

Sulla macerazione biochimica della "Ampelodesma mauritanica, Dur. e Schinz, e sull'azione dei microbi alcali- tolleranti nella preparazione di paste cellulosiche.

Prof. S. Riccardo (Direttore)

(Ricevuto il 26 Maggio 1941-XIX)

I risultati di un primo contributo (1) hanno messo in chiaro come alcuni microrganismi possano resistere e svilupparsi ottimamente in liquidi contenenti dosi relativamente alte di carbonato sodico, contribuendo, indipendentemente dall'azione dell'alcali, all'opera di disintegrazione delle sostanze incrostanti la cellulosa.

Le esperienze di cui sopra venivano eseguite su di un materiale che, per la sua durezza, aveva resistito fin qui all'attacco di microrganismi pectinolitici. Lo stato di disgregazione raggiunto dai truciolini di tralci viticoli è stato tale da incoraggiare, non solo la sperimentazione con questa essenza legnosa, ma a provare anche su altre piante, che, per la presenza di silice o per altre cause, non si erano prestate finora ad una buona macerazione microbiologica, o biochimica nel senso antico della parola (*).

Fra queste ultime ve ne sono alcune, come l'ampelodesma (*Ampelodesma mauritanica* Dur e Schinz) e la ginestra di Spagna (*Spartium jun-ceum* L.), che hanno richiamato soprattutto la nostra attenzione.

L'ampelodesma è una pianta che viene denominata «lisca» in Liguria, «saracchi» in Toscana, «liama» o «ligàma» in Sicilia, per il suo uso più frequente, che è quello di fare legacci da viti e da covoni, nonchè cordicelle per confezionare il sartame delle tonnare. Ricordata da Plinio come «*herba, quam Siculi vocant Ampelodesmon*», venne denominata dal Link, nel 1827, *Ampelodesma tenax*, e da Durand e Schinz, nel 1895, *Ampelodesma mauritanica*.

Sulla macerazione microbiologica di questa pianta, non mi consta che siano state eseguite finora esperienze degne di rilievo. Bredemann (2), che elenca ben 90 piante esaminate, omette il nome dell'*Ampelodesma*.

Dal punto di vista chimico, invece, importanti esperienze sta svolgendo

(*) La *macerazione biochimica* è stata intesa finora nel senso che, in presenza di materiale cellulosico resistente all'attacco di microrganismi specifici, l'azione dell'alcali dovesse servire soltanto a rammollire il materiale, per farlo quindi (dopo abbondante e prolungato lavaggio con acqua) attaccare dai pectici in ambiente pressochè neutro.

il Prof. Palazzo (3) onde utilizzare le piante annuali quali sorgenti di cellulosa. L'illustre Autore così si esprime:

«Il materiale da noi sperimentato proveniva in parte dal territorio di Caltagirone (prov. di Catania), in parte dal territorio di Avola (prov. di Siracusa), dove era stato appositamente mietuto nell'estate scorsa.

«Data la grande affinità della pianta con lo sparto, anche nei riguardi di quelle applicazioni che dipendono dai caratteri delle fibre, doveva sembrare ovvia la possibilità di utilizzarla per la fabbricazione della cellulosa, applicando il processo tipico alla soda o quello al solfato, quali s'impiegano all'estero per la lavorazione dello sparto africano, oppure il processo Cataldi-Pomilio ad alcali e cloro. Ma, per quello che abbiamo già rilevato a proposito di quest'ultimo, le nostre esperienze miravano sostanzialmente a limitare il consumo di soda, e con esse abbiamo perciò cercato di isolare una cellulosa greggia applicando un trattamento alcalino piuttosto blando, seguito da altri trattamenti meccanici e chimici (con esclusione del cloro gassoso e dell'acqua di cloro), ed in ultimo quello con la soluzione d'ipoclorito di calcio.

«Il trattamento alcalino, destinato soprattutto a predisporre il materiale all'azione di altri reattivi, si effettuava con liscivie molto deboli, contenenti solo 1% NaOH, e perciò alquanto più diluite delle liscivie adoperate nel processo Cataldi-Pomilio per la lavorazione dello sparto, le quali contengono per solito da 2 a 2,5 % di soda caustica. Così pure erano diverse le condizioni di temperatura, giacchè nel suddetto processo la lisciviazione viene eseguita a temperatura inferiore a 100°, mentre nelle nostre esperienze il trattamento alcalino avveniva a temperatura più alta, operando sotto la pressione di 2-2,2 atmosfere.

«... Mentre con simile trattamento il nostro materiale era sufficientemente predisposto all'azione successiva di altri reattivi, ma molto lontano ancora da quel grado di disincrostazione che può competere ad una cellulosa industriale, sia pure nello stato greggio, cuocendo in modo analogo la stessa materia prima con una soluzione d'idrato sodico di concentrazione doppia, ossia al 2, abbiamo ottenuto un prodotto che riteniamo possa trovare utile applicazione anche come tale, e cioè, come « mezza-pasta », analoga ai prodotti che possono attenersi dalle varie paglie con l'impiego di calce, ma di colorito più chiaro, e di solidità maggiore ».

Da quanto sopra appare evidente che, oltre all'azione dell'alcali, interviene anche quella del calore, fino a raggiungere le due atmosfere di pressione.

Il materiale da noi adoperato proveniva dal mercato di Randazzo (provincia di Catania), dove è noto col nome volgare di « ligamello », dal largo uso che se ne fa per legare i tralci delle viti, ed era rappresentato da foglie lineari, lunghissime (raggiungenti fino 1 metro e mezzo) convolte, tenaci, ruvido-taglienti al margine.

Le prove di macerazione colla ginestra, utilizzando alcuni fra i ceppi alcali-tolleranti isolati, miravano ad osservare se l'epidermide e la cuticola delle vermene, resistenti alla macerazione rustica o industriale (culture pure di pectici aerobici o anaerobici) potessero essere attaccate, e quindi facilmente liberate, dopo essiccazione, colla sola operazione della *scotolatura*.

È noto, infatti, come la ginestra — per la struttura anatomica dei suoi fusti — si accosti più alla ramia che al lino ed alla canapa, per la resistenza dell'epidermide e della cuticola alla macerazione biologica. Si sa, inoltre, che la *scotolatura* della ginestra macerata e seccata richiede maggiori sforzi della *scotolatura* della canapa e del lino, che non ha altro scopo che di allontanare il legno dalle fibre, ossia dividere due materie molto eterogenee: mentre che l'epidermide della ginestra si toglie bene solo con una *pettinatura*, operazione che ha altra finalità, e cioè quella di togliere le fibre corte o recise.

Del resto, anche la macerazione rustica è già per conto proprio (almeno in Calabria e in Basilicata), una operazione non solamente biologica (macerazione all'acqua corrente o stagnante), ma anche fisico-chimica, richiedendo una bollitura preventiva dei rami.

In quanto ai processi di macerazione usati per la ginestra, Trotter (4) riferisce che esperienze di carattere industriale avrebbero dato risultati soddisfacenti con il trattamento seguente: lessiva al 20 % di soda caustica in rapporto al peso del vegetale secco; pressione di 3-4 kg.; durata della cottura 6 ore; imbianchimento al 15% di cloruro di calce.

Sulla macerazione chimico-microbiologica della ginestra, Rovesti (5) così si esprime:

« È stato rilasciato il brevetto industriale n. 361938, in data 8 agosto 1938, a Federico Chiarabba di Milano per un processo di macerazione enzimatica della ginestra e altre fibre tessili, secondo il quale gli inconvenienti del processo di macerazione microbiologica sarebbero eliminati, in quanto si fa subire al materiale da macerare un trattamento chimico a temperatura ordinaria, o leggermente aumentata, con soluzioni molto diluite di sostanze chimiche tali da intaccare leggermente le parti protettive degli steli delle piante, per consentire una penetrazione degli agenti microbiologici entro gli steli stessi, così che la macerazione possa aver luogo in modo completo.

« Un leggero aumento della temperatura renderebbe più rapido questo trattamento chimico preventivo. Si realizzerebbero così tutti i vantaggi della macerazione enzimatica, mentre si renderebbe possibile il trasporto ai centri di raccolta della fibra greggia, anzichè delle fascine di steli che sono molto voluminose. Le fibre sono poi sciacquate in soluzioni chimiche proprie, per impedire che esse si incollino fra di loro durante l'essiccazione. Questa operazione di sciacquatura non è però necessaria.

« Esempio: in una fossa riempita di acqua si aggiunge 0,3% circa di carbonato sedico in polvere, sul volume totale del liquido. Si immergono quindi le fascine di rametti di ginestra, e si mantengono completamente sommerse mediante pietrame. Dopo quarantotto ore le fascine vengono tolte e lavate con acqua; quindi passate al macero microbiologico.

Dopo questa macerazione si lavano con soluzione acquosa al 0,1% di formalina o di allume di rocca, perchè abbia luogo una coagulazione degli ultimi residui di collosità fra le fibre ».

Ma quella che oggi ha preso il sopravvento è indubbiamente la *macerazione chimica* perchè più rapida, e per la difficoltà — come abbiamo ricordato innanzi — che presentano i rametti di liberare la fibra dalla resistentissima pellicola corticale.

« È verso l'uso esclusivo della soda caustica (idrato sodico) — scrive Ro-vesti — che si è orientata l'industria della ginestra, ed infatti, con questo reagente, si ha una macerazione che non abbisogna di maciullatura, di scotolatura e di schiacciamento dei rametti e che è rapidissima, perchè può durare un'ora al massimo. Tale macerazione che più propriamente deve nominarsi fisico-chimica, si realizza facendo bollire i rametti in caldaie a superficie libere o sotto la pressione di atmosfere 1-1 ½ (autoclavi) e riempite per circa ¾ del loro volume di acqua nella quale sia stata sciolta la soda caustica. La proporzione della soda è variabile alla stregua dell'età dei rametti, ma generalmente, prendendo ad esempio un quantitativo di essi di 3 quintali, occorrono 30 Kg. di soda sciolta in 1.500 litri di acqua. Terminata la macerazione, nelle stesse caldaie o autoclavi, si compiono poi successivamente altre cinque macerazioni aggiungendo ogni volta il liquido residuo di altri 15 Kg. di soda caustica e di 150-170 litri di acqua. In ognuna delle caldaie o delle autoclavi, compiute le sei macerazioni, rimangono circa 1.500 litri di acqua non più razionalmente utilizzabile per altre macerazioni. Alcuni aggiungono anche ad ogni ettolitro di soluzione sodica da 20 a 30 gr. di comune colla da falegname ».

