondo l'EPA (2009) i bovini emettono il 95% del metano dallo comparto zootecnico (il 71% è emesso dai bovini da carne e il 24% da quelli da latte) mentre il restante proviene da altri animali (Figura 1.6).



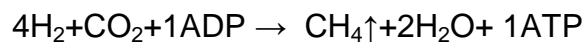
I ruminanti sono i maggiori produttori di CH<sub>4</sub> poiché questo gas viene prodotto sia nel rumine che nel tratto intestinale (unica sede di produzione nei monogastrici).

La metanogenesi ruminale è un processo biochimico complesso che avviene ad opera di particolari microorganismi. Si tratta di un processo che da un lato concorre a mantenere le condizioni ossidative in un ambiente anaerobio (fortemente riducente come quello ruminale), attraverso la riossidazione dei cofattori trasportatori di elettroni, come il NADH, il FADH<sub>2</sub> e la ferrodossina, ma dall'altro rappresenta una perdita di energia per il ruminante.



La produzione di metano nel rumine rappresenta il risultato finale di tre stadi di fermentazione di cui sono responsabili differenti gruppi di microrganismi:

- nella prima fase si ha la degradazione dei polisaccaridi (cellulosa, emicellulosa, pectina, amido ed altri carboidrati) a mono ed oligosaccaridi, successivamente metabolizzati in acidi grassi volatili (AGV), H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ed alcoli;
- nella seconda fase avviene la produzione di H<sub>2</sub> ad opera di batteri acetogenici, responsabili della produzione di acido acetico a partire dai substrati derivati dalla degradazione dei carboidrati, protozoi e miceti dotati di idrogenosomi (organelli cellulari che consentono di eliminare parte dei protoni derivati dalla dissociazione dei composti acidi);
- nell'ultima fase i batteri metanogeni utilizzano i prodotti dei primi due stadi, soprattutto H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> per la produzione di CH<sub>4</sub>, secondo la seguente equazione:



I batteri metanogeni hanno esigenze nutrizionali particolari (es: acidi volatili ramificati, ecc.) per cui la loro crescita avviene solo in simbiosi con altri batteri.

Si stima che fino al 10-14% dell'energia lorda degli alimenti consumati viene dispersa nell'ambiente in forma di metano allontanato dall'organismo con eruttazione e flatulenze; in quanto non è utilizzabile per il metabolismo dell'animale.

Inoltre, la metanogenesi e la produzione di AGV sono antagoniste, la prima viene depressa con diete a base di concentrati nelle quali è favorito lo sviluppo batterico a scapito di quello protozoario con una maggiore produzione di propionato.

Van Nevel e Demeyer (1996), hanno stimato una perdita di energia grezza della razione che va dal 2 al 15%, riducendo quindi il processo di metanogenesi si avrebbero dei benefici in termini di resa energetica e di impatto ambientale (Moss et al., 2000).

Johnson e Ward, (1996) riportano un consumo medio del 5 – 6.5% dell'energia grezza degli alimenti per la produzione di metano, confrontano inoltre le emissioni stimate da altri autori, espresse in kg/capo/anno con l'impiego in % dell'energia lorda dell'alimento per la sua produzione (tab. 1.3).

**Tabella 1.3.** Emissioni di CH<sub>4</sub> stimate e l'energia grezza impiegata per la sua produzione

Classe	Paese	Crutzen et al. (1986)		Gibbs e Johnson (1994)	
		%	kg/capo/anno	%	kg/capo/anno
<b>Vacche da latte</b>	USA	5.5	84	6	118
<b>Vacche da latte</b>	Europa	5.5	95	6	100
<b>Vacche da latte</b>	India	9	35	6	46
<b>Bovini</b>	USA	7.5	54	6	69
<b>Feedlot</b>	USA	6.5	65	3.5	14
<b>Bufalo</b>	India	9	50	7.5	53
<b>Cammello</b>	Mondo	9	58	7	46

Còndor et al. (2008), in un recente lavoro riportano una stima della quantità di metano emesso nella bufala mediterranea in lattazione pari a 73 kg/capo/anno e a 56 kg/capo/anno, per le altre categorie di bufalo.

La produzione di metano è una tappa obbligata per il corretto equilibrio della fisiologia del rumine ed è dipendente da vari fattori, correlati soprattutto all'alimentazione e alla sua digeribilità, al contenuto di fibra (NDF), al peso dell'animale, al livello di ingestione (Wilkerson et al., 1994) e al grado di saturazione dei lipidi presenti nella razione (McAllister et al., 1996). A livello ruminale i fattori che modulano la metanogenesi sono principalmente il pH e il rapporto acetato:propionato (Veerassamy et al., 2011).

Infine, anche i fattori genetici giocano un ruolo nella produzione di metano (Nkrumah et al., 2006).

Le strategie messe in atto per ridurre le emissioni di CH<sub>4</sub> nei ruminanti si basano principalmente sull'alimentazione, variando il rapporto fibra/concentrati a favore di quest'ultimi, e/o impiegando sostanze che inibiscono il processo di metanogenesi e/o che agiscono sulla flora ruminale, alterando il rapporto protozoi/batteri, (eliminando i protozoi si limita la produzione di H<sub>2</sub>, inoltre i metanogeni trovano supporto sul corpo dei protozoi ed utilizzano l'idrogeno liberato da questi; la defaunazione riduce le emissioni di metano fino al 30-45%).

Tra queste sostanze sono state individuate alcune essenze vegetali e sono stati studiati gli effetti di alcuni olii essenziali estratti dall'aglio (Busquet et al., 2005) o dalla menta piperita (Agarwal et al., 2009).

Tra le molecole di sintesi invece troviamo diverse sostanze in grado di modulare la metanogenesi, tra queste il Monensin sodico (antibiotico ionoforo) che, impiegato come additivo alimentare nella razione e utilizzato per incrementare le performance dell'animale (effetto auxinico), agisce sulla produzione di gas, riducendo la quantità di CH<sub>4</sub> dal 4 al 31%.

Fra la ricerche agro-zootecniche impegnate a migliorare l'efficienza delle trasformazioni dei carboidrati, ricordiamo quelle mirate alla manipolazione della microflora e della microfauna ruminale:

- la riduzione dei protozoi (imputati della produzione del 20% del metano),
- la riduzione della microflora acetica e delle conseguenti emissioni di metano,
- le vaccinazioni nei confronti dei metano batteri,

Tali tecniche sono applicabili anche agli animali allevati al pascolo, ma potrebbero incontrare lo sfavore dei consumatori, ostili a tali radicali interventi.

Un altro aspetto riguarda la riduzione delle emissioni di metano da fermentazione delle deiezioni che può essere realizzata migliorandone la gestione e mediante la produzione di biogas. Esistono già oggi tecniche idonee utilizzate prevalentemente nelle aziende di tipo industriale, che hanno la capacità e i mezzi per investire in nuove tecnologie orientate al miglioramento della gestione delle deiezioni.

## 2. L'AZOTO NEL SISTEMA AGRICOLO

L'azoto è un elemento chimico che si riscontra in natura come gas biatomico ( $N_2$ ) nell'aria di cui costituisce in media il 78,09% in volume e rappresenta, quindi, la componente più significativa della nostra atmosfera che è composta, inoltre, dal 20,95% di ossigeno, dallo 0,95% di argon, dallo 0,04 di anidride carbonica e da altri gas.

L'azoto è il costituente di numerose molecole organiche (DNA, proteine, vitamine) alla base della vita. I processi con i quali gli esseri viventi lo utilizzano e lo riciclano costituiscono il ciclo dell'azoto che può essere alterato da diversi fattori antropici.

L'agricoltura è un importante fattore di alterazione del ciclo naturale dell'azoto a causa delle importanti perdite che si registrano all'interno del comparto colturale e zootecnico.

Le più importanti perdite di azoto dal sistema agricolo sono costituite da:

- emissione di ossidi di azoto verso il comparto atmosferico,
- lisciviazione dei nitrati verso il comparto acqua,
- volatilizzazione dell'ammoniaca verso il comparto atmosferico.

### 2.1 L'AZOTO E IL SISTEMA COLTURALE: I FERTILIZZANTI

L'agricoltura è responsabile per circa il 75% dell'emissione globale di ammoniaca nell'atmosfera, metà della quale (circa il 37,5%) proviene dal letame e il 16% è direttamente associato alla produzione ed all'uso dei fertilizzanti (*International Plant Protection Convention*, IPPC 2004).

Con l'avvio del metodo Haber-Bosch, processo industriale sviluppato nel 1910 che permette la sintesi industriale dell' $NH_3$  su larga scala utilizzando l' $N_2$  atmosferico, un numero crescente di industrie ha iniziato a produrre ingenti quantità di ammoniaca da

trasformare in fertilizzanti; oltre il 60% dell'azoto prodotto industrialmente viene oggi utilizzato per tale scopo (*European Fertilizer Manufacturers Association, EFMA, 2011*).

Lo scopo dei fertilizzanti è quello di apportare al terreno i principi nutritivi di cui le piante hanno bisogno, per mantenere così rese e produzioni elevate. Generalmente le concimazioni riguardano l'apporto di macroelementi quali l'azoto, il fosforo e il potassio (N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O).

Nelle culture intensive, a causa dell'elevato asporto dei vari elementi, l'integrazione è sempre necessaria poiché vengono alterati i cicli biogeochimici. Nell'ambito delle principali specie coltivate sono state selezionate varietà molto produttive che sfruttano in modo notevole l'apporto artificiale di tali elementi.

William (2009) riporta una produzione industriale globale annua di circa 150 megatonnellate (Mt) di azoto, (di cui 125 provenienti dall'industria dei fertilizzanti e 25 provenienti dalla combustione di carburante fossile), di questi circa:

- 9 Mt sono accumulate nella biosfera terrestre con tempi di permanenza che vanno dai 10 a diverse centinaia di anni,
- 35 Mt finiscono nei fiumi,
- 15 Mt finiscono nelle falde acquifere,
- 17 Mt sono immesse nell'atmosfera a causa soprattutto della nitrificazione che avviene nel terreno e nelle paludi.

Si è stimato infine che circa 48 Mt di N-reattivo (l'azoto reattivo include un'ampia famiglia di molecole soprattutto radicali acidi (-NO<sub>x</sub><sup>-</sup>), ossidi di azoto (N<sub>x</sub>O) e ammoniaca (NH<sub>3</sub>)) vengono trasportate dall'atmosfera dalla terra al mare, per un totale delle perdite che ammonta a circa 124 Mt N/anno, pari al 83% della produzione; l'EFMA (2011) afferma che l'85-95% circa dell'azoto reattivo che si perde lungo la catena alimentare viene rilasciato nell'ambiente.

Rockstrom et al. (2009) hanno stimato che l'attività umana, principalmente l'industria dei fertilizzanti e le colture delle leguminose (in grado di fissare l'azoto atmosferico), sia in grado di convertire in azoto reattivo circa 120 Mt di azoto atmosferico l'anno, un valore che vale circa il doppio dell'azoto prodotto da tutti gli altri processi naturali. Gran parte di questo N-reattivo finisce nell'ambiente inquinando i corsi d'acqua, le zone costiere, il terreno e l'aria.

Da stime effettuate nell'Europa dell'Est, l'agricoltura risulta essere responsabile per il 90% dell'emissioni di ammoniaca di origine antropica (Kirchmann et al., 1998; Bussink & Oenema 1998).

Nel 2009 si sono prodotti nel mondo circa 163.7 Mt di fertilizzanti (N+P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>+K<sub>2</sub>O) (dati IFA), l'azoto è quello maggiormente prodotto perché rappresenta quasi sempre l'elemento limitante della produzione a causa della grande solubilità dei nitrati che li rende facilmente soggetti alla lisciviazione e al dilavamento e quindi meno disponibili nel terreno.

La capacità di ritenzione del terreno dipende soprattutto dalla natura del terreno, dalle caratteristiche chimico-fisiche, dalla quantità di sostanza organica e dal rapporto C/N. I processi di impoverimento del terreno che portano a una diminuzione del contenuto di azoto sono causati principalmente da:

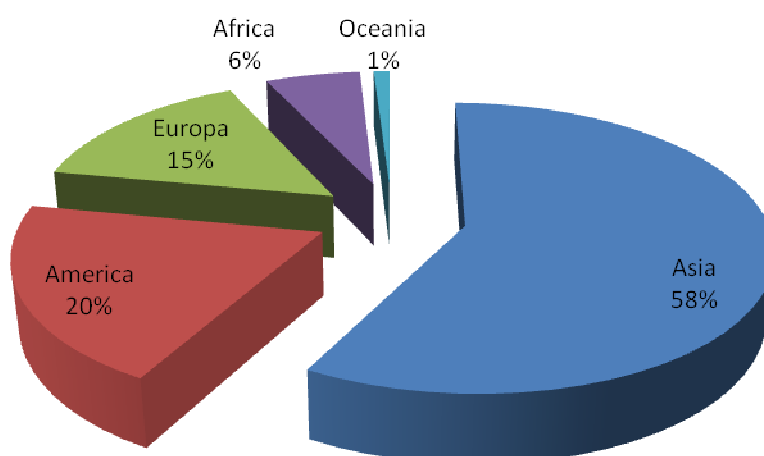
- la produzione utile;
- la denitrificazione;
- la volatilizzazione;
- la lisciviazione.

Secondo la FAO (2010), il consumo globale stimato di fertilizzanti (N+P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>+K<sub>2</sub>O) nel 2009 è stato di 161.7 Mt, mentre per il 2010 la stima è stata di circa 169.7 milioni di tonnellate, con una crescita del +2.6% negli anni successivi fino a raggiungere un consumo stimato di 187.9 milioni di tonnellate entro la fine del 2014 (tabella 2.1 ).

**Tabella 2.1.** Domanda dei fertilizzanti nel mondo espressa in migliaia di tonnellate

ANNO	2010	2011	2012	2013	2014
<b>Azoto (N)</b>	103,877	106,054	107,901	109,835	111,638
<b>Fosforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)</b>	39,148	40,445	41,594	42,791	43,876
<b>Potassio (K<sub>2</sub>O)</b>	26,655	28,542	29,882	31,218	32,413
<b>Totale (N+P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>+K<sub>2</sub>O)</b>	169,680	175,041	179,377	183,844	187,927

La stima della domanda mondiale di azoto dal 2010 al 2014, prevede un incremento del +6.95%, pari a 7,2 milioni di tonnellate di azoto ripartite nei continenti così come mostrato nella figura 2.1.

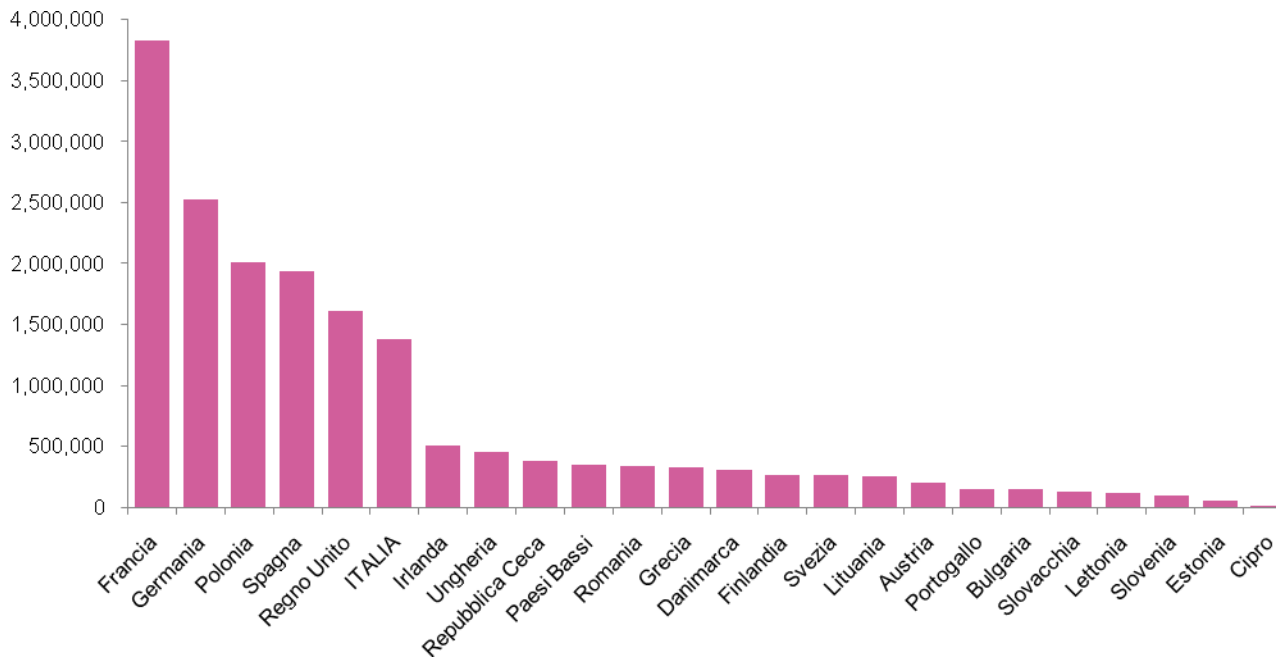


**Figura 2.1.** Ripartizione geografica della domanda mondiale di azoto

In Italia i principali concimi azotati impiegati in agricoltura sono l'urea, il nitrato ammonico, ed il solfato ammonico successivamente trasformati nel terreno ed assorbiti dalle piante soprattutto sotto forma di nitrato.



Nel 2009 in Italia, sono stati distribuiti circa un quintale di fertilizzanti semplici (N+P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>+K<sub>2</sub>O) per ettaro di superficie agricola utilizzata (SAU), pari ad un consumo totale inferiore ai 1.500 Kt l'anno (dati ISTAT 2009) (figura 2.2.).



**Figura 2.2.** Livello europeo sui consumi di fertilizzanti relativi ai paesi UE 27 (Fonte: Eurostat, Environment statistics)

### **3. L' AZOTO NEL COMPARTO ZOOTECNICO**

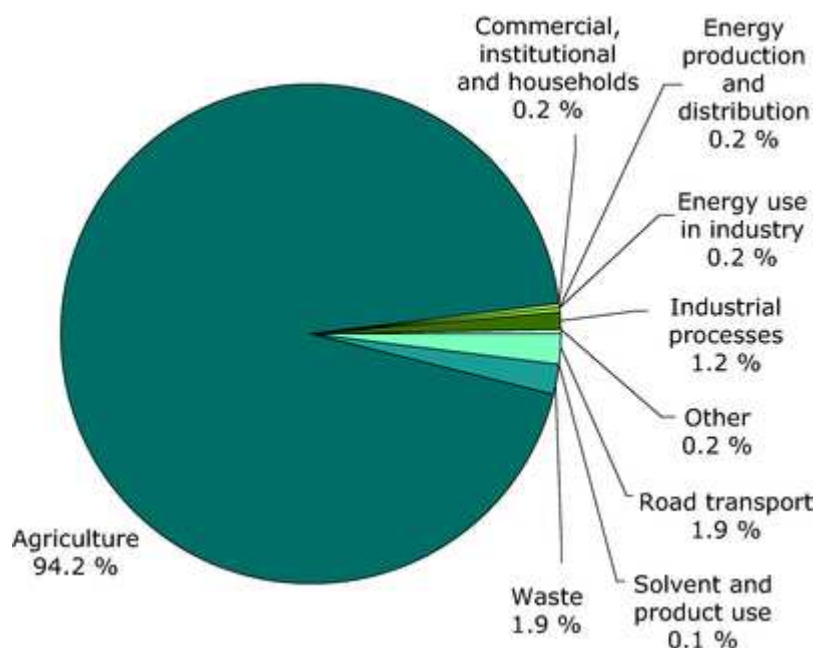
#### **3.1 EMISSIONE DI AZOTO**

L'*International Fertilizer Industry Association* (IFA, 2007). ha stimato che, su un totale dell'86% dell'emissione di ossidi di azoto di origine antropica, l'agricoltura contribuisce per il 38%; di questo il 44% è correlato alla gestione e all'utilizzo del letame, mentre il 14% è direttamente associato all'uso dei fertilizzanti.

Secondo Steinfeld et al. (2006) l'allevamento del bestiame è ritenuto responsabile della emissione del 65% degli ossidi di azoto ( $\text{NO}_x$ ) di natura antropica e del 75-80% di quelli agricoli, costituiti da gas liberati dal terreno a seguito della coltivazione di foraggi, cereali e semi oleaginosi destinati al bestiame e da gas derivanti dalle fermentazione delle deiezioni animali.

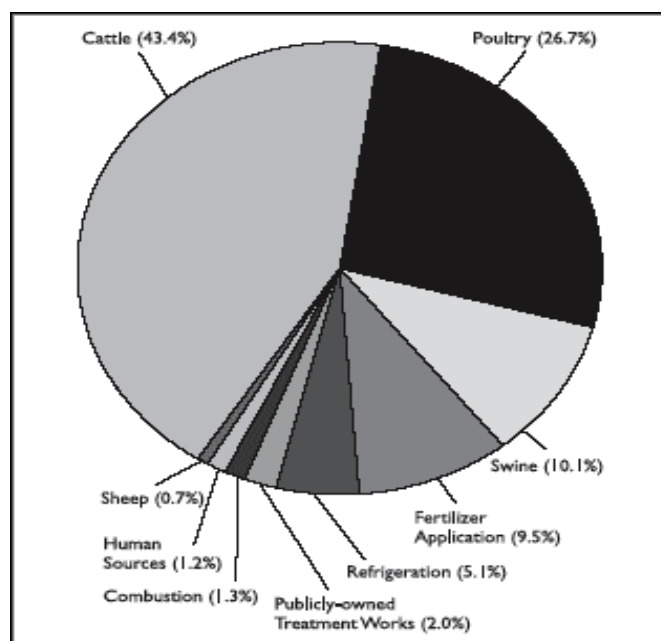
Secondo Van Aardenne et al. (2001) le emissioni di ammoniaca ( $\text{NH}_3$ ) e di protossido di azoto ( $\text{N}_2\text{O}$ ) di origine antropica, provenienti dal comparto zootecnico, si aggirano rispettivamente sul 70 e 30%.

L'Autorità Ambientale Europea (EEA, 2008b) non riporta specifiche tabelle di emissioni di  $\text{N}_2\text{O}$  bensì quelle di  $\text{NO}_x$ , dalle quali si evince che l'agricoltura, compresi allevamenti e pesca, incide solamente per il 7.3%, mentre per le emissioni di  $\text{NH}_3$  (figura 3.1) l'agricoltura incide per il 94.2% (di cui il 69% circa proviene dal letame, mentre il 22% proviene direttamente dal suolo).



**Figura 3.1.** Emissioni di NH<sub>3</sub> nella EU-27, per categorie, (2008 EEA).

Negli Stati Uniti il comparto zootecnico è responsabile per il 50-85% delle emissioni totali di ammoniaca di origine antropica (Battye et al., 1994); nella figura 3.2 lo stesso autore riporta le emissioni per le diverse specie allevate.



**Figura 3.2.** Emissione di ammoniaca di origine antropica nel 1994 negli USA. (Battye 1994)

Le emissioni di ammoniaca si verificano in diverse fasi della produzione zootecnica, variando in modo significativo tra le aziende agricole a causa delle differenze nei metodi di raccolta, stoccaggio e trattamento del letame. In generale, le maggiori perdite di ammoniaca sono associate con lo spargimento del letame sul suolo agricolo; tali perdite possono variare dal 35% al 45%.

Altre perdite (emissioni) possono provenire anche dai pascoli (dal 10% al 25%) se concimati con letame, e dallo stoccaggio del letame (5% - 15%) (Meisinger e Jokela, 2000).

Questi dati, ci mostrano che ci sono molteplici opportunità per ridurre le emissioni di ammoniaca, agendo direttamente su diverse fasi componenti il settore agro-zootecnico.

Attualmente le emissioni di ammoniaca dal settore agro-zootecnico non sono direttamente regolamentate; tuttavia nel 1997, l'EPA ha emesso standard nazionali di qualità dell'aria (*National Ambient Air Quality Standards*, NAAQS) per la riduzione del particolato atmosferico, costituito da particelle in sospensione nell'atmosfera che vengono classificate in base al loro diametro.

Le PM2.5 (ossia particelle con diametro uguale o inferiore a 2,5  $\mu\text{m}$ ) sono derivati dell'ammoniaca (Huang et al., 2011) e i regolamenti volti a contenere le concentrazioni e le emissioni di PM2.5 richiederanno probabilmente una riduzione delle emissioni di ammoniaca dal settore zootecnico.

Questa classificazione del particolato in base al diametro è di notevole interesse perché le ridotte dimensioni delle particelle permette loro di penetrare in profondità nei polmoni. Recenti studi indicano che diversi problemi cardiovascolari e respiratori, come l'enfisema e l'asma, sono associati all'esposizione alle PM2.5.

L'agenzia per la protezione ambientale americana nel 2008 ha stimato una emissione globale di monossido di azoto ( $\text{N}_2\text{O}$ ) di origine antropica pari a 318.2 Tg  $\text{CO}_2$

Eq., ( $1\text{Tg} = 10^3 \text{ Gg} = 10^6 \text{ t} = 10^{12} \text{ g}$ .) di cui il 67.8%, pari 215.9 Tg CO<sub>2</sub> Eq., provengono dal settore agricolo (tabella 3.1) e riguardano prevalentemente l'applicazione dei fertilizzanti e le pratiche colturali, mentre la gestione del letame incide per il 5.4% sulle emissioni totali e per il 7.9% su quella agricola.

