



UNISS
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI SASSARI

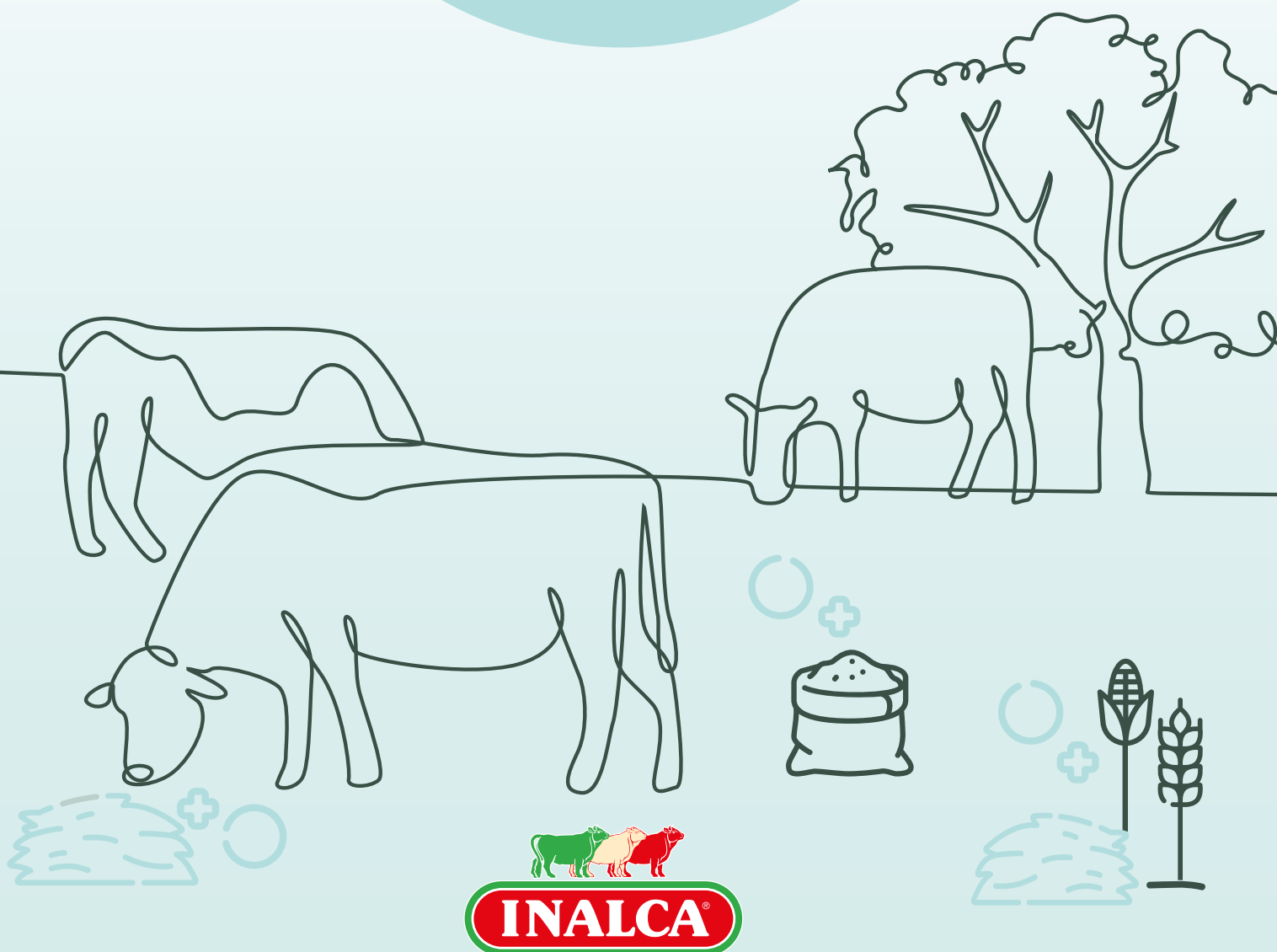


UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI MILANO



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

RELAZIONE FINALE PROGETTO METHAN/CUT





UNISS
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI SASSARI



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI MILANO



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

PROGETTO METHANCUT

Giuseppe Pulina¹,
Carlo Sgoifo Rossi²,
Andrea Formigoni³,
Sara Sechi¹,
Silvia Grossi²,
Giovanni Buonaiuto³,
Mondina F. Lunesu¹,
Silvia Carta¹,
Fabio Correddu¹,
Damiano Cavallini³

¹ Università degli studi
di Sassari,
Dipartimento di Agraria,
viale Italia 39a,
07100 Sassari (SS)

² Università degli studi
di Milano,
Dipartimento di Medicina
Veterinaria e Scienze Animali,
via Dell'Università 6,
26900 Lodi (LO)

³ Università degli studi
di Bologna,
Dipartimento di Medicina
Veterinaria e Scienze Animali,
via Tolara di Sopra 50, 40064
Ozzano dell'Emilia (BO)

BIBLIOGRAFIA

FAO, 2023. Pathways towards lower emissions – A global assessment of the greenhouse gas emissions and mitigation options from livestock agrifood systems. Rome <https://doi.org/10.4060/cc9029en>

Hristov, A.N., Oh, J., Firkins, J.L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H.P.S., Adesogan, A.T., Yang, W., Lee, C., Gerber, P.J., Henderson, B., and Tricarico, J.M., 2013. Special topics--Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science*, 91 (11), 5045–5069.

ISPRA, 2023 Le emissioni di gas serra in Italia: obiettivi di riduzione e scenari emissivi. https://www.isprambiente.gov.it/files2023/pubblicazioni/rapporti/rapporto_384_2023_le-emissioni-di-gas-serra-in-italia.pdf

Laven, R., & Yang, D. A. 2025. Common misinterpretations of statistical significance and P-values in dairy research. *JDS communications*.

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.

Kaneko, J.J., Harvey, J.W., and Bruss, M.L., eds, 2008. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Sixth Edition)*. San Diego: Academic Press, iv.

Patra, A.K. and Saxena, J., 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91 (1), 24–37.

Pulina G., 2025. Opinion paper: The sound use of experimental hypotheses in animal science. *Animal*, 19 (2025) 101634 <https://doi.org/10.1016/j.animal.2025.101634>

Sorg, D., Difford, G. F., Mühlbach, S., Kuhla, B., Swalve, H. H., Lassen, J., ... & Pszczola, M. 2018. Comparison of a laser methane detector with the GreenFeed and two breath analysers for on-farm measurements of methane emissions from dairy cows. *Computers and electronics in agriculture*, 153, 285-294.

RIASSUNTO

Il progetto **METHANCUT** ha valutato l'efficacia di due additivi alimentari a base di estratti vegetali (Silvafeed e Anavrin) nella riduzione delle emissioni di metano enterico in bovini da carne, adottando un approccio sperimentale esplicitamente *hypothesis-driven*.

L'obiettivo principale era verificare se l'inclusione degli additivi fosse in grado di **ridurre la metanogenesi ruminale (ipotesi primaria, H1)**, e, contestualmente, se tale effetto potesse essere accompagnato da **interferenze negative sulle prestazioni produttive, sulla qualità delle carcasse e sul benessere animale (ipotesi secondaria, H2)**.

La prova è stata condotta su 36 bovini maschi di razza Limousine, assegnati a tre gruppi sperimentali (Controllo, Anavrin, Silvafeed) e allevati in condizioni standard di ingrasso. Sono state monitorate le performance di crescita, l'ingestione alimentare, la digeribilità apparente dei nutrienti, i parametri ematochimici, le caratteristiche della carcassa e della carne, nonché numerosi indicatori di salute ruminale, inclusi rilievi macroscopici, istologici e istometrici.

Le emissioni di metano sono state misurate mediante Laser Methane Detector, distinguendo la componente respiratoria da quella eruttativa, e analizzate attraverso modelli lineari misti integrati da un approccio basato sugli intervalli di compatibilità.

I risultati indicano che l'ipotesi primaria (H1) può essere accolta. In particolare, Silvafeed ha determinato una riduzione consistente delle emissioni di metano totali e respiratorie, prossima al 18–20%, supportata da intervalli di compatibilità non sovrapposti a quelli del gruppo di controllo. Anavrin ha mostrato una riduzione più contenuta (circa 7–8%), ma biologicamente plausibile e coerente con i meccanismi ipotizzati. Gli additivi hanno agito prevalentemente sull'intensità delle emissioni, senza modificare la frequenza degli eventi di respirazione ed eruttazione, indicando un effetto diretto sui processi fermentativi ruminali.

Per quanto riguarda l'ipotesi secondaria (H2), i risultati consentono di rigettarla. Non sono emerse interferenze negative sugli accrescimenti ponderali, sull'ingestione di sostanza secca, sulle rese alla macellazione, sulle caratteristiche qualitative della carne né sui principali parametri ematochimici, che sono rimasti entro i range fisiologici. Al contrario, le analisi morfologiche e istologiche del ruminale suggeriscono un possibile effetto protettivo degli additivi sull'integrità della mucosa ruminale, con una riduzione delle alterazioni compatibili con paracheratosi e infiltrazione infiammatoria osservate nel gruppo di controllo.

Nel complesso, la conferma di H1 unitamente al rigetto di H2 dimostrano che gli additivi testati, in particolare Silvafeed, possono contribuire in modo efficace e biologicamente sostenibile alla mitigazione delle emissioni di metano enterico nei bovini da carne, senza compromettere le prestazioni produttive, la qualità delle carcasse o il benessere animale.

Tali risultati assumono particolare rilevanza poiché ottenuti in un sistema alimentare già caratterizzato da basse emissioni di base, rafforzando la solidità biologica e applicativa delle evidenze emerse.

INDICE

1	PREMESSA	3
2	IPOTESI SPERIMENTALE	4
3	MATERIALI E METODI	5
	3.1 Animali e trattamenti alimentari	5
	3.2 Misurazioni e analisi in vivo	6
	3.3 Macellazioni e misurazioni post-mortem	8
	3.4 Analisi statistica	10
4	RISULTATI	11
	4.1 Ingestione di sostanza secca e accrescimenti	11
	4.2 Misurazioni delle emissioni di metano	12
	4.3 Caratteristiche dell'unifeed, dei residui, delle feci e digeribilità apparente	14
	4.4 Parametri ematici	18
	4.5 Risultati alla macellazione	19
	4.6 Dati di macellazione: valutazione in loco del pH e della presenza di lesioni sulla parete ruminale	20
	4.7 Dati di macellazione: valutazione istologica e morfologica della parete ruminale	20
	4.8 Valutazioni istometriche dei campioni di muscolo	24
5	CONCLUSIONI	25

1

PREMESSA

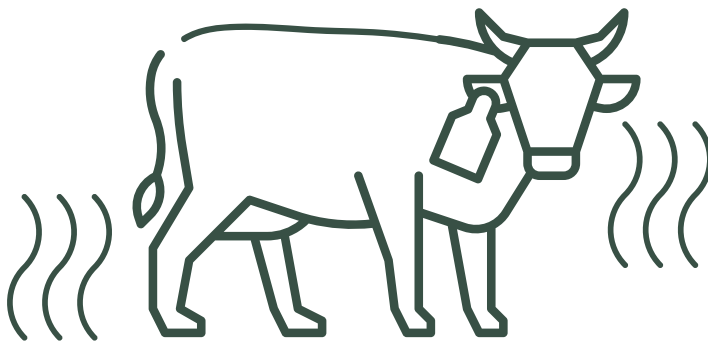
Il metano (CH_4) è riconosciuto come uno dei principali gas climalteranti di origine antropica e rappresenta, dopo l'anidride carbonica, una delle componenti più rilevanti del riscaldamento globale. A differenza della CO_2 , il metano è caratterizzato da un potenziale di riscaldamento più elevato su base temporale breve, il che lo rende un obiettivo prioritario nelle strategie di mitigazione climatica.

Una quota significativa delle emissioni antropogeniche di metano è attribuibile al settore agricolo e, in particolare, ai ruminanti. In questi animali il CH_4 origina prevalentemente dai processi fermentativi ruminali, quale sottoprodotto della degradazione microbica dei carboidrati strutturali e non strutturali, ed è successivamente eliminato attraverso eruttazione e respirazione. La produzione di metano enterico rappresenta quindi un fenomeno fisiologicamente inevitabile, ma biologicamente modulabile, poiché dipende dalla dinamica delle fermentazioni ruminali e dalla composizione della dieta.

Nel contesto delle politiche europee di transizione climatica, la riduzione delle emissioni di metano enterico nei ruminanti è considerata una priorità strategica, in quanto consente di intervenire direttamente su una delle principali fonti di metano antropogenico. Ne deriva l'interesse verso soluzioni nutrizionali in grado di modificare l'ecosistema ruminale e di ridurre la metanogenesi senza compromettere le prestazioni produttive e il benessere animale.

Pertanto, **per l'Unione Europea, la riduzione delle emissioni di metano enterico rappresenta una delle sfide più importanti** e di forte priorità al fine di raggiungere la neutralità climatica entro il 2050.

PRINCIPALI FONTI DI EMISSIONE DI METANO IN UN ALLEVAMENTO BOVINO DA CARNE:



FERMENTAZIONI RUMINALI ED EMISSIONI DERIVANTI DALLA GESTIONE DEI REFLUI ZOOTECNICI

Tra le diverse strategie per la riduzione delle emissioni di metano enterico, si annovera l'**utilizzo di additivi alimentari**, i quali agiscono sul processo di fermentazione ruminale.

