

## Sull'autodepurazione degli ortaggi

**Prof. Mario Mazzeo** (Direttore)

**Prof. Giuseppe Marinelli** (Aiuto)

*(Ricevuto il 5 dicembre 1940-XIX)*

La possibilità che le verdure, specie quelle che si consumano abitualmente crude, possano ospitare germi di malattie infettive, è generalmente ammessa dagli igienisti; i quali, fra i veicoli delle infezioni intestinali, non mancano di annoverare gli ortaggi.

Ma, se si volesse scervere in base a quali dati sperimentali o statistici tale convinzione è venuta formandosi, si rimarrebbe molto perplessi di fronte alla scarsità ed alla contraddittorietà degli elementi di giudizio.

Non staremo qui a fare la storia e la critica delle numerose osservazioni pro e contro la possibilità di cui sopra: si può soltanto accennare al fatto che vi sono studiosi che negano ogni possibilità di un inquinamento infettante massivo e duraturo degli ortaggi, facendo assegnamento sugli sfavorevoli fattori che agirebbero concomitantemente sui germi patogeni (luce, disseccamento, asportazione meccanica per piogge ed innaffiamento, concorrenza vitale, batteriofagi, ecc.); altri che ammettono la possibilità di un inquinamento durevole delle parti più esterne delle piante, facilmente eliminabile con la mondatura ed il lavaggio sufficientemente prolungato; altri, infine, che ritengono che i germi possano penetrare profondamente nella compagine del vegetale, anche se non sono dei fitopatogeni, e permanervi un tempo anche molto lungo: nessuna forma di pulizia e disinfezione — tranne la cottura — sarebbe capace, in questo caso, di bonificare l'ortaggio.

L'ottimismo dei primi è da ritenersi senza dubbio, oltre che pericoloso, infondato: un inquinamento anche massivo delle verdure può verificarsi anche immediatamente prima del loro invio al mercato, e — se pure in misura più limitata — al mercato stesso; d'altra parte i fattori naturali di depurazione non sempre agiscono nelle stesse condizioni, e quindi con la medesima intensità: sarebbero poi del tutto o quasi inefficaci nel caso di penetrazione dei germi nella compagine del vegetale.

Ammessa dunque come possibile una contaminazione degli ortaggi da parte di germi infettanti, quali probabilità vi sono perchè essa si propaghi nella compagine di essi; e quali difese può il vegetale apporvi? La questione è stata ampiamente discussa, con contributi di notissimi studiosi, fra i quali molti italiani. Abbastanza recentemente, poi, Savulescu (1), in una vasta rassegna sulla immunità delle piante alle malattie batteriche, ha preso in esame anche la maggior parte dei lavori eseguiti in proposito; sicchè noi ci

limiteremo a dare uno sguardo panoramico alla questione, con qualche accenno particolare alle più recenti ricerche, od a quelle sfuggite all'autore romeno.

Che i germi capitati sulle piante possano, indipendentemente dalla loro possibilità di nuocere ai tessuti della pianta stessa, penetrare nell'interno di essi pare cosa da non mettersi più in dubbio. Anche del tutto recentemente lavori compiuti in questo Istituto (2) hanno permesso di confermare simile possibilità. I germi fitopatogeni possono penetrare nelle piante attraverso i tessuti integri, oppure ledendo con le loro azioni biochimiche detti tessuti. Il primo modo di penetrazione è stato molto bene studiato da Kunkel (3), a proposito della penetrazione del *Plasmadiophora brassicae* nel tessuto dei cavoli: si credeva che tale invasione potesse aver luogo esclusivamente attraverso i peli assorbenti, ma K. ha visto che il parassita può penetrare da un punto qualsiasi delle radici; e, dopo di aver traversata la corteccia, raggiunge il *cambium* che invade in tutte le direzioni: di là si propaga da una parte nella corteccia, che esso invade così secondariamente, e nei fascetti legnosi e i raggi midollari.

L'altra forma di invasione è caratteristica specialmente dei funghi. Young (4) ha visto che all'attacco di alcuni funghi le piantine di grano reagiscono con un ispessimento della membrana che imprigiona l'ifa di penetrazione, e che si chiama callosità. Spesso le callosità si accrescono più rapidamente che le ife da esse racchiuse, e continuano così ad imprigionarle; ma talvolta le ife di penetrazione si spingono fuori delle callosità e riescono a traversare da una a tre cellule dell'ospite; in questi casi la reazione della membrana cellulare è impotente ad arginare la infezione.

Una volta che il germe fitopatogeno sia penetrato, la sua progressione nei tessuti del vegetale ospitante si effettua con meccanismi probabilmente diversi, e che sono oggetto, anche per uno stesso germe, di discussioni controverse. Ci si può riferire, come esempio caratteristico, a quanto è stato scritto circa l'azione patogena del *B. tumefaciens*. Secondo Smith (5), il parassita resterebbe nell'interno delle cellule, e la sua migrazione deriverebbe dalla divisione e proliferazione delle cellule invase. Per Riker (6), invece, il batterio si sposterebbe per mobilità propria nel liquido che invade gli spazi intercellulari dopo la inoculazione; ed infine, per Robinson e Walkden (7), i batteri progredirebbero lungo gli spazi intercellulari sotto forma di zooglee. Ben Hill (8) ha confermato più recentemente la maniera di vedere di questi ultimi AA., ed ha chiarito il meccanismo di tale progressione. Nelle piante di pomodoro inoculate verso la sommità dello stelo con *B. tumefaciens* si notano (all'esame istologico eseguito ad intervalli, fra 15 minuti e 48 ore dopo la inoculazione), zooglee batteriche che si formano nelle cellule lese dalla puntura e si spostano in seguito verticalmente, lungo gli spazi intercellulari del midollo e del tessuto sottoepidermico: esse sono costituite da batteri inglobati in una ganga gelatinosa; la loro forma dipende dalla forma

