

# BIO TANGAS / BIOMETA

**Studio BIOMolecolare del potenziale impatto di un'alimentazione integrata con tannini sulla composizione della popolazione microbica enterica interessata alla produzione di metano, in campioni di feci di bovini da carne**

Il Bovino da carne protagonista di uno studio sulla potenzialità dei Tannini, nel modulare la composizione della popolazione microbica enterica responsabile dell'emissione di Gas metano.

Lo **scopo** del progetto è quindi quello di verificare se, attraverso un'alimentazione integrata con prodotti specifici, in questo caso prodotti naturali quali i tannini, è possibile modulare l'attività del microbioma ruminale in particolare dei microrganismi metanogenetici, quindi direttamente coinvolti nella produzione di metano, al fine di ridurre la produzione senza modificare le normali attività fisiologiche degli animali.



Effetto di un'alimentazione integrata con tannini sulla composizione della popolazione microbica enterica coinvolta nella produzione del metano e caratterizzazione della composizione fecale

L'aumento della concentrazione di CO<sub>2</sub> e di gas serra nell'atmosfera è la causa principale dei cambiamenti climatici in atto; le variazioni nella composizione dell'atmosfera sono correlate allo sviluppo delle attività antropiche sul pianeta negli ultimi 150 anni, tra cui le attività agricole e di allevamento, che nel tempo hanno aumentato l'emissione in atmosfera sia di CO<sub>2</sub> sia di gas considerati ad impatto ancora più elevato nell'effetto serra quali il metano, il protossido di azoto e, indirettamente, l'ammoniaca.

L'Europa nel 2015 (Conferenza di Parigi -Dicembre 2015 - COP 21) è stata la prima economia globale ad impegnarsi stilando un Accordo affinché tutti i paesi dell'unione raggiungano dei precisi

obiettivi atti a mitigare i cambiamenti climatici già in atto, al fine di limitarne le conseguenze più gravose. Quindi tutte le attività produttive sono chiamate a contribuire alla mitigazione delle emissioni di gas ad effetto climalterante (GHG).

Il 23% delle emissioni di gas serra derivanti dall'att. umana derivano da agricoltura, zootecnia e silvicoltura.

Nello specifico, il settore agricolo contribuisce con il 7% delle emissioni di gas serra, circa, la maggior parte di queste, quasi l'80%, deriva dagli allevamenti, in particolare dalle categorie di bestiame bovino (quasi il 70%) e suino (più del 10%), mentre il 10% proviene dall'uso dei fertilizzanti sintetici (IPCC,2019) . Tra i gas climalteranti quello che maggiormente è coinvolto nel riscaldamento globale è il metano e per il settore agricolo, la maggior produzione è determinata dalla fermentazione enterica, a carico in particolare dei ruminanti.

Senza negare che il metano sia un gas climalterante in quanto impedisce al calore di dissiparsi dalla terra, va sottolineato che la sua persistenza in atmosfera è molto ridotta rispetto ad altri; ciò nonostante è comunque necessario applicare delle strategie di mitigazione dello stesso anche e soprattutto nell'ottica di nuova stringente legge UE sul clima, che prevede come obiettivo un aumento della riduzione delle emissioni di gas a effetto serra entro il 2030, dal 40% ad almeno il 55%.

Il settore agroo-zootecnico può quindi continuare a giocare il suo ruolo attivo nel controllo delle emissioni di gas serra.

L'emissione di metano nei ruminanti è un fenomeno assolutamente fisiologico risultato di una millenaria evoluzione; esso è determinato dalla simbiosi mutualistica tra l'animale e microrganismi (protozoi e batteri) che ne popolano il rumine e che permettono di trasformare alimenti altamente fibrosi e quindi difficilmente digeribili per l'uomo con prodotti con elevato valore nutritivo, quali latte e carne.

Nei ruminanti, infatti, la complessa comunità microbica del rumine, tra cui i microrganismi metanogenici, attraverso la fermentazione dei carboidrati oltre a produrre proteina microbica e acidi grassi volatili utili per il metabolismo dell'animale ospite, utilizzano i gas prodotti durante tali fermentazioni, quali l'idrogeno e la CO<sub>2</sub> per produrre metano (L. R. Thompson and J. E. Rowntree, 2019). Tale processo di trasformazione del metano, oltre a rappresentare un dispendio energetico per l'animale, è fortemente attenzionato a causa del suo contributo al Green House Gas, GHG, appunto.

Proprio per questo motivo e soprattutto per una alterata informazione della collettività numerosi sono gli studi indirizzati al contenimento del contributo alla produzione di gas climalteranti da parte della zootecnia. Tra le varie strategie di mitigazione che sono state proposte per il settore delle produzioni zootecniche, alcune interessano la produzione e l'utilizzo dei mangimi.

Lo **scopo** del progetto è quindi quello di verificare se, attraverso un'alimentazione integrata con prodotti specifici, in questo caso prodotti naturali quali i tannini, è possibile modulare l'attività del microbioma ruminale in particolare dei microrganismi metanogenetici, quindi direttamente coinvolti nella produzione di metano, al fine di ridurre la produzione senza modificare le normali attività fisiologiche degli animali.

I tannini sono delle sostanze polifenoliche, rappresentano una famiglia molto varia di metaboliti secondari delle piante e vengono distinti in tannini condensati (TC) e in tannini idrolizzabili (HT).

Sia i tannini idrolizzabili sia quelli condensati riducono l'emissione diretta di metano da parte dei ruminanti, tuttavia con diversi meccanismi di azione. I tannini condensati agiscono prevalentemente sulla diminuzione della digeribilità della fibra, andando così anche a ridurre l'efficienza digestiva dell'animale. Più interessante è l'effetto dei tannini idrolizzabili, che agiscono sui batteri metanogeni e sulla loro attività senza ridurre la digeribilità della fibra (Vasta et al., 2018; Chen et al., 2021).

A tale scopo sono state identificate due realtà produttive ben rappresentative del mondo zootecnico lombardo, in particolar modo del settore dei bovini da carne: Azienda SO.CO.BE.V. SRL con l'allevamento a Verdello, (BG) e Azienda Agricola F.Oli.Ma.N di Roverbella,(MN).

Sono diverse le ricerche condotte in vitro che hanno accertato le svariate potenzialità di tali sostanze tra cui la potenzialità alla riduzione di metano enterico, mentre poche sono le ricerche condotte in vivo (Aboagye et al., 2019).

Gli **obiettivi** di questa ricerca sono quindi quelli di indagare tramite un approccio di biologia molecolare la popolazione microbica isolata nelle feci di animali alimentati con aggiunta di tannini e animali alimentati con la medesima dieta ma priva di tannini, per valutare se l'aggiunta dei polifenoli

può cambiare la composizione del microbioma riducendo la presenza dei batteri direttamente coinvolti nella metanogenesi ruminale.

**L'attività** prevede quindi di alimentare gli animali con la normale razione utilizzata e per un gruppo si prevederà un piano di integrazione mirato con polifenoli secondo le necessità della categoria animale. Ad intervalli prestabiliti verranno fatti i campionamenti delle feci dal gruppo trattato e non, da cui in laboratorio verrà isolato il DNA per la successiva caratterizzazione della popolazione microbica.

Questo tipo di ricerca condotta in vivo non andrà ad influenzare il benessere degli animali perché la tipologia di indagine prescelta non prevede la manipolazione degli animali.

