

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Animali

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

AGLIO COME ADDITIVO NELLA DIETA DI VACCHE DA LATTE: EFFETTI *IN VITRO* SUI PROCESSI FERMENTATIVI RUMINALI E SULLA PRODUZIONE DI IDROGENO E METANO

Relatore: Prof. Franco Tagliapietra

Correlatore: Dott. Giulia Rossi

Laureanda: Alessia Tognetto

Matricola: 1128520

ANNO ACCADEMICO 2016-2017

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1 Riscaldamento globale	5
1.1.1 Emissioni a livello globale e nel settore zootecnico	5
1.2 Metano	9
1.2.1 Il rumine e le fermentazioni ruminanti	13
1.2.2 Microbiologia ruminale	19
1.3 Strategie di mitigazione della produzione di metano	21
1.3.1 Estratti vegetali delle piante come additivi nella dieta dei ruminanti	22
1.3.2 Effetti degli estratti vegetali sulle fermentazioni ruminanti	25
2. OBIETTIVI	27
3. MATERIALI E METODI	28
3.1 Descrizione disegno sperimentale <i>in vivo</i>	28
3.2 Descrizione disegno sperimentale <i>in vitro</i>	30
3.2.1 Preparazione dell'incubazione	31
3.2.2 Preparazione dei campioni il giorno dell'incubazione	34
3.2.3 Incubazione	35
3.2.3.1 <i>Procedure di incubazione</i>	37
3.2.3.2 <i>Chiusura incubazione</i>	39
3.3 Analisi chimiche	40
3.3.1 Misurazione del pH	40
3.3.2 Determinazione degli acidi grassi volatili (AGV)	41
3.3.3 Azoto ammoniacale (N-NH ₄)	42
3.3.4 Fibra neutro detersa (NDF)	42
3.3.5 Analisi dei gas di fermentazione	43
3.3.6 Determinazione della conta protozoaria	44
3.4 Procedure di calcolo	46
3.5 Analisi statistica dei dati	49

4.	RISULTATI	50
4.1	Effetto dell'aglio <i>in vivo</i>	50
4.2	Effetti degli additivi <i>in vitro</i>	52
4.2.1	Effetti sulla degradabilità e sui prodotti della fermentazione	52
4.2.2	Effetti sui gas di fermentazione	57
4.2.3	Effetti sulla quantificazione protozoaria	62
5.	DISCUSSIONE	64
6.	CONCLUSIONI	70
	BIBLIOGRAFIA	71
	SITOGRAFIA	79

RIASSUNTO

L'anidride carbonica, il metano e il protossido di azoto sono i principali gas di origine antropica che contribuiscono all'effetto serra. Sono noti perché hanno un impatto significativo sui cambiamenti climatici, causando modificazioni alla composizione dell'atmosfera terrestre. Le emissioni di metano vengono rilasciate principalmente dal settore zootecnico, in particolare dalle fermentazioni enteriche dei ruminanti. Tra le diverse strategie di mitigazione, l'impiego di aglio come additivo nell'alimentazione delle vacche da latte è una soluzione che può consentire di ridurre le produzioni di metano enterico e le perdite di efficienza alimentare.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare l'effetto dell'aglio e del suo estratto vegetale, il diallyl sulfide, sulle fermentazioni ruminali, con particolare attenzione alla produzione di idrogeno e metano.

La prova è stata suddivisa in due parti, una *in vivo* e una *in vitro*, ciascuna caratterizzata da tre periodi di trattamento. La parte *in vivo* ha previsto l'alimentazione di tre bovine da latte, secondo un disegno sperimentale a quadrato latino 3 x 3, con una dieta di lattazione senza l'aggiunta di additivi (trattamento di controllo "CTR") o integrata con 400 e 1200 g/d di aglio ("aglio400" e "aglio1200" rispettivamente). Per ogni periodo sperimentale della prova *in vivo*, è stata realizzata una prova *in vitro* che ha previsto il confronto di 6 trattamenti sperimentali in 4 repliche con l'aggiunta di 5 bianchi per un totale di 29 bottiglie incubate. La dieta delle lattifere è stata incubata con il liquido ruminale prelevato dalle tre bovine (tesi di CTR, aglio400 e aglio1200) senza ulteriore aggiunta di additivi. Inoltre, il liquido ruminale della tesi CTR è stato incubato con l'aggiunta di 0,12 g e 0,36 g di aglio macinato (A012 e A036) e con 1 ml di diallyl sulfide (DAS). Le 3 prove di incubazione *in vitro*, hanno avuto una durata di 24 ore e hanno previsto l'impiego della strumentazione Ankom^{RF} System Gas Production, in grado di registrare e misurare la cinetica e i quantitativi di gas prodotto.

Per il liquido ruminale *in vivo* non pre-adattato (CTR) e pre-adattato (aglio 400 e aglio1200) con l'aggiunta di dosi crescenti di aglio, sono state eseguite le analisi degli acidi grassi volatili singoli e totali (AGV), dell'azoto ammoniacale (N-NH₄) e del pH. Inoltre è stata misurata l'ingestione alimentare, la produzione di latte e l'indice di conversione alimentare (ICA).

Il liquido di fermentazione delle prove *in vitro* è stato analizzato per determinare il pH, la degradabilità della fibra (NDFd) e della sostanza secca (TDMd), la concentrazione di acidi grassi volatili (AGV), l'azoto ammoniacale (N-NH₄), la produzione cumulata di gas (GP) a 24 ore, la cinetica di produzione di gas, la produzione di idrogeno e metano e la conta protozoaria.

Nella prova *in vivo*, rispetto alla tesi di controllo (*CTR*), l'aggiunta in dosi crescenti di aglio (*aglio400* e *aglio1200*), non ha determinato effetti significativi sui parametri fermentativi ruminanti.

L'incubazione *in vitro* dei liquidi ruminanti pre-adattati *in vivo* (*CTR* vs *aglio400* e *aglio1200*), evidenzia che, rispetto alla tesi di controllo, i liquidi ruminanti delle vacche alimentate con aglio hanno una minore capacità degradativa della fibra e riducono la produzione di acido propionico a favore dell'acido N-butyrico. Viceversa, la produzione di metano e idrogeno e la presenza di protozoi, è aumentata quando è stato utilizzato il liquido ruminale delle vacche alimentate con aglio.

Rispetto alla tesi di controllo (*CTR*), l'incubazione *in vitro* di dosi crescenti di aglio (*A012* e *A036*), ha determinato effetti significativi sul livello del pH e sulle concentrazioni di acidi grassi volatili. In particolare, si osserva un aumento della produzione di acido propionico e una riduzione dell'acido acetico e N-butyrico. L'impiego invece dell'estratto vegetale, diallyl sulfide, ha incrementato il livello di pH e ha ridotto la degradabilità della fibra e della sostanza secca, come pure la produzione di acido acetico a favore dell'acido N-butyrico. Entrambi gli additivi, hanno esercitato una riduzione sulla produzione di metano, con effetti significativi per quanto riguarda l'utilizzo di aglio in dosi 0.12g e 0.36 g, e anche sulla produzione di idrogeno che si è ridotta in misura significativa. Inoltre, rispetto alla tesi di controllo (*CTR*), l'aggiunta di aglio in dosi 0.36 g e del diallyl sulfide, ha diminuito il numero di protozoi appartenenti all'ordine *Holotricha*.

In conclusione, la presente prova suggerisce che l'alimentazione delle vacche con aglio anche in dosaggi molto elevati ha effetti limitati sui parametri fermentativi ruminanti. Al contrario, i liquidi ruminanti incubati *in vitro* hanno modificato i processi fermentativi, la produzione di metano e la popolazione protozoaria. Gli effetti più rilevanti, sono stati osservati quando gli additivi sono stati incubati *in vitro*, infatti sia l'aglio che il suo principale principio attivo, hanno modificato i processi fermentativi incrementando la produzione di acido propionico e riducendo la produzione di metano e idrogeno e la presenza dei protozoi.

ABSTRACT

Carbon dioxide, methane and nitrous oxide are the main anthropogenic gases contributing to the greenhouse effect. Are known to have a significant impact on climate, causing changes in the composition of Earth's atmosphere. Methane emissions are released mainly from the livestock sector, especially from enteric fermentation of ruminants. Among the various mitigation strategies, the use of garlic as an additive in dairy cow nutrition is a solution that can help reduce enteric methane production and feed efficiency. The aim of this thesis was to evaluate the effect of garlic and its plant extract, the diallyl-sulfide on rumen fermentation, with special attention to the production of hydrogen and methane. The test was divided into two parts, one *in vivo* and *in vitro*, each with three treatment periods. The *in vivo* foresaw the power of three dairy cows, according to a 3 x 3 latin square experimental design, with a diet of milk without additives (control treatment "CTR") or integrated with 400 and 1200 g/d of garlic ("garlic400" and "garlic1200" respectively). For each experimental period of *in vivo* testing, an *in vitro* test was carried out that provided for a comparison of 6 experimental treatments in 4 replicas with the addition of 5 whites for a total of 29 incubated bottles.

The diet of cows were incubated with rumen fluid taken from three cows (CTR, *garlic400* and *garlic1200*) without further additives. In addition, the rumen fluid of thesis CTR was incubated by adding 0.12 g 0.36 g of garlic powder (A012 and A036) and 1 ml of diallyl sulfide (DAS). The 3 tests *in vitro* incubation, lasted 24 hours and involved the use of instrumentation AnkomRF Gas Production System, able to record and measure the kinetics and the quantities of gas produced. For *in vivo* rumen fluid not pre-adapted (CTR) and pre-adapted (*garlic 400* and *garlic1200*) with the addition of increasing doses of garlic, you have performed the analysis of individual and total volatile fatty acids (AGV), ammoniacal nitrogen (N-NH₄) and pH. Was also measured feed intake, milk production and feed conversion index (ICA). The liquid fermentation of *in vitro* tests were analyzed to determine the pH, the degradability of fiber (NDFd) and solids (TDMd), the concentration of volatile fatty acids (AGV), ammonia nitrogen (N-NH₄), cumulative gas production (GP) in 24 hours, the kinetics of gas production, the production of hydrogen and methane and protozoal.

In the *in vivo* evidence, compared to control (CTR), adding in increasing doses of garlic (*garlic400* and *garlic1200*), did not result in significant effects on rumen fermentation parameters. *In vitro* incubation of rumen liquid pre-adapted *in vivo* (CTR vs *garlic400* and *garlic1200*), highlights that, compared to the thesis of control, rumen fluid of dairy cows fed with garlic have lower capacity fiber degradative and reduce propionic acid production in favour of N-butyric acid. Conversely, the production of methane and hydrogen and the presence of protozoans, is en-

hanced when you used the rumen fluid of dairy cows fed with garlic. Compared to control (*CTR*), *in vitro* incubation of increasing doses of garlic (*A012* and *A036*), resulted in significant effects on the level of pH and the concentrations of volatile fatty acids. In particular, we observe an increase in the production of propionic acid and acetic acid and N-butyric acid reduction. Use instead of vegetable extract, diallyl sulfide, has increased the level of pH and reduced the degradability of dry matter and fiber, as well as acetic acid production in favour of N-butyric acid. Both additives, exerted a reduction on the production of methane, with significant effects with regard to the use of garlic in 0.12 g dose and 0.36 g, and also on the production of hydrogen which was reduced significantly. Furthermore, compared to control (*CTR*), adding 0.36 g dose diallyl sulfide and garlic, diminished the number of protozoa belonging to the order *Holotricha*. In conclusion, this evidence suggests that feed the cows with garlic even in very high dosages has limited effects on rumen fermentation parameters. In contrast, the rumen liquid incubated *in vitro* have amended the fermentation processes, the production of methane and protozoal population. The most significant effects were observed when the additives were incubated *in vitro*, in fact both garlic that its main active ingredient, they modified the fermentation processes by increasing the production of propionic acid and reducing production of methane and hydrogen and the presence of protozoa.

1. INTRODUZIONE

1.1 Riscaldamento globale

Il riscaldamento globale del pianeta è un fenomeno determinato dall'accumulo nell'atmosfera di alcuni gas che hanno la capacità di trattenere parte delle radiazioni infrarosse emanate dalla superficie terrestre: l'alterazione del bilancio energetico terrestre determina l'aumento delle temperature globali, da cui i cambiamenti del clima che causano impatti sulla natura e sull'attività dell'uomo (Caserini, 2015; Crovetto & Sandrucci, 2010).

Questi gas vengono definiti gas ad effetto serra (GHG) e sono principalmente l'anidride carbonica (CO₂), il metano (CH₄), il protossido di azoto (N₂O) e i gas fluorurati.

Contribuiscono in misura significativa ai cambiamenti climatici, in particolare si prevede che le temperature superficiali globali aumenteranno da 0.3° a 1.4°C entro il 2030 e nel 2070 si verificherà un aumento tra 0.6 e 2.8 °C (Mirzaei-Aghsaghali & Maheri-Sis, 2011).

Moss et al. (2000) ha riportato che nel 2030 il mondo sarà di 1-2°C più caldo di oggi e il livello del mare aumenterà da 17 a 26 cm, soprattutto a causa dell'espansione termica degli oceani e dall'aumento della fusione dei ghiacciai nelle aree Artiche e Antartiche.

1.1.1 Emissioni a livello globale e nel settore zootecnico

Le emissioni di gas ad effetto serra (GHG) di origine antropica hanno continuato ad aumentare dal 1970 al 2010 (Edenhofer et al., 2014) e per questo motivo il riscaldamento globale assume un'importanza notevole.

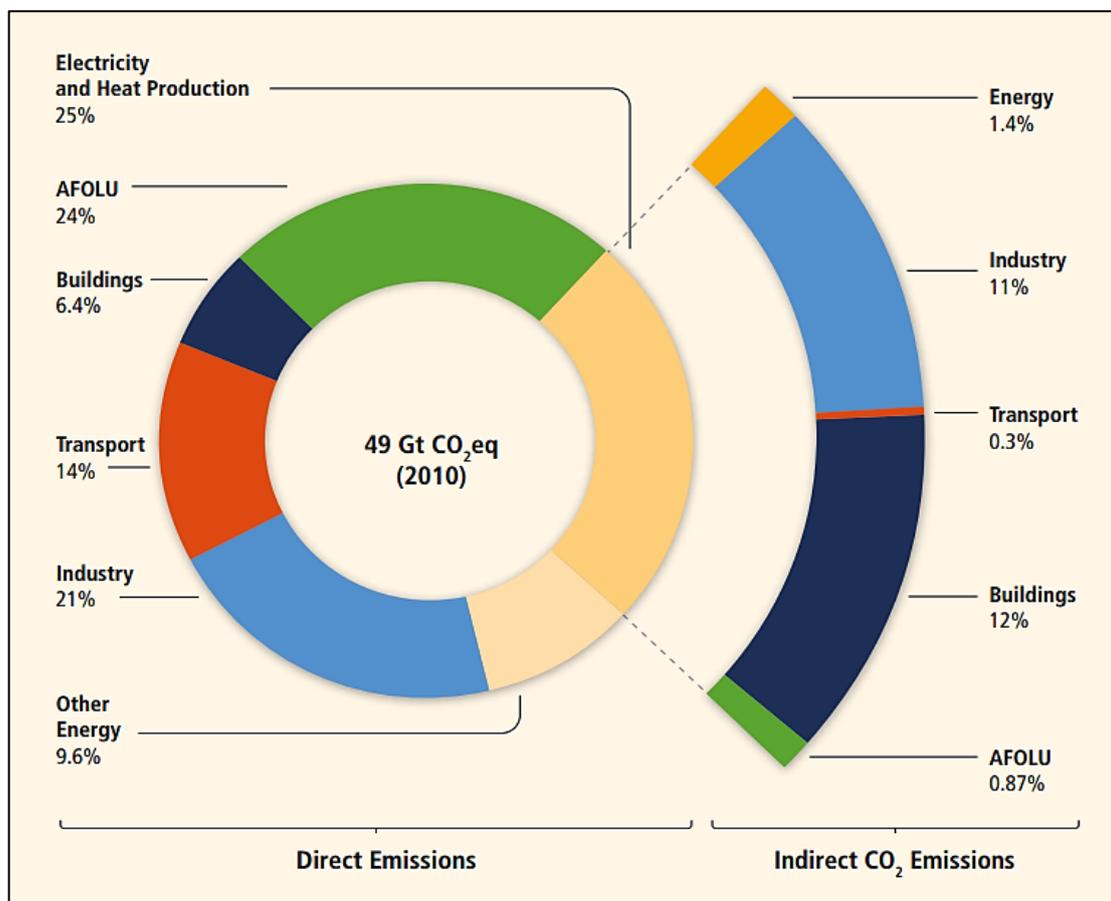
Le emissioni di gas serra descritte in seguito, sono state espresse in termini di equivalente di anidride carbonica: CO₂-eq (Coderoni et al., 2010).

Le emissioni annuali di GHG sono aumentate in media di 1.0 GtCO₂-eq per anno (2.2%) dal 2000 al 2010 rispetto a 0.4 GtCO₂-eq per anno (1.3%) dal 1970 al 2000. Le emissioni di origine antropica di GHG sono state le più alte nella storia umana dal 2000 al 2010 e hanno raggiunto i 49 GtCO₂-eq/anno nel 2010 (Edenhofer et al., 2014).

In particolare, nel 2010, il 35% (17 GtCO₂-eq) delle emissioni di GHG è stato rilasciato dal settore energetico, il 24% (12 GtCO₂-eq) dal settore "AFOLU" (agricoltura, silvicoltura e altro uso del suolo), il 21% (10 GtCO₂-eq) dall'industria, il 14% (7 GtCO₂-eq) dal trasporto e il 6.4% (3.2 GtCO₂-eq) dal settore dell'edilizia. Mentre le emissioni provenienti dalla produzione di elettricità e calore, che utilizzano l'energia finale (cioè le emissioni indirette), il settore

dell'industria e delle costruzioni rilasciano rispettivamente il 31% e il 19% delle emissioni globali di GHG.

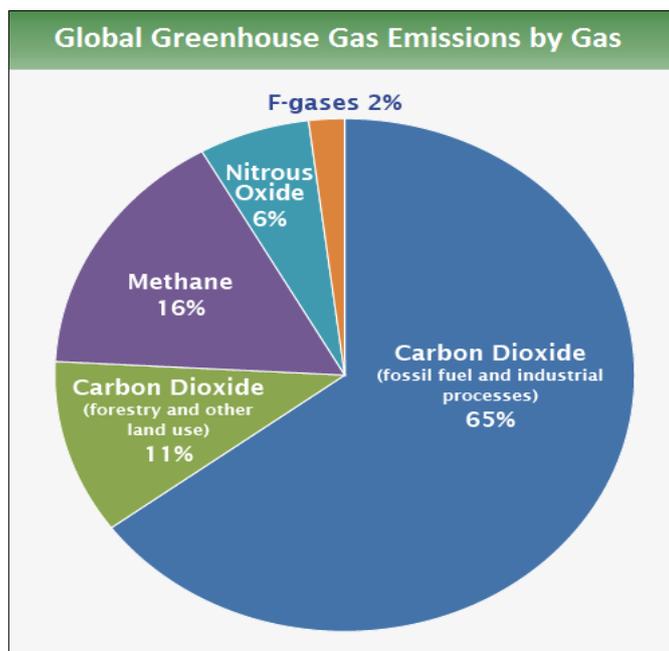
Figura 1. Emissioni totali di GHG di origine antropica nel 2010 (Edenhofer et al.,2014)



Le emissioni di anidride carbonica (CO₂) derivanti dalla combustione dei combustibili fossili e dai processi industriali, hanno contribuito al 78% circa dell'incremento totale delle emissioni di gas serra dal 1970 al 2010, con un contributo percentuale simile per il periodo 2000-2010. Quelle derivanti dai combustibili fossili hanno raggiunto 32 GtCO₂-eq/anno nel 2010, e crescono di circa il 3% tra il 2010 e il 2011 e di circa il 1-2% tra il 2011 e il 2012.

Dei 49 GtCO₂-eq /anno, l'anidride carbonica rimane il principale gas serra di origine antropica che rappresenta il 76% di tutte le emissioni di GHG antropogeniche nel 2010. Segue poi il metano (CH₄), con un 16% e il protossido di azoto (N₂O) con un contributo del 6%. Il rimanente 2% deriva da una piccola parte di gas chiamati gas-fluorurati (F-gases) (Edenhofer et al.,2014).

Figura 2. Emissioni globali di GHG stimate nel 2010 (www.epa.gov/ghgemissions/global-greenhouse-gas-emissions-data)



È stato stimato che il settore zootecnico rilascia circa 7.1 Gt di CO₂-eq per anno, rappresentando il 14.5 % di tutte le emissioni causate dalle attività dell'uomo, giocando un ruolo importante nel cambiamento climatico (Gerber et al.,2013).

Secondo i dati riportati da Barker et al. (2007), il settore zootecnico emette i seguenti gas ad effetto serra:

- 2 Gt di CO₂-eq di CO₂ per anno, pari al 5 % delle emissioni antropiche di CO₂;
- 3.1 Gt di CO₂-eq di CH₄ per anno, pari al 44 % delle emissioni antropiche di CH₄;
- 2 Gt di CO₂-eq di N₂O per anno, pari al 53 % delle emissioni antropiche di N₂O

Le emissioni di idrofluorocarboni (HFCs) sono marginali su scala globale.

Secondo Gerber et al. (2013), i principali contributori di emissioni totali nel settore zootecnico sono i bovini, rappresentando il 65 % (circa 4,6 Gt di CO₂-eq). La produzione delle carni bovine contribuisce a 2.9 Gt CO₂-eq, o 41% delle emissioni totali del settore, mentre la produzione del latte bovino ammonta a 1.4 Gt CO₂-eq, o 20 %.

Il settore suinicolo, avicolo, bufalino e quello dei piccoli ruminanti hanno livelli di emissione molto più bassi, ciascuno dei quali rappresenta tra il 7% e il 10% delle emissioni totali nel settore zootecnico.

