

Trasformazioni biochimiche nei foraggi infossati e conseguenze pratiche

Carlo Arnaudi e Isidoro Politi

*“ Non c'è filo d'erba che non
abbia una storia da raccontare ”*

AMIEL

Come è avvenuto per molte delle pratiche agricole, anche l'usanza di insilare i foraggi per prolungarne la conservazione, ha preceduto la conoscenza dei fondamenti scientifici che stanno alla base di tale pratica. A vero dire, essa è tuttora dominata dall'empirismo, non soltanto a causa della incompletezza delle nostre conoscenze sull'intimo meccanismo della conservazione stessa, ma anche per la molteplicità delle specie vegetali che vengono insilate e che, possedendo composizioni chimiche differenti, danno luogo di conseguenza a processi trasformativi presentanti un andamento più o meno diverso.

A rendere ancor più complesso il problema, concorre la confusione esistente fra sistemi e metodi di insilamento, tipi di silo e modalità di impiego, cosicché ha potuto farsi strada l'errata opinione che la forma ed il materiale col quale è costruito il silo, costituiscono i fattori che determinano l'andamento del processo conservativo.

Sulla necessità di sgomberare il campo da tale inutile bagaglio di idee errate, originate per lo più dalle interessate affermazioni dei costruttori o dei pseudo-inventori, ha scritto recentemente il Politi (1), il quale ha collegato i quattro principi fondamentali sui quali può essere basata la conservazione dei foraggi da insilare, con i corrispondenti quattro noti sistemi di insilamento:

a) sistema per semiessiccazione, detto anche sistema cremasco o italiano (riduzione dell'umidità al di sotto del 50%);

b) sistema per acidificazione con acidi minerali, o sistema Giglioli - Virtanen;

c) sistema per autoriscaldamento a 60-70° C.;

d) sistema per fermentazione acida naturale.

Le ricerche intorno al meccanismo dei processi trasformativi cui soggiacciono i foraggi durante l'insilamento, risalgono agli ultimi anni del secolo scorso e l'opinione dominante fino ai primi anni del '900, considerava tali processi come legati essenzialmente al riscaldamento del foraggio. Questo veniva attribuito da alcuni autori, quali il Griffith (1894) (2) ed il Wollny (1897) (3), all'azione dei batteri, mentre altri - quali il Fry (1899) (4) - lo ritenevano dovuto a fenomeni respiratori svolgentisi ancora nei vegetali insilati, oppure ad attività enzimatiche.

La dottrina autolitica, che compendia quest'ultima opinione, considerava pertanto il riscaldamento come elemento conservativo. Ogni inter-

vento microbico era da essa riguardato come dannoso e parassitario, tale quindi da dover essere assolutamente frenato e possibilmente impedito.

S. M. Babcock e H. L. Russell (5) hanno creduto di poterne dare la dimostrazione, ma il metodo di lavoro e l'impostazione delle esperienze di questi autori, non reggono — come vedremo in seguito — ad una critica che tenga conto delle moderne conoscenze sulla batteriologia dei foraggi insilati. Tali ricerche sono state tuttavia invocate ancora recentemente come documenti probativi in favore della teoria autolitica della conservazione dei foraggi infossati.

È merito indiscusso di C. Gorini (6), di avere riaffermato tra il 1904 ed il 1918 l'importanza che i microrganismi hanno nei processi conservativi di silaggio. Gorini non ha ricercato sperimentalmente quanto corrisponda al vero la presunta attività degli enzimi autolitici. Anzi, nell'affrontare l'argomento egli stesso dichiara di avere trascurato di proposito il lato teorico del problema, lasciando impregiudicata la questione se il foraggio insilato possa fermentare senza la partecipazione microbica e chiedendosi invece se nella realtà pratica tale partecipazione possa essere evitata o no. A mezzo dell'esame batteriologico di alcuni foraggi insilati, egli ha accertato come il maggiore o minor grado di conservazione dell'insilato sia in rapporto con la natura della microflora che è riuscita a prevalere nel foraggio stesso.

Riaffermata la necessità di escludere l'aria dall'insilato, il Gorini distingue fra i micròbi microaerofili presenti nel foraggio, un gruppo di batteri dannosi (butirrici) ed un altro ad azione benefica, costituito da micròbi acidificanti (fermenti lattici ed acido-proteolitici). Sulla base delle proprietà fisiologiche dei due gruppi, si è sforzato di dettare norme di insilamento, che potessero creare condizioni favorevoli allo sviluppo dei fermenti lattici e contrarie ai butirrici, in guisa da poter giungere il più rapidamente e completamente possibile alla formazione di un silaggio lattico. Tale ordine di idee il Gorini ha saputo diffondere in Italia ed all'estero con pertinacia e metodicità. La dottrina autolitica non venne abbandonata tuttavia da tutti gli autori, specialmente americani, sicchè nel 1917 A. R. Lamb (7), riteneva ancora necessario dare una dimostrazione sperimentale della preponderante importanza dei batteri nello svolgimento dei processi di conservazione.