2

IPOTESI SPERIMENTALE

Lo studio è stato progettato e condotto secondo un approccio esplicitamente “*hypothesis-driven*”, in linea con i principi epistemologici e metodologici delineati da Pulina (2025), secondo cui un’ipotesi sperimentale deve essere formulata a priori, essere biologicamente plausibile, falsificabile e coerente con il disegno sperimentale, distinguendosi nettamente sia da mere dichiarazioni di intenti sia da razionalizzazioni post hoc dei risultati.

Sulla base delle conoscenze disponibili sui meccanismi di **modulazione della fermentazione ruminale esercitata da tannini, saponine, oli essenziali e bioflavonoidi**, nonché delle evidenze preliminari relative al loro potenziale ruolo nella **mitigazione della metanogenesi enterica**, è stata formulata la seguente ipotesi primaria (H1): l’inclusione nella dieta di bovini da carne di additivi alimentari a base di estratti **vegetali (Silvafeed e Anavrin)** riduce le emissioni di metano enterico rispetto a una dieta di controllo priva di additivi, attraverso una modulazione dei processi fermentativi ruminali. La corrispondente ipotesi nulla (H0) assume l’assenza di differenze nelle emissioni di metano tra i gruppi sperimentali.

Accanto all’ipotesi primaria, e coerentemente con il principio di “modestia” e di “conservatorismo” dell’ipotesi scientifica richiamato da Pulina (2025), è stata formulata una ipotesi secondaria (H2), necessaria a verificare che l’eventuale riduzione delle emissioni **non sia ottenuta a discapito delle prestazioni produttive, della qualità delle carcasse o dello stato di benessere animale**. In altri termini si è inteso verificare se l’inclusione degli additivi Silvafeed e Anavrin nella dieta di bovini da carne interferisca negativamente con gli accrescimenti ponderali, l’ingestione alimentare, le rese alla macellazione e la qualità della carcassa, e possa alterare i principali parametri biologici indicativi del benessere animale, inclusi lo stato metabolico, l’integrità e la funzionalità ruminale e gli indicatori ematochimici. Anche in questo caso, l’ipotesi nulla (H0) postula l’assenza di differenze tra i gruppi sperimentali per i parametri produttivi, di macellazione e biologici considerati.

La distinzione esplicita tra ipotesi primaria e secondaria riflette la necessità, sottolineata da Pulina (2025), di mantenere una chiara gerarchia interpretativa tra gli effetti attesi principali e le condizioni di eventuale interferenza biologica, evitando sia il rischio di “*fishing expeditions*” sia quello di sovrainterpretazioni basate su risultati marginali o non coerenti con il disegno sperimentale.

In questo quadro, la conferma dell’ipotesi primaria (H1) unitamente al rigetto dell’ipotesi secondaria (H2) rappresenterebbe una dimostrazione biologicamente rilevante e metodologicamente solida dell’efficacia degli additivi nel contribuire alla mitigazione delle emissioni di metano enterico senza compromettere le prestazioni produttive e il benessere dei bovini da carne.

L’INCLUSIONE NELLA DIETA DI BOVINI DA CARNE DI ADDITIVI ALIMENTARI A BASE DI ESTRATTI VEGETALI (SILVAFEED E ANAVRIN)

IPOTESI PRIMARIA (H1)

riduce le emissioni di metano enterico

IPOTESI SECONDARIA (H2)

non interferisce con le prestazioni produttive, della qualità delle carcasse o dello stato di benessere animale

3

MATERIALI E METODI

La prova sperimentale è stata condotta da gennaio a maggio 2025, presso la stalla Galvana (Inalca S.p.A.), nel pieno rispetto delle linee guida europee sulla protezione degli animali per scopi sperimentali (ARRIVE guidelines; U.K. Animals -Scientific Procedures- Act, 1986; EU Directive 2010/63/EU).

3.1 ANIMALI E TRATTAMENTI ALIMENTARI

Trentasei bovini di razza Limousine e sesso maschile, omogenei per peso ed età (età: 11,5±2,02 mesi), sono stati selezionati da un gruppo più numeroso composto da 56 animali e assegnati a tre gruppi sperimentali: **Controllo, Anavrin e Silvafeed**.

Tutti gli animali erano in buone condizioni di salute. Lo stato sanitario è stato valutato all’inizio della prova e monitorato durante l’intero ciclo di ingrasso dal personale veterinario.

Gli animali sono stati alloggiati in 9 box, ciascuno dei quali ospitava 4 soggetti (superficie di 5 m² a capo) omogenei per peso.

Tutti gli animali ricevevano la stessa dieta di base, la cui composizione è riportata in Tabella 1, integrata con un concentrato commerciale la cui composizione e caratteristiche nutrizionali sono riportate in tabella. Per i gruppi sottoposti a trattamento (Anavrin e Silvafeed), il concentrato includeva l’additivo, sotto forma di sfarinato.

La distribuzione dell’alimento avveniva una volta al giorno, al mattino, mediante carro miscelatore. Di seguito si riportano i dettagli delle diete somministrate ai tre gruppi:

GRUPPO 1 CONTROLLO

Dieta base formulata per soddisfare i fabbisogni alimentari (NASEM, 2016), integrata con 1,2 kg/capo/giorno di un concentrato commerciale

GRUPPO 2 ANAVRIN

Dieta base integrata con 1,2 kg/capo/giorno del concentrato commerciale contenente l’additivo Anavrin (pari a 5 gr/100 kg di peso vivo)

GRUPPO 3 SILVAFEED

Dieta base integrata con 1,2 kg/capo/giorno del concentrato commerciale contenente l’additivo Silvafeed (pari a 30 gr/capo)

Tabella 1 - Composizione della razione alimentare

kg/capo/giorno*		% sulla sostanza secca	
DIETA BASE		COMPOSIZIONE	
PAGLIA	0,60	SOSTANZA SECCA	69,78
INTEGRATORE	0,45	UNITÀ FORAGGERE CARNE	1,07
FARINA DI SOIA	1,10	PROTEINA GREZZA	12,65
FARINA DI MAIS	3,00	ZUCCHERI	5,19
GRASSI IDROGENATI	0,22	AMIDO	39,33
BISCOTTO	1,60	NDF	24,23
PASTONE DI MAIS	3,00	GRASSO	5,73
GRANO	3,00	CA TOT	0,66
CONCENTRATO COMMERCIALE	1,20	P TOT	0,40

* valori espressi sul tal quale

3.2 MISURAZIONI E ANALISI IN VIVO

INGESTIONE ALIMENTARE E PERFORMANCE DEGLI ANIMALI

L'ingestione è stata quantificata quotidianamente, per box, registrando le quantità somministrate in mangiatoia e i relativi residui, raccolti dopo 24 ore.

I campioni di alimento e residui sono stati analizzati mediante spettroscopia NIR (TANGO FT-NIR; Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany) al fine di determinarne la composizione chimica.

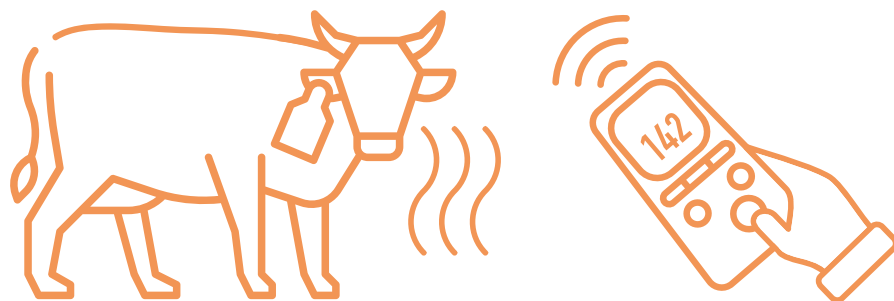
Per valutare le performance degli animali, ciascun soggetto è stato pesato individualmente all'inizio della prova (d0), a metà (d68) e al momento della macellazione (d124). I dati raccolti sono stati utilizzati per il calcolo dell'incremento medio giornaliero di peso (average daily gain, ADG).

MISURAZIONI DI METANO

Le misurazioni di metano sono state eseguite a cadenza settimanale, una volta al mattino e una al pomeriggio, utilizzando due rilevatori laser di metano (Methane Gas detector "Laser Methane mini", LMD, Tokyo Gas Engineering, Tokyo, Japan). Ogni misurazione è stata eseguita con una registrazione continua ogni 0,5 secondi per 3 minuti, per capo. Poiché il LMD misura la concentrazione di CH₄ nell'aria espirata, è stato considerato il ciclo respiratorio dell'animale.

Tenuto conto che il metano può essere rilasciato sia tramite eruttazione, direttamente dal rumine, che mediante respirazione, in seguito all'assorbimento del CH₄ dal rumine o dal tratto digerente inferiore (Murray et al., 1976), è stata ipotizzata una distribuzione bimodale dei dati, al fine di distinguere le emissioni di CH₄ associate rispettivamente alla respirazione e all'eruttazione. Ogni misurazione effettuata con l'LMD ha generato un file contenente circa 400 record. La serie temporale dei valori di CH₄ così ottenuta è stata definita "profilo" (Figura 1). I profili erano caratterizzati da picchi e valli; i picchi attribuibili all'eruttazione risultavano generalmente molto più elevati rispetto a quelli associati alla respirazione. Prima dell'analisi, alcuni segnali considerati "non fisiologicamente plausibili" sono stati rimossi: in particolare, sono stati eliminati i valori → 100 ppm in presenza di valori pari a 0 sia nel record precedente sia in quello successivo.

METHANE GAS DETECTOR



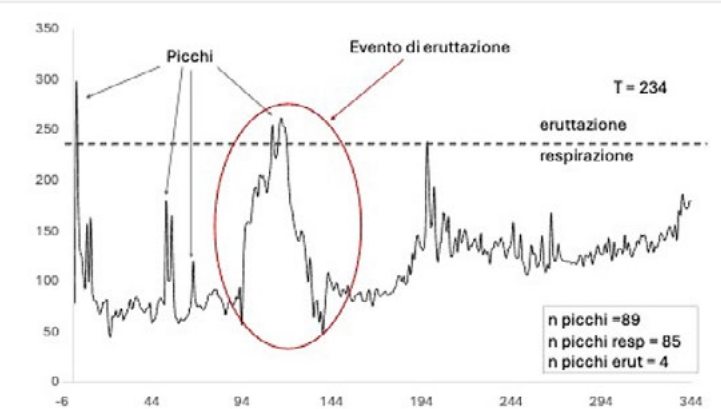
"Laser Methane mini", LMD, Tokyo Gas Engineering, Tokyo, Japan

L'identificazione dei picchi nei profili di CH₄ è stata effettuata secondo la procedura descritta da Sorg et al. (2018). Per ciascun profilo, sono state calcolate la differenza tra un dato (X) e il valore precedente (X-1), e la differenza tra X e il valore (X-2). Se la prima differenza (X - X-1) risultava ≤ 0 e la seconda (X - X-2) ≥ 0, il valore X-1 veniva classificato come picco. La distinzione tra picchi dovuti a eruttazione e quelli dovuti a respirazione è stata effettuata anch'essa secondo quanto proposto da Sorg et al. (2018), identificando la soglia (T) come:

$$T = Q3 + [1,5 \times (Q3 - Q1)]$$

dove Q1 e Q3 rappresentano, rispettivamente, il primo e il terzo quartile della distribuzione dei picchi di CH₄ in ciascun profilo. I fenotipi correlati alle emissioni di metano erano: le medie di tutti i valori di CH₄, le medie di tutti i picchi identificati, le medie dei picchi di respirazione e le medie dei picchi di eruttazione e il numero dei picchi.

Figura 1 - Esempio profilo di misurazione



VALUTAZIONE DELLA DIGERIBILITÀ APPARENTE

La valutazione della digeribilità apparente (aTTD) è stata effettuata settimanalmente, per l'intera durata della prova. Sono state quindi valutate sia le caratteristiche dell'unifeed che delle feci, mediante Polispes NIR (Polispes, ITPhotonics, Via Astico, 39, 36030 Fara Vicentino-VI-Italy). Nello specifico, la valutazione dell'unifeed è stata effettuata al mattino, al momento dello scarico dell'alimento fresco in mangiatoia e dopo aver provveduto alle integrazioni di additivo previste. Le rilevazioni sono state effettuate lungo l'intera mangiatoia, suddividendo la stessa in parti uguali corrispondenti ai diversi gruppi di studio ed effettuando perciò 3 rilevazioni per gruppo di studio (9 rilevazioni totali). Queste singole rilevazioni sono state poi unificate ed è stata valutata la media giornaliera.

In concomitanza, sono anche stati raccolti campioni di unifeed da conservare e analizzare in seguito mediante spettroscopia NIR (TANGO FT-NIR; Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany) e, quando necessario, con metodiche di chimica classica.

Relativamente alle feci, le analisi sono state eseguite settimanalmente prima della somministrazione dell'alimento al mattino, tramite la raccolta di un pool rappresentativo di feci per ogni box coinvolto nella prova (3 box per gruppo, 9 box totali). Per ogni box sono stati presi campioni freschi (al momento della defecazione) da almeno 3 animali per box, ed è stato poi creato un pool per avere tre rilevazioni settimanali per gruppo. Sia i campioni di feci che di unifeed sono stati analizzati per ottenere il contenuto in sostanza secca (SS), ceneri, proteine grezze (PG), grassi, fibra neutro-detersa (NDF), fibra acido-detersa (ADF), lignina acido-detersa (ADL), ceneri acido-insolubili (AIA) e amido.