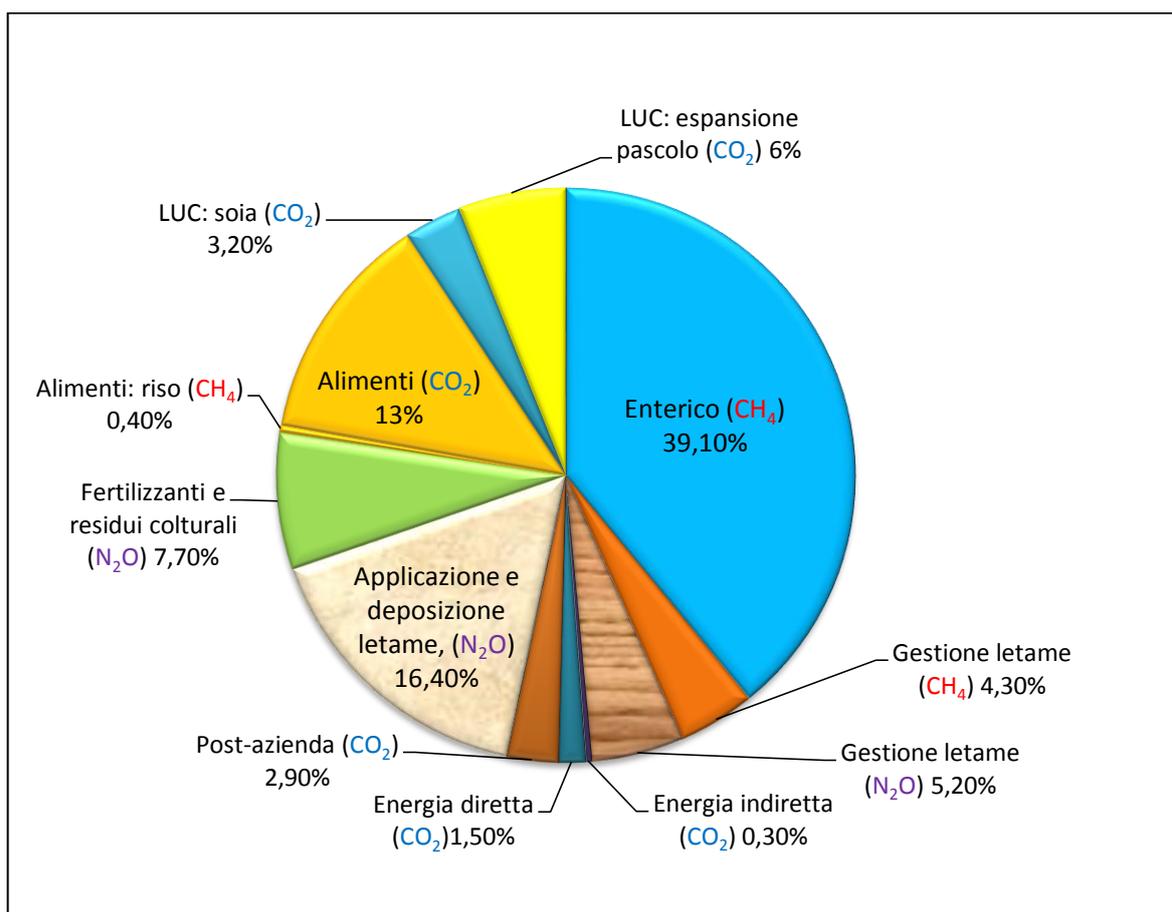
A livello mondiale, nei paesi sviluppati dove l'agricoltura praticata sui pascoli è una parte significativa dell'economia (ad esempio, in Irlanda e Nuova Zelanda) o nei paesi in via di sviluppo con popolazioni di bestiame di grandi dimensioni (ad esempio, Brasile e India), i ruminanti sono considerati un contributo molto grande di emissioni di gas serra a livello nazionale (Gerber et al., 2010).

Come si può osservare in Figura 3, le fermentazioni enteriche rappresentano la più grande fonte di produzione di metano, contribuendo circa al 40% del totale delle emissioni nel settore zootecnico. Seguono poi con un 10% la gestione del letame e le coltivazioni di riso. I fertilizzanti e i residui colturali, assieme alla deposizione e gestione del letame sui pascoli, emettono grandi quantità di protossido di azoto (N_2O), circa il 30%.

L'ultimo gas ad effetto serra sotto forma di anidride carbonica (CO_2) è emesso in misura significativa dalla produzione, lavorazione e trasporto dei mangimi, con un contributo del 13%.

Il cambiamento di utilizzo del suolo (*LUC*) rappresenta invece il 10% delle emissioni globali, rilasciando emissioni di CO_2 da terreni destinati sia all'utilizzo del pascolo e sia alla coltivazione dei mangimi, tipo la soia. Le emissioni associate al consumo di energia (direttamente o indirettamente legati ai combustibili fossili) sono rilasciate principalmente dalla produzione di mangimi e dai fertilizzanti. In ultima, una piccola quota pari al 2.9%, deriva anche dalla trasformazione e dal trasporto dei prodotti di origine animale tra il punto di produzione e il punto di vendita al dettaglio (*POST-AZIENDA*) (Gerber et al., 2013).

Figura 3. Fonti di emissioni globali di GHG nel settore zootecnico (Gerber et al., 2013)



1.2 Metano

Il metano costituisce il secondo gas serra più significativo dopo l'anidride carbonica e, rappresenta fino al 20-30 % dell'effetto del riscaldamento globale (Solomon, 2007).

Il potenziale di riscaldamento globale (GWP) combina la capacità di un gas ad assorbire la radiazione a raggi infrarossi, la sua vita nell'atmosfera e la durata di tempo in cui i suoi effetti sul clima della terra devono essere quantificati (l'orizzonte temporale). La definizione più comune del potenziale di riscaldamento globale è il GWP-100 anni, che viene utilizzato in tutte le politiche internazionali e governative compreso il protocollo di Kyoto (Figura 4). Nel caso del metano, su un orizzonte temporale di 100 anni, una tonnellata è 23 volte più potente di una tonnellata di anidride carbonica. Questo fa del metano un'opzione interessante per ridurre le emissioni di gas a effetto serra.

Vale anche la pena notare che, il metano ha una durata relativamente breve nell'atmosfera di solo 12 anni, rispetto ai 200 anni per l'anidride carbonica. Ciò significa che le riduzioni delle emissioni sono rapidamente trasformate in riduzioni di concentrazione atmosferica. I gas con una

vita più lunga raggiungono concentrazioni atmosferiche più elevate con un ritardo più lungo tra riduzioni delle emissioni e riduzione delle concentrazioni atmosferiche (Jardine et al., 2004).

Dai dati riportati in Figura 4, la durata dell'anidride carbonica in atmosfera in realtà è variabile e può non essere specificata con precisione. Secondo Archer & Brovkin (2008) il tempo di invasione della vita atmosferica della CO₂ potrebbe essere di un centinaio di anni più una frazione significativa che cambia il clima in continuazione.

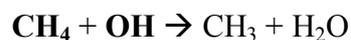
Figura 4. Global Warming Potentials for the greenhouse gas 'basket' (Jardine et al., 2004)

<i>Global Warming Potential</i>				
<i>(time horizon years)</i>				
<i>Gas</i>	<i>Lifetime (years)</i>	<i>20 years</i>	<i>100 years</i>	<i>500 years</i>
CO ₂	5-200	1	1	1
CH ₄	12	62	23	7
N ₂ O	114	275	296	156
HFC _s	0.3-260	40-9400	12-12000	4-10000
PFC _s	2600-50000	3900-8000	5700-11900	8900-18000
SF ₆	3200	15100	22200	32400

Fonti di rimozione del metano

Il metano viene rimosso dall'atmosfera (cioè convertito in prodotti meno dannosi) da una serie di processi chimici e biologici che si verificano in diverse regioni dell'atmosfera. Questi includono l'ossidazione troposferica, l'ossidazione stratosferica e l'assorbimento dai suoli (Jardine et al., 2004).

La troposfera rappresenta il livello più basso dell'atmosfera. Come aria più fredda, si trova in cima all'aria più calda in questa sezione dell'atmosfera ed è ben mescolata verticalmente dalle correnti di convezione. Il metano è presente ad una concentrazione costante di circa 1.7 ppm in tutta la troposfera e la sua rimozione attraverso l'ossidazione, è di circa 506 Mt di metano all'anno dal carico globale del metano (Jardine et al., 2004). In particolare, dopo il vapore acqueo e l'anidride carbonica (CO₂), il metano rappresenta il gas ad effetto serra più abbondante nella troposfera (Wuebbles & Hayhoe, 2002) e circa l'85% viene principalmente eliminato attraverso l'ossidazione con i radicali idrossilici (OH) secondo la reazione seguente (Cicerone & Oremland, 1988; Le Mer & Roger, 2001):



L'ossidazione, che consuma OH, porta alla formazione di formaldeide (CH_2O), anidride carbonica (CO_2), monossido di carbonio (CO), acqua (H_2O) e idrogeno (H_2).

Sopra la troposfera troviamo la stratosfera, che è meno densa della troposfera e non è miscelata verticalmente dalla convezione, in quanto l'aria più calda si trova in cima all'aria più fredda in questa regione. La maggior parte del metano presente nella troposfera, passa nella stratosfera e viene consumato da reazioni chimiche, quindi la concentrazione relativa del metano diminuisce con l'altitudine. Circa 40 Mt all'anno di metano sono ossidati nella stratosfera, rappresentando il 7% di tutta la rimozione del metano (Jardine et al., 2004).

La chimica del metano nella stratosfera inferiore, è identica a quella della troposfera, con i radicali ossidrilici (OH) che ossidano il metano nello stesso modo. Infatti, l'ossidazione del metano all'anidride carbonica e all'acqua rappresenta la fonte di circa il 50% del vapore acqueo stratosferico.

Nella stratosfera superiore invece, la decomposizione del metano con conseguente rimozione dall'atmosfera, può essere avviata in altri due modi: per reazione con i radicali di cloro (Cl) o con gli atomi di ossigeno (Jardine et al., 2004).

La reazione nel quale avviene la rimozione del metano attraverso gli atomi di cloro è la seguente (Le Mer & Roger, 2001):



In ultima, una piccola frazione di metano può attraversare la stratosfera e arrivare nella mezosfera, dove una luce UV molto corta di lunghezza d'onda, distrugge il metano fotoliticamente (Cicerone & Oremland, 1988).

Il terzo processo di rimozione del metano dall'atmosfera, si verifica nell'interfaccia di terra-atmosfera. Circa 30 Mt di metano vengono rimossi dall'atmosfera ogni anno con l'assorbimento nei suoli (Jardine et al., 2004).

Nel suolo, il metano viene prodotto nelle zone anaerobiche di terreni sommersi dai metanogeni e viene eliminato attraverso l'ossidazione in CO_2 dai metanotrofi nelle zone aerobiche dei terreni umidi e nei suoli delle montagne. Il trasferimento di metano dal suolo all'atmosfera avviene per lo più attraverso l'aerenchima (parenchima aerifero) delle piante acquatiche, ma anche dalla diffusione e dalle bolle che scappano dai terreni umidi. Le fonti di metano sono principalmente le zone umide. Tuttavia, il 60-90% del metano prodotto nelle zone anaerobiche delle zone umide viene re-ossidato nelle loro zone aerobiche (rizosfera e ossidazione terreno-acqua). Anche i

terreni aerobici consumano metano atmosferico ma, le loro attività, sono molto basse e i microrganismi coinvolti sono in gran parte sconosciuti (Le Mer & Roger, 2001).

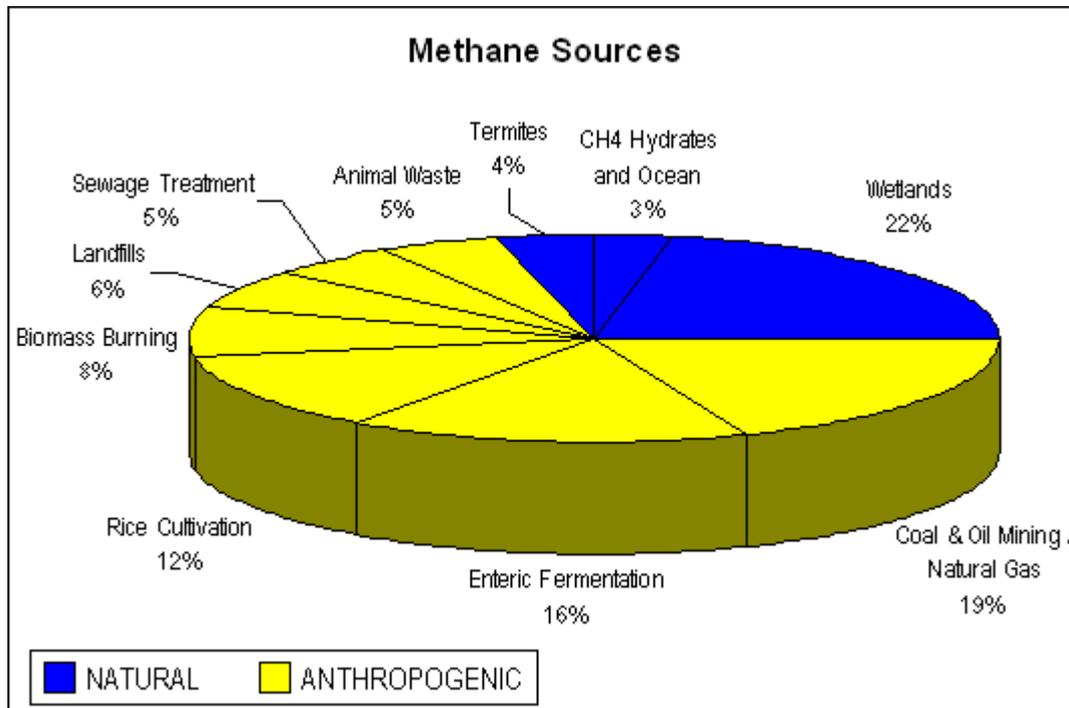
Fonti del metano

Come si può notare in Figura 5, le fonti naturali sono considerate responsabili per circa il 30% del totale delle emissioni di metano. Le zone umide rappresentano circa il 22%, seguono poi le termiti e gli oceani. Più della metà delle emissioni totali di metano, 71%, è dovuta alle attività umane. In particolare nel settore agricoltura, la principale fonte di emissione sono le fermentazioni enteriche, con un 16%, segue poi la coltivazione del riso, 12% e la gestione del letame, 5%. Le fonti prodotte dall'uomo come i combustibili fossili, la biomassa, le discariche, il trattamento delle acque reflue rappresentano il 38%. A livello globale, i ruminanti producono circa 80 milioni di tonnellate di metano, che conta annualmente circa il 28% delle emissioni totali di origine antropica (Beauchemin et al., 2008).

Si calcola inoltre che possono produrre una quantità di metano che varia da 250 a 500 l al giorno (Johnson & Johnson, 1995).

La categoria di animali ruminanti che emette gran parte del metano enterico sono i bovini con il 77 %, seguiti dai bufali, 13%, e dai piccoli ruminanti, 10% (Gerber et al., 2013).

Figura 5. Fonti di emissione globale di metano
 (<https://icp.giss.nasa.gov/education/methane/intro/cycle>)



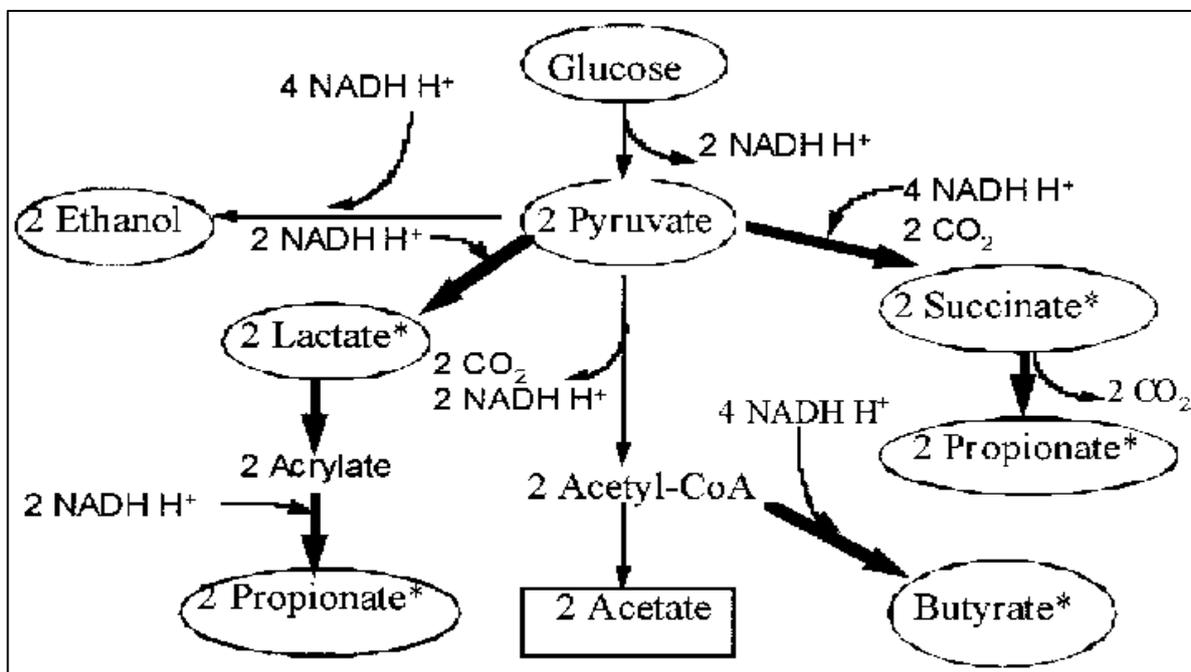
1.2.1 Il rumine e le fermentazioni ruminali

I ruminanti sono animali poligastrici, ovvero sono dotati di 4 prestomaci: rumine, reticolo, omaso e abomaso. A differenza dei monogastrici dove i processi fermentativi avvengono nell'intestino, in genere a livello di cieco e colon, per i ruminanti la fermentazione pre-gastrica avviene nel rumine grazie ad un'intensa attività microbica (Guglielmelli, 2009).

Il rumine è il più grande dei quattro compartimenti e presenta una capienza di oltre 100 litri in un bovino adulto. È costituito da una miscela gassosa composta da anidride carbonica (circa 65%) prodotta dall'attività microbica e dalla neutralizzazione degli acidi con il bicarbonato, che entrano nel rumine attraverso la saliva e il sangue, e da metano (circa 35%). Sono presenti anche piccole quantità di idrogeno, azoto, ossigeno che sono contaminate dall'aria e che entrano con l'alimento e con l'acqua. L'assenza di ossigeno rende l'ambiente ruminale strettamente anaerobico con un potenziale redox di 150-350 mV (Nagaraja, 2016). In queste condizioni, nel rumine il glucosio subisce un processo di fermentazione dal quale si ottiene la riduzione dei cofattori come NADH (Moss et al., 2000). In particolare, i monosaccaridi rilasciati dalla idrolisi dei polisaccaridi, sono ulteriormente metabolizzati e ridotti a co-fattori come NADH e NADPH.

Per essere ri-utilizzati nel sistema anaerobico e quindi per completare la fermentazione, questi co-fattori devono essere ossidati a NAD⁺ e NADP⁺ da elettroni transfer a accettori terminali diversi dall'ossigeno, e le fonti principali sono CO₂, SO₄, NO₃ e fumarato (Moss et al., 2000).

Figura 6. Produzione di metano dai ruminanti (Moss et al., 2000)



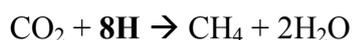
Dalle reazioni di ossidazione che avvengono per ottenere energia in forma di ATP, viene rilasciata una grande quantità di idrogeno, che dipende dal tipo di dieta e dalle popolazioni microbiche presenti nell'ecosistema ruminale (Mirzaei-Aghsaghal & Maheri-Sis, 2011).

Come si può notare dalle reazioni riportate di seguito, la formazione di acido propionico consuma idrogeno, mentre la formazione di acido acetico e butirrico rilascia idrogeno.

Reazioni che producono idrogeno:



Reazioni che utilizzano idrogeno:



Durante la fermentazione dei carboidrati, la produzione di metano dipende molto dalla quantità degli acidi grassi volatili che si formano, in particolare l'acido acetico e l'acido butirrico contribuiscono all'aumento del metano emesso, mentre l'acido propionico risulta essere una via competitiva per utilizzare l'idrogeno e dunque ridurre il metano (Moss et al., 2000; Boadi et al., 2004). Si può dedurre quindi che se le fermentazioni ruminali sono spostate da acetato a propionato, le produzioni di idrogeno e metano saranno ridotte. Risulta quindi importante la relazione tra le emissioni di metano e il rapporto dei differenti acidi grassi volatili (Mirzaei-Aghsaghal & Maheri-Sis, 2011).

Come si può notare dalle reazioni, anche se l'idrogeno è uno dei principali prodotti finali di fermentazione da parte dei protozoi, funghi e batteri, non si accumula nel rumine perché viene immediatamente utilizzato da altri batteri presenti nell'ambiente microbico. La collaborazione tra gruppi microbici responsabili della fermentazione e quelli che utilizzano l'idrogeno (ad esempio metanogeni) viene definita "trasferimento di idrogeno inter-specie" (Ianotti et al., 1973).

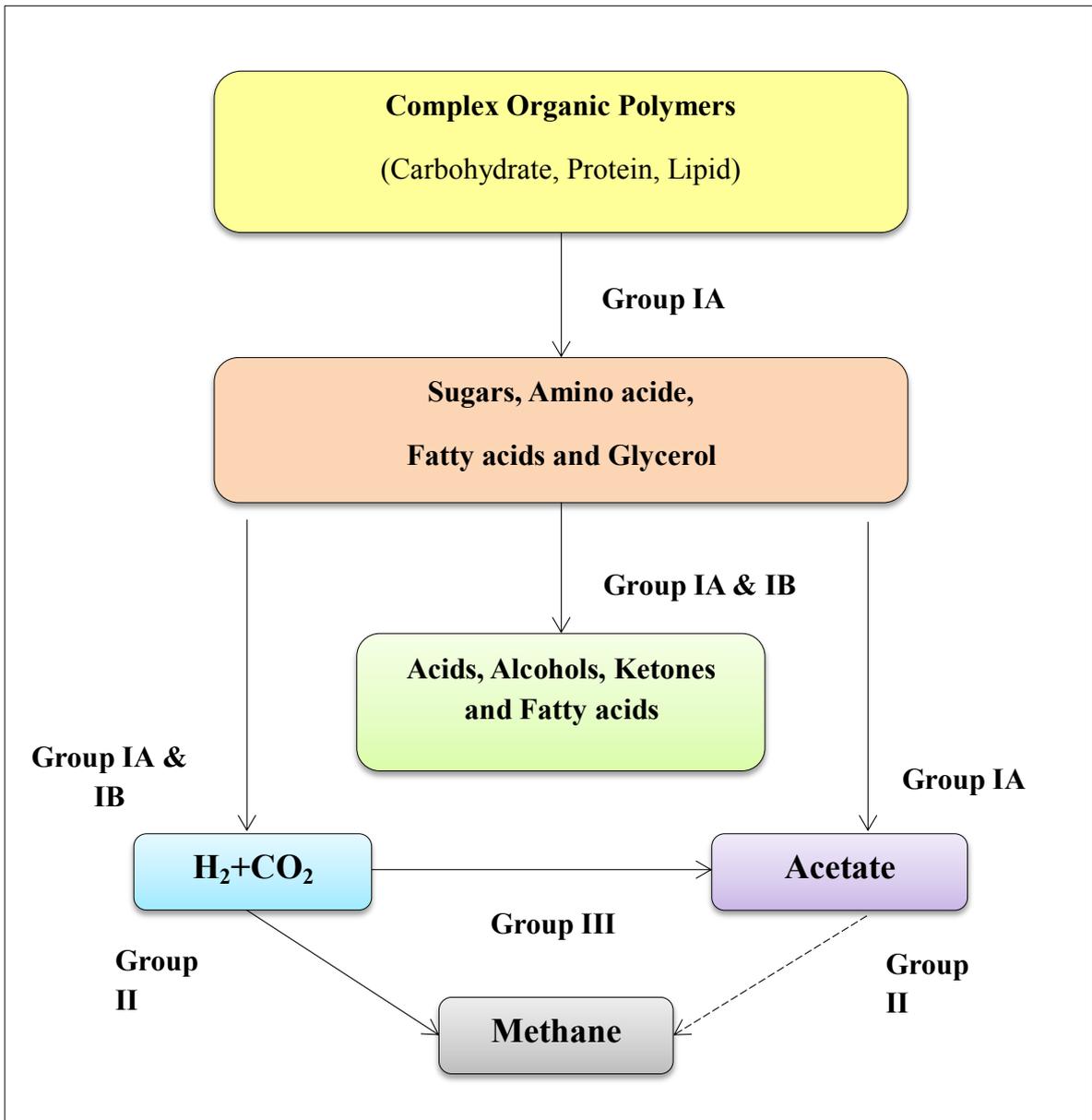
Quando l'idrogeno molecolare non viene utilizzato correttamente dai batteri metanogeni, NADH può essere re-ossidato da deidrogenasi dai batteri fermentanti per formare etanolo o lattato (Mosse et al., 2000).

