

## **Utilizzo di microrganismi benefici e di zeolititi per l'alimentazione e la difesa di animali da reddito.**

Dott. D. Prisa

Dottore in Biotecnologie Agro-Industriali spec. Vegetali e Microbiche, P.H.D. in Crop Science Production all'Università di Pisa, esperto in substrati organici e inorganici innovativi, agricoltura biologica, microrganismi per agricoltura, zootecnia, e depurazione suolo/acqua, post-harvest. Collaboratore di ricerca al CRA-VIV di Pescia (PT)

e-mail: [domenico.prisa@entecra.it](mailto:domenico.prisa@entecra.it)

Tel 339 1062935

Per microrganismi benefici o probiotici, s'intendono "microrganismi specifici, vitali capaci di influenzare la microflora mediante impianto o colonizzazione in un distretto dell'ospite e di esercitare in tal modo un effetto benefico sulla salute". (Schrezenmeir J., de Vrese M., 2001) In campo zootecnico, i probiotici sono usati da diversi decenni allo scopo di migliorare le performances produttive degli animali; l'attenzione su questi microrganismi è aumentata negli ultimi anni anche per effetto del divieto di utilizzo di antibiotici a scopo auxinico nelle produzioni animali, introdotto dal Regolamento CE 1831/2003. Gli effetti positivi noti riguardano l'efficienza di utilizzo dei nutrienti, l'incremento ponderale, la qualità delle produzioni ed il benessere animale (SCAN, 2000). I probiotici contribuiscono al mantenimento di una microflora enterica ottimale per l'assorbimento delle sostanze nutritive (Guarner F., Malagelada J.R., 2003) ed esercitano un'azione antagonista nei confronti di microrganismi patogeni che possono influire negativamente sullo stato di salute intestinale degli animali. È noto infatti che un ottimale stato fisiologico della mucosa gastroenterica porta ad una migliore capacità di assimilazione dei nutrienti Rolfe R.D. (2000). Per spiegare queste attività sono stati suggeriti diversi meccanismi, quali la produzione di sostanze inibitrici, lo stimolo della risposta immunitaria, la competizione per il nutrimento e per i siti di adesione. La scelta di un probiotico deve tenere conto di diversi requisiti: il più importante è la sicurezza del prodotto nei confronti della salute umana ed animale (SCAN, 2003). L'EFSA ha proposto un'armonizzazione dei requisiti necessari per qualificare i microrganismi utilizzabili nel campo dell'alimentazione umana ed animale (QPS, Quality Presumption of Safety), ponendo l'accento sulla loro possibile patogenicità e sul potenziale trasferimento di geni di antibiotico-resistenza EFSA (2005). Inoltre, per un suo utilizzo ottimale, è necessario che il probiotico sia in grado di resistere alle condizioni presenti nell'apparato gastroenterico dell'organismo ospite (acidità gastrica, lisozima, sali biliari, enzimi digestivi) ed all'azione dei principali antibiotici utilizzati nella specie considerata. Diversi autori sostengono inoltre che la funzionalità di un probiotico sia massimizzata con la somministrazione di microrganismi isolati dal tratto gastroenterico di animali della medesima specie (Vanbelle M., et al., 1990). Va sottolineato che alcune proprietà probiotiche sono legate a specifici cloni microbici, in particolare per quanto riguarda la capacità di sopravvivenza dei microrganismi nel tratto gastrointestinale (Goldin B.R., 1998).