dei meati dove si sviluppano; i loro contorni sono netti, e le loro estremità, per dove si effettua la progressione, arrotondate in forma di menisco convesso. I batteri non prendono la via vascolare che raramente, e solo quando i vasi sono stati feriti dalla puntura: le cellule sane non sono mai invase. La velocità di migrazione varia da cm. 0,029 a 0,04 per minuto: la più grande velocità si osserva nei 30 minuti consecutivi alla inoculazione; al termine di 3 ore essa è ridotta alla metà.

Quale che sia il reale meccanismo di invasione dei tessuti da parte del *B. tumefaciens*, pare accertato che questo germe, che pure è fra i fitopatogeni uno dei più attivi, è incapace di attaccare le cellule integre; onde è generalmente considerato un parassita delle ferite. Lo studio del suo modo di comportarsi nelle piante non lese è dunque importante come termine di raffronto col modo di comportarsi dei germi non fitopatogeni. Interessanti sono, a questo riguardo, le osservazioni del Rivera (9). Egli ha deposto sulla epidermide di ricini e gerani il *B. tumefaciens*, con risultati negativi, mentre le piante inoculate con lesioni dei tessuti hanno tutte avuto dei tumori: il risultato restava negativo anche se si proteggevano i germi dal disseccamento con manicotti di garza mantenuti umidi, ed anche se si scioglieva con xilolo il rivestimento cereo dell'epidermide del ricino. Altri esperimenti sono stati fatti dall'A. introducendo il bacillo direttamente nel sistema vascolare delle piante: steli fioriferi di cavolo e rami terminali di ricino, tagliati, sono stati messi in bottiglie con acqua, e sulla superficie di sezione sono stati posti in gran numero *B. tumefaciens*. Questi microbi penetrano nei vasi sezionati, e sono aspirati con la linfa ascendente, invadendo così tutti gli organi; ma le piante così trattate non hanno mai avuto tumori. Tuttavia l'azione stimolante del bacillo si è manifestata in tali casi con la produzione di numerosissime radici sulla superficie di sezione; il che ha fatto concludere al Rivera che il bacillo è certo un parassita delle ferite, sia che il traumatismo rappresenti la porta di entrata dell'infezione, sia piuttosto che esso costituisca una condizione necessaria alla produzione del neoplasma, eccitando l'attività cicatriziale dei tessuti, la quale sarebbe esagerata e deviata sotto l'azione costante dei batteri, sempre presenti nei tumori in via di accrescimento.

Da queste e da altre ricerche emerge intanto la constatazione indubbia che la linfa ascendente è capace di trasportare i germi che abbiano comunque superata la barriera epidermica della pianta in tutte le parti di essa, con una forza ascensionale che appare molto più importante e complessa di quanto poteva essere giudicata in passato, specie per merito di Bose (10); che ha reso noti in un grosso volume i risultati dei suoi studi sul meccanismo dell'ascensione della linfa. Egli dichiara che il problema di tale ascensione è uno dei più oscuri della fisiologia vegetale. La teoria generalmente ammessa è che la forza motrice necessaria per l'ascensione sia fornita dalla pressione esercitata dalle radici e soprattutto dal movimento di trazione che si opera dalle foglie mediante la traspirazione. Per Bose, invece, l'ascensione della

linfa non è un fenomeno puramente meccanico, ma è dovuto essenzialmente all'attività di speciali cellule pulsanti, situate nell'assise più profonda della corteccia: gli agenti fisici interverrebbero solo per favorire accessoriamente il movimento. In quanto ai vasi del legno, situati in prossimità della assise pulsatrice, essi non sono altro che un serbatoio drenante l'eccesso della linfa, e non hanno che una parte passiva nella circolazione. Le pulsazioni delle cellule che, con le loro contrazioni ritmiche, fanno circolare la linfa, hanno potuto essere registrate dall'A. con procedimenti elettrici.

Comunque sia, è certo che la linfa ascendente può diffondere i germi in tutti gli organi della pianta; ma tale diffusione, come risulta anche dagli studi di Rivera, non rappresenta necessariamente una causa di malattia per la pianta, anche se si tratti di germi fitopatogeni; a maggior ragione, poi, rimane senza effetti deleteri la penetrazione di germi non patogeni per la pianta. Quale è allora la sorte di questi germi?

Korinek (11) ha visto che la fava si mostra assolutamente insensibile a microbi saprofiti (bacillo prodigioso) introdotti nei suoi tessuti, sia per inoculazione sia coltivando in sospensione batterica gli steli tagliati. Ma, mentre gli animali distruggono rapidamente i microbi saprofiti, nelle piante essi persistono lungamente, allo stato di vita latente, accollati alle pareti cellulari. Bisognerebbe pertanto supporre che la linfa che avvolge in questi casi i germi non espliciti su di essi alcuna azione deteriorante. Essa li assume e li trasporta con la stessa azione indifferente con la quale assume e trasporta le sostanze nutritive. Ma contro tale ipotesi stanno numerosi lavori, i quali arrivano alla conclusione che la pianta si difende, contro qualsiasi tipo di germe, con gli stessi meccanismi che mette in moto l'organismo animale.