Riassumendo, le principali componenti degli alimenti per i ruminanti sono la cellulosa, l'emicellulosa, la pectina, l'amido, le proteine e i lipidi. Anche la lignina è un polimero vegetale ma non è degradata dai microbi, e infatti agisce come una barriera fisica per limitare la digestione della parete cellulare dei polisaccaridi. Sulla base del tipo di substrati metabolizzati all'interno del rumine, i microorganismi possono essere raggruppati nei seguenti tre gruppi metabolici (Figura 7, Nagaraja, 2016):

- Il primo gruppo, Gruppo I, comprende i batteri fermentativi o idrolitici, i protozoi e i funghi, che rompono i polimeri complessi (carboidrati, proteine e lipidi) inizialmente in oligomeri e monomeri e, infine, in acidi (principalmente acetato, propionato e butirrico), alcoli (etanolo e metanolo) e gas (principalmente H_2 e CO_2). Tra i microbi fermentativi, alcuni sono fermentatori polimerici (Gruppo IA) che possono convertire il polimero nei prodotti di fermentazione finale e monomeri (Gruppo IB) che non possono rompere i polimeri ma possono utilizzare monomeri per produrre acidi, alcoli e gas. I batteri fermentativi includono anche batteri che fermentano i carboidrati, proteine e lipidi;
- Il secondo gruppo include i metanogeni (Gruppo II), che convertono l' H_2 e la CO_2 o acetato, in CH_4 ;

- Il rumine contiene anche un altro gruppo metabolico di batteri, detti omoacetogeni (Gruppo III), che sintetizzano acetato partendo da idrogeno e anidride carbonica.

Figura 7. Microbial groups and stages in ruminal fermentation (Nagaraja, 2016)

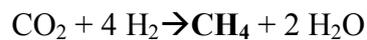


Metanogenesi

Rappresenta l'ultimo stadio della degradazione dell'alimento ed è un processo metabolico essenziale perché rappresenta la principale via di eliminazione dell'idrogeno molecolare. Avviene ad opera dei metanogeni, microrganismi strettamente anaerobici, il quale producono metano per ottenere energia per la crescita (Thauer, 1998).

Questo processo è importante in quanto l'accumulo di una piccola quantità di idrogeno nel rumine, può limitare l'ossidazione degli zuccheri e inibire l'attività degli enzimi idrogenasi quando non ci sono percorsi alternativi per l'eliminazione dell'idrogeno (McAllister & Newbold, 2008; Moss et al., 2000). Inoltre inibisce la crescita microbica e la produzione degli acidi grassi volatili (AGV) (Mirzaei-Aghsaghal & Maheri-Sis, 2011).

La formazione del metano avviene con la seguente reazione, proposta da Moss et al. (2000):

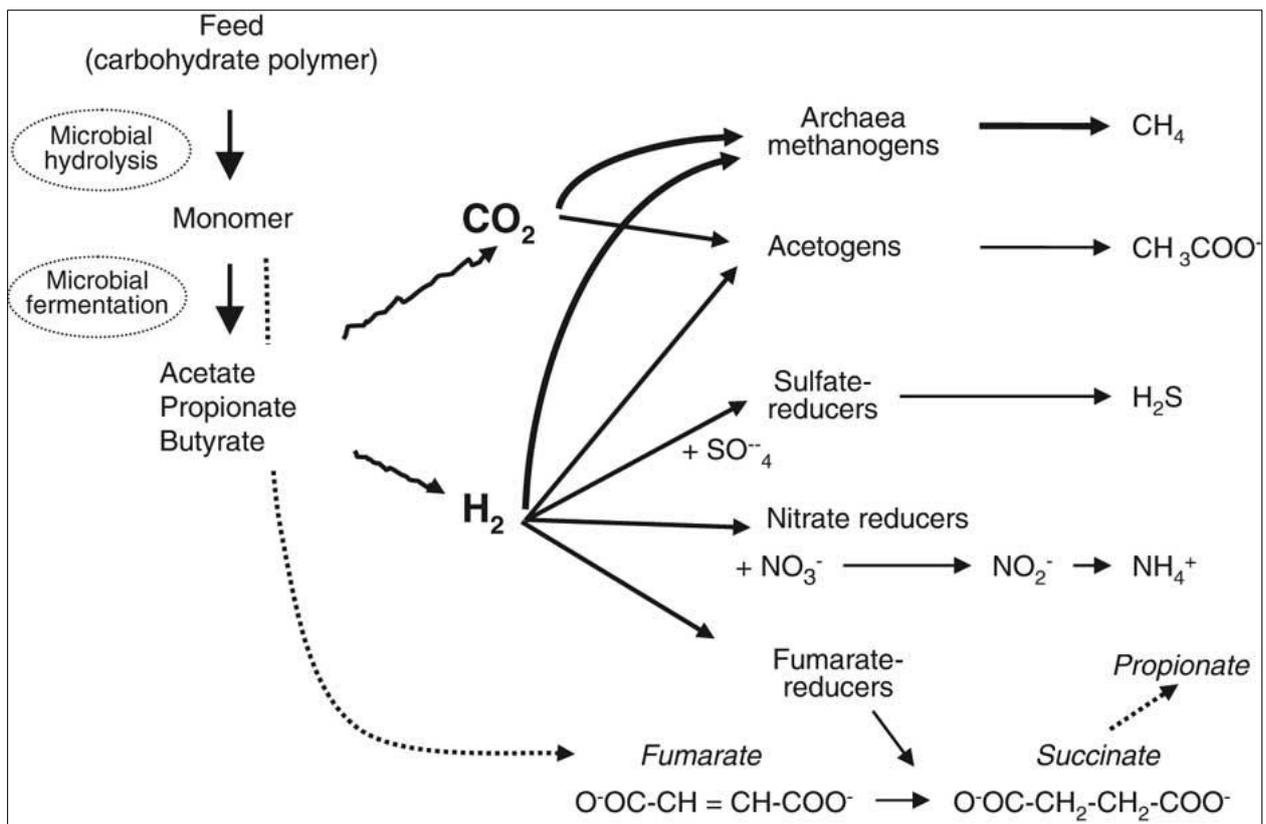


Liu & Whitman (2008), riportano i tre principali substrati utilizzati dai batteri metanogeni per la produzione del metano:

1. Anidride carbonica (CO₂): la maggior parte dei metanogeni sono *idrogenotrofici* cioè possono ridurre l'anidride carbonica (CO₂) a metano (CH₄), utilizzando l'idrogeno (H₂) come elettrone donatore primario. Molti metanogeni *idrogenotrofici* possono utilizzare anche il formato come principale donatore di elettroni. Esso rappresenta fino al 18% del metano prodotto nel rumine (Hungate et al., 1970). In questo caso, quattro molecole di formato sono ossidate a CO₂ dalla deidrogenasi formato (Fdh), prima che una molecola di CO₂ sia ridotta a metano. Nei metanogeni *idrogenotrofici*, la CO₂ viene ridotta successivamente a CH₄ attraverso il formile, il metilene e il metile;
2. Composti contenenti il gruppo metilico (CH₃): essi comprendono il metanolo, il metilammine (monometilammina, dimetilammina, trimetilammina, e tetrametilammonio) e metilsolfuro (metanetiolo e dimetilsolfuro). In particolare il metilammine e il metanolo, prodotti nel rumine, possono essere utilizzati anche dai metanogeni metilatrofici, appartenenti all'ordine *Methanosarcinales*, ad eccezione della specie *Methanosphaera*, che appartiene all'ordine *Methanobacteriales*;
3. Acetato (CH₃COO⁻): è un intermedio principale nella catena alimentare anaerobica, e fino a due terzi del metano generato biologicamente deriva dall'acetato. Sono noti solo

due generi che utilizzano acetato per la metanogenesi: *Methanosarcina* e *Methanosaeta*. Essi compiono una reazione acetoclastica che divide l'acetato, ossidando il gruppo carbossilico a CO_2 e riducendo il gruppo metilico a CH_4 . Il genere *Methanosarcina* preferisce il metanolo e la metilammina all'acetato, e molte specie utilizzano anche l' H_2 . Mentre il genere *Methanosaeta* è uno specialista che utilizza solo acetato

Figura 8. Schema della fermentazione microbica dei polisaccaridi e percorsi di riduzione dell' H_2 nel rumine (Morgavi et al., 2010)



1.2.2 Microbiologia ruminale

Il rumine è un habitat ideale per la crescita e la sopravvivenza dei microrganismi e presenta una temperatura che rimane relativamente costante (36-40°C). La popolazione microbica include tre grandi domini: *Bacteria* (batteri), *Archaea* (metanogeni) e *Eukaryota* (protozoi e funghi) (Nagaraja, 2016).

Batteri metanogeni

I batteri metanogeni sono caratterizzati dalla loro capacità di produrre metano in condizioni anaerobiche e oltre ad utilizzare i substrati di H₂ e CO₂, sono in grado di utilizzare altri precursori come acetato, metanolo e altri alcoli, i quali, essendo potenti donatori di elettroni, alimentano in modo efficiente l'attività dei batteri coinvolti (McAllister & Newbold, 2008; Ohene-Adjei et al., 2008).

Rappresentano circa il 2-4% della popolazione batterica del rumine e vivono con un potenziale redox al di sotto di -300 mV. Molti crescono a pH attorno alla neutralità, ma alcune specie possono sopravvivere in condizioni estreme, con pH compreso tra 3.5 e 9.0 (Moss et al., 2000; Boadi et al., 2004; Nagaraja, 2016).

Sulla base della presenza dei citocromi, si distinguono due tipi di metanogeni. Quelli appartenenti all'ordine *Methanosarcinales* che contengono citocromi che permettono di utilizzare metanolo, metilammine, acetato e / o CO₂ più H₂ come substrati metanogenici (Thauer, 1988) e quelli privi di citocromi, appartenenti agli ordini *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales* e *Methanopyrales*, che utilizzano solo CO₂ più H₂ (Ohene-Adjei et al., 2008).

Delle sessanta specie isolate nei diversi ambienti anaerobi, nel rumine se ne trovano principalmente cinque (Moss et al., 2000):

1. *Methanobrevibacter ruminantium*;
2. *Methanosarcina barkeri*;
3. *Methanosarcina mazei*;
4. *Methanobacterium formicicum*;
5. *Methanomicrobium mobile*.

Della specie *Methanobrevibacter ruminantium* e *Methanosarcina barkeri*, nel rumine sono state trovate le concentrazioni maggiori, più di 10⁶ ml⁻¹ che di conseguenza hanno il ruolo predominante (Boadi et al., 2004).

È importante sottolineare che, esiste una relazione simbiotica tra i metanogeni e i protozoi, dalla quale deriva circa il 37% del metano ruminale. Inoltre i metanogeni utilizzando l'idrogeno per ridurre la CO₂ a CH₄, mantengono bassa la sua pressione all'interno del rumine (Boadi et al., 2004).

Protozoi

Nel rumine, i protozoi sono per la maggior parte ciliati (105-108 cell/mL) ma, in minor misura, si possono trovare anche i protozoi flagellati (Guglielmelli, 2009).

La classe dei ciliati comprende due ordini, distinti sulla base di caratteristiche morfologiche differenti (Nagaraja, 2016):

1. *Trichostomatida* o *Holotricha*: presentano una membrana flessibile la quale, nella maggior parte delle specie, è quasi completamente ricoperta da una ciliatura somatica completa ed uniforme;
2. *Entodiniomorphida* o *Oligotricha*: caratterizzati dalla presenza di una rigida membrana e di ciliatura somatica ridotta, a bande o ciuffi, con ciglia situate solo sul peristoma (solco a spirale diretto fino all'apertura del canale nutritivo).

I protozoi ciliati costituiscono una frazione importante della massa microbica totale nel rumine e partecipano attivamente alla digestione ruminale. L'impatto dei protozoi ciliati sulla digestione ruminale e la fermentazione dei mangimi dipendono dalla loro concentrazione e composizione nella popolazione (Nagaraja, 2016).

I protozoi ciliati dell'ordine *Holotricha* sono utilizzatori primari di zuccheri solubili, mentre l'ordine *Entodiniomorphida* utilizza una grande varietà di substrati. In particolare, è in grado di ingerire piccole particelle vegetali e di utilizzare i carboidrati della parete cellulare. Hanno un'alta attività di amilasi per la digestione dell'amido e alcuni degli amidi inghiottiti possono essere conservati come granuli o come amilopectina nella piastra scheletrica. La digestione della proteina inghiottita si verifica all'interno delle cellule (Nagaraja, 2016).

1.3 Strategie di mitigazione della produzione di metano

La degradazione dei nutrienti porta alla produzione di AGV e alla sintesi di proteine microbiche per ottenere energia e proteine. Allo stesso tempo, queste fermentazioni provocano perdite di metano e di ammoniaca, che non solo riducono le performance produttive dei ruminanti ma contribuiscono anche al rilascio di inquinanti in atmosfera (Calsamiglia et al., 2007).

Il metano prodotto dai ruminanti rappresenta una delle principali cause del riscaldamento globale e riduce l'efficienza dell'utilizzo dei nutrienti (El Din & Nasser, 2012).

Nei ruminanti, l'89% di metano viene prodotto nel rumine e viene rilasciato con l'eruttazione, attraverso il naso e la bocca. Il rimanente 13% viene prodotto nel cieco dei monogastrici (Murray et al., 1976).

Il metano è una perdita significativa di energia alimentare dal sistema di produzione, con un contenuto di energia pari a $55.22 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ CH}_4$. Il 6-10 % del totale dell'energia consumata dalle vacche da latte è convertita a metano e rilasciata attraverso la respirazione (Mirzaei-Aghsaghali & Naser-Sis, 2011).

Attraverso la manipolazione del rumine quindi, si può migliorare la digeribilità dei mangimi fibrosi, ridurre le emissioni di metano e l'escrezione di azoto per migliorare le loro performance e l'efficienza di conversione dei mangimi a prodotti animali consumabili dall'uomo (Thomson, 2012; Kongmun et al., 2011). Inoltre quando si sviluppano strategie per controllare le emissioni di metano enterico, la gestione della produzione di idrogeno metabolico risulta essere il fattore più importante da considerare (Boadi et al., 2004).

I metodi per ridurre efficacemente la produzione di metano nel rumine comprendono la defaunazione del rumine, l'elaborazione dei mangimi, l'aggiunta alla dieta di acidi grassi insaturi, di acidi organici, di composti alogenati, di ionofori, di additivi come i probiotici, di estratti vegetali e loro metaboliti secondari (Faniyi et al., 2016).

Knapp et al. (2014), riassume le strategie per la riduzione del metano enterico in tre grandi categorie:

1. Alimento, gestione dell'alimentazione e nutrizione: alimenti di buona qualità che possono aumentare la produttività e l'efficienza dell'alimento, oppure alimenti che migliorano la produzione di propionato o riducono la produzione di acetato, diminuendo l'idrogeno metabolico che sarebbe convertito a metano;

2. Modificatori del rumine: alimentazione di sostanze specifiche che direttamente o indirettamente inibiscono la metanogenesi o l'utilizzo di controlli biologici, come la defaunazione e l'immunizzazione, diretti a ridurre la metanogenesi;
3. Genetica e altri approcci di gestione per aumentare la produzione animale

1.3.1 Estratti vegetali delle piante come additivi nella dieta dei ruminanti

Gli estratti delle piante sono usati da secoli per diversi scopi, come la medicina tradizionale, applicazioni industriali, conservazioni alimentari, perché presentano proprietà antimicrobiche e una gran parte di loro sono classificati dalla legislazione vigente come *GRAS* (Generalmente riconosciuti sicuri) per il consumo umano (Thomson, 2012).

L'utilizzo di additivi nel mangime si è rivelato uno strumento utile nel ridurre le perdite di energia (sotto forma di metano) e di azoto (sotto forma di ammoniaca) dalla dieta (Busquet et al., 2005a).

La ragione per cui si è cominciato a valutare l'uso di lieviti, acidi organici, estratti vegetali e probiotici per manipolare la microflora gastro-intestinale, è dovuta al fatto che l'utilizzo di antibiotici, che hanno avuto molto successo nel ridurre le perdite di metano e ammoniaca, sono stati proibiti dall'UE nel gennaio 2006 (Mc Allister & Newbold, 2008; Calsamiglia et al., 2007).

In particolare, negli ultimi anni è aumentato l'interesse dell'uso potenziale delle erbe e degli oli essenziali delle piante, ricchi di metaboliti secondari, per modificare le fermentazioni ruminali (El Din & Nasser, 2012).

I composti secondari sono un gruppo di sostanze chimiche che non sono coinvolti nei processi primari biochimici della pianta, come la crescita e la riproduzione, ma provvedono a proteggere la pianta dagli insetti e dal pascolamento degli erbivori, grazie all'attività anti-microbica che svolgono. La loro attività anti-microbica è altamente specifica e può essere usata per la manipolazione delle fermentazioni ruminali attraverso l'inibizione selettiva di un gruppo di microrganismi presenti nell'ecosistema ruminale (Kamra et al., 2006).

Questi composti hanno inoltre dimostrato di esercitare un effetto specifico nei confronti dei protozoi ruminali lasciando inalterati il resto della biomassa ruminale (Wang et al., 2012).

La maggior parte di questi composti secondari rientrano nella categoria delle lignine, tannini, saponine, oli essenziali, alcaloidi, composti organosolfuri ecc.

Oli essenziali

Gli oli essenziali sono composti aromatici volatili, estratti dalle piante attraverso l'estrazione con solventi o distillazione a vapore (Greathead, 2003).

Sono una miscela di terpenoidi e presentano una varietà di idrocarburi alifatici a basso peso molecolare, acidi, alcoli, aldeidi, esteri aciclici o lattoni e talvolta composti contenenti azoto e zolfo e omologhi di fenilpropanoidi (Dorman & Deans, 2000).

Da molti secoli, gli oli essenziali sono tradizionalmente utilizzati dall'uomo perché forniscono sapore e aroma caratteristici e specifici a molte piante e sono utilizzati come agenti antimicrobici e conservanti (Patra & Saxena, 2010).

Sono chiamati anche oli volatili o eteri e sono liquidi oleosi aromatici che vengono estratti in molte parti della pianta, comprese le foglie, i fiori, il gambo, i semi, le radici e la corteccia (Guenther, 1948; Benchaar et al., 2008).

Vengono definiti anche “*quinta essenza*” perché sono un concentrato di sostanze aromatiche idrofobiche delle piante (Benchaar et al., 2008).

Gli effetti principali degli oli essenziali nel rumine, includono la riduzione della degradazione delle proteine e dell'amido e l'inibizione della degradazione degli amminoacidi, a causa dell'azione selettiva su alcuni microrganismi ruminanti, in particolare alcune specie di batteri (Yildiz et al., 2015). È stato riferito che influenzano la colonizzazione batterica ruminale, soprattutto nei substrati ricchi di amido e l'inibizione dei batteri produttori di iper-ammoniaca coinvolti nella deaminazione degli aminoacidi (Hart et al., 2008).

Saponine e tannini

Le saponine sono composti secondari prodotti principalmente dalle piante, ma anche da animali marini e batteri (Riguera, 1997, Yoshiki et al., 1998).

L'effetto antiprotozoico delle saponine è attribuito al legame con il colesterolo nella membrana cellulare protozoale, causando la lisi cellulare (Chao, 2000).

È stato riportato che le saponine tendono ad avere un effetto drammatico sull'attività dei protozoi ruminanti (Teferedegne et al., 1999).

Le saponine influiscono sui protozoi formando complessi con steroli nella superficie della membrana dei protozoi (Wina et al., 2005). Le membrane diventano compromesse e si disintegrano (Wallace et al., 2002).

Le piante ricche di saponine possono rappresentare un potenziale per aumentare il flusso di proteine microbiche del rumine, aumentando l'efficienza dell'utilizzo dei mangimi e diminuendo la metanogenesi (Jayanegara et al., 2009).

I tannini sono composti secondari vegetali importanti e sono complesse molecole organiche fenoliche. Si ritiene che i tannini abbassino il tasso di degradazione delle proteine nel rumine, rallentando i tassi di solubilizzazione e degradazione delle proteine in ammoniaca (Patra & Saxena, 2011).

I tannini sono stati pensati anche per sopprimere i parassiti interni e la metanogenesi nei ruminanti (Patra & Saxena, 2011, Jayanegara et al., 2012). Gli effetti inibitori dei tannini sulla metanogenesi sono stati attribuiti ai loro effetti diretti sugli *Archaea* e sui protozoi, indirettamente portando ad una depressione della degradazione delle fibre nel rumine (Patra & Saxena, 2011).

Composti organosolfuri

L'aglio (*Allium Sativum*) è una pianta che può avere effetti positivi sulle performance degli animali e presenta molte attività biologiche tra cui antimicrobiche, anti-infiammatorie, anti-ossidanti e immunostimolanti. Inoltre, migliora la digeribilità dei nutrienti e gioca un ruolo protettivo nella funzione cardiovascolare, come antiipertensivo (Thomson, 2012).

È costituito da una miscela complessa di prodotti secondari vegetali tra cui l'allicina ($C_6H_{10}S_2O$), diallyl sulfide ($C_6H_{10}S$), diallyl disulfide ($C_6H_{10}S_2$) e allyl mercaptene (C_3H_6S) (Lawson, 1996).

L'aglio oltre a contenere oli volatili, circa il 0.10-0.36%, contiene una buona quantità di proteine, 16-17% ed è una ricca fonte di potassio, fosforo, magnesio, sodio, calcio e zolfo (varia dai 0.5 ai 3.7 g per 100 g di sostanza secca) (Kamra et al., 2012).

Questi composti, possono manipolare le fermentazioni ruminali come diminuire la proporzione di acetato e aumentare la proporzione di propionato e butirato, inibire la metanogenesi e diminuire il rapporto CH_4/AGV (Busquet et al., 2005a).

Kamra et al.(2012) riporta che gli spicchi di aglio sono ricchi di alliina, un amminoacido ricco di zolfo a base di cisteina presente abbondantemente nei tessuti mesofilici. L'enzima che degrada l' alliina ad allicina, noto come alliinasi, è presente negli spicchi d'aglio, ma in particolare è concentrato in una guaina del bulbo e pertanto è tenuto lontano dal substrato (alliina) delle pareti cellulari tra i due tipi di tessuto. Di conseguenza, gli spicchi intatti odorano solo leggermente, ma l'aroma caratteristico dell'aglio si intensifica quando viene frantumato. La triturazione o la frantumazione, portano il substrato (alliina) a contatto con l'enzima (alliinasi) e si forma il prodotto allicina, che è in primo luogo responsabile del caratteristico odore dell'aglio. Ma, l'allicina è una molecola volatile intermedia che si decompone ad altri composti, come il diallyl sulfide, diallyl disulfide e diallyl trisulfide e altri (Amagase et al., 2001).

Questa instabilità dell' allicina è responsabile del basso livello di allicina nei bulbi d'aglio (Lawson 1996). L'allicina rimane attiva nell'aglio tritato solo per poche ore, a causa della sua

utilizzazione in altre reazioni biochimiche e anche per la sua natura volatile. Anche l'odore caratteristico e l'attività antimicrobica, diminuiscono quando la concentrazione di allicina nella miscela decresce (Ankry & Mirelman, 1999).