I numerosi studi compiuti sui foraggi insilati dopo tale lavoro, sono stati rivolti in gran parte a diversi argomenti collegati con la tecnica di insilamento e riguardano specialmente gli accorgimenti più adatti a rendere sempre più semplice e sicura la buona conservazione dei foraggi. Nei riguardi batteriologici si è cercato di precisare la natura e la posizione sistematica dei fermenti lattici e le condizioni di migliore attività loro per ottenere la inibizione dei butirrici. Il problema della funzione dei batteri acidificanti nella conservazione, non è stato più messo in questione e particolarmente la letteratura tedesca sull'argomento, è unanime nel considerare superato tale problema, onde tutti gli autori germanici mostrano di seguire la teoria microbica della conservazione.

Il concetto del fattore acidità, quale elemento conservativo dei foraggi insilati verdi, si è andato, quindi sempre più affermando ed è stato precisato particolarmente da A. J. Virtanen (8) il quale ha dimostrato che una

acidità compresa fra pH 3,5 e pH 4 è necessaria e sufficiente ad arrestare i processi di degradazione di origine autolitica o batterica e adatta, conseguentemente, a preservare i foraggi dai processi di putrefazione.

Nel 1929 soltanto, S. H. Hansen (9) riprendeva l'ipotesi della natura enzimatica della conservazione, tentando di dimostrare l'origine autolitica degli acidi che si riscontrano nei buoni insilati. Nel 1932 Curin (10) affrontava l'argomento, giungendo a conclusioni nettamente contrarie, riconfermanti l'origine essenzialmente batterica dell'acidità degli insilati. Nel 1939 e nel 1941 U. Pratolongo ed A. Fabris (11-12-13) tentavano nuovamente di dimostrare l'origine autolitica degli acidi. Arnaudi e Politi riaffermavano invece nel 1939 e nel 1940 (14-15) per via sperimentale, la preponderanza della funzione microbica nel corso del processo in causa. L'ipotesi di Babcock e Russell, che pareva essere stata superata dalle deduzioni di Gorini e dalle esperienze di Lamb ed altri, risorgeva quindi dopo un quarantennio, a dimostrazione di quanto i fenomeni biochimici sui quali si basa la pratica dell'insilamento, siano intricati e complessi e di non facile soluzione.

Le attuali conoscenze intorno a tali fenomeni ci consentono di distinguere nettamente i processi essenzialmente respiratori ed enzimatici, svolgentisi con notevole riscaldamento negli insilati « caldi » (detti altrimenti « dolci »), da quelli che hanno luogo negli insilati « freddi » od « acidi », onde la nuova teoria autolitica della conservazione si riferisce precisamente all'insilamento « freddo » od « acido », cui si destinano i foraggi freschi ed umidi, i quali vengono compressi accuratamente e tenuti protetti dall'aria.

Essendo evidente l'impossibilità di dettare norme pratiche di insilamento che abbiano qualche probabilità di buon successo, fino a quando non saranno noti in maniera meno incerta i fenomeni biochimici che si svolgono nei foraggi durante la conservazione, siamo decisi ad affrontare ancora la dibattuta e fondamentale questione dell'origine degli acidi nei foraggi insilati, giacchè l'acidità è unanimemente riconosciuta come fattore essenziale della conservazione e la microflora dei foraggi assume un significato ed un'importanza ben diverse a seconda se essa viene considerata come « la patologia del silo », secondo la definizione di Pratolongo (12), oppure come un elemento regolabile e tendenzialmente favorevole per la buona riuscita del silo, secondo l'opinione di Gorini, per cui le conseguenze pratiche che ne derivano sono evidentemente assai diverse.

Prima di esporre le nostre indagini ed esperienze, riteniamo utile riportare brevemente i risultati ottenuti dagli autori che si sono occupati dell'argomento e di soffermarci in particolare sui criteri sperimentali che essi hanno seguito.

ESPERIENZE DI BABCOCK E RUSSELL

Le esperienze di Babcock e Russell comprendono tre gruppi di prove: nel primo, i campioni di foraggio (frumento) vengono posti in palloni in presenza di anestetici diversi (etere, cloroformio e benzolo). Dopo vari giorni, procedendo all'esame, si nota che il loro aspetto ed il loro aroma corrispondono a quelli dei foraggi regolarmente fermentati, presentanti una scarsa acidità. È sulla base di questa scarsa acidità formata (E che le odierne

nostre cognizioni considerano come insufficiente a garantire la conservazione del foraggio) che i suddetti autori si credono autorizzati ad attribuire la produzione degli acidi alle attività del protoplasma vivente del vegetale insito. Viene constatato inoltre dagli autori un certo parallelismo fra intensità di acidificazione e vitalità delle cellule vegetali. Non accompagnando queste esperienze (come del resto nessun'altra) ad accurate ricerche sulle specie batteriche presenti, gli autori non sentono il bisogno di prospettarsi l'eventualità che il maggior grado di acidità verificatosi possa essere in dipendenza del fatto che eventuali microrganismi acidificanti possano trovare condizioni favorevoli di moltiplicazione ed attività in un ambiente costituito da tessuti vegetali acquosi, con pareti cellulari meno ispessite e con una composizione dei succhi cellulari più opportuna.