I microrganismi maggiormente impiegati a scopo probiotico negli animali e nell'uomo sono i LAB (Lactic Acid Bacteria), appartenenti principalmente ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*; meno frequentemente vengono utilizzati batteri dei generi *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, batteri sporigeni (*Sporolactobacillus* spp., *Brevibacillus* spp., *Bacillus* spp.) e lieviti (*Saccharomyces* spp.) (Anadón A., et al., 2006)

Per realizzare una produzione di probiotici economicamente sostenibile è necessario che i microrganismi possiedano alcune caratteristiche fondamentali: facilità di coltivazione, resistenza ai processi di liofilizzazione, mantenimento della vitalità e stabilità nelle diverse condizioni

tecnologiche e commerciali. Per tale motivo, l'utilizzo di batteri sporigeni appare particolarmente vantaggioso; la notevole resistenza tipica delle spore può tradursi infatti in una maggiore conservabilità delle preparazioni commerciali ed in una maggiore resistenza ai processi tecnologici come la pelletizzazione (Goldin B.R., 1998). In campo zootecnico diverse specie di bacilli vengono utilizzate sperimentalmente a scopo probiotico: *Bacillus subtilis*, *B. cereus* var. *toyoi*, *B. licheniformis* e *B. coagulans* risultano le più studiate. I settori maggiormente interessati sono quello suino ed avicolo, e con minore frequenza quello bovino. Gli esiti positivi ottenuti sono quantificabili in un aumento dell'incremento ponderale degli animali, un migliore indice di conversione alimentare, una maggiore produzione zootecnica (latte, uova), un'azione antagonista nei confronti della flora microbica indesiderata (per esempio *Escherichia coli*) e di conseguenza un'azione protettiva nei confronti delle patologie a carattere diarroico (minore frequenza, gravità e mortalità) (Hyronimus B. et al. 2000)

### **Meccanismi d'azione**

Gli effetti benefici dell'ingestione di probiotici sporigeni sono documentati in letteratura, ma il meccanismo attraverso cui essi vengono ottenuti non è stato ancora completamente chiarito; potrebbero essere attribuiti alle spore come tali oppure alle forme vegetative (Leser T.D., 2008). La definizione dell'azione probiotica degli sporigeni dipende dalla conoscenza del loro comportamento all'interno dell'apparato digerente dell'ospite, alcuni ricercatori, per spiegare l'efficacia di questi microrganismi, suggeriscono differenti meccanismi, non mutuamente esclusivi:

- Produzione di sostanze antimicrobiche, denominate batteriocine o BLIS (Bacteriocin-Like-Inhibitory-Substances):
- Attività metabolica: diverse specie di batteri sporigeni, indicati come SFLAB (Spore Forming Lactic Acid Bacteria), sono in grado di produrre acido L(+) lattico, utile ai fini della regolazione della microflora intestinale (Hyronimus B. et al. 2000).
- Esclusione competitiva (CE) nei confronti dei patogeni per quanto riguarda i siti recettoriali di adesione e l'assunzione di sostanze nutritive (Mazza P., 1994).
- Attività immunostimolante-immunomodulatrice sulla mucosa intestinale, operata dalle forme vegetative o dalle spore, grazie ad una interazione con il GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue). Gli autori concordano nell'affermare che gli sporigeni somministrati per via orale sono in grado di attraversare la barriera gastrica<sup>13,46</sup>; meno definito è invece il loro comportamento nell'ambiente intestinale. (Muscettola M. et al., 1992)

Una parte della comunità scientifica ritiene che gli sporigeni non germinino a livello intestinale; a conferma di tale teoria è stata osservata, in animali alimentati con razioni contenenti probiotici sporigeni, la rapida scomparsa delle spore dalle feci dopo la fine della somministrazione<sup>59</sup>. L'azione probiotica in questo caso dipenderebbe esclusivamente da una stimolazione del sistema immunitario. Tale stimolazione è inoltre considerata particolarmente efficiente poiché è stata ipotizzata la possibile colonizzazione di organi linfatici (placche di Peyer, linfonodi mesenterici, milza) da parte di spore traslocate attraverso le cellule M (componenti del GALT). Nei tessuti linfoidi, le spore possono essere in grado di germinare grazie alla presenza di condizioni più adatte rispetto a quelle intestinali. (Spinosa M.R., 2000) Ipotesi più recenti indicano invece la possibilità di un rapporto endosimbiotico degli sporigeni con l'ospite, con una sopravvivenza e proliferazione delle forme vegetative nel tratto gastrointestinale (Hong H.A., et al., 2005). Casula e Cutting (Casula G., Cutting S.M., 2002) hanno evidenziato forme vegetative di *B. subtilis* nel piccolo intestino (in particolare nel digiuno) dopo somministrazione di spore ai topi. Un comportamento simile è stato osservato da Jadamus e coll. (Jadamus A., et al., 2001)