L'allicina nella sua forma pura, è stata trovata a mostrare diverse attività antimicrobiche (Ankry & Mirelman, 1999):

- attività antibatterica contro una vasta gamma di batteri Gram-negativi e Gram-positivi, inclusi i ceppi entero-tossigenici di *Escherichia coli* resistenti ai farmaci;
- attività antifungina, in particolare contro *Candida albicans*;
- attività antiparassitaria, inclusi alcuni principali parassiti protozoi intestinali umani come *Entamoeba Histolytica* e *Giardia lamblia*;
- attività antivirale

Si producono un'ampia gamma di composti organosolfuri diversi durante la lavorazione dell'aglio, compresi i tiosolfinati, gli organosolfuri volatili e gli organosolfuri idrosolubili (Kodera et al., 2002).

I prodotti a base di aglio possono essere classificati in quattro gruppi: oli essenziali di aglio, macerato di olio di aglio, polvere di aglio e estratto di aglio (Amagase, 2006).

1.3.2 Effetti degli estratti vegetali sulle fermentazioni ruminanti

Secondo lo studio di Calsamiglia et al.(2007), gli oli essenziali possono interagire con le membrane cellulari microbiche e inibire la crescita di molti batteri Gram-positivi e Gram-negativi. Inoltre l'aggiunta di molti estratti vegetali al rumine possono provocare un'inibizione della deaminazione e della metanogenesi, con conseguente diminuzione dell'ammoniaca, metano e acetato e viceversa un aumento nelle concentrazioni di propionato e butirrato.

I risultati hanno indicato che l'olio di aglio, la cinnamaldeide, l'eugenolo, la capsaicina e l'olio di anice, possono aumentare la produzione di propionato, ridurre la produzione di acetato o metano, e modificare la proteolisi, peptidolisi o la deaminazione nel rumine.

Busquet et al.(2005a), ha osservato in studi *in vitro* che l'effetto dell'olio di aglio e dei suoi componenti ridurrebbe la proporzione di acetato e la catena ramificata degli acidi grassi volatili e aumenterebbe la proporzione di propionato e butirrato. Questo suggerisce che l'azione dell'olio di aglio e dei suoi componenti è una diretta inibizione della metanogenesi.

In particolare, l'olio di aglio e i quattro componenti attivi purificati (allicina, diallyl sulfide, diallyl disulfide e allyl mercaptene) che giocano un ruolo importante nell'attività antimicrobica,

sono stati testati *in vitro* per determinare i loro effetti sulle fermentazioni ruminali. Lo studio riporta che l'olio di aglio, diallyl disulfide e allyl mercaptene riducono la produzione di acetato e metano e aumentano le proporzioni di propionato e butirato. Mentre gli altri due composti, hanno mostrato minor effetti sulle fermentazioni microbiche ruminali.

Lo studio condotto invece da Ankri & Mirelman(1999), riporta che l'attività antimicrobica dell'aglio è generalmente attribuita ai suoi composti solfuri, in particolare l'allicina.

Per quanto riguarda invece l'effetto antimetanogenico dell'aglio e dei suoi composti attivi, è causa della diretta inibizione dei microorganismi *Archaea* presenti nel rumine.

Molti studi suggeriscono che i microorganismi *Archaea* presentano un'unica membrana di lipidi che contiene glicerolo, legato a lunghe catene di alcoli isoprenoidi, essenziali per la stabilità della membrana cellulare. La sintesi di queste unità di isoprenoidi è catalizzata dal coenzima A idrossimetilglutaril reduttasi. L'olio di aglio e alcuni composti di zolfo derivanti, sono forti inibitori di questo coenzima e di conseguenza la sintesi viene inibita, le membrane dei microorganismi *Archaea* diventano instabili e le cellule muoiono (De Rosa et al., 1986; Gebhardt & Beck, 1996; Miller & Wolin, 2001).

2. OBIETTIVI

L'obiettivo della presente ricerca è stato quello di valutare l'effetto *in vivo* dell'uso dell'aglio in dosaggi differenti, come additivo nella dieta di vacche da latte, sulle dinamiche fermentative ruminanti.

Inoltre, si è voluto valutare la dinamica fermentativa *in vitro* e la cinetica di produzione di gas attraverso l'utilizzo di differenti dosaggi di aglio e del suo estratto, il diallyl sulfide, utilizzando un sistema automatico di misurazione delle produzioni di gas.

La finalità dello studio *in vivo* e *in vitro* è stata quella di valutare la possibilità di utilizzare l'aglio nell'alimentazione delle vacche da latte per ridurre l'emissione di metano e idrogeno, senza compromettere la funzionalità ruminale e la produzione di latte.

3. MATERIALI E METODI

La prova sperimentale è stata realizzata nel periodo compreso tra il 23 gennaio 2017 e il 9 marzo 2017, secondo il calendario di sotto riportato, ed è stata suddivisa in una parte *in vivo* ed una *in vitro*.

La parte *in vivo* è stata svolta presso l’Azienda Agricola Sperimentale “Lucio Toniolo” dell’Università di Padova, situata a Legnaro (PD). La parte *in vitro* è stata effettuata presso il laboratorio chimico (LaCHI) del Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente (DAFNAE), situato nel complesso universitario di Agripolis (PD).

3.1 Descrizione disegno sperimentale *in vivo*

Tre bovine di razza Frisona, in lattazione, con ordine di parto uguale a due e giorni di lattazione 114.5 ± 15.7 , sono state casualmente assegnate secondo uno schema a quadrato latino 3 x 3 (3 vacche x 3 periodi sperimentali). Ogni periodo sperimentale ha avuto la durata di due settimane (14 giorni), nella quale le vacche hanno ricevuto allo stesso modo la dieta (TMR, Tabella 1), con la presenza o non, degli additivi.

Secondo il piano sperimentale (Tabella 2) ciascuna vacca, nei 3 periodi sperimentali, è stata sottoposta ai seguenti trattamenti:

- ✓ Trattamento di controllo (*CTR*): dieta di controllo (TMR) non integrata;
- ✓ Trattamento con aglio 400 (*aglio400*): dieta di lattazione (TMR) con aggiunta di 400 g di aglio al giorno;
- ✓ Trattamento con aglio 1200 (*aglio1200*): dieta di lattazione (TMR) con aggiunta di 1200 g di aglio al giorno

Durante tutta la durata della prova l’aglio, una volta sbucciato e sminuzzato, è stato miscelato direttamente a tutta la razione presente in mangiatoia, in corrispondenza del pasto mattutino.

Tabella 1. Formulazione della dieta di lattazione (TMR) utilizzata *in vivo*

Alimento	Quantità, kg	Quantità, %
Silomais	27	61.6
Mix energetico	5	11.4
Mix proteico	4	9.1
Medica	5.3	12.1
Fieno	0.6	1.4
Polpe	1	2.3
Milk H	0.4	0.9
Lino	0.5	1.1
Totale	43.8	100

Tabella 2. Disegno sperimentale *in vivo*

Periodo				Durata	Trattamento			
Inizio	Fine			<i>aglio1200</i>	<i>aglio400</i>	<i>CTR</i>		
				Box 1	Box2	Box3		
Ven	27-gen-17	Gio	9-feb-17	14 d	Vacca850	Vacca696	Vacca819	
Ven	10- feb -17	Gio	23-feb-17	14 d	Vacca819	Vacca850	Vacca696	
Ven	24-feb-17	Gio	9-mar-17	14 d	Vacca696	Vacca819	Vacca850	

Il 10° giorno di trattamento, le bovine sono state sottoposte ad un prelievo di liquido ruminale, che è stato usato come inoculo microbico per la realizzazione delle prove *in vitro*.

Durante il procedimento di raccolta è stata fatta particolare attenzione al mantenimento della temperatura (39°C) in modo da preservare la vitalità dei microrganismi ruminali.

Il prelievo del liquido ruminale è stato effettuato la mattina, con le vacche a digiuno, tramite una pompa da vuoto collegata ad una sonda esofagea. Il liquido è stato trasportato molto rapidamente ai laboratori all'interno di termos.

3.2 Descrizione disegno sperimentale *in vitro*

Nella prova sperimentale *in vitro* sono stati effettuati i seguenti trattamenti:

1. Trattamento di controllo (*CTR*): liquido ruminale privo della dose di aglio, ma integrato nella parte *in vitro* con i seguenti additivi:
 - Trattamento con aglio 12 (*A012*): aggiunta *in vitro* di una dose di aglio omogeneizzato pari a 0.12 g;
 - Trattamento con aglio 36 (*A036*): aggiunta *in vitro* di una dose di aglio omogeneizzato pari a 0.36 g;
 - Trattamento con diallyl sulfide (*DAS*): aggiunta *in vitro* di diallyl sulfide pari a 1 ml (allyl sulfide, 97% purezza, sigma-Aldrich Chemical, Milano, Italia)
2. Trattamento aglio 400 (*aglio400*): liquido ruminale pre-adattato all'integrazione con aglio in dose 400 g;
3. Trattamento aglio 1200 (*aglio1200*): liquido ruminale pre-adattato all'integrazione con aglio in dose 1200 g

Ogni incubazione, al termine del trattamento, comprendeva 29 bottiglie, secondo lo schema di sotto riportato (Tabella 3). In ogni bottiglia sono stati introdotti la soluzione Menke (100 ml), in grado di riprodurre le proprietà tamponanti della saliva animale, la dieta di controllo (TMR, 1 g), il corrispondente liquido ruminale prelevato dalle bovine trattate *in vivo* (50 ml) e l'etanolo (1 ml) e/o l'additivo da laboratorio. Un'eccezione è stata fatta per 4 bottiglie che sono state incubate senza la dieta e gli additivi, perché rappresentano delle unità di confronto (bianchi).

Tabella 3. Disegno sperimentale di ogni prova *in vitro* ha previsto l'incubazione di 1 g di dieta con 25 ml di liquido ruminale prelevato dalle 3 vacche (trattamenti: *CTR*, *aglio1200* e *aglio400*) e l'incubazione di dosi crescenti (0.12 e 0.36 g) di aglio e diallyl sulfide (1 ml) aggiunte al liquido ruminale della vacca di controllo (trattamento: *CTR+A012*; *CTR+A036*; *CTR+DAS*)

Bottiglie	Buffer (100 ml)	Campione (1 g)	Liquido ruminale (50 ml)	Etanolo e/o Additivo	Acronimo del trattamento
4	Si	Dieta	<i>aglio1200</i>	¹ ETOH	<i>aglio1200</i>
4	Si	Dieta	<i>aglio400</i>	ETOH	<i>aglio400</i>
5	Si	Dieta	<i>CTR</i>	ETOH	<i>CTR</i>
4	Si	Dieta	<i>CTR</i>	<i>A012</i> ² + ETOH	<i>CTR+A012</i>
4	Si	Dieta	<i>CTR</i>	<i>A036</i> ³ + ETOH	<i>CTR+A036</i>
4	Si	Dieta	<i>CTR</i>	⁴ <i>DAS</i>	<i>CTR+DAS</i>
1	Si	No	<i>aglio1200</i>	ETOH	Bianco- <i>aglio1200</i>
1	Si	No	<i>aglio400</i>	ETOH	Bianco- <i>aglio400</i>
2	Si	No	<i>CTR</i>	ETOH	Bianco- <i>CTR</i>

¹ETOH = Etanolo; ²*A012* = aggiunta *in vitro* di 0.12 g di aglio omogeneizzato; ³*A036*= aggiunta *in vitro* di 0.36 g di aglio omogeneizzato; ⁴*DAS*= aggiunta *in vitro* di 1 ml di soluzione alcolica di diallyl sulfide

3.2.1 Preparazione dell'incubazione

Il giorno precedente l'incubazione, è stata testato il sistema *Ankom* verificando con accuratezza il funzionamento delle valvole di ogni modulo necessario (apertura, chiusura e tenuta).

Successivamente, è stata essicata e preparata la dieta (Tabelle 4 e 5) da inserire all'interno delle bottiglie, macinata tramite mulino con griglia a fori di Ø=1 mm, così da aumentare la superficie disponibile per l'attacco microbico dell'alimento durante l'incubazione e ottenere al contempo cinetiche di fermentazione su substrati omogenei. Poi è stato pesato 1 g di dieta (range: 0.9990/1.0010 g) che è stata introdotta nelle bottiglie.

Le bottiglie sono state chiuse tramite un modulo attivo, collegato lateralmente ad un sacchetto *Flex Foil* per la raccolta del gas di fermentazione e riposte all'interno di due incubatori impostati ad una temperatura di 39°C.

Tabella 4. Ingredienti e composizione chimica della dieta utilizzata incubata *in vitro*

	Quantità, %
Ingredienti	
Silomais	37.5
Mix energetico	18.3
Mix proteico	14.9
Medica	19.8
Fieno	2.2
Polpe di bietola	3.7
Milk H	1.6
Lino	1.9
Composizione chimica	
NDF	38.4
ADF	22.9
ADL	4.0
PG	15.6
EE	3.1
Amido	25.3
NSC ¹	51.9
Ceneri	6.7

¹ NSC= carboidrati non strutturali (100 – EE – CP – NDF – Ceneri)

Tabella 5. Composizione chimica dell'aglio utilizzato sia come supplemento *in vivo*, sia come aggiunta nelle bottiglie incubate *in vitro*

Composizione chimica	Quantità, %
NDF	6.2
ADF	2.5
ADL	0.3
PG	19.2
EE	0.5
Amido	0.0
NSC ¹	74.4
Ceneri	3.7

¹ NSC = carboidrati non strutturali (100 – EE – CP – NDF – Ceneri)

Come ultima operazione, è stata preparata la saliva artificiale medium (Menke,1988), che è una miscelazione di una soluzione ad azione ossidante composta da: tampone, macrominereale, microminereale, resazurina, L-cisteina, e di una soluzione ad azione riducente (Tabella 6).

Tabella 6. Preparazione dei componenti della saliva artificiale medium (Menke,1988)

	Reagenti	Quantità, g
Soluzione tampone		
Sodio bicarbonato	NaHCO ₃	35 g
Ammonio bicarbonato	NH ₄ HCO ₃	4 g
Acqua deionizzata	H ₂ O	1 l
Soluzione macro minerale		
Sodio fosfato bibasico	Na ₂ HPO ₄	5.7 g
Potassio fosfato monobasico	KH ₂ PO ₄	6.2 g
Magnesio solfato eptaidrato	MgSO ₄ -7H ₂ O	0.6 g
Acqua deionizzata	H ₂ O	1 l
Soluzione micro minerale		
Calcio cloruro diidrato	CaCl ₂ -2H ₂ O	13.2 g
Magnesio cloruro tetraidrato	MnCl ₂ -4H ₂ O	10 g
Cobalto cloruro esaidrato	CoCl ₂ -6H ₂ O	1 g
Ferro cloruro tetraidrato	FeCl ₂ -4H ₂ O	1.17 g
Acqua deionizzata	H ₂ O	100 ml
Soluzione resazurina		
Resazurina	Polvere blu	0.1 g
Acqua deionizzata	H ₂ O	100 ml
Soluzione riducente		
Idrossido di sodio	NaOH 1N	2 ml
Sodio solfuro nonaidrato	Na ₂ S*9H ₂ O	0.336 g
Acqua deionizzata	H ₂ O	47.5 ml
Soluzione idrossido di sodio		
Sodio idrossido	NaOH	40 g
Acqua deionizzata	H ₂ O	1 l

3.2.2 Preparazione dei campioni il giorno dell'incubazione

Il giorno dell'incubazione, sono state unite le componenti della soluzione ad azione ossidante e trasferite in un bottiglione, coperto con il parafilm e posto nel bagnetto termostatico (39-40 °C), insufflando CO₂ al suo interno. Per ultimo, è stata aggiunta la soluzione ad azione riducente, assistendo ad un viraggio di colore dal violaceo all'incolore (Tabella 7).

Il flusso di CO₂ è stato mantenuto costantemente attivo, allo scopo di eliminare i residui di ossigeno presente nel medium e poter così garantire la sopravvivenza dei microrganismi ruminali al momento dell'inoculazione.

Tabella 7. Preparazione della saliva artificiale medium

	Quantità
Soluzione ossidante	
Acqua deionizzata	1662.5 ml
Soluzione micromineraie	0.42 ml
Soluzione macromineraie	840 ml
Soluzione tampone	840 ml
Resazurina	4.27 ml
L-Cisteina	0.875 g
Soluzione riducente	
Acqua deionizzata	166.25 ml
Iodrossido di sodio	7 ml
Sodio solfuro nonaidrato	1.176 g

Le matrici ruminali prelevate *in vivo* dalle tre bovine donatrici, sono state mantenute alla temperatura di circa 39°C fino al trasporto in laboratorio.

Direttamente dall'interno di ciascun termos è stato prelevato 0,5 ml di liquido ruminale per determinare la conta protozoaria. In seguito sono stati aggiunti a ogni campione 0,5 ml di saline formaline (0,9% NaCl e 4% formalina) con lo scopo di conservare il campione e 1 goccia di blu di metilene in modo da colorare le cellule e facilitare la conta dei protozoi.

Successivamente i tre liquidi ruminali sono stati separatamente filtrati, tramite una garza ripiegata in 4 parti, posizionando un tubo erogatore di CO₂, e trasferiti in appositi boccioni, coperti con il parafilm e collocati all'interno di un bagnetto termostatico (39-40 °C).

Sia i tre filtrati che il medium, sono stati oggetto di un duplice campionamento per la determinazione degli acidi grassi volatili (AGV) e dell'azoto ammoniacale (N-NH₄). I campioni sono stati prelevati in due repliche di 5 ml ciascuno e conservati in provette da 10 ml contenenti 1 ml di acido metafosforico al 25% (per impedire la volatilizzazione delle componenti volatili e per la precipitazione della componente proteica).

3.2.3 Incubazione

Come sistema di misurazione dei gas è stato adottato l'AnkomRF Gas Production System (Figura 9), dell'azienda Ankom Technology® (New York, USA) (www.ankom.com).

Figura 9. Strumento AnkomRFGas Production System



Questa apparecchiatura innovativa, è dotata di un sistema automatizzato in grado di rilevare e quantificare la pressione del gas prodotto in seguito alla degradazione fermentativa di un alimento. Lo strumento comprende: a) un set di 50 bottiglie accompagnato da b) un corrispettivo numero di moduli “attivi”; c) un modulo “zero”; d) una centralina wireless denominata “base coordinator”.

a) Giare: sono bottiglie di vetro (capienza 310 ml), all'interno delle quali viene fatto fermentare il campione alimentare insieme al medium e l'inoculo microbico. Ogni bottiglia presenta lateralmente un “beccuccio” aperto all'estremità, chiuso da un tappo in plastica dal quale vengono effettuati i campionamenti di gas. Ciascun tappo è rivestito internamente da un setto

poroso in silicone (che permette di agevolare la penetrazione dell'ago di prelievo minimizzando al contempo le perdite di pressione) invece la bottiglia è complementare ad un “modulo attivo”, un tappo attraverso il quale il campione viene chiuso ermeticamente e che presenta al suo interno un sistema di misurazione e trasmissione wireless dei dati.

b) La struttura del “modulo attivo” presenta una forma cilindrica costituita da materiale plastico, cava internamente e con tre aperture esterne: la prima comunica con un sensore di pressione tramite collegamento wireless interno; la seconda è collegata ad una elettrovalvola di sfiato comandata dal software che gestisce lo strumento e che si apre ogni qualvolta si verifichi un eccesso di pressione; la terza comunica con una valvola meccanica, che permette un rapido attacco con il condotto adduttore della CO₂, necessario per creare l'anaerobiosi prima dell'incubazione.

La parte interna del modulo contiene: 1) un sensore di pressione, 2) una scheda elettronica con antenna per la comunicazione wireless con il software che gestisce la ricezione dei dati 3) una batteria ricaricabile (1.5 V) che alimenta la valvola e l'antenna di collegamento wireless.

c) I moduli sono affiancati da un “modulo zero”, il quale non è collegato a nessuna bottiglia e viene posizionato esternamente all'incubatore. La sua funzione è quella di registrare la pressione atmosferica.

d) I moduli comunicano con una centralina wireless detta “base coordinator”, la quale assicura la trasmissione e registrazione dei dati tramite il software Gas Production Monitor (GMP, versione 9.7.2) fornito dalla stessa ANKOM che può essere utilizzato con qualsiasi PC (Windows XP© o Vista©).

Tale software consente di gestire i parametri operativi dello strumento come, ad esempio, la soglia di pressione massima per l'apertura delle elettrovalvole e l'intervallo di registrazione dei dati; permette inoltre di fornire informazioni tecniche sul livello di carica delle batterie o un eventuale malfunzionamento dei moduli. Le pressioni generate possono essere emesse in psi o in bar e i valori registrati vengono rappresentati in un foglio Excel standard, mediante il quale è possibile creare facilmente le curve di produzione dei gas (ANKOM Technology, 2015).

Per la raccolta del gas sono stati utilizzati i sacchetti Flex Foil SKC (commercializzati con il nome di Sample Flex Foil Bags) che hanno la capacità di trattenere al loro interno diversi composti organici volatili e assicurano una buona stabilità di stoccaggio per quelli a basso peso molecolare. Sono realizzati con materiali di nuova generazione, che permettono una buona protezione del campione contro l'umidità e sono sigillati con saldature che garantiscono una conservazione del campione fino ad un massimo di 48-96 h, variabile a seconda del composto molecolare (www.skcin.com).

La superficie del sacchetto è dotata di un raccordo in plastica, costituito da tre parti: a) una valvola che permette di aprire o chiudere il sacchetto b) un beccuccio laterale, utilizzato per collegare il sacchetto con la fonte da campionare c) un tappo svitabile posizionato sull'estremità superiore del raccordo, costituito esternamente da un foro deputato alla penetrazione della siringa di prelievo e internamente da un setto poroso in grado di minimizzare le perdite di gas durante il campionamento. I sacchetti sono stati adattati allo strumento di incubazione ANKOM, utilizzando l'apertura di ciascun modulo attivo deputata all'elettrovalvola di sfiato del gas, per inserire il tubo di collegamento modulo sacchetto.

3.2.3.1 Procedure di incubazione

La tecnica di incubazione utilizzata ha richiesto tempi esecutivi molto rapidi necessari a preservare l'integrità degli inoculi microbici e quindi la buona riuscita della prova stessa.

- Impostazione del programma RF

Prima di iniziare la procedura esecutiva, sono stati impostati, come riportato in Tabella 8, i parametri di settaggio del software GMP deputato alla comunicazione moduli-computer e alla registrazione dei dati generati durante le 24 ore di attività fermentativa *in vitro*. Al contempo, è stato attivato il "modulo zero", inserendo la batteria al suo interno e verificando una buona connessione con un livello di carica sufficiente (> 6.5 volt).