Eguualmente poco convincenti risultano i dati delle esperienze compiute a mezzo di congelamento. Il foraggio così trattato ha subito infatti una acidificazione pari a quella della prova di controllo (foraggio non sottoposto a congelamento), mentre in una terza prova — effettuata con foraggio congelato e poi mantenuto in presenza di anestetici — non si è avuta alcuna acidificazione. È evidente, oltre che constatato dagli autori, che il preventivo congelamento non vale ad inibire la microflora presente, la cui azione è stata esclusa soltanto con gli anestetici impiegati nella terza prova; il fatto poi che il foraggio semplicemente congelato presenti al termine dell'esperienza un odore sgradevole, è ben comprensibile, dato che i microrganismi acidificanti, minorati dal congelamento, non hanno potuto prevalere nettamente sopra i micròbi sporigeni (e quindi più resistenti) che esplicano per gran parte un'attività proteolitica. In complesso è da notare però che Babcock e Russell, considerando le trasformazioni tipiche del silaggio, non hanno compresa fra le medesime anche l'acidificazione e non hanno attribuito ad essa quell'importanza di fattore conservativo che pure era già stato acutamente indagato dal nostro Giglioli (16) e che è oggi da tutti ammessa e ritenuta fondamentale per il buon esito della conservazione dei foraggi allo stato verde; e ciò, sia che si tratti di acidificazione fermentativa, oppure di aggiunta diretta di acidi.

RICERCHE DI GORINI.

Come già si è detto, le ricerche che hanno condotto il Gorini ad abbracciare e diffondere la teoria microbiologica della conservazione degli insilati non sono rappresentate da esperienze di laboratorio, tendenti ad indagare *in vitro* quale tra i fattori possibili (enzimi cellulari e micròbi) abbia la prevalenza nell'insilamento pratico, ma sono consistite invece nell'esame batteriologico di alcune decine di campioni di insilati diversi, provenienti da privati agricoltori. Nel corso delle prime ricerche, l'esame batteriologico è stato eseguito mediante piastre di isolamento su gelatina al brodo peptonizzato e lattosato (H₂O 100, gelatina 10-15, peptone I, estratto di carne Liebig 0,5, cloruro sodico 0,5, fosfato bipotassico 0,2, lattosio 4) e con culture di arricchimento in latte sterile. In un secondo tempo, l'esame è stato limitato alle culture di arricchimento in latte. Tale tecnica consentiva al Gorini di porre in evidenza i micròbi che si sviluppano facil-

mente nel latte e pertanto, di valutare attraverso alle modificazioni da questo subite, le attività biochimiche dei germi preponderanti nell'insilato, nonchè di trarre indicazioni circa l'influenza che essi potrebbero esercitare sopra il latte delle vacche alimentate con gli insilati in esame. Attraverso a tali saggi qualitativi del comportamento massivo della microflora del foraggio sul latte, il Gorini si formava la convinzione che fra la microflora dell'insilato ed il suo grado di conservazione, esiste uno stretto legame e che i buoni insilati presentano una microflora costituita in prevalenza, non soltanto dai comuni fermenti lattici fra cui identifica lo *Streptococcus lactis acidi* e il *Bacillus lactis acidi*, ma anche da fermenti acidificanti sporigeni e precisamente da bacilli del gruppo degli acidolproteolitici. Ad essi il Gorini ha attribuito particolare se non fondamentale importanza in vista della possibilità che hanno tali batteri di peptonizzare gli albuminoidi anche in reazione acida (17).

ESPERIENZE DI LAMB

La questione del meccanismo biochimico della conservazione rimaneva pertanto ancora aperta.

Nel 1917 il Lamb pubblicava una interessante e documentata memoria, nella quale affrontava il problema tentando di risolverlo mediante esperienze nelle quali eliminava l'azione dei microrganismi con l'impiego di antisettici (toluolo, cloroformio e creosolo) ed inattivava gli enzimi, mediante riscaldamento a temperature fra 80 e 90° C.

Il foraggio sperimentato è stato il frumento. Le prove, realizzate in microsili da laboratorio, ebbero una durata variabile fra 15 e 30 giorni. Il Lamb ha tentato di risolvere la dibattuta questione, oltre che eliminando di volta in volta l'una o l'altra delle due presunte cause di conservazione, anche mediante la caratterizzazione delle principali trasformazioni biochimiche da foraggio e cioè: l'andamento della formazione di CO₂ e la degradazione delle proteine.