per *B. cereus* var. *toyoi* nei suinetti. Leser e coll. (Leser T.D., et al., 2008), grazie all'utilizzo di membrane da dialisi, hanno rilevato la germinazione delle spore di *B. licheniformis* e *B. subtilis* nei diversi tratti dell'apparato gastrointestinale dei suini. A sostegno dell'ipotesi di germinazione vari autori segnalano, in alcuni soggetti, il recupero dalle feci di un numero di spore maggiore di quello

somministrato; anche i tempi di comparsa delle spore nei campioni fecali e di scomparsa alla fine della somministrazione, rilevati in diverse specie animali, sarebbero comunque compatibili con l'ipotesi di germinazione intestinale (Jadamus A., et al., 2001). È stata inoltre documentata la possibilità che specie di *Bacillus* spp., considerate strettamente aerobie, proliferino e producano batteriocine anche in condizioni di anaerobiosi.

Alla luce di queste osservazioni, si è quindi ipotizzata la possibilità che le spore, eventualmente "attivate" dal pH gastrico (Casula G., Cutting S.M., 2002, germinino nello stomaco e nel tenue (digiuno) e le forme vegetative vengano successivamente distrutte o sporifichino nei tratti inferiori dell'intestino, meno adatti alla sopravvivenza dei bacilli, forse per una condizione di maggiore anaerobiosi (Jadamus A., et al., 2001).

Va precisato che l'eventuale germinazione intestinale delle spore non porta necessariamente ad una colonizzazione della mucosa. Alcuni autori hanno comunque ipotizzato la possibilità di una colonizzazione della mucosa del tenue, grazie alla costituzione dello strato esterno della parete batterica, alla presenza di pili sulla superficie delle spore e/o alle condizioni di idrofobicità dei batteri. Inoltre, il clumping batterico e la capacità di formare un biofilm possono creare una nicchia temporanea protetta per la sopravvivenza dei microrganismi. In base a recenti studi, i bacilli già utilizzati a scopo probiotico in campo zootecnico (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* var. *toyoii*), anche se germinati nel tratto gastroenterico, rimarrebbero sotto forma di cellula vegetativa solo per brevi periodi, comportandosi così da microrganismi transienti. Questo fa supporre che la germinazione non sia un requisito essenziale perché si verifichi l'azione probiotica. (Probert H.M., Gibson G.R., 2002).

### **Utilizzo di microrganismi EM (microrganismi benefici) per valutare il tasso di crescita, di diarrea e colonizzazione microbica dell'intestino di suini.**

Lo studio è stato condotto per valutare gli effetti degli EM (81 ceppi di microrganismi costituiti principalmente da Lieviti, Lattobacilli, Batteri della fotosintesi, Attinomiceti e Batteri fermentanti) sulla performance di crescita, tasso di diarrea e di sviluppo microbico nell'intestino di suini. Sono stati utilizzati 45 maialini neri svezzati, divisi in tre gruppi. Gli EM (microorganisms effective) sono stati aggiunti alla dieta base dei maiali, in ragione dello 0,1% (gruppo 1) e 0,2% (gruppo 2), insieme al gruppo di controllo (alimentati normalmente) e sono stati suddivisi in ripetizioni da 5 animali. L'intero esperimento è durato 21 giorni. La prova ha mostrato risultati significativi, infatti il guadagno quotidiano in peso del gruppo 1 e del gruppo 2 è stato rispettivamente del 12,9% e del 22,5% a confronto del gruppo di controllo (P0.05). Il rapporto alimentazione-carne nel gruppo 1 e nel gruppo 2 è diminuito significativamente del 7,87% (P0.05) e del 4,49% (P0.05) rispetto al gruppo di controllo, con conseguente risparmio sulle razioni alimentari e un incremento della qualità della carne. Al giorno 14°, il numero di *Escherichia coli* nel gruppo 1 e nel gruppo 2 era 5,87% e 7,02%, significativamente inferiore rispetto al gruppo di controllo. Al 21° giorno, il numero di lattobacilli nel gruppo 1 e nel gruppo 2 era 4,18% e 4,79% superiore al gruppo di controllo (P0.05) mentre il numero di *Escherichia coli* del 6,68% e 7,84% inferiore.