Il problema se le piante offrano all'aggressione dei batteri la stessa resistenza istogena ed umorale che offrono l'uomo e gli animali, e se in esse la penetrazione di antigeni è seguita dalla formazione di anticorpi, ha sempre appassionato gli studiosi. Lasciando da parte l'abbondantissimo materiale costituito dagli studi sulla immunizzazione artificiale delle piante, e prendendo in esame soltanto la questione delle eventuali difese naturali, si può notare come, in circa un quarantennio di ricerche, non si è ancora potuto arrivare ad un accordo, sia pure generico, da parte degli studiosi.

Fin dal 1902 Kobert (12) aveva annunciato che le differenti proteine vegetali sono capaci di agglutinare le emazie di diversi vertebrati. Poco dopo Mendel (13) ottenne da certe specie di fagioli e di piselli delle emoagglutinine, più attive sul sangue di coniglio che su quello di maiale.

Furono allora iniziate ricerche sistematiche, specie ad opera di Kritschewsky (14, 15, 16), che trovò in alcune piante sostanze agglutinanti e precipitanti per il bacillo tifico, il vibrione colerigeno ed il bacillo tubercolare umano, capaci di agire anche a notevoli diluizioni (1/450 le agglutinine e 1/150 le precipitine). Secondo K., tali anticorpi sarebbero, con la massima probabilità, inclusi nel succo cellulare delle piante: le foglie di una stessa pianta possono differire le une dalle altre per il tenore in anticorpi; ma que-

sti si trovano, oltre che nelle foglie, anche nello stelo, e probabilmente anche nelle radici delle piante.

Quasi contemporaneamente, Wagner (17, 18) rese noto l'esito di sue ri-

cerche, dalle quali risultava che nei succhi delle piante si riscontravano tre specie di sostanze antibatteriche, capaci di agire anche *in vitro*, e precisamente: 1) agglutinine, che immobilizzano i germi; 2) lisine, che rigonfiano le membrane dei germi e li distruggono; 3) sostanze inibitrici dello sviluppo, che impediscono la formazione delle spore e lo sviluppo dei germi protetti da spesse membrane contro l'azione delle lisine.

Anche secondo Vigliano (19) molte piante danno un succo che agglutina i microbi o le emazie di montone, o dissolvono tali emazie, o esercitano azione antiemolitica; e, secondo le differenti piante e le diverse parti di esse, tali azioni possono manifestarsi a 37° e non già a temperature inferiori ai 15°: i principi che le determinano passano benissimo attraverso i filtri di carta ma vengono in parte trattenuti da quelli di amianto.

Per Arata (20), che ha studiato l'infezione dei fagioli da parte del *Botrytis cinerea*, non vi è dubbio che una specie di immunità naturale esiste anche nelle piante non vaccinate; e Duggar e Armstrong (21) hanno visto che il succo di piante refrattarie al virus del tabacco è capace di inattivare il virus stesso, con azione specifica; ma essi ammettono che tale azione sia più probabilmente legata ad un fenomeno di adsorbimento del virus da parte dei corpuscoli colloidali più voluminosi del succo anzichè alla attività di anticorpi; come lo lascerebbe supporre anche il fatto che il potere inibitore si trova diminuito dalla filtrazione del succo per porcellana.

Interessanti sono anche le ricerche di Magrou (22, 23), che in alcune specie di orchidee ha scoperto delle sostanze attive contro i funghi simbiotici di tali piante: sostanze specifiche e termolabili, aventi i caratteri essenziali degli anticorpi che si sviluppano negli animali immunizzati; tanto è vero che l'A. ne ammette senz'altro la equivalenza; e pensa che esercitino nella patologia dei vegetali lo stesso ruolo degli anticorpi degli animali: si tratterebbe di agglutinine, svelabili anche nelle piante sane e non vaccinate; e di precipitine e lisine che si troverebbero soltanto nelle piante infette o vaccinate:

Contro queste ricerche affermative, conviene citare quelle di Silberschmidt (24), che non è riuscito a mettere in evidenza anticorpi precipitanti per il virus del mosaico del tabacco, sia nelle piante recettive che in quelle refrattarie; di Gheorghiu (25), che hanno condotto l'autore a concludere che anche nelle piante vaccinate il meccanismo della immunità resta oscuro, in quanto tutti i mezzi impiegati per svelare gli anticorpi sono rimasti infruttuosi; e finalmente quelle di Carbone e Arnaudi (26), sulla linfa elaborata e sulla linfa ascendente del gelso moro: la linfa elaborata da piante sane e non vaccinate è risultata provvista di un potere agglutinante per le emazie di montone e di un potere antiemolitico, ma sprovvista di emolisine; ed anche di agglutinine verso tutti i microbi impiegati, ad eccezione del bacillo tifico

e del vibrione colerigeno, che furono agglutinati una sola volta. La linfa ascendente si è mostrata capace di assorbire antigeni ed anticorpi; ma l'assorbimento di antigeni non dà luogo, nella linfa bruta, alla comparsa di anticorpi. Di fronte a questi fatti, C. e A. si mostrano molto scettici sulla presenza di veri anticorpi nelle piante: essi dicono che gli autori che hanno creduto di avere risultati positivi si sono trovati probabilmente di fronte a reazioni umorali pseudospecifiche, che sembrano molto diffuse nel regno vegetale; ma non si può dire se esse abbiano importanza nella immunità naturale od acquisita delle piante.