## **1. CONTESTO PRODUTTIVO**

### **1.1 Introduzione alla realtà produttiva interessata dal progetto**

Gli allevamenti moderni, siano essi da latte o da carne, sono erroneamente considerati tra i principali produttori di gas climalteranti; è la ricerca scientifica in primis ad aver dimostrato l'esistenza di disinformazione generale sull'argomento a cui si affiancano dati diffusi da ISPRA, il principale Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale.

Tale Istituto nell'ultimo rapporto sull'emissioni di gas serra da parte del nostro paese riporta infatti un importante calo delle stesse, in termini di CO<sub>2</sub> equivalenti, che equivalgono al 26.7% di diminuzione dal 1990 al 2020. Diminuzione è dovuta alla crescita della produzione di energia da fonti rinnovabili (idroelettrico ed eolico) e all'incremento dell'efficienza energetica nei settori industriali.

Tra i gas serra il principale è la CO<sub>2</sub>, che è andata calando anch'essa del 31.2% nel periodo di riferimento (1990-2020) a cui si aggiungono metano (CH<sub>4</sub>) e protossido di azoto (N<sub>2</sub>O), anch'essi comunque in calo dal 13.4% e il 28.4% rispettivamente (Italian Green House Gas Inventory 1990-2020. National Inventory Report - [www.isprambiente.gov.it](http://www.isprambiente.gov.it)).

Entrando nello specifico del comparto agricolo, una recente ricerca scientifica condotta da Roberto De Vivo e Luigi Zicarelli (2021) ha evidenziato, utilizzando una complessità di calcoli riguardanti diverse voci (foraggio utilizzato, le quantità di carbonio sequestrato dalla coltivazione del foraggio stesso da parte della fotosintesi, quello rilasciato a terra nelle radici ecc.) che il numero di emissioni generate dagli allevamenti è in realtà inferiore all'ossigeno prodotto e al carbonio sequestrato nel ciclo di allevamento e nella produzione di foraggi, portando quindi ad un bilancio finale, in termini di impronta di carbonio delle aziende agricole, interamente a favore dell'ambiente.

In agricoltura il metano prodotto deriva dai fisiologici processi fermentativi a carico dell'apparato digerente dei ruminanti, ma anch'esso dal 1990 ha subito una diminuzione del 13.5%.

Il comparto bovino nel mondo sta subendo un trend positivo con una crescita del patrimonio nel 2019 dell'1,1% rispetto al 2018 superando la soglia di 1,5 miliardi di capi. L'Italia per quanto riguarda la produzione di carne non è autosufficiente, ma risulta comunque essere il terzo maggior produttore a livello europeo e in Lombardia inoltre, dal 2019 il patrimonio bovino regionale è cresciuto del +1,4% (Quaderno n.16 di ottobre 2021 dell'Osservatorio Agroalimentare Lombardo, elaborato da ERSAF e Regione Lombardia). Ma l'attuale situazione geopolitica dovuta al conflitto in Ucraina potrebbe avere pesanti ripercussioni anche sulla zootecnia italiana e di conseguenza lombarda, già comunque pesantemente provata da continui attacchi inferti da ambientalisti e animalisti oltre che dalla riduzione del consumo pro capite.

In questo contesto economico sono molti a considerare la necessità di avvalersi di modelli di consumo e di produzione sostenibili che garantiscano resilienza e sostenibilità dei sistemi dell'industria agroalimentare nel contesto del cambiamento climatico e ambientale.

### **1.2 Composizione dell'aggregazione e breve descrizione delle attività/competenze di ogni partner**

Il Capofila e proponente del presente progetto è **SO.CO.BE.V. SRL**.

La SO.CO.BE.V. – Società Commercio Bestiame Voghera nasce a Varzi (PV) nel 1994. La ditta è da sempre stata dedicata al commercio di bestiame, in particolare ai bovini. I capi di bestiame provengono principalmente dalla Francia e dall'Italia, ma l'azienda ha sempre operato anche in altri

paesi europei, sia per l'importazione che per l'esportazione degli animali. La sua qualifica speciale di impresa agricola, le ha permesso negli anni di dedicarsi anche all'attività di ingrasso dei bovini principalmente di razza Charolaise, producendo carni di qualità rispettando al meglio gli standard di benessere animale.

Nella seguente ricerca l'Azienda agricola si occuperà della gestione degli animali interessati dalla ricerca, alimentandoli come da piano alimentare pianificato con l'azienda mangimistica, dovrà occuparsi della raccolta dei campioni e loro conservazione fino all'invio al laboratorio, alla raccolta dei dati produttivi degli animali coinvolti e condivisione con gli altri partner.

La società agricola **F.Oli.Ma.N s.s.**, fondata dai fratelli Fortuna e con sede a Mozzecane, si occupa di allevare e commercializzare bovini da carne. La mission aziendale consiste nel produrre carne di altissima qualità attraverso ristalli omogenei, controlli diretti delle fasi di crescita dei vitelli ed una scrupolosa formulazione e somministrazione della dieta.

L'azienda agricola nello studio proposto si occuperà della gestione degli animali interessati dalla ricerca, alimentandoli come da piano alimentare stilato con l'azienda mangimistica, dovrà occuparsi della raccolta dei campioni e loro conservazione fino all'invio al laboratorio, alla raccolta dei dati produttivi degli animali coinvolti e condivisione con gli altri partner.

**L'Istituto Spallanzani** (<http://www.istitutospallanzani.it>) L'Istituto Sperimentale Italiano "Lazzaro Spallanzani" (IS) è un ente di ricerca senza fine di lucro con finalità principale la ricerca scientifica e la sperimentazione nel campo delle tecnologie della riproduzione degli animali domestici e della qualità dei prodotti di origine animale in ambito veterinario, agro-zootecnico e biologico applicato ed ha un'ampia esperienza in merito alla divulgazione scientifica con numerose pubblicazioni su riviste internazionali. Dal 1997 il settore di Genetica Molecolare svolge attività di ricerca e di servizio in ambito zootecnico e agro-alimentare. Nell'ambito dell'attività istituzionale il laboratorio è coinvolto nella verifica di filiera del seme animale congelato prodotto e/o importato in Italia (DDMM 403/00 e 27.12.94), eseguito su mandato del Mipaaf. Il Controllo Ufficiale del Seme è un'attività certificata a Norma UNI EN ISO 9001:2015. L'istituto è stato, ed è, titolare di contratti di ricerca finanziati dall'Unione europea, dal Mipaaf, dal MIUR e da Regione Lombardia. In particolare Spallanzani da anni è promotore e coordinatore di progetti Mipaaf e regionali con tematiche attinenti alla presente proposta progettuale e che hanno avuto come obiettivo quello di ridurre l'impatto ambientale e rendere più sostenibile la zootecnica utilizzando le microalghe come fonte biologica, capace di trasformare i reflui in prodotti di nuova origine. In particolare il laboratorio di genetica molecolare di IS vanta un'esperienza pluriennale in attività di ricerca e di servizio nell'ambito della certificazione di filiera e nell'applicazione di metodiche molecolari al fine della tracciabilità/rintracciabilità. Di particolare rilevanza ai fini della presente proposta è l'esperienza che il laboratorio ha maturato nell'ambito delle interazioni tra comunità microbiche e microalghe e l'utilizzo del metabarcoding per la tracciabilità nelle filiere agroalimentari attraverso la tecnologia di Next Generation Sequencing (NGS). Tra gli scopi statutari dell'Istituto, è compresa **l'attività di progettazione ed erogazione di corsi di alta formazione ed addestramento in ambito veterinario, agro-zootecnico e biologico applicato**. Tale attività formativa è **certificata dal 2010 secondo la Norma UNI EN ISO 9001-2015 (Registrazione N. 17-4292)**. **Dal 01 luglio 2015 l'Istituto è iscritto all'albo regionale dei soggetti accreditati per i servizi di istruzione e formazione professionale di Regione Lombardia, ai sensi della D.G.R. n° 2412/2011, con numero di iscrizione 881**. L'IS possiede inoltre strutture accreditate come laboratori per le esercitazioni pratiche e una sala riunioni per lo sviluppo di momenti informativi e/o dimostrativi.