Il livello IgG nel gruppo 1 e nel gruppo 2 è aumentato significativamente del 18,5% e del 22,4% rispetto al gruppo di controllo (P0.05). Il contenuto di proteine è aumentato invece del 9,46% e del 7,21%, mentre l'urea è diminuita del 22,9% e del 25,1% rispetto al gruppo di controllo.

Le attività delle proteasi nei trattati sono aumentate del 84,0% e del 99,3%, mentre le amilasi sono diminuite del 3,98% e il 7,65%.

I dati sperimentali dimostrano che l'utilizzo di questi microrganismi può ridurre in maniera significativa il tasso di diarrea, migliorare le performance di crescita, incrementare la popolazione microbica e la funzione immunitaria dei suini svezzati.

Studi effettuati inoltre sull'isolamento di lattobacilli all'interno di intestini di bovini e capre, hanno dimostrato che l'utilizzo di *Lactobacillus lactis*, può grazie alla sua capacità di acidificare i mezzi incrementare le capacità di assorbimento di sostanze nutritive da parte degli animali.

### **Utilizzo di microrganismi probiotici su bovini**

Per i bovini la somministrazione di probiotici, se somministrati in quantità adeguata, può conferire un beneficio alla salute dell'ospite (FAO/WHO, 2001; Holzapfel et al., 1998). Nei test effettuati, i microrganismi benefici infatti, hanno influenzato positivamente l'equilibrio microbico intestinale grazie alla produzione di acidi organici che possono ridurre il pH dell'intestino inibendo la crescita di batteri indesiderati, e favorire la colonizzazione dell'apparato digerente da parte della microflora autoctona inibendo la crescita di microrganismi potenzialmente patogeni. La loro abilità nell'aderire agli enterociti impedisce l'adesione dei patogeni enterici. Inoltre possono neutralizzare la produzione di enterotossine, migliorare la capacità digestiva e di assorbimento, potenziare le difese immunitarie attraverso un'attività di immunostimolazione (Buddington et al., 2001) con aumento della sintesi di IgA (Fuller, 1990). In sostanza i ceppi probiotici sono quelli che agiscono come "riequilibratori" intestinali, stante la loro effettiva capacità di inibire la colonizzazione dei germi intestinali putrefattivi, infiammatori e patogeni e di sostituirsi ad essi in ambito gastrointestinale (De Vrese et al., 2007). Da tale riequilibrio nasce tutta una serie di benefici a ricaduta tipica dei probiotici, purché siano somministrati in quantità adeguata e per il tempo dovuto.

Il mantenimento dell'equilibrio a livello intestinale è una problematica che può risultare ancor più sentita in alcune forme di allevamento come quella del vitello a carne bianca in cui per i regimi alimentari a cui gli animali sono sottoposti e per la gestione degli stessi, l'integrazione della dieta con probiotici può risultare ancor più interessante. Il vitello a carne bianca, durante le prime settimane di vita, è soggetto a microrganismi patogeni gastro-intestinali che colonizzando lo stomaco e l'intestino possono creare problemi alla funzionalità digestiva, alla produttività e alla sicurezza sanitaria delle carni macellate (Timmerman et al., 2005). Le cause delle disbiosi sono da ricercarsi nelle condizioni di allevamento, di alimentazione ma anche nell'utilizzo di antibiotici a scopo terapeutico nella comune pratica zootecnica.

Tradizionalmente nell'allevamento dei vitelli a carne bianca si utilizzano principalmente lattobacilli e bifidobatteri, i quali, quando somministrati in sufficienti quantità, manifestano un impatto positivo sulla salute (Brooks et al., 2001).