I valori di ADL e AIA sono stati utilizzati come marcatori interni indigeribili per valutare la digeribilità attraverso la seguente formula:

$$aTTD \% = \frac{\left(\frac{xd}{ADLd - AIA d} \right) - \left(\frac{xf}{ADLf - AIA f} \right)}{\left(\frac{xd}{ADLd - AIA d} \right)} * 100$$

Su ogni pool di feci è stato altresì valutato, sul campione fresco e previa miscelazione, il pH fecale.

PRELIEVI EMATICI E ANALISI

I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena coccigea al giorno 0, al mattino, prima della distribuzione della nuova unifeed, e al momento della macellazione durante la giugulazione. I campioni sono stati raccolti in provette sottovuoto contenenti attivatore della coagulazione (silicato) per le analisi sierologiche, litio-eparina per le analisi plasmatiche (Vacutest, Kima) ed EDTA per l'emocromo (CBC).

I campioni con attivatore della coagulazione e litio-eparina sono stati centrifugati rispettivamente a 250 g per 20 min e a 500 g per 10 min (15-20 °C) al fine di ottenere siero e plasma (Centrifugette 4203, ALC International Srl), quindi conservati a -80 °C fino alle analisi. I campioni con EDTA, mantenuti a 4 °C dopo il prelievo, sono stati analizzati entro 4 h per l'emocromo. Un autoanalizzatore clinico (ILAB-650, Instrumentation Laboratory) è stato utilizzato per le analisi ematochimiche, seguendo le procedure descritte da Calamari et al. (2016).

La calibrazione è stata effettuata mediante standard commerciali. Per ogni parametro, in ciascun saggio, sono stati applicati quattro diversi controlli di qualità al fine di verificare ripetibilità e precisione.

3.3 MACELLAZIONI E MISURAZIONI POST-MORTEM

Gli animali sono stati macellati presso il macello di Castelvetro di Modena (MO) dell’Inalca S.p.A. al raggiungimento di un peso medio pari a 600,4±47,6 kg e previo stordimento meccanico.

PERFORMANCE DELLE CARCASSE, PH E COLORE

Il peso delle carcasse è stato rilevato immediatamente dopo la macellazione (peso della carcassa a caldo) e la resa delle carcasse è stata calcolata come percentuale del peso a caldo sul peso vivo finale. In seguito, le carcasse sono state sezionate, divise in due mezzene, e sul lato sinistro sono stati effettuati i rilievi del pH e del colore.

Le misurazioni del pH e delle temperature sono state effettuate 45 minuti e 24 h dopo la macellazione, mediante un pHmetro portatile (K21 NWH Inter) la cui sonda è stata inserita tra la 5° e 6° vertebra della regione lombare, sul muscolo *Longissimus lumborum*.

Le misurazioni del colore del muscolo e del grasso (*L**, luminosità, *a**, rosso/verde e *b** giallo/blu, CIE1986) sono state effettuate mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro (CM-700d/600d Konica Minolta, Giappone). Nello specifico, le misurazioni sono state effettuate seguendo una procedura standardizzata e con la stessa illuminazione per tutte le carcasse. Il colorimetro Minolta è stato impostato sul sistema *L**, *a**, *b**, con illuminante D65, osservatore standard a 10° e apertura di 8 mm. Prima di ogni sessione, lo strumento è stato calibrato utilizzando i riferimenti bianco e nero. Per ciascun campione, è stata registrata la media di cinque letture. I rilevamenti sono stati eseguiti 45 minuti dopo la macellazione sul muscolo *Rectus abdominis* (tra la 6° e la 7° costola) e sul grasso sottocutaneo e 24 ore *post-mortem* sul muscolo *Longissimus thoracis* (tra la 5° e la 6° vertebra della regione toracica) e sul grasso intramuscolare.

VALUTAZIONE DEI PARAMETRI RUMINALI

Alla macellazione, tutti i ruminanti, all’arrivo in tripperia, sono stati aperti completamente, e un campione di contenuto ruminale (frazione solida e liquida) è stato prelevato da diversi punti e usato per la determinazione del pH. I campioni sono stati poi conservati a -80°C per essere utilizzati per la determinazione del microbiota e degli acidi grassi volatili (analisi attualmente in corso). In aggiunta, un campione di parete ruminale (sacco dorsale) è stato prelevato, lavato e riposto in formalina, per l’analisi istologica.

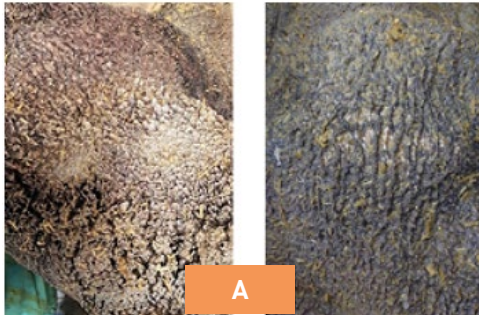
I ruminanti sono stati ispezionati nella tripperia dopo la loro dissezione da intestini, omasi e abomasi e il loro svuotamento e lavaggio completo da parte degli operatori del macello. In particolare, i ruminanti sono stati valutati e osservati per la presenza di alterazioni macroscopiche come ipercheratosi (Figura 2A), segni di ruminite (Figura 2B), cicatrici a stella (Figura 2C) seguendo la metodologia e le referenze previste da Magrin et al. (2021). Ci si è soffermati sulla presenza/assenza dei diversi indicatori, senza dare valutazioni sulla gravità. Anche la presenza o assenza di parassiti ruminanti del genere *Paramphistomum* è stata registrata. Per la valutazione istologica, i campioni di parete ruminale sono sezionati al criotomo, colorati con Ematossilina-Eosina (EE), per valutare la morfologia. Sulle stesse sezioni sono state effettuate le seguenti analisi istometriche:

- 1 - numero di papille ruminanti/mm²;
- 2 - lunghezza papille;
- 3 - larghezza papille;
- 4 - spessore dell’epitelio;
- 5 - spessore lamina propria;
- 6 - spessore strato corneo.

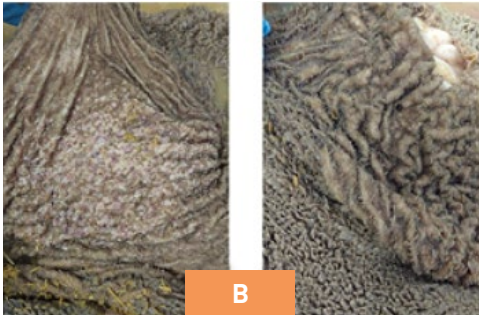
RACCOLTA CAMPIONI DI MUSCOLO

Da ogni campione di *Longissimus thoracis*, sono stati prelevati frammenti di circa 1 cm³ e congelati in isopentano raffreddato da azoto liquido e conservati a -80 °C. Per ogni campione sono state allestite sezioni su cui sono state condotte analisi istochimiche volte a caratterizzare l’attività Succinico deidrogenasica (indice del tipo di metabolismo, glicolitico o ossidativo). Questa colorazione ha permesso di identificare le fibre glicolitiche, ossidative e di tipo intermedio. La numerosità di fibre rosse/ossidative è stata valutata ed espressa in percentuale.

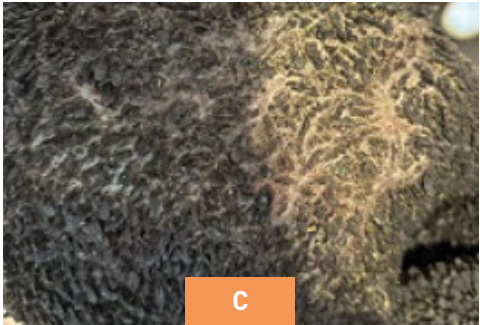
Figura 2 - Esempi utilizzati per la valutazione visiva dei ruminanti proposto da Magrin et al. (2021)



ESEMPIO DI PARETI RUMINALI CON SEGNI DI IPERCHERATOSI



ESEMPIO DI PARETI RUMINALI CON SEGNI DI RUMINITE



ESEMPIO DI CICATRICE STELLATA “STAR SCAR”

3.4 ANALISI STATISTICA

I dati relativi al peso vivo iniziale, al peso vivo alla macellazione, al peso della carcassa a caldo, alla resa a caldo, al colore, al pH e alla temperatura sono stati analizzati mediante il seguente modello statistico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Dove Y_{ij} è la variabile dipendente, μ è la media generale, T_i è l'effetto del trattamento, mentre e_{ij} è l'errore residuo.

I dati relativi agli accrescimenti sono stati analizzati utilizzando un modello misto a misure ripetute mediante la procedura PROC MIXED di SAS:

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + R_j + (T \times R)_{ij} + a_k + b_l + e_{ijklm}$$

Dove Y_{ijklm} è la variabile dipendente, μ è la media generale, T_i è l'effetto del trattamento, R_j è l'effetto del rilievo, $(T \times R)_{ij}$ è la loro interazione, a_k è l'effetto random dell'animale, b_l l'effetto random del box, mentre e_{ijklm} è l'errore residuo.

I dati relativi alle misurazioni di metano sono stati inizialmente analizzati per verificare se fossero normalmente distribuiti. Poiché è stata riscontrata una distribuzione non normale, le analisi successive sono state effettuate sia sui valori originali (ppm) sia sui valori trasformati in logaritmo utilizzando lo stesso modello statistico impiegato per lo studio degli accrescimenti.

I dati sono stati espressi come media $\pm$ SEM (errore standard della media) con i rispettivi intervalli di confidenza al 95% adottando un approccio basato sui cosiddetti intervalli di compatibilità (Laven and Yang, 2025). Gli effetti dei trattamenti sono stati quindi valutati considerando l'ampiezza degli intervalli di confidenza, la loro eventuale sovrapposizione tra gruppi sperimentali e la coerenza biologica delle differenze osservate con le ipotesi formulate a priori. In considerazione della complessità fisiologica delle emissioni di metano e dell'elevata variabilità intrinseca associata a tali misurazioni, è stata inoltre adottata una soglia di significatività tecnica pari a $P \leq 0,10$, utile per identificare effetti coerenti con le ipotesi biologiche formulate, pur in assenza di una significatività statistica convenzionale. Tale scelta è stata esplicitata a priori ed è stata utilizzata esclusivamente come supporto interpretativo, in combinazione con l'analisi degli intervalli di confidenza.

Relativamente alla digeribilità apparente, l'analisi statistica è stata condotta mediante un modello lineare misto (PROC MIXED, SAS) per valutare l'effetto del trattamento, dell'aggregazione temporale (periodo di covariata e test o per mese) e della loro interazione sulle variabili di digeribilità. Il fattore trattamento e il fattore periodo di aggregazione (mese o periodo di covariata e test) sono stati trattati come effetti fissi, mentre i box, considerati unità sperimentali, sono stati inclusi come effetto casuale annidato all'interno del gruppo. Poiché le misure erano ripetute nel tempo sugli stessi box, l'attuazione dell'analisi statistica per misure ripetute ha previsto l'inclusione di una struttura di covarianza "compound symmetry" per modellare la correlazione tra osservazioni successive. I gradi di libertà sono stati corretti mediante il metodo di Kenward-Roger. Per ciascun livello dei fattori fissi sono state stimate le medie marginali (LSMeans) con i rispettivi intervalli di confidenza al 95%, ottenuti dal modello misto. Gli intervalli sono stati calcolati sulla base dell'errore standard stimato dal modello e, nei confronti multipli, corretti secondo la procedura di Tukey-Kramer. Il medesimo approccio è stato usato anche per la valutazione del pH fecale.

I dati ematologici sono stati analizzati utilizzando il programma JMP pro v19, SAS e includendo un modello lineare misto, considerando il trattamento come effetto fisso e includendo la covariata per la correzione dei dati. Le variabili che non rispettavano l'assunzione di normalità sono state trasformate mediante procedura di Box-Cox.

Il pH ruminale è stato analizzato applicando la procedura PROC MIXED di SAS ed includendo nel modello l'effetto fisso del trattamento e l'effetto random del singolo individuo. I dati relativi invece all'analisi visiva dei rumini sono stati analizzati valutando la differenza nella distribuzione di frequenza all'interno delle classi attraverso un test del chi-quadrato (PROC FREQ).

Infine, relativamente alle indagini istologiche, i dati sono stati analizzati con un modello misto che ha considerato l'effetto fisso di trattamento e l'effetto random del singolo individuo.

