

I processi di acidificazione dei foraggi insilati

Dott. Isidoro Politi

(Ricevuto il 20 Maggio 1940)

Le ricerche compiute, in varie epoche e con differenti criteri sperimentali, sui processi fermentativi dei foraggi insilati, hanno condotto a conclusioni e ad ipotesi non concordanti in merito agli agenti che principalmente presiedono alla acidificazione dei foraggi medesimi. Da prima, e specialmente in base ai lavori di S. M. Babcock e H. L. Russell (1), si attribuì una grande importanza alle attività fisiologiche ed enzimatiche delle cellule vegetali, ritenendo queste come i principali agenti dell'acidificazione; ma poi, con l'accrescersi delle conoscenze sulle azioni microbiche del silaggio, l'opinione del prevalente concorso batterico venne via via rafforzandosi, sino ad essere quasi da tutti accettata. Specialmente notevoli a questo riguardo sono le ricerche di A. R. Lamb (2) il quale concluse appunto che i batteri sono i principali responsabili della produzione di acidi.

Solo nel 1929 S. H. Hansen (3) espresse l'opinione che nello stadio di fermentazione anaerobica l'acidificazione enzimatica possa raggiungere valori espressi da $\text{pH} = 3,7$, mentre nel 1932 B. Curin (4), attraverso ricerche compiute mediante l'impiego di antisettici, pervenne alla conclusione che la maggior parte degli acidi del silaggio è d'origine batterica. Qualche anno dopo le ricerche di questa Stazione apportavano un contributo che poteva ritenersi decisivo, sia nei riguardi della natura degli agenti microbici che presiedono all'acidificazione dei foraggi fermentanti a temperature non superiori a 37° - 40° , sia anche a favore della prevalente origine batterica dell'acidità dei foraggi medesimi. Infatti:

Attraverso l'esame di foglie e steli di foraggiere diverse, prelevati sterilmente, Arnaudi (5) ha riscontrato che i batteri acidificanti sono sempre presenti nei foraggi in pieno campo; però il loro numero è relativamente scarso (nei 51 campioni esaminati da 1200 a 23.000 germi per g); ma già con le operazioni di falciatura e di raccolta esso aumenta alquanto, raggiungendo facilmente cifre di alcuni milioni per g.

L'intensissimo sviluppo dei microrganismi acidificanti nel corso della fermentazione è stato poi accertato dallo scrivente (6) che, attraverso numerose prove di fermentazione, ha constatato come nel volgere di breve tempo il loro numero raggiunga cifre assai spesso superiori al mezzo miliardo per

g; in pari tempo il foraggio subisce un'intensa acidificazione e la completa fermentazione degli zuccheri solubili; la correlazione riscontrata fra lo sviluppo dei batteri acidificanti e la produzione di acidi è rappresentata dal diagr. della fig. 1.

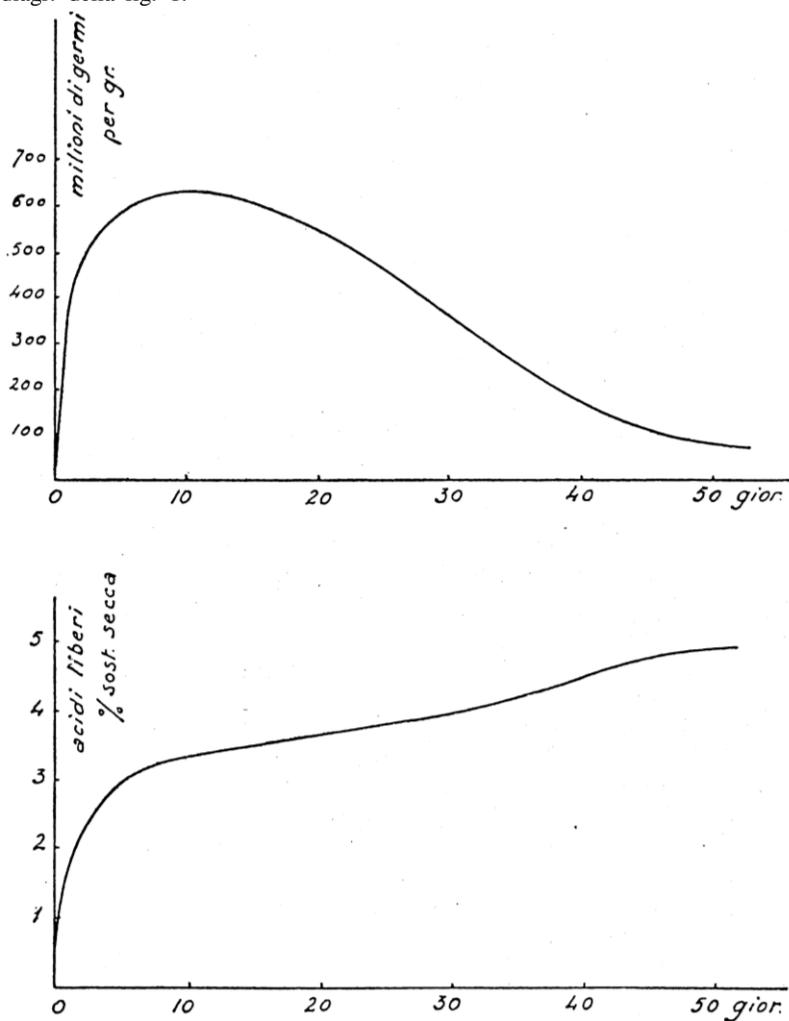


Fig. 1. - Variazioni nel contenuto batterico e nel contenuto in acidi liberi, nel corso della fermentazione in un'esperienza con microsili.