Secondo Antoniani (6), per la ginestra, il procedimento chimico sarebbe l'unico capace di consentire un integrale sfruttamento della materia prima. L'A., però, non si nasconde che la macerazione chimica porta a perdite assai forti di alcali, in dipendenza della cospicua quantità di liscivia che impregna e aderisce alla massa di vermene cotte, al momento della loro estrazione dalla caldaia. E questa liscivia, andando direttamente alle vasche di lavaggio, sfugge ad ogni possibilità di recupero.

Nella Campania, per quanto ci consta, lavorano col procedimento chimico tre Stabilimenti, e precisamente:

- 1) S.T.O.L.A. - Società Tessiture Ottavianesi Lanza An., in Ottajano (Napoli);
- 2) Gennaro Boccia, in Terzigno (Napoli);
- 3) S. A. Meridionale Fibre Autarchiche (S.A.M.F.A.), Napoli, con Stabilimento in Avella (Avellino).

Prima di esporre i risultati delle esperienze eseguite coi tralci di vite, coll'ampelodesma e colla ginestra, crediamo opportuno di riportare i principali caratteri morfologici, colturali e biochimici di due microbi alcali-tolleranti, fra quelli isolati dalle liscivie di rifiuto della lavorazione della cellulosa col metodo cloro-soda, nel primo contributo (1).

MICROORGANISMO 1.

PROPRIETÀ MORFOLOGICHE E CULTURALI

Aspetto microscopico. - Batteri mobili, delle dimensioni medie di μ 1,9x0,4. Possono però assumere la forma di lunghi filamenti, i quali appaiono numerosi soprattutto nei substrati con reazione decisamente alcalina, per aggiunta di carbonato sodico.

Colorabilità. - Buona coi colori basici di anilina, ed anche con eritrosina fenicata. Non resiste al Gram.

Comportamento rispetto all'ossigeno e alla temperatura. - Aerobio; si sviluppa bene sia in termostato che alla temperatura dell'ambiente. *L'optimum* è 34°-35° C.

Infissione su gelatina ordinaria. - Sviluppo scarso, anche dopo molti giorni, e assenza di fluidificazione.

Strisciamento su agar comune (pH = 7,0). - Sviluppo discretamente abbondante, con formazione di patina poco rilevata, bianchiccio-sporca, a consistenza butirrosa, con margini lobato-sinuosi, un po' rilevati, e a lucentezza grassa.

Strisciamento su agar comune-alcalino (1,5 di Na₂CO₃). - Sottile patina mucosa, a lucentezza umida. Al microscopio predominano le forme lunghe con tendenza a raggomitolarsi

Brodo comune (pH = 7,0). - Dopo 72 ore a 34° C., liquido torbido, senza velo superficiale. Assenza di deposito al fondo. Al microscopio, con preparato a fresco, piccoli batteri isolati ed anche lunghi filamenti, che fanno ricordare il *Plocamobacterium bulgaricum* L. et N., dotati di movimento serpeggiante.

Nel preparato colorato con fucsina diluita 1 : 5, i lunghi filamenti risultano formati da corti batteri e sono avvolti da una capsula mucilagginosa, che rimane sbiadita rispetto al rosso vivo delle cellule batteriche.

Brodo comune, con aggiunta dell'1% di Na₂CO₃. - Dopo una settimana di incubazione a 34° C., sviluppo più abbondante che in brodo comune, con tendenza, da parte dei batteri, ad assumere la forma di lunghi filamenti. Questi, dopo 40 giorni di termostato, tendono per lo più ad intrecciarsi a gomitolo, ed il liquido diventa alquanto mucilagginoso e filante. Aumentando, progressivamente fino al 2%, il carbonato di sodio nel substrato nutritivo, lo sviluppo del microorganismo appare dapprima più lento, e poi alquanto stentato, con comparsa di forme atipiche, difficilmente colorabili e che fanno pensare a cellule morte o in via di disfacimento (si veda fig. 2).

Latte (pH = 6,5). - Sviluppo scarso o nullo, e assenza di coagulo. Nessun cambiamento nella reazione dopo 7 giorni di termostato a 34° C.

Infuso di canapa, con frammenti (pH = 6,8). - Sviluppo scarso e macerazione appena incipiente dopo una settimana di termostato a 34° C. Il grado di macerazione non progredisce nemmeno dopo 10 giorni.

Infuso di canapa, con frammenti sterilizzati con H₂O₂, e aggiunta del 0,2% di Na₂CO₃ ().* - Sviluppo abbondante, e macerazione dopo una set-

(*) Si è voluto di proposito eliminare la sterilizzazione con l'autoclave, la quale di per se tende a modificare la struttura dei frammenti vegetali.

La sterilizzazione a freddo con perossido d'idrogeno al 3%, e successivo abbondante lavaggio con acqua sterile, è largamente usata nel nostro Istituto per le esperienze sulle tessili, ottenendo sempre ottimi risultati dal punto di vista della sterilità, rilevati dai controlli su patata e in brodo. La soluzione di carbonato di sodio veniva preparata separatamente e distribuita in tubi, ai quali, dopo sterilizzazione in autoclave, venivano aggiunti, colle dovute precauzioni dell'asepsi, i frammenti di canapa sterilizzati a freddo.

timana a 34° C. (**). Al microscopio, con preparato a goccia pendente, batteri mobilissimi, dotati di movimento serpeggiante. Accanto alle forme di dimensioni medie (μ 1,9x0,4), ve ne sono altre formanti lunghi filamenti, che, colorati sia con colori basici (fucsina Ziehl dil. 1 : 5) che con colori acidi (eritrosina fenicata), mettono in evidenza le stesse caratteristiche riscontrate in brodo comune, e cioè sdoppiamento in corti batteri, i quali risultano av-volti da una sottile capsula mucilagginosa. Nei preparati fatti dopo quindici giorni predominano le forme lunghe, senza assumere però la forma di go-mitolo come avviene in presenza di dosi maggiori di Na_2CO_3 .

Patata comune, in tubo di Roux. - Assenza di sviluppo.

Patata alcalina. - Modificando la naturale reazione acida della patata (immergendo i tasselli in soluzione di carbonato sodico al 2% fino a far assumere ai medesimi un color cioccolato-chiaro, dopo la sterilizzazione all'autoclave), si ha sviluppo uniforme e abbondante su tutta la superficie dello striscio, con formazione di patina a lucentezza grassa, che, asportata con l'ansa, ha un colore tendente al marrone. Al microscopio, predominano i piccoli batteri. Le forme lunghe non raggiungono mai le dimensioni che si notano nei substrati liquidi alcalini.

RESISTENZA AGLI AGENTI FISICI. - La resistenza al calore è stata provata sottoponendo il microorganismo all'azione del calore secco e del calore umido, mentre le prove di essiccamento venivano fatte imbevendo delle striscioline di carta bibula sterili con brodocoltura di 72 ore bene emulsionata. Le striscioline, contenute in scatola Petri sterili, venivano quindi essiccate in un comune essiccatore ad acido solforico, tenuto a temperatura ambiente ed allo scuro.

Nella tabella 1 sono riportati i vari risultati ottenuti.

ATTIVITÀ CHIMICHE.

Omettiamo la descrizione dei metodi seguiti perchè troppo noti. Per ciò che riguarda produzione di idrogeno solforato, di indolo e di fenolo, è risultato positivo soltanto il primo prodotto.

In quanto agli enzimi presi in considerazione (amilasi, invertina, catalasi, presame, tripsina, pectinasi, pectolasi), si è notata soltanto produzione di catalasi.

Per la ricerca della *pectinasi* del Jones (7) (capace di sciogliere la lamella mediana del *sisaro* nelle colture del suo *B. carotovorus*) si è seguito il metodo basato sulla separazione delle culture viventi dai loro prodotti mediante candele di Chamberland e la pressione della pompa Gay-Lussac, facendo agire

(**) È noto come la stessa quantità di Na_2CO_2 , aggiunta in provettoni contenenti acqua e frammenti setici di canapa, sia capace di abbreviare sensibilmente il tempo di macerazione della tessile se i provettoni sono tenuti ad una temperatura di 32-34° C. La medesima dose di alcali, d'altra parte, può da sola macerare la canapa in tubi, se questi ultimi vengono sottoposti all'azione dell'autoclave a 120° C. per 20 minuti. Non altrettanto avviene, invece, quando l'alcali si trova in presenza di frammenti di canapa sterilizzati a freddo con H_2O_2 : la sua azione sulle sostanze pectiche si svolge più lentamente, e si protrae più o meno a lungo a seconda della dose di alcali e della temperatura di incubazione.

TABELLA I

Età coltura (mesi)	TEMPERATURA AMBIENTE			CALORE SECCO				CALORE UMIDO				ESSICCAMENTO				
	Substrato nutritivo	Substrato usato nei passaggi	Esito sviluppo Temperatura	Stufa a secco (gradi centigr.)	Durata riscaldamento (minuti)	Substrato usato per lo sviluppo	Esito sviluppo per lo sviluppo	Temperatura bagnomaria (gradi centigr.)	Durata riscaldamento (minuti)	Substrato usato per lo sviluppo	Esito sviluppo	Apparecchio usato	Durata essiccamento (giorni)	Substrato usato per lo sviluppo	Esito sviluppo	
3	brodo comune (pH = 7,0) brodo comune (+1 % Na ₂ CO ₃)	Patata alcalina in tubo di Roux	+	45	10 ¹	Patata alcalina in tubo di Roux	+	45	10 ¹	Patata alcalina in tubo di Roux	+	Essicatore ad acido solforico	5	Brodo comune (pH = 7,0)	+	
					30 ¹				30 ¹							
					60 ¹				60 ¹							
5	brodo comune brodo comune (+1 % Na ₂ CO ₃)		+	50	10 ¹		+	50	10 ¹		+	»	10	»	+	
					55				55							
					60 ¹				60 ¹							
7	brodo comune brodo comune (+1 % Na ₂ CO ₃)		+	55	10 ¹		+	55	10 ¹		+	»	20	»	+	
					60 ¹				60 ¹							
					70 ¹				70 ¹							
9	brodo comune brodo comune (+1 % Na ₂ CO ₃)		+	60	10 ¹		+	60	10 ¹		-	»	45	»	+	
					65				65							
					70				70							

il filtrato- sterile su frammenti sterilizzati a freddo, con H₂O₂: il filtrato è risultato sempre inattivo.