Crediamo utile di riportare qualcuno dei dati sperimentali di questo autore. Ecco ad esempio quelli che si riferiscono alle prove con gli antisettici:

Specie di silaggio	Acidità totale (10/n)	Alcool	NH ₂ -N
	cc.	gr.	gr.
Frumento verde naturale	34	0	0,052
Silaggio al toluolo (2 %)	31	tracce	0,057
» » cloroformio (5 %)	250	...	0,176
» » creosolo (0,5 %)	255	0,15	0,199
» normale	675	0,81	0,256
(per 100 gr. di silaggio secco)			

Le esperienze di inattivazione enzimatica a mezzo del calore, sono state realizzate confrontando i dati analitici dell'insilato normale con quelli ottenuti da insilati riscaldati ed insilati scaldati e poi inoculati con acqua

di lavaggio di insilati normali, la quale deve portare presumibilmente i germi dei silaggi comuni.

I risultati ottenuti dall'autore, sono raccolti nella seguente tabella:

Specie di silaggio	Acidità tot. (10/n)	Acidità volat. (10/n)	Alcool	NH ₂ - N
	cc.	cc.	gr.	gr.
Frumento verde	23	1,8	0	0,044
Silaggio normale (controllo)	375	118,0	,265
Frumento scaldato a 80° C. ed inoculato	274	123,6	,343	,135
Frumento verde	43	0	,111
Silaggio normale	318	109,6	,150	,214
Frumento scaldato a 90° C. ed inoculato	198	99,1	,244	,068
Frumento verde	19,5	1,2	0	,024
Silaggio normale	342,5	73,1	,297	,114
Frumento scaldato a 85° C. ed inoculato	301,5	58,4	,188	,035

(per 100 cc. di succo)

Assai interessanti sono le curve della scomparsa degli zuccheri e della formazione degli acidi. Anche da esse appare quanto ebbe poi a ritrovare Fabris (13) e che noi stessi abbiamo pure riscontrato, cioè che la rapidità della scomparsa degli zuccheri è superiore a quella della formazione degli acidi. Tale fenomeno appare chiaramente dai dati della seguente tabella:

Età del silaggio	Acidità tot. (10/n)	Acidità volat. (10/n)	Alcool	NH ₂ - N	NH ₃ - H	Zucch. totali	Scomp. degli zucch.
giorni	cc.	cc.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
0	17,3	1,4	0,000	0,021	0,006	3,129	0,000
1	97,0	42,1	,188	,053	,008	1,622	1,517
2	160,3	56,9	,210	,060	,010	1,008	2,131
3	205,4	65,2	,197	,066	,010	,648	2,491
4	235,2	68,4	,262	,095	,026	,235	2,904
5	250,6	68,6	,307	,098	,018	,158	2,981
7	254,4	70,6	,238	,097	,019	,019	3,120
9	263,9	71,0	,493	,104	,021	,019
12	266,9	78,9	,256	,084	,019	,120
15	274,6	75,8	,347	,112	,025	,161
21	291,8	84,0	,354	,128	,027
30	296,6	79,5	,337	,149	,028

Dalle successive e più dettagliate ricerche sulla scomparsa degli zuccheri e formazione di acidi durante i primi sette giorni di conservazione, nonchè dal confronto di tali trasformazioni con l'evoluzione quantitativa della microflora presente, la produzione di CO₂ e la temperatura, il Lamb

trae le sue conclusioni. Egli afferma che mentre è indubbia la parziale trasformazione degli zuccheri ad opera di enzimi, la massima parte di essi risulta però trasformata ad opera di batteri acidificanti e di lieviti. La produzione di alcool sarebbe in gran parte dovuta alle attività enzimatiche delle cellule vegetali ad opera di enzimi del tipo zimasi, ben noti ai fisiologi botanici. Le curve di produzione dell'alcool fanno pensare però che una parte di esso sia dovuta a lieviti, i quali interverrebbero in un secondo tempo sullo zucchero residuo. Ciò sarebbe in armonia con le osservazioni di Esten e Mason (18) i quali hanno segnalata la presenza di lieviti negli insilati di frumento e di mais. Similmente gli enzimi cellulari agirebbero per primi nell'evoluzione delle proteine, mentre i microrganismi sarebbero attivi in un secondo tempo.

Circa il punto fondamentale della quistione cioè circa l'origine degli acidi, il Lamb, pur riconoscendo che il metodo degli antisettici non ha dato a lui, come già agli altri sperimentatori che lo avevano preceduto, dei risultati definitivi, crede di poter affermare in base alle ricerche compiute, che i batteri sono i responsabili della massima parte della acidità prodotta.