Pure lo studio e l'identificazione specifica della microflora acidificante dei foraggi sono stati iniziati e compiuti, si può dire ex-novo, da questa Stazione, giacchè in passato la maggior parte delle ricerche effettuate sull'argomento si era limitata ad indicare solo la presenza di batteri classificati in modo affatto generico come fermenti lattici. Il sistematico controllo

batteriologico di un gran numero di insilati, prove di fermentazione in microsili ed esperienze di insilamento in vasche hanno consentito di isolare in coltura pura numerosi ceppi dei quali venne effettuato uno studio dettagliato con speciale riguardo ai loro caratteri fisiologici. I risultati di questi studi (5, 6, 7) dimostrano che la microflora acidificante del silaggio è costituita da microrganismi nettamente diversi dai comuni fermenti lattici del latte, perchè incapaci di intenso sviluppo in questo terreno, dotati di scarsa azione sul lattosio e fortemente attivi sui pentosi. I più importanti di essi sono stati riferiti alle due specie *Streptobacterium plantarum* O. Jensen e *Lactobacillus pentoaceticus* Fred, Peterson e Davenport ¹⁾; è stato pure accertato il concorso di altri microrganismi aventi molte proprietà fisiologiche e biochimiche simili a quelle dei predetti.

Tutti questi microrganismi danno come prodotto principale l'acido lattico; ma le loro proprietà fisiologiche spiegano anche l'origine dell'acido acetico che si riscontra sempre, sebbene in quantità assai variabili, nei foraggi insilati; fermentando i pentosi essi producono infatti acido lattico ed acetico in proporzioni pressochè equivalenti, mentre il *Lactobacillus pentoaceticus* produce cospicue quantità di acido acetico anche dal glucosio e più ancora dal levulosio; inoltre, nella fermentazione di questo zucchero, il germe medesimo dà origine ad abbondanti quantità di mannite, la cui presenza nel silaggio di mais è stata pure segnalata.

Rimarchevole è anche la proprietà, rilevata da Arnaudi (5), che i suddetti microbi hanno di intaccare lo xilano, fermentandone i prodotti di idrolisi.

Le sistematiche ricerche compiute dalla nostra Stazione, integrando e coordinando le piuttosto frammentarie ed incomplete osservazioni batteriologiche fatte precedentemente, hanno quindi dimostrato come nelle trasformazioni cui soggiacciono i foraggi fermentanti a temperature non superiori a 37-40° si abbia sempre un intensissimo intervento di batteri acidificanti. Appariva così assai attendibile l'ipotesi della prevalente acidificazione microbica. A opposte affermazioni pervennero però nel frattempo Pratolongo e Fabris (8, 9); secondo questi A.A. il normale processo di acidificazione dei foraggi insilati sarebbe di natura enzimatica ed endocellulare, suscettibile di svolgersi con grande prontezza ed intensità sino al raggiungimento di acidità espresse da valori del pH prossimi a 4, indipendentemente da qualsiasi concorso batterico. Pertanto è parso di grande interesse istituire una nuova serie di ricerche atte a risolvere in modo definitivo il dibattuto quesito, la cui importanza è anche in special modo di carattere pratico, in quanto è alla

¹⁾ La presenza nei foraggi insilati di batteri di queste due specie era stata segnalata in precedenza anche da qualche altro Autore, senza però che il preminente sviluppo dei microrganismi medesimi venisse dimostrato con sistematiche ricerche.

Secondo C. S. Pederson il *Lactobacillus pentoaceticus* si identifica con *Lactobacillus brevis* (O. Jensen) Bergey et al.

precisa conoscenza dei processi fermentativi e dei loro agenti che deve appoggiarsi la tecnica del razionale insilamento dei foraggi. Per queste ragioni e sotto la direzione del Prof. Arnaudi, sono state effettuate le esperienze di cui segue l'esposizione; di esse si è già in parte riferito con una precedente nota (10), mentre le indagini tuttora proseguono al fine di integrare ulteriormente i risultati sinora raccolti e di chiarire nel medesimo tempo qualche lato più interessante del complesso problema.

È noto, sin dalle classiche esperienze di Pasteur, che in assenza completa di ossigeno il normale processo respiratorio delle cellule vegetali risulta sostituito dalla cosiddetta respirazione intramolecolare, dalla quale traggono origine, come prodotti principali, alcool etilico ed anidride carbonica, attraverso un complesso di fenomeni biochimici analoghi a quelli della fermentazione operata dai lieviti.

Si comprende quindi come allo svolgersi di codesti processi di respirazione anaerobica sia per la massima parte da attribuire l'abbondante sviluppo di anidride carbonica che accompagna la fermentazione dei foraggi insilati; e così pure un complesso di modificazioni, tra cui il caratteristico odore alcoolico-etero dei buoni insilati. È logico altresì ammettere che ai processi medesimi possa essere dovuta anche una produzione di acidi organici, ma sempre in proporzioni esigue, cioè contenute nei limiti delle quantità di acidi che accompagnano, come prodotti secondari, la fermentazione alcoolica. Ciò significa che le elevate quantità di acido lattico che si formano nella fermentazione dei foraggi non sembrano attribuibili alle attività fisiologiche ed enzimatiche delle cellule vegetali; a meno di non supporre che in condizioni anaerobiche, la respirazione intramolecolare possa svolgersi anche con l'andamento della fermentazione lattica, oltre che con quello della fermentazione alcoolica, il che però non è stato ancora dimostrato.

Accanto alle trasformazioni endocellulari, dovute alle attività fisiologiche del protoplasma vivente, vanno considerate quelle determinate dagli enzimi contenuti nelle stesse cellule vegetali, le cui azioni si possono esplicare anche dopo la morte delle cellule medesime. Per la sola azione di questi enzimi possono formarsi delle notevoli quantità di acidi? Le esperienze di Babcock e Russell lo escluderebbero, poichè mantenendo il foraggio in presenza di anestetici (etere, cloroformio, benzolo), i quali determinano una rapida cessazione delle attività batteriche, rispettando però gli enzimi ¹⁾, si ottiene un foraggio fermentato tipico come colore ed aroma, ma con scarsa acidità. È assai interessante notare che appunto in base a questo unico rilievo, ma in modo affatto arbitrario, i detti A.A. hanno attribuito la produzione di acidi alle attività dirette del protoplasma vivente. Nè gli altri rilievi compiuti pos-

¹⁾ Si noti in proposito che la presenza di anestetici, pur sospendendo la funzione clorofilliana, non impedisce lo svolgersi dei processi respiratori; gli anestetici non arrestano quindi se non parzialmente le attività vitali delle cellule.

sono essere considerati in favore di codesta loro ipotesi; essi infatti constatarono un certo parallelismo fra la vitalità delle cellule vegetali e l'intensità dell'acidificazione; ma è troppo evidente che i tessuti delle piante in piena fase di sviluppo e con la massima vitalità sono più acquosi con pareti cellulari meno ispessite, più diffusibili e più rapidamente intaccabili dagli agenti enzimatici e microbici, offrendo così condizioni più favorevoli all'intenso sviluppo batterico, il quale risulta favorito anche dalla stessa composizione dei succhi cellulari.