Anche le prove eseguite, secondo la tecnica di Carbone (8-9), per la ricerca della *pectolasi*, adoperando pectina liquida della ditta C. Erba, diluita al 10%, hanno dato esito negativo.

Non del tutto chiarito appare ancora, pertanto, il modo d'azione di alcuni microorganismi nell'attacco delle piante tessili. D'altra parte è noto come anche sull'esistenza di vere diastasi pectiche segregate da cellule vegetali non isolate, appartenenti a tessuti ed organi di piante più o meno superiori, veri concetti precisi non si abbiano ancora; nello stesso modo eancora insoluta è la questione della digestione della cellulosa nell'intestino animale, nel senso che ancora non sappiamo la parte che spetti in tale processo ad eventuali enzimi di origine glandulare e quella che spetti alla flora intestinale.

La costituzione chimica delle pectine, d'altronde, è stata stabilita solo ora dai recenti, classici lavori di Felix Ehrlich (10-11), i quali dimostrano come queste possano variare da una pianta all'altra, ed anche per ogni singola pianta o sua parte, a seconda dell'età dei suoi tessuti o di altre circostanze ancora inesplorate.

L'azione sulla lignina e sulla cellulosa è stata saggiata usando il metodo di Waksman e Cordon (12), i quali preparano una miscela ben definita di lignina e cellulosa, versando una soluzione concentrata di lignina in alcool etilico su fibre secche di carta da filtro, ed evaporando quindi l'alcool a 60° C. La miscela di cellulosa-lignina viene -frequentemente agitata durante l'evaporazione dell'alcool, in modo da far ricoprire completamente la cellulosa con la lignina. Due grammi di questa lignina-cellulosa, seccata all'aria, e 100 gr. di sabbia lavata vengono messi in Erlenmeyer da 250 cc., dove si versano 20 cc. di acqua contenente 100 mgr. di NaNO₃, 100 mgr. di K₂HPO₄, 50 mgr. di MgSO₄ e tracce di FeCl₃. Gli Erlenmeyer vengono, quindi, sterilizzati e insemenzati con culture pure di eumiceti o di schizomiceti.

Gli AA. preparano anche una serie parallela per lo studio sulla cellulosa, mettendo in ogni Erlenmeyer gr. 1,5 di cellulosa e 100 gr. di sabbia, oltre, bene inteso, i sali minerali di cui sopra.

Dopo sei mesi a 28° C., il dosaggio della lignina e della cellulosa non decomposte indicherà la misura del processo di decomposizione posseduto dai microorganismi in esame.

Nelle prove da noi eseguite, non si è avuto decomposizione nè di lignina nè di cellulosa.

I risultati sulla variazione della concentrazione idrogenionica in presenza di idrati di carbonio ed alcoli polivalenti, nonchè quelli del potere fermentativo, sono riportati nella Tab. 2.

Confrontando alcuni caratteri rilevati nel microorganismo da noi isolato coi corrispondenti del *Bacterium faecale alcaligenes* Petruschky, di *Escherichia alcalescens* Ford, e di *Escherichia anindolica* Lembke, si nota quanto appresso:

Microorganismi	Mobilità Coagulazione del latte	Coltura su patata comune a reazione naturale acida	Sviluppo di gas in brodo glucosato	Agar al rosso neutro	Fluidificazione gelatina	Indolo	Osservazioni
Microorganismo 1	+ —(1)	—	—	rosso invariato	—	—	(1) Sviluppo scarso o nullo e reazione invariata.
<i>Bact. faecale alcali- genes</i>	+ —(2)	+ (patina bruna)	—	»	—	—	(2) Sviluppo buo- no, e reazione deci- samente alcalina.
<i>Escherichia alcali- scens</i>	+ —	+ (p. giallognola)	+	»	—	—	
<i>Escherichia anindo- lica</i>	+ +	+ (p. biancastra)	+	decolorato fluorescente	—	—	

Da quanto sopra appare evidente come il *Micror. 1* e il *Bact. faecale alcaligenes* (non prendendo in considerazione le due *Escherichia*, le quali sviluppano gas da glucosio) si differenzino soprattutto per il fatto che, mentre il *Micror. 1* non sopporta i substrati a reazione acida, il *Bact. alcaligenes* li sopporta benissimo, dando luogo ad uno sviluppo rigoglioso su patata comune, facendole assumere un colorito bruno. Lo stesso dicasi per il latte, che viene alcalinizzato da quest'ultimo dopo pochi giorni di termostato a 36°-37° C.

In quanto al *Bact. coli alcaligenes* di Chiari e Löffler (1925) siamo d'accordo con Lipska (13) che tale specie non abbia motivo di esistere perchè l'alcalinizzazione e la decolorazione dell'agar di Endo possono essere causate da influenze biochimiche dei colibacilli e possono aver luogo anche in culture monocitogenetiche.

Il microorganismo 1 si differenzia, poi, sostanzialmente dai ceppi 108, 116 e 134 studiati da Mossevich (14) perchè questi ultimi sono sporigeni, e due di essi fondono anche la gelatina. Il ceppo 116 di Mossevich ha in comune col batterio da noi isolato l'assenza di sviluppo in latte e su patata comune, nonchè assenza di produzione di acidi dagli zuccheri. Anche il ceppo 108 di Mossevich non si sviluppa su patata, ma coagula il latte.

Nè vi è corrispondenza coi cinque ceppi anaerobi facoltativi isolati da Kayser e Delaval (15), asporigeni e mobili del gruppo del *Bact. coli*, capaci, secondo gli AA., di decomporre la pectina, perchè tutti fermentano i monosi e i disaccaridi.

È noto, d'altra parte, come a causa della loro instabilità fisiologica e del loro enorme potere di adattabilità alle più svariate condizioni, molte specie batteriche non si prestino facilmente ad essere determinate e classificate. Così dicasi, per es., per molte specie appartenenti ai generi *Alcaligenes* (*), *Rhizobium*, *Chromobacterium* e *Phytomonas*.

(*) Conn, Wolfe e Ford propongono di riunire nella famiglia *Rhizobiaceae* i tre generi: *Rhizobium*; *Chromobacterium*; *Alcaligenes*. Quest'ultimo comprenderebbe i sapro-fiti non cromogeni. Specie-tipo: *Alcaligenes faecalis* (Petruschky) Castellani e Chalmers. I limiti di questo genere sono attualmente imprecisati (alcuni parassiti delle piante, in particolare le specie attualmente denominate *Phytomonas rhizogenes* e *Ph. tumefadens*, sono molto vicine alle specie dei generi *Rhizobium* e *Alcaligenes*).

TABELLA 2

Brodo comune con aggiunta del 2% di	Reazione iniziale (pH)	Età della coltura e concentrazione idrogenionica (temperatura termostato: 34° C.)							Potere fermentativo	Osservazioni
		2 giorni (pH)	3 giorni (pH)	4 giorni (pH)	5 giorni (pH)	6 giorni (pH)	7 giorni (pH)			
Glucosio	7,0	7,0	7,2	7,2	7,2	7,2	7,3	—	—	
Levulosio	»	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	—	sviluppo molto scarso	
Galattosio	»	7,0	7,0	7,0	7,3	7,3	7,3	—	—	
Saccarosio	»	7,0	7,0	7,0	7,2	7,2	7,2	—	—	
Maltosio	»	7,0	7,0	7,2	7,3	7,2	7,2	—	—	
Lattosio	»	7,0	7,0	7,2	7,4	7,3	7,4	—	—	
Raffinosio	»	7,0	7,0	7,2	7,5	7,4	7,4	—	—	
Arabinosio	»	7,0	7,0	6,9	7,0	7,1	7,1	—	—	
Xilosio	»	7,0	7,0	7,0	7,2	7,2	7,2	—	—	
Destrina	»	7,0	7,0	7,1	7,0	7,2	7,2	—	—	
Amido	»	7,0	7,0	6,9	6,9	6,9	7,0	—	—	
Mannite	»	7,0	7,0	7,0	7,0	6,9	6,9	—	sviluppo molto scarso	
Glicerina	»	7,0	7,0	7,0	6,9	7,0	7,0	—	sviluppo molto scarso	

Il microrganismo da noi isolato riteniamo debba rientrare nel nuovo genere *Alcaligenes* proposto da Conn, Wolfe e Ford (16).

MICROORGANISMO 2.

È un pectinolitico appartenente alla « sammelspecies » *Bac. mesentericus vulgatus* Flügge.

È noto come, fra i microbi mesofili, alcuni di quelli appartenenti al gruppo dei *mesenterici* siano capaci di dissolvere la lamella mediana delle fibre del lino, come hanno messo in rilievo Beijerinck e van Delden fino dal 1904 (17).

Tralasciando la descrizione dei principali caratteri morfobiologici ben noti di questi microbi, ci soffermiamo sul modo di comportarsi del ceppo isolato nelle culture su papata, e sulle sue proprietà pectinolitiche e fermentative.

Patata a reazione naturale acida, contenuta in tubo di Roux. - Non sempre si notano gli stessi caratteri circa la forma della patina di sviluppo e il colore più o meno marcato che tende ad assumere il tassello. La tipica forma della patina, a pliche più o meno rilevate e sinuose, e a consistenza mucosa, molte volte appare quasi omogenea e liscia, a lucentezza un po' umida nelle prime 48-72 ore di sviluppo, e solo dopo molti giorni appare una lieve increspatura; talvolta le pliche compaiono subito, altre volte, invece, la patina è sottile e appena appariscente, e la patata acquista un colore marrone più o meno carico. In culture vecchie di 5-6 mesi, si notano spesso dei puntini bianchicci disseminati sulla superficie di sviluppo e sul resto del tassello, che, esaminati al microscopio, risultano formati da ammassi di spore.