**Tabella 3.1.** Emissioni di CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O espresse in Tg CO<sub>2</sub> Eq.

Table 6-1: Emissions from Agriculture (Tg CO <sub>2</sub> Eq.)								
Gas/Source	1990	1995	2000	2005	2006	2007	2008	
<b>CH<sub>4</sub></b>	<b>169.6</b>	<b>185.9</b>	<b>183.7</b>	<b>186.7</b>	<b>188.1</b>	<b>194.2</b>	<b>194.0</b>	
Enteric Fermentation	132.4	143.7	136.8	136.7	139.0	141.2	140.8	
Manure Management	29.3	33.9	38.6	42.2	42.3	45.9	45.0	
Rice Cultivation	7.1	7.6	7.5	6.8	5.9	6.2	7.2	
Field Burning of Agricultural Residues	0.8	0.7	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	
<b>N<sub>2</sub>O</b>	<b>218.3</b>	<b>221.8</b>	<b>227.2</b>	<b>233.0</b>	<b>229.1</b>	<b>228.8</b>	<b>233.5</b>	
Agricultural Soil Management	203.5	205.9	210.1	215.8	211.2	211.0	215.9	
Manure Management	14.4	15.5	16.7	16.6	17.3	17.3	17.1	
Field Burning of Agricultural Residues	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
<b>Total</b>	<b>387.8</b>	<b>407.7</b>	<b>410.9</b>	<b>419.7</b>	<b>417.2</b>	<b>423.0</b>	<b>427.5</b>	

Note: Totals may not sum due to independent rounding.

Analisi più settoriali riportano le emissioni di CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O espresse in Gg (10<sup>9</sup>g) dal letame delle diverse specie zootecniche allevate negli USA (tabella 3.2 ).

**Tabella 3.2.** Emissioni di CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O in espresse in Gg (10<sup>9</sup>g) dal letame.

Table 6-7: CH <sub>4</sub> and N <sub>2</sub> O Emissions from Manure Management (Gg)							
Gas/Animal Type	1990	1995	2000	2005	2006	2007	2008
<b>CH<sub>4</sub><sup>1</sup></b>	<b>1,395</b>	<b>1,612</b>	<b>1,837</b>	<b>2,011</b>	<b>2,015</b>	<b>2,183</b>	<b>2,144</b>
Dairy Cattle	485	561	727	822	835	929	925
Beef Cattle	126	133	125	120	125	122	117
Swine	624	764	832	899	882	957	932
Sheep	7	5	4	4	4	4	4
Goats	1	1	1	1	1	1	1
Poultry	131	128	126	127	128	131	125
Horses	22	21	22	39	41	41	39
<b>N<sub>2</sub>O<sup>2</sup></b>	<b>47</b>	<b>50</b>	<b>54</b>	<b>54</b>	<b>56</b>	<b>56</b>	<b>55</b>
Dairy Cattle	16	17	17	17	18	18	18
Beef Cattle	20	22	25	23	25	24	24
Swine	4	5	5	5	5	5	5
Sheep	+	1	1	1	1	1	1
Goats	+	+	+	+	+	+	+
Poultry	5	5	5	6	6	6	6
Horses	1	1	1	1	1	1	1

+ Less than 0.5 Gg.  
 Note: Totals may not sum due to independent rounding.  
<sup>1</sup>Includes CH<sub>4</sub> emission reductions due to anaerobic digestion.  
<sup>2</sup>Includes both direct and indirect N<sub>2</sub>O emissions.

Rotz (2004) riporta la quantità di azoto escreto annualmente, espressa in % del peso corporeo (*Body Weight*, BW), dagli animali in base al loro stato fisiologico. (tabella 3.3).

**Tabella 3.3.** Valori tipici di N escreto annualmente espresso in % del peso corporeo da diversi tipi di animali (Koelsch and Shapiro 1998).

<b>Animal type</b>	<b>Annual N excretion, % BW</b>
<b>Swine</b>	
Nursery	22
Growing	15
Finish	15
Sows and litter	17
Gestating sows	7
Gilts	9
Boars	6
<b>Poultry</b>	
Layer	30
Pullet	23
Broiler	40
<b>Beef</b>	
Stocker	11
Feeder	11
Cow	12
<b>Dairy</b>	
Cow (20 kg/d) <sup>b</sup>	18
Cow (33 kg/d)	22
Cow (45 kg/d)	27
Dry cow	11
Heifer/calves	11
<sup>b</sup> Average daily milk production.	

### 3.2 ESCREZIONE DI AZOTO

L'escrezione di azoto dagli allevamenti zootecnici dipende principalmente dalla dieta: si stima che solo il 20% dell'azoto contenuto negli alimenti viene ritenuto, mentre il restante 80% è escreto nell'ambiente soprattutto tramite escrezione urinaria (Bierman et al., 1996).

Tamminga, (1992) riporta che l'escrezione totale di azoto deriva per il 30-35% dalle feci e per il 65-70% dalle urine. Secondo Power et al. (1994) il 75% circa dell'azoto escreto finisce nell'atmosfera.

Le vacche, in media, emettono con il latte dal 25 al 35% dell'azoto da loro consumato, mentre il rimanente viene escreto con le urine e con le feci (Chandler, 1996).

Kohn et al. (2005) riportano una ritenzione media di azoto nel comparto zootecnico del 5 – 30%, mentre la restante parte è dispersa nell'ambiente.

L'azoto immesso nell'ambiente tramite le escrezioni fecali ed urinarie, può variare sia per la quantità che per la natura chimica delle molecole azotate.

### 3.2.1 ESCREZIONI FECALI

L'azoto totale fecale nei ruminanti è in genere un valore che si aggira attorno ai 75 g di N/kg di sostanza secca ingerita (Bussinink e Oenema, 1998). L'azoto fecale è costituito dalla somma di tre componenti:

- **azoto metabolico fecale** o *azoto endogeno*, rappresenta un valore pressoché costante escreto fisiologicamente, che proviene dall'organismo come i residui delle secrezioni dei succhi digestivi (dalla saliva ai succhi gastrico, biliare, pancreatico, ed enterico), dalle cellule di sfaldamento epiteliale e dai residui delle cellule microbiche presenti nell'intestino. Van Soest (1994) riporta valori di N-endogeno pari al 10-15% dell'azoto totale escreto con le feci, mentre Castillo (1999) riporta una escrezione di azoto endogeno compresa tra il 5 e il 20%. La quantità escreta è approssimativamente proporzionale alla dose di sostanza secca ingerita (SSI) dall'animale; nei suini l'N-metabolico fecale equivale a circa 6 g di proteina/kg di sostanza secca ingerita, mentre nei ruminanti la quota di N-metabolico fecale è



molto più alta (30g di proteina/kg di sostanza secca ingerita) poiché bisogna considerare i residui azotati derivanti dai batteri ruminanti;

- **azoto dei residui indigeriti dei nutrienti alimentari**, questa quota costituisce in media il 20-25% dell'N fecale ed è composta dalle frazioni azotate che resistono alla digestione peptica operata sia dalla flora ruminale che dal ruminante stesso, come proteine legate alla lignina o prodotti dalla reazione di Maillard. Negli alimenti il contenuto proteico e la sua digeribilità sono influenzati da diversi fattori quali: (a) **stadio vegetativo** della pianta al momento dello sfalcio (un foraggio che presenta un stadio vegetativo precoce ha un maggiore contenuto di proteina degradabile e un minor contenuto di proteina bypass, presenta inoltre un contenuto elevato di azoto non proteico (NPN) costituito principalmente da  $\text{NH}_3$ , nitrati, amine e aminoacidi, mentre nei foraggi a stadio vegetativo avanzato il tenore proteico e soprattutto la sua digeribilità e degradabilità diminuiscono notevolmente a causa delle "incrostazioni" di lignina intorno le pareti cellulari); (b) **specie foraggera** (le leguminose presentano un contenuto proteico ed una degradabilità più elevata rispetto alle graminacee); (c) **concimazione** (un eccesso di  $\text{NH}_3$  e nitrati nel terreno aumenta la quota di NPN a discapito delle proteine; nella pianta fresca, la concentrazione di nitrati può variare da 1800 a 3200 mg/g di SS dal primo al secondo taglio di erba medica (Cash et al., 2007)); (d) **insilamento** (aumenta la quota degradabile delle proteine);
- **azoto dei residui del metabolismo microbico**, in media è il 60-70% dell'N fecale, ed è rappresentato soprattutto dall'N presente nella parete cellulare dei microrganismi e da metaboliti.

### 3.2.2 ESCREZIONE DI AZOTO URINARIO

Secondo Bussinink e Oenema, (1998) l'azoto urinario varia da 1 a 20 g di N/l; nei bovini circa il 60 - 80% dell'azoto totale viene escreto dalle urine (Bierman et al., 1996; Van Horn et al., 1996), mentre Kohn et al. (2005) riportano una escrezione urinaria media del 56%. Le principali molecole azotate escrete con le urine sono rappresentate da:

- **Urea**, metabolita del catabolismo proteico prodotto a livello epatico dalla carbosilazione di due molecole di ammoniaca. L'urea rappresenta il 50-90% dell'azoto totale escreto, mentre Broderick et al. (2008) riportano un valore di N-ureico/N-tot nelle urine in vacche in lattazione che va dal 73 all'86%.
- **Derivati delle purine**, (allantoina, acido urico, xantina e ipoxantina), sono molecole azotate di natura eterociclica prodotte dal catabolismo delle purine. Nelle urine dei bovini l'allantoina e l'acido urico sono i più rappresentativi, poiché l'alta attività della xantina ossidasi presente nel sangue e nei tessuti converte la xantina e l'ipoxantina in acido urico (Chen et al., 1992). La loro escrezione è correlata positivamente alla proteosintesi ruminale (Chen et al., 1990). Nella specie bufalina l'escrezione dei derivati purinici generalmente è inferiore del 50% rispetto alle altre specie. Secondo diversi Autori (Makkar, 2004; Yu et al., 2001, Thanh e Ørskov, 2005) ciò potrebbe essere dovuto ad una più bassa filtrazione glomerulare nel bufalo rispetto al bovino oppure ad una maggiore permeabilità dal sangue al ruminale nel bufalo. Cutrignelli et al. (2007) hanno trovato in bufale in asciutta valori di allantoina e acido urico, più bassi dell'11%. rispetto al bovino.
- **Creatinina**, metabolita della creatina, viene prodotta a livello muscolare in maniera costante ed è altamente correlata alla massa muscolare e al peso corporeo (BW); (Hobson 1939, Lofgreen e Garret, 1954). Chizzotti et al. (2008), riportano una escrezione giornaliera di creatinina in vacche da latte pari a 0.213 e 0.212 mmol/kg

di BW, pari a 24.10 mg/kg di BW, mentre Valadares et al. (1999) riportano una escrezione media giornaliera di creatinina pari a 29 mg/kg di BW in bovine in lattazione.

- **Azoto nitrico e nitroso.**
- **Piccoli peptidi e singoli amminoacidi.**

La quantità totale di azoto escreto (azoto urinario + azoto fecale) è dipendente della quantità di urine e feci prodotte, e dalla concentrazione di N.

Per calcolare l'escrezione media dagli allevamenti intensivi, bisogna prendere in considerazione numerosi fattori:

- specie allevata,
- stadio fisiologico,
- peso corporeo,
- ingestione di sostanza secca,
- concentrazione proteica della razione,
- NDF nella razione e livello produttivo.

Con l'impiego di questi parametri si sono estrapolati equazioni per stimare l'escrezione totale di azoto, l'escrezione totale delle deiezioni e le escrezioni totali della sostanza secca (SS).

La maggior parte di questi modelli matematici sono stati elaborati sui dati delle bovine da latte; Nennich et al. (2005) per esempio elaborando i dati raccolti in un data set sulle bovine da latte, ha estrapolato diverse equazioni matematiche, ottenendo un valore medio di deiezioni (Et) pari a 66.3 kg/d/capo, per un animale con un peso corporeo di 630 kg ed una ingestione di sostanza secca (DMI) di 21.7 kg/d.

Impiegando questi dati si è estrapolata una retta di equazione:

$$Et=[DMI*2.63(\pm 0.10)]+9.4(\pm 2.8)$$

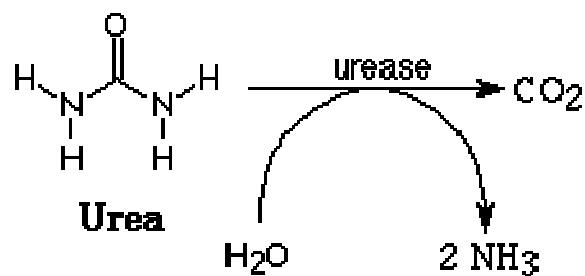
Wilkerson et al. (1997) hanno elaborato un modello per la stima dell'escrezione totale di azoto (Ne) tenendo in considerazione diversi parametri:

$$\text{Ne: } [(0.000232 \cdot \text{BW}) + (0.000342 \cdot \text{DMI}) + (0.00649 \cdot \text{milk}) + (1.83 \cdot \text{pg, g/g di DM}) + (0.280 \cdot \text{NDF, g/g di DM}) - 0.440].$$

### 3.2.3 CICLO DELL'AZOTO ESCRETO

L'azoto escreto nelle deiezioni (azoto fecale + azoto urinario), si presenta soprattutto in forma ammoniacale e organica; circa il 40-50% dell'azoto presente nelle deiezioni è sottoforma di N-ureico e ammoniacale e proviene dall'urina (Van Horn et al., 1994).

L'urea contenuta nelle urine è convertita rapidamente in  $\text{NH}_3$  ad opera dell'ureasi, enzima abbondantemente presente nelle feci, prodotta da batteri e funghi presenti anche nel terreno, secondo la seguente reazione chimica:



In condizioni ottimali tutto l'N-ureico può essere convertito in ammoniaca e finire nell'atmosfera, l'N-ammoniacale denominato anche TAN (Total Ammonia Nitrogen), rappresenta la porzione di azoto che viene rapidamente persa nell'atmosfera, secondo la seguente equazione chimica:



Dal punto di vista chimico l' $\text{NH}_3$  è un gas incolore, tossico (eccessive concentrazioni nell'ambiente riducono le performance produttive degli animali e possono causare danni alla salute sia degli animali che degli operatori) e dall'odore caratteristico; è molto solubile in acqua, cui impartisce una netta basicità, in ambiente acido reagisce con idrogenioni ( $\text{H}^+$ ) formando ioni ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ) molto solubili in acqua e non gassosi (questa reazione impedisce quindi la diffusione di  $\text{NH}_3$  nell'atmosfera).

I principali fattori che agiscono sulla perdita di TAN possono essere divisi in 3 gruppi:

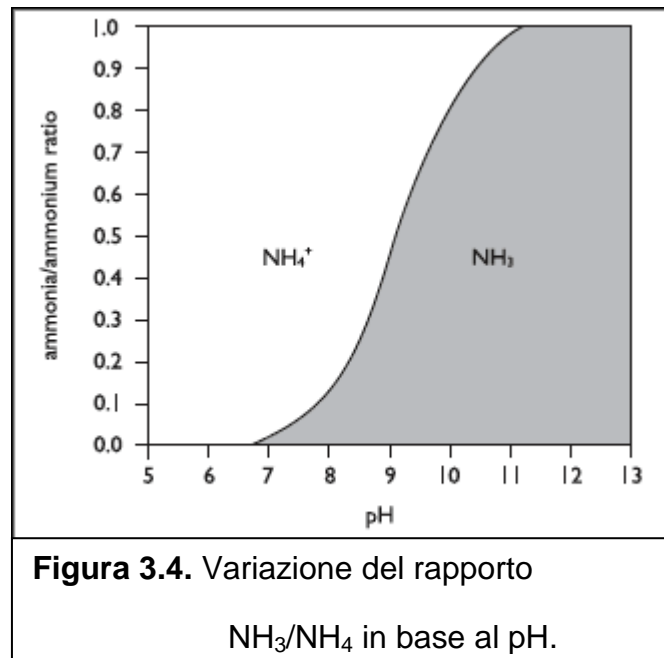
- caratteristiche delle deiezioni (sostanza secca, pH, contenuto di N- $\text{NH}_4$ );
- modalità di spargimento del letame (incorporazione del letame nel suolo, zona di applicazione e tempo di applicazione);
- condizioni pedoclimatiche dell'area di applicazione (tessitura del suolo, impasto, copertura superficiale residui/piante, temperatura, ventosità e piovosità).

Diversi studi confermano una perdita di azoto compresa tra il 40-70% quando si impiega liquame bovino come fertilizzante (Stevens and Laughlin, 1997), mentre lo spargimento di liquame in primavera su terreno coltivato fa abbassare la perdita al 24-33% di TAN (Beauchamp et al., 1982).

Il contenuto di sostanza secca nel letame è un parametro molto importante nella perdita di N-ammoniacale: Sommer e Olesen (1991) mostrano una correlazione positiva tra il contenuto di SS nel liquame bovino dal 4 al 12% e l'emissione di ammoniaca, probabilmente perché un liquame più liquido riesce a penetrare meglio e più velocemente nel terreno, evitando quindi la perdita di N-ammoniacale.

Lauer et al. (1976) hanno stimato una perdita di azoto dal 61 al 99% da letame con circa il 20% di sostanza secca.

A causa di un basso contenuto in acidi il letame ha quasi sempre un  $\text{pH} > 7.0$  che può oscillare da 7.5 a 8.5, ciò promuove il processo di ammonizzazione (Sommer et al., 1991), causando una perdita di  $\text{N-NH}_3$  pari al 50-75% (Van Horn et al., 1994); a  $\text{pH}$  inferiori al 7 la perdita di  $\text{NH}_3$  diventa minima (Moore et al., 1995). La figura 3.4 riporta la variazione del rapporto  $\text{NH}_3/\text{NH}_4$  in base al  $\text{pH}$ .



In ambiente aerobico l' $\text{NH}_3$  viene convertita in ione nitrato  $\text{NO}_3^-$  mediante il processo di nitrificazione (questa reazione avviene sulla parte superficiale della massa).

La nitrificazione rappresenta l'ossidazione biologica dell'ammonio a nitrato, ed avviene ad opera di microrganismi autotrofi specifici (nitrificanti) e alcuni eterotrofi, che possono effettuare una nitrificazione parziale a partire da forme ridotte dell'azoto.

Nell'ossidazione dell'ammonio a nitrito si formano due o più intermedi tra cui l'idrossilammina, che sono a loro volta ossidati a nitrato. I microrganismi nitrificanti autotrofi possono essere suddivisi in:

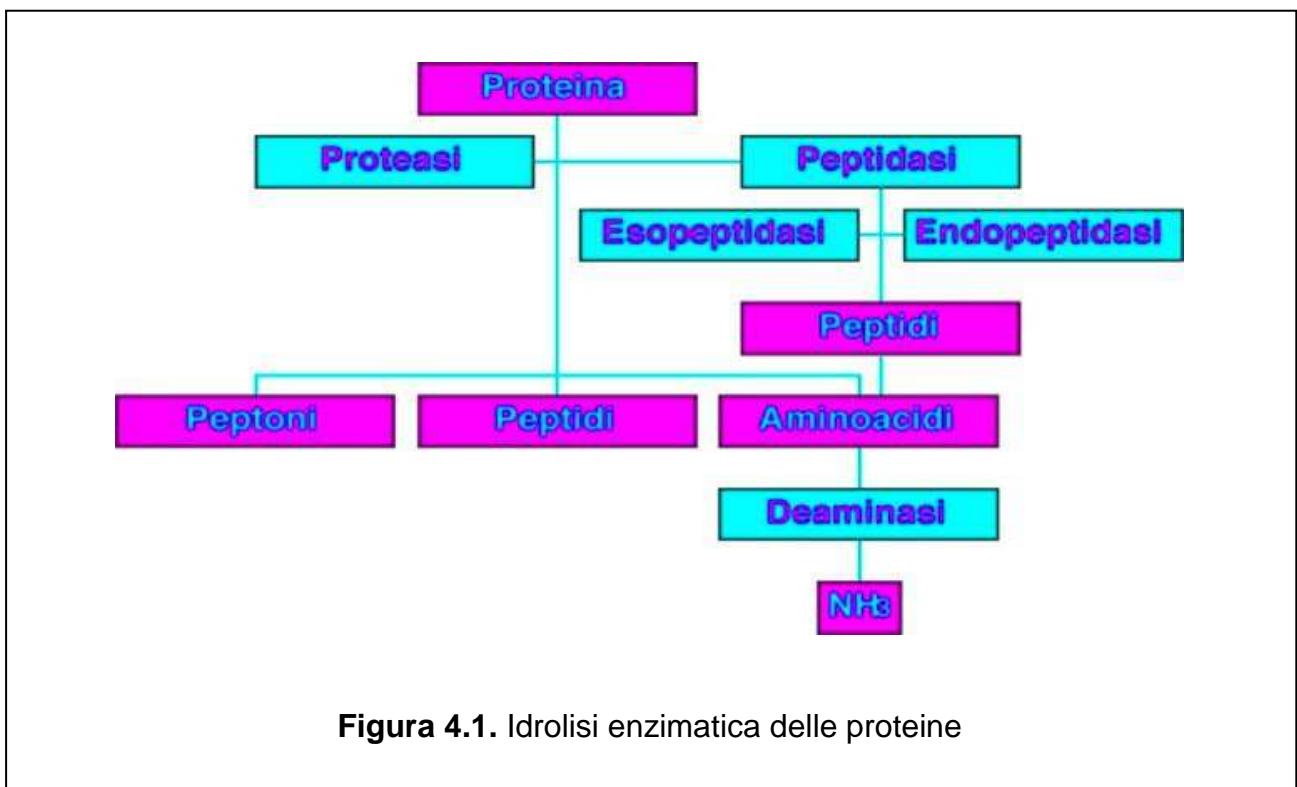
- batteri nitrosanti, che ossidano lo ione ammonio a nitrito,
- batteri nitricanti, che ossidano il nitrito a nitrato.

I nitrati in ambiente anaerobico, ad opera di batteri, vanno incontro a processi di denitrificazione fino ad ottenere azoto elementare ( $N_2$ ) $\uparrow$ , questo processo  $NO_3 \rightarrow N_2$  dà origine ad una serie di intermedi gassosi ( $NO$ ,  $NO_2$  e  $N_2O$ ) $\uparrow$  dannosi allo strato di ozono e responsabili (soprattutto  $N_2O$ ) dell'effetto serra

## 4. L'AZOTO NEL RUMINE

### 4.1 DEGRADAZIONE RUMINALE DELLE PROTEINE

Le proteine alimentari sono idrolizzate (ad opera di enzimi specifici, fig.4.1) a peptidi ed amminoacidi dai microrganismi del rumine, ed alcuni amminoacidi vengono ulteriormente degradati ad acidi organici, ammoniaca e anidride carbonica.

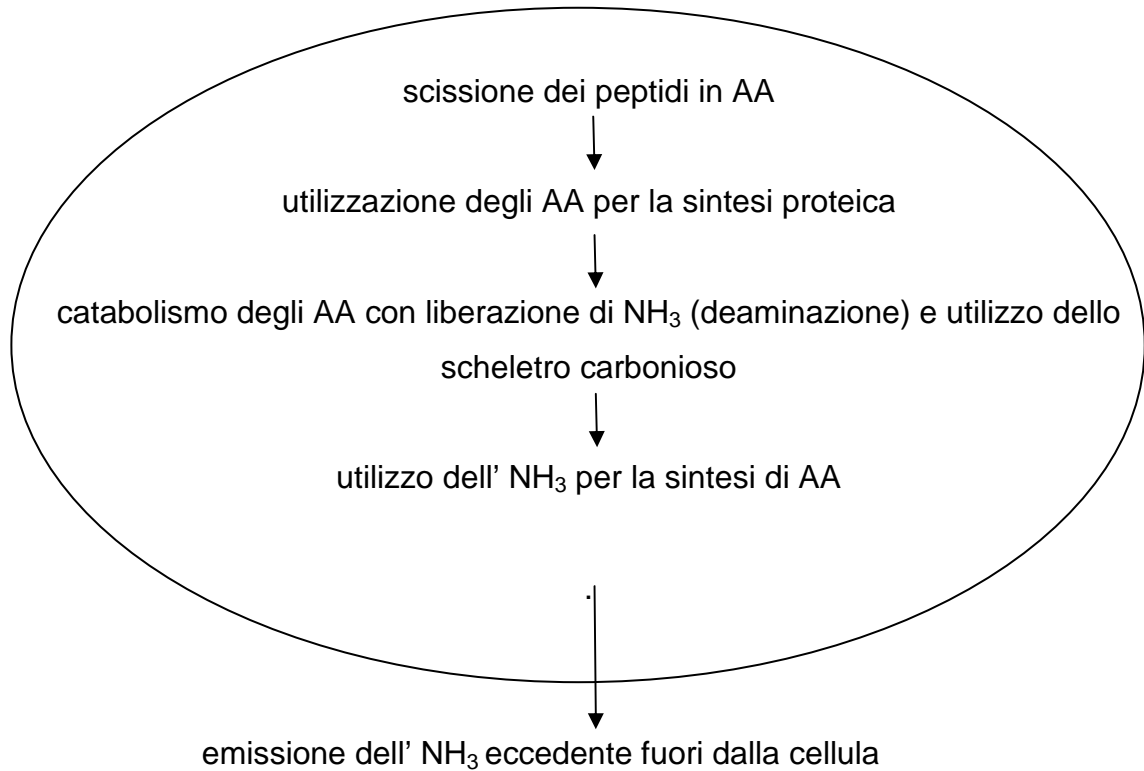


La depolimerizzazione delle proteine a livello ruminale, avviene in modo diverso per opera di batteri e protozoi. I batteri degradano le proteine in ambito extracellulare, liberando nel fluido ruminale enzimi proteolitici. I protozoi invece, digeriscono all'interno della cellula, ovvero nel loro sistema lisosomiale, previa fagocitosi o dei batteri o di particelle alimentari.