Pure le esperienze compiute con foraggio sottoposto a congelamento non riescono convincenti; il foraggio così trattato subì infatti un'acidificazione pari a quello della prova di controllo (foraggio non sottoposto a congelamento); mentre in una terza prova, effettuata con foraggio congelato e poi mantenuto in presenza di anestetici, non si ebbe alcuna acidificazione. È evidente, oltre che constatato dagli autori, che il preventivo congelamento non è valso ad inibire la microflora presente, la cui azione venne esclusa solo con gli anestetici impiegati nella terza prova; il fatto poi che il foraggio semplicemente congelato presentasse al termine dell'esperienza un odore sgradevole è ben comprensibile, dato che i microrganismi acidificanti, minorati dal congelamento, non hanno potuto prevalere nettamente sopra i microbi sporigeni (e quindi più resistenti) che sono per gran parte ad attività proteolitica. In complesso però è da notare che Babcock e Russell, considerando le trasformazioni tipiche del silaggio, non compresero fra le medesime anche l'acidificazione e non attribuirono ad essa quell'importanza di fattore conservativo che, riconosciuta più tardi, è oggi da tutti ammessa e ritenuta fondamentale per il buon esito della conservazione dei foraggi allo stato verde; e ciò, sia che si tratti di acidificazione fermentativa, oppure di aggiunta diretta di acidi.

Da quanto precede emerge chiaramente come l'ipotesi della prevalente origine enzimatica degli acidi sia stata enunciata più come una spiegazione di fenomeni che le scarse ed imperfette conoscenze sulla microflora del silaggio non consentivano di chiarire in modo soddisfacente, che come il risultato di sistematiche ricerche batteriologiche e chimiche. Ciò appare evidente anche dal citato lavoro di Babcock e Russell, in cui lo sviluppo microbico è riguardato essenzialmente come causa di alterazioni, senza alcuna distinzione fra i batteri che intaccano più o meno profondamente i costituenti ed il valore nutritivo dei foraggi ed i batteri che, oltre a non causare apprezzabili perdite di sostanze nutritive, concorrono efficacemente alla buona conservazione. Dalla lettura anzi del lavoro di Babcock e Russell si trae la netta impressione che per i detti A.A. i microbi presenti nei foraggi siano esclusivamente delle specie termofile e sporigene, non sospettando essi la eventuale presenza di altre specie microbiche.

Comunque una conclusione sicura al riguardo non può essere desunta che attraverso indiscutibili ricerche sperimentali; e tale è appunto il fine delle esperienze che qui si espongono. Alcune di esse sono state compiute in

condizioni analoghe a quelle degli Autori precedenti ed altre, a carattere affatto definitivo, operando in condizioni di assoluta sterilità, cioè evitando qualsiasi trattamento con antisettici, mediante l'impiego di vegetali nati e cresciuti sterilmente.

I. - ESPERIENZE MEDIANTE STERILIZZAZIONE CHIMICA DEL FORAGGIO

Alcune prove preliminari, compiute su erba medica, mediante l'impiego di diverse sostanze disinfettanti, dimostrarono subito la difficoltà di ottenere una completa sterilizzazione; ciò è apparso dovuto principalmente al fatto che non era facile ottenere che la soluzione impiegata bagnasse il materiale in tutte le sue parti superficiali. Perciò ed anche allo scopo di usare soluzioni microbicide il più possibile diluite, in modo da contenere nei più ristretti limiti l'azione delle medesime sulle cellule vegetali e sugli enzimi in esse contenuti, si è trovato opportuno di impiegare i soli steli di erba medica. Questi, privati delle foglie, vennero accuratamente sistemati in tre microsili e quindi sottoposti ai seguenti trattamenti:

1° trattamento con tachiolo diluito all'1% per 20' e susseguenti lavaggi con acqua distillata sterile;

2° trattamento con soluzione al 2% di Cu SO_4 per 30' e ripetuti lavaggi con acqua distillata sterile;

3° controllo senza alcun trattamento.

La sterilizzazione venne effettuata nello stesso barattolo costituente il microsilo; l'eliminazione del liquido di sterilizzazione ed i successivi lavaggi con acqua sterile vennero effettuati con il dispositivo rappresentato nella fig. 2.

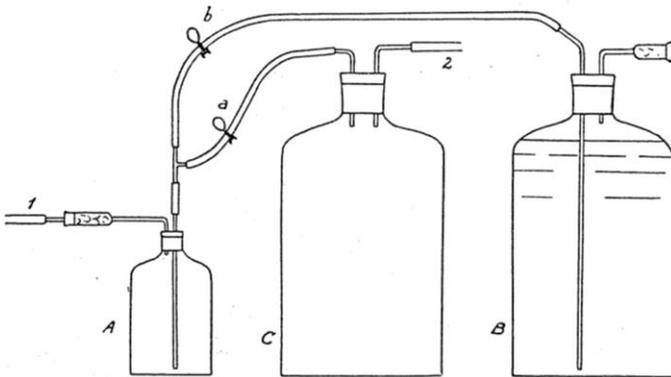


Fig. 2. - Dispositivo per la sterilizzazione chimica del foraggio. A: microsilo, B: bottiglione con acqua distillata sterile, C: recipiente per l'eliminazione dell'acqua di lavaggio. Chiudendo in *b* e aspirando da *2*, si vuota il recipiente A. Chiudendo in *a* e aspirando da *1*, si riempie A con acqua sterile.