Volendo seguire quest'ultima tesi, che appare molto ragionevole, e non potendosi confutare i risultati dei molti autori che hanno constatata l'azione battericida di numerose piante, conviene pensare che fattori biologici ordinari di tali piante siano tanto sfavorevoli ai germi da provocarne la morte in breve tempo. Ma quali potrebbero essere questi fattori?

Politis (27) ritiene che la difesa naturale delle piante sia, almeno per la massima parte, affidata ai mitocondri. Egli dice che l'invasione parassitaria eccita i mitocondri, come si può rilevare dalla persistenza del colore verde negli aranci invasi dalla cocciniglia (colore che è dovuto ai cloroplastidi, che non sono altro che mitocondri altamente differenziati) e dalla produzione nelle piante parassitate di pigmenti antocianici e tannici, che possono probabilmente esplicare un ruolo nella difesa dei vegetali contro i parassiti: tale reazione varierebbe nelle diverse piante e, in una stessa pianta, nelle diverse parti di essa: ma Beauverie (28, 29) sostiene invece che i mitocondri ed i plastidi diventano più fragili a livello dei tessuti parassitati come si può giudicare dalla loro diminuita resistenza ad una soluzione di saponina.

Wagner (30), che abbiamo visto sostenitore convinto della presenza di anticorpi, dà anche grande importanza alla elevazione di acidità delle piante ammalate, che aggiungerebbe i suoi effetti a quelli degli anticorpi naturali: conviene aggiungere che la importanza del pH dei succhi delle piante nella resistenza di queste alle infezioni è ammessa dalla maggior parte degli autori; molti anzi spiegano la maggiore suscettibilità ad ammalare delle piante giovani col fatto che in queste i succhi sono neutri od alcalini, diventando acidi soltanto in seguito. A sua volta Stutzer (31) ammette che certe malattie delle piante siano favorite ad una acidità od alcalinità eccessive del suolo.

Per finire, ricorderemo che Petri (32) dà una grande importanza allo stato elettrico dei tessuti nel determinismo delle infezioni delle piante. Egli dice che la capacità elettrostatica dei tessuti dei vegetali viventi diminuisce notevolmente quando essi perdono la loro turgescenza. Questo fenomeno non è in rapporto soltanto con la struttura dei tessuti, considerati come dei condensatori elettrici; ma è determinato anche dalle proprietà dei colloidi idrofili organici, i quali isolati dall'organismo, possiedono allo stato fluido una capacità elettrostatica superiore a quella che presentano quando si riduce il loro grado di dispersione, per evaporazione dell'acqua o per coagulazione. In un tessuto vegetale elettricamente isolato ed al quale sia stata data una carica

elettrica determinata, l'aumento di potenziale consecutivo al disseccamento può essere assai notevole (passando da 160 a 191,30 volta in 40 minuti in una delle esperienze dell'A.). Queste variazioni di potenziale sono di grande interesse dal punto di vista delle condizioni che favoriscono od ostacolano l'attacco delle piante superiori da parte dei microrganismi parassiti; e P. ritiene che, nel caso in cui non appaia sufficiente la spiegazione chimica della sensibilità e della resistenza, si potrà con vantaggio sostituire, alla nozione vaga di una recettività particolare del citoplasma, lo studio dello stato elettrico dei costituenti dei tessuti della pianta.

\* \* \*

Come si vede, nessuna chiara luce illumina ancora il problema delle relazioni fra germi e piante: non sempre pare che queste si traducono in lotta; ed anche quando questa si verifica, il suo meccanismo è assai probabilmente diverso da quello, ormai abbastanza conosciuto, della lotta fra germi ed organismi animali, essendo fondato su fenomeni biologici molto differenti, e che variano da pianta a pianta. Ne deriva che la questione non può essere affrontata e risolta nel suo insieme, ma deve essere frammentata in tanti quesiti quante sono le specie vegetali, od almeno i gruppi di piante molto affini fra di loro: forse dal confronto di tante ricerche potrà anche scaturire un filo conduttore unico.

In considerazione di ciò, e tenendo naturalmente presente la maggiore importanza ed urgenza di tali ricerche sui vegetali destinati all'alimentazione dell'uomo, e specie su quelli che si consumano senza cottura, abbiamo voluto indagare sulla esistenza di un eventuale potere battericida dei succhi di alcuni ortaggi — quasi tutti consumantisi abitualmente crudi — su parecchi germi patogeni od ospiti abituali dell'intestino umano.

In una prima serie di esperimenti, sui risultati dei quali abbiamo riferito tempo fa in una nota alla Società Italiana di Biologia sperimentale (33), abbiamo saggiato il potere antibatterico del succo di broccoli di rape, indivia, lattuga, incappucciata, sedano, finocchio, sui seguenti germi: stafilococco aureo, vibrione colerigeno, bacillo tifico, bacillo dissenterico Shiga, colibacillo comune, *B lactis aërogenes*; osservando il risultato di un contatto prolungato al massimo per 24 ore sulla vitalità dei germi mescolati ai succhi filtrati per filtro di amianto Seitz.