4

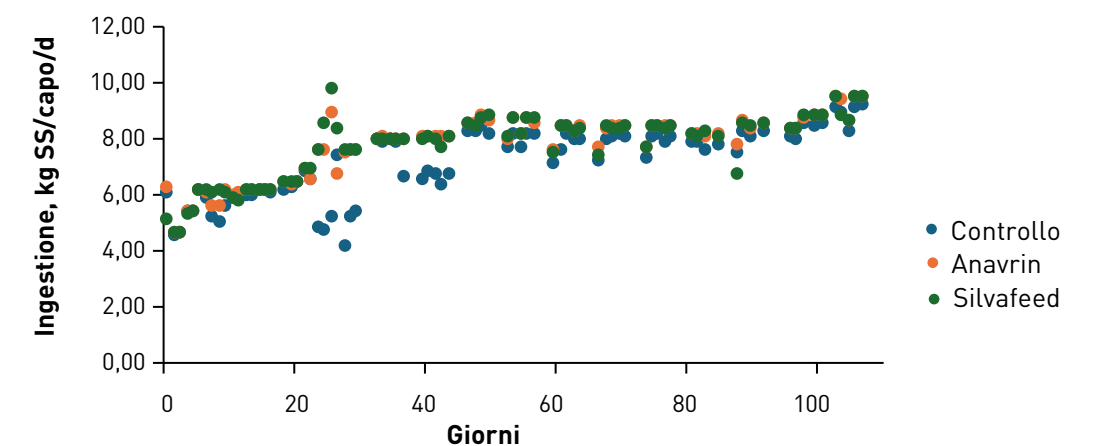
RISULTATI

4.1 INGESTIONE DI SOSTANZA SECCA E ACCRESCIMENTI

In Figura 3 sono riportati i risultati relativi all'ingestione giornaliera di sostanza secca (kg SS/capo/d) dei tre gruppi sperimentali. Complessivamente, l'ingestione è aumentata progressivamente nei primi giorni della prova, stabilizzandosi tra i 20 e i 30 giorni, con valori medi compresi tra 7 e 9 kg SS/capo/d. Non sono state riscontrate differenze significative tra i gruppi Controllo, Anavrin e Silvafeed, indicando che la supplementazione con gli additivi non ha influenzato negativamente la capacità di ingestione degli animali.

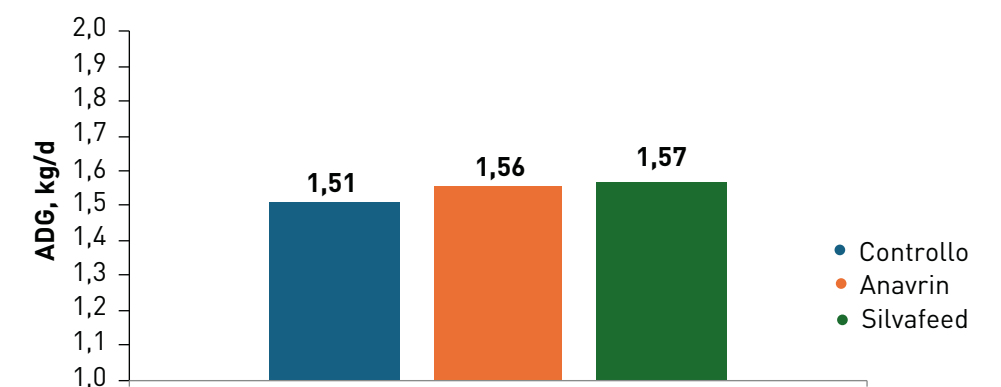
Tutti i gruppi hanno mostrato un andamento regolare, coerente con le fasi fisiologiche di crescita, con un leggero aumento dell'ingestione nelle fasi finali, in corrispondenza dell'incremento del peso vivo e del fabbisogno energetico.

Figura 3 - Ingestione individuale di sostanza secca nei gruppi Controllo, Anavrin e Silvafeed



I risultati relativi agli accrescimenti medi giornalieri sono riportati in Figura 4. Come si evince dalla figura, non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i trattamenti ($P \rightarrow 0.05$), indicando che la supplementazione con gli additivi non ha influenzato negativamente le prestazioni di crescita.

Figura 4 - Accrescimento medio giornaliero (ADG) nei gruppi Controllo, Anavrin e Silvafeed



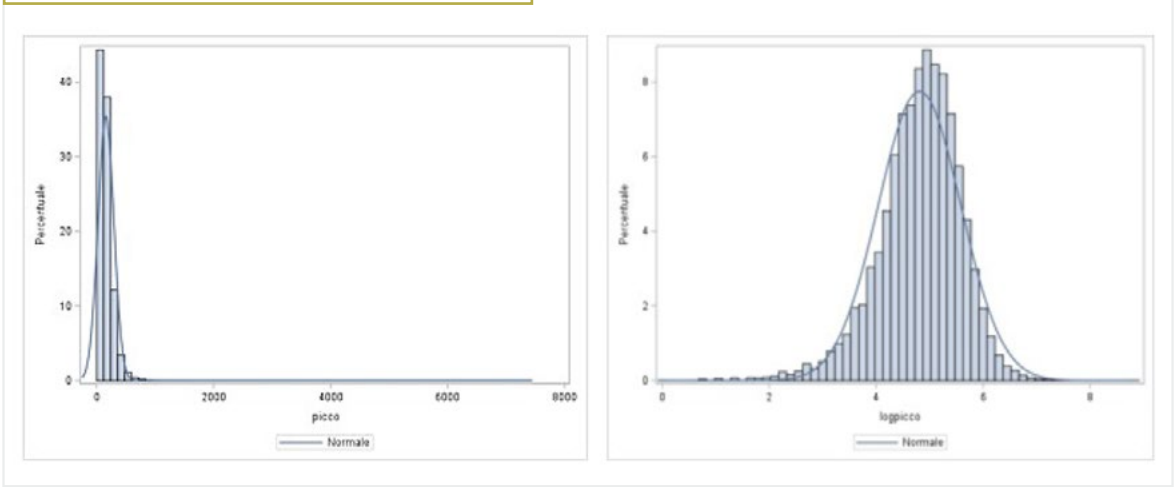
I dati sono riportati come media $\pm$ SEM. Effetto del trattamento $P=0.97$, effetto del rilievo $P=0.10$, effetto dell'interazione trattamento x rilievo $P=0.31$.

4.2 MISURAZIONI DELLE EMISSIONI DI METANO

Dall’analisi delle emissioni di metano è emersa una distribuzione non normale. Per questo motivo i dati sono stati espressi sia su scala originale (ppm) che su scala logaritmica (Figura 5). Tuttavia, poiché l’interpretazione biologica rimane invariata, si presentano i risultati in ppm per garantire una lettura immediata e intuitiva dei valori. Inoltre, come riportato nella sezione dei materiali e metodi, si riportano i dati come: medie di tutti i valori di CH₄, medie di tutti i picchi identificati, medie dei picchi di respirazione e dei picchi di eruttazione e numero dei picchi.

L’interpretazione dei risultati segue il metodo proposto da Laven & Yang (2025), secondo cui la valutazione degli effetti non deve dipendere rigidamente dal superamento di soglie convenzionali di significatività (es. $P < 0.05$), ma deve concentrarsi sugli intervalli di compatibilità (compatibility intervals), che descrivono il range di effetti coerenti con i dati. Tale approccio consente di mettere in evidenza sia la plausibilità biologica dell’effetto sia l’eventuale incertezza residua, superando la dicotomia “significativo/non significativo”. Nel presente studio, tuttavia, è stata anche adottata una soglia di significatività tecnica $P < 0.10$, come esplicitato nella sezione dei materiali e metodi, utile per individuare effetti coerenti con le ipotesi biologiche in un contesto sperimentale complesso.

Figura 5 - Trasformazione logaritmica dei dati



Come si evince in Tabella 2, i valori medi di metano, espressi sottoforma logaritmica, non differivano tra i gruppi (CON: 4,74; ANAV: 4,72; SILV: 4,59). Anche dall’analisi del numero dei picchi totali, dei picchi di respirazione e di eruttazione (Tabella 3) non è emersa alcuna differenza significativa tra i trattamenti.

Tuttavia, dall’analisi dei dati espressi in ppm sono emersi dei risultati più interessanti come riportato in Tabella 4. **Nello specifico, il gruppo Silvafeed ha mostrato la concentrazione media di metano più bassa (125,81 ppm, IC95%: 125,32–127,39), seguita da Anavrin (145,16 ppm, IC95%: 144,23–146,37) e dal gruppo Controllo (156,90 ppm, IC95%: 156,12–158,68).**

L’intervallo di compatibilità per **Silvafeed** è interamente al di sotto di quello del Controllo e non si sovrappone a quello di Anavrin, indicando una **riduzione prossima al 20%**, tecnicamente significativa secondo la soglia $P < 0.10$ adottata. L’ampiezza contenuta degli intervalli suggerisce una stima sufficientemente precisa dell’effetto. **Anavrin** mostra anch’esso una **riduzione**, ma di entità **più modesta (circa 7-8%)**, con parziale sovrapposizione degli intervalli di controllo.

Tale risultato si discosta significativamente dall’ampia bibliografia relativa all’additivo Anavrin ed alla sua maggiore efficacia, rispetto al dato riscontrato, nel ridurre la metanogenesi, evidenziando pertanto la necessità di ulteriori approfondimenti. Le referenze bibliografiche riportano, in studi condotti in vitro ed in vivo sia nel bovino da latte che nel bovino da carne, con evidenze anche nel vitello a carne bianca, effetti di riduzione superiori al 13% sulla produzione di metano giornaliera (g/d), con effetti anche superiori al 15% quando le emissioni sono ricondotte all’assunzione alimentare di sostanza secca (Montini et al., 2024; Minutti et al., 2025; Sgoifo Rossi et al., 2022; Altshuler et al., 2023; Grossi et al., 2024).

L’andamento dei picchi totali conferma il pattern generale: **Controllo (170,68 ppm), Anavrin (160,89 ppm) e Silvafeed (144,47 ppm)**. Anche qui Silvafeed presenta il valore inferiore più consistente, con un intervallo di compatibilità che indica una riduzione coerente e fisiologicamente rilevante, benché con incertezza residua compatibile con la variabilità tipica dei picchi di emissione. L’effetto è significativo.

La componente respiratoria del metano è particolarmente informativa, poiché riflette la quota assorbita attraverso il tratto digerente e poi eliminata tramite espirazione. I valori registrati sono: Controllo pari a 161,75 ppm (IC95%: 158,13-163,09), Anavrin: 151,91 ppm (IC95%: 149,27-153,27) e Silvafeed ha mostrato valori di 131,92 ppm (IC95%: 130,86-134,18). L’intervallo di compatibilità di **Silvafeed** è completamente separato da quello del controllo e significativamente inferiore a quello di Anavrin, indicando un effetto coerente con una **riduzione del 18-20% delle emissioni respiratorie, tecnicamente significativo**. Anavrin mostra una riduzione minore, pur compatibile con una mitigazione fisiologica moderata.

I picchi attribuiti all’eruttazione non mostrano differenze coerenti tra i gruppi. Gli intervalli sono ampi e sovrapposti, indicando che l’effetto degli additivi agisce principalmente sulle fermentazioni ruminali e sul metano di origine sistemica (via respiratoria), più che sulla dinamica meccanica dell’eruttazione.

Sulla base degli intervalli di compatibilità e della significatività tecnica adottata: Silvafeed evidenzia l’effetto mitigante più marcato, con riduzioni vicine al 20% nelle emissioni totali e respiratorie, supportate da intervalli di compatibilità non sovrapposti al controllo. Anavrin mostra un effetto più moderato, ma coerente con una riduzione fisiologicamente plausibile delle emissioni enteriche. L’assenza di significatività piena ($P < 0.05$) per alcuni parametri non contraddice l’effetto; come sottolineato da Laven & Yang (2025), ciò riflette semplicemente l’ampiezza dell’incertezza statistica, non la mancanza di effetto biologico.

Tabella 2 - Dati sulle emissioni di metano espressi sottoforma logaritmica (Media e Intervallo di Confidenza, IC95%)

VARIABILE	TRATTAMENTO			SEM ¹	P-VALUE ²		
	CONTROLLO	ANAVRIN	SILVAFEED		T	R	T×R
log CH ₄ (DATI GREZZI)	4,74 [4,74-4,76]	4,72 [4,71-4,73]	4,59 [4,59-4,61]	0,002	0.323	< .0001	< .0001
log CH ₄ (TUTTI I PICCHI)	4,85 [4,82-4,86]	4,84 [4,82-4,85]	4,74 [4,73-4,76]	0,005	0.434	< .0001	< .0001
log CH ₄ (PICCHI ERUTTAZIONE)	5,69 [5,57-5,69]	5,70 [5,62-5,71]	5,71 [5,67-5,76]	0,014	0.976	< .0001	< .0001
log CH ₄ (PICCHI RESPIRAZIONE)	4,81 [4,79-4,82]	4,80 [4,78-4,81]	4,68 [4,67-4,70]	0,004	0.385	< .0001	< .0001

¹ SEM = Errore standard della media

² T = Trattamento

R = Rilievo

T×R = Interazione trattamento x rilievo

Tabella 3 - Numero di picchi totali, dei soli picchi di respirazione e dei picchi di eruttazione (Media e Intervallo di Confidenza, IC95%).

VARIABILE	TRATTAMENTO			SEM ¹	P-VALUE ²		
	CONTROLLO	ANAVRIN	SILVAFEED		T	R	T×R
CH ₄ TUTTI I PICCHI, N.	90,42 [87,99-92,85]	89,02 [86,73-91,22]	90,70 [88,49-92,90]	0,666	0.572	0.140	0.694
CH ₄ PICCHI RESPIRAZIONE, N.	86,22 [83,87-88,56]	84,78 [82,55-86,95]	85,81 [83,59-88,03]	0,655	0.676	0.326	0.901
CH ₄ PICCHI ERUTTAZIONE, N.	4,88 [4,25-5,65]	4,73 [4,14-5,49]	5,33 [4,78-5,88]	0,185	0.428	0.002	0.118

¹ SEM = Errore standard della media

² T = Trattamento

R = Rilievo

T×R = Interazione trattamento x rilievo

Tabella 4 - Effetto del trattamento, del giorno di rilievo e della loro interazione sulle emissioni di metano espresse in ppm (Media e Intervallo di Confidenza, IC95%).