Dopo l'ultimo lavaggio, ogni microsilo venne chiuso con tappo di gomma (previamente sterilizzato), attraversato da un tubicino per lo scarico dei prodotti gassosi della fermentazione; capovolgendo il microsilo e facendo pescare codesto tubicino in un bicchierino contenente dell'olio di vaselina, si provvide ad ottenere l'eliminazione completa dell'acqua residua dell'ultimo lavaggio e la chiusura idraulica del microsilo stesso.

I tre microsili vennero mantenuti per 7 giorni in termostato a 37°, e quindi il materiale venne utilizzato per le determinazioni chimiche e batteriologiche; i risultati ottenuti sono raccolti nella tab. I.

Durante la conservazione si constatò che in tutte le tre prove si ebbe sviluppo di gas; perciò è dato che la produzione di gas è dovuta principalmente ai processi respiratori delle cellule vegetali, si può ritenere che la vitalità delle cellule medesime non sia stata intaccata, se non in limitata misura, dai trattamenti di sterilizzazione effettuati.

È agevole rilevare che il trattamento con Cu SO_4 e con tachiolo, come era prevedibile, non hanno consentito di ottenere la completa sterilizzazione del foraggio; però il contenuto batterico finale delle prove 1^a e 2^a dimostra che si ebbe la eliminazione della microflora acidificante, mentre le forme sporigene, poterono, almeno in parte, sopravvivere e moltiplicarsi durante la conservazione. Nonostante ciò, nelle prove 1^a e 2^a gli zuccheri non subirono che una parziale degradazione, rispettivamente dei 44 e del 24 % del contenuto iniziale; e si noti che questo contenuto era piuttosto esiguo (1,24 % del materiale fresco).

TABELLA I

	pH	Acidità libera % sost. secca (come acido lattico)		Zuccheri riduttori % sost. secca		Contenuto microbico per g
		totale	incremento	presenti	fermentati	
Valore iniziale	5,8	0,94	—	8,3	—	n. d.
Prova 1 ^a	5,8	1,23	0,29	4,65	3,65	6.700.000
Prova 2 ^a	5,75	1,27	0,33	6,3	2	14.800.000
Prova 3 ^a	5,75	1,44	0,50	tracce	8,3	14.500.000

N.B. Il contenuto batterico delle prove 1^a e 2^a è costituito per la quasi totalità da sporigini; quello della prova 3^a, invece, quasi completamente da acidificanti.

Assai lievi furono del pari gli incrementi di acidità: praticamente immutato il pH e leggeri gli aumenti in acidi liberi.

Nella prova di controllo invece si poté constatare che mentre il contenuto batterico finale era costituito per la quasi totalità da germi acidificanti, gli zuccheri riduttori erano stati completamente fermentati. L'acidità, pur essendo un po' maggiore di quella delle due precedenti prove, non aveva però subito che uno scarso incremento; si tratta tuttavia dell'acidità libera e non della totale quantità degli acidi formati; perciò si può presumere che la

maggior parte di questi sia stata neutralizzata dalle sostanze basiche prodotte da una contemporanea degradazione delle sostanze azotate. Che nella prova di controllo si siano svolti dei processi di alterazione è apparso infatti evidente dall'odore piuttosto sgradevole del foraggio, mentre è naturale che nelle condizioni in cui si trovavano gli steli i microrganismi acidificanti, con molta probabilità presenti in esiguo numero, non abbiano avuto la possibilità di prevalere nettamente.

Ma anche prescindendo dall'andamento dei processi svoltisi in quest'ultima prova, dai risultati della presente esperienza si può dedurre che con la soppressione della microflora acidificante si ha una limitata fermentazione degli zuccheri e una scarsa produzione di acidi.

Per confermare codesta conclusione e nel medesimo tempo per dimostrare con maggior evidenza la prevalente natura batterica dei processi di acidificazione, si credette opportuno di ripetere l'esperienza allestendo quattro microsili con le seguenti modalità:

1° trattamento con tachiolo diluito all' 1 % per 20', ripetuti lavaggi con acqua distillata sterile, lavaggio finale con succo d'erba sterilizzato per filtrazione amicrobica.

2° trattamento con soluzione al 2 % di Cu SO_4 per 30', indi come N. 1.

3° trattamento con soluzione al 2% di Cu SO_4 per 30', indi come N. 1 e 2 e seminato con coltura pura di batteri acidificanti dei vegetali.

4° nessun trattamento.

Il lavaggio finale con succo d'erba sterile venne compiuto allo scopo di favorire lo sviluppo dei batteri acidificanti nella prova 3^a; esso venne effettuato anche nella 1^a e 2^a per non creare diversità di condizioni iniziali all'in fuori della presenza dei detti batteri. Le modalità seguite sono per il resto le medesime della precedente esperienza.

I risultati delle determinazioni compiute dopo otto giorni di conservazione a 37° sono raccolti nella tab. II.

TABELLA II

	Valori iniziali	1°	2°	3°	4°
pH	5,75	5,5	5,2	4,15	5,05
Acidità libera - } Totale	0,95	1,5	2,3	5,13	3,5
% sostanza secca - } (come ac. lattico) } incremento	—	0,55	1,45	4,14	2,55
Zuccheri riduttori - } Presenti	7,0	2,6	4,5	tracce	assenza
% sost. secca } fermentati	—	4,4	2,5	7,0	7,0
Azoto totale % sost. secca . .	2,48	2,49	2,45	2,48	2,26
Azoto solubile % sost. secca .	n. d.	1,39	1,36	1,37	1,9
Azoto ammoniacale % sost. secca	n. d.	0,139	0,163	0,058	0,429
Contenuto batterico per g . .	n. d.	5.200.000	11.500.000	30.400.000	18.240.000

N.B. La flora microbica delle prove 1^a e 2^a era costituita da microrganismi sporigeni quella delle prove 3^a e 4^a, in prevalenza da acidificanti.

Anche in questa esperienza il trattamento con Cu SO_4 e con tachiolo fu sufficiente per eliminare la microflora acidificante ma non per sterilizzare completamente il foraggio, avendo le forme sporigene resistito ad esso. Ciononostante nelle prove 1^a e 2^a gli zuccheri subirono solo una parziale degradazione, in ragione rispettivamente del 60 e del 27 % dell'esiguo contenuto iniziale (1% del foraggio fresco) mentre gli incrementi di acidità furono assai lievi.