Da questi esperimenti venimmo alla conclusione che non pare si possa parlare di una azione battericida del succo degli ortaggi, almeno tale da poter combattere un inquinamento massivo di essi; mentre l'azione antibatterica da noi riscontrata ci pareva da attribuirsi piuttosto alla naturale acidità dei succhi, efficace almeno sui germi più sensibili alla reazione del loro ambiente vitale.

Annunziavamo pertanto di avere istituito degli altri esperimenti, diretti a saggiare la vitalità degli stessi germi in soluzioni di acidi organici aventi

un pH equivalente a quello riscontrato nei succhi vegetali da noi esaminati. Su questa seconda serie di ricerche riferiamo qui.

\*\*\*

E' noto che tutti i succhi delle piante mostrano reazione nettamente acida al tornasole. Per ciò che riguarda i vegetali da noi esaminati, i valori trovati al comparatore di Hellige furono i seguenti: sedano, pH = 6,6; finocchio, pH = 6,2; lattuga, pH = 6,4; broccoli di rape, pH = 6,3; indivia, pH = 6,5; incappucciata, pH = 6,4.

Circa l'origine di tali acidi, caduta ormai quasi del tutto la ipotesi del Liebig, secondo la quale una parte almeno degli acidi vegetali sarebbe costituita da prodotti intermedi della fotosintesi clorofilliana, si ammette generalmente che tali acidi siano dei prodotti di ossidazione incompleta, specialmente degli zuccheri. Ne abbondano difatti particolarmente i frutti immaturi; mentre le alte parti della pianta ne contengono in assai minor quantità, che va ancora decrescendo dalle foglie verso le radici e dalla corteccia verso l'interno del fusto.

Variazioni dell'acidità, per una stessa pianta, si hanno anche durante le ore del giorno: in quelle notturne l'acidità tende a crescere, ed è massima nelle prime ore del mattino, per poi diminuire gradatamente, diventando minima a prima sera: ciò perchè la temperatura più elevata, l'azione catalitica della luce ed un maggior apporto di ossigeno per l'attività clorofilliana favoriscono l'ossidazione completa.

Secondo la classificazione fatta da Ravenna (34), gli acidi che possono riscontrarsi nelle piante sono assai numerosi, ed appartengono alle seguenti categorie:

1° *Acidi monocarbossilici saturi*: acido formico, acido acetico, acido butirrico, acido isobutirrico, acido isovalerianico, acido caprilico, acido pelargonico.

2° *Ossiacidi monocarbossilici saturi*: acido glicolico, acido lattico.

3° *Acidi monocarbossilici non saturi*: acido metilacrilico, acido angelico, acido sorbico.

4° *Acidi aldeidici*: acido gliossilico.

5° *Acidi bicarbossilici saturi*: acido ossalico, acido malonico, acido mesossalico, acido succinico, acido glutarico, acido adipico.

6° *Acidi bicarbossilici non saturi*: acido fumarico.

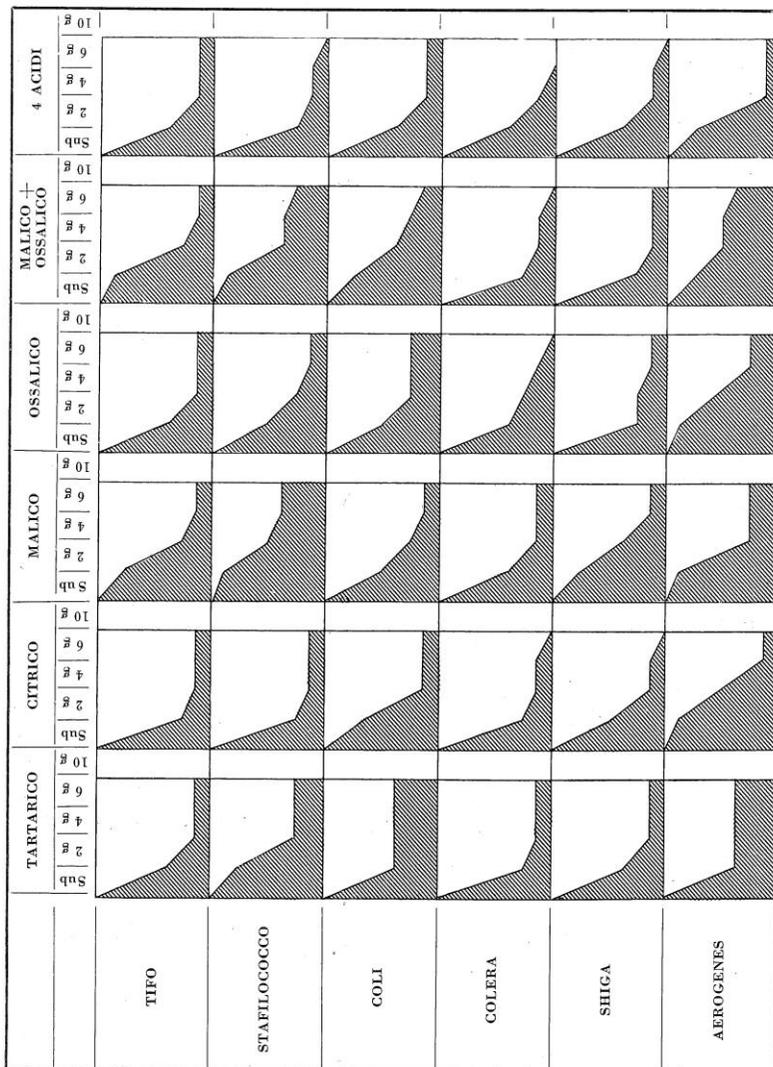
7° *Ossiacidi bicarbossilici*: acido malico, acido tartarico.