- Procedura esecutiva di incubazione

L'intera operazione, realizzata tramite la cooperazione di più operatori (dai 3 ai 4), si è svolta seguendo la medesima procedura per ciascuna bottiglia, come riportato nei passaggi a seguire:

- 1) Estrazione della bottiglia dall'incubatore, una per volta, e rapida chiusura dello stesso per ridurre il più possibile le perdite di temperatura all'interno del macchinario;
- 2) Trasferimento di uno dei 3 liquidi ruminali fermentati (50 ml) all'interno della corrispettiva bottiglia, tramite l'impiego di dosatori distinti, mantenendo in anaerobiosi con CO₂ la matrice ruminale;
- 3) Aggiunta del corrispettivo etanolo e/o additivo (1 ml);
- 4) Aggiunta della soluzione Menke (100 ml);
- 5) Inserimento della batteria all'interno del modulo, verificando nella "live view" del pannello di controllo del programma, l'avvenuto collegamento con il computer e il livello di carica della batteria (> 6.5 volt);

- 6) Avvitamento del modulo alla bottiglia e apertura della valvola del sacchetto *Flex Foil* per la raccolta del gas di fermentazione;
- 7) Inserimento della bottiglia nell'incubatore, evitando di scuoterne il contenuto, che comporterebbe l'adesione delle particelle di alimento alle pareti in vetro, escludendole dal processo fermentativo;
- 8) Attivazione della funzione "record" e "set" nella "configuration view" del pannello di controllo informatico, deputata alla registrazione cumulativa dei valori di pressione prodotti all'interno delle giare.

Tabella 8. Impostazione del programma RF prima e durante le fasi di preparazione dell'incubazione (Pre-incubazione) e durante le 24 h di incubazione (Incubazione)

Parametro	Impostazione		Funzione
	Pre- incubazione ¹	Incubazione ²	
Live interval (secondi)	60	60	Intervallo di tempo attraverso il quale il modulo (e quindi il campione) comunica con il computer.
Recording interval (min)	1	5	Intervallo di tempo con cui registrare la pressione prodotta all'interno di ogni giara.
Pressure unit (Psi o bar)	1	1	Permette di scegliere l'unità di misura della pressione
Global release (Psi o kPa)	1 Psi o 6.8 kPa	1 Psi o 6.8 kPa	Valore soglia (max) di pressione generata da ciascun campione, oltre il quale viene automaticamente rilasciata dal sistema e registrata
Open valve (msec)	250	250	Tempo di apertura della valvola di ogni modulo, al superamento del valore soglia di pressione impostato

¹ Impostazioni dall'estrazione della prima bottiglia dall'incubatore all'inserimento dell'ultima bottiglia

² Impostazioni dall'inizio dell'inserimento dell'ultima bottiglia fino a chiusura incubazione (24 h)

3.2.3.2 Chiusura incubazione

Due ore prima del termine dell'incubazione, è stata modificata la pressione di rilascio da 1 a 3 Psi per avere un accumulo sufficiente di gas all'interno della bottiglia necessario per l'analisi gascromatografica. Mentre al termine delle 24 ore di incubazione, è stata fermata la registrazione delle cinetiche di fermentazione.

Successivamente, è stata estratta dall'incubatore una bottiglia alla volta e da ciascuna di esse sono stati effettuati i campionamenti del gas e del liquido di fermentazione.

La raccolta del gas di fermentazione è stata effettuata tramite un duplice campionamento:

- prelievo dallo spazio di testa (ST) di ciascuna bottiglia: sono stati prelevati 10 ml di gas dal setto poroso del beccuccio laterale di ogni bottiglia e iniettati all'interno di provette;
- prelievo dal sacchetto *Flex-Foil* (SA): è stato eseguito staccando il sacchetto SKC collegato a ciascun modulo e "chiudendolo" tramite rotazione della valvola. Dal foro presente sul raccordo del sacchetto, sono stati prelevati 10 ml di gas e trasferiti nella corrispondente provetta di raccolta

Per entrambe le tipologie di raccolta sono state utilizzate siringhe per iniezione manuale di tipo *Hamilton* e provette di tipo VACUETTE® in PET da 9 ml, per prelievo venoso, con metodo sottovuoto. Tali provette sono dotate di un componente brevettato che le rendono impermeabili ai gas e di una chiusura di sicurezza, composta da un tappo interno in gomma e da un cappuccio esterno in plastica.

I prelievi invece eseguiti per il liquido di fermentazione sono stati:

- 0,5 ml di liquido di fermentazione per la determinazione della conta dei protozoi conservato in salin-formalina e colorati con blu di metilene;
- 5 ml di liquido di fermentazione bloccato con 1 ml di acido metafosforico al 25%, per la determinazione dell'azoto ammoniacale (N-NH₄);
- 5 ml di liquido di fermentazione bloccato con 1 ml di acido metafosforico al 25%, per la determinazione degli acidi grassi volatili (AGV)

3.3 Analisi chimiche

Le analisi hanno permesso di monitorare le attività fermentative prendendo come riferimento i parametri più rappresentativi della funzionalità microbica del rumine, consentendo così di quantificare e confrontare tra loro, gli effetti dei trattamenti sperimentali.

Ciascun parametro è stato analizzato per tutti i 39 residui di fermentazione.

Per pH, AGV e N-NH₄ sono stati analizzati anche i campioni di inoculo microbico e medium prelevati nella fase di “pre-incubazione”.

I parametri misurati sono stati i seguenti:

- pH
- Acidi grassi volatili (AGV)
- Azoto ammoniacale (N-NH₄)
- Fibra neutro detersa (NDF)
- Composizione del gas di fermentazione
- Conta protozoi

3.3.1 Misurazione del pH

La misurazione del pH è stata eseguita sugli inoculi microbici, sul medium e sul liquido di fermentazione. Come strumento di analisi è stato utilizzato un pHmetro (*pH meter Basic 20*, CRISON) dotato di un elettrodo in vetro in grado di rilevare i valori di pH di ciascun campione (www.crisoninstruments.com).

Figura 10. Strumento pHmetro *Basic 20* CRISON



3.3.2 Determinazione degli acidi grassi volatili (AGV)

La quantificazione degli acidi grassi volatili totali (acetico, propionico, N-butirrico, iso-butirrico, N-valerianico ed iso-valerianico) è stata realizzata attraverso l'analisi gas-cromatografica (GC) con rilevatore a flusso di fiamma (FID) (7820A GC System, *Agilent Technology*, Milan, Italy).

I campioni prima di essere analizzati, sono stati sottoposti a centrifugazione (5000 giri, $t = 10$ min, $T = 10^{\circ}\text{C}$) e filtrati mediante utilizzo di filtri in cellulosa ($\text{Ø} = 0.2\text{-}0.45\mu\text{m}$).

Il contenuto di ogni vial, composto da 1 ml di filtrato e 200 μl di standard interno (acido metil-valerianico), è stato iniettato all'interno di una colonna in silice di lunghezza 30 mt (J&W DB-FFAP, *Agilent Technologies*, Milan, Italy) internamente rivestita da una fase stazionaria deputata a trattenere la miscela da analizzare. Per movimentare gli analiti all'interno della colonna, è stato utilizzato idrogeno come gas di trasporto (portata: 30 ml/min; temperatura forno termostabile 150°C). Il risultato finale dell'analisi è stato rappresentato sotto forma di cromatogramma, nel quale ogni componente della miscela è stato visualizzato sotto forma di un picco a diversa ampiezza, determinato dal diverso tempo impiegato da ciascun analita per attraversare la colonna, a parità di condizioni analitiche dello strumento (temperatura, umidità, etc.)

3.3.3 Azoto ammoniacale (N-NH₄)

I campioni prima di essere sottoposti ad analisi, sono stati centrifugati (5000 giri, t = 12 min., T = 4°C) e filtrati mediante utilizzo di filtri in cellulosa ($\varnothing = 0.2-0.45\mu\text{m}$). Ciascun filtrato è stato poi diluito (1:20 = 0,5 ml filtrato + 9.5 ml di acqua deionizzata), affinché la concentrazione di azoto ammoniacale rientrasse nei range di calibrazione dello strumento (0-5 ppm).

L'azoto ammoniacale è stato analizzato mediante lo strumento *FIAsstarTM 5000 Analyzer* (FOSS Analytical) che utilizza idrossido di sodio (NaOH) per liberare l'ammoniaca presente nei campioni, la quale viene trattenuta da una membrana interna allo strumento.

La soluzione, colorata da un indicatore, è stata misurata tramite colorimetro il quale, sulla base di una curva di taratura, ha permesso di determinare la concentrazione dell'analita (espressa in ppm).

3.3.4 Fibra neutro detersa (NDF)

La procedura analitica è stata eseguita utilizzando lo strumento *Fibertech Analyzer* (VELP ® Scientifica), adottando il sistema di Van Soest et al.(1991). Tale sistema ha permesso di quantificare la frazione insolubile della fibra, andando a stimare i principali costituenti (emicellulosa, cellulosa e lignina).

Lo strumento è dotato di sei colonne in vetro, alla base delle quali sono stati posizionati dei crogioli porosi (pori = 40-100 μm , volume = 30 ml, *Robu Glasfilter-Geräte* GMBH®), con cui la frazione liquida della matrice fermentata è stata separata da quella solida, formata dai residui alimentari e microbici.

All'interno di ciascuna colonna è stato versato il residuo di fermentazione, filtrato, in modo da far defluire la parte liquida, lasciando all'interno di ogni crogiolo solo la frazione solida.

Questa è stata sottoposta ad un trattamento con soluzione NDF secondo quanto indicato da Mertens (2002). Per depurare la fibra estratta dai residui di natura non fibrosa presenti al suo interno (principalmente amido) ed evitare così una sovrastima finale, si è ricorso all'utilizzo dell'enzima α -amilasi, in grado di spezzare i legami chimici e solubilizzare i costituenti della componente amidica (500 μl). Infine il residuo NDF estratto, è stato lavato e disidratato mediante trattamenti ripetuti con acqua deionizzata ed acetone.

Figura 11. Strumento *Fibertech Analyzer* (VELP® Scientifica)



3.3.5 Analisi dei gas di fermentazione

I componenti del gas di fermentazione (idrogeno, aria, metano e anidride carbonica) sono stati determinati mediante gas cromatografo (*GC Agilent 7820A*) dotato di un detector a termoconducibilità (TCD) e di colonne capillari (lunghezza 30 mt; $\text{Ø}=0.32$ mm; spessore del film di 3 μm , GS-CARBONPLOT *Agilent J&W USA*). Le condizioni di lavoro adottate sono state le seguenti: iniettore 200°C; detector 230 °C; forno iniziale 32°C, hold di 2.2 min, incremento di 60°C fino a 120 °C, hold di 0 min; gas di trasporto argon con flusso di 2 ml/min; volume di splittaggio dell'iniettore 30 ml/min, rapporto di splittaggio di 1/15.

L'analisi quantitativa di ciascun gas è stata eseguita con il metodo dello standard esterno per confronto con la retta di calibrazione, creata su sei miscele di gas standard con grado di purezza 6.0 (idrogeno, aria, metano, anidride carbonica) a quantità nota (Tabella 9). La concentrazione di ogni singolo gas o della miscela di azoto e ossigeno nel caso dell'aria, è stata espressa in percentuale sul totale del contenuto della provetta di tipo vacuette.

Tabella 9. Miscele di calibrazione su sacchetti per campionamento gas da 1 litro

Standard di calibrazione	Volume in ml di gas					
	Bag 1	Bag 2	Bag 3	Bag 4	Bag 5	Bag 6
Idrogeno	0.1	0.8	2	4	8	16
Aria	399.4	393.2	378	348	280	164
Metano	0.2	2	4	16	32	60
Anidride carbonica	0.2	4	16	32	80	160
Totale	400	400	400	400	400	400

3.3.6 Determinazione della conta protozoaria

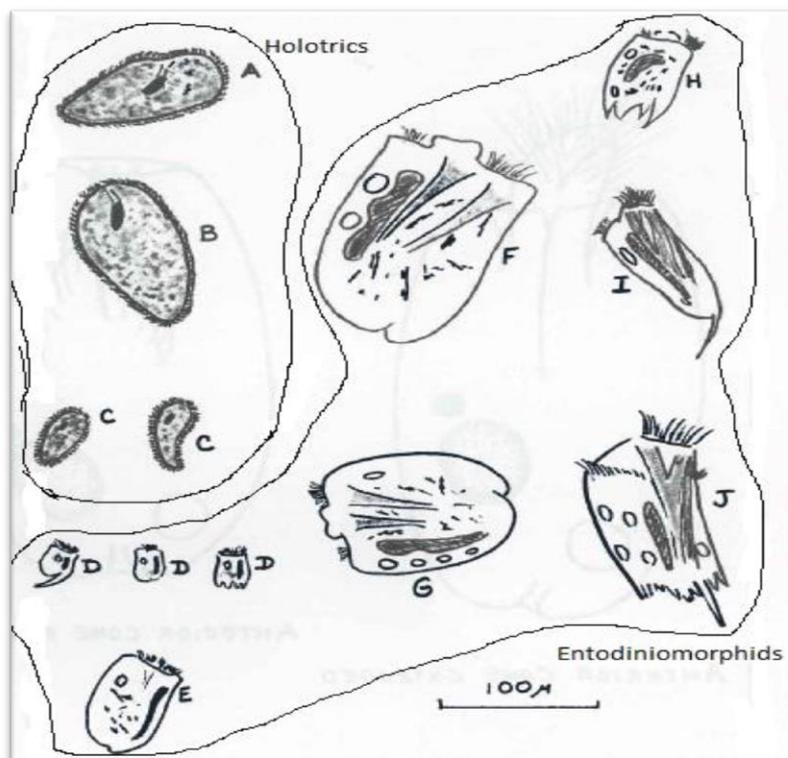
La quantificazione dei protozoi è stata effettuata su un'aliquota di 10 μ l di liquido di fermentazione, osservati con microscopio ottico (OLYMPUS BH-2, ingrandimento Ach 20X /0.40 ∞ /0.17).

Le concentrazioni di protozoi appartenenti alla classe dei ciliati, ordine *Holotricha* e *Entodiniomorphida* (Figura 13), sono state espresse come cellule/mL e come logaritmo (n+1).

Figura 12. Microscopio ottico OLYMPUS BH-2



Figura 13. Morfologia comparativa di protozoi ciliati dell'ordine *Holotricha* e *Entodiniomorphida*



3.4 Procedure di calcolo

3.4.1 Calcolo della digeribilità della fibra al detergente neutro (NDF)

Sulla base del valore di NDF della dieta di base (NDFalimento) e il contenuto di NDF residuale al termine dell'incubazione (NDFresidua), è stata calcolata la quota di fibra NDF degradata dai microrganismi durante l'attività fermentativa *in vitro*. Tale quantità, espressa in termini percentuali (NDF,%), è calcolata mediante la seguente formula (1):

$$(1) \text{ NDFd, \%} = [(\text{NDFalimento} - \text{NDFresidua} / \text{NDFalimento})] * 100$$

Dove,

NDFresidua = NDF che residua al termine dell'incubazione, g/bottiglia

NDFalimento = NDF presente nel campione incubata, g/bottiglia

3.4.2 Calcolo della digeribilità vera della sostanza secca (TDMd)

La digeribilità vera della sostanza secca, meglio conosciuta come *True Dry Matter Digestibility* (TDMd), è stata calcolata per ogni campione incubato ed espressa in termini percentuali (TDMd %), utilizzando la formula (2):

$$(2) \text{ TDMd, \%} = [(\text{SSalimento} - \text{NDFresidua}) / \text{SSalimento}] * 100$$

Dove,

SSalimento = sostanza Secca del campione di dieta incubato, g/bottiglia;

NDFresidua = NDF residua (g/bottiglia), ovvero la frazione NDF presente nella bottiglia al termine del processo di incubazione

3.4.3 Calcolo della produzione degli acidi grassi volatili (AGV)

Sia nella prova *in vivo* che *in vitro*, gli acidi grassi volatili sono stati calcolati dividendo la quantità di ciascun acido grasso (g/l) analizzato nel liquido di fermentazione per la quantità totale degli acidi grassi, moltiplicando poi per 100. La formula che si ripete per tutti gli acidi grassi volatili analizzati in questa prova, è la seguente (3):

$$(3) \text{ Acido acetico, \%} = [\text{acido acetico(g/l)/AGV(g/l)}]*100$$

Dove,

AGV= sono la sommatoria della composizione degli acidi grassi espressi in g/l

3.4.4 Calcolo della produzione dei gas

Nella prova *in vitro*, i dati di composizione dei gas di fermentazione (metano e idrogeno) sono stati espressi per grammo di sostanza secca incubata (ml/g SS) e in proporzione sul gas prodotto (%). Sono stati calcolati con le seguenti formule (4), (5), (6), (7):

$$(4) \text{ CH}_4, \text{ ml/g SS incub.} = [(\text{CH}_4 \text{ GAS ST} * (257-151) + \text{CH}_4 \text{ GAS SA} * \text{GP 24})/100/ \text{SS}]$$

$$(5) \text{ H}_2, \text{ ml/g SS incub.} = [(\text{H}_2 \text{ GAS ST} * (257-151) + \text{H}_2 \text{ GAS SA} * \text{GP 24})/100/ \text{SS}]$$

$$(6) \text{ CH}_4, \% = (\text{CH}_4 \text{ ml/g SS} / \text{GP24}) * 100$$

$$(7) \text{ H}_2, \% = (\text{H}_2 \text{ ml/g SS} / \text{GP24}) * 100$$

Dove,

$\text{CH}_4 \text{ GAS ST} =$ metano prodotto nello spazio di testa bottiglia $= (\text{CH}_4 \text{ ST/TOT GAS ST}) * 100$;

$\text{CH}_4 \text{ GAS SA} =$ metano prodotto nello spazio del sacchetto $= (\text{CH}_4 \text{ SA/TOT GAS SA}) * 100$;

$\text{H}_2 \text{ GAS ST} =$ idrogeno prodotto nello spazio di testa bottiglia $= (\text{H}_2 \text{ ST/TOT GAS ST}) * 100$

$\text{H}_2 \text{ GAS SA} =$ idrogeno prodotto nello spazio del sacchetto $= (\text{H}_2 \text{ SA/TOT GAS SA}) * 100$

GP 24= produzione di gas prodotto nelle 24h, ml/g SS;

SS = percentuale di sostanza secca dei campioni, %

3.4.5 Conversione dei dati di pressione (Psi) in volume di gas prodotto (ml)

La produzione di gas è stata espressa in valori cumulati nelle 24 h di incubazioni per grammo di sostanza secca incubata (GP24, ml/g SS) e come variazioni orarie (ml/h).

I valori di pressione (Psi) registrati durante le 24 ore di incubazione, sono stati convertiti in volume, facendo ricorso all'equazione proposta da Lopez et al. (2007) (8):

$$(8) \text{ GP} = (\text{Pt} * \text{ST}) / \text{Po} / (\text{SS}\% * \text{SS camp})$$

Dove,

GP = produzione di gas, ml/g SS;

Pt = pressione al tempo t, Psi;

ST = spazio di testa bottiglia, ml = (volume bottiglia) – [(volume medium) + (volume LR) + (volume additivo/etanolo)];

Po = pressione atmosferica misurata il giorno dell'incubazione, Psi;

SS = percentuale di sostanza secca dei campioni, %;

SS camp = quantità campione (dieta) incubato, g

3.4.6 Calcolo della conta protozoaria

Nella prova *in vitro*, sono stati analizzati i protozoi appartenenti all'ordine *Holotricha* e *Entodiniomrphida*, relativi al liquido di fermentazione dopo le 24h di incubazione. Sono stati eseguiti i seguenti calcoli (9) e (10):

$$(9) \text{ Cell/mL} = (\text{cellule di protozoi in } 10 \mu\text{l} * 1000) / 10 * 2$$

$$(10) \text{ Log (n+1)} = \text{Log (cell/mL)} + 1$$

3.5 Analisi statistica dei dati

I dati raccolti al termine dei tre periodi sperimentali relativi a NDFd, TDMD, pH, AGV, N-NH₄, CH₄, H₂, GP, variazione oraria e conta protozoaria, sono stati analizzati utilizzando il pacchetto SAS (2007, versione 9.4).

Per la prova *in vivo*, tutti i parametri considerati sono stati sottoposti ad analisi della varianza mediante la procedura PROC MIXED considerando il trattamento sperimentale come fattore fisso (TRT), mentre la data entro periodo, la vacca per periodo e il periodo sperimentale (n=3) come fattori random.

Per la prova *in vitro* i parametri sperimentali sono stati sottoposti ad analisi della varianza utilizzando la procedura PROC MIXED considerando come fattori fissi, il trattamento sperimentale (TRT), mentre come fattori random, la vacca per periodo, il periodo sperimentale, replica entro periodo e incubazione.

Le differenze tra i 5 trattamenti sperimentali sono state valutate mediante contrasti lineari e ortogonali. In particolare sono stati testati i seguenti contrasti:

Effetto del liquido ruminale prelevato dalle vacche alimentate con aglio:

- Lineare (LIN): CTR vs aglio1200;
- Quadratico (QUAD): aglio400 vs CTR+aglio1200

Effetto dell'aglio aggiunto *in vitro*:

- Lineare (LIN): CTR vs A036;
- Quadratico (QUAD): A012 vs CTR+ A036

Effetto del diallyl sulfide aggiunto *in vitro*:

- CTR vs DAS

Il livello di significatività considerato è stato $P \leq 0.05$.

Inoltre, i dati sono stati riportati in forma grafica esprimendoli come variazioni (%) dei diversi trattamenti sperimentali rispetto al controllo (CTR).

4. RISULTATI

4.1 Effetto dell'aglio *in vivo*

L'effetto sull'attività ruminale di dosi crescenti di aglio somministrate a vacche in lattazione, è stato valutato ponendo a confronto i parametri fermentativi ottenuti *in vivo* (Tabella 10).

Rispetto al controllo, l'aggiunta *in vivo* di dosi crescenti di aglio non ha modificato in misura significativa l'ingestione alimentare, la produzione di latte e l'indice di conversione alimentare delle vacche in lattazione ($P>0.05$).

La produzione di acidi grassi volatili complessiva si è attestata intorno a 3.69 g/l con una produzione di acido acetico del 58.2 %, di acido propionico del 20.8 % e di acido butirrico del 14.7 %. Tutti gli altri acidi grassi ramificati rappresentano il 7.4% del totale (Tabella 10).

L'alimentazione delle vacche con aglio ha determinato una riduzione della percentuale dell'acido propionico nel liquido ruminale, che però non raggiunge la significatività statistica ($P>0.05$).

Analogamente, rispetto alla tesi di controllo "CTR", il rapporto (acetico+butirrico)/propionico è aumentato alimentando le vacche con elevati quantità di aglio (1200 g) passando rispettivamente da 3.54 a 4,36. Nonostante questa notevole differenza, l'effetto della somministrazione dell'aglio nella dieta delle vacche non ha raggiunto la significatività statistica per effetto dell'elevata variabilità di questo parametro (SEM= 0.58). L'unica variazione statisticamente rilevante è stata osservata per l'acido caproico, il cui aumento è proporzionale alla dose di aglio somministrata, da 0.4 % a 0.7 %, rispettivamente per la tesi di controllo e la tesi "aglio1200".

Riguardo il contenuto di ammoniaca ed il pH, l'impiego di aglio in dosi crescenti non ha determinato differenze significative.