Nella prova 3^a invece gli zuccheri risultarono completamente fermentati ed il grado di acidità particolarmente elevato. Anche nella prova 4^a gli zuccheri subirono una totale fermentazione, mentre l'acidificazione, per quanto minore di quella della prova 3^a, risultò sensibilmente maggiore di quella delle prove 1^a e 2^a.

I contenuti in azoto solubile ed ammoniacale dimostrano inoltre che nella prova 4^a, a differenza delle altre tre, la proteolisi si era svolta con notevole intensità, neutralizzando una frazione cospicua degli acidi prodotti e perciò mascherando in parte i processi di acidificazione subiti dal foraggio. Risultano così confermati i risultati della precedente esperienza e perciò parrebbe logico concludere che sopprimendo la microflora acidificante i processi di acidificazione cui soggiacciono i foraggi risultano fortemente attenuati; la formazione degli acidi parrebbe cioè legata prevalentemente all'intervento microbico.

II - PROVE DI FERMENTAZIONE IN PRESENZA DI SOLUZIONI GLICERICHE

Si riempirono quattro microsili con 180 g di foraggio, costituito da pianticelle di sorgo trinciate e 520 g di soluzione idroglicerica al 20 % in volume, resa acida a $\text{pH} = 3$ mediante H_2SO_4 . (Il foraggio era completamente immerso nel liquido). I quattro microsili, muniti di chiusura idraulica, vennero mantenuti in termostato alla temperatura di 30°. Essi vennero aperti in tempi successivi, impiegandosi il materiale per la determinazione del pH del liquido, dell'acidità libera totale e del contenuto batterico. I risultati ottenuti sono riassunti nella tab. III.

TABELLA III

Determinazioni	pH	Acidità totale % del foraggio fresco iniziale (come ac. lattico)	Contenuto batterico per g di foraggio
Valore iniziale (foraggio fresco)	5,7	0,144	102.000.000
Dopo 1 giorno di fermentazione	5,2	n. d.	23.000.000
Dopo 3 giorni di fermentazione	4,1	1,40	636.000.000
Dopo 4 giorni di fermentazione	3,9	2,07	260.000.000
Dopo 7 giorni di fermentazione	3,45	2,64	960.000.000

È facile rilevare che durante il periodo di conservazione si ebbe una rapida ed intensa produzione di acidi; evidentemente la soluzione idroglicerica non ha impedito lo svolgersi dei processi di acidificazione e così pure non ha impedito un abbondante sviluppo microbico; gli opportuni mezzi colturali elettivi impiegati hanno anzi dimostrato trattarsi dei tipici microrganismi acidificanti del silaggio.

L'andamento dell'acidificazione è apparso inoltre in stretta relazione con lo sviluppo di codesti germi. Infatti, il contenuto batterico iniziale del foraggio risultò assai elevato; ma ciò non deve stupire poichè si tratta del numero dei germi al momento dell'aggiunta della soluzione idroglicerica e non del numero di quelli inizialmente presenti sulle pianticelle. In seguito alla trinciatura di queste e durante l'allestimento dei microsili, è evidente che essi ebbero tempo e modo di moltiplicarsi attivamente. Però dell'abbondante microflora presente all'inizio della conservazione, solo una piccola frazione era rappresentata da batteri acidificanti (fig. 3 a).

Il numero dei germi presenti dopo un giorno risultò assai diminuito, mentre dalle piastre di isolamento appariva chiara la prevalenza delle specie acidificanti (fig. 3 b). Evidentemente la soluzione idroglicerica acida aveva soppresso una frazione cospicua della flora microbica, favorendo in pari tempo la selezione delle specie presenti a favore degli acidificanti, d'altra parte avvantaggiati dalla presenza delle notevoli quantità di zuccheri offerti loro dal foraggio.

Al 3° giorno il contenuto batterico risultava notevolmente aumentato, presentandosi quasi come una coltura pura dei tipici acidificanti dei vegetali (fig. 3 c), mentre al giorno successivo si poteva constatare una diminuzione nel numero dei germi medesimi, i quali rappresentavano egualmente la quasi totalità della microflora del materiale in fermentazione. Al 7° giorno invece si è notato un nuovo fortissimo aumento che può essere agevolmente spiegato dal fatto che lo sviluppo microbico, dapprima limitato alla superficie dei

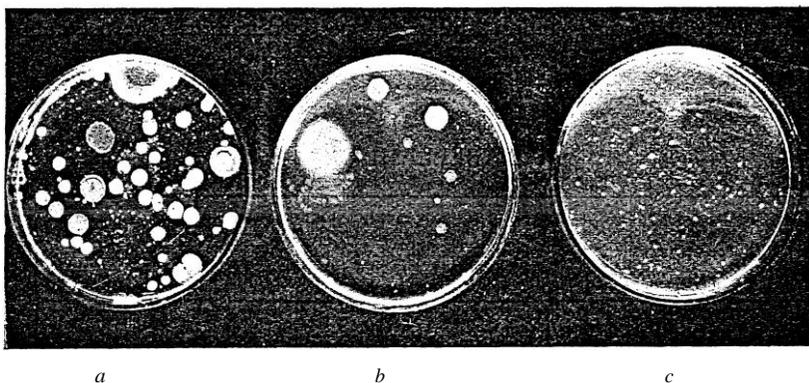


Fig. 3. - Piastre di agar malto nell'esperienza II.