8° *Acidi tricarbossilici saturi*: acido tricarballylico.

9° *Acidi tricarbossilici non saturi*: acido aconitico.

10° *Ossiacidi tricarbossilici*: acido citrico.

A questi sarebbero da aggiungere alcuni acidi della serie grassa, come il palmitico, lo stearico, ecc.; delle serie non sature, quali l'oleico, il linoleico, ecc., che entrano nella composizione dei grassi; ed infine gli aminoacidi.



La maggior parte degli acidi summenzionati sono contenuti nelle piante in assai piccola quantità, oppure sono di diffusione non generale. Quelli che per la maggior diffusione e la maggior quantità in cui si ritrovano hanno particolare importanza sono: l'acido ossalico, l'acido malico, l'acido tartarico e l'acido citrico, che vengono pertanto considerati come i veri acidi delle piante.

Abbiamo perciò preparato delle diluizioni dei suddetti quattro acidi in acqua di fonte sterile, in maniera che esse venissero ad avere un pH equivalente a quello medio dei succhi degli ortaggi adoperati nel primo esperimento; e cioè  $\text{pH} = 6,5$ . Altre diluizioni sono state fatte con miscugli di tali acidi; e precisamente: una con acido ossalico ed una con tutti e quattro gli acidi; partendo da diluizioni equivalenti di ciascuno degli acidi, e mescolandole, in quantità uguali, in acqua di fonte sterile, sino ad aversi un  $\text{pH} = 6,5$ .

Le diluizioni degli acidi sono state distribuite in grossi tubi sterili, in ragione di 20 cmc. per ogni tubo; e per ciascun acido o miscela di acidi si è proceduto all'allestimento di una serie di tali tubi inquinati ognuno con una quantità uguale ed approssimativamente nota dei seguenti germi: bacillo tifico, stafilococco aureo, colibacillo, vibrione colerigeno, bacillo dissenterico Shiga, *aerobacter aerogenes*. A tal uopo, da sospensioni di detti germi valutate all'opacimetro di Welcome, veniva prelevata ed introdotta nei tubi la quantità sufficiente a dare la voluta concentrazione batterica (circa 10.000 germi per eme.).

Subito dopo, da ciascun tubo sono state allestite colture a piatto in scatole di Petri con agar semplice, usando 0,1 cmc. di liquido, il che avrebbe dovuto portare allo sviluppo approssimativo di 1000 colonie per scatola. Le cifre trovate dopo 24 ore di incubazione delle piastre in termostato a  $37^\circ$  si sono difatti molto sensibilmente avvicinate a tale numero di colonie.

I tubi inquinati sono stati tenuti a temperatura ambiente (media di  $15^\circ \text{C}$ ) ed all'oscuro. Dopo 2, 4, 6 e 10 giorni è stato ripetuto da ogni tubo; previa accurata agitazione del liquido, l'allestimento delle colture a piatto, con la stessa quantità di liquido; e si è proceduto, dopo 24 ore di incubazione delle piastre a  $37^\circ$ , alla numerazione delle colonie.

I risultati ottenuti, per ragioni di brevità e di chiarezza, vengono compendati nell'accluso prospetto diagrammatico; nel quale si ha subito una impressione visiva della vitalità dei vari germi nei diversi acidi o miscugli di acidi, corrispondente alla vastità della superficie tratteggiata.

Non è quindi necessario soffermarsi dettagliatamente su ogni singolo reperto: si può, in linea di massima, rilevare che il germe meno resistente si è dimostrato — come era da prevedere, e come già avevamo constatato nella prima serie dei nostri esperimenti — il vibrione colerigeno; seguito a breve distanza dal bacillo dissenterico di Shiga e quindi dal bacillo tifico: molto più resistenti si sono rivelati lo stafilococco ed il colibacillo, ed ancora di più *l'aërogenes*. Di tutti i germi saggianti si è avuta l'estinzione del solo vibrione colerigeno nella maggior parte degli esperimenti, entro un periodo dai 6 ai

10 giorni dalla sua introduzione nella soluzione acida; e solo una volta del bacillo di Shiga. Per tutti gli altri germi, dopo una riduzione iniziale, in genere notevolissima, del loro numero, si è avuta quasi una stabilizzazione dei risultati, con la sopravvivenza — fino almeno al 10° giorno di esperimento — di un numero più o meno notevole di cellule batteriche.

Il fatto che la distruzione dei germi non sia continuata nei giorni successivi con lo stesso ritmo dei primi giorni, ci ha indotti a fare delle ricerche per accertare se la reazione acida iniziale delle soluzioni fosse stata modificata dalla presenza dei germi. Difatti, la determinazione del pH del liquido di ciascun tubo, al 10° giorno di esperimento, ha fatto rilevare la neutralità od anche una leggiera alcalinità del liquido stesso; sicchè appare evidente che il rallentamento ed arresto della azione battericida delle soluzioni è da attribuirsi precipuamente alla loro neutralizzazione; sempre, si capisce, tenendo presente anche la diversa resistenza che cellule batteriche di una stessa specie possono offrire all'azione di fattori letali chimici e fisici.