Tabella 10. Effetto *in vivo* dell'alimentazione di vacche in lattazione con dosi crescenti di aglio, sull'ingestione alimentare, sulla produzione di latte e sulla composizione del liquido ruminale

	Trattamenti			SEM ¹	Contrasti ⁴	
	CTR	aglio400	aglio1200		LIN ²	QUAD ³
Ingestione alimentare, kg/SS	23.4	22.9	23.0	1.09	0.77	0.81
Produzione latte, kg	26.6	27.4	27.0	2.80	0.90	0.87
ICA ⁵	1.16	1.16	1.18	0.092	0.84	0.92
Acidi grassi volatili,						
AGV, g/l	3.48	4.03	3.57	0.71	0.93	0.58
Acetico, %	58.3	56.5	59.8	2.84	0.66	0.38
Propionico, %	21.9	22.9	17.6	3.12	0.36	0.44
N-butirrico, %	13.6	14.5	16.1	1.46	0.23	0.84
(a+b)/p ⁶	3.54	3.32	4.36	0.58	0.35	0.39
Caproico, %	0.42	0.49	0.70	0.07	0.001	0.14
Iso-butirrico, %	1.41	1.33	1.56	0.21	0.62	0.57
Iso-valerianico, %	2.45	2.28	2.56	0.24	0.63	0.28
N-valerianico, %	1.92	2.02	1.70	0.38	0.69	0.67
N-NH ₄ , mg/l	4.14	3.79	4.35	0.50	0.77	0.47
pH						
Liquido ruminale	7.18	6.94	7.17	0.15	0.96	0.19
Feci	6.43	6.47	6.43	0.16	1.00	0.47

¹SEM= standard error delle medie; ²LIN= effetto lineare dell'impiego di LR di vacche alimentate con dosi crescenti di aglio; ³QUAD= effetto quadratico dell'impiego di LR di vacche alimentate con dosi crescenti di aglio; ⁴Significatività ($P \leq 0,05$); ⁵ICA= indice di conversione alimentare; ⁶(a+b)/p= rapporto (acetico+butirrico)/propionico

4.2 Effetto degli additivi *in vitro*

L'effetto degli additivi è stato valutato *in vitro* attraverso due differenti modalità: in primo luogo sono stati confrontati gli effetti dei liquidi ruminali prelevati dalle vacche alimentate con o senza aglio (*CTR*, *aglio400* e *aglio1200*) sui processi fermentativi e, in secondo luogo, è stato valutato l'effetto dell'aggiunta o meno dell'aglio e del diallyl sulfide al liquido ruminale di controllo (*CTR+A012*, *CTR+A036*, *CTR+DAS*).

4.2.1 Effetti sulla degradabilità e sui prodotti di fermentazione

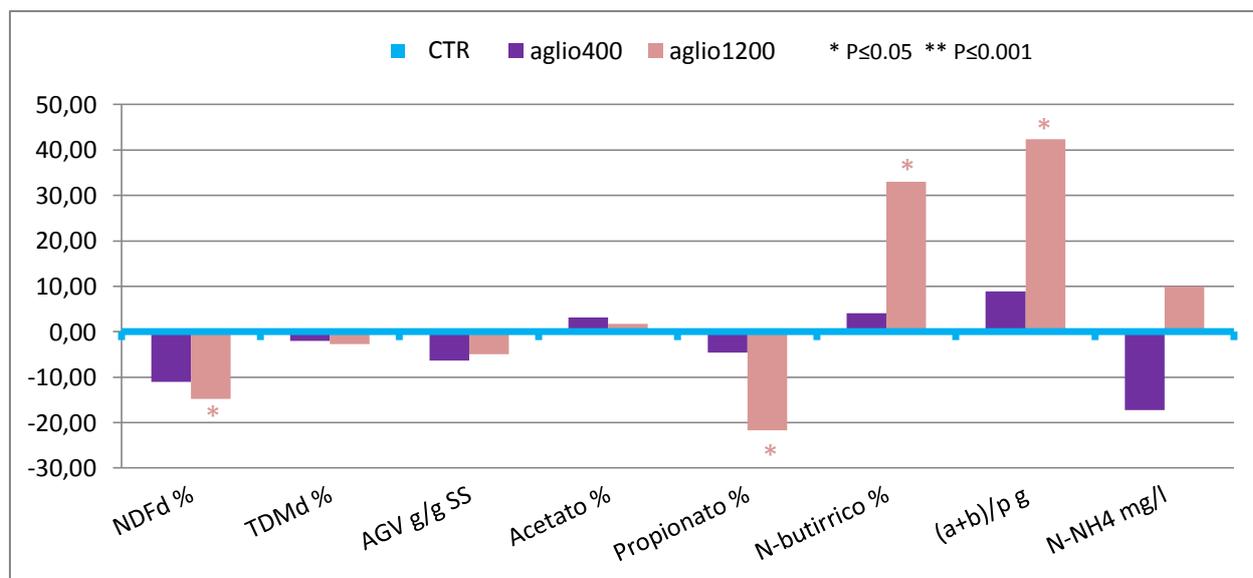
Effetto del liquido ruminale in vitro

L'effetto dell'aglio sull'attività del liquido ruminale è stata testata utilizzando il liquido ruminale prelevato dalle vacche, come inoculo microbico di fermentazioni *in vitro*. Come si può osservare nel Grafico 1, la somministrazione *in vivo* di aglio in dose 1200 g ha determinato una riduzione significativa nella variazione in percentuale della degradabilità della fibra, rispetto alla tesi di controllo (*CTR*). Anche la percentuale di propionato è diminuita in misura significativa, a differenza dell'acido N-butirrico. Di conseguenza, il rapporto (acetico+butirrico)/propionico è aumentato significativamente.

Dai dati riportati in Tabella 11 relativi ai contrasti, si può osservare che rispetto alla tesi di controllo “*CTR*”, il liquido ruminale delle vacche alimentate con aglio ha determinato una lineare riduzione della degradabilità della fibra e della dieta nel suo complessivo ($P=0.035$).

Nonostante questo, i liquidi ruminali trattati, non hanno modificato la produzione complessiva degli acidi grassi volatili, che si sono attestati intorno a 0.3 g/g di SS della dieta (Tabella 11). Analogamente a quanto osservato *in vivo*, il liquido ruminale delle vacche alimentate con aglio non ha modificato *in vitro* la proporzione di acido acetico, ma ha determinato una riduzione della proporzione di acido propionico a favore dell'acido N-butirrico ($P=0.011$; $P=0.035$). Di conseguenza, anche il rapporto (acetico+butirrico)/propionico è aumentato linearmente passando da valori prossimi a 2 a valori prossimi a 3 ($P=0.005$) rispettivamente per la tesi “*CTR*” e “*aglio1200*”.

Grafico 1. Effetto dell'impiego di liquido ruminale di vacche alimentate con aglio sui principali parametri di fermentazione *in vitro*. Il grafico riporta le variazioni percentuali dei diversi trattamenti (*aglio400* e *aglio1200*) rispetto al controllo (*CTR*)



Effetto dell'aglio in vitro

Le variazioni percentuali relative alle aggiunte di aglio *in vitro* al liquido ruminale di controllo, non sono risultate significative per i parametri NDFd e TDMd (Grafico 2).

Per la produzione di acidi grassi volatili totali si può osservare che, rispetto al controllo, è aumentata a differenza della percentuale di acetato che è diminuita a favore del propionato. Inoltre le variazioni dei trattamenti “A012” e “A036” hanno influenzato il rapporto (acetico+butirrico)/propionico, con una riduzione rispetto al controllo (Grafico 2).

L'aggiunta dell'aglio *in vitro* al liquido ruminale di controllo, ha modificato il pH al termine delle incubazioni in misura significativa ($P=0.011$) (Tabella 11). Nonostante questo, le differenze tra i trattamenti sperimentali sono state quantitativamente molto ridotte e non rilevanti sull'andamento dei processi fermentativi. A differenza di quanto evidenziato per i liquidi ruminali, l'impiego *in vitro* dell'aglio non ha modificato in misura significativa la degradabilità della fibra e dell'alimento nel suo complesso (Tabella 11).

All'aumentare della dose di aglio incubata, è stata osservata una riduzione lineare ($P<0.001$) della produzione di acidi grassi volatili e un incremento dell'acido propionico a scapito della produzione di acido acetico e N-butyrico ($P=0.001$). Questo ha determinato quindi una riduzione del rapporto (acetico+butirrico)/propionico all'aumentare della dose di aglio impiegata rispetto al controllo (lineare $P=0.001$; quadratico $P=0.026$). Inoltre, l'aggiunta *in vitro* dell'aglio ha

determinato una riduzione della produzione complessiva degli acidi grassi volatili ramificati e di ammoniacca (quadratico $P=0.018$) (Tabella 11).

Effetto del diallyl sulfide in vitro

Le variazioni in percentuale relative al trattamento *in vitro* con il diallyl sulfide rispetto al controllo, sono risultate significative per la degradabilità della fibra neutro deterosa e dell'alimento. Anche per la produzione degli acidi grassi, in particolare per l'acetato e il propionato si osserva una variazione significativa rispetto al controllo, a differenza del rapporto (acetico+butirrico)/propionico che non ha subito alcuna variazione (Grafico 2).

Secondo i dati riportati in Tabella 11, l'impiego di questo additivo ha modificato in misura significativa il pH dei liquidi di fermentazione ($P=0.011$), e ha provocato una riduzione della degradabilità della fibra neutro deterosa e della sostanza secca dell'alimento ($P=0.004$; $P=0.005$, rispettivamente), in misura analoga a quanto rilevato per i liquidi ruminali prelevati da vacche alimentate con aglio.

Questo additivo addizionato *in vitro* non ha influenzato la produzione di acidi grassi volatili totali, ma ha ridotto in modo significativo la percentuale di acido acetico ($P<0.001$), a favore dell'acido N-butirrico ($P=0.016$), mentre non ha avuto effetto sulla percentuale di acido propionico. Per questa ragione, il rapporto (acetico+butirrico)/propionico non si è modificato in misura significativa (Tabella 11).

È inoltre interessante osservare che, il trattamento con il diallyl sulfide, ha determinato un aumento complessivo della produzione degli acidi grassi volatili ramificati, in particolare per l'acido N-valerianico ($P<0.001$), ma non si è verificato un aumento della concentrazione di ammoniacca (Tabella 11).

Grafico 2. Effetti dell'aggiunta di aglio e diallyl sulfide sui principali parametri di fermentazione *in vitro*, espressi come variazioni percentuali dei diversi trattamenti (A012, A036, DAS) rispetto al controllo (CTR)

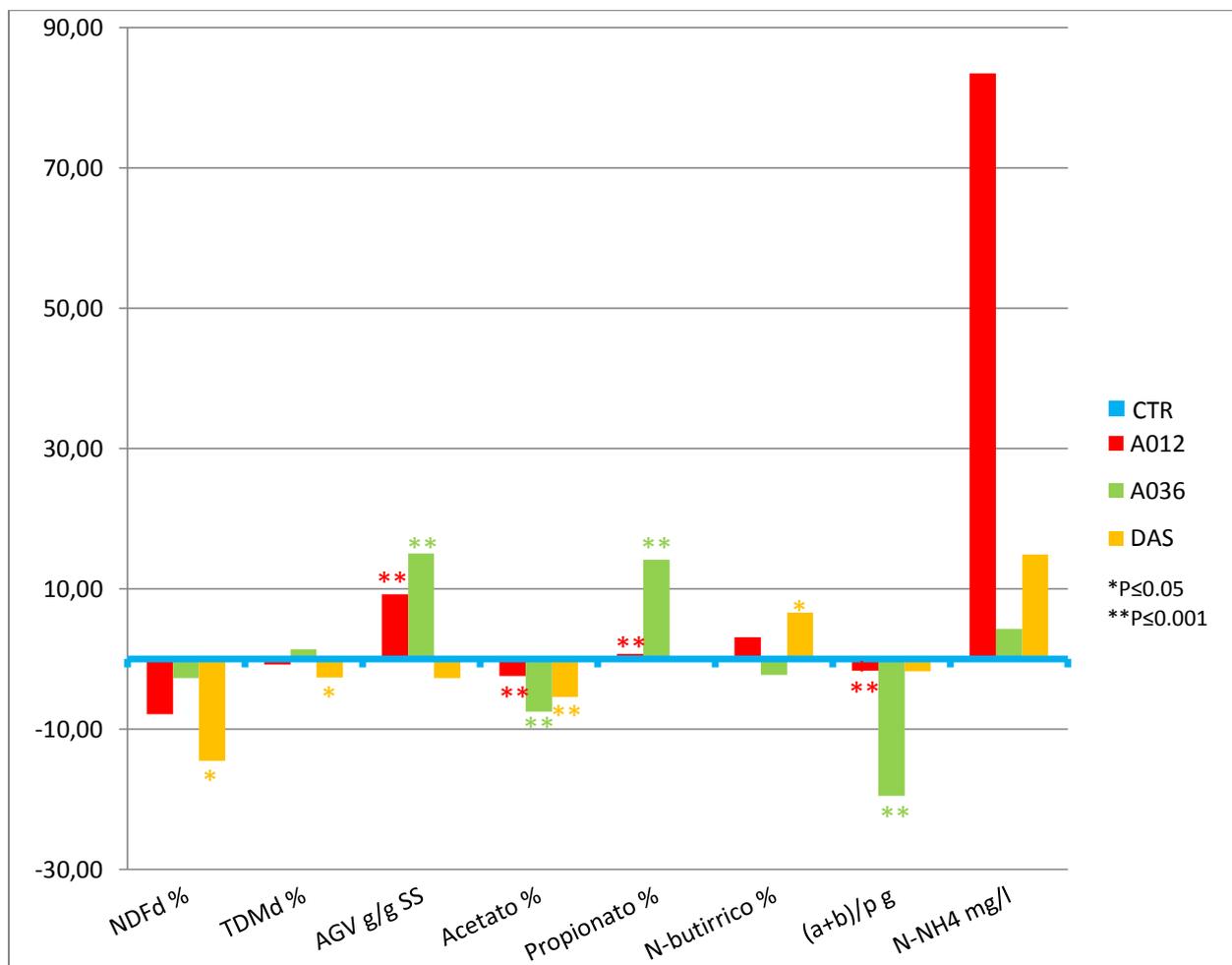


Tabella 11. Effetti *in vitro* sulla degradabilità e sui prodotti della fermentazione

	Trattamenti						SEM ¹	Contrasti				
	CTR	Liquido ruminale		Aggiunte <i>in vitro</i>				Liquido ruminale		Aggiunte <i>in vitro</i>		CTR vs DAS
		<i>aglio400</i>	<i>aglio1200</i>	<i>A012</i>	<i>A036</i>	<i>DAS</i>		LIN ²	QUAD ³	LIN	QUAD	
pH	6.75	6.75	6.76	6.76	6.72	6.79	0.02	0.39	0.67	0.011	0.034	0.011
Degradabilità												
NDFd, %	35.8	31.9	30.5	33.0	34.8	30.6	0.02	0.035	0.55	0.57	0.13	0.004
TDMd, %	75.3	73.8	73.3	74.8	76.4	73.3	0.01	0.06	0.60	0.12	0.08	0.005
Acidi grassi volatili prodotti												
AGV, g/g SS	0.31	0.29	0.29	0.34	0.35	0.30	0.02	0.51	0.55	<0.001	0.65	0.51
Acetato, %	41.5	42.8	42.2	40.5	38.4	39.3	1.13	0.66	0.48	0.001	0.28	<0.001
Propionato, %	31.0	29.6	24.3	31.2	35.4	31.1	2.05	0.011	0.39	0.001	0.004	0.95
N-butyrico, %	21.0	21.8	27.9	21.6	20.5	22.4	3.08	0.035	0.35	0.41	0.08	0.016
(a+b)/p ⁴ ,g	2.07	2.25	2.95	2.04	1.67	2.03	0.26	0.005	0.34	0.001	0.026	0.66
Iso-butyrico, %	1.09	1.01	0.97	1.10	0.96	1.19	0.12	0.46	0.90	0.011	0.09	0.049
Iso-valerianico, %	2.44	2.27	2.32	2.40	1.83	2.45	0.29	0.75	0.72	0.003	0.14	0.97
N-valerianico, %	3.63	2.98	2.85	3.63	3.47	4.10	0.59	0.35	0.72	0.22	0.53	<0.001
Caproico, %	0.32	0.30	0.28	0.32	0.27	0.39	0.20	0.90	0.99	0.26	0.43	0.08
N-NH ₄ , mg/l	2.95	2.44	3.25	5.42	3.08	3.39	1.29	0.86	0.65	0.91	0.018	0.69

¹SEM= standard error delle medie; ²LIN= effetto lineare dell'impiego di LR di vacche alimentate con dosi crescenti di aglio; ³QUAD= effetto quadratico dell'impiego di LR di vacche alimentate con dosi crescenti di aglio; ⁴(a+b)/p= rapporto (acetico+butirrico)/propionico; Significatività ($P \leq 0,05$)

4.2.2 Effetti sui gas di fermentazione

Effetto del liquido ruminale in vitro

L'alimentazione delle vacche con dosi crescenti di aglio ha modificato l'attività fermentativa *in vitro* del liquido ruminale. Come si può osservare nel Grafico 3, rispetto alla tesi di controllo, la variazione in percentuale del liquido ruminale di vacche alimentate con aglio in dose 1200 g è aumentata per quanto riguarda la concentrazione di metano, espresso in percentuale.

Questo risultato si può osservare anche nei dati riportati in Tabella 12, dove l'effetto della somministrazione *in vivo* di aglio al liquido ruminale, ha modificato in misura lineare la concentrazione di metano, espressa in percentuale, sul gas totale prodotto ($P=0.021$). Mentre per la concentrazione di idrogeno ($H_2\%$), non sono state osservate delle differenze significative rispetto al controllo ($P>0.05$) (Tabella 12).

Per quanto riguarda le variazioni orarie dei gas *in vitro* riportate nel Grafico 4, per tutti i trattamenti sperimentali (*CTR*, *aglio400* e *aglio1200*), il picco di produzione di gas è stato registrato intorno alla terza ora di incubazione, dopo del quale la velocità di produzione di gas si è ridotta progressivamente. In particolare, l'impiego di 1200 g di aglio al giorno, ha determinato un picco nella produzione di gas più alto, rispetto al controllo. Viceversa, nelle fasi successive dell'incubazione, la situazione si è invertita con una minore produzione di gas della tesi "*aglio 1200*" rispetto al controllo (Grafico 4).

Nonostante questo, secondo i dati riportati in Tabella 12, la produzione complessiva di gas è risultata più elevata per la tesi "*aglio1200*" rispetto al controllo, nelle fasi successive dell'incubazione ($P<0.001$). Viceversa, nelle prime ore di incubazione, la somministrazione di aglio in dose 1200 g, non ha modificato la cinetica di produzione di gas ($P>0.05$) (Tabella 12).

Grafico 3. Effetto dell'impiego di liquido ruminale di vacche alimentate con aglio sulla produzione dei gas di fermentazione *in vitro*. Il grafico riporta le variazioni percentuali dei diversi trattamenti (*aglio400* e *aglio1200*) rispetto al controllo (*CTR*)

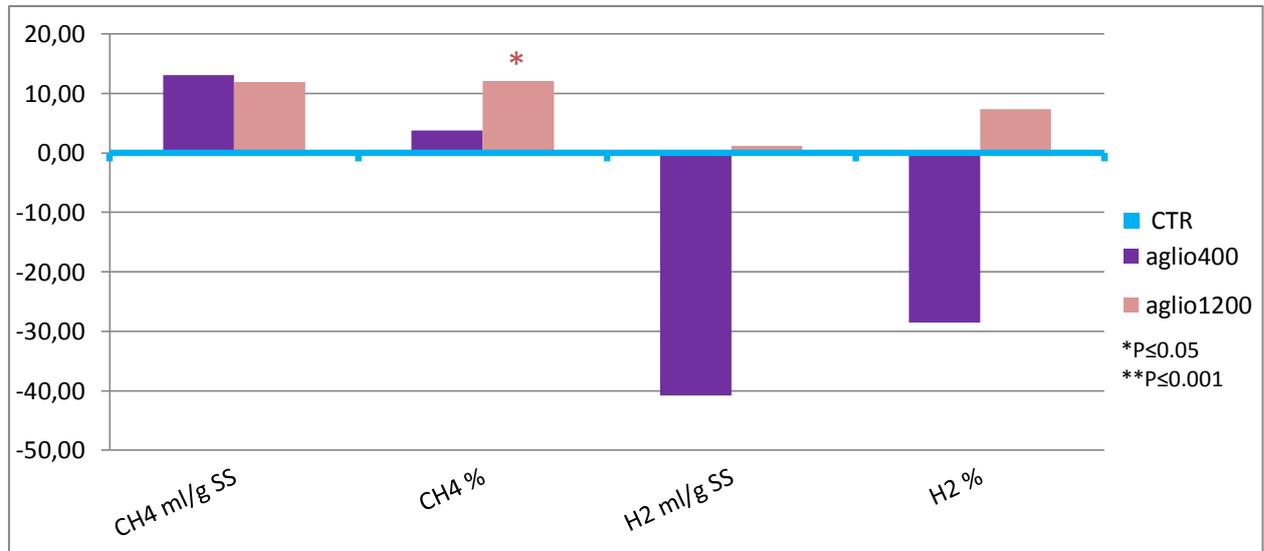
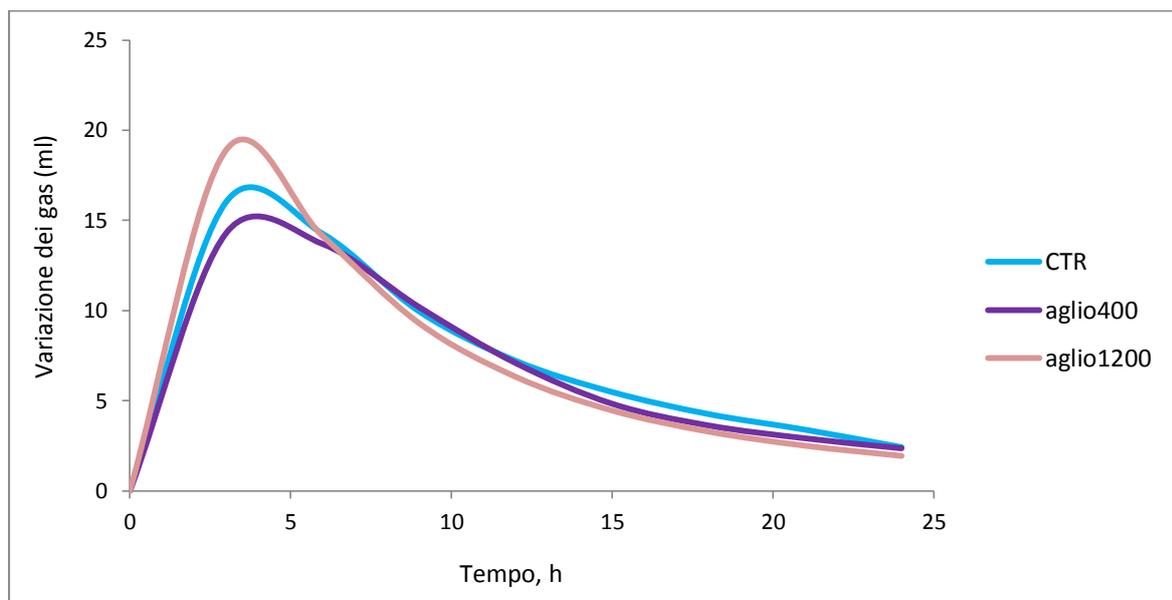


Grafico 4. Effetto dell'impiego di liquido ruminale di vacche alimentate con aglio sulla cinetica di produzione di gas *in vitro*. Il grafico riporta le variazioni orarie (ml/h) dei diversi trattamenti (*CTR*, *aglio400* e *aglio1200*)



Effetto dell'aglio in vitro

L'aggiunta *in vitro* di dosi crescenti di aglio, ha determinato una riduzione significativa nella variazione del metano, espresso in percentuale e dell'idrogeno, espresso in ml/g SS e in % (Grafico 5).