TABELLA IV

ACIDIFICAZIONE DELL'INFUSO DI MALTO
ADDIZIONATO DI GLICERINA

Valori del pH dopo giorni	Controllo sterile	Lactob. pento- aceticus	Strept. plantarum	Bac. brassicae ferm.	Lact. Delbrücki	Ceppo Crema M	Ceppo Crema C	Ceppo Crema T	Ceppo Crema SP	Ceppo Crema 13/4
SENZA GLICERINA										
2	6	5,8	5,7	5,8	5,8	5,3	5,2	4,4	4,2	4,4
8	5,8	3,7	3,2	3,6	3,2	3,4	3,8	3,6	3,3	3,3
10 % DI GLICERINA										
2	6	5,5	5,9	6	5,8	5,7	5,2	4,9	5	5
8	5,8	3,8	3,6	3,9	3,6	3,3	3,9	3,5	3,2	3,4
15 % DI GLICERINA										
2	6	5,5	5,7	5,5	5,3	5	5	4,8	4,7	4,7
8	5,8	3,8	3,5	3,6	3,5	3,3	3,7	3,5	3,2	3,2
20 % DI GLICERINA										
2	6	5,8	5,8	5,8	5,7	5,6	5,7	5,7	5,3	5,1
8	5,8	4,1	3,5	3,9	3,4	3,2	3,7	3,5	3,4	3,4
25 % DI GLICERINA										
2	6	5,8	5,7	5,6	5,5	5,3	5,2	5,7	5,5	5,8
8	5,8	4,9	4,3	4,5	3,9	4,2	4,4	4,6	4	4,2
30 % DI GLICERINA										
2	5,75	5,20	5	4,9	4,95	4,55	5,2	4,75	5,15	4,5
8	5,75	4,95	4,5	4,8	4,9	4,5	5,15	4,65	4,8	4,3
35 % DI GLICERINA										
8	5,75	4,95	4,7	4,93	4,8	4,55	5,45	4,85	4,85	4,75
40 % DI GLICERINA										
8	5,95	5,5	4,75	4,8	4,8	4,65	4,8	4,9	4,9	4,95

In presenza del 10% e del 15% di glicerina la moltiplicazione dei microrganismi è molto rapida; in 24 ore si ha un intenso intorbidamento delle colture; il loro comportamento è identico a quello delle colture senza glicerina.

Con il 20% di glicerina, Lact. pentoaceticus ed il ceppo Crema T si moltiplicano lentamente e solo dopo 6-7 giorni raggiungono uno sviluppo pari a quello degli altri ceppi.

Mediante il 25% di glicerina si ottiene uno sviluppo pressochè normale per Strept.

plantarum, Lact. Delbrücki e per i ceppi Crema M, SP, 13/4; tutti gli altri ceppi si sviluppano molto più lentamente.

L'aggiunta del 30 % di glicerina determina un discreto sviluppo del ceppo Crema 13/4; tutti gli altri microrganismi crescono assai lentamente.

Con il 35 ed il 40 % di glicerina la moltiplicazione è praticamente arrestata per tutti i ceppi; solo dopo 8 giorni si nota un leggero deposito sul fondo della provetta del ceppo 13/4.

L'esame microscopico delle colture come pure il grado di intorbidamento hanno servito per valutare la moltiplicazione dei microrganismi.

frammenti di foraggio, dopo il 5°-6° giorno potè svolgersi in tutto il liquido idroglicerico nel quale si erano frattanto diffusi i succhi vegetali.

Da quanto precede emerge che la soluzione idroglicerica al 20 % non è atta ad impedire l'intenso sviluppo dei batteri acidificanti dei vegetali. Questa constatazione ed altri rilievi, fatti in precedenti esperienze a carattere orientativo, ci indussero ad esaminare il comportamento di codesti microrganismi verso la glicerina. Vennero compiute delle prove di fermentazione che permisero di accertare che la maggior parte dei batteri acidificanti dei vegetali e specie simili ad essi sono effettivamente capaci di fermentare la glicerina, con produzione di acidi (7).

Alcuni ceppi, scelti fra quelli più tipici, isolati da foraggi verdi insilati, nonché da piante foraggere in pieno campo, vennero quindi seminati in provette contenenti infuso di malto sterile, addizionato delle sottoindicate quantità di glicerina e mantenute in termostato a 30°. Di tempo in tempo si controllò il grado di sviluppo e eli acidità; i risultati sono raccolti nella Tab. IV.

Questi risultati dimostrano in modo indiscutibile la notevole resistenza che i microrganismi esaminati presentano alla glicerina: sino a concentrazioni del 25 ed anche del 30 % si ha infatti una intensa o per lo meno evidente moltiplicazione, mentre al 35 - 40 % alcuni di essi, pur non presentando una palese moltiplicazione, sono ancora capaci di incrementare l'acidità. Tutti questi rilievi danno quindi una chiara spiegazione dell'intenso sviluppo di acidificanti riscontrato nell'esperienza sopradescritta, in cui il foraggio era immerso in una soluzione idroglicerica del 20 %. Essi pure dimostrano come non sia possibile impiegare la glicerina alle suddette concentrazioni come antisettico contro i fermenti lattici dei vegetali.

Per quanto precede, le recenti esperienze di Pratalongo e Fabris (9), in base alle quali gli A.A. hanno concluso che il normale processo di acidificazione dei foraggi insilati è di natura enzimatica, non possono avere alcun valore definitivo; infatti, nelle esperienze medesime venne impiegata come antisettico una soluzione di glicerina al 20 %, la quale non poteva impedire un intenso sviluppo dei batteri acidificanti. D'altra parte gli stessi A.A. hanno constatato che le soluzioni idrogliceriche al 30 % impediscono completamente l'acidificazione del foraggio; è evidente che in queste condizioni i pochi germi acidificanti inizialmente presenti non poterono moltiplicarsi, se non in misura ridotta e lentissimamente, anche perchè ostacolati dalla reazione spiccatamente acida del substrato; ma non per questo si può concludere

con sicurezza che la mancata acidificazione sia da attribuire al fatto che gli eventuali enzimi furono paralizzati dalla glicerina, giacchè la massima parte degli enzimi agisce normalmente anche in presenza del 30 % di glicerina.

Tutti questi rilievi dimostrano quindi come l'ipotesi della prevalente origine enzimatica degli acidi del silaggio non abbia trovato tuttora l'appoggio di indiscutibili dimostrazioni sperimentali.

III - ESPERIENZE PER ACCERTARE L'INTENSITÀ DELL'ACIDIFICAZIONE IN CONDIZIONI ASSOLUTAMENTE ASETTICHE

Con queste esperienze si è cercato di controllare l'intensità dei processi di acidificazione quali si svolgono nell'interno di tessuti vegetali integri, e perciò sicuramente sterili, in modo da evitare l'impiego di qualsiasi anti-settico.