Queste variazioni colturali su patata comune sono dovute, evidentemente, alla varietà della patata che si adopera (tuberi a polpa bianca o a polpa gialla, appena estratti dal terreno o di vecchia data, ecc.) nonché alle variazioni dell'ambiente termico. Il che è provato dal fatto che si verificano anche con culture monocitogenetiche.

Patata alcalinizzata con Na_2CO_3 fino a farle assumere un color cioccolato al latte dopo sterilizzazione. - Lo sviluppo è abbondante, con patina per lo più mucosa, a lucentezza umide con lievi increspature superficiali. Anche qui si possono, però, avere tutte le variazioni riscontrate nella patata naturale per quanto riguarda la conformazione della patina di sviluppo, la quale qualche volta si presenta opaca, esile, con rilievi pressochè nulli. Nelle vecchie colture compaiono spesso, come nelle patate naturali, molti puntini bianchicci (ammassi di spore).

Patata cruda e sterile in acqua sterile. - In tubi di acqua sterile si aggiungevano, colle dovute precauzioni dell'asepsi, pezzettini interni di patata, i quali si ricavavano tagliando con coltello rovente i tuberi — previo abbruciamento della superficie esterna dei medesimi alla fiamma di un becco Bunsen — operando sotto un coperchio di campana di Tyndall provvisto di carta bibula imbevuta d'acqua. È ovvio dire che, prima dell'inseminamento, i tubi subivano la prova del termostato ad una temperatura di 37° C. per 48 ore.

In questo substrato lo sviluppo è abbondante, con formazione di mem-

brana superficiale più o meno increspata e resistente allo scuotimento. Dopo 15 giorni di termostato a 34° C., si osserva una lieve dissoluzione del tassello, il che sta ad indicare che il microrganismo in questione è dotato di un certo potere amilolitico.

Mentre le prove eseguite per la ricerca della *pectinasi* del Jones hanno dato esito negativo, quelle fatte usando la tecnica di Carbone per la *pectolasi* hanno dato esito positivo.

Si sviluppa bene negli infusi di canapa e di lino, ed i frammenti vengono macerati dopo 6-7 giorni a 34°-35° C.

Se alla sterilizzazione con l'autoclave viene sostituita quella con H₂O₂, e nel liquido di macerazione si aggiungono piccole dosi (0,2-0,3%) di Na₂CO₃ il tempo di macerazione viene sensibilmente ridotto, e il microrganismo si sviluppa abbondantemente tollerando molto bene l'alcali aggiunto (*).

Le prove fatte sulla lignina e sulla cellulosa, seguendo le istruzioni di Waksman e Cordon, hanno dato esito negativo. Anche prolungando fino a 10 mesi la permanenza degli Erlenmeyer in termostato a 28° C., i risultati non sono stati tali da far ritenere che il microrganismo in questione possa svolgere un'azione decomponente sulla lignina pure, in condizioni che facciano escludere la presenza di liquidi alcalini.

In quanto al potere fermentativo dei principali idrati di carbonio ed alcoli polivalenti, il microrganismo ha dato i seguenti risultati, rilevati dopo una settimana di incubazione a 34° C.

Agar-glucosio e brodo comune glucosato (pH = 7,0). — L'infissione in agar ha dato sviluppo abbondante di patina superficiale con pliche poco rilevate, di color marrone chiaro; assenza di gas. Il terzo superiore del tubo ha assunto un colore più marcato. In brodo, liquido torbido e assenza di bollicine. Concentrazione idrogenionica = pH 6,9.

Agar e brodo comune più levulosio (pH = 7,0). — In agar, sviluppo discreto in superficie con patina molto lievemente increspata solo al punto d'infissione; assenza di gas. In brodo, liquido poco torbido, con sottile patina superficiale a pliche appena incipienti; assenza di bollicine; pH = 7,0.

Agar e brodo comune più galattosio (pH = 7,0). - In agar, sviluppo abbondante in superficie, con pliche discretamente rilevate. Il terzo superiore dell'agar si è colorato in marrone scuro; assenza di gas. In brodo, abbondante sviluppo superficiale e assenza di bollicine; pH = 7,6.

Agar e brodo comune più maltosio (pH = 7,0). - In agar, sviluppo abbondante in superficie, con pliche molto rilevate, di colore tendente al marrone; colore dell'agar accentuato verso il marrone scuro nel terzo superiore del tubo; assenza di gas. In brodo, assenza di bollicine e sviluppo abbondante in superficie; pH = 7,4.

Agar e brodo comune più saccarosio (pH = 7,0). - In agar, sviluppo abbondante in superficie, con pliche un po' meno rilevate che in agar-maltosio;

(*) Coltivato in brodo comune, con aggiunta del 0,6 e 0,8 % di Na₂CO₃, si è sviluppato in tutti i tubi con abbondante membrana superficiale, bianchiccia, increspata, e alquanto resistente all'agitazione. Solo in tubi contenenti l'1% di Na₂CO₃ lo sviluppo è stato alquanto stentato, con scarsa membrana superficiale, lievemente increspata.

assenza di gas. In brodo, niente bollicine, liquido poco torbido e abbondante sviluppo superficiale; pH = 7,2.

Agar e brodo comune più lattosio (pH = 7,0). - In agar sviluppo superficiale piuttosto scarso, con patina sottile e poco increspata, di color bianchiccio-sporco; assenza di gas. In brodo, assenza di bollicine, liquido limpido, e patina superficiale sottile e a pliche appena visibili; pH = 7,4.

Agar e brodo comune più raffinioso (pH = 7,0). - In agar, sviluppo abbondante in superficie; con pliche rilevate, di color bianchiccio-sporco ai bordi, e marrone chiaro al centro, in corrispondenza del punto d'infissione; assenza di gas. In brodo, assenza di bollicine, liquido limpido e abbondante patina superficiale lievemente increspata; pH = 7,6.

Agar e brodo comune più mannite (pH = 7,0). - In agar, sviluppo buono in superficie, con patina poco rugosa, tinta tendente al marrone scuro nel quarto superiore dell'agar; assenza di gas. In brodo, assenza di bollicine, liquido un po' torbido, e abbondante patina superficiale; pH = 7,2.

ESPERIENZE ESEGUITE COI TRALCI DI VITE, COLL'AMPELODESMA. E COLLA GINESTRA

La difficoltà che oppongono i tralci, sia allo stato ancora verde che allo stato secco, ad essere attaccati dai microrganismi, ci ha indotto a sottoporre i sarmenti all'azione preventiva di NaOH al 16% per 48 ore, seguito da abbondante lavaggio con acqua del Serino, prima di trattarli nel modo come appresso. Tale trattamento ci ha già dato soddisfacenti risultati in esperienze analoghe eseguite su tralci provenienti dalla Tunisia (18), per una eventuale loro pratica utilizzazione onde arricchire di sostanza organica le estese zone viticole possedute dagli Italiani colà residenti.

Dopo l'azione preventiva dell'idrossido di sodio, si dava corso alle seguenti esperienze.

ESPERIENZA I.

Si adoperavano tralci di Sangiovese, sia allo stato ancora verde che secco, e ridotti a truciolini colle modalità usate nel primo contributo. Si preparavano 12 vasche rettangolari di vetro (munite di coperchio di vetro non perfettamente aderente ai bordi), delle dimensioni di cm. 30 x 20 x 25, si lavavano internamente con H₂O₂ a 12 volumi insieme colla lastra di copertura, si lasciavano sgocciolare, e si versavano in ciascuna i seguenti quantitativi di liquido da macero: nelle prime sei vasche litri 4 di liscivia di « Effluente A » (*) diluita 1 : 1; nelle rimanenti sei la medesima quantità e qualità di liscivia, però diluita 1 : 2.

Le vasche, numerate da I a XII subivano quindi il seguente trattamento:

(*) Trattasi di liscivie di rifiuto della lavorazione della cellulosa col metodo cloro-soda. Le liscivie provenivano dal Sindacato Cellulosa Pomilio, ed erano di due qualità: una denominata « Effluente A » con assenza di cloro-derivati, e l'altra « Effluente C » con presenza di cloro-derivati. Riguardo al contenuto in sostanza organica, azoto e anidride fosforica, un campione di queste liscivie, sottoposto all'analisi chimica, dava i seguenti risultati centesimali: sostanze organiche 34,21; azoto totale 0,46; anidride fosforica 0,11. La soda vi era contenuta in quantità di circa 0,8 %.

I, II, VII, VIII contenenti gr. 200 di truciolini ancora verdi venivano insemenate con miscela batterica; III, IV, IX, X contenenti gr. 200 di tralci secchi, venivano insemenate anch'esse con miscela batterica; V e XI contenevano soltanto gr. 200 di truciolini verdi (controlli); VI e XII gr. 200 di truciolini secchi (controlli).

Le vasche si ponevano in camera-termostato a 30° C. e due volte al mese si facevano le osservazioni microscopiche e quelle relative al grado di decomposizione dei truciolini.

Dopo 15 giorni non si notarono fatti degni di rilievo nelle vasche contenenti la miscela batterica, nè in quelle controllo. Soltanto dopo un mese si poté constatare che lo sviluppo microbico era più rigoglioso nelle vasche contenenti tralci messi allo stato ancora verde, e ciò sia con liscivia diluita 1 : 1 che con liscivia diluita 1 : 2. Evidentemente l'aggiunta di tralci verdi nelle liscivie tende a correggere la reazione delle medesime, data la natura acida dei succhi vegetali, con sensibile beneficio dello sviluppo batterico e, pertanto, non si è notata una sensibile differenza fra le due diluizioni adoperate.

Dopo due mesi, però, la maggiore concentrazione della liscivia (anche per effetto della evaporazione dell'acqua) non tardò a far risentire la sua azione sullo sviluppo microbico, che prese a stabilizzarsi nella diluizione 1 : 1, prendendo un decisivo sopravvento la diluizione 1 : 2, e ciò tanto nelle vasche contenenti tralci allo stato verde che in quelle contenenti tralci allo stato secco. Le osservazioni microscopiche rivelarono sviluppo preponderante dei due microrganismi insemnati, oltre, bene inteso, ad altre forme banali per inquinamento accidentale attraverso la chiusura non ermetica del coperchio, il quale, per evidenti ragioni di aerobiosi, era costituito da una semplice lastra poggiate sull'orlo, non perfettamente levigato della vasca.