Dai dati riportati in Tabella 12, l'effetto dell'aggiunta *in vitro* di aglio, ha determinato una riduzione lineare e quadratica ($P=0.001$; $P=0.004$, rispettivamente) nella concentrazione di metano, espressa in percentuale. Analogamente, anche per la concentrazione in percentuale di idrogeno si evidenzia una significatività lineare ($P=0.002$).

Per quanto riguarda le variazioni orarie, riportate nel Grafico 6, le curve relative ai trattamenti "CTR", "A012" e "A036" presentano un andamento simile per quanto riguarda il picco, che si verifica attorno alle 3-4 ore di incubazione. In particolare, il picco più alto è rappresentato dall'aggiunta di aglio in dose 0.12 g, per poi diminuire con un andamento simile a quello del liquido di controllo a partire dalle 9 ore sino al termine dell'incubazione.

Trend un po' diverso riguarda l'aglio in dose 0.36 g che presenta anch'esso un picco maggiore rispetto al controllo, ma spostato verso le 5 ore di incubazione e più prolungato (Grafico 6).

Effetto del diallyl sulfide in vitro

L'aggiunta *in vitro* del diallyl sulfide, rispetto al controllo, non ha determinato una variazione significativa nella produzione di metano, espressa in percentuale. Viceversa, per la variazione relativa alla concentrazione di idrogeno, espressa in ml/g SS e in %, si è verificata una riduzione significativa (Grafico 5).

A differenza di quanto osservato nelle aggiunte *in vitro* di aglio, statisticamente il trattamento con il diallyl sulfide ha determinato solo una riduzione significativa della concentrazione di idrogeno, espresso in percentuale ($P=0.006$) (Tabella 12).

Nel Grafico 6, si può invece osservare che durante le 24 ore di incubazione, l'impiego del diallyl sulfide ha determinato una riduzione della produzione di gas rispetto al controllo nelle prime 6 ore, mentre è aumentata leggermente tra le 6 e le 18 ore di incubazione, per poi uniformarsi al liquido di controllo (CTR).

Grafico 5. Effetti dell'aggiunta di aglio e diallyl sulfide sulla produzione di gas *in vitro*. Il grafico riporta le variazioni dei gas dei diversi trattamenti (A012, A036, DAS) rispetto al controllo (CTR)

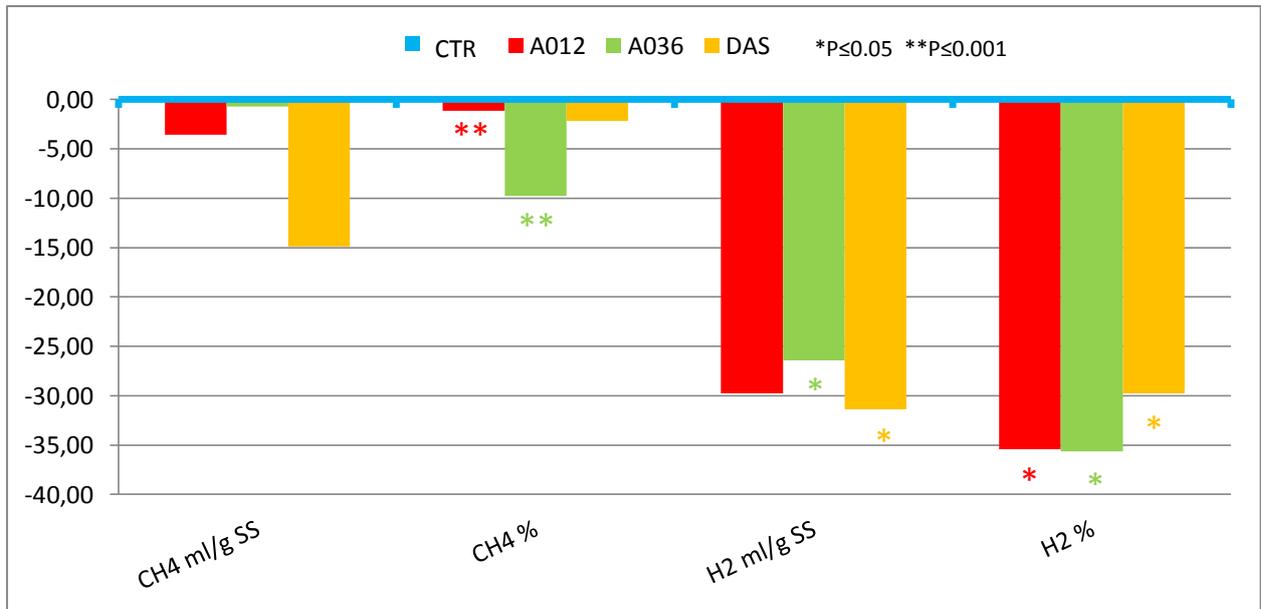


Grafico 6. Effetti dell'aggiunta di aglio e diallyl sulfide sulla cinetica di produzione di gas *in vitro*. Il grafico riporta le variazioni orarie (ml/h) dei diversi trattamenti (CTR, A012, A036, DAS)

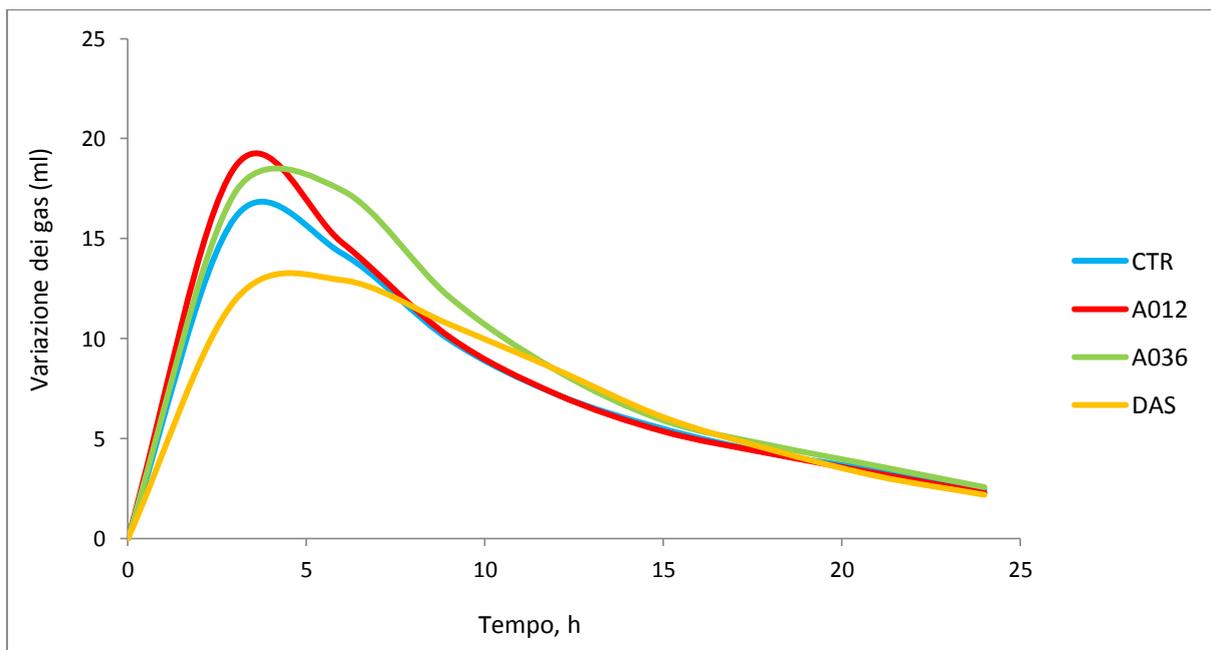


Tabella 12. Effetti *in vitro* sui gas di fermentazione

	Trattamenti						SEM ¹	Contrasti				
	CTR	Liquido ruminale		Aggiunte <i>in vitro</i>				Liquido ruminale		Aggiunte <i>in vitro</i>		
		<i>aglio400</i>	<i>aglio1200</i>	<i>A400</i>	<i>A1200</i>	<i>DAS</i>		LIN ²	QUAD ³	LIN	QUAD	CTR vs DAS
Produzione dei gas												
CH ₄ , ml/g SS	3.95	4.47	4.42	3.81	3.92	3.36	0.80	0.66	0.77	0.35	0.82	0.35
CH ₄ , %	14.1	14.6	15.8	13.9	12.7	13.8	0.52	0.021	0.62	0.001	0.004	0.13
H ₂ , ml/g SS	3.92	2.32	3.96	2.75	2.88	2.69	1.04	0.98	0.21	0.027	0.19	0.027
H ₂ , %	2.05	1.47	2.21	1.33	1.32	1.44	0.44	0.81	0.23	0.002	0.08	0.006
Produzione oraria												
GP3, ml/g SS	48.1	42.9	56.8	55.7	51.9	35.7	6.46	0.33	0.22	0.29	0.08	< 0.001
GP6, ml/g SS	91.5	84.3	99.6	100.6	104.6	75.0	9.20	0.52	0.31	0.004	0.51	< 0.001
GP9, ml/g SS	121.1	114.6	127.2	130.8	140.8	107.0	9.90	0.65	0.42	0.001	0.97	0.002
GP24 ml/s SS	208.4	194.9	201.0	209.5	213.0	197.7	12.0	0.65	0.49	0.49	0.85	0.10
Variazioni orarie												
Var 0-3, ml/h	16.0	14.3	18.9	18.6	17.3	11.9	2.18	0.33	0.22	0.29	0.08	< 0.001
Var 3-6, ml/h	14.3	13.7	14.1	14.8	17.4	12.9	1.09	0.93	0.70	0.001	0.053	0.020
Var 6-9, ml/h	9.96	10.2	9.30	10.1	12.1	10.7	0.68	0.49	0.50	0.001	0.008	0.038
Var 9-12, ml/h	7.22	7.09	6.33	7.22	8.42	8.45	0.58	0.19	0.59	0.001	0.069	< 0.001
Var 12-15, ml/h	5.49	4.84	4.47	5.36	5.91	6.07	0.45	0.043	0.75	0.21	0.27	0.07
Var 15-18, ml/h	4.27	3.64	3.30	4.25	4.67	4.45	0.29	0.009	0.65	0.12	0.35	0.45
Var 18-21, ml/h	3.40	2.93	2.51	3.26	3.63	3.12	0.26	0.017	0.92	0.22	0.13	0.11
Var 21-24, ml/h	2.43	2.37	1.95	2.28	2.57	2.19	0.22	0.13	0.52	0.07	0.08	0.07

¹SEM= standard error delle medie; ²LIN= effetto lineare dell'impiego di LR di vacche alimentate con dosi crescenti di aglio; ³QUAD= effetto quadratico dell'impiego di LR di vacche alimentate con dosi crescenti di aglio; ⁴Rapporto (a+b)/p= rapporto (acetico+butirrico)/propionico; Significatività ($P \leq 0,05$)

4.2.3 Effetti sulla quantificazione protozoaria

Effetto del liquido ruminale in vitro

L'effetto del liquido ruminale prelevato dalle vacche alimentate o meno con aglio non è stato significativo all'analisi statistica. I protozoi appartenenti all'ordine *Holotricha*, espressi in cell/mL e Log (n+1), sono diminuiti rispetto al controllo, ma in misura non significativa (Tabella 13). Al contrario, l'ordine *Entodiniomorphida*, espresso in Log (n+1), con la somministrazione di aglio in dose 1200 g, è aumentato evidenziando una significatività lineare ($P=0.002$). Come si può notare in Tabella 13, anche il numero totale dei due ordini di protozoi, espressi in Log (n+1) è aumentato in misura significativa ($P=0.003$).

Effetto dell'aglio in vitro

L'effetto dell'aggiunta *in vitro* di aglio in dose 0.12 g mostra una diminuzione dell'ordine *Holotricha*, espresso in Log (n+1), in misura significativa ($P=0.022$), invece per l'ordine *Entodiniomorphida*, espresso in Log (n+1), si può osservare una leggera diminuzione ma non significativa (Tabella 13).

Effetto del diallyl sulfide in vitro

Il trattamento con il diallyl sulfide ha portato ad una diminuzione significativa dell'ordine *Holotricha*, espresso in Log (n+1) ($P=0.022$), mentre i protozoi appartenenti all'ordine *Entodiniomorphida*, espresso in Log (n+1), non sono stati influenzati dal trattamento (Tabella 13).

Tabella 13. Effetti *in vitro* sulla quantificazione protozoaria

	Trattamenti						SEM ¹	Contrasti				
	CTR	Liquido ruminale		Aggiunte <i>in vitro</i>				Liquido ruminale		Aggiunte <i>in vitro</i>		
		<i>aglio400</i>	<i>aglio1200</i>	<i>A012</i>	<i>A036</i>	<i>DAS</i>		LIN ²	QUAD ³	LIN	QUAD	CTR vs DAS
Cell/mL												
Holotricha	160	100	100	50	200	0	61.9	0.49	0.70	0.07	0.10	0.07
Entodiniomorphida	2880	9150	14250	5300	5200	2450	2069	< 0.001	0.82	0.88	0.63	0.88
Totale	3040	9250	14350	5350	5400	2450	2106	< 0.001	0.83	0.84	0.67	0.84
Log (n+1)												
Holotricha	1.84	0.65	1.15	0.58	1.80	0	0.54	0.36	0.22	0.022	0.08	0.022
Entodiniomorphida	3.39	3.89	4.12	3.61	3.57	3.39	0.15	0.002	0.48	0.97	0.49	0.97
Totale	3.42	3.89	4.12	3.62	3.60	3.39	0.15	0.003	0.52	0.86	0.56	0.86

¹SEM= standard error delle medie; ²LIN= effetto lineare dell'impiego di LR di vacche alimentate con dosi crescenti di aglio; ³QUAD= effetto quadratico dell'impiego di LR di vacche alimentate con dosi crescenti di aglio; Significatività($P \leq 0,05$)

5. DISCUSSIONE

Effetto dell'aglio

Nella prova *in vivo*, l'impiego dell'aglio nell'alimentazione delle vacche da latte, non ha avuto effetti rilevanti sull'ingestione alimentare e sulle performance produttive delle vacche da latte e ha avuto solo blandi effetti sulla composizione del liquido ruminale, riducendo la proporzione di acido propionico rispetto all'acetico e al butirrico ma, tali variazioni, non hanno raggiunto la significatività statistica. I risultati ottenuti *in vivo* confermano inoltre che l'alimentazione delle vacche da latte con elevati dosaggi di aglio, non ha alterato i processi fermentativi ruminali e la capacità fermentativa da parte dei microorganismi.

Analogamente, anche nella prova *in vitro* l'impiego del liquido ruminale delle vacche alimentate con aglio ha aumentato le proporzioni di acido acetico e butirrico rispetto al propionico ma, in questo caso, le differenze tra le tesi sperimentali hanno raggiunto la significatività statistica. Questo risultato evidenzia come le metodologie *in vitro*, che permettono di standardizzare le condizioni sperimentali, consentono di mettere in luce effetti, anche molto blandi, che altrimenti non possono essere osservati con le convenzionali prove condotte *in vivo* sugli animali.

Per quanto concerne l'azione dell'aglio sull'attività del liquido ruminale, i risultati della prova *in vitro* suggeriscono un possibile effetto inibitorio di questo additivo alimentare sulla capacità degradativa dei microorganismi ruminali nei confronti della fibra e della dieta nel suo complesso.

In questo caso, questa diminuzione non è direttamente collegata con una riduzione di acido acetico, come accade solitamente ma, al contrario, è stata probabilmente influenzata da una riduzione dell'acido propionico. Questo può suggerire un effetto selettivo dell'additivo sulla popolazione microbica ruminale a favore dei microorganismi produttori di acido propionico. Non si può escludere che, oltre alla riduzione della fibra, ci sia stata anche una riduzione della degradabilità dell'amido che può spiegare la minore produzione di acido propionico. Nonostante questo, la somministrazione *in vivo* dell'aglio non ha ridotto la produzione complessiva di acidi grassi volatili, ma ne ha modificato la proporzione. Questo risultato, suggerisce una possibile modificazione dei rapporti tra i microorganismi ruminali ma non una riduzione della loro attività complessiva.

Sorprendentemente, a differenza di quanto osservato sia nella prova *in vivo* che utilizzando il liquido ruminale come inoculo microbico, l'aggiunta direttamente *in vitro* dell'aglio non ha influito sulla degradabilità della fibra e ha esplicito effetti opposti, rispetto a quanto visto in precedenza, sulla proporzione tra i diversi acidi grassi volatili, diminuendo il rapporto tra (acetico+butirrico)/propionico. Questo risultato conferma quanto riportato dallo studio di Al-

Hadeethi et al.(2016), il quale hanno affermato che l'aggiunta *in vitro* di estratti dell'aglio in sistemi di colture *in vitro*, non hanno effetti sulla digeribilità della dieta, ma aumenta il livello di propionato e riduce la proporzione di acetato.

In questa prova, per quanto riguarda il metabolismo proteico, gli effetti dell'aglio sembrano essere stati piuttosto limitati. Nella prova *in vivo*, non sono stati osservati effetti sulla concentrazione ruminale di ammoniaca. Allo stesso modo, anche nella somministrazione *in vivo* di aglio in dose 400 g e 1200 g, non sono stati osservati effetti dei diversi trattamenti sperimentali sulla produzione di acidi grassi ramificati e di ammoniaca, che sono i principali prodotti della degradazione degli amminoacidi ad opera dei microorganismi ruminanti.

Solo l'incubazione *in vitro* dell'aglio "A012" e "A036" sembra avere avuto un blando effetto inibitorio sulla produzione di acidi grassi ramificati (acido iso-valerianico e iso-butirrico).

Per quanto riguarda i gas di fermentazione, l'impiego del liquido ruminale di vacche alimentate con aglio come inoculo microbico, secondo l'analisi statistica ha avuto effetti sulle cinetiche di produzione di gas e ha aumentato la variazione percentuale del metano nei gas di fermentazione rispetto al liquido di controllo. Questo risultato, se pur inatteso, è però in accordo con la modifica della composizione degli acidi grassi volatili prodotti durante la fermentazione che, come precedentemente discusso, ha visto aumentare l'acido acetico e l'acido N-butirrico, a scapito dell'acido propionico. Infatti, la produzione di acido acetico e butirrico, è comunemente associata con la produzione di idrogeno, che viene utilizzata dai microorganismi del rumine per la produzione di metano (Moss et al., 2000; Boadi et al., 2004).

Viceversa, quando l'aglio è stato aggiunto direttamente *in vitro* (A012 e A036), è stato osservato un aumento della velocità di produzione di gas senza alcun effetto sulla produzione complessiva di gas ma una riduzione della proporzione di metano nei gas di fermentazione rispetto alla tesi di controllo (CTR). Anche in questo caso, la produzione di gas di fermentazione e di metano sono coerenti con la produzione di acidi grassi volatili. Infatti, l'incubazione *in vitro* di aglio ha favorito la produzione di acido propionico a scapito degli altri acidi grassi volatili.

Alcune ricerche hanno evidenziato che l'impiego di olio a base d'aglio (Busquet et al.,2005b; Wanapat et al.,2008; Kongmun et al., 2010) o dei principi attivi solforati (Ma et al., 2016) utilizzati in sistemi di coltura *in vitro*, può modificare l'attività microbica ruminale favorendo la produzione di acido propionico a scapito di quella acetica e butirrica. Il differente utilizzo dell'idrogeno che deriva dalla produzione di questi acidi grassi, riduce la disponibilità di idrogeno per la sintesi microbica del metano e quindi, ha effetti positivi sulla disponibilità di energia per la vacca e sull'emissione nell'ambiente di questo gas serra.

Un altro studio ha evidenziato che l'inibizione della produzione di metano attraverso la riduzione della popolazione metanogenica degli *Archaea*, porta ad un aumento della concentrazione di idrogeno utilizzato nel rumine per la sintesi dell'acido propionico (Al-Hadeethi et al., 2016).

Nella presente ricerca, l'aggiunta *in vitro* dell'aglio ha ridotto in misura significativa sia la produzione di metano che la produzione di idrogeno, e ciò può essere collegata ad un aumento della concentrazione di acido propionico.

Alcuni Autori (De Rosa et al., 1986) hanno ipotizzato che il meccanismo di azione dell'olio di aglio e alcuni composti organosolfuri derivanti, sarebbe relativo alla diretta inibizione degli *Archaea* metanogeni attraverso l'azione inibitoria dell'enzima 3-metil-glutaryl-coenzima A (HMG-CoA) reduttasi che catalizza la sintesi delle unità isoprenoide nelle membrane degli *Archaea*. In particolare i metanogeni e altri microrganismi *Archaea* presentano lipidi membrana unici che contengono glicerolo, unito da legami di etere con alcoli isoprenoidi a catena lunga, che non è presente in altri microorganismi ruminali (De Rosa et al., 1986). Di conseguenza, si verifica una inibizione della sintesi delle unità isoprenoide, la membrana diventa instabile e le cellule muoiono (Gebhardt & Becke, 1986; Busquet et al., 2005a; Soliva et al., 2011).

Anche lo studio *in vitro* condotto da Chaves et al. (2008), ha riportato che l'aggiunta di 100 e 250 mg/L di olio di aglio a microbi ruminali miscelati, ha ridotto la formazione di metano di circa il 70%.

Lo studio di Ohene-Adjei et al. (2008) ha riportato che l'aggiunta di olio di aglio (contenente allil mercaptene, 26%; allil trisulfide, 18%; allicina 1.5%) in una dieta di pecore, non ha influito sul numero totale di *Archea* metanogeni, quantificato dai numeri di copia 16S rRNA. Tuttavia, l'analisi filogenetica ha indicato che l'integrazione dell'olio di aglio ha inibito il *Methanogenic ruminantium*. Nello studio è stato suggerito che i composti organosolfuri possono aumentare la distribuzione filogenetica degli *Archaea* metanogeni modificando la presenza nelle diverse specie protozoali a cui sono associati.

Per quanto riguarda il trattamento con l'aglio in polvere, Kongmun et al. (2010) hanno evidenziato un significativo abbassamento della produzione di metano, rispetto al controllo, e nel 2011 hanno osservato un effetto antimetanogenico dell'aglio e dei suoi componenti con la diretta inibizione dei microrganismi *Archaea* nel rumine.

Analogamente, altri studi *in vitro* che hanno utilizzato bulbi di aglio (Sterfl et al., 2010) ed estratto di aglio (El Din et al., 2012), hanno mostrato un chiaro effetto mitigatorio sulla produzione del metano rispetto al controllo.

Un altro studio dove l'aglio ha mostrato effetti positivi sulla riduzione di metano, è l'esperimento condotto da Al-Hadeethi et al.(2016) che ha previsto l'utilizzo di estratti di aglio in differenti dosaggi, in un sistema di coltura *in vitro*.

Nei risultati ottenuti dalla presente ricerca, relativi alla conta protozoaria, è stato osservato rispetto alla tesi di controllo (*CTR*), un aumento significativo dell'ordine *Entodiniomorpha* con la somministrazione *in vivo* di aglio. Viceversa, con l'aggiunta *in vitro* di aglio si è verificata una riduzione dell'ordine *Holotricha*.

Questi risultati possono suggerire un collegamento con la produzione di metano, ad esempio nelle aggiunte *in vitro* si è verificata una riduzione della concentrazione di metano.