RICERCHE DI HANSEN

Nel 1929 S. H. Hansen ha affrontato il problema da un punto di vista esclusivamente chimico ed enzimatico, giungendo alla conclusione che il processo di conservazione si attua in due tempi. A causa dell'aria ancora a contatto con la massa delle piante, si avrebbe nel primo di essi una intensa respirazione, senza formazione di acidi, mentre nel secondo si formerebbero diversi acidi organici e principalmente acido lattico. Ciò avverrebbe allorché le condizioni anaerobiche della massa insilata consentono la respirazione intramolecolare. La concentrazione idrogenionica risultante, corrisponderebbe ad un pH di 3,7 - 4. Successivamente non si svolgerebbero più né reazioni enzimatiche, né attività batteriche.

ESPERIENZE DI CURIN

Le esperienze di Curin, Pralongo e Fabris sono basate sopra l'impiego di antisettici, che dovrebbero inibire l'attività acidificante dei batteri e risultare inerti rispetto agli enzimi cellulari. Una razionale impostazione sperimentale in questo senso, richiederebbe una serie di ricerche preliminari atte a chiarire il reale comportamento dei microrganismi acidificanti nei riguardi degli antisettici usati e parallelamente quello degli enzimi cellulari.

Prove del genere sono state fatte effettivamente, almeno in parte, da Curin nei confronti della microflora complessiva dei foraggi, ma non in particolare sugli agenti specifici della acidificazione, che andrebbero invece saggiati in cultura pura, onde accertare il loro comportamento verso gli antisettici da impiegare.

Il Curin ha compiuto molte esperienze allo scopo di accertare l'azione esplicata dall'antisettico sulle attività vitali di batteri originariamente presenti sui vegetali, in condizioni tali da far sì che l'attività delle cellule venisse offesa il meno possibile, controllando da un lato la loro vitalità

(prendendo come indice la respirazione) e dall'altro l'attività antibatterica dell'antisettico impiegato per la sterilizzazione delle piante. L'A. ha adottato così un trattamento con ossicianuro mercurico in soluzione al 5 per 1000, della durata di 30 minuti, il quale consentirebbe di sterilizzare le piante senza provocare apprezzabili diminuzioni dell'attività respiratoria. Dopo aver eseguito queste ricerche preliminari, Curin ha allestito alcune serie di microsili con foraggi normali e sterilizzati. Aperti i microsili dopo qualche tempo, sono stati presi in considerazione quelli, fra gli sterilizzati, che si erano mantenuti veramente tali per tutto il periodo di conservazione, procedendo alla loro analisi (in confronto con gli insilati di controllo) e particolarmente al dosaggio della acidità formata. Conoscendo la quantità e la composizione del foraggio iniziale, il Curin ha potuto istituire anche alcuni bilanci della conservazione. I risultati ottenuti gli hanno permesso di concludere che la massima parte dell'acidità formata nel silaggio normale è dovuta ad attività batteriche. Fissando a 100 la quantità media dell'acido lattico formato nel corso della conservazione normale di foraggi freschi, l'84,5% sarebbe di origine microbica, mentre il 15,5 % sarebbe provocato da altre attività non precisate e quindi, presumibilmente, da attività enzimatiche cellulari.

ESPERIENZE DI PRATOLONGO E FABRIS

Le ricerche di Pratolongo e Fabris partono dal presupposto che le esperienze dei precedenti autori non sono scovre da obiezione circa la presunta inefficacia degli antisettici impiegati sopra le attività enzimatiche che si vogliono mettere in evidenza.

Il loro primo gruppo di esperienze (1939) comprende degli insilamenti sperimentali in vasi di vetro a chiusura ermetica della capacità di 5 litri circa. Il foraggio impiegato è stato del mais fresco, sommerso in soluzioni gliceriche di varia concentrazione, portate a pH = 3 con acido solforico, allo scopo di assicurare una *asepsi funzionale*, cioè di impedire la moltiplicazione ed ogni altra attività batterica. Prove preliminari, di cui non sono riferiti però i dati sperimentali, hanno dimostrato agli autori che le soluzioni gliceriche al 10 % sono insufficienti a mantenere una asepsi effettiva mentre quelle al 30 % paralizzerebbero le azioni microbiche e contemporaneamente anche quelle enzimatiche. Sono state pertanto prescelte per le esperienze delle soluzioni idrogliceriche al 20% con pH = 3. I risultati dell'esame chimico comparativo del foraggio iniziale e di quello insilato della prima esperienza, durata 45 giorni, vengono riassunti come segue:

	Foraggio iniziale	Foraggio insilato
	(sulla sostanza secca)	
Grado di acidità (pH)	5,2	4
Acidità complessiva (espressa come acido lattico)	n. d.	0,229%
Acidità lattica	assente	0,179%
Zuccheri riduttori	1,40%	0,27%