Per ciò che riguarda la peculiarità di azione dei diversi acidi, possiamo notare che gli ossiacidi bicarbossilici (acido tartarico, acido malico) si sono dimostrati alquanto meno attivi degli altri; mentre le miscele di acidi, specie quella dei quattro acidi, hanno dimostrato un potere battericida nettamente superiore a quello dei singoli acidi.

Ciò ci induce a pensare che in natura, dove tali miscele sono di norma, si ritrovino condizioni paragonabili alle migliori che abbiamo potuto sperimentalmente determinare per ottenere la uccisione dei germi.

Naturalmente, questi esperimenti non hanno la pretesa di chiarire il meccanismo della difesa chimica dei vegetali quale può verificarsi *in vivo*: troppi altri fattori entrano in ballo in questo caso, sia a favore che a sfavore dei germi, perchè si possa non prenderli in considerazione. I nostri esperimenti, però, confermando l'importanza difensiva dell'acidità del succo delle piante, e precisandone in certo qual modo i limiti, vogliono chiarire uno solo dei lati della questione.

E' da supporre che nella pianta viva, dove gli acidi sono sempre parecchi e dove essi non possono certo venire neutralizzati come si è verificato nei nostri esperimenti *in vitro*, questo solo fatto debba costituire una condizione di assoluto sfavore non solo alla moltiplicazione, ma anche alla vita stessa di germi che non siano veri e propri patogeni delle piante; e che la loro distruzione avvenga entro un periodo di tempo relativamente breve. Nella prima serie dei nostri esperimenti noi vedemmo che non bastano poche ore perchè il succo degli ortaggi si autodepuri; ma anche in quel caso si trattava di esperimento *in vitro*. Si può pertanto ritenere che, se non poche ore, alcuni giorni debbano essere sufficienti alla pianta viva per effettuare tale depurazione.

Ci pare perciò di poter concludere che il pericolo di un inquinamento della compagine degli ortaggi da parte di germi patogeni per l'uomo, penetrati attraverso lesioni dei tessuti delle piante, se anche non deve ritenersi impossibile è certamente assai diminuito, e praticamente annullato, dalla possi-

bilità di autodepurazione di detti vegetali, fondata su meccanismi diversi, fra i quali è da annoverare in prima linea la naturale acidità dei loro succhi.

Resta naturalmente immodificata la questione, molto più preoccupante e complessa, dell'inquinamento superficiale; il cui annullamento è fondato su fattori ambientali esterni grandemente variabili, e sulla detersione che può operare l'uomo, di per sè stessa pericolosa e non sempre efficace.

#### AUTORIASSUNTO

Gli AA., in connessione e proseguimento di loro precedenti ricerche, e di altre compiute nello stesso Istituto, dirette a stabilire la importanza delle verdure quali veicoli di infezioni, hanno studiato la resistenza di parecchi germi patogeni in soluzioni di acidi organici vegetali aventi lo stesso pH dei succhi degli ortaggi che più comunemente si consumano crudi; venendo alla conclusione che l'acidità naturale di detti succhi è un fattore non trascurabile di autodepurazione, specialmente se si accompagna agli altri fattori che possono far sentire il loro peso nella pianta viva.

#### AUTOREFERAT

In Fortsetzung ihrer eigenen früheren Untersuchungen und in Einklang mit anderen Arbeiten des gleichen Institutes, welche den Zweck hatten die Bedeutung der Gemüse bei der Uebertragung von Infektionskrankheiten festzustellen, erforschten die Verff. die Resistenz einiger pathogener Keime in Lösungen von organischen Säuren vegetalischen Ursprungs, welche pH-Werte aufwiesen die jenen der Säfte von gewöhnlich roh konsumierten Gemüsen entsprachen. Die Verff. kamen dabei zur Schlussfolgerung, dass der natürliche Säuregrad dieser Säfte einen nicht unbedeutenden Autodepurationsfaktor darstelle, besonders in Verein mit den übrigen Faktoren die bei der lebenden Pflanze ins Gewicht fallen können.

#### BIBLIOGRAFIA

(1) *Savulescu T.* - L'immunité aux maladies bactériennes des plantes. « Arch. Roumain. de Pathol. exper. », IX, 209, 1936.

(2) *Mazzeo M. e Cianci V.* - Sulla possibilità di penetrazione di microrganismi nelle verdure. « Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. », XV, 567, 1940.

(3) *Kunkel L. O.* - *Plasmodiophora brassicae* as agent of disease of cabbages. « Jl. Agric. Resear. », XIV, 20, 1918.

(4) *Young P. A.* - Penetration phenomena and facultative parasitism in *Alternaria*, *Diplodia*, and other fungi. « Botan. Gaz. », LXXXI, 258, 1926.

(5) *Smith E.* - Are there bacterial diseases of plants? «Zentralbl. f. Bak-  
ter. », II, 5, 1899.

(6) *Riker A. J.* - Studies on the influence of some environmental factors  
on the development of crown-gall. «Jl. Agric. Resear. », XXXII, 83, 1926.

(7) *Robinson W. e Walkden H. A.* - A critical study of Crown-gall. «Ann.  
Bot. », XXXVII, 299, 1923.