VARIABILE	TRATTAMENTO			SEM ¹	P-VALUE ²		
	CONTROLLO	ANAVRIN	SILVAFEED		T	R	T×R
CH ₄ TUTTI I DATI, PPM	156,90 [156,12-158,68]	145,16 [144,23-146,37]	125,81 [125,32-127,39]	0,334	0.066	< .0001	< .0001
CH ₄ TUTTI I PICCHI, PPM	170,68 [166,00-171,45]	160,89 [157,58-162,57]	144,47 [142,25-148,04]	0,803	0.175	< .0001	< .0001
CH ₄ PICCHI RESPIRAZIONE, PPM	161,75 [158,13-163,09]	151,91 [149,27-153,27]	131,92 [130,86-134,18]	0,609	0.084	< .0001	< .0001
CH ₄ PICCHI ERUTTAZIONE, PPM	353,88 [310,81-359,49]	341,89 [307,06-366,20]	364,73 [325,93-407,66]	9,971	0.909	0.002	0.002

¹ SEM = Errore standard della media

² T = Trattamento

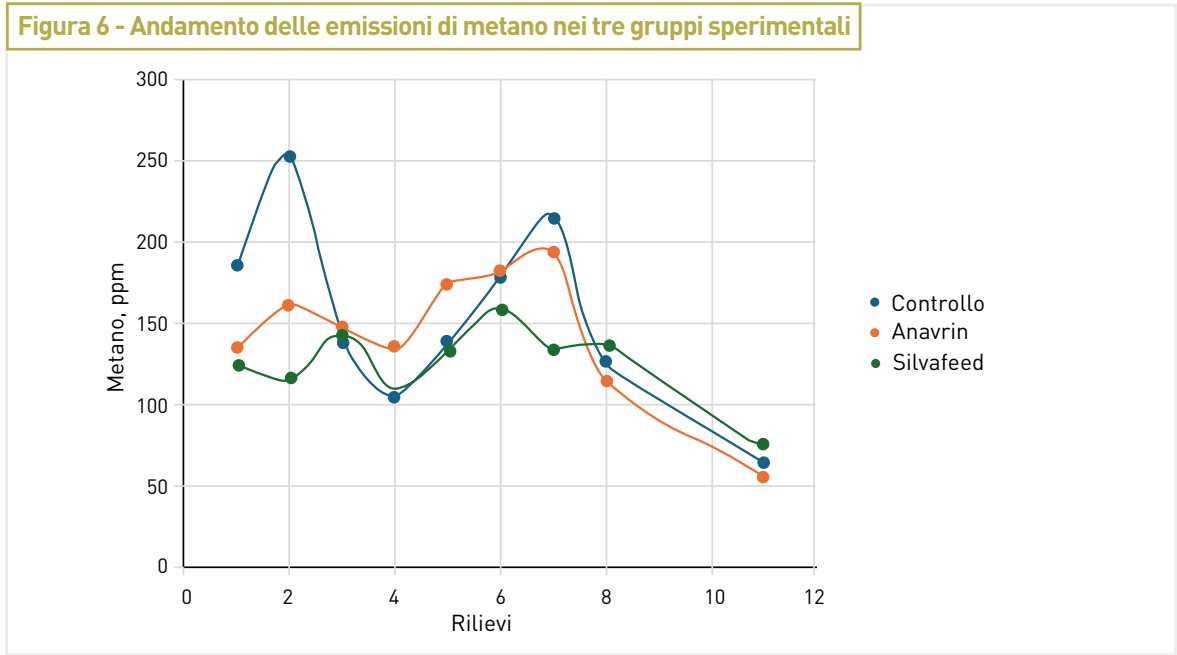
R = Rilievo

T×R = Interazione trattamento x rilievo

È inoltre utile rimarcare che, le razioni somministrate agli animali presentavano un contenuto lipidico abbastanza elevato (5,73% sulla sostanza secca), caratteristica nota per ridurre fisiologicamente la metanogenesi ruminale. Questo implica che l'intero sistema sperimentale operasse già in condizioni di bassa emissione di base. Pertanto, osservare riduzioni ulteriori del 15–20% (Silvafeed) o del 7–8% (Anavrin) deve essere considerato particolarmente rilevante, poiché ottenuto in un contesto in cui il margine di miglioramento era intrinsecamente limitato. Questo risultato conferma che entrambi gli integratori hanno espresso un effetto biologicamente interessante, con un impatto differenziato ma coerente con i rispettivi meccanismi d'azione.

L'andamento delle emissioni di metano è riportato in Figura 6. Il gruppo Controllo presenta valori mediamente più elevati rispetto ai trattamenti Anavrin e Silvafeed, soprattutto nei primi rilievi, con un picco massimo intorno ai 250 ppm, seguito da una progressiva diminuzione nelle misurazioni successive. Il gruppo Silvafeed mostra, invece, valori costantemente inferiori rispetto al Controllo per quasi tutto il periodo considerato, mentre Anavrin presenta un andamento intermedio, con valori leggermente superiori nelle fasi centrali ma allineati al Silvafeed nelle fasi finali.

Figura 6 - Andamento delle emissioni di metano nei tre gruppi sperimentali



4.3 CARATTERISTICHE DELL'UNIFEED, DEI RESIDUI, DELLE FECI E DIGERIBILITÀ APPARENTE

Le caratteristiche medie dell'unifeed e delle feci sono riportate nelle Tabelle 5 e 6. I risultati relativi alla aTTD sono riportati in Tabella 7 ed in Figura 7 e 8. In Tabella 7 sono stati riportati i valori relativi all'intero periodo di prova, suddiviso in "Covariata" e "Test". Durante il periodo di Covariata, non sono state riportate differenze statisticamente significative tra i tre gruppi di studio. Contrariamente, durante l'intero periodo di Test (10 rilevazioni settimanali), la digeribilità dell'amido è risultata significativamente più elevata nel gruppo Anavrin (94,78%) rispetto al gruppo di controllo (93,31%; $P < 0.05$), con intervalli di confidenza al 95% IC: 94,35–95,22 e Controllo: 92,88–93,75. La differenza, pari a circa 1,5 punti percentuali, pur modesta, suggerisce un miglioramento consistente e riproducibile della digeribilità nel gruppo Anavrin. Non sono emerse differenze significative nel confronto tra i due additivi Anavrin e Silvafeed per quanto concerne l'amido. In relazione al gruppo di Controllo, i risultati del gruppo Silvafeed si posizionano a un livello intermedio, e mostrano una significatività tecnica ($P = 0.06$). Gli intervalli di confidenza al 95% per il gruppo Silvafeed (93,72–94,58) indicano un possibile effetto positivo del trattamento più moderato rispetto al gruppo Anavrin.

Relativamente alla digeribilità dell'NDF non è emersa alcuna differenza significativa, considerati sia la Covariata che l'intero periodo di Test, visti anche gli intervalli di confidenza altamente sovrapposti. Similmente non sono emerse differenze significative anche per la digeribilità dei lipidi e delle proteine (dati non riportati in tabella). Non è stato rilevato alcun effetto significativo relativo all'interazione tra gruppo di trattamento e periodo di rilevazione.

Tabella 5 - Caratteristiche composizionali dell'unifeed e dei residui di mangiatoia durante l'intera durata della prova considerando la covariata e media per l'intero periodo di somministrazione degli additivi (Test). Valori riportati in % sulla sostanza secca

PERIODO	SOSTANZA SECCA	CENERI	PROTEINE GREZZE	LIPIDI	aNDF	AMIDO	ADL	AIA
UNIFEED								
COVARIATA	55,20	6,20	13,40	4,50	33,70	30,20	2,40	0,60
TEST	61,03	5,98	13,44	4,84	29,97	35,64	2,32	0,37
RESIDUI DI MANGIATOIA								
COVARIATA	66,73	5,98	15,02	-	20,74	41,32	3,46	-
TEST	65,01	5,39	13,88	-	22,10	43,94	2,11	-

Tabella 6 - Caratteristiche composizionali delle feci nei tre gruppi di studio durante l'intera durata della prova considerando la covariata e media per l'intero periodo di somministrazione degli additivi (Test). Valori riportati in % sulla sostanza secca

TRATTAMENTO	SOSTANZA SECCA	CENERI	PROTEINE GREZZE	LIPIDI	aNDF ¹	AMIDO	ADL ²	AIA ³
COVARIATA								
CONTROLLO	19,50	13,51	24,22	7,69	47,01	7,57	8,85	1,04
ANAVRIN	19,30	14,13	24,72	8,42	45,41	7,31	8,94	1,25
SILVAFEED	20,17	13,84	22,90	8,34	47,51	7,41	8,97	1,25
TEST								
CONTROLLO	21,09	12,51	21,59	8,00	49,12	8,77	8,33	1,02
ANAVRIN	19,78	13,22	21,76	7,67	50,00	7,34	8,79	0,96
SILVAFEED	19,64	12,86	21,51	7,84	49,89	7,91	8,61	1,08

¹aNDF = Fibra neutra detersa
²ADL = Lignina acido detersa
³AIA = Ceneri acido insolubili

Tabella 7 - Digeribilità apparente dell'amido e dell'NDF riscontrate durante la covariata ed il periodo di prova

PERIODO	CONTROLLO (LSMean ⁴ ± SE ⁵ , IC95% ⁶)	ANAVRIN (LSMean ± SE, IC95%)	SILVAFEED (LSMean ± SE, IC95%)
DIGERIBILITÀ DELL'AMIDO, %			
COVARIATA	94,21 ± 0,68 [92,87 – 95,55]	94,33 ± 0,68 [93,00 – 95,68]	94,20 ± 0,68 [92,87 – 95,55]
TEST*	93,31 ± 0,19 [92,88 – 93,75] ^a	94,78 ± 0,19 [94,35 – 95,22] ^{ab}	94,15 ± 0,19 [93,72 – 94,58] ^b
P trattamento 0.289 P periodo 0.678 P periodo*trattamento 0.404			
DIGERIBILITÀ DELL'NDF, %			
COVARIATA	67,82 ± 3,62 [60,61 – 75,02]	68,42 ± 3,63 [61,21 – 75,63]	66,82 ± 3,62 [59,62 – 74,03]
TEST	55,52 ± 0,74 [53,87 – 57,18]	57,36 ± 0,74 [55,70 – 59,02]	56,05 ± 0,74 [54,39 – 57,70]
P trattamento 0.848 P periodo <0.0001 P periodo*trattamento 0.956			

⁴LSMean = Media dei minimi quadrati
⁵SE = Errore standard
⁶IC95% = Intervallo di confidenza al 95%

* media delle rilevazioni settimanali effettuate.
^{aB} $P < 0.0001$
^{ab} $P < 0.100$

In Figura 7 e 8 sono riportate le differenze mensili per la digeribilità dell'amido e dell'NDF. L'analisi mensile dei dati relativi alla digeribilità dell'amido ha evidenziato che questa è aumentata progressivamente da gennaio ad aprile in tutti i gruppi. Non sono emerse differenze significative per il mese di gennaio, che rappresenta la covariata, e per il mese di febbraio. Nel mese di marzo, la digeribilità riscontrata nel gruppo Anavrin (94,62%, IC: 93,85-95,38) è risultata significativamente superiore rispetto al gruppo di Controllo (93,39%, IC: 92,63-94,15) ($P = 0.029$). Non emergono differenze rispetto al gruppo Silvaeed, che si situa in posizione intermedia. Nel mese di aprile invece, la digeribilità dell'amido riscontrata nel gruppo Anavrin (95,15%, IC: 94,57-95,73) è risultata significativamente superiore sia al gruppo Controllo (93,26%, IC: 92,86-94,86) ($P < 0.0001$) che al gruppo Silvaeed (94,29%, IC: 93,51-95,03) ($P < 0.04$), con differenze significative anche tra Silvaeed e Controllo ($P = 0.0162$). Nel mese di aprile gli intervalli di confidenza non si sovrappongono tra Controllo e Anavrin e tra Controllo e Silvaeed e presentano solo una bassa sovrapposizione tra Anavrin e Silvaeed, a favore di Anavrin.

Relativamente all'andamento mensile (Figura 8) della digeribilità dell'NDF non sono emerse differenze statisticamente significative.