Nello specifico IS si occuperà del coordinamento scientifico e di caratterizzare nei campioni di feci forniti dalle aziende coinvolte la popolazione microbica, tale attività prevede quindi estrazione di DNA e successiva analisi mediante protocolli di real-time PCR appositamente creati in laboratorio e approccio di Next Generation Sequencing. Sarà inoltre coinvolto nell'analisi dei dati e nella diffusione dei risultati.



**COMAZOO scarl**, Cooperativa per il Miglioramento Agricolo e Zootecnico, è mangimificio ed essiccatoio cooperativo con sede a Montichiari (BS). Comazoo opera da oltre trent'anni per il miglioramento agricolo zootecnico, rappresentando oggi circa 1500 soci allevatori e agricoltori, di cui circa oltre la metà allevatori di vacche da latte e bovini da carne, distribuiti principalmente nelle province della Lombardia. Oggi Comazoo produce e vende circa 3 milioni di quintali tra materie prime e mangimi, di cui la metà sono destinati ai ruminanti. L'attività della cooperativa, senza scopo di lucro, è sempre stata finalizzata al raggiungimento di soluzioni nutrizionali zootecniche caratterizzate dal miglior punto di efficienza tecnico economica, a partire dalla massima valorizzazione dei foraggi aziendali. Inoltre, in quest'ottica, negli ultimi anni ci siamo particolarmente focalizzati sullo sviluppo di sinergie di filiera al fine di acquisire sistemi produttivi sempre più efficienti e sostenibili, da un punto di vista ambientale, etico ed economico. Comazoo, in qualità di cooperativa di servizio ed assistenza alla base sociale, ha come primo interesse il mantenimento dell'attività dei propri soci, che potrà avvenire solo se l'allevamento ritroverà una compatibilità con l'ambiente: la possibilità di diffondere buone pratiche per il contenimento degli impatti sull'ambiente (acqua, aria, clima) è la condizione nel lungo periodo per la sopravvivenza dell'attività zootecnica; ricondurre tale impegno ad una diversificazione produttiva certificabile e remunerabile è una sfida per il breve periodo.

Nella presente proposta si occuperà della formulazione del mangime contenente i tannini, dell'impostazione delle razioni presso gli allevamenti interessati dalla sperimentazione e darà supporto all'allevatore per la registrazione e il monitoraggio dei dati. Sarà inoltre impegnato nella condivisione e diffusione dei risultati raggiunti con attività di dimostrazione e diffusione.

## **2. ANALISI DEI FABBISOGNI**

### **2.1 Analisi dei punti di debolezza e dei fattori di miglioramento della realtà produttiva**

Il comparto della carne bovina rappresenta uno dei settori primari del sistema agroalimentare nazionale, ma ormai da diversi anni, sta affrontando un graduale ridimensionamento e la competitività degli allevamenti nazionali risulta minata da una serie di fattori che attengono principalmente ad aspetti strutturali e organizzativi della filiera.

Il mercato nazionale delle carni bovine, dopo un 2020 anomalo, con un - 2,3% sulla produzione e un - 1,5% di fatturato rispetto al 2019, ha visto rimettersi in moto i consumi nel 2021 (*Ismea su dati Istat e Federalimentare*), più probabilmente non per un effettivo maggior consumo pro capite di carne ma per l'uscita dalla situazione sanitaria che ha caratterizzato gli ultimi due anni. L'offerta nazionale per contro è rimasta sostanzialmente stabile, con un 51,4% di auto approvvigionamento, in quanto la redditività aziendale, dati i continui rialzi nei costi di produzione, rimane marginale. Ci avvaliamo quindi di una buona parte di carne proveniente dall'estero per coprire le richieste, la carne di importazione ha un costo inferiore rispetto a quella prodotta sul territorio nazionale, soprattutto perché i costi di produzione nei paesi esteri giovano delle tipologie di allevamento che li caratterizza (maggiore disposizione di arre a pascolo).

La spesa domestica per le carni ha rappresentato nel 2020 il 10,2% del totale per l'agroalimentare; le carni bovine rappresentano in valore il 42% del comparto carni (il 32% in termini di volume). Nel 2020 la spesa per i consumi domestici di carne è aumentata del 6,2% rispetto al 2019, compensando solo in parte le perdite per le parziali chiusure di diversi canali di vendita.

La produzione di carne bovina in Europa nel 2020 è in flessione sul 2019 del 1,2% e ancora inferiore dell'1% rispetto a 5 anni prima (2016), l'Italia dopo l'uscita degli UK dall'UE diventa terzo produttore Europeo di carni bovine con uno share del 11%.

Sono indubbiamente molti i **punti di forza** del comparto che vanno dall'elevato know-how negli allevamenti intensivi del Nord Italia, dalla forte caratterizzazione e tipicità di alcune realtà produttive, dall'attitudine alla valorizzazione delle aree svantaggiate a cui si contrappongono diversi **punti di debolezza** che emergono in questo comparto: elevata dipendenza dall'estero, costi di produzione in media più elevati, ridotta dimensione degli allevamenti, forte concentrazione di allevamenti intensivi al Nord Italia con conseguente impatto ambientale, soprattutto nelle aree marginali, scarsa comunicazione sul tema del benessere animale e della transizione ecologica.

Il forte trend negativo che caratterizza i consumi di carne sono indubbiamente legati alla contrazione della spesa delle famiglie in generale, perché orientate verso altre voci di spesa, ma a questo si aggiunge sicuramente anche una scarsa fiducia nelle attività di allevamento e nell'impatto che questi possono avere sulla situazione ambientale odierna che si sta sempre più spingendo verso un'economia sostenibile.

Le opportunità che questa situazione crea sono rappresentate dalla possibilità di rispondere efficacemente alla maggiore attenzione di innovazione, sostenibilità, salubrità e benessere animale sempre più richieste dai consumatori.

Inoltre la presenza di maggiori costi di produzione nel nostro paese ha portato ad una forte specializzazione del comparto con alte competenze tecniche maturate e l'utilizzo di diete specificatamente formulate consentono di ottenere performance di crescita migliori rispetto ai principali paesi europei (Vigna et al., 2013).

## **2.2 Prospettive di sviluppo delle aziende partner**

La realizzazione di un protocollo molecolare non invasivo nei confronti della routinaria attività aziendale, associato ad un piano alimentare che, grazie all'inclusione di prodotti di derivazione naturale e con un costo non impattante sul bilancio alimentare aziendale, permetterà di realizzare una fotografia di quella che è la popolazione microbica enterica coinvolta nelle fermentazioni enteriche e quindi potenzialmente impattanti sull'ambiente in termini di metano, dando la possibilità alle aziende agricole partner coinvolte, di valorizzare e rendere più visibile il loro impegno nella contenzione dei gas climalteranti e portando facilmente all'attenzione del consumatore l'ampio impegno e l'interesse profusi dal settore primario per la sostenibilità ambientale e il benessere animale che ne consegue.