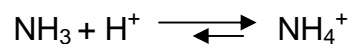


Gli enzimi proteolitici batterici variano da specie a specie, ma sono comunque in grado di provvedere all'idrolisi di circa il 35-40% delle proteine ingerite.

I peptidi e gli AA captati dai batteri vanno incontro a cinque distinte fasi intracellulari:



Ai valori di pH tipici del rumine l'ammoniaca si trova prevalentemente sotto forma di ione ammonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) secondo la seguente reazione chimica:



Lo ione ammonio non viene assorbito dalle pareti rumino-omasali e viene impiegato per la sintesi batterica di AA e di altri composti azotati, l'azoto ammoniacale è il substrato impiegato dalla maggior parte dei batteri ruminali che lo utilizzano fino al 50-80% per la sintesi degli amminoacidi.

Una parte dell'ammoniaca oltrepassa comunque la parete ruminale e finisce nel circolo sanguigno e successivamente nel fegato dove viene detossificato mediante il ciclo dell'urea, parte di questa viene riciclata nel rumine attraverso la saliva. Tale meccanismo è molto importante soprattutto per il recupero dell'azoto: è stato stimato che il ruminante può riciclare fino ad un massimo di 6 e 24 g/N al giorno rispettivamente nell'ovino e nel bovino (Houpt, 1970); nella specie bufalina è stato rilevato un maggior passaggio di urea dal sangue al rumine rispetto al bovino.

La popolazione batterica ruminale ottiene dal 25 al 50% del suo azoto dall' $\text{NH}_3$ , ed in minor misura da nitriti e nitrati, anche quando la dieta è ricca di proteine.

La concentrazione di ammoniaca nel liquido ruminale varia notevolmente a seconda della quantità di azoto presente nella dieta, della solubilità dei composti azotati e della rapidità con la quale essi vengono degradati. La concentrazione di ammoniaca nel liquido ruminale può essere impiegata come indicatore dell'efficienza di conversione dell'azoto alimentare in azoto microbico e il valore spesso suggerito per avere un livello ottimale di proteosintesi batterica è di 5 mg/dl (Firkins et al., 2007).

Altri autori riportano come valore ottimale concentrazioni di 6.2 mmol/l pari a 10.6 mg/dl, con limiti compresi da 5 a 11 mmol/l (Allen e Miller, 1976; Okorie et al., 1977).

Nel bufalo la concentrazione di ammoniaca nel rumine risulta molto più alta rispetto a quella bovina come dimostrato da Sangwan et al., (1990) e Kennedy et al., (1992a). Puppo et al., (2002) hanno trovato nel bufalo una maggiore capacità di sintesi microbica ed una maggiore capacità di riciclare l'urea dal sangue al rumine rispetto al bovino.

L'ampio catabolismo proteico dei batteri ruminali, necessita di un elevato apporto di protidi nella razione e riduce l'efficienza di utilizzo delle proteine degradabili da parte dell'animale.

Wallace (1996), riporta che la produzione di ammoniaca nel rumine è dovuta alla deaminazione degli AA da parte di numerosi batteri che presentano una bassa attività deaminativa e un più piccolo numero di batteri con una più alta attività.

I protozoi, che rappresentano dal 10 al 50% ed oltre della biomassa microbica ruminale, vivono nel rumine grazie alla predazione di batteri e di zoospore fungine, si cibano inoltre di piccole particelle di alimenti. Il numero massimo di protozoi si raggiunge con una dieta ricca di fibre, mentre con una dieta a base di concentrati il numero di protozoi diminuisce, fino alla scomparsa di alcune specie.

I protozoi presentano una migliore attività degradativa sulle proteine insolubili rispetto a quelle solubili e dispongono di enzimi proteolitici dotati di un'attività più elevata rispetto a quella dei batteri. Diversamente da questi ultimi, i protozoi sono incapaci di sintetizzare AA partendo dall' $\text{NH}_3$ , inoltre rilasciano quantità maggiori di peptidi e AA così come di peptidasi nel liquido ruminale.

Alcuni studi indicano che il 65% o più dei protozoi riciclano le proteine all'interno del rumine, aumentando quindi i tempi di ritenzione nel rumine delle proteine; è stato stimato che circa il 25% delle proteine "microbiche" digerite dall'animale provengono dai protozoi.

Le proteine protozoariche sono caratterizzate da una migliore digeribilità rispetto a quelle batteriche e da un valore nutritivo notevole, per la presenza nel pool di AA di elevate concentrazioni di lisina.

L'apporto quanti/qualitativo di sostanza organica fermentescibile (SOF) nella razione influenza profondamente il processo di trasformazione dell'ammoniaca ruminale in proteine batteriche e l'efficienza di sintesi, in modi differenti. Oba e Allen (2003) hanno riscontrato che aumentando nella razione la percentuale di cereali, aumentava a livello intestinale l'afflusso di N-microbico di circa il 30%.

L'entità della sintesi proteica microbica è in funzione della disponibilità di energia, per questo è importante il rapporto azoto/energia fermentescibile nella razione. La quantità di energia disponibile per la popolazione ruminale è stimata come SOF e, mediamente, ad ogni kg di SOF, corrisponde la sintesi di 145 g di proteine microbiche, valore che si può ritenere prudenziale in quanto è stato evidenziato che, in genere, ad ogni kg di SOF corrisponde la sintesi di 25 – 35 g di N-microbico, che corrisponde a 156 – 219 g di proteine.

Mediamente per mole di ATP vengono prodotti 10.5 g di materiale cellulare secco costituito da un 10% di N di cui l'80% è formato da AA e il rimanente 20% è presente sotto forma di acidi nucleici.

#### **4.2 CINETICA DELLA DEGRADAZIONE RUMINALE DELLE SOSTANZE AZOTATE**

Le sostanze azotate che giungono nel rumine attraverso gli alimenti possono essere distinte in:

- sostanze proteiche (proteine),
- sostanze non proteiche (NPN).

Queste ultime seguono vie metaboliche differenti dalle proteine e vengono maggiormente utilizzate soprattutto dai batteri ruminali come fonti di azoto per la biosintesi di proteine microbiche; l'importanza di questa sintesi è relativa alla capacità dei batteri di sintetizzare amminoacidi (essenziali e non), motivo per cui i microrganismi ruminali rendono il loro ospite indipendente da un apporto alimentare di amminoacidi essenziali.

Nelle piante le frazioni azotate non proteiche maggiormente presenti sono:

- Amminoacidi (in particolare l'acido glutammico, l'acido aspartico, l'alanina, la serina, la glicina e la prolina),

- Ammine,
- Ammidi,
- Purine,
- Pirimidine,
- Nitrati e nitriti (azoto non organico),
- Alcalodi,
- Vitamine del gruppo B.

Negli alimenti per ruminanti, oltre il 30% dell'azoto totale può essere sotto forma di NPN; l'insilato di mais può contenere fino al 50% di NPN/N totale, mentre il fieno di erba medica può contenere dal 10 al 20% di NPN/N totale; la maggior parte del NPN presente nel fieno e nei foraggi tagliati deriva dall'azione di proteasi e peptidasi liberati dalla pianta.

Molti di questi composti vengono demoliti rapidamente nel rumine ed il loro azoto entra nel pool dell'ammoniaca.

Nel sistema Cornell net carbohydrate and protein system (CNCPS) i composti azotati, siano essi di natura proteica e non, vengono classificati in base alla loro degradabilità (tab 4.1), ovvero in base alla velocità di transito ruminale ( $K_p$ ) e alla velocità di degradazione ( $K_d$ ); in funzione di questi due parametri, la componente azotata può essere suddivisa in 5 frazioni:

A → NPN, azoto totalmente solubilizzato nel rumine

$B_1$  }  
 $B_2$  } frazioni proteiche solubilizzate in tempi diversi nel rumine  
 $B_3$  }

C → proteine non degradate nè digerite, legate a lignine o tannini

La proteina solubile comprende l'azoto non proteico (A) e la proteina vera solubile degradata velocemente dai microrganismi ruminanti (B1); la proteina degradabile (Rumen Degradable Protein, RDP) comprende l'azoto non proteico (A) + la proteina solubile velocemente degradabile (B1) + la proteina non solubile lentamente degradabile (B2); la proteina non degradabile (Rumen Undegradable Protein, RUP) comprende sia la quota degradabile molto lentamente a livello ruminale (B3), in quanto associata all'NDF e quindi disponibile a livello intestinale, sia quella non disponibile in assoluto, cioè legata all'ADF (C).

**Tabella 4.1.** Degradabilità ruminale dei composti azotati secondo la CNCPS

<b>FRAZIONE</b>	<b>COMPOSIZIONE</b>	<b>DEGRADABILITÀ RUMINALE (Kd, %/h)</b>	<b>RDP-RUP</b>
<b>A</b>	NH <sub>3</sub> , NO <sub>3</sub> , AA, peptidi	istantanea	solubile
<b>B1</b>	Globuline Alcune albumine	200-300	degradabile
<b>B2</b>	La maggior parte delle albumine Gluteline	5-15	degradabile
<b>B3</b>	Prolamine Proteine associate alla parete cellulare Proteine denaturate	0.1-1.5	Non degradabile
<b>C</b>	Prodotti della reazione di Maillard Azoto legato alla lignina	0	Non degradabile

In genere le frazioni azotate NPN hanno tempi di degradazione molto veloci (> 300 %/h), poiché uno dei fattori più importanti correlati alla velocità di degradazione è la solubilità dei composti.

La degradabilità delle frazioni azotate dipende da vari fattori sia chimici che fisici, come:

- struttura tridimensionale della molecola;
- legami intra ed inter molecolari;
- incapacità di attraversare le membrane cellulari;
- fattori antinutrizionali.

Tra tutti i fattori, la struttura tridimensionale è quella che agisce maggiormente sulla degradabilità delle proteine, la presenza più o meno accentuata di legami chimici come i ponti disolfuro stabilizzano la molecola, rendendo più difficile l'attacco enzimatico e la sua degradazione.

Alcuni studi che utilizzavano marcatori contenenti  $^{15}\text{N}$  in forma ammoniacale o ureica infusi nel rumine, hanno mostrato che la proteina microbica derivava dal 18 al 100 % dall' $\text{NH}_3$ . Leng e Noland (1984), hanno invece rilevato che oltre la metà dell'azoto microbico proteico non derivava dall'  $\text{NH}_3$ , bensì da peptidi e amminoacidi.

Ricerche condotte da Cotta e Russell (1982) hanno mostrato che si può migliorare l'efficienza della sintesi proteica microbica quando peptidi o AA vengono sostituiti da  $\text{NH}_3$  o urea. È stato inoltre evidenziato una differenza tra AA e peptidi sul tasso di crescita e produzione di batteri ruminali, correlata alla quantità di energia fermentescibile e quella rapidamente disponibile.

L'azoto ammoniacale viene utilizzato soprattutto dai batteri che degradano i carboidrati strutturali, mentre l'azoto degli AA viene utilizzato meglio dai batteri che degradano i carboidrati non strutturali (NSC), poiché per degradare gli AA occorre più energia di quella necessaria per degradare  $\text{N-NH}_3$  (NRC, 2001).

Una delle caratteristiche che contraddistingue la bufala è quella di avere dei tempi di permanenza ruminale superiori a quelli della bovina, per cui l'alimento permane per più

tempo nel rumine ma per meno tempo nell'intestino (Bartocci et al., 1997) e questo comporta una diminuzione della quota proteica by-pass che giunge all'intestino (Di Lella et al., 1995). Anche i tempi di ruminazione sono più lunghi nel bufalo rispetto al bovino, migliorando l'efficienza di degradabilità degli alimenti, che vengono maggiormente triturati aumentando la superficie di attacco della flora ruminale.

Mc Sweeney et al. (1989) hanno notato che il bufalo impiega oltre il 53% di tempo in più a ruminare rispetto al bovino e questo migliora l'efficienza di transito ( $K_p$ ) delle particelle fini.

#### **4.3 CICLO DEI NITRATI/NITRITI NEL RUMINE**

I nitrati essendo molto solubili finiscono facilmente nelle falde acquifere creando problemi (in base alle concentrazioni) di potabilità e/o salute; per i ruminanti è consigliata una concentrazione non superiore ai 10 mg/l di  $\text{NO}_3\text{-N}$ , mentre la concentrazione in nitrati ( $-\text{NO}_3$ ) deve essere inferiore ai 44 mg/l.

Un contenuto superiore ai 221 mg/l di  $\text{NO}_3$  e 40 mg/l di  $\text{NO}_3\text{-N}$ , può causare la morte dell'animale (NRC 2001), inoltre il contenuto dei nitrati delle acque deve essere aggiunto a quello degli alimenti, in quanto l'effetto è additivo. Nella tabella 4.2 vengono riportati i livelli consigliati di nitrati contenuti nei foraggi.



**Tabella 4.2** - Livelli consigliati di nitrati contenuti nei foraggi

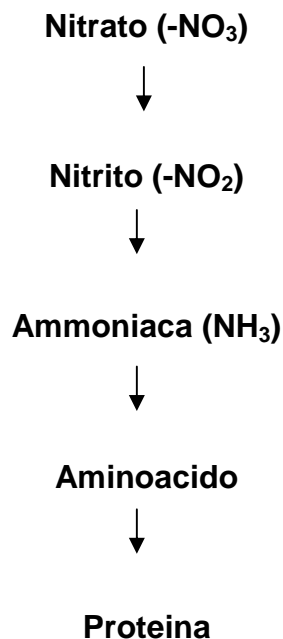
<b>NO<sub>3</sub>-N (%)</b>	<b>NO<sub>3</sub>-N (ppm)</b>	<b>Livello alimentare</b>
<b>&lt;0.10</b>	1000	Sempre sicuro
<b>0.1-0.15</b>	1000-1500	Generalmente sicuro
<b>0.15-0.20</b>	1500-2000	<50% dieta (diluito)
<b>0.20-0.35</b>	2000-3500	<35% dieta (diluito)
<b>0.35-0.40</b>	3500-4000	<25% dieta (diluito)
<b>&gt;0.40</b>	>4000	Potenzialmente tossico

Vengono considerati sicuri alimenti che presentano una concentrazione di nitrati che va dai 4 ai 1,760 mg/kg di BW come farina di soia, erba media fresca e affienata, mentre per quanto riguarda farina di mais, cariossidi d'avena e insilato di erba medica i valori sono rispettivamente di 22, 44 e 880 mg/kg (Crowley, 1985).

I nitrati non sono eccessivamente tossici, nei monogastrici hanno più che altro un effetto caustico sulla parete intestinale (Brüning-Fann e Kaneene, 1993); altri sintomi legati all'intossicazione da nitrati sono: vomito, diarrea, scarso appetito, aborti, scarsa crescita e fertilità.

La dose letale LD<sub>50</sub> per il bovino varia dai 330 ai 990 mg/kg di BW (Bradley et al., 1940), sempre lo stesso autore per il bovino riporta un valore pari a 450 mg di sodio nitrato/kg di BW (Bradley et al., 1942).

A livello ruminale i nitrati vengono impiegati come fonte di azoto per la sintesi di proteine batteriche ad opera di batteri come: *Selenomonas Ruminantium* (*S. ruminantium*), *Veillonella parvula* (*V. parvula*) e *Wolinella succinogenes* (*W.succinogenes*) (Iwamoto et al., 1999, 2001b, 2002); in grado, attraverso reazioni di ossidoriduzione, di ridurre il nitrato/nitrito in ammoniaca secondo il seguente schema:



In normali condizioni i nitrati ingeriti vengono rapidamente convertiti in nitriti, ad opera dell'enzima nitrato reduttasi (Lewicki et al., 1998) che trova nel rumine le condizioni ottimali di pH (Wright e Davison, 1964; Sen et al., 1969; Mirvisch et al., 1975), per poi essere ridotti ulteriormente in ammoniaca. Quest'ultima tappa si svolge più lentamente rispetto alla conversione del nitrato in nitrito (EFSA 2009).

Il passaggio dei nitrati e nitriti dal rumine al torrente circolatorio è in genere del 10-20% (EFSA 2009), mentre la rimanente parte viene ridotta in ammoniaca; una parte dei nitrati assorbiti viene riciclata nel rumine tramite la saliva oppure riassorbiti nell'intestino (Yaremicio, 1991). L'organismo mostra una tendenza al recupero del nitrato: è stato infatti stimato che solo il 20% viene escreto con le urine (EFSA, 2008a), a differenza dei nitriti, che sono rapidamente escreti.

Quando l'animale ingerisce grandi quantità di nitrati, pari ad una concentrazione superiore ai 65 mmol/NO<sub>3</sub> nel liquido ruminale, la capacità dei batteri di ridurre i nitrati in ammoniaca si abbassa notevolmente con conseguente accumulo di prodotti intermedi

come i nitriti (Baranova et al., 1999). Questi ultimi fluiscono nel circolo sanguigno legandosi all'emoglobina in maniera quasi irreversibile, rendendo molto difficile lo scambio con l'ossigeno; e formando un legame molto stabile tra emoglobina e nitrito che impedisce la respirazione.

Questa "nuova" emoglobina, prende il nome di metaemoglobina (MetHb), ciò sta ad indicare una diversa specie chimica che ha perso tutte le caratteristiche originarie dell'emoglobina e tale fenomeno può portare alla morte per soffocamento (Koch and Paisley, 2002).

Inoltre i nitriti hanno una azione tossica sui batteri cellulosolitici (Marais et al., 1988) con conseguente riduzione della digeribilità dei carboidrati strutturati, ridotta ingestione di sostanza secca e abbassamento delle produzioni.

La direttiva Europea 2002/32/CE, relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali, indica un contenuto massimo di nitriti pari a 15 mg/kg (ppm) in mangimi, al tasso di umidità del 12%, destinati ad animali d'allevamento, ad eccezione di animali da compagnia.

Dal punto di vista tossicologico i nitriti hanno una tossicità 10 volte maggiore rispetto ai nitrati; attualmente per i ruminanti non sono disponibili precisi valori, vista però la capacità del rumine di convertire i nitrati in nitriti, è importante conoscere il rapporto e il contenuto di tali sostanze negli alimenti e nelle acque e limitarne il più possibile l'ingestione.

L'acqua di bevaggio è potenzialmente la principale fonte d'apporto di nitriti, a causa soprattutto dell'elevato consumo idrico: in media una bovina in lattazione beve 95 l/d di H<sub>2</sub>O e anche la carica batterica incide sul rapporto nitriti/nitrati; infatti elevate contaminazioni di coliformi (> 10 UFC/100ml) fanno aumentare i primi poiché sono in grado di ridurre i nitrati (Cockburn et al., 2010).

Tra gli alimenti che possono contenere elevate quantità di nitriti (>200 mg/kg). si annoverano soprattutto insilati e fieni

#### 4.4 METABOLISMO PROTEICO

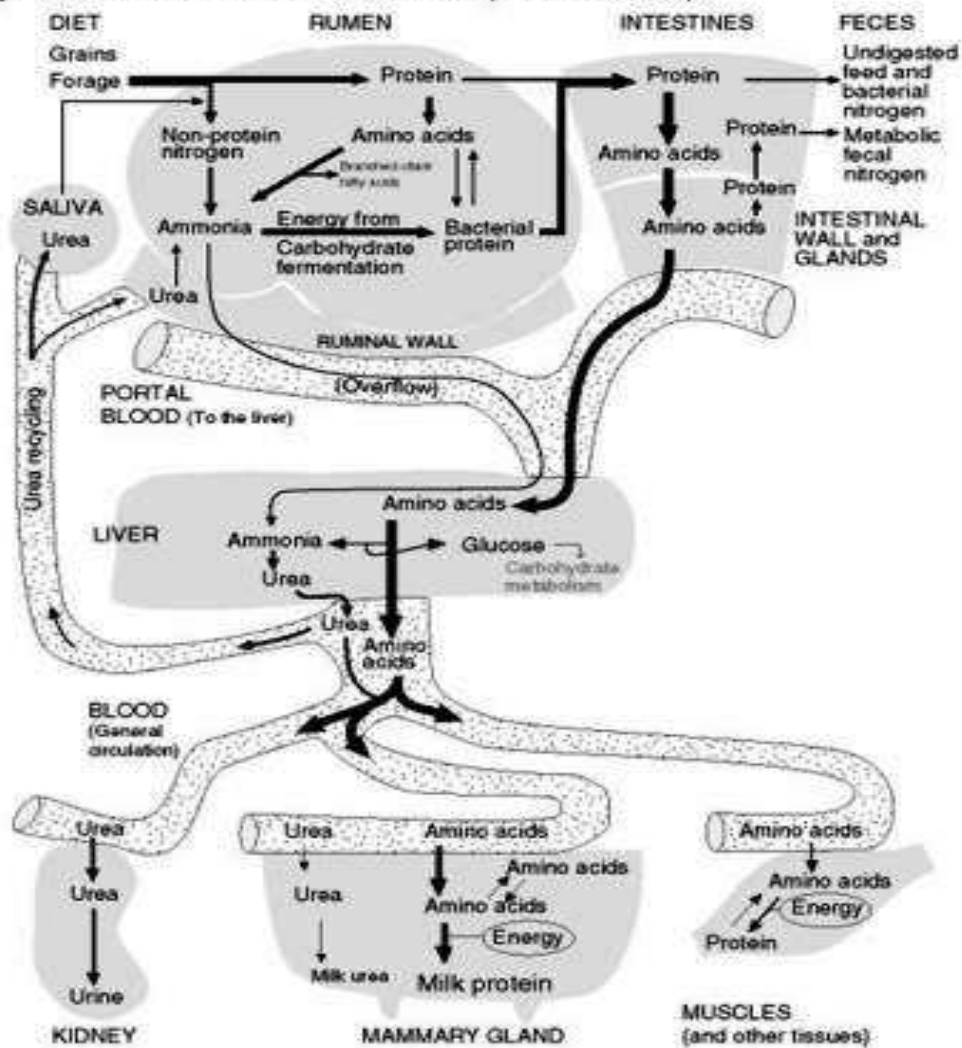
La quota proteica postruminale che giunge nell'abomaso dell'animale, prende il nome di proteina metabolizzabile (MP) ed è costituita principalmente dalle proteine di origine microbica (MCP), dalla quota di proteine indegradabili ruminali (RUP) presenti nell'alimento, e da una piccola quota di proteine endogene (ECP).

Al fine di ottimizzare l'apporto proteico nei ruminanti bisogna:

- **promuovere la produzione di MCP**, fornendo una adeguata quantità di proteine degradabili ruminali (RDP) e di NPN insieme ad un adeguato apporto di energia (SOF). La quota di proteina microbica costituisce circa il 50-70% dell'MP ed è caratterizzata da una composizione amminoacidica pressoché costante;
- **fornire una adeguata quantità di proteine indegradabili (RUP)**, in grado di bypassare il rumine senza essere degradate dalla flora ruminale. Per quanto riguarda le RUP, oltre alla quantità è fondamentale la composizione amminoacidica.

Il valore della proteina metabolizzabile per le vacche da latte è determinato dal suo profilo amminoacidico e soprattutto dal contenuto in amminoacidi essenziali (EAA); la quota di EAA che arriva nell'intestino tenue insieme alla quota digeribile delle RUP, sono gli unici parametri utilizzati per stimare il valore proteico di un alimento. La conoscenza di questi due dati dovrebbe spiegare la risposta degli animali alle diverse fonti proteiche.

**Figure 1.** Protein metabolism in dairy cows. Microbial protein synthesis requires dietary energy and ammonia. The diet supplies both true protein and nonprotein nitrogen (NPN) to the ruminal ammonia pool. Ammonia not used for microbial protein is excreted as urea in the urine (Wattiaux, 1998).



## 5. PRINCIPALI EFFETTI DELL'INQUINAMENTO DA AZOTO

L'Unione Europea prescrive, ambiziosamente, che entro il 2016 tutte le acque (superficiali e profonde) devono almeno raggiungere il grado di qualità "buono".

L'agricoltura può influire negativamente sulla qualità delle acque profonde se i campi coltivati perdono azoto sotto forma di nitrati lisciviati verso le falde.

Questa diffusa forma di contaminazione può nuocere direttamente alla salute umana se raggiunge l'acqua potabile. Gli interventi prescritti per prevenire la perdita di nitrati e gestire i territori in cui le acque di falda superano la soglia di 50 mg di nitrati L<sup>-1</sup> sono diventate il paradigma per il controllo degli impatti dell'agricoltura sulla qualità delle acque.

Sono state individuate le "zone vulnerabili ai nitrati"; è stato avviato un esteso monitoraggio della qualità delle falde e sono stati stabiliti i "programmi di azione" obbligatori per correggere le pratiche agricole. Un importante effetto dell'adozione di tali iniziative è l'aver provocato una più precisa conoscenza del territorio agricolo e l'aver notevolmente aumentato l'attenzione degli agricoltori sugli effetti ambientali delle loro pratiche di gestione.

### 5.1 EUTROFIZZAZIONE

Il termine eutrofizzazione sta ad indicare un eccesso di nutrienti nelle acque, principalmente azoto e fosforo (Levine e Schilnder, 1989), che favoriscono una proliferazione eccessiva di piante acquatiche, alghe e organismi fitoplanctonici.

Circa il 50-80% delle perdite di azoto di origine antropica è riciclata nell'acqua e nel suolo mentre un'altra parte (20-50%) si trasforma in azoto elementare inerte e una piccola percentuale in protossido di azoto N<sub>2</sub>O (gas ad effetto serra).

L'eutrofizzazione è un problema diffuso in fiumi, laghi, estuari, coste ed oceani. Le fonti principali d'inquinamento sono i fertilizzanti utilizzati in agricoltura, i reflui zootecnici e gli scarichi urbani. L'eccessiva e scorretta pratica della fertilizzazione (non rispettando le esigenze colturali e i periodi di somministrazione) causa un accumulo eccessivo di fosforo nel terreno, una parte del quale è trasportato nell'ecosistema acquatico prevalentemente per erosione e per scorrimento (Sharpley e Menzel, 1987).