Figura 7 - Valori mensili della digeribilità dell'amido registrati nei tre gruppi di studio

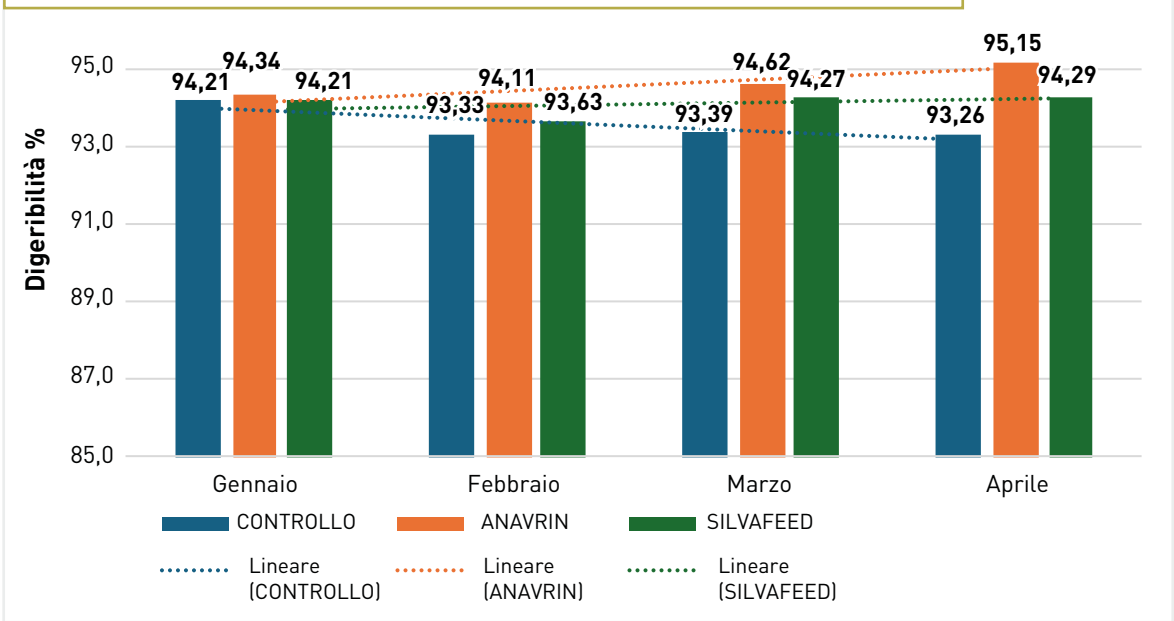
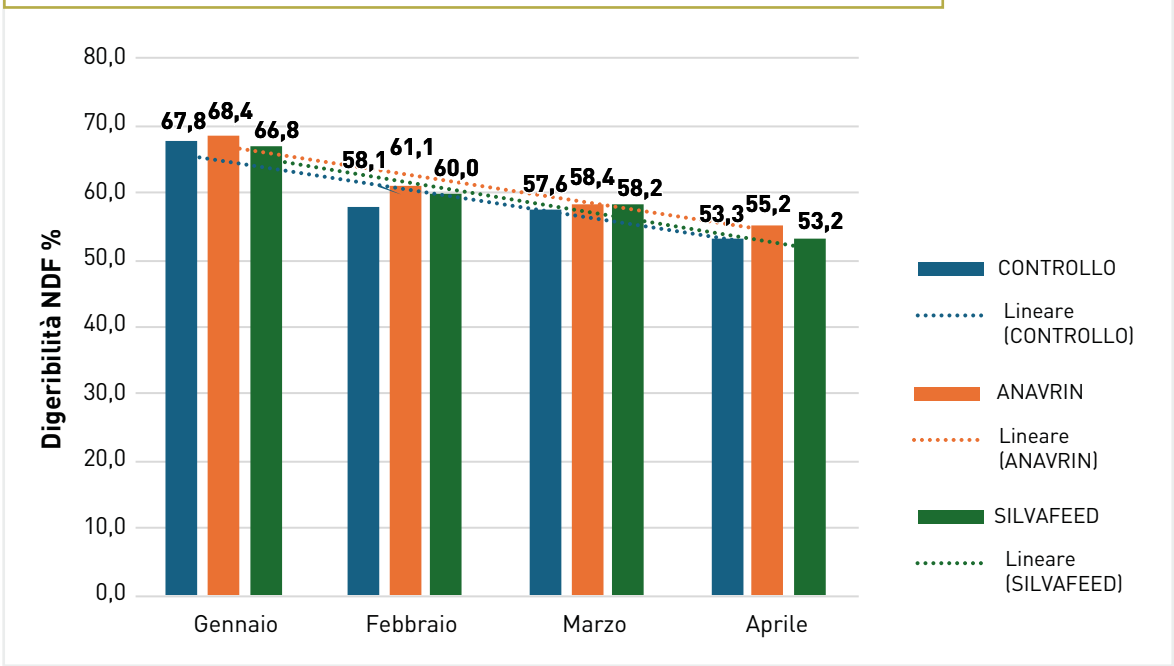


Figura 8 - Valori mensili della digeribilità dell'NDF registrati nei tre gruppi di studio



Relativamente al pH fecale non sono emerse differenze statisticamente significative sia considerando i valori medi della covariata e dell'intero periodo di Test (Tabella 8) che i valori mensili (Figura 9).

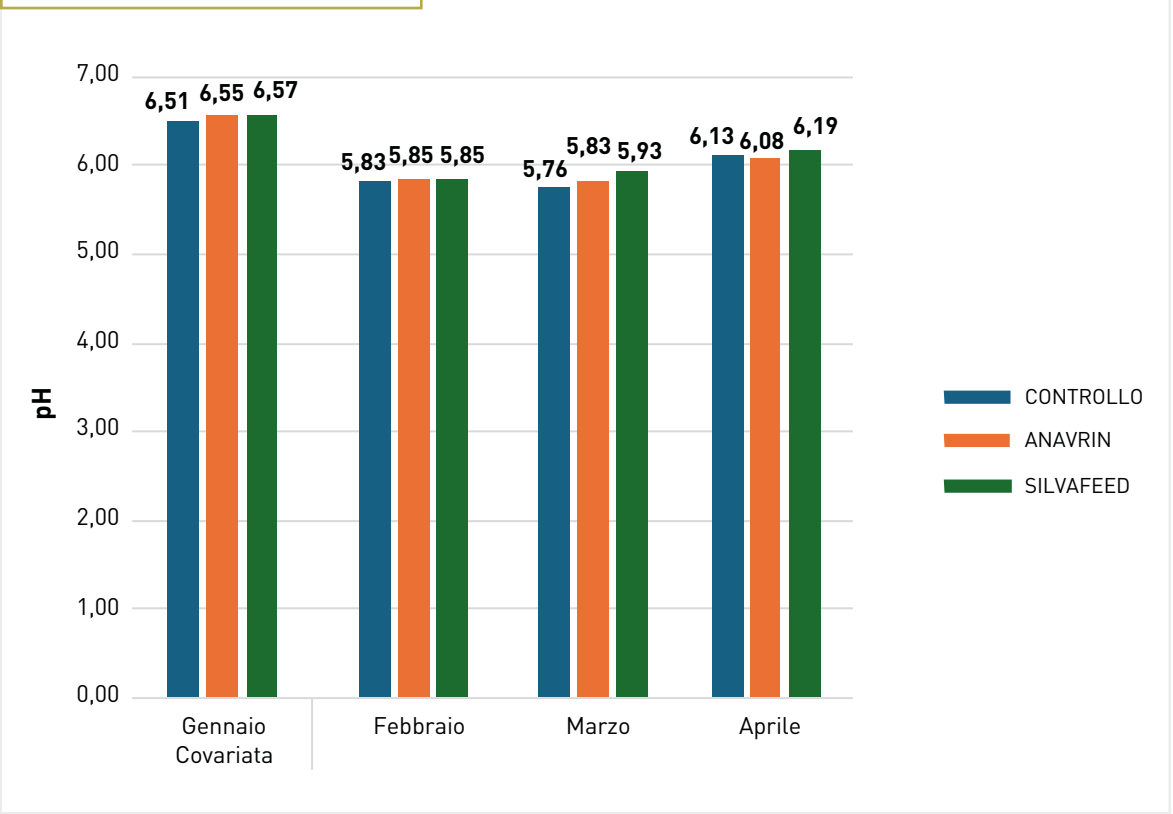
Tabella 8 - Valori medi di pH fecale

PERIODO	CONTROLLO (LSMean ¹ ± SE ² , IC95% ³)	ANAVRIN (LSMean ± SE, IC95%)	SILVAFEED (LSMean ± SE, IC95%)
COVARIATA	6,50±0,20 (6,09-6,91)	6,55±0,20 (6,14-6,95)	6,57±0,20 (6,16-6,98)
TEST	5,95±0,04 (5,84-6,06)	5,95±0,05 (5,84-6,06)	6,04±0,05 (5,93-6,15)

¹LSMean = Media dei minimi quadrati
²SE = Errore standard
³IC95% = Intervallo di confidenza al 95%

P trattamento 0.854
 P periodo < 0.0001
 P periodo*trattamento 0.977

Figura 9 - Valori mensili di pH fecale



4.4 PARAMETRI EMATICI

Relativamente ai risultati dei rilievi ematici, nel complesso, la maggior parte dei parametri non ha mostrato differenze significative tra i gruppi, confermando che l'integrazione non ha compromesso lo stato metabolico ed epatico degli animali in quanto i valori sono rientrati nei range fisiologici riportati per bovini da carne [Kaneko et al., 2008]. Tuttavia, alcune variazioni statisticamente significative sono emerse (Tabella 9). L'acido urico è risultato più elevato nei gruppi con additivo rispetto al controllo ($P = 0.01$), mentre per la bilirubina diretta è stata osservata una lieve differenza ($P = 0.05$), con valori più alti nel gruppo Silvafeed. Anche il cloro sierico ha mostrato differenze significative ($P \leftarrow 0.01$), con valori maggiori nel controllo rispetto al gruppo Anavrin. Inoltre, il parametro UIBC [capacità latente di legame del ferro] si è differenziato tra i gruppi ($P = 0.05$), con valori più bassi nel controllo rispetto agli additivi. Gli altri indici legati al metabolismo energetico, alla funzionalità epatica, alle proteine sieriche e al bilancio minerale non hanno evidenziato differenze rilevanti.

Tabella 9 - Risultati delle analisi ematochimiche dei soggetti coinvolti nello studio				
	CONTROLLO	ANAVRIN	SILVAFEED	P-VALUE
METABOLISMO ENERGETICO				
GLICEMIA mg/dL	137	151,5	125	0.22
UREA mg/dL	24,29	24,04	26,67	0.33
ACIDO URICO mg/dL	1,34 ^B	1,58 ^A	1,46 ^A	0.01
COLESTEROLO TOTALE mg/dL	143,27	154,27	143,83	0.85
FUNZIONALITÀ EPATICA				
BILIRUBINA TOTALE mg/dL	0,28	0,27	0,32	0.12
BILIRUBINA DIRETTA mg/dL	0,05 ^{AB}	0,04 ^B	0,06 ^A	0.05
BILIRUBINA INDIRETTA mg/dL	0,23	0,23	0,26	0.14
ASPARTATO MINOTRANSFERASI U/L	135	133	118,5	0.23
GAMMA-GLUTAMIL TRANSFERASI U/L	22,9	26,35	20,8	0.26
FOSFATASI ALCALINA U/L	135	150	137,5	0.62
PROTEINE SIERICHE				
PROTEINE TOTALI g/dL	7,2	7,03	7,02	0.56
ALBUMINE g/dL	3,54	3,68	3,58	0.26
GLOBULINE g/dL	3,66	3,35	3,44	0.32
RAPPORTO A/G	0,99	1,11	1,06	0.32
MINERALI ED ELETTROLITI				
SODIO mmol/L	146	145	146	0.25
POTASSIO mmol/L	5,8	6,05	6,4	0.73
CLORO mmol/L	100 ^A	97 ^B	99 ^{AB}	$\leftarrow .01$
FOSFORO mg/dL	8,74	8,48	8,57	0.39
CALCIO mg/dL	9,87	9,98	9,72	0.25
MAGNESIO mg/dL	2,27	2,37	2,25	0.3
METABOLISMO DEL FERRO				
FERRO TOTALE µg/dL	194,55	200,36	188,67	0.79
TIBC ¹ µg/dL	481,45	536,09	502,42	0.06
UIBC ² µg/dL	286,91 ^B	337 ^A	313,75 ^{AB}	0.05
SATURAZIONE %	40,41	37,26	37,53	0.53

¹ Total Iron Binding Capacity

² Unsaturated Iron Binding Capacity

Alcune variazioni meritano tuttavia considerazione. L'acido urico è risultato significativamente più elevato nei gruppi con additivo rispetto al controllo ($P = 0.01$), suggerendo un possibile incremento dell'attività ossidativa o un diverso metabolismo proteico, in linea con effetti antiossidanti descritti per alcuni estratti vegetali (Patra e Saxena, 2011). La bilirubina diretta ha mostrato valori leggermente più alti nel gruppo Silvafeed ($P = 0.05$), indice di un possibile adattamento epatico al diverso regime alimentare, senza evidenti implicazioni cliniche.

Un aspetto interessante riguarda l'urea: pur non risultando statisticamente significativa ($P = 0.33$), essa numericamente è più alta nel gruppo Silvafeed rispetto a controllo e Anavrin (26,67 vs. 24,29 e 24,04 mg/dL). Questa osservazione, pur contenuta entro i limiti fisiologici, potrebbe riflettere una diversa utilizzazione dell'azoto a livello ruminale, plausibilmente legata alla presenza di metaboliti secondari della pianta in grado di modulare la degradabilità proteica. L'osservazione appare coerente con i dati della bilirubina diretta, delineando un lieve effetto metabolico specifico di questo additivo. Infine, le differenze riscontrate per cloro e UIBC indicano una modulazione dell'equilibrio elettrolitico e del metabolismo del ferro, pur rimanendo entro valori fisiologici. Tali evidenze sono in linea con l'ipotesi che gli additivi a base di estratti vegetali possano modulare il metabolismo ruminale, contribuendo a ridurre la produzione di metano enterico tramite effetti sulla comunità microbica (Hristov et al., 2013), senza compromettere i parametri ematici di salute.