In una prima esperienza si impiegarono grossi steli di sorgo (*Sorghum Saccharatum*), privati delle foglie, ma lasciati integri e scelti in modo che non presentassero lesioni o screpolature. Si tagliarono in modo da avere un internodio ed i due nodi estremi e con questo materiale si allestirono le seguenti prove:

- 1° Steli in atmosfera di aria libera (recipiente aperto).
- 2° Steli in atmosfera di aria confinata (recipiente a chiusura idraulica).
- 3° Steli in atmosfera di anidride carbonica.
- 4° Steli in atmosfera di azoto.
- 5° Controllo, con steli finemente tagliuzzati ed accuratamente sistemati nel microsilo.

I cinque microsili vennero mantenuti in termostato a 37° per undici giorni. Quindi dagli steli delle singole prove si ricavò la parte interna, nella quale qualsiasi azione batterica era da ritenersi affatto esclusa. L'acidità iniziale del succo della parte centrale degli steli impiegati era espressa da pH = 5,35 e l'acidità libera di 10 cc del succo stesso equivalente a 0,8 cc di H₂SO₄ 0,1 N.

Al termine della conservazione si ebbero i seguenti risultati:

	pH	Acidità di 10 cc di succo cc 0,1 N
1° Steli in atmosfera di aria libera	5,4	0,8
2° Steli in atmosfera di aria confinata	4,9	1,7
3° Steli in atmosfera di CO ₂	5,4	0,9
4° Steli in atmosfera di azoto	6,3	0,5
5° Controllo: steli tagliuzzati	3,75	14,4

Nella prova 5^a venne anche accertato lo sviluppo, intensissimo, dei batteri acidificanti.

Per una maggiore attendibilità delle conclusioni le prove 2^a, 3^a e 4^a vennero ripetute con le stesse modalità e dopo 14 giorni di conservazione si ottennero i seguenti risultati:

	pH	Acidità di 10 cc di succo cc 0,1 N.
Valori iniziali	5,15	1,0
Steli in atmosfera d'aria confinata	5,25	1,2
Steli in atmosfera di CO ₂	6,2	0,55
Steli in atmosfera di azoto	5,3	0,7

I dati sovraesposti rivelano che mentre nella prova su steli tagliuzzati, e quindi non in condizioni di sterilità, si ebbe una intensa produzione di acidi, nell'interno degli steli mantenuti integri e perciò senza la presenza di microrganismi, l'incremento di acidità è stato assai lieve. Soltanto nella prova con aria confinata si è verificata una leggera diminuzione del pH, mentre in tutte le altre prove il valore medesimo si è mantenuto immutato od ha subito dei leggeri aumenti. È evidente pertanto che nelle precedenti condizioni di esperienza lo svolgersi dei processi dovuti alle attività fisiologiche ed enzimatiche delle cellule vegetali ha dato origine a quantità di acidi affatto esigue. Ne deriva che l'elevata acidità prodottasi nella prova di controllo è, praticamente nella sua totalità, di origine batterica. Essa corrisponde a quella presente nei buoni insilati di mais e sorghi sfibrati; perciò è dato anche che gli zuccheri di questi foraggi sono contenuti per la maggior parte negli steli, è affatto logico ed attendibile concludere che l'acidificazione cui soggiacciono i foraggi medesimi è prevalentemente di natura batterica.

Un altro gruppo di esperienze in condizioni di assoluta sterilità venne compiuta operando con pianticelle di pisello e di mais ottenute per coltivazione assolutamente asettica.

Ecco la tecnica seguita:

I semi vennero trattati con soluzione di sublimato corrosivo al 5 per mille per 75-90'; quindi, con precauzioni atte ad evitare inquinamenti, essi vennero lavati con acqua sterile, passati in germinatoi previamente sterilizzati e mantenuti poi a temperatura ambiente, attendendosi la loro germinazione. Allorchè le radichette raggiunsero una lunghezza di 1-2 cm, i semi germinati vennero distribuiti, in numero di 8-10, entro piastre sterili in cui si era fatto solidificare dell'agar-malto, mantenendo poi in termostato a 30° per 2-3 giorni, al fine di controllare il risultato della sterilizzazione. Dopo di ciò i singoli semi germinati, sicuramente sterili, vennero introdotti in grosse provette di Roux, contenenti 10 cc di liquido di Knopp, previamente sterilizzate in autoclave; si lasciarono poi crescere le piantine alla luce sino a raggiungere il massimo sviluppo consentito dalle dimensioni delle provette.

Sempre con le dovute precauzioni, atte a mantenere la sterilità, le pianticelle vennero private delle radici, tagliate in 2-3 frammenti ed introdotte

in provette sterili. Una parte del materiale così preparato venne seminato con coltura pura di batteri acidificanti dei vegetali.

La conservazione venne effettuata in atmosfera di azoto, alla temperatura ambientale di 18-20°.

I risultati ottenuti dopo 25 giorni di conservazione sono i seguenti:

Determinazioni sul succo di spremitura	PISELLO			MAIS		
	Valori iniziali	Valori finali		Valori iniziali	Valori finali	
		Piantine sterili	Piantine più batteri acid.		Piantine sterili	Piantine più batteri acid.
pH	5,8	6	5,3	5,6	5,7	4,3
Zuccheri	presenza	presenza	assenza	4 ⁰ / ₁₀₀	5,5 ⁰ / ₁₀₀	assenza

Dai precedenti dati è agevole rilevare che le piantine sterili non subirono apprezzabili variazioni nel grado di acidità e nel contenuto zuccherino, mentre invece le piantine addizionate di batteri acidificanti soggiacquero a notevole acidificazione ed alla completa fermentazione degli zuccheri presenti. I risultati sono assai evidenti specialmente nell'esperienza con il mais e perciò è affatto lecito concludere in modo definitivo che l'acidificazione dei foraggi è dovuta principalmente ad azioni batteriche, mentre il concorso degli enzimi contenuti nelle cellule vegetali è da ritenersi assai esiguo.