Per quanto riguarda l'azoto, i concimi minerali apportano direttamente ammoniaca e nitrati nelle acque sotterranee per lisciviazione, e nelle acque superficiali per scorrimento e "drenaggio" sotterraneo. L'entità di questo apporto dipende dalle condizioni pedoclimatiche del terreno al momento dello spandimento, dalla quantità di reflui prodotti e distribuiti per unità di superfici agricola, dalla loro forma (letame o liquame) e dalle modalità e tempistica della distribuzione.

Carpenter et al. (1998) riportano una perdita di azoto per lisciviazione nei terreni argillosi pari al 10-40%, mentre una perdita del 25-80% è stata osservata nei terreni sabbiosi. L'azoto organico presente nei reflui zootecnici segue lo stesso andamento; inoltre una parte si disperde nell'atmosfera sotto forma di ammoniaca (volatizzazione) e  $N_2O$  (denitrificazione incompleta). Queste sostanze si ridepositano nel suolo e nei corsi d'acqua sotto forma di pioggia (deposizione umida) o direttamente (deposizione atmosferica a secco). La direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano recepita con il Decreto Legislativo 31/2001, fissa i limiti di legge di 50mg/l per i nitrati, di 0.50mg/l per i nitriti e 0.50mg/l per lo ione ammonio.

Nell'uomo il 5-10% dei nitrati ingeriti è ridotto nella saliva e nel tratto gastrointestinale nel più tossico nitrito. I nitriti e le nitrosammine, composti contenenti il gruppo funzionale -nitroso ( $-N=O$ ) che si originano in ambiente fortemente acido dalla

reazione del nitrito con le ammine rilasciate nella digestione delle proteine, possono dare luogo a gravi patologie per l'uomo (Gupta et al. 2000; Hill 1999).

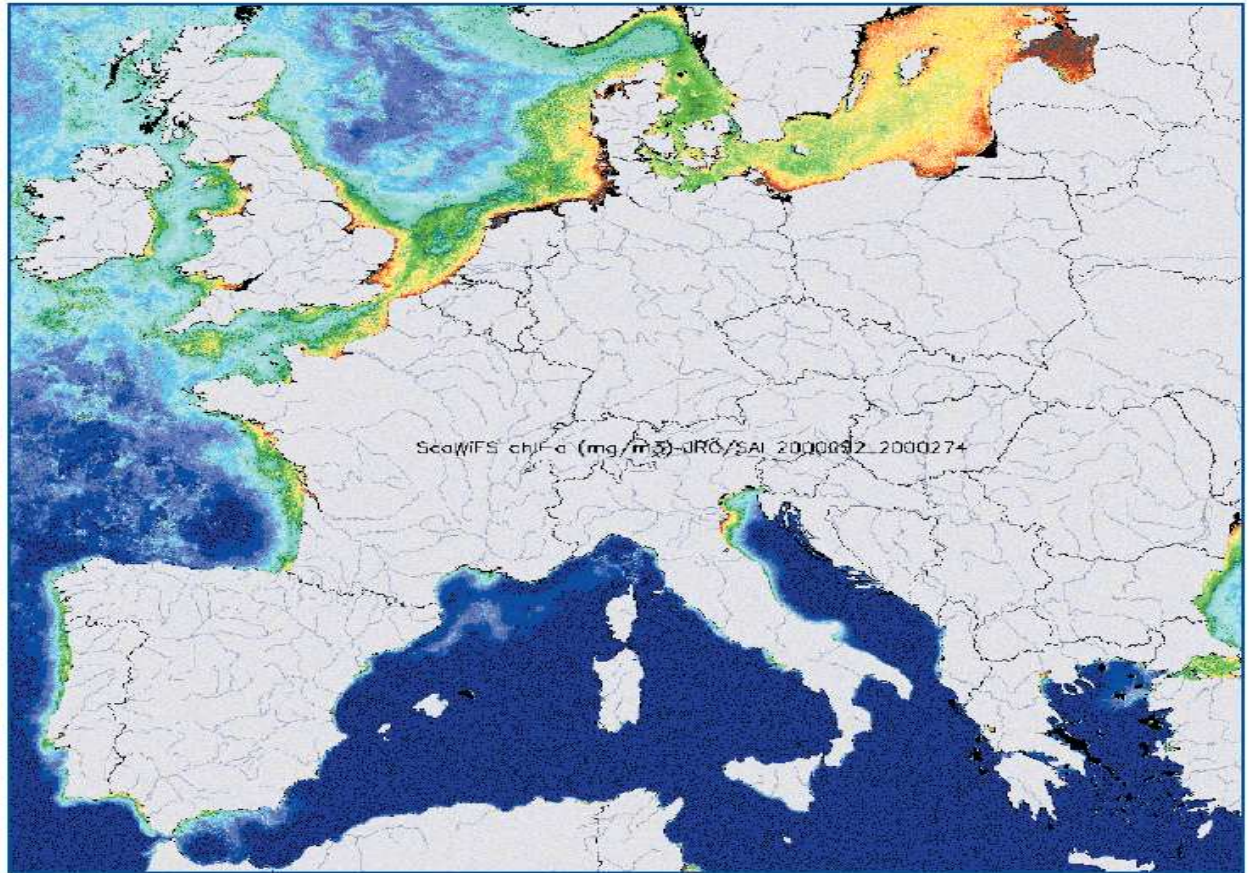
Sebbene il ruolo del N-nitroso e dei nitriti nella promozione del cancro sia incontrovertibile, le prove relative al ruolo dei nitrati sono meno chiare (Pobel et al., 1995).

L'effetto principale prodotto dai nitriti è, come visto precedentemente, l'ossidazione dell'emoglobina a metaemoglobina, che non è più in grado di trasportare ossigeno ai tessuti e che è dannosa soprattutto per i bambini piccoli in cui causa una lenta asfissia chiamata sindrome del bambino blu.

Un altro fenomeno molto comune soprattutto nei corsi idrici, è lo sviluppo di fioriture di alghe blu-verdi (Cianobatteri). La stessa specie di cianobatteri può essere associata sia a fioriture tossiche che non tossiche, il problema sanitario legato alla presenza dei cianobatteri tossici è dovuto alla loro capacità di produrre sostanze tossiche (cianotossine) alle quali l'uomo può essere esposto attraverso varie vie (fig.5.1). La produzione di cianotossine tende ad aumentare durante la fase di crescita esponenziale per diminuire gradualmente durante la fase stazionaria (Watanabe et al., 1988). Molti studi indicano che i cianobatteri producono la massima quantità di tossine in condizioni di luce e di temperatura ottimali per la loro crescita (Ressom et al., 1994). La più elevata produzione di cianotossine da parte delle specie estive avviene generalmente a temperature comprese tra 18° e 25°C (Chorus e Bartram, 1999). Una maggior produzione di tossine può essere stimolata da condizioni di stress ambientale e, in alcune specie, da basse intensità di luce e brevi fotoperiodi (Ressom et al., 1994).



Mapa I — Immagine da satellite delle concentrazioni di clorofilla-a nei mari dell'UE (valori medi estate 2000). Le zone rosse e gialle indicano un forte sviluppo di fitoplancton, uno dei segnali più evidenti dell'eutrofizzazione, con potenziali effetti nocivi (dinoflagellati tossici, riduzione dell'ossigeno, modifica della flora e della fauna bentonica, ecc.)



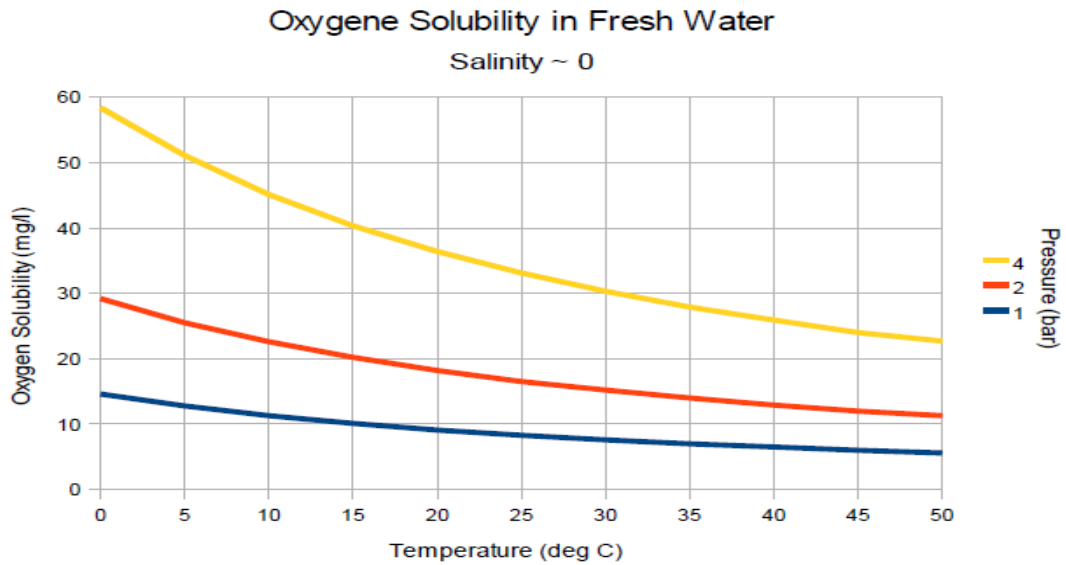
NB: Occorre tener conto delle interferenze di sostanze umide e in sospensione in prossimità degli estuari.

**Figura 5.1.** Immagine satellitare che mostra lo sviluppo di fitoplancton sulle coste europee

È stato generalmente riconosciuto che in molti ceppi la maggior tossicità delle fioriture è correlata a squilibri nella disponibilità di nutrienti (soprattutto il fosforo). In determinati condizioni di oscurità ed a temperature elevate queste fioriture possono morire, decomporsi e produrre acqua qualitativamente sgradevole, per esempio avente cattivo odore. Se l'acqua è usata come rifornimento idrico per utilizzi pubblici o privati, le alghe possono essere difficili da rimuovere e possono conferire un gusto discutibile all'acqua distribuita.

Le alghe, inoltre, hanno la tendenza ad assorbire e concentrare le sostanze nutrienti minerali nelle loro cellule. Quando muoiono, alla conclusione del periodo di crescita, si depositano sul fondo del lago o del corso d'acqua e da esse si liberano sostanze nutrienti minerali ed organiche che danno inizio ad un nuovo periodo di crescita.

In questo modo le alghe costituiscono una fonte di inquinamento secondario originato dai resti degli organismi morti che, decomponendosi, vanno incontro a processi putrefattivi e fermentativi favoriti dall'ambiente anaerobio che si viene a creare. Infatti, la prima fase della decomposizione avviene in ambiente aerobio, ma se è molto massiccia, l'ossigeno disciolto nell'acqua si consuma rapidamente determinando un ambiente anaerobio che favorisce i processi fermentativi e putrefattivi da cui si originano grandi quantità di sostanze nocive come ammoniaca, acido solforico e metano. Inoltre l'aumento della temperatura causato dal ristagno delle acque comporta una diminuzione della solubilità dell'ossigeno, che è inversamente proporzionale alla temperatura (figura 5.2) accentuando la creazione di un ambiente sempre più anaerobio. In tali condizioni si determina un grave danno all'intero ecosistema acquatico, con perdita della biodiversità e scomparsa di specie ittiche economicamente rilevanti.



**Figura 5.2.** Solubilità dell'ossigeno in acqua alle diverse temperature e pressioni

## 6. NORMATIVE ANTINQUINAMENTO

L'azoto inorganico originato dalle attività agricole ha raggiunto, a metà degli anni '80 in ambito europeo, un picco superiore ai 12 milioni di tonnellate/anno, per poi decrescere nel periodo successivo.

Il numero di animali allevati e le produzioni zootecniche hanno seguito lo stesso trend, contribuendo in modo rilevante ad aumentare il carico di azoto immesso nell'ambiente.

Le quote latte, introdotte nel 1984, hanno stabilizzato o contribuito a ridurre il numero dei capi bovini allevati, mentre il comparto suinicolo e avicolo hanno continuato ad aumentare.

La maggior parte degli allevamenti di vacche da latte, vitelloni, suini e avicunicoli è concentrata in aree caratterizzate da una maggiore intensità di produzione; le dimensioni medie degli allevamenti, inoltre, tendono costantemente ad aumentare.

Ad esempio, l'83% circa del latte vaccino italiano viene prodotto nelle 8 regioni settentrionali ed il 50,2% della produzione nazionale si concentra in 9 province.

Per quanto riguarda il suino pesante, che costituisce la quasi totalità dei suini allevati in Italia, gli 8,186,058 di capi allevati nel 2003 erano concentrati in quattro Regioni:

- Lombardia (52,4%)
- Emilia Romagna (17,5%)
- Piemonte (15,1%)
- Veneto (7,4%).

Una concentrazione produttiva simile si osserva anche nel settore avicolo dove circa l'80% della produzione di pollame è realizzata in 3 regioni (Emilia Romagna, Veneto e Lombardia).

Questo processo di accentramento è dovuto alla necessità di utilizzare tecnologie sempre più raffinate e, pertanto, onerose, per cui solo aumentando le dimensioni dell'allevamento si possono ottenere economie di scala; questo sistema però determina anche maggiori rischi di impatto ambientale puntiforme

Per questo motivo la Direttiva 2008/1/CE, che sostituisce la Direttiva 96/61/CE (detta direttiva IPPC, *Integrated Pollution Prevention and Control*) ed ha per oggetto la prevenzione e la riduzione dell'inquinamento proveniente dalle attività sia agricole che industriali, impone il rilascio di un'autorizzazione per tutte le attività che presentano un notevole potenziale inquinante.

Questa autorizzazione può essere concessa solo se vengono rispettate alcune condizioni ambientali, per far sì che le imprese stesse si facciano carico della prevenzione e della riduzione dell'inquinamento che possono causare. Allevamenti aventi un numero superiore ai 2.000 suini all'ingrasso, 750 suini in riproduzione o 40.000 posti pollame; devono richiedere l'autorizzazione.

Chi intenda dunque avviare un allevamento di tali dimensioni, che, peraltro, sono piuttosto ridotte se confrontati con i valori medi correnti, o, dal 2007, semplicemente continuare a mantenerlo, deve presentare una dettagliata descrizione di tutto il processo produttivo, mettendo in evidenza fra l'altro per ogni reparto :

- le fonti di emissioni inquinanti dall'impianto, quindi, ad esempio, il sistema di raccolta ed evacuazione dei liquami ed il sistema di ventilazione;
- il tipo e l'entità delle emissioni verso i tre recettori: aria (composti dell'azoto, metano, idrogeno solforato, polveri), acqua (Bod, composti dell'azoto e del fosforo) e suolo (metalli pesanti, fosforo, sodio);
- le tecniche previste per prevenire le emissioni dall'insediamento oppure, qualora ciò non fosse possibile, per ridurle.

Lo spirito di questa direttiva è pertanto quello di spingere gli allevatori a dimostrare una concreta volontà di ridurre l'impatto ambientale dell'allevamento mediante il ricorso alle Migliori Tecniche Disponibili (*Best Available Techniques*, B.A.T.).

## **6.1 NORMATIVA NITRATI**

In un ambito più ristretto relativo alla sola tutela delle acque, la direttiva 91/676/CE conosciuta come direttiva nitrati e recepita con D.Lgs. dell'11 maggio 1999 n° 152, riguarda specificatamente il rapporto tra zootecnia e ambiente.

Va sottolineato che la gran parte delle normative attualmente in vigore a livello comunitario, nazionale e regionale riguardano la prevenzione dell'inquinamento delle acque da nitrati e il destino dei reflui zootecnici.

Per limitare l'impatto ambientale e l'inquinamento da azoto di provenienza agricola delle falde acquifere, i principali tipi di azione promossi dalla direttiva nitrati sono i codici di buona pratica agricola (BAT) che riguardano:

- rotazione delle colture; mantenimento di una copertura vegetale durante il periodo invernale; colture intercalari al fine di limitare la lisciviazione durante il periodo delle piogge;
- uso di fertilizzanti ed effluenti di allevamento basato sull'equilibrio tra necessità delle colture, apporto di azoto e ammendamento del suolo, con frequenti analisi degli effluenti e del suolo; piani di concimazione obbligatori e restrizioni generali all'uso di concimi azotati minerali ed organici a seconda del tipo di coltura;
- appositi calendari di spandimento dell'azoto e sufficiente capacità di stoccaggio degli effluenti, da usare soltanto quando le colture hanno bisogno di nutrienti e buone pratiche di spandimento;
- effetto «tampon» delle fasce erbose non concimate e delle siepi lungo i corsi d'acqua ed i fossati;
- buona gestione e limitazione della coltivazione nei terreni in pendenza ripida e dell'irrigazione.

L'eccesso di azoto (differenza tra input e output per coltivazione o produzione di carne o latte) può essere un buon indicatore delle potenziali immissioni nell'ambiente da parte di un'azienda agricola locale o regionale.

La cosiddetta Direttiva Nitrati, norma anche la possibilità di utilizzare i reflui di allevamento a scopi agronomici, fissando la quantità massima di azoto utilizzabile a fine

di concimazione per ettaro e per anno. Essa è fissata in 170 kg di azoto nelle zone vulnerabili (ZV) e in 340 kg di azoto nelle zone non vulnerabili (ZNV).

Nell'art. 38 di tale decreto legislativo si prevede l'emanazione di un regolamento nel quale, fra l'altro, queste quantità di azoto siano trasformate in capi allevabili per ettaro e per anno, espressi come valore medio nazionale per le diverse specie e categorie di animali di interesse zootecnico.

Nel 2003, con la riforma Fischelr, la Politica Agricola Comune (PAC) ha introdotto una nuova formula di sostegno al reddito aziendale, totalmente disaccoppiato dalle produzioni, ma subordinato al rispetto delle norme e degli obiettivi in termini di ambiente, sicurezza alimentare, salute e benessere animale a livello delle aziende agricole.

Il decreto legislativo n°258 del 2000 e il successivo D.M. del 7 aprile 2006 ha per oggetto la definizione dei criteri e delle norme tecniche generali per la disciplina regionale dell'utilizzazione agronomica degli affluenti di allevamento; tale decreto conferma i limiti di azoto per le ZV e le ZNV in 170 e 340 kg N/ha all'anno e riporta i valori di azoto prodotto da animali di interesse zootecnico espressi sia in kg di N/capo per anno, che per kg di N/peso vivo medio (espresso in tonnellate).

I valori di azoto escreto riportati per le vacche in produzione (al netto di una quota fissa persa per volatilizzazione dell'azoto nelle prime fasi di gestione del refluo, quota che nel caso delle bovine da latte è stimata al 28% dell'azoto escreto dagli animali) ammontano a 138 kg per t di p.v., per cui nelle ZNV si possono allevare 2.5 t di p.v./ha, valore che scende a 1.2 t di p.v./ha nelle ZV, corrispondenti a 4 e 2 vacche adulte per ettaro. La quantità di azoto escreto viene calcolato tramite l'utilizzo di valori tabulari in funzione della specie, della categoria e, in qualche caso, del tipo di stabulazione (tabella 6.1).

**Tabella 6.1-** Azoto prodotto da animali di interesse zootecnico: valori al campo per anno al netto delle perdite per emissioni di ammoniaca; ripartizione dell'azoto tra liquame e letame. Fonte:[http://www.ambientediritto.it/Legislazione/INQUINAMENTO/2006/dm\\_7apr2006.htm](http://www.ambientediritto.it/Legislazione/INQUINAMENTO/2006/dm_7apr2006.htm)

Categoria animale e tipologia di stabulazione	Azoto al campo (al netto delle perdite)	
	kg/capo/anno	kg/t p.v./anno
<b>Suini: scrofe con suinetti fino a 30 kg p.v.</b>	26.4	101
<b>Suini: accrescimento/ingrasso</b>	9.8	110
<b>Vacche in produzione (latte) (peso vivo: 600kg/capo)</b>	83	138
<b>Rimonta vacche da latte (peso vivo: 300 kg/capo)</b>	36.0	120
<b>Bovini all'ingrasso (peso vivo: 400 kg/capo)</b>	33.6	84
<b>• vitelli a carne bianca su pavimento fessurato (peso vivo: 130 kg/capo)</b>	8.6	67
<b>• vitelli a carne bianca su lettiera (peso vivo: 130 kg/capo)</b>	8.6	67

In particolare alla specie bufalina, assimilabile a quella bovina, è assegnato un peso vivo medio di 4 t/ha pari ad una escrezione media di azoto per capo l'anno di 83 kg.

Attualmente la Deliberazione n. 583 del 2 agosto 2010 – DGR n. 120/07: "Recepimento del DM del 7 aprile 2006 ad oggetto Criteri e norme tecniche per la disciplina regionale dell'utilizzazione agronomica degli effluenti di allevamento. Integrazioni per l'allevamento bufalino" ha stabilito che la quantità di effluenti ed il relativo contenuto di azoto per la specie bufalina non sono equiparabili a quelli della specie bovina, così come invece riportato nell'Allegato I del DM del 7 aprile 2006.

Boccia et al. (2010) riportano in tabella 6.2 un valore di azoto escreto per capo bufalino/anno di 44.3 kg, tale valore considera, oltre la quantità di azoto ingerito e ritenuto



durante il periodo di lattazione (270 d) e di asciutta (circa 100 d), anche la fertilità media della mandria bufalina (circa 75%) e la rimonta pari a circa il 50% (gli animali in accrescimento hanno una escrezione media di 32 kg di N/anno). Tale valore si discosta notevolmente dagli 83 kg di azoto annui escreti dalla bovina da latte.

**Tabella 6.2.** Ingestione di SS e di PG (kg/anno), azoto ingerito, ritenuto ed escreto in bufale adulte e nella rimonta.

	<b>Bufala adulta</b>	<b>Rimonta</b>
	kg	kg
<b>Peso medio*</b>	670	300
<b>Ingestione sostanza secca**</b>	4410	2409
<b>Ingestione proteina grezza**</b>	576	289
<b>N ingerito</b>	92.2	46.3
<b>N ritenuto</b>	13.5	1.9
<b>Perdita di N per volatilizzazione (28%)</b>	22	12.4
<b>N escreto</b>	56.7	31.9

\* il peso medio è stato calcolato per la bufala adulta considerando il 20% di incidenza di primipare e per la rimonta l'incidenza delle varie fasi di accrescimento

\*\* calcolata in funzione delle razioni utilizzate nei diversi momenti fisiologici

## 7. SCOPO DELLA RICERCA E DISEGNO SPERIMENTALE

L'attività di ricerca svolta durante i tre anni del corso di dottorato rientra nel progetto finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (MiPAAF) "*Tecnologie alimentari per la riduzione dell'impatto ambientale da azoto negli allevamenti intensivi italiani* (Progetto RENAI)" il cui obiettivo è quello di ricercare nuove tecnologie alimentari che possano contribuire a diminuire l'inquinamento da azoto degli allevamenti intensivi.

La ricerca rappresenta il risultato della collaborazione tra due Enti: il *Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali* dell'Università degli Studi di Napoli *Federico II* e il *Centro Produzioni Carni e Miglioramento Genetico* (CRA-PCM) di Tor Mancina (ROMA), presso il quale sono state svolte le fasi operative della ricerca.

La ricerca si è articolata in due fasi.

Nel primo anno di attività è stata condotta un'indagine conoscitiva in 98 aziende bufaline del centro-sud Italia, in collaborazione con l'Associazione Italiana Allevatori (AIA).

Nel secondo e terzo anno di attività è stata condotta una prova sperimentale riguardante lo studio dell'impiego della metionina rumino-protetta (RPM) in diete a ridotto contenuto proteico per bufale in lattazione, esaminando gli effetti sulla produzione di latte, sul metabolismo dell'azoto e quantificando l'escrezione azotata.

## **8. INDAGINE CONOSCITIVA**

### **8.1 INTRODUZIONE**

La maggior parte degli allevamenti bufalini è concentrato in specifiche aree dell'Italia Centro-meridionale ad elevata intensità di produzione. Questo processo di accentramento è dovuto, in parte ad una consolidata tradizione di allevamento, e in parte alla necessità di utilizzare tecnologie sempre più impegnative dal punto di vista tecnico ed economico che possono attuarsi solamente in grandi aziende. L'intensivizzazione dell'allevamento bufalino ha determinato l'aumento dell'inquinamento ambientale verso i tre recettori naturali, cioè acqua, aria e suolo, dovuto all'azoto escreto con le deiezioni.

L'obiettivo della ricerca è stato quello di costruire un quadro di riferimento per l'allevamento bufalino al fine di:

- creazione di una banca dati relativa alle diete somministrate e alle produzioni di latte ottenute,
- messa a punto di piani alimentari formulati per ridurre la quantità di azoto escreto.

Con queste azioni ci si è proposti di migliorare la gestione degli allevamenti bufalini e dell'alimentazione nell'ottica di una maggiore sostenibilità ambientale.

La creazione della banca dati sopra citata è stata realizzata mediante un monitoraggio presso 98 allevamenti bufalini, siti in Lazio, Campania, Puglia, il cui latte è destinato alla produzione del prodotto D.O.P. "Mozzarella di Bufala Campana".

Le informazioni raccolte in 98 allevamenti bufalini (tabella 8.1), hanno riguardato un totale di 5.597 capi in lattazione, distribuiti su un totale di 2.359 ha, in aziende di varie dimensioni e con diversa numerosità delle mandrie. Per ciascuna azienda sono stati rilevati i seguenti parametri:

- dieta somministrata [quantità di sostanza secca (SS), protidi grezzi (PG) e unità foraggiere latte (UFL)];
- numero di capi in lattazione;
- superficie aziendale;
- quantità e qualità del latte prodotto;
- fase media di lattazione.