La seconda esperienza è consistita nell'insilare del mais in quattro vasi, sommergendo il foraggio in soluzione idroglicerica al 20% (pH = 3, con H₂SO₄). Non è detto il rapporto di quantità fra foraggio e soluzione. I quattro vasi, mantenuti a 30° C., sono stati aperti successivamente ad intervalli di 3-4 giorni ed il contenuto è stato sottoposto ad esame riguardante le variazioni dello zucchero e dell'acido lattico. L'esperienza è durata complessivamente 15 giorni. Le trasformazioni biochimiche subite dal foraggio sono espresse dai seguenti dati (per 100 gr. di prodotto fresco):

Giorni dall'inizio dell'esperienza	Zuccheri riduttori	Acidità totale	Acidità fissa	Incremento di acidità lattica	Acidità volatile espressa come acido acetico
0	1,852	1,722	0,978	-	0,012
3	1,264	1,370	1,273	0,295	0,065
7	0,204	0,996	1,557	0,579	0,110
10	0,136	1,742	1,577	0,599	0,110
13	0,130	1,740	1,632	0,654	0,072

Sulla base di tali risultati gli autori concludono in senso affermativo circa l'ipotesi che l'acidità lattica riscontrata negli insilati verdi abbia una origine puramente enzimatica (autolitica), con meccanismo biochimico non dissimile da quello per il quale il glucosio si trasforma nei muscoli in acido lattico, secondo lo schema di Meyerhof.

Le ricerche in parola non sono accompagnate da controlli batteriologici, per cui l'incremento di acidità viene attribuito senz'altro all'azione di ipotetici enzimi. Non viene verificato preliminarmente se la soluzione idroglicerica al 20 % con pH = 3, sia effettivamente capace di inibire lo sviluppo e l'attività dei batteri acidificanti, cioè di realizzare la cosiddetta asepsi funzionale, e del pari non vengono compiute prove di controllo dirette sui foraggi insilati sperimentalmente, per controllare se nel corso dell'esperienza la microflora iniziale rimanga stazionaria o se si verifichi una eventuale moltiplicazione.

Il secondo gruppo di esperienze (1941), comprende prove di insilamento sperimentale di mais verde. Come antisettico è stato fatto uso di glicerina in soluzione al 20 %. L'acidificazione è stata portata questa volta a pH = 2. In tre vasi della capacità di 500 cc. sono stati posti 50 grammi di mais che sono stati compressi e mantenuti sul fondo del vaso mediante alcuni dischi di vetro. Il rimanente del vaso è stato riempito con soluzione idroglicerica a pH = 2.

I tre vasi sono stati aperti a tempi diversi ed il materiale è stato sottoposto ad analisi. I risultati sottoriportati, consentono agli autori di riconfermare le loro conclusioni del 1939.

Giorni dall'inizio dell'esperienza	Grammi per 100 grammi di prodotto fresco		
	Zuccheri riduttori dopo inversione	Acidità fissa come acido lattico	Acidità volatile come acido acetico
0	3,76	0,04	0,036
7	2,43	0,17	0,036
21	1,57	0,53	0,12
56	0,93	1,61	0,20

Anche queste ricerche presentano la lacuna del controllo batteriologico riguardante le variazioni della carica batterica dall'inizio alla fine dell'esperienza. Probabilmente esso è stato ritenuto superfluo, per il fatto che il forte grado di acidità della soluzione idroglicerica (pH = 2) dovrebbe impedire ogni sviluppo microbico. È possibile però che tale pH non sia stato quello delle particelle di mais venute a contatto con la soluzione idroglicerica, giacché i 50 grammi di foraggio, oltre ad essere accuratamente pressati sul fondo del vaso, erano anche separati dai dischi di vetro dalla rimanente massa di soluzione idroglicerica, sicché è assai poco probabile che il pH relativo sia risultato uniforme. Pare non azzardato anzi il supporre che la soluzione a contatto diretto con il foraggio, abbia potuto neutralizzarsi in grado tale da consentire lo sviluppo batterico, prima che un equilibrio di acidità si sia potuto stabilire in tutta la massa. È ben vero che il Fabris avverte che il pH del liquido non è mai salito durante il corso di tutta l'esperienza oltre 3,2; egli non precisa però di quale liquido si tratti: se di quello situato al di sopra dei dischi di vetro, o di quello aderente al foraggio.

RICERCHE DI ARNAUDI E POLITI

Le ricerche di Arnaudi e Politi (1939-1940), hanno preso le mosse dai precedenti lavori dei sostenitori della dottrina autolitica.

Esse comprendono tre gruppi di esperienze: prove di conservazione di foraggi sterilizzati chimicamente, prove di fermentazione in presenza di soluzioni idrogliceriche e prove tendenti ad accertare l'intensità della acidificazione in condizioni assolutamente asettiche.

Le esperienze per sterilizzazione chimica del foraggio (steli di erba medica), sono state compiute con tachiolo 1% per 20' e con solfato di rame 2% per 30'. Hanno fatto seguito accurati lavaggi con acqua sterile.