4.5 RISULTATI ALLA MACELLAZIONE

I risultati relativi alle prestazioni degli animali e alle caratteristiche della carcassa, colore e pH, sono riportati nella Tabella 10. I trattamenti non hanno influenzato in modo significativo il peso vivo iniziale e alla macellazione, né il peso delle carcasse e la resa a caldo ($P \rightarrow 0.05$). Analogamente, non sono state riscontrate differenze significative tra i gruppi sperimentali per i parametri di pH e colore delle carcasse. Tuttavia è stato riscontrato un fisiologico abbassamento del pH nelle 24 ore successive alla macellazione. Nel complesso, i risultati suggeriscono che la somministrazione prolungata degli additivi Anavrin e Silvafeed non ha influenzato negativamente né le prestazioni produttive né le caratteristiche qualitative della carne. Nonostante l'inclusione degli additivi per l'intera durata della prova, gli animali hanno raggiunto pesi ottimali alla macellazione e mantenuto standard qualitativi elevati. In tutti i casi, i valori di $P \rightarrow 0.05$, confermando l'assenza di differenze statisticamente significative tra i trattamenti.

Tabella 10 - Effetto del trattamento sulle prestazioni di crescita, sulle caratteristiche della carcassa, sul colore, sul pH e sulla temperatura					
VARIABILE	TRATTAMENTI			SEM ¹	P-VALUE ²
	CONTROLLO	ANAVRIN	SILVAFEED		
PESO VIVO INIZIALE, KG	408,3	409,6	410,7	11,1	0.997
PV ALLA MACELLAZIONE, KG	589,8	605,9	604,6	8,05	0.684
PESO CARCASSA A CALDO, KG	380,0	394,1	393,3	5,49	0.522
RESA A CALDO, %	64,40	65,07	65,04	0,22	0.418
COLORE DEL MUSCOLO RECTUS ABDOMINIS					
L* ³	28,12	28,33	29,74	0,456	0.291
a* ⁴	11,21	11,24	9,99	0,348	0.246
b* ⁵	7,83	7,13	6,88	0,276	0.367
COLORE DEL GRASSO SOTTOCUTANEO					
L*	62,19	64,62	63,15	0,610	0.273
a*	1,50	1,42	1,40	0,134	0.950
b*	7,57	5,95	6,37	0,481	0.380
COLORE DEL MUSCOLO LONGISSIMUS THORACIS					
L*	37,66	39,44	37,96	0,463	0.248
a*	17,76	17,18	17,45	0,342	0.798
b*	14,39	13,68	14,02	0,335	0.704
COLORE DEL GRASSO INTRAMUSCOLARE					
L*	77,93	77,98	79,35	0,403	0.265
a*	1,85	1,83	1,99	0,166	0.916
b*	9,11	8,64	8,84	0,225	0.702
MUSCOLO LONGISSIMUS LUMBORUM					
pH 45 min	6,12	6,23	6,27	0,030	0.168
pH 24 h	5,56	5,50	5,55	0,021	0.569
T°C 45 min	36,52	34,95	36,16	0,324	0.126
T°C 24 h	5,15 ^A	4,09 ^B	5,20 ^A	0,127	$\leftarrow .0001$

¹ SEM = Errore standard della media

² P-value = Effetto del trattamento

³ Luminosità

⁴ Componente rosso-verde

⁵ Componente giallo-blu

^{AB} All'interno di una riga, i valori contrassegnati dalla stessa lettera maiuscola sono uguali ($P \leftarrow 0.05$)

4.6 DATI DI MACELLAZIONE: VALUTAZIONE IN LOCO DEL PH E DELLA PRESENZA DI LESIONI SULLA PARETE RUMINALE

I dati relativi al pH ruminale ed alla valutazione visiva dei rumini sono riportati in Tabella 11. Non sono stati rilevati rumini con segni di ruminite, che pertanto è stata omessa dalla tabella. È interessante sottolineare che la maggior parte dei rumini, a prescindere dal gruppo di trattamento, presentava segni di infestione, anche importante, con *Paramphistomum* (71% dei rumini analizzati).

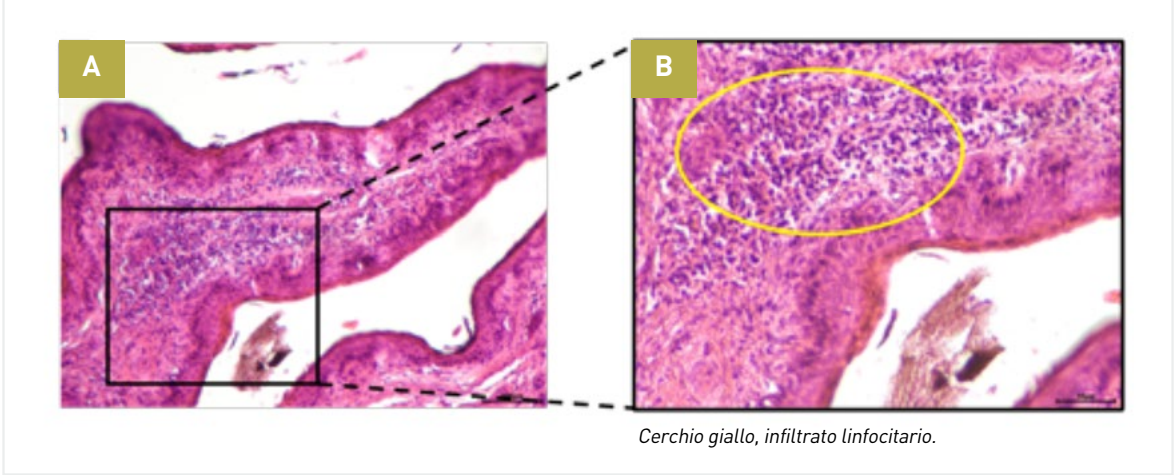
Nonostante differenze numeriche considerevoli nell'incidenza di lesioni da ipercheratosi (50% nel caso del gruppo Silvafeed vs 33,33 e 36,36 nel gruppo Anavrin e Controllo), i dati non hanno raggiunto la significatività statistica. Inoltre, nel gruppo di Controllo, i soggetti con lesioni stellate presentavano mediamente più di una lesione per capo (nello specifico 2 e 8 lesioni), mentre sia nel gruppo Silvafeed che Anavrin sono state riscontrate mediamente 1 lesione per capo.

Tabella 11 - Parametri ruminali: pH e valutazione visiva			
	CONTROLLO	ANAVRIN	SILVAFEED
N. RUMINI VALUTATI	11	12	12
pH	6,63	6,59	6,58
IPERCHERATOSI, % (n)	36,36 (4)	33,33 (4)	50,00 (6)
STAR SCARS, % (n)	18,18 (2)	8,33 (1)	25,00 (3)

4.7 DATI DI MACELLAZIONE: VALUTAZIONE ISTOLOGICA E MORFOLOGICA DELLA PARETE RUMINALE

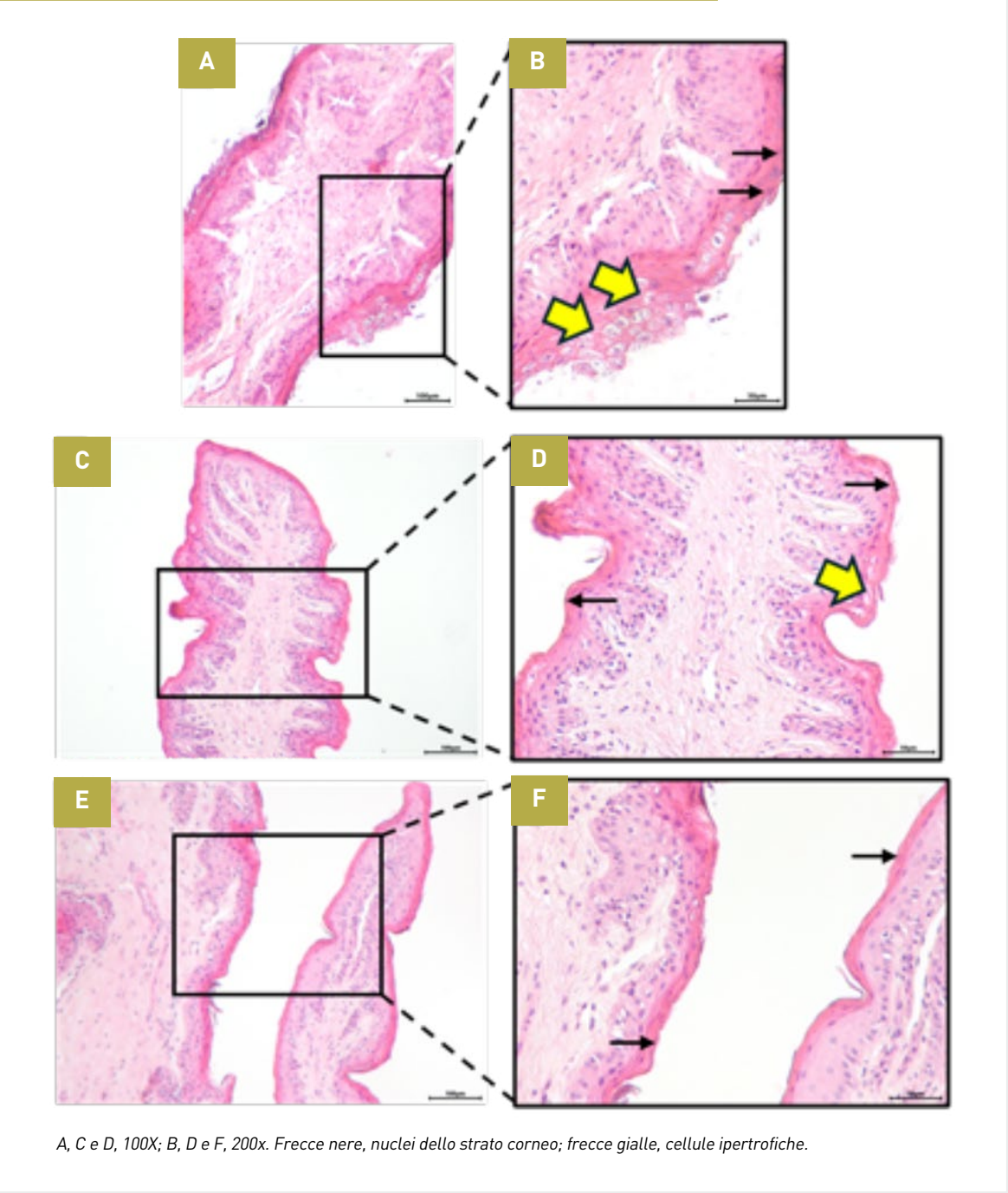
Da un'osservazione della morfologia ruminale, si evince la presenza di infiltrati di tipo linfocitario in *lamina propria* nei campioni provenienti da animali del gruppo Controllo, indicatore di un processo infiammatorio non acuto (Figura 10). Infiltrato che invece non si nota con la stessa frequenza nei due gruppi di trattamento Anavrin e Silvafeed.

Figura 10 - Immagini rappresentative delle papille ruminali di animali del gruppo Controllo. A, 100X, B, 200X.



In tutti i campioni la cheratinizzazione appare alterata data la presenza di cellule nucleate nello stato corneo (Figura 11, freccia nera). In particolare, nei campioni afferenti al gruppo di Controllo, è evidente la presenza di cellule voluminose “a forma di pallone”, descritte in letteratura come paracheratosiche (Ragionieri et al., 2016), con ampi spazi attorno ai loro nuclei e materiale cellulare debolmente colorato solo alla periferia (Figura 11, freccia gialla).