**Tabella 8.1.** Numero di aziende e capi in lattazione nelle Regioni in cui è stata effettuata l'indagine.

<b>Regione</b>	<b>N° di aziende</b>	<b>Capi tot.</b>
Campania	58	3028
Puglia	7	560
Lazio	33	2009

## 8.2 MATERIALE E METODI

Per ciascuna azienda è stato compilato un apposito modulo (fig. 8.1), dove veniva riportata:

- la quantità e il tipo di alimento impiegato nella razione,
- la superficie aziendale,
- la lunghezza media della lattazione
- la consistenza della mandria in lattazione,
- la produzione media giornaliera di latte,
- la percentuale di grasso nel latte,
- la percentuale di proteine nel latte.

La determinazione del contenuto proteico (%) ed energetico (UFL/kg di SS) delle razioni aziendali, è stata effettuata impiegando le tavole dei valori nutritivi degli alimenti di interesse zootecnico (Martilotti et al., 1996), mentre per i concentrati sono stati utilizzati i valori riportati sull'etichetta.

**Figura 8.1. Scheda di rilevamento**

Foraggi Somministrati								
%	Alimenti	Kg t.q.	ss	kg ss	UFL/kg ss	PG %	UFL/kg ss	PG %
%	TOT-->	Kg t.q.		Kg SS			UFL/Kg SS/d	PG %
							UFL/d	PG g/d

(2)

Commento	N° Capi in Lattaz.	Latte Kg/d	Latte Kg/capo/d	Tipo di Produz.	Latte Norm. Kg	Grasso nel Latte %	Proteine % Latte
	Ettari	Data-Provincia			Periodo lattazione		

Successivamente tutte le aziende sono state suddivise in 3 gruppi, in base alla fase di lattazione:

- fase iniziale ≤90 giorni,
- fase intermedia 91-180 giorni,
- fase finale ≥ 181giorni.

Si è poi determinata la differenza (Δ) fra le quantità di PG, UFL e SS della razione e quelle stimate sulla base della produzione di latte normalizzato bufalino (LNB) all'8.30% di grasso e al 4.73% di proteine, calcolato secondo la seguente formula messa a punto da Di Palo, (1992):

$$LNB = \{ \{ [(g/Kg \text{ di Grasso} - 83) + (g/Kg \text{ di Proteine} - 47,3)] \times 0,00687 \} + 1 \} \times \text{kg Latte}$$

### 8.2.1 STIMA DEI FABBISOGNI NUTRIZIONALI IN BASE AL LBN PRODOTTO

L'ingestione di sostanza secca (SSI) è stata stimata in funzione della quantità di LNB, impiegando la seguente formula (CMBC 2002):

$$\text{SSI (kg/d)} = 11.052 + 0.5012 * \text{Kg di LNB}; (R^2=0.99).$$

I fabbisogni di PG e UFL giornalieri sono stati calcolati secondo le equazioni elaborate da Bartocci et al. (2002):

$$\text{UFL/d} = 7.16 + 0.66 * \text{Kg di LNB}; (R^2=0.80);$$

$$\text{PG (g/d)} = 314.72 + 187.35 * \text{Kg di LNB}; (R^2=0.87);$$

Le differenze ( $\Delta$ PG, g/d e UFL/d) tra la quantità di protidi grezzi ed energia netta realmente forniti all'animale e quelli stimati in base alla produzione di latte, forniscono una indicazione del bilanciamento proteico ed energetico delle diete somministrate.

In questa maniera è possibile stabilire valori-soglia della quantità di protidi grezzi (espressi come gr/capo/d) della dieta. Al di sotto di questi valori soglia si può avere diminuzione sia quantitativa che qualitativa (espressa quest'ultima come valore percentuale di proteine e grassi nel latte) delle produzioni, mentre al di sopra si ha un aumento delle escrezioni azotate, oltre a tutta una serie di effetti negativi sulla salute degli animali e sui risultati economici dell'azienda.

I risultati ottenuti dai calcoli effettuati hanno consentito di distinguere le diete, in base al  $\Delta$ PG della razione, in:

- ipoproteica,  $\Delta PG$  compreso tra -961 -101g/d; (Dieta I)
- bilanciata,  $\Delta PG$  compreso tra -100 + 100 g/d; (Dieta II)
- iperproteica,  $\Delta PG$  compreso tra +101 + 2292g/d; (Dieta III)

### 8.2.2 MODELLI STATISTICI

I dati riguardanti le produzioni quanti/qualitative del latte, i valori nutrizionali delle diete aziendali e quelli stimati sono stati elaborati statisticamente mediante la procedura GLM (SAS, 1989) applicando un modello monofattoriale.

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Dove:

$\mu$  = media generale;

$\alpha_i$  = fase di lattazione ( $i = 1,2,3$ );

$\varepsilon_{ij}$  = errore.

Al fine di valutare l'interazione Fase di lattazione x Dieta è stato utilizzato un modello bifattoriale con interazione mediante procedura GLM:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  = osservazioni del K<sup>esimo</sup> controllo della J<sup>esima</sup> dieta e dell'I<sup>esimo</sup> periodo di lattazione;

$\mu$  = media generale;

$\alpha_i$  = periodo di lattazione ( $i = <90, 91-180, >181$ ; giorni);

$\beta_j$  = Diete ( $j =$  Dieta I, Dieta II, Dieta III;  $\Delta PG$ );

$(\alpha\beta)_{ij}$  = interazione periodo di lattazione x modello

$e_{ijk}$  = errore residuo;

Per tutte le analisi statistiche le differenze sono state considerate significative per un valore di  $P \leq 0.05$ .



### 8. 3. RISULTATI E DISCUSSIONI

Il coefficiente di densità aziendale rilevato (n°ca pi/ha), pari a 2.4 capi/ha, presenta un valore compatibile coi limiti previsti dalla normativa nitrati, D.lg. n°258 del 2000, che riporta un carico bestiame (per i bovini, con un peso medio di 650 Kg) di 4 capi/ha nelle ZNV.

Le aziende suddivise nelle tre diverse classi in funzione della fase di lattazione (tabella 8.2) hanno fatto registrare differenze statisticamente significative relativamente alla produzione media giornaliera di latte ( $P < 0.001$ ) e di LNB ( $P < 0.001$ ) che si è ridotta con il progredire della lattazione.

Le proteine del latte non hanno mostrato differenze significative nei 3 diversi periodi, mentre per il contenuto di grasso si sono rilevate differenze significative ( $P < 0.05$ ) tra il primo e gli ultimi due periodi, con questi ultimi non significativamente diversi tra loro.

L'andamento del contenuto in grasso del latte è aumentato al progredire della lattazione, in misura proporzionale all'abbassamento della produzione (Bartocci et al., 2002; Catillo et al., 2002). Il minor tenore in grasso nel primo periodo di lattazione è probabilmente dovuto al deficit energetico fisiologico tipico della fase iniziale della lattazione o all'effetto diluizione.

La produzione media di latte durante l'intera lattazione (270 d) è stata di 2,106 kg, valore in linea con quelli riportati dall' Associazione Nazionale Allevatori Specie Bufalina (ANASB, 2010), lo stesso dicasi per i valori percentuali relativi a grasso e proteina rispettivamente del 8.47 e 4.59% (ANASB, 2010).

**Tabella 8.2.** Produzioni quanti/qualitative del latte, rilevate durante i diversi periodi di lattazione e dell'intera lattazione. Le significatività vengono riportate per colonne (P= a<0.001; A<0.05).

<b>Periodo Lattazione (d)</b>	<b>N° capi</b>	<b>Produzione Latte (kg/d)</b>	<b>Proteine Latte (g/kg)</b>	<b>Grasso Latte (g/kg)</b>	<b>LNB (kg/d)</b>
<b>&lt;90</b>	953	9.68 <sup>a</sup> ± 1.81	45.15 ± 1.94	79.71 <sup>A</sup> ± 5.89	9.32 <sup>a</sup> ± 1.77
<b>91-180</b>	4051	7.81 <sup>b</sup> ± 1.61	45.52 ± 3.55	83.10 <sup>B</sup> ± 4.76	7.72 <sup>b</sup> ± 1.71
<b>&gt;181</b>	593	5.88 <sup>c</sup> ± 2.23	46.19 ± 2.78	85.69 <sup>B</sup> ± 8.53	5.88 <sup>c</sup> ± 2.11
<b>intera lattazione</b>	5597	7.80	45.56	82.99	7.96
<b>RMSE</b>		1.73	3.30	5.52	1.78

Dall'analisi della composizione delle diete somministrate (tabella 8.3), è emerso che non ci sono differenze significative per quanto riguarda l'apporto di SS, UFL e PG capo al giorno, nei diversi periodi di lattazione; questi dati indicano che gli animali ricevevano la stessa dieta durante l'intera lattazione.

Come si vede invece dall'analisi dei fabbisogni stimati in base alla produzione di latte normalizzato, questi avrebbero dovuto decrescere con il progredire della lattazione; a conferma di ciò tutti i valori di SS, PG e UFL nei tre periodi di lattazione sono differenti tra loro (P<0.01).

I valori medi stimati per l'intera lattazione hanno messo in evidenza differenze significative (P<0.01) tra le quantità di SS, UFL e PG apportate con la razione aziendale e quelle stimate; questi eccessi si riflettono negativamente oltre che sul management aziendale, con l'aumento dei costi di produzione, anche sull'impatto ambientale.

**Tabella 8.3.** Composizione delle diete somministrate e fabbisogni stimati in base alla produzione, le differenze significative sono riportate per colonna ( $P = a < 0.01$ ); mentre per riga per l'intera lattazione.

Fase di lattazione (d)	Composizione della dieta			Fabbisogni stimati		
	SS (Kg/d)	UFL/d	PG (g/d)	SSI (Kg/d)	UFL/d	PG (g/d)
<90	16.42±3.03	14.53±3.05	2467.91±877.3	15.71 <sup>a</sup> ±0.82	13.61 <sup>a</sup> ±1.28	2359.37 <sup>a</sup> ±214.68
91-180	16.10±2.21	13.98±2.52	2227.95±439.05	14.95 <sup>b</sup> ±0.82	12.54 <sup>b</sup> ±1.31	2186.15 <sup>b</sup> ±230.4
>181	16.03±3.23	13.33±3.04	2301.81±834.23	13.99 <sup>c</sup> ±1.07	11.46 <sup>c</sup> ±1.77	1998.24 <sup>c</sup> ±296.98
intera lattazione	16.13 <sup>a</sup>	13.90 <sup>a</sup>	2270.24 <sup>a</sup>	14.93 <sup>b</sup>	12.53 <sup>b</sup>	2182.35 <sup>b</sup>
RMSE	2.48	2.66	573.76	0.85	1.39	240.40

Le differenze ( $\Delta$ ) tra i valori di PG (g/d) apportati con la razione e quelli stimati (tabella 8.4) e successivamente mediati, evidenziano soprattutto nella fase finale della lattazione (>181 d) un eccesso di protidi grezzi nella razione pari a +303.57 g/d per capo; come mostrato in figura 8.2 la percentuale più alta di aziende (61.53%), somministrava diete iperproteiche nell'ultima fase di lattazione. Il 40.27% delle aziende ha somministrato una razione bilanciata nella fase intermedia di lattazione (91-180 d) con un valore medio di  $\Delta$ PG pari a 41.45 g/d/capo.

Altro dato interessante è il coefficiente di trasformazione (*dairy efficiency*) di LNB per kg di SS, che diminuisce con l'avanzamento della lattazione, così come il coefficiente di conversione tra azoto del latte e quello alimentare.

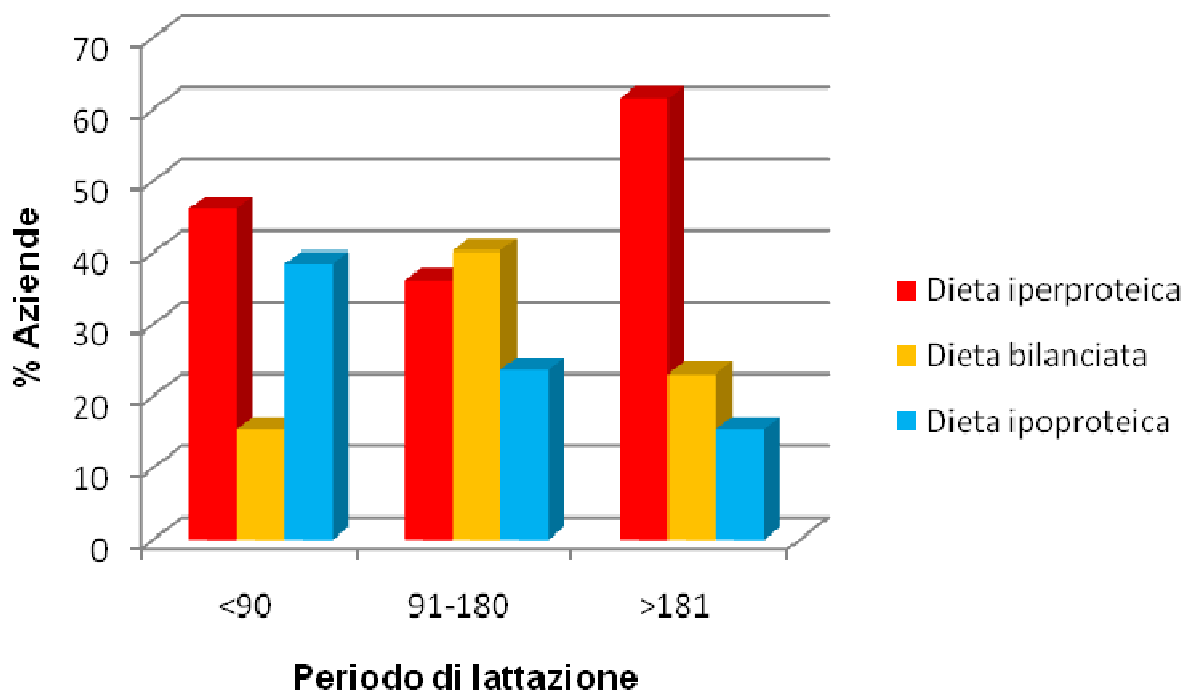
**Tabella 8.4.** Valori di  $\Delta$ PG, e parametri per la produzione del latte in base al periodo di lattazione, ( $P < 0.01$ )

Periodo di lattazione (d)	$\Delta$ PG (g/d)	Coeff.di conversione (%) (N latte / N alimento)	LNB/SS
<90	108.35	18.99 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>
91-180	41.45	15.86 <sup>b</sup>	0.48 <sup>b</sup>
>181	303.57	11.96 <sup>c</sup>	0.37 <sup>c</sup>

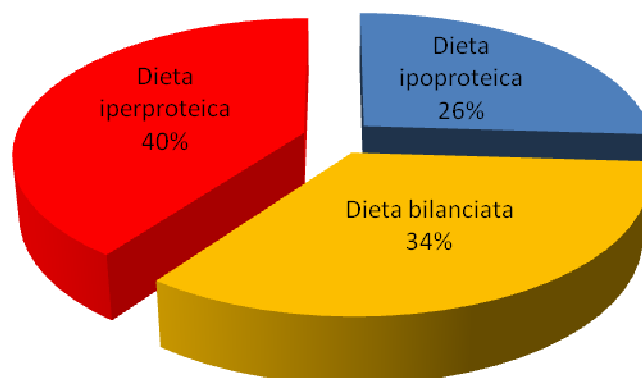
La creazione di questo database ha consentito di stimare l'apporto proteico in tutte le aziende, e classificarle in base al loro  $\Delta$ PG, scegliendo come range di variazioni  $\pm 100$  g PG/d.

Su 98 aziende monitorate (figura 8.3):

- il 34% somministrava una razione proteica bilanciata con un  $\Delta$ PG medio di  $49.93 \pm 20.47$  g/d,
- il 26% somministrava una razione ipoproteica con un  $\Delta$ PG medio di  $-439.21 \pm 161.04$  g/d,
- il 40% delle aziende somministrava una razione di proteine eccedente di  $470.55 \pm 368.78$  g/d rispetto al fabbisogno.



**Figura.8.2.** Ripartizione degli allevamenti in base alla quantità di proteine somministrate nelle 3 fasi della lattazione.



**Figura 8.3.** Ripartizione delle aziende in base al  $\Delta$ PG

Calcolando le interazioni Fase di lattazione x Dieta con il modello bifattoriale prima descritto (tabella 8.5) sono stati stimati i dati relativi alla produzione di latte, proteine, e i valori medi di  $\Delta$ PG all'interno di ciascuna dieta, per le tre fasi di lattazione.

Da questi dati è emerso che tutte le aziende hanno ottenuto produzioni di latte più elevate impiegando una razione bilanciata dal punto di vista proteico (dieta II), anche se le differenze sono significative solamente nel periodo intermedio ( $P < 0.05$ ) con una produzione di 8.15 kg/d rispetto alla media per quel periodo di 7.81 kg/d.

Il contenuto in proteine del latte non è variato in base al  $\Delta$ PG, poiché, come è noto dalla letteratura (Bertoni et al., 1991), la maggior parte dell'azoto che arriva nell'intestino è di origine batterica, quindi prevalentemente dipendente dall'ingestione della sostanza organica fermentescibile; inoltre il bufalo è caratterizzato da un migliore riciclo dell'azoto (Puppo et al., 2002) e da una più alta capacità di sintesi microbica in diete a ridotto contenuto proteico (Kewalramani and Gupta 1987).

Per quanto riguarda l'apporto proteico nella prima fase di lattazione i valori medi di  $\Delta$ PG, variavano notevolmente soprattutto nella dieta I e II.

Nel primo periodo di lattazione (<90 d) le aziende che rientravano nella dieta I (ipoproteica) somministravano razioni con un deficit medio di proteine grezze pari a -658.64 g/capo/giorno, mentre per le aziende che rientravano nella dieta III (razione iperproteica) il surplus di proteine era di +818.04 g capo/giorno.

**Tabella 8.5.** Produzione di latte, contenuto in proteine e media dei  $\Delta$ PG in base al periodo di lattazione

Periodo di lattazione (d)	Latte (kg/d)			Proteine latte (g/kg)			$\Delta$ PG (g/d)		
	Dieta I	Dieta II	Dieta III	Dieta I	Dieta II	Dieta III	Dieta I	Dieta II	Dieta III
<90	9.31	9.95	9.53	44.66	44.5	45.66	-658.64	-54.02	818.04
91-180	7.1 <sup>B</sup>	8.15 <sup>A</sup>	7.91 <sup>AB</sup>	44.92	45.39	46.1	-391.07	4.76	343.12
>181	5.24	6.98	5.62	46.35	46.4	46.08	-302.21	11.03	564.73
RMSE		1.74			3.38			310.97	

## 8.4 CONCLUSIONI

L'esame degli apporti proteici nelle 3 fasi della lattazione presi in esame ha messo in luce che la somministrazione di proteine in eccesso rispetto ai fabbisogni è particolarmente diffusa nell'ultima fase della lattazione (61% degli allevamenti monitorati) con una media di protidi grezzi apportati con la razione ( $\Delta$ PG) pari a +303.57 g/d/capo.

La tendenza osservata è quella di somministrare la stessa quantità di proteine e sostanza secca (tabella 8.3) in tutte le fasi della lattazione, senza adattarle ai fabbisogni delle diverse fasi produttive.

I maggiori errori in termini di eccesso e carenza di protidi grezzi apportati con la razione, si sono comunque evidenziati nelle aziende in cui la maggior parte delle bufale si trovava nella fase iniziale della lattazione (<90 d), con oscillazioni di  $\Delta$ PG da +818.04 a -658.64 g capo/giorno.

Inoltre, le proteine somministrate in eccesso rispetto alle esigenze degli animali non si traducono in una maggiore produzione di latte, che risulta più alta negli allevamenti che forniscono una quantità di proteine bilanciata rispetto ai fabbisogni (tabella 8.5).

Il 40% degli allevamenti monitorati apportava una razione iperproteica con un  $\Delta$ PG di  $470.55 \pm 368.78$  g/proteine/capo al giorno, rispetto al reale fabbisogno.

La quota in eccesso di sostanze azotate viene escreta con le deiezioni e aggrava l'impatto ambientale degli allevamenti, con un effetto tanto più marcato quanto più è elevato il carico di bestiame aziendale (capi/ha). Ai fini della riduzione delle emissioni azotate negli allevamenti bufalini è pertanto indispensabile la conoscenza il più possibile accurata dei fabbisogni di azoto nei diversi periodi della lattazione.

Il passaggio successivo è la messa a punto di tecnologie alimentari per la riduzione della somministrazione di proteine, mediante ottimizzazione dell'utilizzazione dell'azoto alimentare e una migliore conoscenza delle escrezioni azotate nella bufala in lattazione.



## **9. IMPIEGO DI METIONINA RUMINO PROTETTA NELLA DIETA DI BUFALE IN LATTAZIONE**

### **9.1 INTRODUZIONE**

Nell'area mediterranea l'allevamento della bufala da latte ha assunto negli ultimi decenni un carattere sempre più marcatamente intensivo, in risposta alla crescente richiesta di latte destinato alla produzione di mozzarella.

Di conseguenza, il problema delle emissioni azotate derivanti dagli allevamenti bufalini, che era considerato in passato di scarsa rilevanza, sta acquistando un crescente rilievo con la diffusione di allevamenti di grandi dimensioni, con alta densità di capi e tecniche di alimentazione simili a quelli delle bovine da latte.

Nelle bovine da latte, uno dei sistemi più studiati per la riduzione delle emissioni azotate è quello della riduzione della quantità di proteine grezze nella dieta e nella sua integrazione con amminoacidi rumino-protetti in misura tale da soddisfare i fabbisogni proteici e fornire adeguate quantità di amminoacidi essenziali.

Dalle ricerche effettuate negli ultimi anni è emerso che la metionina è il principale amminoacido limitante nelle bovine in lattazione alimentate con foraggi di leguminose, insilato, granella di mais e farina di soia (Pisulewski et al., 1996, NRC, 2001) e che l'integrazione di queste diete con metionina rumino-protetta influenza positivamente la produzione e la qualità del latte.

In particolare Samuelson et al. (2001) e Lara et al. (2006) riportano un incremento della produzione di latte in risposta alla somministrazione di metionina rumino-protetta; Chilliard and Doreau (1997), Kowalski et al. (2003), Leonardi et al. (2003), Berthiaume et al. (2006) hanno riscontrato un aumento della percentuale di proteine nel latte, e Armentano et al. (1997), Samuelson et al. (2001), Lara et al. (2006), un aumento della resa in proteina.

Altri Autori hanno riscontrato un aumento della percentuale di grasso nel latte (Overton et al., 1998; Samuelson et al., 2001) o della resa in grasso del latte (Schmit et al., 1999; Krober et al., 2000).

Tuttavia Krober et al. (2001), Younge et al. (2001) e Davidson et al. (2008) non hanno riscontrato aumenti nella produzione di latte per effetto della integrazione delle diete con metionina rumino protetta: Benefield et al., (2009) hanno evidenziato una diminuzione della resa in proteine; Chilliard and Doreau (1997) e Socha et al. (2005) una diminuzione della resa in grasso.

Broderick et al. (2008) hanno somministrato diete a differente contenuto in proteine e integrate con quantità variabili di metionina rumino-protetta, per verificare la possibilità di ridurre l'apporto proteico della dieta e l'escrezione di azoto urinario senza influenzare negativamente la produzione e la qualità del latte. Questa ricerca ha evidenziato, per alcuni rapporti tra proteina grezza ingerita e metionina rumino-protetta, un aumento della produzione di latte e dell'utilizzazione dell'azoto, ma scarsa o nessuna influenza sulla resa in proteina, sul lattosio e sul residuo magro (SNF): Per le diete a un più ridotto contenuto proteico con una più elevata integrazione in metionina rumino-protetta ha rilevato una diminuzione dell'azoto urinario proporzionale alla riduzione della proteina grezza nella razione e una migliore efficienza azotata, ma una minore produzione di latte dovuta al fatto che le bovine stavano apparentemente mobilizzando le proteine corporee.

I risultati ottenuti per le bovine da latte non possono però essere automaticamente estesi alle bufale a causa delle notevoli differenze che esistono tra le due specie sia a livello di anatomia e fisiologia dell'apparato digerente, sia come capacità di ingestione e digestione degli alimenti, popolazione microbica ruminale, presenza di protozoi, metabolismo ruminale, etc. (Bartocci et al., 1997; Terramocchia et al., 2000; Puppo et al., 2002; Calabrò et al., 2008).

Le ricerche sulla nutrizione del bufalo sono più scarse rispetto a quelle sui bovini a causa della minore consistenza numerica della specie bufalina, della loro presenza limitata ad alcune aree geografiche del pianeta e della tipologia di allevamento prevalentemente estensiva, basata sul pascolo e/o sulla somministrazione di alimenti poveri, con basso contenuto di energia e proteine. Negli allevamenti intensivi, caratterizzati dalla presenza di un grande numero di capi in ambienti confinati, l'esigenza di ottimizzare la produzione di latte sia dal punto di vista quantitativo, sia da quello del contenuto in proteine e grassi e della resa in mozzarella ha determinato l'adozione di diete con livelli proteici ed energetici simili a quelli delle bovine da latte (Bartocci et al., 2002).

Queste diete potrebbero però non considerare adeguatamente la nota capacità del bufalo di utilizzare, meglio di altri ruminanti, alimenti poveri di energia e proteine e potrebbero fornire un eccesso di nutrienti superflui ai fini produttivi e dannosi per il loro potere inquinante.