I due campioni sterilizzati sono stati raccolti in microsili. Contemporaneamente è stato allestito un terzo microsilo di controllo, con foraggio non sottoposto a trattamento alcuno.

I tre microsili sono stati tenuti per 7 giorni a 37° C., dopo di che si è proceduto alle analisi chimiche e batteriologiche. I risultati sono riassunti nella seguente tabella.

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

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

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

Come era prevedibile, il trattamento con Cu SO₄ e con tachiolo non ha consentito di ottenere la completa sterilizzazione del foraggio; però il contenuto batterico finale delle prove 1^a e 2^a dimostra che si è avuta la eliminazione della microflora acidificante: mentre le forme sporigene hanno potuto sopravvivere almeno in parte e moltiplicarsi durante la conservazione. Nonostante ciò, nelle prove 1^a e 2^a gli zuccheri non hanno subito che una parziale degradazione, rispettivamente del 44 e del 24 % del contenuto iniziale. Va notato che questo contenuto era piuttosto esiguo (1,24 % del materiale fresco).

Assai modici sono stati del pari gli incrementi di acidità: praticamente immutato il pH e leggeri gli aumenti in acidi liberi.

Nella prova di controllo invece si è potuto constatare che mentre il contenuto batterico finale era costituito per la quasi totalità da germi acidificanti, gli zuccheri riduttori erano stati completamente fermentati. L'acidità, pur essendo un po' maggiore di quella delle due precedenti prove, non aveva però subito che uno scarso incremento; si tratta tuttavia dell'acidità libera e non della totale quantità degli acidi formati e si può presumere perciò che la maggior parte di questi sia stata neutralizzata dalle sostanze basiche prodotte da una contemporanea degradazione delle sostanze azotate.

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

Per confermare codesta conclusione e nel medesimo tempo, per dimostrare con maggiore evidenza la prevalente natura batterica dei processi di acidificazione, l'esperienza è stata ripetuta allestendo quattro microsili con le seguenti modalità:

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

2° trattamento con soluzione al 2 % di Cu SO₄ per 30', indi come N. 1.

3° trattamento con soluzione al 2 % di Cu SO₄ per 30', indi come NN. 1 e 2; semina con cultura pura di batteri acidificanti dei vegetali.

4° nessun trattamento.

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

I risultati delle determinazioni compiute dopo otto giorni di conservazione a 37° C. sono raccolti nella seguente tabella.

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

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

Anche in questa esperienza il trattamento con Cu SO₄ e con tachiolo è stato sufficiente per eliminare la microflora acidificante ma non per sterilizzare completamente il foraggio, avendo le forme sporigene resistito ad esso. Ciò nonostante, nelle prove 1^a e 2^a gli zuccheri hanno subito soltanto una parziale degradazione, rispettivamente in ragione del 60 e del 27 % dell'esiguo contenuto iniziale (1 % del foraggio fresco) mentre gli incrementi di acidità sono stati assai lievi.

Nella prova 3^a invece, gli zuccheri sono risultati completamente fermentati ed il grado di acidità particolarmente elevato. Anche nella prova 4^a gli zuccheri hanno subito una totale fermentazione, mentre l'acidificazione, per quanto minore di quella della prova 3^a, è risultata sensibilmente superiore di quella delle prove 1^a e 2^a.

I contenuti in azoto solubile ed ammoniacale dimostrano inoltre che nella prova 4^a, a differenza delle altre tre, la proteolisi si era svolta con notevole intensità, neutralizzando una frazione cospicua degli acidi prodotti, mascherando perciò in parte i processi di acidificazione subiti dal foraggio. Risultano così confermati i risultati della precedente esperienza epperò gli autori credono giustificato di concludere che sopprimendo la microflora acidificante, i processi di acidificazione cui soggiacciono i foraggi risultano

fortemente attenuati. La formazione degli acidi parrebbe cioè legata prevalentemente all'intervento microbico.

Le prove di fermentazione in presenza di soluzioni gliceriche sono state eseguite come segue.

Quattro microsili sono stati riempiti con 180 gr. di foraggio (costituito da pianticelle di sorgo trinciate) e 520 gr. di soluzione idroglicerica al 20 % in volume, resa acida a pH = 3 mediante H₂ SO₄. (Il foraggio era completamente immerso nel liquido). I quattro microsili, muniti di chiusura idraulica, sono stati mantenuti in termostato alla temperatura di 30° C. Essi sono stati aperti in tempi successivi, impiegandosi il materiale per la determinazione del pH del liquido, dell'acidità libera totale e del contenuto batterico. I risultati ottenuti sono riassunti nella seguente tabella.