La collaborazione tra enti di ricerca, che mettono a disposizione le loro conoscenze e le loro piattaforme tecnologiche e, gli allevatori che mettono a disposizione il loro processo produttivo (stalle e quota parte degli animali), rappresenta un'importante risorsa in grado di generare nuova "linfa" per la ricerca e lo sviluppo nel settore agro-alimentare, dimostrando come i risultati di studi pregressi, corroborati da quelli che si otterranno con la sperimentazione proposta nel presente progetto, possano avere un potenziale economico per le aziende coinvolte e non solo.

## **2.3 Altri progetti correlati**

Il presente progetto si collega ad altre attività realizzate nel recente passato dalle parti coinvolte, IS e Comazoo. IS vanta un'ampia esperienza nella realizzazione di progetti di ricerca nel settore agro-zootecnico che hanno permesso di fornire nuovi strumenti applicativi. Si citano ad esempio progetti pertinenti con la tematica del progetto e/o con le metodologie utilizzate per il raggiungimento degli obiettivi:

- **Il polo delle Microalgahe-Cariplo emblematico-** La proposta progettuale origina dall'aver identificato nella provincia di Cremona il contesto ideale per tecnologie e dei processi basati sull'impiego delle microalgahe. Cremona è infatti una Provincia prettamente agricola, considerata per oltre la metà del proprio territorio "zona vulnerabile" secondo la "Direttiva Nitrati" (676/91/CE). I nitrati provenienti da fonti agricole sono una delle cause d'inquinamento delle acque e possono comprometterne l'uso potabile. Il lattiero-caseario è uno dei settori industriali più rilevanti in provincia, di cui è anche leader regionale nell'export. Lo sviluppo di vie di valorizzazione dei sottoprodotti alimentari che non trovano attualmente impieghi consolidati, se non il declassamento a rifiuto con conseguente spesa di smaltimento, rappresenta pertanto un'opportunità per il territorio cremonese. Le tecnologie microalgali sono qui proposte sia come risposta ad esigenze specifiche del territorio sia come opportunità per lo sviluppo di innovativi ed interessanti mercati nel settore della bioeconomia. Questo progetto si è posto la realizzazione di un centro di sperimentazione, lo sviluppo di tecnologie innovative e di progetti imprenditoriali finalizzati alla mitigazione dell'impatto dei reflui e sottoprodotti di origine zootecnica e agro-alimentare e alla trasformazione di questi in nuovi prodotti da valorizzare in differenti settori già consolidati sul territorio, quali il cosmetico, mangimistico, energetico e agricolo.
- **Use of microalgae to mitigate nitrogen pollution from agricultural wastewaters (Microgate)-progetto Cariplo.** Il presente progetto ha verificato la fattibilità dell'utilizzo

delle microalghe per rimuovere l'azoto ammoniacale dalle acque di rifiuto di origine agro-zootecnica come soluzione tecnicamente semplice al problema dell'inquinamento da nitrati delle acque superficiali e sotterranee. Lo studio si è focalizzato su reflui provenienti da impianti di biogas sui quali sono stati ottimizzati metodi separativi solido/liquido per ottenere frazioni adeguatamente chiarificate e idonee al passaggio di luce. Su tali reflui sono stati coltivati in laboratorio inoculi microalgali e la comunità fitoplanctonica e microbiologica è stata caratterizzata dal punto di vista biologico, per velocità di crescita e stato metabolico. Si è inoltre stimata la resa depurativa relativa ai nutrienti. Infine, sulla base dei dati sperimentali, i ceppi più idonei al trattamento sono stati posti in coltura in una vasca prototipale all'aperto valutando la resa di processo e la produzione di biomassa algale.

- **Sviluppo ed integrazione tecnologica di una piattaforma High-Throughput per il miglioramento sostenibile dei processi produttivi delle filiere dell'agroalimentare (AGRIHUB)-S** Bando Call HUB Ricerca e Innovazione. Regione Lombardia, Programma Operativo Regionale 2014-2020. Obiettivo "Investimenti in favore della crescita e dell'occupazione", cofinanziato con il FESR. Nel progetto l'Istituto Spallanzani sarà impegnato nell'identificazione e valutazione in vitro dell'effetto di nuovi formulati a base di peptidi attivi con azione antimicrobica per impiego in zootecnia.
- **New Technologies for Cheese production (NEWTECH)** progetto NEWTECH si è posto l'obiettivo di sviluppare tecniche avanzate a supporto della valutazione dell'autenticità delle produzioni DOP nel settore lattiero-caseario nazionale, studiare a livello sperimentale l'effetto dell'uso di derivati anidri del latte nella produzione di formaggi industriali ed infine mettere a punto un nuovo sistema in spettrometria nel vicino infrarosso (NIR) per valutare le proprietà strutturali dei formaggi. Nell'ambito del progetto l'Istituto Spallanzani è stato coinvolto nella linea di ricerca "Approcci innovativi per la lotta alla contraffazione nelle produzioni DOP del settore caseario (Grana Padano)". Nello specifico, l'analisi delle informazioni ottenute dallo studio delle variazioni nella diversità genetica complessiva della microflora e dei "residui vegetali" dell'alimentazione nel latte, opportunamente elaborate mediante approcci bioinformatici e statistici, consentirà di mappare il latte ed il formaggio in funzione di polimorfismi, che potranno essere utilizzati come potenziali marcatori per test di analisi della biodiversità e della tracciabilità.

Comazoo grazie all'operatività quotidiana che svolge ha acquisito negli anni competenze nel settore della valorizzazione del settore agro-zootecnico e nella realizzazione di progetti di ricerca che hanno portato allo sviluppo di nuove tecnologie e prodotti. Si citano ad esempio alcuni dei più significativi progetti e collaborazioni di recente attuazione:

- **Low EmiSSion farming - Produzioni zootecniche lombarde a basse emissioni, eco compatibili e resilienti (progetto in corso)**  
MISURA 1. – "Trasferimento di conoscenze e azioni di informazione", SOTTOMISURA 1.2 – "Sostegno a attività dimostrative e azioni di informazione", OPERAZIONE 1.2.01 – "Progetti dimostrativi e azioni di informazione". L'obiettivo è diffondere le informazioni e l'innovazione disponibili riguardo le buone pratiche in campo e in stalla per la riduzione delle le emissioni di gas ad effetto serra (GHG) e di ammoniaca provenienti dal settore agricolo lombardo, con particolare riferimento all'allevamento delle bovine da latte e dei suini.
- **LIFE09 ENV/IT/000208 - AQUA Achieving good water QUALity status in intensive Animal production areas**, specificatamente dedicato a dimostrare come ridurre l'inquinamento delle acque sotterranee e superficiali quando dovuto alla dispersione di nutrienti di origine agricola (azoto e fosforo), ottimizzando il loro utilizzo nelle aziende zootecniche. Comazoo ha partecipato attuando presso l'allevamento suinicolo di un proprio associato due piano alimentari (a basso e alto tenore proteico) a confronto.
- **GOI RISparmio e COnservazione dell'azoto nei SiStemi Agricoli suini** (<http://riscossa.crpa.it>). Comazoo ha partecipato attuando presso l'allevamento suinicolo di un proprio associato due piano alimentari (a basso e alto tenore proteico) a confronto.

- **Sostenibilità e diversificazione produttiva nella filiera del latte vaccino - Smart & Green Milk**

SOTTOMISURA 16.2 – “Sostegno a progetti pilota e allo sviluppo di nuovi prodotti, pratiche, processi e tecnologie ” OPERAZIONE 16.2.01 – “Progetti pilota e sviluppo di innovazione”. il progetto intende perseguire l’obiettivo ambientale “incentivare l’uso efficiente delle risorse e il passaggio a un’economia a basse emissioni di carbonio e resiliente al clima nel settore agroalimentare”. Comazoo è stata partner del progetto, fornendo l’assistenza nutrizionale specifica per la valutazione delle buone pratiche di razionamento finalizzate alla riduzione dell’impronta del carbonio.