Questi microrganismi trovano anche particolare applicazione nel prevenire o comunque limitare i sintomi dello stress da svezzamento: si tratta di una sindrome patologica definita, nota per la sua influenza sulla stabilità dell'ecosistema microbico. Va osservato che la letteratura attuale riferisce in merito ai favorevoli benefici dell'impiego dei probiotici soltanto in animali più giovani, più facilmente esposti agli stress ambientali e nutrizionali.

La selezione di ceppi lattici naturalmente residenti nel canale digerente dei vitelli a carne bianca permette di potenziare l'effetto barriera nei confronti dei batteri patogeni, proteggendo in questo modo la mucosa intestinale dalle infezioni. L'aggiunta di probiotici consente un più corretto sviluppo della flora microbica intestinale; ne risulta un migliore stato di "gut health" (sanità della mucosa gastro-enterica), che porta di conseguenza ad una migliore capacità di assimilazione dei nutrienti (Giardini e Villa, 2007).

Lo scopo generale che si vuole ottenere con la probiosi nei vitelli è il mantenimento di una buona igiene digestiva del vitello, che si ripercuote positivamente sullo stato di salute intestinale e generale. In particolare si riducono l'incidenza, la gravità e la durata degli episodi diarroici e talvolta dei problemi respiratori (Timmerman et al., 2005), con conseguente diminuzione dei trattamenti antibiotici.

Prove effettuate su animali a cui è stato somministrato un mix di lattobacilli sono risultati essere molto più pesanti rispetto agli animali del gruppo Controllo, facendo registrare un maggior incremento ponderale medio giornaliero, senza grosse variazioni del metabolismo in termini di contenuto di glucosio, acidi grassi non esterificati (NEFA), GGT ed urea nel sangue.

La protidemia totale è aumentata per gli animali del gruppo probiotici rispetto al Controllo. I dati registrati al macello hanno evidenziato un maggiore peso vivo e delle carcasse del gruppo probiotici rispetto al gruppo Controllo, in linea con i dati riportati da Denoyelle et al. (1999).

I risultati sulla qualità della carne hanno permesso di evidenziare come la muscolatura del gruppo *Lactobacillus* sia più luminosa e meno rossa rispetto agli altri due gruppi sia per la punta di petto che per il *Rectus abdominis* in linea con i valori presentati da Klont et al. (1999) Si è osservata, analizzando l'andamento dell'intera sperimentazione, una carica di *E. coli* significativamente più bassa nel gruppo probiotici ( $P < 0.05$ ) e il gruppo Controllo ( $P < 0.01$ ).

Il gruppo probiotici in tutto il periodo ha mostrato una microflora intestinale più in equilibrio, con un rapporto batteri lattici/*Escherichia coli* sempre favorevole.

Ciò conferma comunque quanto già osservato da Timmerman et al. (2005), ovvero la minor richiesta di trattamenti contro patologie gastroenteriche e respiratorie in vitelli ai quali erano state somministrate miscele probiotiche. In letteratura sono presenti inoltre altri studi, soprattutto nel campo della medicina umana, che confermano una diminuzione della necessità di trattamenti antibiotici contro le affezioni respiratorie in bambini trattati con probiotici (Saavedra et al., 2004), sono riportate anche sperimentazioni effettuate su cavie da laboratorio alle quali sono state indotte affezioni polmonari poi trattate con probiotici (Racedo et al., 2006).

### **Utilizzo delle zeoliti in zootecnia**

La zootecnia moderna mira sempre di più a raggiungere livelli produttivi, quantitativamente e qualitativamente sempre maggiori. La moderna tecnologia consente di disporre di prodotti sempre meglio formulati e con caratteristiche ottimali di appetibilità, digeribilità e conservabilità. In questi ultimi anni in campo zootecnico vengono utilizzati diversi composti inorganici in grado di migliorare le prestazioni e lo stato di salute degli animali. Tali sostanze che possono essere incorporate nei mangimi o impiegate direttamente negli ambienti di allevamento, comprendono diversi tipi di argille che possono essere divise in due gruppi:

- I Fillosilicati (comprendenti le bentoniti, le caoliniti e le sepioliti) che hanno una struttura lamellare e i tectosilicati (comprendenti le zeoliti) che possiedono una struttura tridimensionale (Wolter et al., 1990).