CONCLUSIONI

Le sistematiche ricerche compiute presso questa Stazione intorno ai processi di acidificazione dei foraggi insilati hanno consentito di raccogliere un complesso di rilievi e di risultati che può essere così riassunto:

a) costante presenza nei foraggi conservati allo stato verde, mediante insilamento «a freddo», compresi quelli con aggiunta di acidi minerali, di un elevato numero di batteri acidificanti;

b) Rapido ed intensissimo sviluppo di codesti batteri nei primi giorni di fermentazione; dalle poche migliaia inizialmente presenti nel foraggio il loro numero aumenta ad oltre ½ miliardo per gr;

c) I succhi vegetali costituiscono un terreno elettivo per i batteri medesimi, che ne fermentano gli zuccheri con grandissima rapidità ed intensità, dando come prodotto principale acido lattico e, fra i prodotti secondari, acido acetico;

d) I batteri acidificanti dei foraggi insilati presentano un vasto potere fermentativo per tutti gli zuccheri vegetali ed utilizzano attivamente i pentosi ed i loro derivati; per contro essi sono scarsamente attivi sul lattosio, differenziandosi così nettamente dagli stréptococchi lattici e dai lattobacilli tipo bulgaricus, ritenuti in passato come i responsabili della fermentazione acida del silaggio;

e) Sopprimendo mediante sostanze microbicide di blanda azione la microflora acidificante, gli zuccheri contenuti nel foraggio non soggiacciono che ad una parziale ed esigua degradazione, mentre l'acidità non subisce che scarsi incrementi (esperienze I di questa nota)

f) Non è possibile usare soluzioni idrogliceriche per accertare lo svolgersi e l'intensità dei processi di acidificazione endocellulari a causa della notevole resistenza dei microbi acidificanti dei vegetali a tale sostanza.

g) Le quantità di acidi che si producono nell'interno di tessuti vegetali integri e sicuramente sterili (come nelle condizioni delle esperienze III di questa nota) è nulla od assai lieve.

In virtù di tutti questi rilievi l'ipotesi che gli acidi che si formano negli insilamenti a freddo siano prevalentemente d'origine endocellulare, traendo origine dalle attività fisiologiche ed enzimatiche delle cellule vegetali, non è accettabile; per contro le esperienze III di questa nota autorizzano a concludere in modo definitivo che *l'acidificazione dei foraggi insilati è dovuta per la massima parte ad azioni batteriche.*

RIASSUNTO

Le indagini descritte concernono gli agenti che presiedono ai processi di acidificazione dei foraggi insilati: alcune di esse sono state compiute mediante sterilizzazione chimica del foraggio, altre mediante prove di fermentazione in presenza di soluzioni idrogliceriche ed altre, con carattere definitivo, mediante l'impiego di vegetali fatti nascere e crescere sterilmente. È stato così dimostrato che l'acidificazione dei foraggi insilati è dovuta per la massima parte ad azioni batteriche, mentre assai scarso è il concorso degli enzimi contenuti nelle cellule vegetali.

ZUSAMMENFASSUNG

Die hier beschriebenen Untersuchungen betreffen die den Ansäuerungsprozessen im Silofutter vorstehenden Agentien; bei einigen derselben wurde das Futter chemisch sterilisiert, bei anderen wurden in Gegenwart von hydroglyzerischen Lösungen Gärungsproben ausgeführt und wieder andere, endgültige, wurden mit steril erhaltenen und gewachsenen Vegetalien angestellt. Es konnte somit festgestellt werden, dass die Ansäuerung im Silofutter zum grössten Teil auf einer bakteriellen Wirkung beruht, und dass die in den Pflanzenzellen enthaltenen Enzyme sehr spärlich daran beteiligt sind.

RÉSUMÉ

Ces recherches portent sur les agents qui président aux procès d'acidification des fourrages ensilés. Certaines d'entre elles ont été exécutées moyennant la stérilisation chimique du fourrage; les autres, moyennant des épreuves de fermentation en présence de solutions hydroglycériques et des autres

encore, à caractère définitif, moyennant l'emploi de végétaux faits naître et croître stérilement. On a démontré ainsi que l'acidification des fourrages ensilés est due pour la plupart à des actions bactériennes, tandis que le concours des enzymes contenus dans les cellules végétales est très limité.

BIBLIOGRAFIA

(1) *S. M. Babcock e H. L. Russell* - Die bei der Herstellung von Gärfutter (Silage) wirkenden Ursachen (Centr. f. Bakteriologie 1902, 9, pag. 81).

(2) *A. R. Lamb* - The relative Influence of Microorganisms and Plant-Enzymes on the Fermentation of Corn Silage. (Journ. of Agric. Research. Washington, 1917, 8, pag. 361).

(3) *S. H. Hansen* - I processi biochimici nell'insilamento dei foraggi verdi. (Norges Landbrukshoiskole, 25 Beritning, 1929, p. 58).

(4) *B. Curin* - O puvodu kyseling mlécné v. silazi (Sbornic Vyzkumnych uslaver zemedelskych C.S.R., Praga 1932, 96).

(5) *C. Arnaudi* - Ricerche sui microrganismi acidificanti dei foraggi insilati. (Atti R. Acc. dei Lincei, 1938, 28, pag. 157).

(6) *I. Politi* - Sui processi fermentativi dei foraggi insilati allo stato verde. (Annali Sperim. Agraria, 1938, 29, pag. 89, 95).

(7) *I. Politi* - Studio e riferimento sistematico dei batteri acidificanti dei foraggi insilati. (Questi Annali 1940, 1). (in corso di pubblicazione)

(8) *U. Pratolongo* - L'infossamento dei foraggi - Aspetti biochimici e tecnici. (Atti R. Acc. dei Georgofili, 1939).

(9) *U. Pratolongo e A. Fabris* - Il processo normale di acidificazione biochimica dei foraggi insilati. (Ann. del Lab. di ricerche sulle fermentazioni «L. Spallanzani», 1939, 5, pag. 149).

(10) *Arnaudi C. et Politi I.* - Quelques observations à propos des procès d'acidification des fourrages ensilés. (Bollett. Sez. It. della Soc. Intern. di Microbiologia 1939, 11, pag. 217).