### **3. OBIETTIVI DEL PROGETTO E RISULTATI ATTESI**

#### **3.1 Definizione dell’ambito di innovazione che il progetto intende sviluppare**

L’idea progettuale scaturisce dalla volontà di rispondere ad importanti criticità della zootecnia in ambito di sostenibilità ambientale e alla distorta percezione che i consumatori hanno della tecnologia applicata all’allevamento intensivo.

L’ambito quindi di innovazione del progetto riguarda la valorizzazione di sistemi per la riduzione delle emissioni di metano passando attraverso un’ottimizzazione della produttività aziendale attuando scelte alimentari calibrate all’obiettivo di contributo effettivo alla sostenibilità ambientale, traducibile poi nell’intenzione di sviluppare una certificazione di riduzione delle emissioni che potrebbe essere mostrata sul prodotto agricolo, come strumento di formazione ed informazione dei consumatori circa l’impegno che il comparto zootecnico mette in atto per preservare la sostenibilità dell’allevamento. Numerose sono le strategie di mitigazione che potenzialmente si potrebbero applicare negli allevamenti di tipo intensivo, al fine di contenere la produzione di metano che deriva dalla fermentazione enterica e dalle deiezioni. Tra queste risultano particolarmente interessanti quelle che prevedono l’applicazione di pratiche e soluzioni innovative applicate all’alimentazione e che si avvalgono di sostanze in grado di modificare l’assetto di quella popolazione microbica direttamente coinvolta nella produzione fisiologica del metano enterico.

Tali obiettivi saranno raggiunti mediante 7 azioni che prevedono: una prima fase di formulazione e produzione di un mangime additivato con tannino ; una seconda fase di realizzazione di un piano alimentare specifico per la categoria animale interessata, una terza fase di somministrazione dell’alimento e contestuale monitoraggio dei dati produttivi; una quarta azione riguarda il recupero dei campioni; una quinta fase di attività di ricerca mirata alla caratterizzazione delle comunità microbiche; una sesta fase prevede l’analisi bioinformatica dei risultati ottenuti ed infine una settimana sarà dedicata alla realizzazione di una serie di eventi e servizi di informazione ed divulgazione dedicati al comparto. Il dettaglio delle Azioni è riportato nei successivi paragrafi.

#### **3.2 Obiettivi specifici del progetto**

Gli obiettivi specifici del progetto sono pertanto i seguenti:

- assistenza nutrizionale specifica per la valutazione delle buone pratiche di razionamento finalizzate all’utilizzo di additivi naturali in un contesto di maggior sostenibilità ambientale
- caratterizzazione tramite Metabarcoding della popolazione microbica isolata nelle feci
- messa a punto di un protocollo in real time PCR per una valutazione quanti/qualitativa della popolazione microbica nelle feci
- sviluppo di un protocollo aziendale di mitigazione dell’emissione di metano
- favorire la consapevolezza dei consumatori sulle strategie messe in atto negli allevamenti per la riduzione di emissione metano



### 3.3 Tipologia di intervento e azioni previste nel progetto

La prima azione prevista dal progetto prevede la formulazione del mangime: il nutrizionista grazie alle sue conoscenze scientifiche e al Know-how aziendale progetta un alimento additivato con tannino derivato dal castagno adeguato al fabbisogno nutrizionale della categoria animale interessata, segue quindi la produzione vera e propria del prodotto. Contestualmente la seconda azione prevede che, sempre il nutrizionista, realizzi un piano alimentare in collaborazione con le aziende agricole interessate, al fine di inserire in maniera equilibrata il prodotto con la realtà alimentare dell'azienda. L'incaricato delle aziende dovrà somministrare l'alimento agli animali come da pianificazione (terza azione), si prevede quindi una registrazione ai fini del progetto dei normali parametri produttivi rilevati in situazione non sperimentale per assicurarsi che gli animali non risentano in alcun modo del cambiamento. In periodi prestabiliti verrà eseguita la raccolta dei campioni di feci presso gli allevamenti (quarta azione), il loro trasferimento presso il laboratorio dello Spallanzani per le successive processazioni che prevedono (quinta azione): estrazione di DNA microbico, valutazione quali/quantitativa dell'acido nucleico estratto mediante spettrofotometro Nanodrop per le successive applicazioni di biologia molecolare, sviluppo di un saggio in real time PCR e analisi metagenomica con approccio di Next Generation per la caratterizzazione dei ceppi microbici isolati nei campioni. I risultati ottenuti dalla precedente azione verranno elaborati e confrontati mediante un'analisi bioinformatica (sesta azione) che permetterà di stilare una classificazione tassonomica dei microrganismi che caratterizzano il microbioma indagato. La settima ed ultima azione prevede che i risultati ottenuti vengano condivisi mediante seminari, giornate in campo, pubblicazioni, sito web con chi opera direttamente nel settore, ma anche con il fruitore finale: il consumatore.

### 3.4 Prodotti del progetto

Il principale prodotto del progetto sarà lo sviluppo di una buona pratica di razionamento mediante l'utilizzo di tannini, quali fonti di polifenoli.

Altri prodotti concreti derivati dalle singole azioni di ricerca saranno:

- formulazione mangime additivato
- dati scientifici in grado di supportare l'efficacia del mangime testato
- sviluppo di un "saggio rapido ed economico" per la caratterizzazione della comunità microbica

### 3.5 Bibliografia consultata

- IPCC, 2019: Summary for Policymakers. In: *Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems* [P.R. Shukla, J. Skea, E. Calvo Buendia, V. Masson-Delmotte, H.- O. Pörtner, D. C. Roberts, P. Zhai, R. Slade, S. Connors, R. van Diemen, M. Ferrat, E. Haughey, S. Luz, S. Neogi, M. Pathak, J. Petzold, J. Portugal Pereira, P. Vyas, E. Huntley, K. Kissick, M. Belkacemi, J. Malley, (eds.)]. In press.
- Crovetto GM, Colombini S, 2017. Environmental impact of animal production. Perugia, June 16th, 2017 22nd Congress of A.S.P.A.
- Chen, L.; Bao, X.; Guo, G.;Huo, W.; Xu, Q.; Wang, C.; Li, Q.; Liu,Q. Effects of Hydrolysable Tannin with or without Condensed Tannin on Alfalfa Silage Fermentation Characteristics and In Vitro Ruminal Methane Production, Fermentation Patterns, and Microbiota. *Animals* 2021, 11, 1967. <https://doi.org/10.3390/ani11071967>
- L. R. Thompson and J. E. Rowntree *SUSTAINABILITY AND INTEGRATED SYSTEMS: Invited Review Invited Review: Methane sources, quantification and mitigation in grazing beef systems Applied Animal Science* 36:556–573 <https://doi.org/10.15232/aas.2019-01951>
- V. Vasta, M. Daghigho, A. Cappucci, A. Buccioni, A. Serra, C. Viti e M. Mele "Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches" *J. Dairy Sci.* 102:3781–3804 <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14985>