A questo proposito, una ricerca condotta su un consistente numero di allevamenti bufalini italiani per monitorare i livelli proteici ed energetici delle diete somministrate ha evidenziato in un gran numero di allevamenti un eccesso di proteine cui non faceva riscontro un miglioramento né della quantità di latte prodotto né del contenuto in proteine e grasso (Pace et al., 2010).

Altri Autori, confrontando due diete con contenuto energetico carente ed eccessivo, hanno confermato che i bufali sono gli unici ruminanti capaci di adattare i loro fabbisogni energetici e di mantenere costante il peso vivo e la capacità riproduttiva anche ricevendo una alimentazione teoricamente insufficiente alle loro esigenze (Campanile et al., 2010).

Alla luce di queste considerazioni, con il presente lavoro si è voluto verificare l'effetto di una moderata riduzione del contenuto in proteina grezza di una dieta somministrata a bufale in lattazione e integrata con metionina rumino-protetta, su:

- produzione e qualità del latte,
- condizioni metaboliche degli animali
- quantità e distribuzione delle escrezioni azotate.

## 9.2. MATERIALE E METODI

### 9.2.1 ANIMALI

Lo studio è stato condotto su 16 bufale pluripare di razza *Mediterranea Italiana* divisi in due gruppi (gruppo RPM e gruppo controllo) di 8 animali omogenei per i seguenti parametri: giorni di lattazione (day in milk, DIM) ( $76.62 \pm 22.85$  e  $75.50 \pm 18.52$ , rispettivamente per i due gruppi sperimentali), numero di lattazioni (3.12 e 3.12), produzione giornaliera di latte nella lattazione precedente ( $6.25 \pm 0.84$  e  $6.98 \pm 2.00$  kg/d), produzione media giornaliera di latte normalizzato bufalino (LNB) nella lattazione precedente ( $6.68 \pm 0.63$  e  $7.27 \pm 2.07$  kg/d), peso vivo all'inizio della prova ( $695.84 \pm 53.12$  e  $706.41 \pm 94.49$  kg) e stato d'ingrassamento degli animali (body condition score, BCS) ( $5.85 \pm 0.17$  e  $5.82 \pm 0.24$ ), determinato utilizzando la scala elaborata da Wagner et al. (1988) e modificata per la specie bufalina da Campanile et al. (1998).

La durata della prova è stata di 120 giorni.

Entrambi i gruppi venivano munti due volte al giorno alle 06:30 e 18:00 in una sala di mungitura a spina di pesce (8+8). La mungitura è stata effettuata a un livello di vuoto di 44 kPa, un tasso di pulsazione di 60 cicli/min e un rapporto di pulsazione di 60:40; i parametri di mungitura sono stati mantenuti costanti durante il periodo di studio.

I rilievi sperimentali sono stati effettuati ogni 14 giorni. Ogni bufala era oggetto di rilievo e registrazione individuale della produzione con raccolta di campioni di latte, sangue, feci e urine.

### 9.2.2 DIETE

Entrambi i gruppi sono stati alimentati utilizzando la tecnica unifeed; quotidianamente sono stati calcolati i residui della razione non consumanti dagli animali.

I due trattamenti alimentari differivano per l'apporto proteico (14.24 vs 15.61%, rispettivamente per il gruppo RPM e Controllo), ma presentavano un egual apporto energetico (0.90 UFL/kg di DM); il gruppo RPM riceveva, inoltre, 12 g di metionina rumino-protetta (con un contenuto minimo dell'85% di DL-metionina sulla sostanza secca) miscelata a farina di mais e somministrata singolarmente agli animali.

La razione di controllo è stata formulata per sostenere una produzione ideale di circa 11 kg di LBN, produzione registrata durante i primi 150 giorni della lattazione precedente ( $10.46 \pm 1.675$  e  $10.21 \pm 1.519$  kg/d rispettivamente gruppo RPM e controllo).

Gli alimenti costituenti la razione sono riportati in tabella 9.1, la razione aveva un rapporto foraggio/concentrato pari al 70% di foraggio, 28% di concentrato e un 2% di integratore minerale/vitaminico.

**Tabella 9.1.** Percentuali degli alimenti impiegati nella razione

<b>Costituenti della razione (%)</b>	<b>Gruppo RPM</b>	<b>Gruppo Controllo</b>
Insilato di mais	44.00	44.00
Fieno di medica 2° taglio	26.00	26.00
Farina di soia	9.50	13.00
Farina di mais	18.50	15.00
Vitamin/mineral mix	2.00	2.00

### 9.2.3 CAMPIONAMENTO E ANALISI

L'analisi dei **foraggi** (tabella 9.2) è stata effettuata su campioni essiccati per circa 48h in stufa a ventilazione forzata a 65°C, fino a peso costante e successivamente macinati su griglia da 1mm.

I campioni così trattati sono stati analizzati per la determinazione delle ceneri (Ash) e della sostanza organica (OM), della fibra grezza (FG), dei protidi grezzi (PG), e dell'estratto etero secondo la metodica AOAC (1980). La quantità di azoto organico, è stata determinata con il metodo Kjeldahl, secondo la metodica dell'Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) n° 984.13 (A-D), 2006. Tale metodo prevede la mineralizzazione completa dell'azoto organico in solfato di ammonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) mediante trattamento a caldo (~600°C) con acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrato del campione.

Successivamente si procede alla distillazione dell'azoto ammoniacale (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) con raccolta in acido solforico 0.05 M previa neutralizzazione con idrossido di sodio (NaOH).

La titolazione avviene impiegando una soluzione di idrossido di sodio 0.1M e un indicatore che vira da rosa a incolore quando si raggiunge pH 7; ciascun mL di acido solforico consumato nella titolazione corrisponde a 0.0014 g di azoto.

Con il metodo Kjeldhal viene determinato tutto l'azoto sotto forma amminica (proteine, aminoacidi, urea), iminica (basi puriniche, citosina), amidica (nicotinamide) e ammoniacale (ammoniaca e sali d'ammonio). Per il calcolo del contenuto proteico, a partire dal contenuto di azoto, si è partiti da due premesse:

1. che tutto l'azoto presente nell'alimento sia sottoforma proteica,
2. che tutte le proteine alimentari contengano 160 g di N/kg, (16% di N/100g di pg)

il contenuto azotato dell'alimento è espresso in termini di proteine grezze (PG), così calcolate:

$$PG \text{ (g/kg)} = \text{g N/kg} * 6.25$$

Questo calcolo comunque non è esatto poiché le proteine alimentari hanno diversi contenuti di azoto e perciò si dovrebbero usare coefficienti diversi per trasformare il tenore azotato dei singoli alimenti in tenore proteico (Jones 1931). L'uso del fattore medio di conversione 6.25 per tutte le proteine alimentari, è in pratica giustificato dal fatto che i fabbisogni proteici degli animali in produzione zootecnica, espressi in termini di  $N \times 6.25$ , sono di fatto fabbisogni di azoto e non proteine come tali.

I costituenti della parete cellulare NDF, ADF e lignina (ADL) sono stati determinati secondo il metodo proposto da Van Soest et al. (1991), mentre la cellulosa, l'emicellulosa e i carboidrati non strutturali (CNS) sono stati ricavati per differenza.

Le UFL dei singoli alimenti sono stati ottenuti applicando l'equazione di Andrieu e Demarquilly (INRA, 1987).

**Tabella 9.2.** Sostanza secca (g/kg) e composizione chimica (g/kg DM) degli alimenti impiegati nella prova

	DM <sup>1</sup>	PG	FG	EE	NSC	Ash	NDF	ADF	ADL	UFL
<b>Alimento:</b>										
Insilato di mais	314.9	75.9	225.7	20.3	313.4	64.2	526.2	305.2	37.3	0.85
Fieno di medica 2° taglio	871.9	173.0	317.5	11.7	255.1	86.9	473.3	388.8	90.0	0.67
Farina di soia	896.5	479.9	63.7	4.4	277.7	70.7	167.3	90.4	24.8	1.15
Farina di mais	880.3	88.2	30.4	30.7	743.4	14.9	122.8	39	16.4	1.24
Vitamin/mineral mix <sup>2</sup>	962.0	105.8	68.2	72.5	137.4	462.5	221.8	100.7	42	0.64
<b>Diete:</b>										
RPM	632.5	142.4	194.9	19.5	370.9	69.6	397.6	253.2	46.0	0.90
Controllo	633.1	156.1	196.1	18.6	354.6	71.5	399.2	255	46.3	0.90

<sup>1</sup>DM=sostanza secca; PG= proteine grezze; FG=fibra grezza; EE=estratto etero; NSC=carboidrati non strutturati=[1000-(Ash+PG+EE+NDF)]; NDF=neutral-detergent fibre; ADF=acid-detergent fibre; ADL=acid-detergent lignin; UFL=unità foraggere latte.

<sup>2</sup>Vitamin/mineral mix contiene per Kg di SS: vit.A 500000 UI, vit.D 50000 UI, vit.E 600mg, vit.PP 3000mg, Ca 38%, Fe 1600mg, Cu 300mg, Zn 3000mg, Mn 1500mg, I 7.00mg, Co 5.00mg, Se 6.00mg.

I rilievi relativi alla produzione di **latte** sono stati effettuati su singolo animale durante la mungitura della mattina e della sera. I campioni venivano raccolti in contenitori di PE da 250ml a cui era stato aggiunto precedentemente un antimicrobico Bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol) al 20%, al dosaggio di 1µl/ml di latte e conservati a -20°C fino al momento delle analisi.



Sui campioni di latte individuali è stato determinato:

- il contenuto di azoto organico con il metodo Kjeldahl e successivamente calcolato quello proteico ( $N \cdot 6.38$ ),
- il contenuto di grasso impiegando butirrometri con scala per il grasso fino al 14% (metodo butirrometrico di Gerber, Pearson 1976);
- l'attitudine alla coagulazione, mediante lattodinamografo (Maspres, Italia), considerando i seguenti parametri: tempo di coagulazione (r), tempo di rassodamento del coagulo ( $K_{20}$ ) e consistenza del coagulo (A30);
- pH, lattosio (ISO 26.462-2.010), urea nel latte (MU) (ISO 14637:2004) e la caseina (ISO 17997-2:2004) sono stati determinati mediante spettrofotometria ad infrarossi (MilkoScan FT 6000; Foss Electric, Hillerød, Danimarca). Per la determinazione dell'urea (MU), il latte è stato centrifugato a 3000g per 15', e separato dal grasso, prelevata un'aliquota di 5 ml a cui sono stati aggiunti 5 ml di acido tricloroacetico (TCA) al 25%, e centrifugato per 5' a 2500g, recuperato il surnatante è stato filtrato su filtro da siringa (Millex®-SR, Fluoropore™ PTFE, 25mm diam., 0.5 µm pore size) e conservato a -20°C fino al momento dell'analisi.

I campioni di **feci** sono stati raccolti approssimativamente 2 ore prima della somministrazione della razione e messi in contenitori di alluminio, successivamente alloggiati in essiccatore a 65°C a ventilazione forzata, fin quando non raggiungevano un peso costante e macinati su griglia da 1mm.

Le feci sono state analizzate per la determinazione dell'azoto totale (AOAC, 1980) e delle ceneri acido insolubili (CAI) all'HCl secondo il metodo (Van Keulen and Young, 1977).

La digeribilità apparente dell'azoto è stata stimata utilizzando come marker interno le CAI (Elliot et al., 1981) applicando la seguente formula:

$$100-[100*(\% \text{ CAI alimento} / \% \text{ CAI feci}) * (\% \text{ N nelle feci} / \% \text{ N alimento})] .$$

La quantità di azoto escreto giornalmente dalle feci è stato calcolato impiegando il modello di equazione suggerito da (Kohn et al., 2005),:

$$\text{N-fecale (g/d)} = \text{N ingerito} - (\text{N urinario} + \text{N latte} + \text{N ritenuto})$$

mentre la quantità di sostanza secca di feci (kg DM) escrete giornalmente è stata ottenuta utilizzando la formula:

$$\text{N-fecale (g/d)} * \text{N-fecale}(\%)$$

I campioni di **urina** sono stati raccolti in sala mungitura e aliquote di 15ml sono state immediatamente trasferite in recipienti contenenti 60ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.072N e stoccati a -20°C fino al momento delle analisi; dopo lo scongelamento a temperatura ambiente i campioni sono stati diluiti in H<sub>2</sub>O in rapporto 1:5 e analizzati tramite ILAB (Model ILAB 650 Clinical, Chemistry System) per la determinazione della creatinina, mediante colorimetria con acido picrico (Test<sup>TM</sup> Creatinine; Oser,1965) e dell'azoto ureico con il metodo ureasi/GLDH (Test<sup>TM</sup> Urea Nitrogen; Sampson, 1980), mentre l'azoto totale è stato determinato secondo il metodo Kjeldahl (AOAC, 1980).

Il volume di urine giornaliero, da cui è stata calcolata l'escrezione totale di azoto e di urea, è stato stimato partendo dalla concentrazione urinaria di creatinina che nella bovina è pari a 29 mg/kg di peso corporeo (Valadares et al., 1999; Broderick et al., 2008).

Il **sangue** veniva prelevato prima della somministrazione della razione, dalla vena mammaria tramite 'vacutainer' da 10ml contenenti Li-eparina e conservato a 4°C fino all'arrivo in laboratorio, dove veniva centrifugato a 3000 g x 15'.

Il plasma successivamente veniva pipettato in eppendorf da 2 ml e stoccato a -20°C; una volta scongelato a temperatura ambiente, il plasma veniva analizzato tramite

ILAB650; per la determinazione dell' N-ureico (BU) è stato impiegato il Test<sup>TM</sup> Urea Nitrogen, mentre per la determinazione dell'insulina ematica è stato utilizzato un kit ELISA (Mercodia Bovine Insulin).

#### 9.2.4 ELABORAZIONE STATISTICA

Le differenze tra i due gruppi RPM e controllo sono state testate mediante la procedura GLM (SAS, 2001) utilizzando il modello monofattoriale:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Dove

$\mu$  = media generale;

$\alpha_i$  = gruppo alimentare (i = RPM, controllo);

$\varepsilon_{ij}$  = errore del modello.

### 9.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

All'inizio della prova nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra il latte dei due gruppi per tutti i parametri quanti-qualitativi considerati, pertanto i criteri adottati per la suddivisione degli animali in gruppi sono risultati adeguati.

Le bufale di entrambi i gruppi, durante lo svolgimento della prova, non hanno mai manifestato condizioni metaboliche o fisiologiche negative riconducibili all'alimentazione.

In tutte le tabelle i rilevamenti relativi a due controlli successivi sono stati accorpati su base mensile.

L'ingestione media giornaliera di sostanza secca (SSI) è stata di  $17.13 \pm 0.55$  kg/d per il gruppo RPM e di  $17.19 \pm 0.41$  per il gruppo di controllo.

La presenza di RPM nella dieta non sembra quindi aver influenzato in modo significativo l'ingestione degli alimenti. Anche Broderick et al., (2008, 2009) non hanno riscontrato differenze significative nell'ingestione di diete integrate con RPM. Benefield et al. (2009), invece, hanno riscontrato, in vacche da latte, una maggiore ingestione di DM nelle diete addizionate con RPM nella fase iniziale della prova, differenza che però risultava non significativa nella media dell'intero periodo sperimentale. Patton (2010), dall'analisi comparativa di un consistente numero di ricerche, ha rilevato una generale lieve diminuzione dell'ingestione di DM in diete integrate con RPM.

I principali parametri quanti-qualitativi del latte prodotto dai due gruppi sono riportati nella tabella 9.3.

**Tabella 9.3.** Parametri quanti/qualitativi del latte prodotto nella prova; le significatività sono riportate per colonna (P= A<0.05; a<0.01)

		1° mese	2° mese	3° mese	4° mese	Media generale
		[89-103 DIM]	[117-131 DIM]	[145-159 DIM]	[173-187 DIM]	
<b>Latte (kg/d)</b>	RPM	9.16	8.57	7.01	5.92	7.63
	Controllo	9.78	8.24	6.89	5.49	7.69
	Rmse	2.9	2.29	2.00	1.77	2.11
<b>Grasso (g/kg)</b>	RPM	82.06 <sup>b</sup>	91.06	97.75	99.75	92.81
	Controllo	88.50 <sup>a</sup>	96.38	94.93	98.93	94.5
	Rmse	8.88	10.05	8.97	10.36	7.85
<b>Proteine (g/kg)</b>	RPM	46.08	44.45 <sup>b</sup>	47.09	47.3	46.21
	Controllo	44.72	48.12 <sup>a</sup>	49.13	48.12	47.42
	Rmse	1.99	4.61	3.94	3.26	2.52
<b>LNB (kg/d)</b>	RPM	8.86	8.66	7.69	6.58	7.91
	Controllo	9.90	8.94	7.50	6.06	8.24
	Rmse	2.29	2.17	1.97	1.89	1.88
<b>Lattosio (g/kg)</b>	RPM	47.17	45.02	45.35 <sup>B</sup>	44.68 <sup>B</sup>	45.58
	Controllo	47.86	43.93	47.32 <sup>A</sup>	46.79 <sup>A</sup>	46.49
	Rmse	2.23	4.43	1.74	1.59	1.45
<b>Urea latte (mg/100 ml)</b>	RPM	39.76 <sup>b</sup>	32.35	26.44	45.28	35.53
	Controllo	48.38 <sup>a</sup>	37.11	31.41	50.67	41.09
	Rmse	7.33	10.14	8.85	9.87	6.34
<b>Caseina (g/kg)</b>	RPM	37.98	36.26	38.82	39.5	38
	Controllo	37.22	38.64	41.01	40.10	39.10
	Rmse	1.65	4.05	3.15	2.88	2.16
<b>Indice caseina (%)</b>	RPM	82.41 <sup>b</sup>	81.48	82.43 <sup>b</sup>	82.12	82.13
	Controllo	83.22 <sup>a</sup>	80.31	83.55 <sup>a</sup>	82.81	82.44
	Rmse	0.91	2.44	3.31	1.60	0.56
<b>LNB/DMI</b>	RPM	0.54	0.51	0.44	0.37	0.47
	Controllo	0.59	0.53	0.41	0.34	0.47
	Rmse	0.14	0.13	0.12	0.11	0.11

Nessuna differenza significativa è stata rilevata nella produzione giornaliera di latte sia nei controlli mensili che nella media generale.

Nel primo mese la produzione di latte è risultata leggermente più alta nel gruppo di controllo, mentre nei tre mesi successivi la tendenza risulta invertita e sembra comparire un effetto positivo della RPM con produzioni più elevate, anche se non significativamente, nel gruppo che la riceveva.

I dati disponibili in letteratura a questo proposito sulle vacche da latte sono contraddittori; alcuni ricercatori (Krober et al., 2001; Younge et al., 2001; Davidson et al., 2008; Benefield et al., 2009) non hanno riscontrato differenze significative nella produzione di latte in seguito all'aggiunta di RPM nelle diete, mentre altri (Samuelson et al. 2001; Lara et al., 2006; Broderick et al., 2008; Patton, 2010) riferiscono aumenti più o meno rilevanti della produzione.

Riguardo alla qualità del latte, nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata a livello mensile tranne che per il grasso nel primo mese e la proteina nel secondo mese ( $P < 0.05$ ), significativamente più alte nel gruppo di controllo (tab. 3).

Queste differenze non hanno però influenzato le medie generali che sono risultate non dissimili: 92.81 e 94.50 g/kg per il grasso e di 46.21 e 47.42 g/kg per la proteina rispettivamente per i gruppi RPM e controllo.

I maggiori valori di grasso e proteine del latte prodotto dal gruppo controllo portano ad una maggiore differenza del parametro LNB (7.91 e 8.24 kg/d) per i gruppi RPM e controllo rispettivamente. Anche per questo parametro, tuttavia non sono state evidenziate differenze significative tra i due gruppi.

Nelle vacche da latte alimentate con diete integrate con RPM alcuni Autori (Samuelson et al., 2001; Leonardi et al., 2003; Lara et al., 2006) hanno riscontrato un aumento del contenuto in grasso e proteine del latte, mentre Benefield et al., (2009) hanno

notato un incremento del contenuto in grasso e proteine solo nella fase iniziale della prova e nessuna differenza significativa nelle medie generali dell'intero periodo.

Broderick et al. (2008), hanno riscontrato un effetto positivo della RPM sulla produzione e qualità del latte in diete con un contenuto in PG compreso tra circa il 16 e il 17%, mentre con un livello di PG inferiore al 15%, l'effetto della metionina risulta meno evidente.

I risultati della nostra prova sembrano indicare una tendenza ad uno scadimento della qualità del latte prodotto dalle bufale in conseguenza della riduzione del contenuto proteico della dieta, probabilmente non del tutto bilanciata dalla dose di RPM aggiunta, almeno nel periodo iniziale di maggior produzione.

Per il contenuto in lattosio sono state riscontrate differenze significative ( $P < 0.01$ ) a vantaggio della dieta di controllo nei rilievi del 3° e 4° mese e nessuna differenza significativa nei primi due mesi e nella media generale (45.58 e 46.49 g/kg rispettivamente per il gruppo RPM e controllo).

Questo risultato è in accordo con quanto riscontrato per le vacche da latte da Broderick et al., (2008) e da Benefield et al., (2009) che non attribuiscono un chiaro significato fisiologico alle variazioni di quantità del lattosio.

Come atteso, in tutto l'arco della prova il contenuto di MU risulta più alto nel gruppo di controllo rispetto al gruppo RPM, ma le differenze sono significative ( $P < 0.05$ ) solo nel primo mese. Anche altri ricercatori (Campanile et al., 1998) avevano riscontrato una rapida diminuzione del livello di urea nel latte di bufala, in conseguenza della diminuzione dell'apporto di PG nella dieta, seguita da una tendenza al riequilibrio dei valori tra i due gruppi con il proseguimento della lattazione.

Succi e Crovetto (1999), in vacche da latte alimentate con diete a ridotto contenuto in proteine, integrate con metionina e lisina rumino-protette hanno riscontrato una

diminuzione significativa dell'urea nel latte e nessuna influenza sulla produzione rispetto agli animali alimentati con razioni a maggior contenuto in PG ma senza integrazione con amminoacidi protetti, mentre Benefield et al., (2009) non hanno trovato riduzione significativa dell'urea, in conseguenza dell'aggiunta di RPM alle diete con bassi livelli di proteine.

Nessuna differenza è stata rilevata in tutto l'arco della prova riguardo al contenuto in caseina, che risulta praticamente identica tra i due gruppi e sembra non essere stata influenzata dal minore apporto proteico della dieta RPM. Questo risultato assume un particolare rilievo, considerato il ruolo della caseina nel processo di caseificazione cui il latte di bufala è interamente destinato. Nella Tabella 9.4 vengono riportati il pH, i parametri di coagulazione del latte e la produzione stimata di mozzarella.

**Tabella 9.4.** Parametri tecnologici del latte

		1° mese	2° mese	3° mese	4° mese	Medie generali
		[89-103 DIM]	[117-131 DIM]	[145-159 DIM]	[173-187 DIM]	
<b>Acidità (pH)</b>	RPM	6.67	6.59	6.56	6.65	6.62
	Controllo	6.74	6.62	6.61	6.68	6.66
	Rmse	0.10	0.08	0.08	0.09	0.07
<b>r (min)</b>	RPM	16.59	17.46	16.62	18.38	17.26
	Controllo	17.93	17.84	18.04	19.25	18.71
	Rmse	5.08	3.85	2.50	3.08	2.89
<b>K<sub>20</sub> (min)</b>	RPM	1.75	1.91	1.89	1.80	1.85
	Controllo	1.91	1.77	1.68	2.17	1.94
	Rmse	0.60	0.84	0.56	0.79	0.56
<b>A<sub>30</sub> (mm)</b>	RPM	51.61	50.39	47.55	51.32	50.11
	Controllo	49.00	50.77	48.48	48.36	48.13
	Rmse	11.14	10.94	9.25	7.51	7.47
<b>Prod. mozzarella (kg/d)</b>	RPM	2.28	2.18	1.99	1.65	2.01
	Controllo	2.49	2.28	1.92	1.52	2.07
	Rmse	0.61	0.57	0.53	0.48	0.49



I tre parametri della coagulazione non sono risultati statisticamente diversi nei controlli mensili; le medie generali sono state, rispettivamente per il gruppo RPM e controllo, 17.26 e 18.71 min per il tempo di coagulazione, 1.85 e 1.94 min per la velocità di coagulazione e 50.11 e 48.13 mm per la consistenza del coagulo.

L'assenza di differenze nei parametri di coagulazione del latte dei due gruppi indica che la riduzione di proteine nella dieta RPM è stata bilanciata dall'apporto di metionina rumino-protetta senza provocare un peggioramento delle caratteristiche di caseificazione del latte.

Queste considerazioni sono confermate anche dalla produzione stimata di mozzarella che risulta praticamente uguale nei due gruppi sia nei controlli mensili che nella media generale (2.01 e 2.07 kg/d) con un rapporto caseina/proteine latte praticamente uguale nel latte dei due gruppi (82.13 e 82.44%).

A questo proposito va tuttavia considerato che l'equazione usata per stimare la produzione di mozzarella:

$$\text{Mozzarella kg} = \text{latte kg} * [(3.5 * \text{pg} (\%) + 1.23 * \text{grasso} (\%)) - 0.88] / 100$$

non tiene conto del rapporto caseina/proteine, essendo basata sul contenuto in grasso e proteina del latte.

L'urea ematica (BU) (tabella 9.5) sin dal primo mese di trattamento è risultata significativamente inferiore nel gruppo che riceveva la dieta a minor contenuto proteico integrata con metionina rumino-protetta.