Le zeoliti sono strutturalmente diversificate, infatti esistono giacimenti di tipo roccioso e di tipo tufaceo. E' da notare che la roccia ed il minerale che essa contiene sono indicati con lo stesso nome di zeolite, mentre in realtà la roccia madre contiene, oltre ai minerali zeolitici, anche altri composti come feldspati, calcite, rulite, apatiti, illite, ecc. La roccia poi può contenere una sola o più specie zeolitiche, ed il contenuto può variare da poche unità percentuali fino al 90%. Per una corretta utilizzazione delle zeoliti è quindi necessario conoscere la purezza della roccia e la sua composizione in materiali zeolitici (Mumpton, 1983).

L'inserimento di zeoliti nella dieta animale risulta interessante in quanto queste sarebbero in grado di favorire alcuni processi digestivi migliorando quindi le performances produttive degli animali. Per quello che riguarda i monogastrici l'integrazione con zeoliti nelle razioni favorirebbe l'assorbimento intestinale attraverso: la rimozione dell'acqua in eccesso dal tubo digerente, la modificazione del Ph del mezzo e la stimolazione dell'attività dell'epitelio ciliato.

Numerosi autori concordano nell'attribuire alle zeoliti una elevata capacità di assorbire, nel tratto intestinale, l'ammoniaca ed i prodotti tossici derivanti dai processi di deaminazione e di degradazione batterica, agendo quindi con un'azione di tipo detossificante (Avallone et al., 1987).

L'impiego delle zeolititi nei ruminanti risulta interessante anche in considerazione del benefico effetto sulle fermentazioni ruminali determinato dall'elevata capacità di scambio cationico di questi minerali; essa agirebbe soprattutto nei confronti dello ione ammonio (White e OhlRrogge, 1974).

Fra i composti sui quali si focalizzata l'attenzione dei ricercatori ricordiamo la clinoptilolite e la chabasite, minerali innocui, sia per la salute animale, sia per quella dell'uomo, senza peraltro porre problemi per l'ambiente una volta escreti. L'impiego delle zeolititi naturali in genere, nell'allevamento bovino è legato alle proprietà fisico chimiche, ed in particolare alla capacità di scambio ionico, di questo minerale. Da esperimenti effettuati sia in vivo che in vitro, si è dimostrato che le zeolititi, sarebbero in grado di legare fino al 15% dello ione ammonio presente nel rumine e successivamente di rilasciarlo in maniera graduale, permettendo quindi alla flora ruminale di sintetizzare proteine microbiche con maggiore continuità (White e OHLRogge, 1974).

Per quanto riguarda i bovini all'ingrasso, numerosi ricercatori riconoscono che tali sostanze promuovono le performances produttive soprattutto nei bovini in accrescimento. Kondo et al. (1969), impiegando nella dieta di vitelli il 5% di zeolitite fino a sei mesi di età, hanno riscontrato maggiori accrescimenti del 20% rispetto ai controlli.

In uno studio effettuato su giovani manzi, l'impiego del 5% di zeolitite (clinoptilolite) ha elevato il contenuto in sostanza secca delle feci (SWENEY et al., 1983). In una prova condotta su 67 vitelloni all'ingrasso sono stati studiati gli effetti della zeolitite su alcuni parametri del metabolismo azotato e su quello ruminale dei carboidrati. Negli animali trattati, sottoposti all'integrazione dai 200 fino ai 420 Kg di peso vivo, sono aumentati la ritenzione giornaliera di azoto, la concentrazione di acidi grassi volatili e sono diminuiti l'azoto urinario e l'ammoniaca (Strzetelski et al., 1988).