- Isaac A. Aboagye and Karen A. Beauchemin “Potential of Molecular Weight and Structure of Tannins to Reduce Methane Emissions from Ruminants: A Review.” *Animals* 2019, 9, 856; doi:10.3390/ani9110856
- Moate et al, 2014 “Grape marc reduces methane emissions when fed to dairy cows “ *J. Dairy Sci.* 97:5073–5087 <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7588>
- De Vivo, Roberto & Zicarelli, L.. (2021). Influence of carbon fixation on the mitigation of greenhouse gas emissions from livestock activities in Italy and the achievement of carbon neutrality. *Translational Animal Science.* 5. 10.1093/tas/txab042.
- S. Vigna, G. Baldi, R. Compiani, C. A. Sgoifo Ross “Carne bovina punti di forza e punti di debolezza del comparto” *INFORMATORE ZOOTECNICO* n.12 / 2013
- Adam Cieslak, Pawel Zmora, Emilia Pers-Kamczyc, Anna Stochmal, Anna Sadowinska, Abdelfattah Z.M. Salem, Dorota Kowalczyk, Piotr Zbonik & Malgorzata SzumacherStrabel (2014) Effects of Two Sources of Tannins ( *Quercus L.* and *VacciniumVitisIdaea L.*) on Rumen Microbial Fermentation: an *inVitro* Study, *Italian Journal of Animal Science*, 13:2, 3133, DOI: 10.4081/ijas.2014.3133

## 4. COOPERAZIONE

### 4.1 Progettazione e costituzione dell'aggregazione, motivazione della partecipazione di ogni componente (per le aggregazioni già costituite motivare la coerenza del partenariato in funzione della nuova attività intrapresa)

Il presente progetto prevede la costituzione di un' ATS ex-novo fra tutte le Unità Operative, aziende ed enti di ricerca, che apporteranno il proprio contributo alla realizzazione dello stesso. In particolare le aziende coinvolte nel progetto metteranno a disposizione i propri allevamenti e la propria esperienza nella gestione aziendale per avviare all'interno degli stessi, linee di alimentazione integrate con tannino; il mangimificio provvederà alla fornitura del mangime e alla relativa consulenza.

Di seguito sono elencate le Unità Operative con i principali ruoli svolti per la realizzazione del progetto.

Il ruolo di SO.CO.BE.V. SRL capofila del progetto, è quello di gestire gli animali interessati dalla ricerca, alimentandoli come da piano alimentare pianificato con l'azienda mangimistica, dovrà occuparsi della raccolta dei campioni e loro conservazione fino all'invio al laboratorio, alla raccolta dei dati produttivi degli animali coinvolti e condivisione con gli altri partner.

Il ruolo di Azienda Agricola Foliman è quello di gestire gli animali interessati dalla ricerca, alimentandoli come da piano alimentare pianificato con l'azienda mangimistica, dovrà occuparsi della raccolta dei campioni e loro conservazione fino all'invio al laboratorio, alla raccolta dei dati produttivi degli animali coinvolti e condivisione con gli altri partner.

Il ruolo di **COMAZOO scarl** è quello di formulare e realizzare del mangime opportunamente additivato con Tannini, di definire il piano di razionamento degli animali interessati alla sperimentazione e di coinvolgere le due aziende agricole allevamenti per l'ottimale gestione degli animali. Sarà inoltre coinvolto nella condivisione e diffusione dei risultati raggiunti.

Il ruolo dell'**Istituto Spallanzani (IS)**, coordinatore scientifico del progetto, sarà quello di caratterizzare nei campioni di feci forniti dalle aziende coinvolte la popolazione microbica. Tale attività prevede l'estrazione di DNA, la metabarcoding analisi per l'identificazione tassonomica dei microrganismi presenti tramite tecnologie NGS, sviluppo di saggi in real-time PCR appositamente sviluppati in laboratorio per la quantificazione delle popolazioni microbiche di interesse. Si occuperà dell'analisi dei dati e della diffusione dei risultati.

### 4.2 Gestione dei rapporti fra i partner

Partner di progetto sono quattro: **SO.CO.BE.V. SRL, Azienda Agricola Foliman, COMAZOO e Istituto Spallanzani.**

Ai fini di un corretto andamento non solo dei rapporti, ma anche del lavoro e per il rispetto delle tempistiche, verrà svolta un'efficace e costante attività di coordinamento scientifico e tecnico da parte dell'U.O. Istituto Spallanzani a cui afferisce la persona scelta dalla costituenda ATS come responsabile scientifico, **XXXX**

Il coordinamento avrà le seguenti funzioni:

1. coordinamento delle azioni orizzontali per le diverse attività di progetto e delle attività da realizzare in campo presso gli allevamenti bovini coinvolti e presso l'azienda mangimistica;
2. stesura degli stati di avanzamento;
3. verifica dei risultati ottenuti soprattutto in chiave applicativa, rilevamento di eventuali esigenze di modifica/completamento/integrazione delle attività.

#### **4.3 Monitoraggio dell'andamento del progetto: metodo adottato e strumenti (cronoprogramma, tempistiche, prodotti intermedi e reportistica)**

Al fine di assicurare il collegamento fra i Partner e i consulenti e poter verificare il regolare svolgimento dell'attività, nonché il raggiungimento dei risultati ipotizzati, verranno effettuate almeno tre riunioni di coordinamento: all'avvio, a metà ed al termine del progetto. I partner coinvolti nel progetto e i consulenti esterni dovranno fornire al soggetto scelto dalla costituenda ATS come "coordinatore", Istituto Spallanzani, un breve stato di aggiornamento ogni quattro mesi, al fine di garantire un costante monitoraggio del *timing* progettuale e della rapida identificazione di problematiche operative.

##### **Prodotti concreti**

- *Report Stato di avanzamento*
- *Stima dell'effetto del tannino sulla comunità enterica metanogenica*
- *Sviluppo di un protocollo real-time a basso costo per un servizio di monitoraggio aziendale per la quantificazione delle comunità metanogeniche*
- *Sviluppo di un piano alimentare impattante sul microbioma intestinale per ridurre le emissioni di gas metano degli allevamenti*
- *Riconoscimento di allevamento a minor impatto ambientale: sviluppo di un processo di promozione delle aziende con riduzione di emissioni*
- *la divulgazione dei dati ottenuti nei circuiti del settore attraverso seminari e/o workshop in: fiere, pubblicazione su riviste divulgative e su riviste scientifiche di impatto nazionale e internazionale*

##### *Cronoprogramma per il monitoraggio dell'andamento progetto*

|  | 0 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 |
|--|---|---|---|----|----|----|----|
| <i>Report</i>  | X |   |   | X  |    |    | X  |
| <i>Stima dell'effetto del tannino sulla comunità enterica metanogenica</i>   |   |   |   |    |    | X  | X  |
| <i>Sviluppo di un protocollo real-time a basso costo per un servizio di monitoraggio aziendale per la quantificazione delle comunità metanogeniche</i> |   |   |   |    |    | X  |    |
| <i>Sviluppo di un piano alimentare impattante sul microbioma intestinale per ridurre le emissioni di gas metano degli allevamenti</i>                  |   |   |   |    |    | X  | X  |
| <i>Riconoscimento di allevamento a minor impatto ambientale: sviluppo di un processo di promozione delle aziende con riduzione di emissioni</i>        |   |   |   |    |    | X  | X  |
| <i>Divulgazione dei risultati</i>  |   | X |   |    | X  |    | X  |

## **5. RICADUTA E DESTINATARI DEI RISULTATI**

### **5.1 Destinatari dei prodotti del progetto**

I primi destinatari del progetto sono le due aziende coinvolte, che già in fase di svolgimento del progetto, saranno costantemente informati e aggiornati sull'andamento dei risultati delle prove analitiche condotte in laboratorio per un'analisi incrociata con quanto avviene in campo.