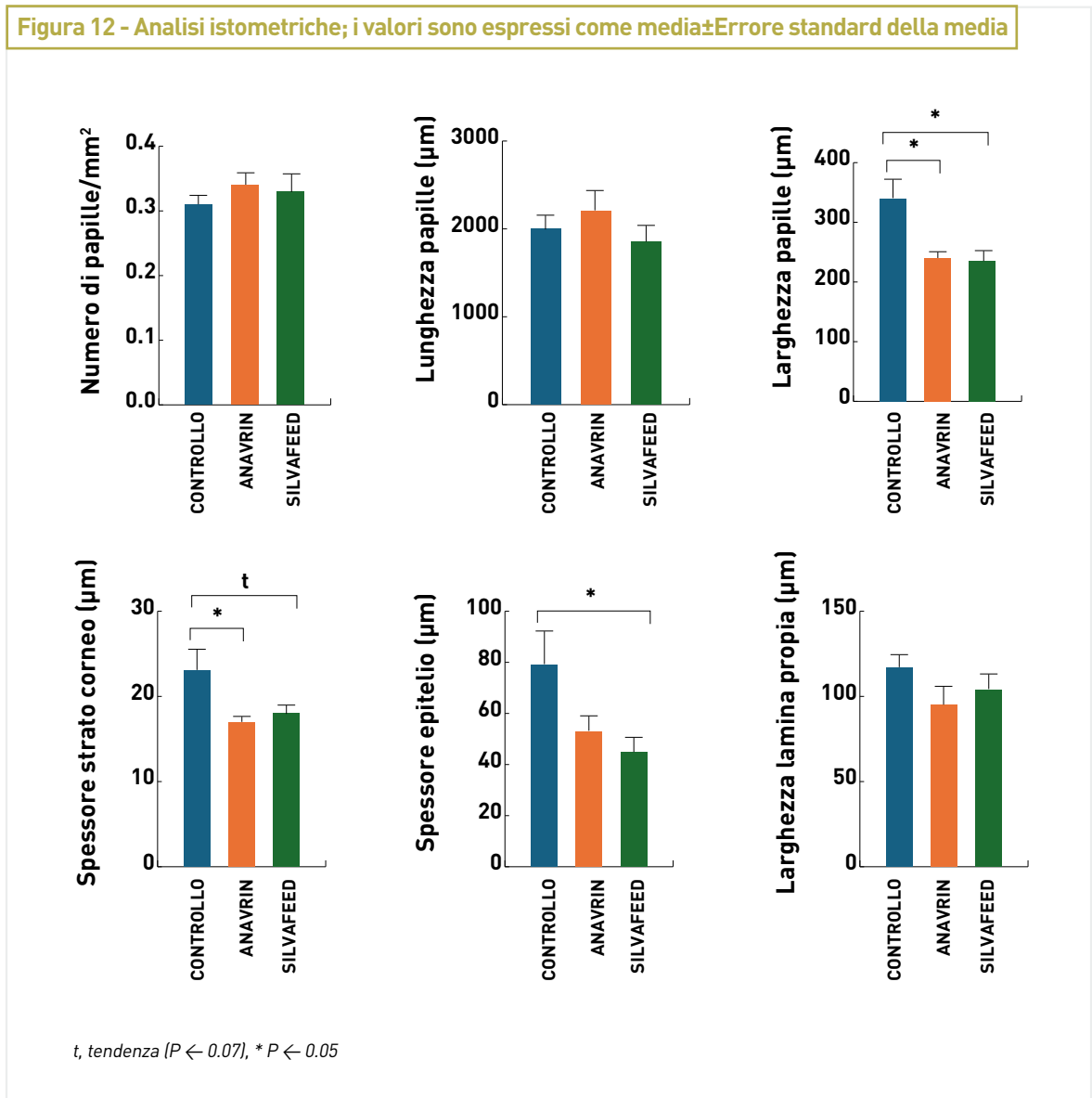
Figura 11 - Immagini rappresentative delle papille ruminali di animali del gruppo Controllo (A e B), Anavrin (C e D) e Silvafeed (E e F)



È stato descritto come una maggiore quantità di sostanza organica disponibile per la fermentazione nel ruminale possa determinare un'iperplasia delle cellule metabolicamente attive (Ragionieri et al., 2016), con la conseguenza che, durante il processo di corneificazione, lo strato granuloso scompare o si riduce a un numero molto limitato di cellule, e le cellule dello strato spinoso si trasformano direttamente in cheratinociti rigonfi, ovoidi e ancora nucleati, costituenti di uno strato corneo ispessito. Secondo Marcato (Marcato, 2000) questa morfologia è tipica della paracheratosi e potrebbe essere favorita dalla vacuolizzazione delle cellule epiteliali dovuta a osmolarità non fisiologiche causate da un'elevata assunzione di concentrati (Hinders and Owen, 1965; Nocek et al., 1984).

Tabella 12 - Riassunto dell’osservazione delle sezioni: infiltrato linfocitario, cheratinizzazione e presenza di cellule ipertrofiche. NO, assenti; + poche; ++ alcune; +++molte; ++++ moltissime				
TRATTAMENTO	CAMPIONE	INFILTRATO LINFOCITARIO	CHERATINIZZAZIONE	CELLULE IPERTROFICHE
CONTROLLO	L24-25	+++	NO	NO
	L24-26	NO	NO	+
	L24-27	NO	NO	+++
	L24-28	++	NO	
	L24-29			
	L24-30	+	NO	++
	L24-31	NO	NO	+
	L24-32	NO	NO	
	L24-33	NO	+	
	L24-34	NO	NO	+
	L24-35	+	+	+
ANAVRIN	L24-1	NO	++++	
	L24-2	NO	++	NO
	L24-3	NO	NO	+
	L24-4	+	+	+
	L24-5	NO	++	+
	L24-6	NO	+++	NO
	L24-7	NO	+	NO
	L24-8	NO	++	NO
	L24-9	NO	NO	NO
	L24-10	NO	+	NO
	L24-11	NO	+++	NO
	L24-12	NO	NO	+
SILVAFEED	L24-13	NO	NO	+
	L24-14	NO	NO	+
	L24-15	NO	+	NO
	L24-16	+	NO	NO
	L24-17	NO	NO	NO
	L24-18	NO	+	NO
	L24-19	NO	NO	NO
	L24-20	NO	+	NO
	L24-21	NO	NO	NO
	L24-22	+	+	NO
	L24-23	NO	NO	NO
	L24-24	+++	NO	NO

Le analisi istometriche confermano quanto osservato dal punto di vista qualitativo. Infatti, gli animali del gruppo Controllo presentano una larghezza delle papille statisticamente superiore a quella degli animali alimentati con Anavrin o Silvafeed. La maggior larghezza delle papille negli animali alimentati con la dieta di Controllo è dovuta ad un maggior spessore dell’epitelio e, in particolare, dello strato corneo (Figura 12).



Considerando *in toto* le analisi morfologiche ed istometriche della mucosa ruminale, si evidenziano significative alterazioni strutturali associate alla dieta di base, caratterizzate da una cheratinizzazione non completa e presenza di cellule nucleate nello strato corneo, indice di un processo di paracheratosi. Un ulteriore rilievo morfologico riguarda la presenza di infiltrati linfocitari nella lamina propria nei campioni provenienti dagli animali alimentati con la dieta base, indicatore di un processo infiammatorio cronico o non acuto a carico della mucosa ruminale. Tale reperto suggerisce una risposta immunitaria locale persistente, probabilmente correlata alle alterazioni strutturali e funzionali dell’epitelio. Tali modificazioni risultano correlate a una maggiore disponibilità di substrato fermentescibile nel rumine, che determina iperplasia delle cellule metabolicamente attive e la scomparsa o riduzione dello strato granuloso, in accordo con quanto riportato in letteratura. Gli animali alimentati con Anavrin o Silvafeed hanno mostrato caratteristiche morfologiche più vicine a quelle attese per un rumine più sano, suggerendo un effetto protettivo di tali integratori contro il processo di cheratinizzazione. I risultati suggeriscono che la dieta base predispone allo sviluppo di paracheratosi ruminale, mentre l’integrazione con Anavrin o Silvafeed può contribuire a preservare l’integrità e la funzionalità dell’epitelio ruminale, favorendo una migliore salute digestiva complessiva.

4.8 VALUTAZIONI ISTOMETRICHE DEI CAMPIONI DI MUSCOLO

L'analisi istometrica del muscolo non ha evidenziato alcuna differenza nella percentuale di fibre rosse/ ossidative tra i gruppi sperimentali, indicando che la dieta non ha avuto un effetto sul metabolismo delle fibre muscolari (Figure 13 e 14).

Figura 13 - Immagini rappresentative del muscolo Longissimus thoracis con la colorazione succinato deidrogenasi (SDH) degli animali

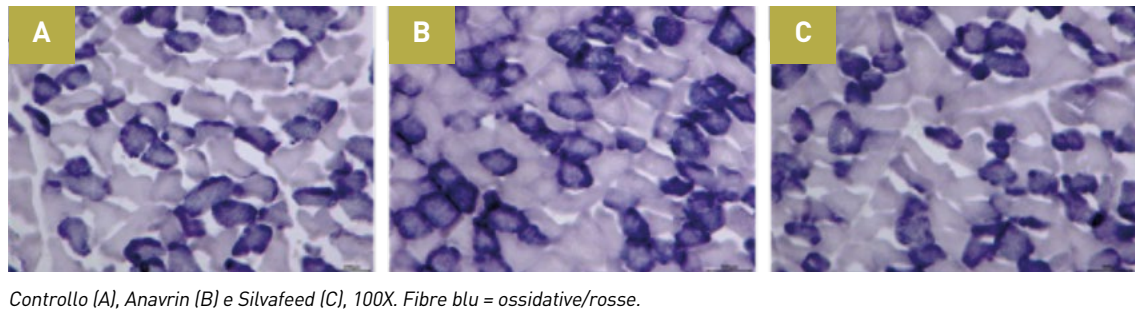
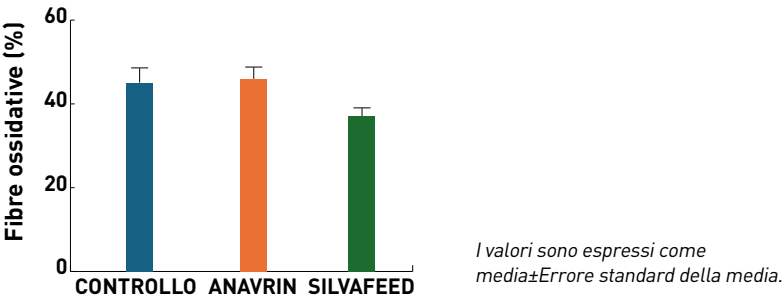


Figura 14 - Quantificazione delle fibre ossidative/rosse espressa in percentuale



5

CONCLUSIONI

Questo studio sperimentale è stato progettato e condotto secondo un approccio rigorosamente *hypothesis-driven*, con l'obiettivo di valutare in modo esplicito e falsificabile l'efficacia di additivi alimentari a base di estratti vegetali nella mitigazione delle emissioni di metano enterico nei bovini da carne, nonché di verificare la possibile insorgenza di effetti collaterali indesiderati a carico delle prestazioni produttive, della qualità delle carcasse e dello stato di benessere animale.

Alla luce dei risultati ottenuti, l'ipotesi primaria (H1), secondo cui l'inclusione in dieta di Silvafeed e Anavrin è in grado di ridurre le emissioni di metano enterico attraverso una modulazione dei processi fermentativi ruminali, può essere accolta, seppur con un effetto differenziato tra i due additivi. In particolare, Silvafeed ha mostrato un effetto mitigante più marcato e coerente, con riduzioni prossime al 20% delle emissioni totali e respiratorie, supportate da intervalli di compatibilità non sovrapposti a quelli del gruppo di controllo. Anavrin ha evidenziato una riduzione più contenuta, dell'ordine del 7-8%, ma biologicamente plausibile e coerente con i meccanismi d'azione ipotizzati. Tale risultato si discosta significativamente dall'ampia bibliografia relativa all'additivo Anavrin ed alla sua maggiore efficacia, rispetto al dato riscontrato, nel ridurre la metanogenesi, evidenziando pertanto la necessità di ulteriori approfondimenti. L'assenza di effetti sulla frequenza dei picchi di emissione conferma che l'azione degli additivi si esplica sull'intensità della metanogenesi e sui processi fermentativi ruminali, piuttosto che sulla dinamica meccanica dell'eruttazione.

Per quanto concerne l'ipotesi secondaria (H2), formulata intenzionalmente come ipotesi di possibile interferenza negativa degli additivi sulle performance produttive, sulle rese alla macellazione, sulla qualità delle carcasse e sui principali indicatori biologici del benessere animale, i risultati consentono di rigettarla. L'assenza di differenze significative negli accrescimenti ponderali, nell'ingestione alimentare, nelle rese alla macellazione e nei parametri qualitativi della carne, unitamente alla stabilità dei principali indici ematochimici entro i range fisiologici, indica che la riduzione delle emissioni non è stata ottenuta a scapito delle prestazioni produttive, dello stato metabolico degli animali e, in definitiva, del loro benessere.

Ulteriori elementi di interesse emergono dalle valutazioni ruminali, sia macroscopiche sia istologiche, che suggeriscono un possibile effetto protettivo degli additivi sull'integrità della mucosa ruminale. Gli animali alimentati con Anavrin o Silvafeed hanno mostrato un quadro morfologico più vicino alla fisiologia rispetto al gruppo di controllo; in particolare sono minori segni di infiltrazione linfocitaria e di alterata cheratinizzazione. Tali evidenze, pur non costituendo l'obiettivo primario dello studio, rafforzano l'interpretazione biologica dei risultati e suggeriscono che la modulazione delle fermentazioni ruminali possa avvenire senza compromettere, e anzi potenzialmente migliorare, lo stato funzionale del rumine e la salute dell'animale.

Nel complesso, la conferma dell'ipotesi primaria (H1) unitamente al rigetto dell'ipotesi secondaria (H2) rappresenta una dimostrazione biologicamente rilevante e metodologicamente solida dell'efficacia degli additivi studiati nel contribuire alla mitigazione delle emissioni di metano enterico nei bovini da carne, senza introdurre effetti avversi misurabili sul piano produttivo, qualitativo o di benessere animale. Questo risultato assume particolare rilievo considerando che la prova è stata condotta in un sistema alimentare già caratterizzato da una bassa emissione di base, condizione che rende le riduzioni osservate ancora più significative dal punto di vista fisiologico e applicativo.

In definitiva i dati ottenuti supportano l'impiego mirato di additivi a base di estratti vegetali come strumento potenzialmente efficace e sostenibile per la riduzione delle emissioni di metano enterico, nel rispetto dei principi di solidità sperimentale, gerarchia delle ipotesi e interpretazione prudente dei risultati, così come delineato nel quadro teorico di riferimento adottato nello studio.