**Tabella 9.5.** Valori di urea ed insulina ematica rilevati durante la prova; le significatività sono riportate per colonna (P= A<0.05; a<0.01)

		1° mese	2° mese	3° mese	4° mese	Medie generali
		[89-103 DIM]	[117-131 DIM]	[145-159 DIM]	[173-187 DIM]	
<b>Urea ematica (mmoli/l)</b>	RPM	5.72 <sup>B</sup>	6.22 <sup>B</sup>	5.28	6.12 <sup>b</sup>	5.88 <sup>B</sup>
	Controllo	7.65 <sup>A</sup>	7.72 <sup>A</sup>	6.10	6.78 <sup>a</sup>	7.01 <sup>A</sup>
	Rmse	0.92	1.1	1.46	0.79	0.59
<b>Insulina (µg/l)</b>	RPM	0.82	0.84	0.99	1.19	0.98
	Controllo	0.73	0.84	1.01	1.13	0.91
	Rmse	0.35	0.28	0.28	0.52	0.28

Nei mesi successivi le differenze si sono mantenute significative, tranne che nel terzo mese. Le medie generali dei due gruppi sono risultate significativamente diverse (5.88 vs 7.01 mmol/l, P<0.01), confermando la stretta correlazione esistente tra contenuto in PG della dieta e livello di BU, riscontrata da molti ricercatori sia nelle bovine che nelle bufale (Carlsson e Pehrson, 1994, Baker et al., 1995, Bertoni et al., 1994, Campanile et al., 1994, 1996, 1998).

Dalla prova è inoltre stata confermata la correlazione tra BU ed MU (Roseler et al, 1993, Baker et al.,1995, Campanile et al., 1998), con un Coefficiente di Pearson positivo.

Nel corso della prova il livello di urea ematica raggiunge il valore massimo nel secondo mese (circa 150<sup>mo</sup> giorno di lattazione), e resta quasi sempre significativamente minore nel gruppo RPM.

I livelli di urea riscontrati nell'arco della prova sono generalmente risultati nel range individuato dalla Associazione Scientifica Produzioni Animali (ASPA,1999) che indica come valore massimo di urea ematica per bufale in lattazione 7.5 mmol/l e da Bertoni et al. (1990) che avevano riscontrato i valori di urea ematica per la bufala in lattazione

compresi tra 5.0 e 7.5 mmol/l; tuttavia, nei primi due mesi, le concentrazioni di urea ematica nel gruppo di controllo sono risultate leggermente superiori a questo valori.

E' noto infatti che le bufale utilizzano l'azoto ingerito in modo più efficiente delle bovine grazie alle migliori capacità dei microrganismi presenti nel loro rumine di sintetizzare proteine anche dall'azoto non proteico (Langer et al, 1969) e al miglior riciclo dell'urea nel tratto digestivo (Houpt, 1970), per cui le bufale si adattano più facilmente delle bovine a diete carenti di proteine (Bertoni et al., 1993).

Campanile et al. (1998) hanno osservato che l'apporto di protidi grezzi nella razione compresi tra il 9% e il 12 % sulla DM, erano in grado di soddisfare i fabbisogni proteici di bufale in lattazione, purchè la quantità di energia fermentescibile fosse adeguata, e che un incremento della quantità di proteine, in eccesso rispetto ai fabbisogni, causava aumento dell'urea ematica e disordini metabolici.

Valori molto alti di urea (8.62 mmol/l), al di fuori dei limiti fisiologici, sono stati ritrovati nel sangue di bufale alimentate con diete contenenti oltre il 17% di PG da Bovera et al. (2007), che attribuivano queste concentrazioni anomale ad un possibile squilibrio nel rapporto proteine metabolizzabili/energia netta.

I livelli di insulina non presentano differenze significative tra i due gruppi in tutto l'arco della prova e mostrano un andamento crescente con il progredire della lattazione con valori medi, pari a 0.98 e 0.91 µg/l per i gruppi RPM e controllo rispettivamente.

Nella tabella 9.6 sono riportate le quantità di azoto escreto per via urinaria e fecale dagli animali alimentati con le due diete, nonché quello in creatinina utilizzato per il calcolo della quantità di urina emessa giornalmente, la digeribilità dell'azoto e la quantità totale di azoto contenuto nelle deiezioni solide e liquide.

L'azoto totale urinario è sempre risultato più alto negli animali alimentati con la dieta di controllo rispetto a quelli del gruppo RPM sia nei rilievi mensili che nella media

generale, con differenze altamente significative nel secondo mese e nella media generale (179.17 vs 207.52 g/d,  $P < 0.01$  nei gruppi RPM e controllo rispettivamente).

Nell'ultimo mese della prova l'azoto totale appare in crescita in entrambi i gruppi; lo stesso andamento è stato riscontrato anche per l'azoto ureico con differenze significative al secondo e terzo mese e nella media generale (135.24 vs 156.42 g/d,  $P < 0.05$ ).

Anche questo parametro risulta in crescita nell'ultimo mese della prova suggerendo che, in questa fase della lattazione in cui la produzione di latte diminuisce, la quantità totale di proteine grezze somministrate alle bufale di entrambi i gruppi superava i loro fabbisogni azotati.

**Tabella 9.6.** Escrezione di azoto urinario e fecale rilevati durante la prova; le significatività sono riportate per colonna (P= A<0.05; a<0.01)

<b>Azoto Urinario</b>		<b>1° mese</b> [89-103 DIM]	<b>2° mese</b> [117-131 DIM]	<b>3° mese</b> [145-159DIM]	<b>4° mese</b> [173-187DIM]	<b>Media generale</b>
<b>N-totale (g/d)</b>	RPM	190.79	158.09 <sup>B</sup>	157.74	219.78	179.17 <sup>B</sup>
	Controllo	211.36	202.91 <sup>A</sup>	186.54	232.48	207.52 <sup>A</sup>
	Rmse	51.74	36.15	41.91	43.83	18.90
<b>N-ureico (g/d)</b>	RPM	112.30	132.46 <sup>B</sup>	104.87 <sup>b</sup>	186.97	135.24 <sup>b</sup>
	Controllo	145.66	168.44 <sup>A</sup>	132.64 <sup>a</sup>	192.26	156.42 <sup>a</sup>
	Rmse	41.52	27.33	24.89	33.45	18.74
<b>Creatinina (mmol/l)</b>	RPM	6.54	8.32	7.30	5.35	6.90
	Controllo	6.20	8.23	7.16	5.11	6.65
	Rmse	1.82	2.24	2.68	1.62	1.43
<b>Urina (l/d)</b>	RPM	29.50	23.40	27.90	39.00	30.00
	Controllo	32.10	23.70	31.20	39.80	31.70
	Rmse	9.08	5.39	11.64	9.31	4.66
<b>Azoto fecale</b>						
<b>N-tot feci (g/d)</b>	RPM	106.18	147.8	162.79	118.67	135.48
	Controllo	128.69	152.65	178.49	148.46	151.05
	Rmse	53.32	40.10	46.38	51.68	25.84
<b>SS feci (kg/d)</b>	RPM	5.25	6.16	6.58	6.48	6.06
	Controllo	5.56	6.62	6.45	6.58	6.48
	Rmse	1.18	1.25	1.41	2.09	1.08
<b>Digeribilità N (%)</b>	RPM	67.21	55.74	62.32	55.95	59.95
	Controllo	70.07	63.95	71.62	64.04	67.72
	Rmse	11.98	15.90	14.92	7.76	9.60
<b>N-tot (feci+urina) (g/d)</b>	RPM	296.97 <sup>B</sup>	305.89 <sup>B</sup>	320.53 <sup>B</sup>	338.45 <sup>B</sup>	314.65 <sup>B</sup>
	Controllo	340.05 <sup>A</sup>	355.56 <sup>A</sup>	365.03 <sup>A</sup>	380.95 <sup>A</sup>	358.57 <sup>A</sup>
	Rmse	16.91	17.82	20.84	17.86	15.70

Il rapporto N-ureico/N-totale risulta praticamente uguale nei due gruppi (75.48% nel gruppo RPM e 75.38% nel gruppo controllo nella media generale), a differenza di quanto trovato da Broderick et al. (2008) nella specie bovina, in cui una riduzione delle proteine grezze nella dieta dal 18.6% al 14.8% + 15g RPM causava una diminuzione del rapporto N-ureico/N-totale dal 78 al 53%.

Considerando il parametro creatinina, dalla quale si ricava la quantità stimata di urine emesse, nessuna differenza significativa viene evidenziata sia nei prelievi mensili che nella media generale; è interessante notare che la differenza, seppur non significativa, tra i valori di urina stimata (30.0 l/d per il gruppo RPM e 31.7 l/d per il gruppo controllo) è in accordo con quanto riscontrato da Leonardi et al. (2003) e da Broderick et al. (2008) che riportano valori inferiori di urina escreta per diete a ridotto contenuto in proteine.

Nessuna differenza significativa è stata riscontrata, tra gli animali dei due gruppi, per la quantità giornaliera di feci emesse. Il contenuto di azoto totale nelle feci risulta sempre più alto nel gruppo di controllo, ma non in maniera significativa, sia nei rilievi mensili che nell'intera prova, 135.48 g/d per il gruppo RPM e 151.05 g/d per il gruppo controllo;

L'andamento risulta crescente nei rilievi mensili tranne che nell'ultimo mese in cui si è riscontrato un valore più basso in corrispondenza di un aumento dell'escrezione dell'azoto con le urine.

Questo effetto potrebbe essere attribuito in parte anche alla maggiore quantità di acqua ingerita e di urina emessa dalle bufale nell'ultimo mese della prova (luglio-agosto) a causa della temperatura particolarmente elevata e quindi ad una maggiore escrezione dell'azoto per via urinaria.

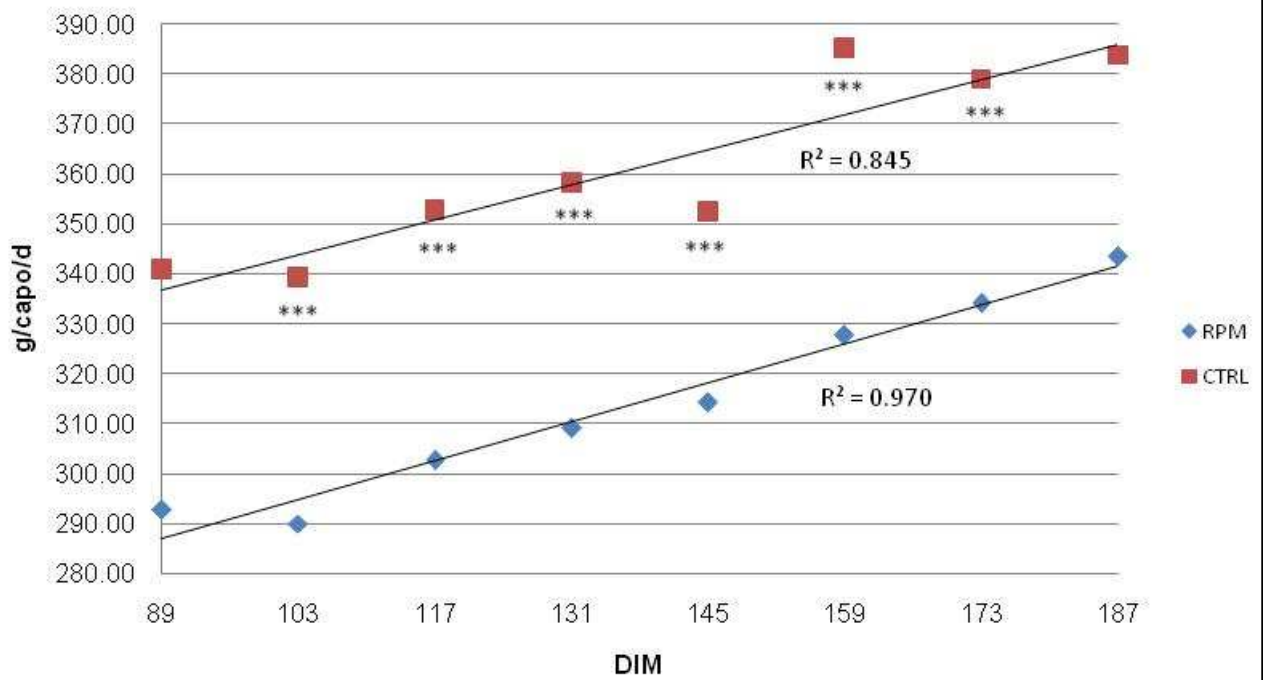
A questo proposito Leonardi et al. (2003) avevano rilevato che l'integrazione della dieta con RPM, a parità di PG, non influiva sulla quantità di urina emessa né

sull'escrezione urinaria o fecale dell'azoto, mentre l'aumento della quantità di PG nella dieta causava un incremento della concentrazione di azoto sia nelle urine che nelle feci.

La digeribilità apparente dell'azoto è risultata sempre maggiore, ma non in modo significativo, nel gruppo di controllo con valori medi pari a 59.95 % per il gruppo RPM e 67.72 % per il gruppo controllo.

Anche altri Autori (Broderick et al., 2008; Puppo et al., 2002 [bovini e bufali]; Bartocci et al., 1997) hanno riscontrato, sia per le bovine da latte che per le bufale, che in diete a maggior contenuto proteico la digeribilità apparente dell'azoto risulta più alta. Considerando il contenuto di azoto nelle deiezioni totali, emerge in modo evidente in tutti i rilievi e nell'intera prova che la quantità di azoto escreto era sempre significativamente maggiore nel gruppo di controllo rispetto al gruppo RPM (in media 314.65 vs 358.57 g/d, rispettivamente per RPM e controllo;  $P < 0.01$ ).

In figura 9.1 è riportata la correlazione tra l'azoto totale escreto/capo/giorno e i DIM; è interessante notare l'alta correlazione evidenziata per entrambi i gruppi ( $R^2$  0.970 e 0.845, rispettivamente per RPM e controllo).



**Figura 9.1.** Correlazione tra la quantità di N-totale escreto e i giorni di lattazione

Questo risultato conferma nelle bufale quanto riscontrato per le bovine da Broderick et al. (2008), ossia che la riduzione della quota proteica della dieta e l'integrazione con la metionina rumino-protetta si traduce in una riduzione dell'escrezione totale dell'azoto.



## 9.4 CONCLUSIONI

La riduzione della quantità di PG nella dieta di bufale in lattazione e l'integrazione con metionina rumino-protetta della dieta a minor contenuto in PG non sembra aver modificato in modo significativo la produzione del latte, la sua composizione e soprattutto la sua attitudine alla caseificazione, cui il latte di bufala è esclusivamente destinato in Italia.

Nella seconda fase della lattazione, la quantità di PG somministrata probabilmente era eccessiva rispetto ai fabbisogni azotati degli animali e alle produzioni ottenute in quel periodo e questo risultato suggerisce l'opportunità di una più adeguata modulazione dei livelli proteici, del rapporto proteine/energia e delle eventuali integrazioni con amminoacidi protetti nelle diverse fasi della lattazione.

Per quanto riguarda le escrezioni di azoto, la riduzione della quantità di PG nella dieta fornisce risultati soddisfacenti abbassando in modo significativo la quantità di azoto rilasciato nell'ambiente.

Se, come i risultati ottenuti in questa prova hanno evidenziato, fosse possibile una riduzione maggiore del livello proteico delle diete mediante integrazione con RPM nella fase finale della lattazione, il problema dell'impatto ambientale dell'allevamento intensivo delle bufale da latte potrebbe essere alleggerito.

## BIBLIOGRAFIA

A.O.A.C., (1980). Official Methods of Analysis, 13<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C.

Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L.C., Kamra, D.N., (2009). Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on in vitro methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Anim Feed Sci Technol* 148:321–327.

Allen, S.A., and Miller, E.L., (1976). Determination of nitrogen requirement for microbial growth from the effect of urea supplementation of a low N diet on abomasal N flow and N recycling in wethers and lambs. *British journal of nutrition* 36, 353-368.

Armentano, L.E., Bertics, S.J., Ducharme, G.A., (1997). Response of lactating cows to methionine or methionine plus lysine added to high protein diets based on alfalfa and heated soybeans. *J.Dairy Sci.* 80, 1194–1199.

Baker, L.D., Ferguson, J.D., Chalupa, W., (1995). Responses in urea and true protein of milk to different protein feeding schemes for dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78, 2424-2434.

Baranova, M., Mala, P., Burdova, O., and Zezula, L., (1999). Influence of long-term nitrate exposure on calves. *Bulletin of the Veterinary Research Institute in Pulawy* 43 (1), 77-83.

Bartocci S., Amici A., Verna M., Terramoccia S., Martilotti F., (1997). Solid and fluid passage rate in buffalo, cattle and sheep fed diets with different forage to concentrate ratios, *Livestock Production Science* 52:201-208.

Bartocci, S., Terramoccia, S. (2006). Effect of NDF/undegradable crude protein ratio on in vivo digestibility, particle passage rate in riverine buffaloes compared with sheep. *Livestock Science*, 104 (1), p.38-45.

Bartocci, S., Terramoccia, S., Tripaldi, C. (2006). The utilisation of a high level energy/protein diet for lactating Mediterranean buffaloes: Intake capacity and effects on quantitative–qualitative milk parameters. *Livestock Science*, 99 (2), p.211-219.

Bartocci, S., Amici, A., Verna, M., Terramoccia, S., Martilotti, F., (1997). Solid and fluid passage rate in buffalo, cattle and sheep fed diets with different forage to concentrate ratios. *Livest. Prod. Sci.* 52, 201-208.

Bartocci, S., Tripaldi, C., Terramocchia, S., (2002). Characteristics of foodstuffs and diets, and the quanti-qualitative milk parameters of Mediterranean buffaloes bred in Italy using the intensive system An estimate of the nutritional requirements of buffalo herds lactating or dry. *Livest. Prod. Sci.* 77, 45-58.

Battye, R., W. Battye, C. Overcash, and S. Fudge. (1994). Development and Selection of Ammonia Emission Factors. EPA/600/R-94/190. Final report prepared for United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. USEPA Contract No. 68-D3-0034, Work Assignment 0-3.

Beauchamp, E.G., G.E. Kidd, and G. Thurtell., (1982). Ammonia volatilization from liquid dairy cattle manure in the field. *Can. J. Soil Sci.* 62:11–19.

Benefield, B.C., Patton, R.A., Stevenson, M.J., Overton, T. R., (2009). Evaluation of rumen-protected methionine sources and period length on performance of lactating dairy cows within Latin squares. *J. Dairy Sci.* 92, 4448-4455.

Berthiaume, R., Thivierge, M.C., Patton, R.A., Dubreuil, P., Stevenson, M., McBride, B.W., Lapierre, H., (2006). Effect of ruminally protected methionine on splanchnic metabolism of amino acids in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 1621–1634.

Bertoni, G., F. Piccioli-Cappelli, U Bernabucci and E Di Stefano, (1991). Some effects of feeding management on milk production and metabolism of dairy buffaloes *Proceedings of the 3rd World Buffalo Congress, Varna, Bulgaria*, pp. 861–868.

Bertoni, G., Amici, A., Bartocci, S., Soressi, A.,(1994). *Procending IV World Buffalo Congress Sao*.

Bertoni, G., Amici, A., Lombardelli, R., Bartocci, S., (1993). Variations of metabolic profile and hormones in blood of buffaloes, cattle and sheep males fed the same diets. *Proc. of the Inter. Symp. "Prospect of buffalo production in the Mediterranean and the Middle East"*, 345-348.

Bertoni, G., Di Lella, T., Bartocci, S., (1994). Nuove acquisizioni nel campo dell'alimentazione dei bufali. *Agricoltura Ricerca* 153, 159-172.

Bierman, S., Klopfenstein T. K., Stock R., Shain. D., (1996). Evaluation of nitrogen, phosphorous, and organic matter balance in the feedlot as affected by nutrition. *Beef Cattle Report MP66-A*. pp 7476. Univ. of Nebraska, Lincoln.

Boccia L., Infascelli R., Campanile G., (2010). Environmental issue of buffalo [*Bubalus bubalis*] husbandry. *Aspetti ambientali connessi all'allevamento bufalino. Riflessi ambientali*, 133-149.

Bovera, F., Cutrignelli, M.I., Calabrò, S., Piccolo, G., Tudisco, R., D'Urso, S., Infascelli, F., (2007). Use of two different dietary energy and protein contents to define nutritive requirements of lactating buffalo cows. *J. Anim. Physiol. An. N.*, 91(5-6), 181-186.

Bradley W.B., Eppson, H.F., Beath O.A., (1940). Methylene blue as an antidote for poisoning by oat hay and other plants containing nitrates. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.*, 96, pp. 41-42.

Bradley, W.B., (1942). Livestock poisoning by oat hay and ther plants containing nitrate. *Wyoming agr. Expt. Sta. Bull.*, 241.

Broderick G. A., Muck R. E. (2009). Effect of alfalfa silage storage structure and rumen-protected methionine on production in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 92: 1281-1289.

Broderick G. A., Stevenson M. J., Patton R. A. (2009). Effect of dietary protein concentration and degradability on response to rumen-protected methionine in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 92: 2719-2728.

Broderick, G.A., Muck, R.E., (2009). Effect of alfalfa silage storage structure and rumen-protected methionine on production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 1281-1289.

Broderick, G.A., Stevenson, M. J., Patton, R.A., Lobos, N.E, Olmos Colmenero J.J., (2008). Effect of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 1092-1102.

Bruning-fann, C.S. & Kaneene, J.B. (1993). The effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds on human health: a review. *Vet. Human Toxicol.*, 35: 521-538.

Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, M. D. Carro, and C. Kamel., (2005). Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 88:4393-4404.

Bussink, D. W., Oenema, O., (1998). Ammonia volatilization from dairy farming systems in temperate areas: a review. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 51: 19-33.

Bussink, D.W., and Oenema O., (1998). "ammonia volatilization from dairy farming systems in temperate areas: a review". *Nut.Cyc in Agroecosystems* 51:19-33.

Calabro, S., Moniello, G., Piccolo, V., Bovera, F., Infascelli, F., Tudisco, R., Cutrignelli, M.I., (2008). Rumen fermentation and degradability in buffalo and cattle using the in vitro gas production technique. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92, 356-362.

Campanile G., De Filippo C., Di Palo R., Taccone W., Zicarelli L. (1998). Influence of dietary protein on urea levels in blood and milk of buffalo cows. *Livestock Production Science*, vol 55:135-143.

Campanile, G., (1998). Relationship between nutrition and reproduction in buffalo. *Proc. 3rd Course on biotechnology of reproduction in buffaloes*, pp 217-235.

Campanile, G., Avallone, L., D'Angelo, A., Di Palo, R., Di Meo, C., (1994). Influence of the season and of the number of days after calving on the pattern of thyroid hormones in buffalo cows. *IV World Buffalo Congress*, June 1994, 3, 564-566.

Campanile, G., De Filippo, C., Di Palo, R., Taccone, W., Zicarelli, L., (1996). Influence of dietary protein on urea levels in blood and milk of buffalo cows. *VIII<sup>th</sup> Internat. Symp. of Vet. Lab. Diagn.*, 48 (Abstract).

Campanile, G., Neglia, G., Vecchio, D., Di Palo, R., Gasparrini, B., Zicarelli, L., (2010). Protein nutrition and nitrogen balance in buffalo cows. *CAB Reviews: Perspective in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 5, 1-8.

Carlsson, J., Pehrson, B., (1994). The influence of the dietary balance between energy and protein on milk urea concentration. *Experimental trials assessed by 2 different protein evaluation systems. Acta Vet. Scand.* 35, 193-205.

Carpenter, S. R., Caraco N. F., Correll D. L., Howarth R. W., Sharpley A. N., Smith V. H. (1998). Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications* 8:559–568.

Cash, D., Funston, R., King, M., Wichman, D., (2007). Nitrate toxicity of montana forages Available at: <http://animalrangeextension.montana.edu/articles/Forage/General/Nitrate-tox.Htm>.

Castillo A. R., (1999). Improving nitrogen utilisation in dairy cows. *Ph.d. dissertation, university of reading, U.K.*

Catillo G., Macciotta N. P. P., Carretta, A. Cappio-Borlino A. (2002). Effects of Age and Calving Season on Lactation Curves of Milk Production Traits in Italian Water Buffaloes. *J Dairy Sci.* 85: 1298-1306.

Chandler, P. T., (1996). Environmental challenges as related to animal agriculture-dairy. *In* Nutrient management of food animals to enhance and protect the environment. Ed: E. T. Kornegán. CRC Lewis Publishers, New York. p. 7.

Chen X. B., Gomes M. J. (1992). Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of technical details. *Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ.* Rowett Research Institute, Aberdeen, United Kingdom.

Chen X.B., J. Mathieson, E.R. Hovell, F.D. Deb, and P.J. Reeds, (1990). Measurement of purine derivatives in urine of ruminants using automated methods. *J. Sci. Food Agric.*, 53, 23-33.

Chilliard, Y, Doreau, M., 1997. Influence of supplementary fish oil and rumen-protected methionine on milk yield and composition in dairy cows. *J. Dairy Res.* 64, 173-179.

Chizzotti, M.L., de Campos Valadares Filho, S., Ferreira Diniz Valadares, R., Chizzotti F.H.M., Orindo Tedeschi L. (2008). Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. *Livestock Science* 113 218–225.

Chorus, I., Bartram, J., (Ed.) (1999). *Toxic cyanobacteria in water*. London: E & FN Spon.

Church D.C., Pond W.G., (1988). Basic animal nutrition and feeding. ISBN 0-471-85246-5.

Cockburn, A., Brambillab G., Fernándezc M.L., Arcellad D., Bordajandie L. R., Cottrillf B., van Peteghemg C., Dorne J.L., (2010). Nitrite in feed: From Animal health to human health Toxilogly and applied pharmacology.