A tali forme banali andavano aggiunti, peraltro, alcuni bacilli originatisi da spore preesistenti sui frammenti di tralci e non distrutte dal trattamento preventivo con Na OH al 16 %.

L'esame dei truciolini rivelava un debole grado di rammollimento, presentandosi ancora alquanto duri alla dissezione cogli aghi, sia per la parte corticale che per quella legnosa.

Dopo tre mesi si notò un sensibile aumento di sviluppo nella membrana superficiale, dovuta soprattutto ad uno dei due microrganismi insemnati, oltre a qualche ceppo inquinante. Fra questi ultimi, in due vasche si notarono efflorescenze bianchiccie dovute ad actinomiceti.

La parte legnosa dei tralci, però, era ancora dura, sia per quelli messi allo stato verde che per quelli secchi.

Soltanto dopo 5 mesi si poté raggiungere un discreto grado di rammollimento dei tralci in modo da ottenere una mezza-pasta tritutando i truciolini in un mortaio con un po' di acqua.

Le figure 3 e 4 indicano lo stato di disgregazione raggiunto dal materiale delle vasche VII e VIII, contenenti tralci ancora verdi e liscivia diluita 1 : 2.

Nelle vasche-controllo scarsa microflora, costituita da ceppi per lo più sporigeni, e sviluppo superficiale di feltri fungini. In quanto al grado di de-

composizione dei truciolini, dopo 5 mesi di termostato a 30° C., sia la parte corticale che quella legnosa presentavano soltanto una lieve degradazione, dovuta soprattutto al trattamento preventivo con soda. I truciolini provenienti da tralci ancora verdi risultavano più intaccati nella parte legnosa rispetto a quelli appartenenti a tralci secchi.

ESPERIENZA II.

Si allestivano 24 provettoni, contenenti cmc. 25 di decotto di tralci (*), e, dopo sterilizzazione, si aggiungevano in ognuno gr. 2 di truciolini già trattati con soda al 16% per 48 ore, e lavati abbondantemente con acqua del Serino prima, e poi con acqua sterile. I primi 12 provettoni contenevano truciolini di tralci ancora verdi, e gli altri truciolini secchi. Per ogni gruppo di 12, si usavano le seguenti modalità: 4 provettoni contenevano il 0,3 % di Na_2CO_3 , più miscela batterica, altri 4 contenevano il 0,5% di Na_2CO_3 , più miscela batterica; due il 0,3% e due il 0,5% di Na_2CO_3 , (controlli).

I provettoni si ponevano in termostato a 30° C. e si esaminavano ogni 15 giorni.

Anche in questa esperienza soltanto dopo 5 mesi si potè notare un soddisfacente grado di decomposizione nei tralci dei provettoni contenenti il 0,5% di Na_2CO_3 .

I tralci messi allo stato ancora verde sembravano un po' meno resistenti al trattamento cogli aghi da dissezione, rispetto a quelli messi nei provettoni allo stato secco. Abbondante lo sviluppo dei due microrganismi, con patina superficiale del mesenterico. Nei provettoni-controllo, scarsa microflora, dovuta soprattutto a sporigeni, e attacco del legno appena incipiente.

Le figure 5 e 6 dimostrano lo stato di disgregazione raggiunto dopo 5 mesi dal materiale dei provettoni contenenti tralci allo stato ancora verde e soluzione di Na_2CO_3 , al 0,5 %.

Data la notevole quantità di silice nelle foglie di ampelodesma, queste venivano sottoposte ad uno speciale trattamento chimico prima di subire l'azione dei microbi alcali-tolleranti. E, precisamente, in una bacinella di vetro si versavano litri 14 di acqua del Serino, si aggiungeva il 0,7% di Na_2CO_3 del commercio, e, dopo soluzione a freddo, si mettevano sommerse le foglie di ampelodesma (gr. 170). Si poneva una lastra di vetro sulla bacinella, e si lasciava a temperatura ambiente (15° C.), facendo delle osservazioni periodiche ogni dieci giorni. Dopo quaranta giorni, si notava in superficie una sottile pellicola, che, esaminata al microscopio, rivelava ricca flora microbica, nonchè protozoi varii, appartenenti per lo più ai *Ciliophora*. In quanto alla silice, non era stata del tutto eliminata, ma ciò nonpertanto, si ritenne opportuno togliere dal macero l'ampelodesma, per evitare che microrganismi dannosi potessero agire sfavorevolmente sulla resistenza delle fibre, le quali, d'altra parte, erano già sottoposte all'azione dell'alcali, per quanto quest'ultimo in quantità non rilevante.

(*) Gr. 50 di tralci, ridotti finemente con una macina elettrica si ponevano in Erlenmeyer con 500 cc. di acqua del Serino, si tenevano in autoclave per 30 minuti ad un'atmosfera, si filtrava quindi il decotto e si portava a 1000 cmc.

Lavate abbondantemente con acqua del Serino, le foglie di ampelodesma venivano asciugate in stufa, divise in 4 Erlenmeyer, e trattate come segue:

1) gr. 40 in un litro di infuso di canapa sterile, e insembramento con un bacillo pectico aerobico del gruppo *B. asterosporus*;

2) gr. 40 in un litro di infuso di canapa sterile contenente il 0,4% di Na_2CO_3 , e insembramento con miscela dei due microrganismi;

3) gr. 40 in un litro di infuso di canapa sterile contenente il 0,6% di Na_2CO_3 , e insembramento con miscela dei due microrganismi;

4) gr. 40 in un litro di infuso di canapa sterile contenente il 0,6% di Na_2CO_3 (controllo).

Le bacinelle si ponevano in termostato a 30° C.

Le osservazioni sul grado di decomposizione pectica raggiunta dalle foglie di ampelodesma venivano eseguite ogni dieci giorni, non trascurando di saggiare anche la resistenza alla trazione dei fasci fibrosi, la quale poteva esser compromessa da una prolungata sommersione in macero alcalino.

Il materiale della bacinella 1, anche dopo due mesi di permanenza in termostato, presentava le cellule superficiali ricche di silice ed una macerazione solo appena incipiente.

Il materiale, invece, delle bacinelle 2 e 3, dopo lo stesso periodo di tempo, liberatosi dalla maggior parte della silice, presentava un soddisfacente grado di macerazione. Specialmente nella bacinella 3, il decorso della macerazione (*) è risultato più rapido e più completo, benchè il materiale fosse ancora alquanto gommoso al tatto, non essendo liberato del tutto dalle sostanze pectiche. Tuttavia, non si è ritenuto opportuno lasciare ancora nel macero le foglie di ampelodesma, per la già diminuita resistenza dei fasci fibrosi in seguito alla lunga sommersione nell'infuso alcalino.

Lo sviluppo microbico nelle bacinelle 2 e 3 era abbondante, con sottile patina superficiale, dovuta soprattutto al mesenterico alcalii-tollerante.

Le figure 7, 8 e 9 indicano tre diversi stadi delle foglie di ampelodesma dopo il macero alcalino. E, precisamente, la fig. 7 rappresenta lo stato delle foglie dopo un mese di permanenza a temperatura ambiente (15° C.) in soluzione acquosa al 0,7% di Na_2CO_3 , e successivo lavaggio con acqua di condotta; la fig. 8 rappresenta il grado di macerazione raggiunto dopo 2 mesi in infuso di canapa alcalinizzato al 0,4% con Na_2CO_3 e insembrato con miscela batterica; la fig. 9 indica il grado di macerazione raggiunto dopo 2 mesi in infuso di canapa alcalinizzato al 0,6% con Na_2CO_3 e insembrato con miscela batterica.

Il materiale della bacinella-controllo, dopo due mesi, presentava solo un accenno di macerazione.

Le prove sulla ginestra venivano eseguite attenendoci ai seguenti accorgimenti: si adoperavano vasche di vetro, sterilizzate a freddo con H_2O_2 a

(*) O *pseudomacerazione*, secondo la terminologia del compianto Prof. Carbone (8-9) ogni qualvolta si richieda un successivo energico lavaggio del materiale, accompagnato da sfregamento.

12 vol. e quindi lavate con acqua sterile, insieme con la lastra di copertura, la quale, d'altra parte, non impediva che l'aria potesse penetrare nell'interno attraverso le naturali piccole screpolature esistenti sull'orlo dei recipienti. Le vermine erano allo stato secco, e si adoperavano sia intere che schiacciate, sterilizzate con H_2O_2 ovvero allo stato naturale, settiche. E, precisamente, le esperienze venivano condotte secondo lo schema indicato per ognuna.

Esperienza I. — Gr. 90 di vermine intere e sterili venivano messe in litri 4 di acqua del Serino e insemenate con un bacillo peptico aerobico del gruppo *B. asterosporus*. La medesima quantità di vermine sterili, però schiacciate, veniva collocata in un'altra vasca e trattata collo stesso microrganismo. Una terza vasca conteneva gr. 90 di vermine schiacciate, però settiche, e litri 4 di acqua (controllo).

Esperienza II. — Gr. 90 di vermine intere e sterili venivano messe a macerare in 4 litri di acqua del Serino addizionata del 0,3 % di Na_2CO_3 ; una seconda vasca differiva dalla prima soltanto perchè le vermine erano schiacciate. Insemenzamento con miscela batterica alcali-tollerante.

Due altre vasche, contenenti l'una vermine sterili e schiacciate +0,3% di Na_2CO_3 , e l'altra vermine settiche e schiacciate +0,3% Na_2CO_3 , servivano da controlli

Esperienza III. — Si seguivano le stesse modalità della esperienza II, colla sola variante che, invece del 0,3% di Na_2CO_3 , veniva aggiunto il 0,4% in ognuna delle quattro vasche.

Tutte vasche si tenevano in termostato a 32° C.

I risultati ottenuti nelle varie macerazioni si possono così riassumere: L'azione del bacillo peptico aerobico del gruppo del *B. asterosporus*, sulle vermine, sia intere che schiacciate, previamente trattate con H_2O_2 e messe a macerare in acqua priva di alcali, si è dimostrata soddisfacente in quanto a potere macerativo (specie con vermine schiacciate), ma la filaccia ottenuta molto difficilmente riesce a liberarsi dai frammenti di epidermide e dalla cuticola colla sola operazione della scotolatura. Lo stesso dicasi per il controllo riguardante vermine schiacciate e settiche messe a macerare in sola acqua (macerazione rustica).