(8) *Ben Hill f.* - The migration of *Bacterium tumefaciens* in the tissue  
of Tomato plants. «Phytopathology», XVIII, 553, 1928.

(9) *Rivera V.* - E' necessaria la ferita del tessuto per la produzione di  
tumori da *B. tumefaciens* sui vegetali? «Boll. Accad. Pugliese di Sc. A. », I,  
6, 1926.

(10) *Bose J. C.* - Physiologie de l'ascension de la sève. «Ed. Gauthier-  
Villars », Paris, 1927.

(11) *Korinek J.* - Intoxications par les microbes saprophytes chez les  
végétaux. «Zvladni otisk z. II rocniku casopisu "Preslia" », Vestnik Cesko-  
slovenské Botanické, Spolecnosti, 1922 (recens. Boll. Pasteur, XXI, 548, 1923).

(12) *Kobert R.* - Lehrbuch der Intoxikationen, I, 161; II, 695; 1902.

(13) *Mendel L. B.* - Vegetable agglutinins. «Jl. Biol. Chem. », VI, 19,  
1909.

(14) *Kritschewsky J. L.* - Ueber bakterielle Agglutinine und Präzipitine  
vegetablischer Herkunft in Zusammenhange mit der Frage über die Fähig-  
keit der Pflanzen Immunitätskörper zu produzieren. «Zeitschr. f. Immuni-  
tätsf. », XXII, 381, 1914.

(15) *Kritschewsky J. L.* - Ueber die Eigenschaften bakterieller Agglu-  
tinine und Präzipitine vegetablischer Herkunft. «Zeitschr. f. Immunitätsf. »,  
XXIII, 331, 1915.

(16) *Kritschewsky J. L.* - Hämolytins of vegetable origin. «Jl. Exper. Medic.  
», XXV, 1, 1917.

(17) *Wagner R. J.* - Ueber bakterizide Stoffe in gesunden und kranken  
Pflanzen. I. Mitt.: Die gesunde Pflanze. «Zentralbl. f. Bakter. », Zweite Abt.,  
XLII, 613, 1915.

(18) *Wagner R. J.* - Wasserstoffionenkonzentration und natürliche Im-  
munität der Pflanzen. «Zentralbl. f. Bakter. », Zweite Abt., XLIV, 708,  
1916.

(19) *Vigliano - Cortese I.* - Sulla presenza nella piante di sostanze agglu-  
tinanti, precipitanti, emolitiche ed antiemolitiche. «Boll. Ist. Sier. Milanese »,  
I, 116, 1922.

(20) *Arata M.* - Il meccanismo dell'immunità nei vegetali. «Boll. Ist.  
Sier. Milanese», XIV, 558 e 682, 1935.

- (21) *Duggar B. M. e Armstrong J. K.* - The effect of treating the virus of Tobacco mosaic with the juices of various plants. « Ann. Missouri Bot. Garden », XII, 359, 1925.
- (22) *Magrou J.* - L'immunité humorale chez les plantes. « Rev. Path. végét. et Entom. agr. », XI, 189, 1924.
- (23) *Magrou J.* - A' propos du pouvoir fongicide des tubercules d'Ophrydées. « Ann. Sc. nat. Botan. », 10<sup>a</sup> serie, VI, 266, 1924.
- (24) *Silberschmidt K.* - Studien zum Nachweiss von Antikörpern in Pflanzen. Beiträge zur Frage der Resistenz und Immunität von Pflanzen gegenüber dem infizierenden Agens der Viruskrankheiten. « Beiträge zur Biol. der Pflanzen », XX, 105, 1933.
- (25) *Gheorghiu I.* - Étude sur l'immunité chez les plantes. « Ann. Inst. Pasteur », LVII, 204, 1936.
- (26) *Carbone D. e Arnaudi C.* - Nuove esperienze sulle reazioni immunitarie delle piante. « Atti Soc. Ital. Sc. Nat. », LXIII, 269, 1924 e 351, 1925.
- (27) *Politis J.* - Immunité et hérédité chez les végétaux. « Rapp. al 3<sup>o</sup> Congresso internazionale di Patologia comparata », Atene, 1936.
- (28) *Beauverie J.* - La résistance plastidiale et mitochondriale et le parasitisme. « C. R. Acad. Sciences », CLXXII, 1195, 1921.
- (29) *Beauverie J.* - Sur les modes de dégénérescence des chloroplastes particulièrement dans le parasitisme. « C. R. Acad. Sciences », CLXXXIII, 141, 1926.
- (30) *Wagner R. J.* - Wasserstoffionenkonzentration und natürliche Immunität der Pflanzen. « Zentralbl. f. Bakter. », Zweite Abt., XLIV, 708, 1916.
- (31) *Stutzer A.* - Ein Beitrag zur Biochemie der Pflanzen. « Bioch. Zeitschr. », LXXX, 143, 1917.
- (32) *Petri L.* - Le proprietà elettriche dei tessuti vegetali viventi. « Boll. R. Staz. di Patol. veget. », VI, 71, 1926.
- (33) *Mazzeo M. e Marinelli G.* - Hanno i succhi degli ortaggi potere battericida? « Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. », XV, 730, 1940.
- (34) *Ravenna C.* - Chimica vegetale, «Ed. Zanichelli », Bologna, 1926.