In generale però tutta la filiera zootecnica può essere destinataria della ricerca, sia che interessi la produzione di carne, come le aziende direttamente coinvolte, che la produzione di latte.

Il comparto agro zootecnico gioca un ruolo fondamentale nell'economia globale e il futuro di questi settori è fortemente condizionato dalla loro abilità a dimostrare il loro impegno in termini di impatto ecologico ed ambientale e l'utilizzo di applicativi innovativi che spingono in questa direzione possono sicuramente cambiare anche l'immagine distorta che la collettività si è fatta della zootecnia intensiva. Indirettamente quindi anche il consumatore finale risulta essere il destinatario di tale ricerca proprio perchè accompagnato ad una nuova presa di coscienza dell'impegno che questo settore vuole prendersi nei confronti dell'impatto ambientale attraverso scelte di gestione aziendale diversificate tra cui l'utilizzo anche di un alimento appositamente studiato per lo scopo.

### **5.2 Utilità, applicabilità, immediatezza di fruibilità dei risultati**

I risultati in termini di conoscenza della composizione della popolazione microbica caratterizzante i campioni di feci saranno fruibili dagli allevatori di bovini subito al termine del progetto, in quanto all'interno dello stesso è prevista la fase di test e di validazione dei risultati ottenuti.

Le attività previste presentano, infatti, un forte carattere applicativo assicurato anche dalla partecipazione diretta degli allevatori. Questo consentirà di mettere a punto e valutare le metodologie e i prodotti direttamente "sul campo", gli animali saranno costantemente tenuti sotto osservazione dal personale esperto incaricato che potrà registrare eventuali scostamenti dalla normalità, nel rispetto inoltre del mantenimento della condizione di benessere animale.

I risultati della ricerca saranno utili alla filiera che grazie all'attività di divulgazione e informazione prevista dal progetto potrà far conoscere all'opinione pubblica e quindi ai potenziali consumatori l'impegno profuso per la riduzione dell'impatto ambientale della zootecnia dando così al proprio prodotto finale un ulteriore valore aggiunto.

### **5.3 Tempi e modalità di utilizzo dei risultati**

Entro 24 mesi dalla data di inizio del progetto i risultati saranno già utilizzabili da tutti gli allevatori di bovine da carne. La componente scientifica del partenariato (IS) utilizzerà tali risultati unicamente per scopi scientifici; mentre le aziende coinvolte nel progetto si impegneranno per un trasferimento reale e capillare alla filiera.

### **5.4 Benefici attesi**

Il risultato principale del progetto sarà la verifica in campo attraverso l'utilizzo di strumenti di biologia molecolare, di quanto la ricerca scientifica sta già portando in evidenza con numerose sperimentazioni, condotte spesso essenzialmente in vitro, riguardo all'utilizzo di diverse strategie alimentari finalizzate al contenimento della metanogenesi ruminale.

Nello specifico di questo studio condotto su bovini da carne la scelta è ricaduta sull'utilizzo di un integratore naturale il tannino derivato dal castagno, sostanza caratterizzata da polifenoli sia concentrati che idrolizzati che modulando l'attività della popolazione microbica dell'apparato gastro-intestinale dei ruminanti, nello specifico degli archea batteri, direzionano in modo diverso la produzione di metano.

Se i risultati ottenuti attraverso l'indagine e la caratterizzazione della popolazione microbica, isolata nei campioni di feci di animali alimentati con integrazione con tannino, confermano un cambiamento della componente coinvolta nel processo metanogenico (archea batteri) rispetto agli animali di controllo, sarà possibile offrire agli allevatori delle linee guida per l'applicazione di un piano alimentare che porti ad una riduzione del loro impatto ambientale. A questo sarà possibile associare l'impiego di un protocollo molecolare rapido ed economico che permetta di monitorare in tempi brevi l'andamento della popolazione microbica fecale.

Quindi le scelte virtuose di pochi possono avere ripercussioni sull'intera filiera produttiva permettendo l'ottenimento di un miglior riconoscimento del prodotto, che in questo modo può vedersi riconosciuto un maggiore valore economico. Le ricadute sul settore bovino potranno essere non di poca importanza se si considera che ormai da anni, nonostante l'importanza economica che esso rappresenta, soffre di forti perdite economiche per gli operatori che non si vedono riconosciuto adeguatamente l'impegno profuso e, soprattutto, è oggetto di una mistificazione che ha fatto sì che nell'immaginario collettivo gli allevamenti intensivi fossero visti come i principali responsabili del problema gas serra.

## **6. DESCRIZIONE ANALITICA DEL PROGETTO E PIANO DI ATTIVITÀ**

### **6.1 Metodo adottato e piano di lavoro**

Lo scopo della ricerca è la caratterizzazione del microbioma di 60 animali presenti nelle due aziende coinvolte nel progetto, il raggiungimento di questo obiettivo verrà svolto mediante le attività sotto elencate :

1. Coordinamento
2. Formulazione Mangime e piano alimentare
3. Somministrazione sperimentale dell'alimento additivato e gestione della stalla
4. Raccolta campioni e dati produttivi nelle due aziende coinvolte
5. Estrazione del DNA dai campioni raccolti ,Sequenziamento del DNA mediante un approccio metabarcoding di next generation
6. Analisi bioinformatica per la classificazione/assegnazione tassonomica dei microrganismi presenti nel microbioma
7. Diffusione Risultati

Il piano di lavoro per la realizzazione del disegno sperimentale si sviluppa nelle seguenti attività.

#### ***1. Coordinamento***

L'attività di coordinamento verrà gestita dall'U.O. IS a cui afferisce il responsabile scientifico del progetto, xxxxx, come concordato con l'Azienda capofila SO.CO.BE.V. SRL, che invece si occuperà della gestione amministrativa come previsto dal progetto.

Il coordinamento avrà le seguenti funzioni:

- coordinamento delle azioni orizzontali per le diverse attività di progetto e delle attività da realizzare in azienda;
- stesura degli stati di avanzamento;
- verifica dei risultati ottenuti, soprattutto in chiave applicativa, e rilevamento di eventuali esigenze di completamento e/o integrazione con altri progetti.

#### ***2. Formulazione Mangime e piano alimentare***

L'attività di formulazione del mangime e del piano alimentare verrà gestita dall'U.O. Comazoo che provvederà a formulare le migliori soluzioni nutrizionali sia del mangime complementare che verrà somministrato sia della razione in greppia, ovvero integrata con i foraggi e le materie prime aziendali. Grazie ai dati derivanti dal laboratorio analisi di Comazoo, riferiti sia alle materie prime di composizione del mangime sia ai prodotti aziendali sarà possibile gestire piani alimentari specifici per categoria produttiva con sistemi di razionamento dinamici e quindi conoscerne nel dettaglio la componente nutrizionale. Comazoo garantirà inoltre la standardizzazione della formulazione del mangime controllo e trattato.

#### ***3. Somministrazione sperimentale dell'alimento additivato e gestione della stalla***



L'alimento viene distribuito nella greppia dove si cibano gli animali tramite l'utilizzo di un carro miscelatore. La stalla è suddivisa in due corsie destinate ai bovini, una su grigliato e l'altra su lettiera a paglia.