L'azione svolta dalla miscela batterica alcali-tollerante sulle vermine (specialmente in quelle schiacciate e con aggiunta del 0,4% di Na_2CO_3) è stata molto efficace, nel senso che ad una più rapida macerazione, rispetto ai controlli contenenti la sola percentuale di alcali, ha corrisposto una buona filaccia, morbida e discretamente resistente, che con la semplice operazione della scotolatura si lascia liberare quasi completamente dai pochi frammenti di epidermide e di cuticola risparmiati dalla duplice azione micro-chimica.

I controlli (maceri rustici alcalini al 0,3 e al 0,4% di Na_2CO_3) hanno dato una soddisfacente macerazione, specie nelle vermine schiacciate, ma il periodo di tempo richiesto è stato più lungo (14 giorni al 0,4% di Na_2CO_3) rispetto a quello impiegato dalla miscela batterica con materiale sterile (8 giorni con 0,4% di Na_2CO_3 e 10 con 0,3% di Na_2CO_3). A ciò si deve aggiungere il minor grado di resistenza della filaccia nei controlli (maceri rustici alcalini) dovuto, evidentemente, oltrechè all'azione dell'alcali, a quella di microrganismi agenti anche sulla cellulosa.

CONSIDERAZIONI E RILIEVI SULLE RICERCHE PIU' RECENTI DEI VARI AUTORI E CONCLUSIONI.

Le esperienze condotte sui tralci di vite, in questo e nel precedente contributo, hanno avuto di mira soprattutto la eventuale possibilità di adoperare come acqua da macero le liscivie di rifiuto della lavorazione della cellulosa col metodo cloro-soda, le quali, per la notevole quantità di alcali, non possono avere immediata e proficua utilizzazione in agricoltura, pur essendo ricche di sostanze organiche. Le prove eseguite hanno intanto messo in chiaro i seguenti fatti:

1) Le liscivie della lavorazione della cellulosa, specie quelle prive di cloro-derivati, opportunamente diluite, si prestano benissimo come substrati nutritivi per microbi alcali-tolleranti.

2) Fra i microrganismi resistenti a dosi relativamente alte di alcali (Na_2CO_3) si debbono annoverare alcuni capaci di esercitare un'azione disintegrante delle sostanze incrostanti la cellulosa. E ciò indipendentemente da quanto possa essere attribuito all'alcali presente.

3) L'essenza legnosa adoperata ha raggiunto un soddisfacente grado di decomposizione dopo 5 mesi a 30°C. , e previo trattamento per 48 ore con NaOH al 16 %. Bene inteso, l'alcali occorrente per il trattamento preliminare dei tralci si può conservare per successivi trattamenti di altro materiale cellulosico.

I sarmenti, per la fabbricazione della carta, possono dare, secondo Garoglio (19), un rendimento del 22% a peso umido, ma con fibra troppo corta, poco resistente e di difficile imbiancatura. Secondo Sorgato e Valente (20), la resa in cellulosa, in esperienze da essi condotte è risultata invece di circa il 30% sul vegetale secco, con le seguenti proprietà: tenore in α -cellulosa da 82 a 92 %, ceneri da 0,3 a 0,6 %, lunghezza della fibra da 0,8 a 1,5 mm., larghezza da 15 a 20 μ . Gli stessi AA. hanno esaminato un ulteriore sfruttamento dei sarmenti, nel senso di far fermentare i carboidrati contenuti in quantità discreta e risultanti dal processo di estrazione della cellulosa.

Data la dimostrazione sperimentale dell'utilizzazione dei sarmenti, quali materiali cellulosici, che però risultano leggermente inferiori a quelli degli altri residui agricoli, e cioè 30-35 % contro 47 % nell'abete, 42 % nel faggio, 35 % nella paglia, 39 % nei residui fibrosi del sorgo, gli AA. vedono anche un miglioramento nell'economia del processo, con il ricupero dai liscivi di cottura della lignina (14-18 %) con tenore in metossile variabile da 9 a 11%, contro 14-16 nell'abete. Operano il recupero dell'amido, con estrazione sistematica, in modo da ottenere il massimo esaurimento del materiale, come la massima concentrazione nel liquido estratto.

Le condizioni di prova realizzate con la costruzione di un piccolo impianto pilota, la cui batteria permette la estrazione sotto pressione ed eventualmente in ambiente acido, furono le seguenti: carico per estrattore 0,8 Kg. di sarmento sminuzzato (rapporto peso: volume 1:4,5), temperatura media 140° , pressione 4 atm., tempo per lo scarico di un elemento di batteria e il successivo circa 45 minuti.

Il giro di batteria, formata di 5 elementi, compiuto in circa 4 ore, nu-

sciva ad effettuare un esaurimento abbastanza spinto, fino ad abbassare nel materiale residuo e nell'ultimo estrattore le concentrazioni di amido a circa 0,5-1 %. La fermentazione procedette regolarmente, previo ambientamento del lievito ai componenti secondari presenti nel sugo, come di solito si usa per i liqui d'idrolisi e di saccharificazione. La resa in alcool si aggira dal 4 al 7 % sul sarmiento secco, a seconda che si tratti di materiale povero o ricco di amido. Il rendimento può essere aumentato se l'estrazione è praticata con soluzione di acido, anzichè con acqua, in modo da idrolizzare parte delle emi-ed idrocellulose. Tuttavia, gli AA. ritengono di dover escudere l'impiego di soluzioni acide diluitissime, nonchè quello della concentrazione di 3-5% di H_2SO_4 a 135-140°, perchè, in quest'ultimo caso, l'aumento in zuccheri fermentescibili diminuirebbe la resa in cellulosa.

Secondo Rotini (21) si possono ricavare 10 kg. di alcole per quintale di sarmiento secco all'aria, vale a dire una resa di 14% sul sarmiento secco. Questo valore sembra, in verità, eccessivo, poichè comporterebbe l'estrazione acquosa sopra un materiale con almeno 25 % di zuccheri fermentescibili.

Carino-Canina (22) riferisce che i tralci di vite rappresentino una importante materia prima per la produzione di furfurolo, oltre, bene inteso, alla produzione di cellulosa. È noto come il furfurolo sia, fra i prodotti autarchici, uno dei più richiesti, avendo larghe applicazioni nella preparazione di resine sintetiche, di tessuti impermeabili, per migliorare le qualità delle masse plastiche a base di caseina, e per le sue proprietà antidetonanti se aggiunto in piccole porzioni ai carburanti.

Ad ogni modo, non spetta a noi decidere quale sia la migliore utilizzazione industriale dei tralci di vite. Quelli da noi adoperati hanno dato, alla analisi chimica, i seguenti dati, riferiti a sostanza secca: lignina 27,11 % (metodo Villstätter); cellulosa 31,55% (metodo Cross-Bevan).

Se convenga meglio praticare la distillazione secca per ottenere alcool metilico, acido acetico, acetone, catrame, ecc. (per i quali si preferiscono i legni duri come il carpino e il faggio), o se convenga la utilizzazione per la produzione dell'alcool etilico (20-24) come si fa anche per altri sottoprodotti legnosi, quali segatura di legno, paglia di riso o di grano, tutoli di granoturco, bagasse di sorgo, trucioli esausti di castagno provenienti dalle fabbriche di estratti concianti, canapuli non utilizzabili altrimenti, ecc., è una questione che risolveranno i chimici, tenendo nel massimo conto, soprattutto, le esigenze nazionali che fanno preferire un prodotto piuttosto che un altro.

A noi è bastato rilevare il fatto che alcune liscivie ricche di sostanze organiche, che attualmente vanno disperse nel mare, possono acquistare, previa diluizione, una grande importanza in determinate industrie biochimiche, specialmente come acque da macero per materiali cellullosici.

Per quanto riguarda le esperienze eseguite con l'ampelodesma, se si considera che le prove fatte dal Prof. Palazzo hanno richiesto, oltre il trattamento chimico, l'azione dell'alta temperatura fino a 2-2,2 atmosfere per poter realizzare una *mezza-pasta*, i risultati da noi ottenuti possono ritenersi soddisfacenti, soprattutto dal punto di vista economico. Si eliminano, in primo

luogo, le operazioni di cottura, e si possono utilizzare come acqua da macero infusi vegetali alcalini con aggiunta di microbi resistenti alle concentrazioni desiderate, operando in vasche di cemento coperte da teli e durante i mesi estivi, nei quali si può raggiungere naturalmente l'*optimum* di temperatura per i microrganismi che ci interessano. E, in merito a questa microflora, c'è da osservare che, oltre ai veri pectinolitici, possono svolgere un ruolo importantissimo i *pseudomaceranti*, perchè, come ha messo in rilievo anche Sacchetti per la canapa (25), bisogna tener conto del complesso della microflora, sia macerante che banale, perchè quest'ultima può concorrere, specie nei primi momenti, alla demolizione di non poche sostanze.

Per la ginestra — appartenente a quel gruppo di tessili (ramia, gesso, ecc.) nelle quali, senza previo schiacciamento degli steli o asportazione dell'epidermide, i microrganismi incontrano una certa difficoltà a svolgere la loro azione pectinolitica — i risultati sono stati più che soddisfacenti.

Trasportando nel campo industriale le acquisizioni tratte dalle prove di Laboratorio, appare chiaro come la soluzione acquosa al 0,3 di Na_2CO_3 si presti benissimo ad una rapida e completa macerazione delle vermene, provocando nei maceri rustici uno sviluppo elettivo e di arricchimento di microrganismi pectinolitici alcali-tolleranti mediante insembramenti massivi di *preculture* fatte in infusi vegetali alcalinizzati.

La semplice operazione della scotolatura sarebbe sufficiente (dopo il lavaggio ed essiccamento del materiale) a liberare l'epidermide e la cuticola dalle fibre, senza sottoporre le vermene ed un'azione preventiva di bollitura o di alcalinizzazione (a temperatura più o meno elevata) e successivo lavaggio, come avviene nella cosiddetta « macerazione chimico-microbiologica » che altro non è se non la macerazione biochimica nel senso antico della parola.