Effetti positivi dell'uso di zeolitite sono stati riscontrati in altre ricerche su vitelli neonati. L'impiego nella dieta di zeolitite ha comportato l'incremento della concentrazione delle immunoglobuline sieriche, di proteine totali, dei valori delle sieralbumine, del ferro e dell'emoglobina (VRZGULA, 1987).

L'efficacia della zeolitite nel ridurre l'assorbimento di micotossine è stata dimostrata in una ricerca svolta su vacche in lattazione: l'aggiunta di zeolitite in ragione dello 0,5-1% della razione ad una dieta contenente aflatossine (200µg/Kg) ha determinato un abbassamento del livello delle stesse aflatossine nel latte da 1.85 µg/L a 0.44 µg/L (Harvey et. Al, 1991).

Importante sembra quindi la combinazione microrganismi benefici (lattobacilli, lieviti), insieme all'utilizzo delle zeoliti, per incrementare l'assorbimento dei nutrienti da parte degli animali, incrementare le difese immunitarie degli stessi, riduzione della comparsa di malattie e maggiore pulizia dell'acqua e degli ambienti di stoccaggio dei mangimi e delle stalle.

## **Bibliografia**

Anadón A., Martínez - Larrañaga M.R.M., Martínez M.A. (2006) Probiotics for animal nutrition in the European Union Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45: 91-95.

Avallone L. , Mellone C., Guarini R., Pizzuti G.P., Piccolo V., D'angelo A. (1987). Digestibility and nitrogen balance in rabbits fed on diets with different amounts of fibre and zeolite. *Società italiana Biologia Sperimentale*. 63 (6), 451-458.

Brooks & coll. (2001). Liquid feed of pigs: potential for reducing environmental impact and for improving productivity and food safety. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*, 13, 49-63.

Buddington R.K., Piva A., Bach Knudsen K.E., Lindberg J.E. (eds. 2001) The use of nondigestible oligosaccharides to manage the gastrointestinal ecosystem: Gut environment of pigs. Nottingham

University Press, Nottingham, UK pag. 137-147

Casula G., Cutting S.M. (2002) Bacillus probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. Applied and Environmental Microbiology, 68(5): 2344-2352

Denoyelle C., Berny F. (1999). Objective measurement of veal color for classification purposes. Meat Science 53, 203-209.

De Vrese M., Schrezenmeir J. (2007). Effects of probiotics and prebiotics. Journal of Nutrition, 137(suppl. 3S-II).

EFSA (2005) Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of micro-organisms used in feed/food and the production of feed/food additives. EFSA Journal, 226:1-12.

[FAO/WHO] Food and agriculture Organization/World Health Organization (2001). Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic acid Bacteria. Available from: [www.fao.org/es/ESN/food/foodandfoodprobioen.stm](http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfoodprobioen.stm).

Fuller R. (1990). Probiotics in men and animals. J. Appl. Bact., 66, 365-378.

Giardini A., Villa S. (2007). Il vitello parte meglio grazie ai probiotici. L'Allevatore Magazine 2, Area Tecnica.

Goldin B.R. (1998) Health benefits of probiotics. British Journal of Nutrition, 80: S203-S207.

Guarner F., Malagelada J.R. (2003) Gut flora in health and disease. The Lancet, 360: 512-519.

Harvey R.B., Phillips T.D., Ellis J.A., Kubena L.F., Huff W.E., Petersen D., 1991. Effect of aflatoxin on M1 residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin-contaminated diets of dairy cows. AM.J. Vet.Res., 52, 1556-9

Hyronimus B., Le Marrec C., Hadj Sassi A., Deschamps A. (2000) Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 61: 193-197

Holzappel W.H., Haberer P. & coll. (1998). Overview of gut flora and probiotics. Int J Food Microbiol, 4, 85-101.

Hong H.A., Duc L.H., Cutting S.M. (2005) The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiology Reviews, 29: 813-835

Jadamus A., Vahjen W., Simon O. (2001) Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. Archives of Animal Nutrition, 54: 1-17.