#### **4. Raccolta campioni e dati produttivi nelle due aziende coinvolte**

Durante tutto il periodo della sperimentazione verranno prelevati ad opera degli incaricati delle aziende coinvolte i campioni di feci. Il primo campionamento verrà eseguito il giorno dell'inizio della somministrazione della alimentazione da testare per fare una fotografia della situazione iniziale, a seguire, trascorso il periodo di adattamento degli animali, è previsto un campionamento a intervalli di 15 gg per i 90 gg di durata del trattamento. Il giorno del campionamento, ad orari concordati con le aziende, verranno fatti più prelievi del materiale fecale per ciascun box interessato, sia per gli animali trattati che per i controlli. I campioni verranno conservati refrigerati e trasferiti al laboratorio di Genetica Molecolare presso UO IS per le successive analisi. Contestualmente alla raccolta dei campioni verranno registrate le informazioni relative alla gestione degli animali, quali accrescimenti, cali ponderali, patologie ecc.

#### **5. Estrazione del DNA dai campioni raccolti, Sequenziamento del DNA mediante un approccio metabarcoding di next generation**

L'attività del Laboratorio di Genetica molecolare prevede l'estrazione del DNA microbico dai campioni di feci mediante protocolli appositamente scelti per la tipologia di campione, prove preliminari di estrazione verranno fatte su Kit commerciali per adattarli alle esigenze operative interne. Il Dna estratto dovrà essere verificato per quantità e qualità attraverso uno spettrofotometro per modulare la concentrazione dell'acido nucleico in funzione dell'applicazione biomolecolare successiva.

Gli approcci molecolari scelti per indagare la popolazione microbica isolata nei campioni sono di due tipi: un saggio di Real Time PCR che ci permetterà di quantificare le diverse popolazioni che compongono il pool microbico attraverso l'interrogazione di frammenti specifici, NGS (NextGeneration Sequence) con Metabarcoding che prevedono il sequenziamento mirato per porzioni specifiche (target) anche di piccole dimensioni, al fine di ottenere informazioni tassonomiche sui ceppi presenti.

#### **6. Analisi bioinformatica per la classificazione/assegnazione tassonomica dei microrganismo presenti nel microbioma**

In natura i microrganismi esistono in comunità molto complesse costituiti quindi da molte specie che interagiscono con loro, questo è ciò che accade anche nei campioni di feci che stiamo indagando. L'analisi di metagenomica fornirà quindi moltissime informazioni relative a questa complessa comunità che dovranno essere analizzate mediante strumenti bioinformatici quali: database per gli allineamenti delle sequenze e per poter fare l'assegnazione tassonomica, quindi il riconoscimento sulla base della sequenza del ceppo identificato, associato ad un studio di biodiversità mediante indici appositi che permetteranno di mettere in relazione le diverse specie contenute in ogni campione.

#### **7. Diffusione Risultati**

Come specificato nel capitolo 8 PROGRAMMA DI DIFFUSIONE DEI RISULTATI DEL PROGETTO

## 6.2 Dotazioni disponibili

Comazoo:

*IS : Laboratorio Genetica Molecolare: 2 Sequenziatori (3130 xl e 3500 Genetic Analyzer) 7500 Fast Real Time PCR, 4 termociclatori,, apparati per elettroforesi, Bioanalyzer .*

## 6.3 Tempistica delle attività, descrizione dettagliata delle singole fasi, delle azioni e dei prodotti di ogni singola fase

Le 7 TASK sopra richiamate, le cui attività sono state dettagliate nel precedente paragrafo 6.1, vengono di seguito articolate in un diagramma per evidenziare le tempistiche di realizzazione e i prodotti per singola fase, come indicato nel paragrafo 3.4 “Prodotti del progetto”.

| Fasi | Attività  | Prodotti concreti   | M1<br>-<br>M3 | M4<br>-<br>M6 | M7<br>-<br>M9 | M10<br>-<br>M12 | M13<br>-<br>M15 | M16<br>-<br>M18 | M19<br>-<br>M21 | M22<br>-<br>M24 |
|------|---|---|---------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1    | Coordinamento   | Monitoraggio progetto e riunioni [R] coordinamento        | R             |               |               | R               |                 |                 | R               | R               |
| 2    | Formulazione Mangime e piano alimentare   | Mangime   |               |               |               |                 |                 |                 |                 |                 |
| 3    | Somministrazione sperimentale dell'alimento additivato e gestione della stalla  |   |               |               |               |                 |                 |                 |                 |                 |
| 4    | Raccolta campioni e dati produttivi nelle due aziende coinvolte   | Recupero campioni e dati                                  |               |               |               |                 |                 |                 |                 |                 |
| 5    | Estrazione del DNA dai campioni raccolti, Sequenziamento del DNA mediante un approccio metabarcoding di next generation | Dati analitici  |               |               |               |                 |                 |                 |                 |                 |
| 6    | Analisi bioinformatica per la classificazione/assegnazione tassonomica dei microrganismi presenti nel microbioma        | Report Analitici  |               |               |               |                 |                 |                 |                 |                 |
| 7    | Divulgazione dei risultati  | Eventi, brochure, roll-up, pubblicazioni, pagina sito web |               |               |               |                 |                 |                 |                 |                 |

## 6.4 Compiti e responsabilità di ogni partner, fino al dettaglio di ogni soggetto coinvolto nel progetto (con nome e cognome), come da tabella seguente:

Di seguito sono riportate 4 tabelle, una per ciascuna U.O: con indicato in maniera dettagliata i compiti e le rispettive responsabilità come richiesto da paragrafo 6.4.

## **7. IMPIANTO PILOTA/PROTOTIPO**

Non previsto

### **8.1 Definizione dei risultati oggetto della diffusione**

I principali risultati che ci si aspetta di ottenere dalla diffusione dei dati del presente progetto riguardano:

- la conoscenza degli effetti del tannino sull'attività metanogenica del microbiota dei bovini;
- il miglioramento dell'economicità, della redditività e della capacità competitiva per le aziende che intendono differenziarsi con una strategia alimentare "low carbon"
- una sensibilizzazione dei consumatori verso un prodotto carne sempre più rispettoso della sostenibilità ambientale

### **8.2 Individuazione dei destinatari dell'attività di trasferimento**

I destinatari del trasferimento delle conoscenze saranno non solo agli operatori di settore (allevatori), ma anche altri soggetti coinvolti negli anelli più a valle della filiera carne, quali gli esportatori ed i consumatori.

Si prevedono una serie di iniziative di disseminazione e divulgazione quali:

- organizzazione di workshop e convegni *ad hoc*;
- presentazione del progetto e dei risultati in giornate dedicate alla promozione dei prodotti del territorio a livello locale e regionale;
- realizzazione di momenti di incontro specifici (con le diverse parti della filiera) nell'ambito di eventi di ampio respiro per raggiungere il maggior numero di potenziali soggetti interessati;
- pubblicazione sul sito delle unità operative, direttamente coinvolte nel progetto, dei risultati di maggiore rilevanza e delle iniziative organizzate

Per la promozione e divulgazione dei risultati si prevedono stampe di Brochure progetto, cartelline porta documenti, Roll up di progetto (da utilizzare per conferenze stampa e altro).

### **8.3 Definizione delle tempistiche e dei mezzi di comunicazione (strumenti/canali, all'interno dell'aggregazione e all'esterno con gli altri soggetti individuati)**

La tematica trattata è direttamente collegata a tutta la filiera "bovini da carne" della Lombardia ma anche alla filiera del latte, dunque, l'ampiezza divulgativa sarà la massima possibile. I risultati più innovativi del progetto saranno oggetto di una serie di incontri di formazione e saranno inseriti in un pieghevole con lo scopo di diffondere nella pratica le informazioni "aggiuntive" rispetto a quanto già conosciuto a livello tecnico-scientifico.