È noto, d'altra parte, come numerose ricerche (eseguite sia in Laboratorio che nella grande industria) abbiano ripetutamente confermato la benefica influenza di apporti alcalini nell'acqua da macero, onde neutralizzare l'acidità che man mano si forma durante il decorso del processo macerativo. Così, il Dott. Schaefer (25) della Ditta Gruschwitz di Neusalz a. O., ha potuto dimostrare come, neutralizzando con calce, o meglio con Na_2CO_3 , la durata della macerazione del lino possa ridursi da 120 a 75 ore, migliorando, non solo la resa, ma anche la qualità del taglio.

Occorre, peraltro, tenere sempre nella massima considerazione le antiche esperienze dello Störmer (26), quelle più recenti del Ruschmann (27), dell'Habermann (28), e di altri ancora, dalle quali emerge la seguente osservazione fondamentale:

In tutti i tipi di macerazione rustica si ha produzione di acidi organici in quantità più o meno notevole, a seconda del materiale fermentescibile e persistendo, soprattutto, le condizioni di anaerobiosi. Ora, se il potere pectinolitico della flora microorganica è quello che forma l'essenza del processo macerativo subacqueo, un eccessivo sviluppo di microflora acidogena ed acidotollerante, è evidentemente, in contraddizione col buon esito della macerazione, perchè gli acidi menomano la solidità della fibra e la rendono meno atta alla filatura.

RIASSUNTO

Si sono eseguite ulteriori esperienze sulla degradazione dei tralci viticoli, utilizzando alcuni fra i ceppi alcali-tolleranti isolati. I risultati ottenuti sono stati soddisfacenti, sia per il grado di decomposizione raggiunto dai tralci, sia per la possibilità di utilizzare, nella grande industria, abbondanti quantità di liscivie di rifiuto, che attualmente vanno disperse.

Buoni risultati si sono avuti, altresì, con altre piante (*Ampelodesma mauritanica* Dur. e Schinz, e *Spartium junceum* L.), che, per la presenza di silice o per altre cause, non si erano prestate finora ad una buona macerazione microbiologica, o biochimica nel senso antico della parola.

ZUSAMMENFASSUNG

Unter Benützung einiger der früher isolierten Alkali-ertragenden Stamme hat Verf. weitere Untersuchungen über die Degradation der Rebstockschösslinge unternommen. Die erzielten Ergebnisse sind befriedigend gewesen, sei es bezüglich des von den Rebstockschösslingen erreichten Degradationsgrades, sei es in Bezug auf die Möglichkeit in grossen Industriebetrieben reichliche Mengen Ausschusslauge zu verwerten, die gegenwärtig unbenützt bleiben.

Gute Resultate sind auch mit anderen Pflazen erhalten worden (*Ampelodesma mauritanica* Dur und Schinz, und *Spartium junceum* L.) die sich infolge der Gegenwart von Kieselerde, oder wegen anderen Ursachen, bis jetzt einer mikrobiologischen oder biochemischen Röstung -im alten Sinne des Wortes nicht eigneten.

BIBLIOGRAFIA

- (1) *S. Riccardo*. - L'azione di microbi alcali-tolleranti nella preparazione di paste cellulosiche (Esperienze con tralci di vite ridotti a trucioli). «Annali della Facoltà di Agraria della R. Università di Napoli», Serie III, vol. X, 1939, pp. 249-258 (con 4 tavole).
- (2) *G. Bredemann*. - Untersuchungen über den Fasergehalt verschiedener Pflanzen. «Faserforschung», Leipzig, Band 14, Heft 2, 1939, pagine 105-112.
- (3) *F. G. Palazzo*. - Cellulose greggie e nobili di materie prime nazionali. Firenze, Tip. Mariano Ricci, 1935, p. 75 e sg.
- (4) *A. Trotter*. - Piante tessili: Le Ginestre. «L'Italia Agricola», anno 73, n. 3, 1936.
- (5) *G. Rovesti*. - La ginestra e le sue utilizzazioni. Prodotti e sottoprodotti. (Pubblicazioni della Confederazione Fascista degli Industriali). Usila, Roma, 1940, p. 61.

- (6) C. Antoniani. - Aspetti tecnologici della industria della ginestra. «L'Italia Agricola», Roma, n. 7, luglio 1940, pp. 499-501.
- (7) L. R. Jones. - The cytolytic enzyme produces by *Bacillus carotovorus*, ecc. «Centr. für Bakt», II abt., Bd. XIV, p. 257.
- (8) D. Carbone. - La macerazione industriale delle piante tessili col *Bacillus felsineus*. II ediz., I.S.M., Milano, 1926.
- (9) D. Carbone. - La macerazione microbiologica delle piante tessili. «Atti del VI Congresso Nazionale di Microbiologia», Milano, 1937, pagine 699-719.
- (10) F. Ehrlich. - Ueber die Pektolase, ein neuaufgefundenes Pektineu-ferment. «Biochem. Zeitschr.», vol. 250, 1932, p. 525; II, Ibidem. vol. 251, 1932, p. 204.
- (11) Ehrlich, Guttman e Haensel. - «Ueber Pektinferment III. Mitt.», Ibidem, vol. 281, 1935, p. 93.
- (12) A. Waksman and T. C. Cordon. - A method for studying decomposition of isolated lignin, and the influence of lignin on cellulose decomposition. «Soil Science», vol. 45, 1938, pp. 199-20(1).
- (13) I. Lipska. - Les bactéries alcalinisantes du groupe «coli-aérogenes» du lait. «Le Lait», Paris, n. 147, 1935, pp. 705-710.
- (14) M. V. Mossevich. - Study on alkali resistant microorganisms. «Microbiologia» (Rivista russa di Microbiologia generale, agraria e industriale), Mosca, vol. IV, parte II, 1935, pp. 240-246.
- (15) E. Kayser e H. Delaval. - «Bull. Soc. d'Encourag. de l'Ind. nation.», vol. 132, 1920, p. 277.
- (16) H. J. Conn, G. E. Wolfe e M. Ford. - Taxonomic relationship of «Alcaligenes» sp. to certain soil saprophytes and plant parasites. «Journ. Bact.», vol. 39, n. 2, febbraio 1940, pp. 207-226.
- (17) A. C. Thaysen and H. J. Bunker. - The Microbiology of Cellulose, Hemicelluloses, Pectin and Gums. Oxford University Press, 1927.
- (18) S. Riccardo e M. Bilardello. - Sulla decomposizione chimico-microbiologica dei tralci di vite (Contributo sperimentale). «Annali della Facoltà di Agraria della R. Università di Napoli», Serie III, vol. IX, 1938.
- (19) P. G. Caraglio. - Corso di Enologia. Ed. da «Il Progresso vinicolo», Firenze, 1938, p. 282 e s.
- (20) S. Sorgato e R. Valente. - Produzione di alcoli da sarinenti di vite. «La Chimica e l'Industria», settembre 1940, p. 413.
- (21) O. Rotini. - «L'Italia vinicola ed agraria», XXVII, 500, 1938.
- (22) E. Carino-Canina. - I tralci di vite quale materia prima per la produzione di furfurolo. «La Ricerca Scientifica», Roma. A. XI, n. 6, giugno 1940, p. 472.
- (23) F. C. Palazzo. - Fabbricazione industriale dell'alcool etilico da materiali legnosi. «Giornale di chimica industriale ed applicata», Milano, Anno XVI, 1934, p. 443.

(24) *M. Giordani*. - Alcool da materiali cellulosici. «La Chimica e l'Industria». Milano, A. XXI, maggio 1939, p. 265.

(25) *M. Sacchetti*. - Studi ed esperienze sulla macerazione della canapa. Editto dalla «Federcanapa». Roma, 1938.

(26) *K. Stormer*. - Ueber die Wasserröste des Flachses. «Centralbl. für Bakt», II Abt., Bd XIII, 1904.

(27) *G. Ruschmann*. - Grad und Bedeutung der Säurebildung in biologischen Rösten. «Faserforschung», Leipzig, 1 Heft, 1921.

(28) *G. Habermann*. - Der Säuregehalt des Rostflachses im nassen, Künstlich und natürlich getrockneten Zustande. «Faserforschung», Leipzig, 3 Heft, 1921.

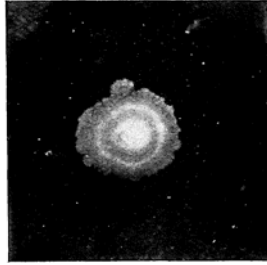


Fig. 1

Fig. 1. - Colonia del microorganismo 1 su agar comune, alcalinizzato col 0,6% di Na_2CO_3 , dopo 15 giorni a 34°C .

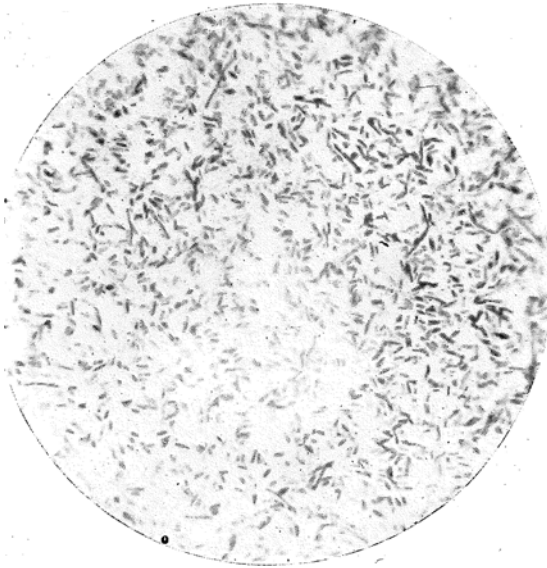


Fig. 2

Fig. 2. - Lo stesso microorganismo, coltivato in brodo comune, con aggiunta dell'1% di Na_2CO_3 (Ingr. circa 700 diam.).

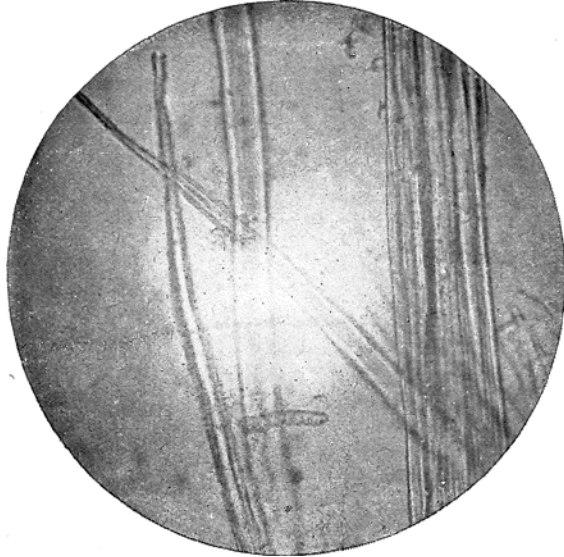


Fig. 3

Fig. 3-4. - Stato di disgregazione raggiunto dai trucioli di tralci delle vasche VII e VIII, contenenti liscivia di «Effluente A» diluita 1:2, e insemata con miscela batterica. (Osserv. dopo 5 mesi a 30° C.; ingr. circa 120 diam.).