Uno studio ha ipotizzato che, la diminuzione della popolazione dei protozoi potrebbe essere responsabile della riduzione dei metanogeni, in quanto la popolazione totale dei metanogeni ha subito una diminuzione in numero assoluto e proporzionale alla popolazione batterica totale, in assenza dei protozoi (Takenaka & Itabashi, 1995). Come è stato riportato in precedenza, alcuni Autori (Ohene-Adjeiet et al.,2007) hanno osservato che i metanogeni ruminali condividono rapporti simbiotici o commensali non casuali con protozoi, e una loro riduzione può portare ad un decremento della popolazione protozoaria. Tuttavia, gli studi di Patra et al.(2006) e Busquet et al.(2005b) hanno evidenziato una grande riduzione della produzione di metano da parte degli oli di aglio, senza però cambiamenti significativi nelle popolazioni dei protozoi. Questi Autori non hanno supportato l'ipotesi che la riduzione della metanogenesi sia associata ad una riduzione della popolazione protozoaria.

In questa prova, inoltre, la somministrazione *in vivo* di aglio ha diminuito la produzione di acido propionico determinando un aumento della popolazione protozoaria, e ciò è in accordo con lo studio di Wallance et al.(2002) dove ha riportato che l'inibizione dei protozoi dovuta all'aggiunta di aglio e dei suoi componenti, può favorire le specie batteriche adibite alla produzione di propionato, con l'accumulo di acido propionico nel rumine.

Effetto del diallyl sulfide

Il diallyl sulfide è uno dei principali composti solforati che si libera a seguito della rottura degli spicchi di aglio. La dose di questo composto utilizzato *in vitro* (30 mg/g DM), è stata scelta in modo da essere simile alla quantità di composti solforati apportata dalla dose elevata di aglio macinato (0.36 g/bottiglia).

Questo principio attivo ha avuto effetti sensibilmente differenti rispetto all'aglio fresco. Infatti, in questo studio, ha determinato una riduzione della degradabilità della fibra della dieta, ma non ha

modificato la produzione complessiva di acidi grassi volatili, il rapporto tra (acetico+butirrico)/propionico e quindi la produzione di metano. Nonostante questo, il principio attivo ha ridotto la produzione di acido acetico a favore dell'acido N-butirrico. In aggiunta, il diallyl sulfide ha determinato un sensibile rallentamento delle cinetiche di produzione di gas con lo spostamento del picco di produzione di gas da 3 ore a 6 ore dopo l'inizio delle incubazione. Complessivamente però, la produzione di gas non è stata differente rispetto alla tesi di controllo (*CTR*). A differenza di quanto osservato per l'aglio, il diallyl sulfide ha esercitato un effetto inibitorio sui processi fermentativi ruminali che però, non ha compromesso la degradazione della dieta. L'aumento dell'acido N-butirrico può anche suggerire che, il diallyl sulfide, in quanto composto solforoso, non ha esercitato un effetto inibitorio nei confronti della crescita dei protozoi ruminali ma al contrario sembra aver prevalso un effetto stimolante sulla loro attività. In realtà, dai risultati ottenuti nel presente studio sulla conta protozoaria, i protozoi appartenenti all'ordine *Holotricha*, espressi in Log (n+1), sono diminuiti rispetto alla tesi controllo (*CTR*) in misura significativa. Inoltre il diallyl sulfide, ha incrementato la produzione di acido propionico, seppur in misura non significativa, a differenza dello studio *in vitro* riportato da Busquet et al.(2005a), che ha utilizzato differenti concentrazioni (3, 30, 300, 3000 mg/l di cultura microbica) di olio di aglio, diallyl sulfide e altri componenti. Questi Autori hanno evidenziato una diminuzione nella proporzione di propionato a favore del butirato, con l'aggiunta di "DAS" in dose 3000 mg/l.

Nella presente ricerca, il trattamento con il "DAS", ha ridotto in misura significativa la concentrazione di idrogeno e ciò potrebbe essere dovuto all'aumento della produzione di N-butirrico, la cui formazione richiede un forte utilizzo di idrogeno. Al contrario, la riduzione del metano non è risultata significativa e questo limitato effetto sulla produzione di metano può essere legato anche alla quantità di principio attivo utilizzato (7 mg/l).

Una ricerca condotta da McAllister & Newbold (2008) ha osservato che all'allicina in dosi pari a 20 mg/ l ha ridotto il numero di metanogeni, ma tale effetto non è stato osservato con dosaggi pari a 2 mg/l. Gli Autori hanno ipotizzato che l'olio di aglio, quando utilizzato in dosi elevate, potrebbe inibire sia i metanogeni che altri microrganismi del rumine.

Lo studio di Kamel et al.(2008) sull'effetto dell'allicina e del diallyl disulfide sulle fermentazioni ruminali *in vitro*, non ha mostrato effetti significativi sulla produzione di metano. Ma et al.(2016) invece, a seguito dell'aggiunta *in vivo* di allicina in una razione per pecore in dose 2 g, hanno riportato una diminuzione giornaliera di emissione di metano e una diminuzione della popolazione metanogenica.

Un simile risultato si può riscontrare nello studio di Busquet et al.(2005a) che hanno esaminato l'effetto dell'olio di aglio e dei suoi componenti principali come il diallyl sulfide, l'allyl mercaptene e altri, e hanno osservato che l'allicina e il diallyl sulfide hanno un minor effetto sulla riduzione del metano. Inoltre gli stessi Autori, hanno ipotizzato che l'olio d'aglio non esercita il suo effetto sulla produzione di metano attraverso la stessa modalità di azione del Monensin (che inibisce specificamente i batteri Gram-positivi), ma piuttosto attraverso un'inibizione diretta dei microrganismi *Archaea* nel rumine.

In questa prova, il trattamento con il diallyl sulfide ha influenzato la popolazione protozoaria, in particolare l'ordine *Holotricha*. Si può ipotizzare che l'additivo abbia esercitato un effetto inibitorio nei confronti della crescita dei protozoi ruminanti, seppur in piccola parte perché il risultato è relativo alla sola categoria di *Holotricha*. Lo studio di Ma et al.(2016) che prevede l'aggiunta *in vitro* di allicina, ha evidenziato una diminuzione della popolazione dei protozoi, seppur in modo non significativo.

L'aggiunta *in vitro* del diallyl sulfide nella presente ricerca, ha determinato anche un aumento della produzione di acidi grassi ramificati che suggeriscono un aumento dell'attività proteolitica microbica. Questo però non è stato confermato da un aumento significativo della concentrazione di ammoniaca nel trattamento "DAS". Lo studio di Cardozo et al.(2005), ha riportato una diminuzione della produzione di azoto ammoniacale (N-NH₃) con l'aggiunta di olio di aglio, e gli Autori ipotizzano un'inibizione dei processi di deaminazione e peptidolisi, nelle 24h di incubazione *in vitro*. Un'altra ricerca ha osservato che l'olio di aglio, ha ridotto la popolazione dei *Prevotella*, che sono i batteri più abbondanti nel rumine responsabili della proteolisi e della deaminazione (Ferme et al., 2004). Altri studi hanno evidenziato che l'olio di aglio può ridurre l'attività di deidrogenasi (Hino & Russell, 1985) spiegando quindi come questo estratto può ridurre il tasso di deaminazione, portando ad una diminuzione della produzione di azoto ammoniacale nel rumine (Al-Hadeethi et al., 2016).

6. CONCLUSIONI

La somministrazione *in vivo* di elevate quantità di aglio a bovine in lattazione non ha determinato cambiamenti nell'ingestione alimentare, nella produzione di latte e sui parametri fermentativi ruminali.

Nelle prove *in vitro* sono stati osservati effetti sensibilmente differenti e spesso contraddittori quando è stato utilizzato l'aglio direttamente *in vitro* e quando è stato utilizzato il liquido ruminale di vacche alimentate con aglio come inoculo microbico.

In particolare, il liquido ruminale trattato *in vivo* con l'aglio ha diminuito la degradabilità della fibra, la produzione di acido propionico e incrementato la produzione di metano e la presenza di protozoi. Viceversa l'aggiunta *in vitro* di aglio, non ha avuto effetti sulla fermentazione della fibra ma ha incrementato la produzione di acido propionico riducendo la produzione di metano la presenza di protozoi.

L'insieme di questi risultati, conferma quanto già riportato in letteratura in merito agli effetti inibitori dell'aglio sulla metanogenesi quando misurati *in vitro* e supporta l'ipotesi che tale effetto sia legato ad una riduzione dell'attività protozoaria. La presente prova non ha confermato che tale attività inibitoria si possa esplicitare anche *in vivo*. Viceversa, l'impiego di liquido ruminale di vacche alimentate con aglio come inoculo microbico *in vitro*, suggerisce che l'effetto inibitorio dell'aglio possa scomparire molto rapidamente e possano verificarsi fenomeni compensatori che favoriscono la sintesi di metano attraverso un aumento della presenza di protozoi.

L'aggiunta *in vitro* del diallyl sulfide, uno dei principali composti solforati dell'aglio, ha avuto effetti sensibilmente differenti rispetto a quelli osservati utilizzando l'alimento nel suo complesso. Infatti, a differenza dell'aglio, il diallyl sulfide ha rallentato i processi fermentativi, ridotto la degradabilità della fibra della dieta, inibito la degradazione delle proteine e ridotto la presenza di protozoi, ma non ha modificato il rapporto tra (acetico+butirrico)/propionico e quindi non ha ridotto la produzione di metano in misura significativa. L'attività di questo principio attivo dell'aglio, non sembra selettivo nei confronti dei microorganismi responsabili della metanogenesi, ma si esplica sull'insieme dei processi fermentativi ruminali. Questo suggerisce che l'attività inibitoria dell'aglio sui protozoi e sui microrganismi metanogeni, sia legata ad altri principi attivi e che l'attività di questo alimento possa dipendere anche dalla forma fisica con cui viene somministrato agli animali.

BIBLIOGRAFIA

Al-Hadeethi A., Günal M., Reyes D. & AbuGhazaleh A. (2016). The effects of plants extracts on fermentation and methane production under *in vitro* conditions. *Global Journal of Bio-Science and Biotechnology*, 5 (2),235-260.

Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S., & Itakura, Y. (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of nutrition*, 131(3), 955S-962S.

Amagase, H. (2006). Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *The Journal of nutrition*, 136(3), 716S-725S.

Archer, D., & Brovkin, V. (2008). The millennial atmospheric lifetime of anthropogenic CO₂. *Climatic Change*, 90(3), 283-297

Ankri, S., & Mirelman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and infection*,1(2), 125-129.

Barker, T., Davidson, O., Davidson, W., Huq, S., Karoly, D., Kattsov, V., ... & Menne, B. (2007). Climate change 2007: synthesis report. *Valencia; IPCC*.

Beauchemin, K. A., Kreuzer, M., O'mara, F., & McAllister, T. A. (2008). Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*,48(2), 21-27.

Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A., & Beauchemin, K. A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*,145(1), 209-228.

Boadi, D., Benchaar, C., Chiquette, J., & Massé, D. (2004). Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review. *Canadian Journal of Animal Science*,84(3), 319-335.

Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Carro, M. D., & Kamel, C. (2005a). Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 88(12), 4393-4404.

Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Cardozo, P. W., & Kamel, C. (2005b). Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2508-2516.

Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, 90(6), 2580-2595.

Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2004). Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science*, 82(11), 3230-3236.

Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2005). Screening for the effects of natural plant extracts at two pH levels on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate beef cattle diet. *XI Jornadas sobre Producción Animal, Zaragoza, Spain, 11-12 Mayo, 2005 (Volúmenes I & II)*, 617-619.

Caserini, S. (2015). Cambiamenti climatici e sicurezza alimentare. *Ingegneria dell'Ambiente*, 2(1).

Chao, S. C., Young, D. G., & Oberg, C. J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12(5), 639-649.

Chaves, A. V., Stanford, K., Dugan, M. E. R., Gibson, L. L., McAllister, T. A., Van Herk, F., & Benchaar, C. (2008). Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Livestock Science*, 117(2), 215-224.

Cicerone, R. J., & Oremland, R. S. (1988). Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global biogeochemical cycles*, 2(4), 299-327.

- Coderoni, S., Valli, L., Pignedoli, S., Tozzi, L., Pantano, A., & Vinci, A. (2010).** Emissioni di gas serra degli allevamenti italiani. *Quali scenari*.
- Crovetto, G. M., & Sandrucci, A. (2010).** *Allevamento animale e riflessi ambientali*. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche.
- De Rosa, M. A. R. I. O., Gambacorta, A., & Gliozzi, A. (1986).** Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiological Reviews*,50(1), 70.
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- Edenhofer, O., Pichs-Madruga, R., Sokona, Y., Farahani, E., Kadner, S., Seyboth, K., ... & Kriemann, B. (2014).** IPCC, 2014: summary for policymakers. *Climate change*.
- El-Din, T. AA & Nasser, ME (2012).** Effect of some herbs on the rumen fermentation: 1-Effect of ginger (*zingiber officinale*) and garlic (*allium sativum*) on gas production, energy values, organic matter digestibility and methane emission, in vitro. *Journal of Agricultural and Environnementa Science*,11, 33-53.
- Faniyi, T. O., Adewumi, M. K., Prates, Ê. R., & Ayangbenro, A. S. (2016).** Effect of herbs and spices (plant extracts) on rumen microbial activities: a review. *PUBVET*, 10(6), 477-486.
- Ferre, D., Banjac, M., Calsamiglia, S., Busquet, M., Kamel, C., & Avguštin, G. (2004).** The effects of plant extracts on microbial community structure in a rumen-simulating continuous-culture system as revealed by molecular profiling. *Folia microbiologica*,49(2), 151-155.
- Gebhardt, R., & Beck, H. (1996).** Differential inhibitory effects of garlic-derived organosulfur compounds on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocyte cultures. *Lipids*,31(12), 1269-1276.
- Gerber, P., Vellinga, T., Opio, C., Henderson, B., & Steinfeld, H. (2010).** Greenhouse gas emissions from the dairy sector: a life cycle assessment. *Africa, S, I*, 94.

Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., ... & Tempio, G. (2013). *Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

Greathead, H. (2003). Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(2), 279-290.

Guenther, E. (1948). The essential oils, volume I.

Guglielmelli, A. (2009). *Studio sulla produzione di metano nei ruminanti: valutazione in vitro di alimenti e diete* (Doctoral dissertation, Università degli Studi di Napoli Federico II).

Hart, K. J., Yanez-Ruiz, D. R., Duval, S. M., McEwan, N. R., & Newbold, C. J. (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1), 8-35.

Hino, T. S. U. N. E. O., & Russell, J. B. (1985). Effect of reducing-equivalent disposal and NADH/NAD on deamination of amino acids by intact rumen microorganisms and their cell extracts. *Applied and environmental microbiology*, 50(6), 1368-1374.

Hungate, R. E., Smith, W., Bauchop, T., Yu, I., & Rabinowitz, J. C. (1970). Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. *Journal of Bacteriology*, 102(2), 389-397.

Iannotti, E. L., Kafkewitz, D., Wolin, M. J., & Bryant, M. P. (1973). Glucose fermentation products of *Ruminococcus albus* grown in continuous culture with *Vibrio succinogenes*: changes caused by interspecies transfer of H₂. *Journal of Bacteriology*, 114(3), 1231-1240.

Jayanegara, A., Togtokhbayar, N., Makkar, H. P., & Becker, K. (2009). Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an in vitro rumen fermentation system. *Animal Feed Science and Technology*, 150(3), 230-237.

Jardine, C. N., Boardman, B., Osman, A., Vowles, J., & Palmer, J. (2004). Methane UK. *The environmental change institute*.

Johnson, K. A., & Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of animal science*,73(8), 2483-2492.

Kamra, D. N., Agarwal, N., & Chaudhary, L. C. (2006, July). Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. In *International Congress Series* (Vol. 1293, pp. 156-163). Elsevier.

Kamra, D. N., Agarwal, N., Sakthivel, P. C., & Chaudhary, L. C. (2012). Garlic as a rumen modifier for eco-friendly and economic livestock production. *Journal of applied animal research*,40(2), 90-96.

Knapp, J. R., Laur, G. L., Vadas, P. A., Weiss, W. P., & Tricarico, J. M. (2014). Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of Dairy Science*,97(6), 3231-3261.

Kodera, Y., Suzuki, A., Imada, O., Kasuga, S., Sumioka, I., Kanezawa, A., ... & Maeshige, K. (2002). Physical, chemical, and biological properties of S-allylcysteine, an amino acid derived from garlic. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(3), 622-632.

Kongmun, P., Wanapat, M., Pakdee, P., & Navanukraw, C. (2010). Effect of coconut oil and garlic powder on in vitro fermentation using gas production technique. *Livestock science*, 127(1), 38-44.

Kongmun, P., Wanapat, M., Pakdee, P., Navanukraw, C., & Yu, Z. (2011). Manipulation of rumen fermentation and ecology of swamp buffalo by coconut oil and garlic powder supplementation. *Livestock Science*, 135(1), 84-92.

Lawson, L. D. (1996). The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. *Garlic: the science and therapeutic application of Allium sativum L. and related species*, 2, 37-107.

Le Mer, J., & Roger, P. (2001). Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: a review. *European Journal of Soil Biology*, 37(1), 25-50.

- Liu, Y., & Whitman, W. B. (2008).** Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 171-189.
- López, S., Dhanoa, M. S., Dijkstra, J., Bannink, A., Kebreab, E., & France, J. (2007).** Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, 135(1), 139-156.
- Ma, T., Chen, D., Tu, Y., Zhang, N., Si, B., Deng, K., & Diao, Q. (2016).** Effect of supplementation of allicin on methanogenesis and ruminal microbial flora in Dorper crossbred ewes. *Journal of animal science and biotechnology*, 7(1), 1.
- McAllister, T. A., Cheng, K. J., Okine, E. K., & Mathison, G. W. (1996).** Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, 76(2), 231-243.
- McAllister, T. A., & Newbold, C. J. (2008).** Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2), 7-13.
- Menke, K. H. (1988).** Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim Res Dev*, 28, 7-55.
- Mertens, D. R. (2002).** Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC international*, 85(6), 1217-1240.
- Miller, T. L., & Wolin, M. J. (2001).** Inhibition of growth of methane-producing bacteria of the ruminant forestomach by hydroxymethylglutaryl~ SCoA reductase inhibitors. *Journal of Dairy Science*, 84(6), 1445-1448.
- Mirzaei-Aghsaghali, A., & Maheri-Sis, N. (2011).** Factors affecting mitigation of methane emission from ruminants I: Feeding strategies. *Asian J. Anim. Vet. Adv*, 6(9), 888-908.
- Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C. J. (2010).** Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *animal*, 4(7), 1024-1036.

Moss, A. R., Jouany, J. P., & Newbold, J. (2000, May). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. In *Annales de zootechnie* (Vol. 49, No. 3, pp. 231-253). EDP Sciences.

Murray, R. M., Bryant, A. M., & Leng, R. A. (1976). Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *British Journal of Nutrition*, 36(1), 1-14.

Nagaraja, T. G. (2016). Microbiology of the Rumen. In *Rumenology* (pp. 39-61). Springer International Publishing.

Ohene-Adjei, S., Teather, R. M., Ivan, M., & Forster, R. J. (2007). Postinoculation protozoan establishment and association patterns of methanogenic archaea in the ovine rumen. *Applied and environmental microbiology*, 73(14), 4609-4618.

Ohene-Adjei, S., Chaves, A. V., McAllister, T. A., Benchaar, C., Teather, R. M., & Forster, R. J. (2008). Evidence of increased diversity of methanogenic archaea with plant extract supplementation. *Microbial ecology*, 56(2), 234-242.

Patra, A. K., Kamra, D. N., & Agarwal, N. (2006). Effect of plant extracts on in vitro methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*, 128(3), 276-291.

Patra, A. K., Kamra, D. N., Bhar, R., Kumar, R., & Agarwal, N. (2008). Plant secondary metabolites present in *Terminalia chebula* and *Allium sativum* reduce methane emission in sheep. *Aust J Exp Agric*, 48, lxx-lxxi.

Patra, A. K., & Saxena, J. (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(11), 1198-1222.

Riguera, R. (1997). Isolating bioactive compounds from marine organisms. *Journal of Marine Biotechnology*, 5, 187-193.

Soliva, C. R., Amelchanka, S. L., Duval, S. M., & Kreuzer, M. (2011). Ruminant methane inhibition potential of various pure compounds in comparison with garlic oil as determined with a rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 106(1), 114-122.

Solomon, S. (Ed.). (2007). *Climate change 2007-the physical science basis: Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC* (Vol. 4). Cambridge University Press.

Staerfl, S. M., Kreuzer, M., & Soliva, C. R. (2010). In vitro screening of unconventional feeds and various natural supplements for their ruminal methane mitigation potential when included in a maize-silage based diet. *J Anim Feed Sci*, 19(19), 651-664.

Takenaka, A., & Itabashi, H. (1995). Changes in the population of some functional groups of rumen bacteria including methanogenic bacteria by changing the rumen ciliates in calves. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 41(5), 377-387.

Teferedegne, B., McIntosh, F., Osuji, P. O., Odenyo, A., Wallace, R. J., & Newbold, C. J. (1999). Influence of foliage from different accessions of the sub-tropical leguminous tree, *Sesbania sesban*, on ruminal protozoa in Ethiopian and Scottish sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 78(1), 11-20.

Thauer, R. K. (1998). Biochemistry of methanogenesis: A tribute to Marjory Stephenson: 1998 Marjory Stephenson prize lecture. *Microbiology*, 144(9), 2377-2406.

Thomson, I. S. I. (2012). Afshar Mirzaei-Aghsaghali, Syed Alireza Syadati, Hasan Fathi, Sohrab Rasouli, Mohammad Sadaghian and Mohamad Tarahomi. *Asian Journal of Biological Sciences*, 5(7), 328-340.

Van Soest, P. V., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*, 74(10), 3583-3597.

Wallace, R. J., McEwan, N. R., McIntosh, F. M., Teferedegne, B., & Newbold, C. J. (2002). Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 15(10), 1458-1468.

Wanapat, M., Khejornsart, P., Pakdee, P., & Wanapat, S. (2008). Effect of supplementation of garlic powder on rumen ecology and digestibility of nutrients in ruminants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(13), 2231-2237.

Wang, H. C., Pao, J., Lin, S. Y., & Sheen, L. Y. (2012). Molecular mechanisms of garlic-derived allyl sulfides in the inhibition of skin cancer progression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1271(1), 44-52.

Wina, E., Muetzel, S., & Becker, K. (2005). The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production A Review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(21), 8093-8105.

Wuebbles, D. J., & Hayhoe, K. (2002). Atmospheric methane and global change. *Earth-Science Reviews*, 57(3), 177-210.

Yildiz, G., Tekeli, A., Drochner, W., & Steingass, H. (2015). Determination of the effects of some plant extracts on rumen fermentation and protozoal counts by hohenheim" in vitro" gas production Technique. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(2), 18-26.

Yoshiki, Y., Kudou, S., & OKuBo, K. (1998). Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(12), 2291-2299.

SITOGRAFIA

www.ankom.com, consultato a marzo 2017

www.crisoninstruments.com, consultato ad aprile 2017

www.epa.gov/ghgemissions/global-greenhouse-gas-emissions-data, consultato a luglio 2017

<https://icp.giss.nasa.gov/education/methane/intro/cycle>, consultato a luglio 2017

www.igwsrl.com/blog/biogas-e-biometano/digestione-anaerobica, consultato ad agosto 2017

www.skinc.com, consultato a marzo 2017