Cóndor, R. D., Valli, L., De Rosa, G., Di Francia, A. and De Lauretis, R., (2008). Estimation of the methane emission factor for the Italian Mediterranean buffalo. *Animal* 2 : pp 1247-1253.

Consorzio per la tutela del formaggio mozzarella di bufala campana, (2002). Modello di regolamento per la gestione igienica ed alimentare dell'allevamento bufalino in relazione alla produzione della mozzarella di bufala campana.

Cotta, M. A., Russell, J. B., (1982). Effect of Peptides and Amino Acids on Efficiency of Rumen Bacterial Protein Synthesis in Continuous Culture. *Journal of Dairy Science* 65, 2: 226-234.

Crowley, J.W., (1985). Effects of nitrate on livestock. American Society of Agricultural Engineers, Paper Number 80-20026. Cited by Undersander, D., Combs, D., Shaver, R., Thomas, D. Available at: <http://www.uwex.edu/ces/forage/pubs/nitrate>.

Davidson S., Hopkins B. A., Odle J., Brownie C., Fellner V., Whitlow L. W., (2008). Supplementing Limited Methionine Diets with Rumen-Protected Methionine, Betaine, and Choline in Early Lactation Holstein Cows. *J. Dairy Sci.*91: 1552-1559.

Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31 "Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano".

Decreto Ministeriale del 19 aprile 1999 recante "Approvazione del codice di buona pratica agricola" G.U. n°102 S.O. n°86 del 4 maggio 1999.

Di Lella T., Infascelli F., Cutrignelli M.I., (1995). Rumen degradability and proteic value of feed utilized by buffaloes. *Bubalus bubalis*, 1,38-48.

Di Palo, R. (1992), produzione latte nella bufala con diete tradizionali e con l'impiego di acidi grassi. Tesi dottorato di ricerca, facoltà di medicina veterinaria, Napoli.

EFSA (European Food Safety Authority), (2008a). Nitrate in vegetables - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *The EFSA Journal* 689, 1-79.

Firkins, J.L., Z.Yu, and M. Morrison, (2007). Ruminant Nitrogen Metabolism: Perspectives for Integration of Microbiology and Nutrition for Dairy. *J. Dairy Sci* Volume 90, Supplement 1, June Pages E1-E16 Electronic.

Fornaio, M.G., (2008). Fitoplancton ed eutrofizzazione: i Cianobatteri come potenziale specie tossica.

Franzolin, R., (1994). Feed efficiency: a comparison between cattle and buffalo. *Buffalo J.*, 39-50. (supplement 2).

G.Catillo, N.P.P. Macciotta, A.Caretta and A. Cappio-Borlino, (2002). Effects of age and calving season on lactation curves of milk production traits in Italian water buffaloes. *J. Dairy Sci.* 85:1298-1306.

Gruber, N., Galloway J.N., (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 451:293–296.

Gupta S.K., Gupta R.C., Gupta A.B., Seth A.K., Bassin J.K., Gupta A., (2000). Ricorrenti infezioni respiratorie acute in zone con alte concentrazioni di nitrati nell'acqua potabile. Recurrent acute respiratory infections in areas with high nitrate concentrations in drinking water. *Environ Health Perspect* 108:363-366.

Hill M.J., (1999). Nitrate toxicity: myth or reality? Br. J. Nutr. 81:343-344.

Hill S. R., Knowlton K. F., James R. E., Pearson R. E., Bethard G. L., Pence K. J., (2007). Nitrogen and Phosphorus Retention and Excretion in Late-Gestation Dairy Heifers. J Dairy Sci. 90: 5634-5642.

Hobson W., (1939). Urinary output of creatine and creatinine associated with physical exercise, and its relationship to carbohydrate metabolism. Biochem. J., 33, pp. 1425–1429.

Houpt, R., (1970). Trasfer of urea and ammonia to the rumen. In: Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant (AT Phillipson ed), Oriel Press Limited, New Castle Upon Tyne, Royaume-Uni, 119-131.

[http://borsarifiuti.com/documenti/altro/repertorio\\_accordi\\_trattati\\_internazionali\\_ambiente.PDF](http://borsarifiuti.com/documenti/altro/repertorio_accordi_trattati_internazionali_ambiente.PDF)

<http://epa.gov/climatechange/emissions/downloads10/US-GHG-Inventory-2010-Chapter-Agriculture.pdf>

[http://europa.eu/legislation\\_summaries/environment/waste\\_management/l28045\\_it.htm](http://europa.eu/legislation_summaries/environment/waste_management/l28045_it.htm)

<http://www.aggiornamentonormativo.com/news/2010/9/regione-campania-disciplina-regionale-utilizzazione-agronomica-effluenti-di-allevamento-137.aspx>

[http://www.ambientediritto.it/Legislazione/INQUINAMENTO/2006/dm\\_7apr2006.htm](http://www.ambientediritto.it/Legislazione/INQUINAMENTO/2006/dm_7apr2006.htm)

[http://www.clal.it/index.php?section=vacche\\_italia](http://www.clal.it/index.php?section=vacche_italia)

[http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_1178712852460.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178712852460.htm).

<http://www.epa.gov/nitrousoxide/sources.html>

<http://www.fao.org/docrep/007/y5019e/y5019e0a.htm>

IPPC (2004). Provincia savona a cura CRPA (2000) - Rapporto Interno ANPA “Aggiornamento dell’inventario delle emissioni in atmosfera di ammoniaca, metano e protossido di azoto dal comparto agricolo” – ANPA.

Iwamoto M, Asanuma N, Hino T., (1999). Effect of nitrate combined with fumarate on methanogenesis, fermentation, and cellulose digestion by mixed ruminal microbes *in vitro*. *Animal Science Journal* 70, 471–478.



Iwamoto M, Asanuma N, Hino T., (2001). Effect of protozoa on nitrate and nitrite reduction in ruminal microbiota. *Kanto Journal of Animal Science* 51, 9–15.

Iwamoto M, Asanuma N, Hino T., (2002). Ability of *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wolinella succinogenes* to reduce nitrate and nitrite with special reference to the Suppression of Ruminal Methanogenesis. *Physiology & Microbial Chemistry*. Volume 8, Issue 4, 209-215.

James N. Galloway, Alan R. Townsend, Jan Willem Erisman, Mateete Bekunda, Zucong Cai, John R. Freney, Luiz A. Martinelli, Sybil P. Seitzinger and Mark A. Sutton., (2008). Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320:889–892.

Johnson, D.E. and Ward, G.M., (1996). Estimates of animal methane emissions. *Environ Monit Assess* 42, 133–141.

Johnson, D.E., Hill, T.M., Carmean, B.R., Branine, M.E., Iodman, D.W. and Ward, G.M., (1991). New perspectives on ruminant methane emission. In: *Proc. 72th Symposium on Energy Metabolism of Farm Animals*, EAAP publ. No. 58, pp. 376-379.

Jones, D. B., (1931). Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of protein. *USDA Circ.* 183:1-21.

Kebreab E., Clark K., Wagner-Riddle C., France J., (1995). Methane and nitrous oxide emissions from Canadian animal agriculture: A review *Canadian Journal of Animal Science*, 86: 135-138.

Kennedy, P. M., Boniface, A. N., Liang, Z. J., Muller, D. and Murray, R. M., (1992a). Intake and digestion in swamp buffaloes and cattle. 2. The comparative response to urea supplements in animals fed tropical grasses. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 119: 243-254.

Kewalramani, N. and Gupta, B.N., (1987). Effect of level of protein on bacterial production rates in the rumen of buffalo calves. *Journal of Nuclear Agriculture and Biology* 16 : 40-44.

Kirchmann, H., M. Esala, J. Morken, M. Ferm, W. Bussink, J. Gustavsson, and C. Jakobsson., (1998). Ammonia emissions from agriculture. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 51: 1-3.

Koch D.W., Paisley S., (2002). Managing forages to minimize nitrate poisoning. University of Wyoming Cooperative Extension Service. B-1122.8.

Koelsch, R., and C. Shapiro, (1998). Estimating manure nutrients from livestock and poultry. G97-1334A. University of Nebraska, Available: <http://www.ianr.unl.edu/pubs/wastemgt/g1334.htm>.

Kohn R. A., Dinneen M. M., Russek-Cohen E., (2005). Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. *J Anim. Sci.* 83: 879-889.

Kowalski, Z.M., Pisulewski, P.M., Gorgulu, M., (2003). Effects of protected methionine and variable energy supply on lactation responses in dairy cows fed grass silage-based diets. *J. Anim. Feed Sci.* 12, 451-464.

Krober, T.F., Kulling, D.R., Menzi, H., Sutter, F., Kreuzer, M., (2000). Quantitative Effects of Feed Protein Reduction and Methionine on Nitrogen Use by Cows and Nitrogen Emission from Slurry. *J Dairy Sci* 83, 2941-2951.

Krober, T.F., Sutter, F., Senn, M., Langhans, W., Kreuzer, M., (2001). Effects of supplying leucine and methionine to early-lactating cows fed silage-concentrate based diets with a calculated deficiency in leucine and methionine. *Animal Research.* 50, 5-20.

Langer, P.N., Sidhu, G.S., Bhatia, J.S., (1969). A study of the microbial population in the rumen of buffalo (*Bos bubalus*) and zebu (*Bos indicus*) on a feeding regimen deficient in carbohydrates. *Indian J. Vet.Sci.* 38, 333-336.

Lara, A., Mendoza, G.D., Landois, L., Barcena, R., Sanchez, T., Rojo, R., Ayala, J., Vega, S., (2006). Milk production in Holstein cows supplemented with different levels of ruminally protected methionine. *Livest. Sci.* 105, 105-108.

Lauren, D.A., D.R. Bouldin and S.D. Klausner. (1976). "Ammonia volatilization from dairy manure spread on the soil surface". *J. Environ. Qual.* 5:134-141.

Legleiter L. R., Mueller A. M., Kerley M. S., (2005). Level of supplemental protein does not influence the ruminally undegradable protein value. *J Anim. Sci.* 83: 863-870.

Leng, R.A., and Noland J.V., (1984). Nitrogen metabolism in the rumen. *J dairy Sci.* 67:1072-1089.

Leonardi C., Stevenson M., Armentano L. E. (2003). Effect of two levels of crude protein and methionine supplementation on performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:4033-4042.

- Leonardi, C., Stevenson, M., Armentano, L.E., (2003). Effect of two levels of crude protein and methionine supplementation on performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86, 4033–4042.
- Levine, S.N., and Schindler, D. W., (1989). Phosphorus, nitrogen and carbon dynamics during the recovery of a lake from eutrophication. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 2-9.
- Lewicki J, Wiechetek M, Souffrant WB, Karlik W and Garwacki S., (1998). The fate of nitrogen from <sup>15</sup>N-labeled nitrate after single intravenous administration of Na<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> in sheep. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76, 850-857.
- Lofgreen G.P., Garret W.N., (1954). Creatinine excretion and specific gravity as related to the composition of the 9, 10, 11th rib cut of Hereford steers. *J. Anim. Sci.*, 13, pp. 496–500.
- Marais JP, Therion JJ, Mackie RI, Kistner A and Dennison C., (1988). Effect of nitrate and its reduction products on the growth and activity of the rumen microbial population. *Br. J. Nutr.* 59 (2), 301-313.
- Mariani, P.M., Podestà A.,(1996). *Biochimica e biotecnologia del ruminante*. Piccin ISBN 88-299-1290-5.
- Martilotti, F., Bartocci S., Terramocchia S., (1996). *Tavole dei valori nutritivi degli alimenti di interesse zootecnico*. Istituto Nazionale di Economia Agraria.
- Massé, D.I., Croteau, F., Patni, N.K. and Masse, L., (2003). Methane emissions from dairy cow and swine manure slurries stored at 10°C and 15 °C. *Canadian Biosystems Engineering/Le génie des biosystèmes au Canada* 45: 6.1-6.6
- Mc Sweeney, C.S., Kennedy, P.M., John, A., (1989). Reticulo-rumina motility in cattle (*Bos indicus*) and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) fed a low quality roughage diet. *Comparative and biochemical and physiology* 94: 635-638.
- McAllister, T.A., Okine, E.K., Mathison, G.W. and Cheng, K.J., (1996). Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, 76: 2, pp. 231–243.
- Meisinger, J.J., and W.E. Jokela, (2000). Ammonia losses from manure. In *Proceedings 62nd Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*, 109-116. Ithaca, N.Y.
- Meyer D., (2000). *Dairying and the Environment*. *J. Dairy Sci.* 83: 1419-1427.

- Mirvisch S.S., (1975). Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and in vivo occurrence. *Toxicol Appl Pharmacol* 31 (3), 325-351.
- Moore, P. A., Daniel, T. C., Edwards, D. R., Miller, D. M, (1995). Effect of Chemical Amendments on Ammonia Volatilization from Poultry Litter. *J. Environ. Qual.* 24: 293-300.
- Moss, A. R., Jouany, J.-P. and Newbold, J., (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49:231-253.
- N. Abdullah, J. V. Nolan, M. Mahyuddin and S. Jalaludin, (1992). Digestion and nitrogen conservation in cattle and buffaloes given rice straw with or without molasses. *The Journal of Agricultural Science*, 119 , pp 255-263 doi:10.1017/S0021859600014180.
- National Research Council, (2001). Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7<sup>th</sup> rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, D.C.
- Naylor, R., and Richard Manning, (2005). "Unleashing the Genius of the Genome to Feed the Developing World," *Proceedings of the American Philosophical Society*.
- Negretti P., Bianconi G., Bartocci S., Terramoccia S., Verna M., (2008). Determination of live weight and body condition score in lactating Mediterranean buffalo by Visual Image Analysis *Livestock Science*, 113 (1), p.1-7.
- Nennich, T. D., Harrison, J. H., VanWieringen, L. M., Meyer, D., Heinrichs, A. J., Weiss, W. P., (2005). Prediction of manure and nutrient excretion from dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 88, 3721–3733.
- Nkrumah, J. D., E. K. Okine, G. W. Mathison, K. Schmid, C. Li, J. A. Basarab, M. A. Price, Z. Wang, and S. S. Moore., (2006). Relationships of feedlot feed efficiency, performance and feeding behaviour with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 84:145–153.
- Oba, M. and Allen, M.S., (2003). Effects of Diet Fermentability on Efficiency of Microbial Nitrogen Production in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 86, 1: 195-207.
- Okorie, A.U. Buttery P.J. and Lewis, D., (1977). Ammonia concentration and protein synthesis in the rumen. *Proceeding of the nutrition society* 36,38A (Abstract)
- Overton, T.R., Emmert, L.S., Clark, J.H., (1998). Effects of source of carbohydrate and protein and rumen-protected methionine on performance of cows. *J. Dairy Sci.* 81, 221–228.

Patton, R.A., (2010). Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: a meta-analysis. *J Dairy Sci.* 93(5), 2105-2118.

Pearson, D., (1976). *Laboratory Techniques in Food Analysis*. Butterworths, London.

Pimentel D., Pimentel M., (2003). Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *Am J Clin Nutr* 78 (suppl):660S–3S. Printed in USA. © 2003 American Society for Clinical Nutrition.

Pisulewsky, P.M., Rulquin, H., Peyraud, J.L. Verite, R., (1996). Lactational and systemic responses of dairy cows to postmortal infusions of increasing amounts of methionine. *J. Dairy Sci.* 79, 1781-1791.

Pobel D, Riboli E, Cornée J, Hémon B, Guyader M., (1995). Nitrosamine, nitrati e nitriti in relazione al cancro gastrico: uno studio caso-controllo a Marsiglia, Francia. Nitrosamine, nitrate and nitrite in relation to gastric cancer: a case-control study in Marseille, France. *Eur J Epidemiol* 11:67-73.

Power, J. F., B. Eghball, and J. A. Lory. (1994). Utilization of nutrients in beef cattle feedlot manure in the Northern Great Plains. pp 161-167. In: *Proc. Great Plains Animal Waste Conference on Confined Animal Production and Water Quality: Balancing Animal Production and the Environment*. GPAC Publ. No. 151. Great Plains Agric. Council, Fort Collins, CO.

Puppo, S., Bartocci, S., Terramoccia, S., Grandoni, F., Amici, A., (2002). Rumen microbial counts and *in vivo* digestibility in buffaloes and cattle given different diets. *J.Anim. Sci.* 75, 323-329.

Ressom, R., Soong, F.S., Fitzgerald, J., Turczyonowicz, L., E.I. Saadi, O., Roder. D., Maynard, T., Falconer, I. (1994). *Health Effects of Toxic Cyanobacteria (Blue-Green Algae)*. Canberra, Australia: National Health and Medical Research Council, Looking Glass Press.

Righi F., Quarantelli A., Bonomi A., Renzi M., (2004). L'assunzione di sostanza secca nella vaccada latte: parametri correlati, regolazione fisica e chimica. *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma* (Vol. XXIV, 299 – 315).

Robinson P. H., Chalupa W., Sniffen C. J., Julien W. E, Sato H., Fujieda T., Watanabe K., Suzuki H., (1999). Influence of postruminal supplementation of methionine and lysine, isoleucine, or all three amino acids on intake and chewing behavior, ruminal fermentation, and milk and milk component production. *J. Anim. Sci.* 77:2781-2792.

- Rockstrom J., (2009). A Safe Operating Space for Humanity. *Nature* vol. 461: 472-475.
- Rodhe, H., (1990). A comparison of the contribution of various gases to the greenhouse effect. *Science*, Vol. 248 no. 4960 pp. 1217-1219
- Roseler, D.K., Fergusen, J.D., Sniffen ,C.J., Herrema. J., (1993). Dietary protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen and milk nonprotein nitrogen in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 76, 525–534.
- Rotz C. A., (2004). Management to reduce nitrogen losses in animal production. *J. Anim. Sci.* 82: 119-137.
- Rotz C. A., Buckmaster D. R., Comerford J. W., (2005). A beef herd model for simulating feed intake, animal performance, and manure excretion in farm systems. *J. Anim. Sci.* 83: 231-242.
- Rulquin H. Delaby L., (1997). Effects of the energy balance of dairy cows on lactational responses to rumen-protected methionine. *J. Dairy Sci.* 80:2513–2522.
- Samuelson, D.J., Denise, S.K., Roffler, R.R., Ax, L., Armstrong, D.V., Romagnolo, D.F., (2001). Response of Holstein and Brown Swiss cows fed alfalfa hay-based diets to supplemental methionine at two stages of lactation. *J. Dairy Sci.* 84, 917–928.
- SangwanD. C., Pradhan, K., Bhatia, S. K., Sagar, V. and Sadhana S., (1990). Associative effect of wheat straw or oat hay with protein supplements on rumen metabolites and nutrient digestibility in cattle and buffalo. *Indian Journal of Animal Sciences* 60: 472-479.
- Schmidt, J., Sipocz, P., Cenkvari, E., Sipocz, J., (1999). Use of protected methionine (Mepron M 85) in cattle. *Acta Vet. Hung.* 47, 409–418. *Science*, 248: 1217-1219.
- Sen, N.P., Smith, D.C., and Schwinghamer, L., (1969). Formation of N-nitrosamines from secondary amines and nitrite in human and animal gastric juice. *Food and Cosmetics Toxicology* 7,301-307.
- Socha, M.T., Putnam, D.E., Garthwaite, B.D., Whitehouse, N.L., Kierstead, N.A., Schwab, C.G., Ducharme, G.A., Robert J.C., (2005). Improving intestinal amino acid supply of pre- and postpartum dairy cows with rumen-protected methionine and lysine. *J. Dairy Sci.* 88, 1113-1126.

Sommer, S. G., Olesen J. E. and B. T. Christensen, (1991). Effects of temperature, wind speed and air humidity on ammonia volatilization from surface applied cattle slurry. *The Journal of Agricultural Science*, 117 , pp 91-100 doi:10.1017/S0021859600079016.

Sommer, S.G. and Olesen, J.E. (1991). Effect of dry matter content and temperature on ammonia loss from surface-applied cattle slurry. *J. Environ. Qual.* 20:679-683.

Steinfeld H., Gerber P., Wassenaar T., Castel V., Rosales M., de Haan C., (2006). *Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Stevens, R.J., and R.J. Laughlin. (1997). The impact of cattle slurries and their management on ammonia and nitrous oxide emissions from grassland. *In* S.C. Jarvis and B.F. Pain (ed.) *Gaseous Nitrogen Emissions from Grasslands*. CAB International, Oxford, UK. studies. J

Succi, G., Crovetto, G.M., (1999). Nutritional strategies in ruminant feeding. *In*: CIHEAM. *Feed Manufacteig in the Mediterranean Region*. Recent advances in Research and technology. 241-257 pp.

Tamminga S., (1992). Nutrition Management of Dairy Cows as a Contribution to Pollution Control *J Dairy Sci.*75: 345-357.

Terramoccia, S., Bartocci, S., Amici, A., Martillotti, F., (2000). Protein and protein-free dry matter rumen degradability in buffalo, cattle and sheep fed diets with different forage to concentrate ratios. *Livest. Prod. Sci.* 65, 185-195.

Thanh, T.K., Ørskov, E.R. (2005). Causes of differences in urinary excretion of purine derivatives in buffaloes and cattle. *Anim. Sci.* 82: 355-358.

Valadares R. F. D., Broderick G. A., Valadares Filho S. C., Clayton M. K., (1999). Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J. Dairy Sci.* 82:2686–2696.

Van Aardenne, J.A. van Aardenne, F.J. Dentener, G.J. Olivier, C.G.M. Klein Goldewijk and J. Lelieveld, A., (2001). 1°x1° resolution data set of historical anthropogenic trace gas emissions for the period 1890–1990. *Global Biogeochemical Cycles*, 15: 4 , pp. 909–928.

Van Horn H., Wilkie A. C., Powers W. J., Nordstedt R. A., (1994). Components of Dairy Manure Management Systems. *J Dairy Sci.* 1994 77: 2008-2030.

Van Keulen, J. and Young, B.A., (1977). Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *J. of Animal Sci.* 44:282-287.

Van Nevel, C. J., and D. I. Demeyer., (1996). Control of rumen methanogenesis. *Environ. Monit. Assess.* 42:73-97.

Van Soest P. J., Robertson J. B., Lewis B. A., (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 74: 3583-3597.

Van Soest, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. Second ed. (1994). Cornell University Press. United States. 291–303.

Veerasamy, S., Rattan, L., Jeffrey, L. and Thaddeus, E., (2010). Measurement and prediction of enteric methane emission. *Int J Biometeorol* 55:1–16.

W. B. Davidson, J. L. Doughty, and J. L. Bolton, (1942). Livestock poisoning by oat hay and other plants containing nitrate. *Wyoming Agr. Expt. Sta. Bull.*, 241.

Wagner, J. J., K. S. Lusby, J. W. Oltjen, J. Rakestraw, R. P. Wettemann and L. E. Walters, (1988). Carcass composition in mature Hereford cows: Estimation and effect on daily metabolizable ewg requirement during Winter. *J. Anim. Sci.* 66: 603-612.

Wallace, R. J., (1996). Ruminal microbial metabolism of peptides and aminoacid. *J. Nutr.* 126:1326s-1334s

Watanabe, M.F., Oishi, S., Harada, K.L., Matsura, K., Kawai, H., Suzuki, M., (1988). Toxins contained in *Microcystis* specie of cyanobacteria (Blue-green algae). *Toxicon*; 26:1017-25.

Wattiaux, M. A., (1998). Protein metabolism in dairy cows. In: Technical Dairy Guide—Nutrition, 2nd edition. The Babcock Institute for International Dairy Research and Development. The University of Wisconsin  
<http://babcock.cals.wisc.edu/publications/overview>.

Whitlock C., (2004). Land management: Forests, fires and climate. *Nature* 432, 28-29 doi:10.1038/432028a; Published online 3 November 2004.

Wilkerson, V. A., D. P. Casper, D. R. Mertens, and H. F. Tyrrell., (1994). Evaluation of several methane prediction equations for dairy cows. In: J. F. Aguilera (Ed.) Proc. 13th Symp. on Energy Metabolism of Farm Animals. Mojacar, Spain. EAAP Publ. 76.



Wilkerson, V.A., Mertens, D.R., Casper D.P., (1997). Prediction of excretion of manure and nitrogen by Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 80:3193–3204.

William H. S., (2009). On the fate of anthropogenic nitrogen. *PNAS* vol. 106:203–208.

Wright M. D., Loerch S. C., (1988). Effects of Rumen-Protected Amino Acids on Ruminant Nitrogen Balance, Plasma Amino Acid Concentrations and Performance. *J. Anim. Sci.* 66: 2014-2027.

Wright, M. J. and Davison K.L., (1964). Nitrate accumulation in crops and nitrate poisoning in animals. In: *Advances in Agronomy*, Academic Press, Inc., New York, 16, 197- 247.

X. Huang, R. Qiu, Chak K. Chan, Pathak Ravi Kant., (2011). Evidence of high PM<sub>2.5</sub> strong acidity in ammonia-rich atmosphere of Guangzhou, China: Transition in pathways of ambient ammonia to form aerosol ammonium at  $[\text{NH}_4]/[\text{SO}_4]=1.5$ . *Atmospheric Research*.

Yaremcio B., (1991). Nitrate poisoning and feeding nitrate feeds to livestock. *Agri-Facts*. Agdex 400/ 60-1. Available at: [http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/agdex851](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/agdex851).

Yasuhiko T., (2002). Lysine and other amino acids for feed: production and contribution to protein utilization in animal feeding: protein sources for the animal feed industry. <http://www.fao.org/docrep/007/y5019e/y5019e0a.htm>.

Younge, B.A., Murphy, J.J., Rath, M., Sloan, B.K., (2001). Effect of dietary absorbable methionine and lysine concentrations on milk production and composition of dairy cows offered grass-silage based diets. *Irish J. Agr. Food Res.* 40, 1-11.

Zicarelli L., (2008). Alimentazione della bufala da latte.