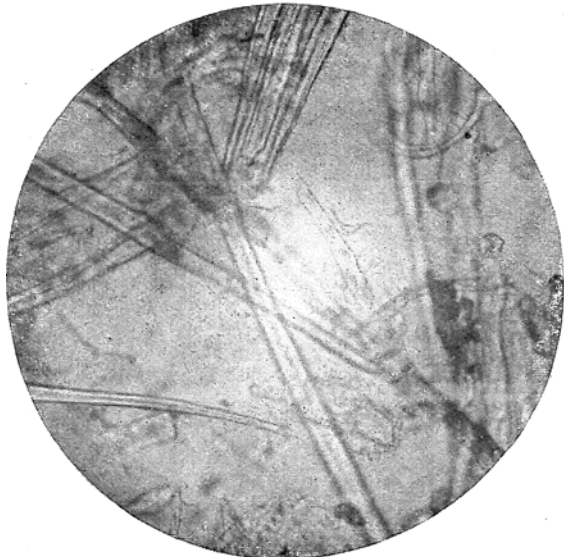


Fig. 4

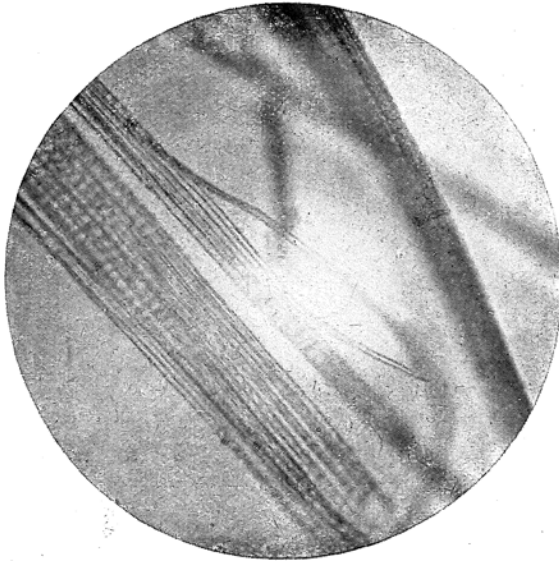


Fig. 5

Fig. 5-6. - Stato di disgregazione raggiunto dal materiale dei provettoni contenenti soluz. al 0,5% di Na_2CO_3 , e insemenzati con miscela batterica. (Osserv. dopo 5 mesi a 30°C .; ingr. circa 120 diam.).

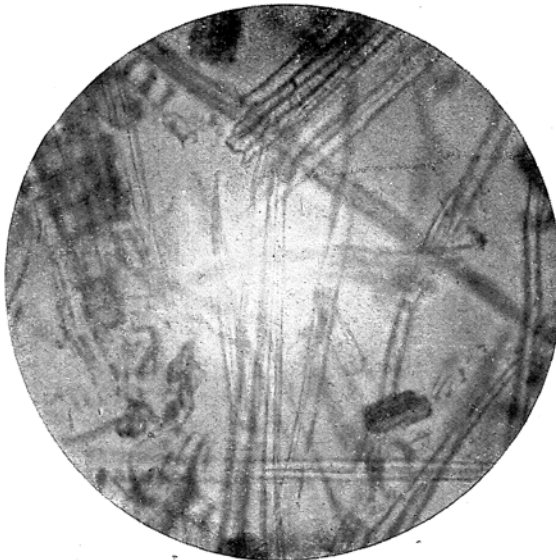


Fig. 6

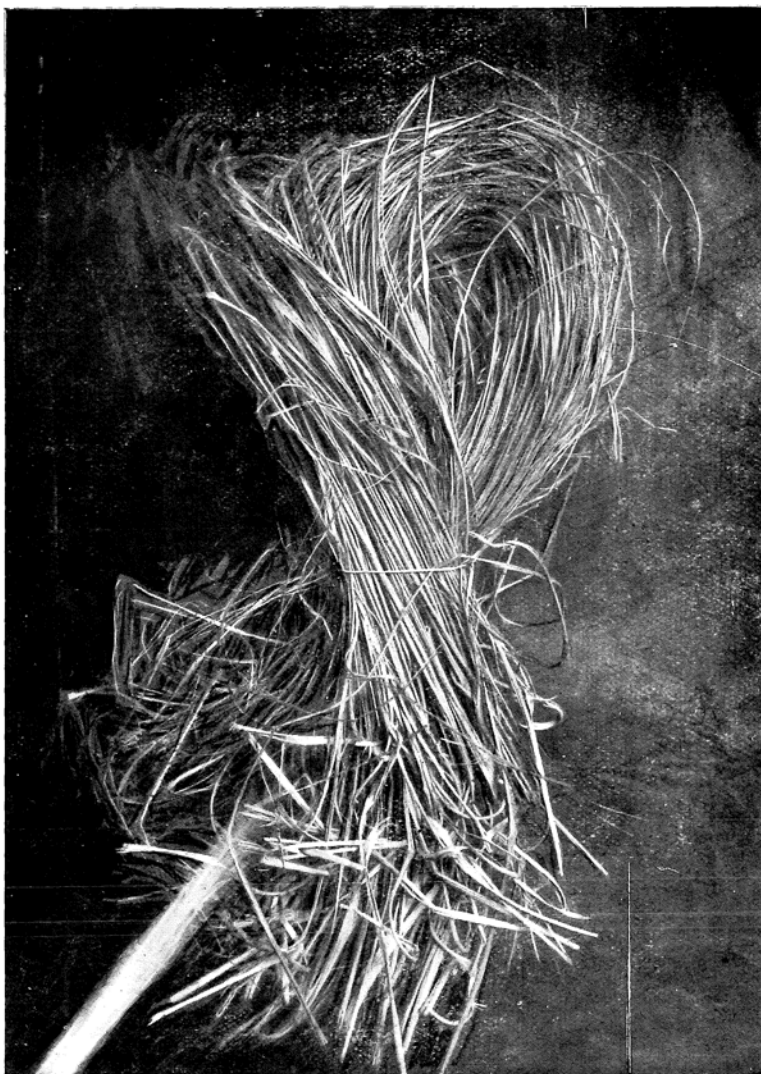


Fig. 7

Fig. 7. - Foglie di Ampelodesma mauritanica Dur. et Schinz dopo un mese di permanenza a temperatura ambiente (15 C°) in soluz. acquosa al 0,7% di Na₂CO₃ e successivo lavaggio con acqua di condotta. Si noti lo stato pressocchè normale delle foglie.

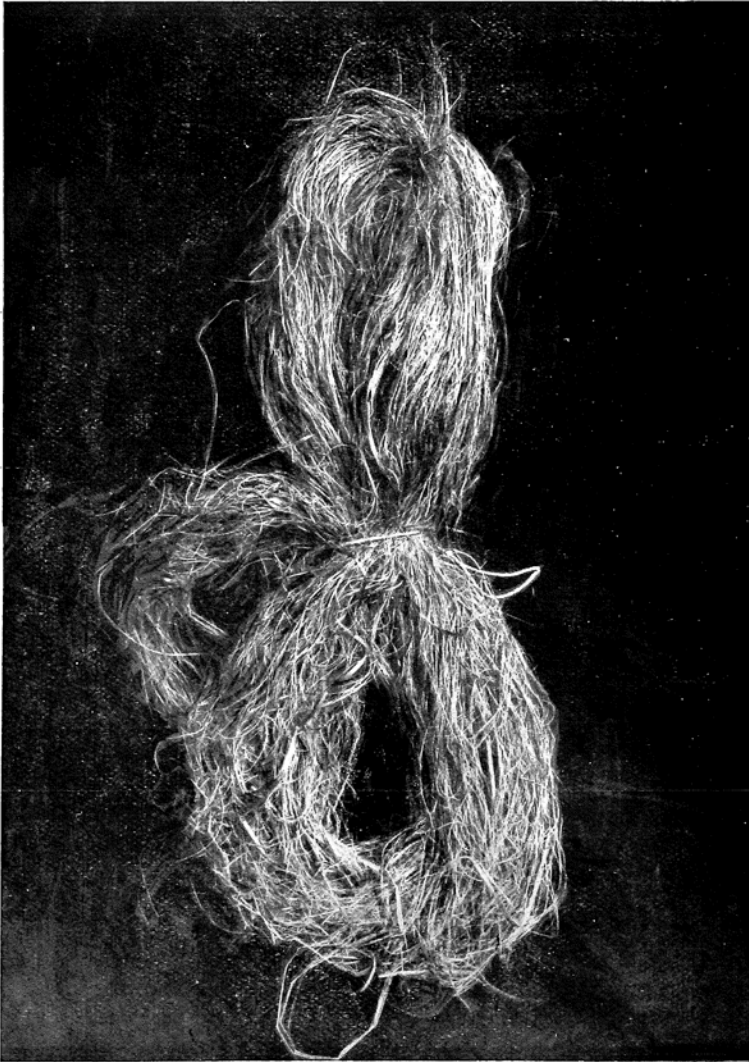


Fig. 8

Fig. 8. - Grado di macerazione raggiunto dalle foglie di Ampelodesma mauritanica (previamente trattate come nella fig. 7) dopo due mesi in infuso di canapa alcalinizzato col 0,40% di Na_2CO_3 e insemizzato con miscela batterica. Temperatura termostato: 30° C.



Fig. 9

Fig. 9. - Grado di macerazione raggiunto dalle foglie di Ampelodesma mauritanica (previamente trattate come nella fig. 7) dopo due mesi in infuso di canapa alcalinizzato col 0,6% di Na_2CO_3 e insemizzato con miscela batterica. Temperatura mostrata: 30° C.