Klont R. E., Barnier V. M. H., Smulders F. J. M., Van Dijk A., Hoving-Bolink A. H., Eikelenboom G. (1999). Post-mortem variation in pH, temperature, and colour profiles of veal carcasses in relation to breed, blood haemoglobin content, and carcass characteristics. Meat Science 53, 195-202

- Leser T.D., Knarreborg A., Worm J. (2008) Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 1025-1033
- Mazza P. (1994) The use of *Bacillus subtilis* as an anti-diarrhoeal microorganism. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, 133: 3-18
- Mumpton F.A., 1983. The role of natural zeolites in agriculture aquaculture. *International Committee on natural zeolites*, 33-43.
- Muscettola M., Grasso G., Blach-Olszewska Z., Migliaccio P., Borghesi- Nicoletti C., Giarratana M., Gallo V.C. (1992) Effects of *Bacillus subtilis* spores on interferon production. *Pharmacological Research*, 26: 176-177
- Probert H.M., Gibson G.R. (2002). Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3: 23-27.
- Racedo S., Villena J., Medina M., Agüero G., Rodríguez V., Alvarez S. (2006). *Lactobacillus casei* administration reduces lung injuries in a *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Microbes and Infection* 8, 2359-2366.
- Reg. (CE) 22-9-2003 n. 1831/2003. Regolamento del Parlamento europeo e del Consiglio sugli additivi destinati all'alimentazione animale. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* 18 ottobre 2003, n. L 268.
- Rolfe R.D. (2000) The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*, 130 (Suppl.): 396S-402S.
- Timmerman H.M., Mulder L., Everts H., van Espen D.C., der Wal E., Klaassen G., Rouwers S.M.G., Hartemink R., Rombouts F.M., Beynen A.C. (2005). Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *J. Dairy Sci.* 88, 2154-2165.
- Saavedra J.M., Abi-Hanna A., Moore N., Yolken R.H. (2004). Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 261-267.
- SCAN (2000). Report of Scientific Committee on Animal Nutrition on the assessment under Directive 87/153/EEC of the efficacy of micro-organisms used as feed additives. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Animal Nutrition. Disponibile in [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out40\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out40_en.pdf).
- SCAN (2003) On a generic approach to the safety assessment of microorganisms used in feed/food and feed/food production. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Animal Nutrition. Disponibile in: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out125\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out125_en.pdf).
- Schrezenmeir J., de Vrese M. (2001). Probiotics, prebiotics and synbiotics- approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(suppl.): 361S-364S.
- Spinosa M.R., Braccini T., Ricca E., De Felice M., Morelli L., Pozzi G., Oggioni M.R. (2000) On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Research in Microbiology*, 151: 361-368.

Strzetelski J., Konarzewki A., Szarek j., Wolski j. (1988). Effect zeolite and smoke dust on performance and some indices of nitrogen and carbohydrate metabolism in fattening bulls. Nutr. Abstr. And Rew 58, 102 (abstr.).

Sweeney T.F., Cervantes A., Bull L.S., Hemken R.W., (1983). Effect of dietary clinoptilolite on digestion and rumen fermentation in steers. International Committee on natural zeolites. 177-188.

Tam N.K.M., Uyen N.Q., Hong H.A., Duc L.H., Hoa T.T., Serra C.R., Henriques A.O., Cutting S.M. (2006) The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. Journal of Bacteriology, 188: 2692-2700.

White J.L., Ohlrogge A.J, 1974. Ion-exchange materials to increase consumption of non-protein nitrogen in ruminants. Canad patent 186-195.

Wolter R., Dunoyer C., Henry N., Seegmuller S., 1990. Les argilles en alimentation animale interet general. Rec. Med. Vet. 166, 21-27

Vanbelle M., Teller E., Focant M. (1990) Probiotics in animal nutrition: a review. Archives of Animal Nutrition, 40: 543-567.

Vrzegula L., 1987. The effect of natural zeolite on the indices of the internal environment of calves during the first 15 days of postnatal development. Nutr.Abstr. and Rew 57, 312 (Abstr.).