Determinazioni	pH	Acidità totale % del foraggio fresco iniziale (come ac. lattico)	Contenuto batterico per g. di foraggio
Valore iniziale (foraggio fresco)	5.7	0,144	102.000.000
Dopo 1 giorno di fermentazione	5.2	n. d.	23.000.000
Dopo 2 giorno di fermentazione	4.1	1,40	636.000.000
Dopo 3 giorno di fermentazione	3.9	2,07	260.000.000
Dopo 4 giorno di fermentazione	3.45	2,64	960.000.000

Si rileva da questi dati che durante il periodo di conservazione si è avuta una rapida ed intensa produzione di acidi. Evidentemente la soluzione idroglicerica non ha impedito lo svolgersi dei processi di acidificazione e così pure non ha impedito un abbondante sviluppo microbico; gli opportuni mezzi culturali elettivi impiegati hanno anzi dimostrato trattarsi dei tipici microrganismi acidificanti del silaggio.

L'andamento dell'acidificazione è apparso inoltre in stretta relazione con lo sviluppo di codesti germi. Infatti, il contenuto batterico iniziale del foraggio è risultato molto elevato. Ciò non deve stupire poichè si tratta del numero dei germi al momento dell'aggiunta della soluzione idroglicerica e non del numero di quelli inizialmente presenti sulle pianticelle. In seguito alla trinciatura di queste, e durante l'allestimento dei microsili, è evidente che essi hanno avuto tempo e modo di moltiplicarsi attivamente.

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

Al 3° giorno il contenuto batterico risultava notevolmente aumentato, presentandosi quasi come una cultura pura dei tipici acidificanti dei vegetali, mentre il giorno successivo veniva constatata una diminuzione nel numero dei germi medesimi, i quali rappresentavano egualmente la quasi

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

In presenza del 10 % e del 15 % di glicerina, la moltiplicazione dei microrganismi è molto rapida. In 24 ore si ha un intenso intorbidimento delle culture. Il loro comportamento è identico a quello delle culture senza glicerina.

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

Mediante il 25 % di glicerina si ottiene uno sviluppo pressochè normale per lo *Strept. plantarum*, il *Lact. Delbrücki* e per i ceppi Crema M, SP, 13/4. Tutti gli altri ceppi si sviluppano molto più lentamente.

L'aggiunta del 30 % di glicerina consente un discreto sviluppo del ceppo Crema 13/4. Tutti gli altri microrganismi crescono molto lentamente.

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

La moltiplicazione dei microrganismi è stata valutata in base all'esame microscopico delle culture, come pure al grado di intorbidamento.

totalità della microflora del materiale in fermentazione. Al 7° giorno invece appariva un nuovo fortissimo aumento che può essere agevolmente spiegato con il fatto che lo sviluppo microbico, dapprima limitato alla superficie dei frammenti di foraggio, dopo il 5°-6° giorno ha potuto svolgersi in tutto il liquido idroglicerico nel quale si erano diffusi frattanto i succhi vegetali.

Da quanto precede emerge che la soluzione idroglicerica al 20 % non è atta ad impedire l'intenso sviluppo dei batteri acidificanti dei vegetali. Questa constatazione ed altri rilievi fatti in precedenti esperienze a carattere orientativo, ha indotto gli autori ad esaminare il comportamento di codesti microrganismi verso la glicerina.

Alcuni ceppi, scelti fra quelli più tipici, isolati da foraggi verdi insilati, nonchè da piante foraggere in pieno campo, sono stati seminati in provette contenenti infuso di malto stede, addizionato delle indicate quantità di glicerina e mantenute in termostato a 30° C. Di tempo in tempo veniva controllato il grado di sviluppo e di acidità. I risultati, raccolti nella tabella dimostrano in modo indiscutibile la notevole resistenza che i microrganismi esaminati presentano alla glicerina.

Questi rilievi danno una chiara spiegazione dell'intenso sviluppo di acidificanti riscontrato nell'esperienza sopradescritta, nel corso della quale il foraggio è stato immerso in una soluzione idroglicerica al 20 %. Essi dimostrano pure come non sia possibile impiegare la glicerina alle suddette concentrazioni come antisettico contro i fermenti lattici dei vegetali.

Le esperienze condotte allo scopo di accertare l'intensità dell'acidificazione in condizioni assolutamente asettiche, sono state eseguite dagli autori onde controllare l'intensità dei processi di acidificazione quali si svolgono nell'interno di tessuti vegetali integri, e perciò sicuramente sterili, in modo da evitare l'uso di qualsiasi antisettico.

In una prima esperienza sono stati impiegati grossi steli di sorgo (*Sorghum Saccharatum*), privati delle foglie, ma lasciati integri e scelti in modo che non presentassero lesioni o screpolature. Essi sono stati tagliati in modo da avere un internodio ed i due nodi estremi. Con questo materiale sono state allestite le seguenti prove:

- 1° Steli in atmosfera di aria libera (recipiente aperto).
- 2° Steli in atmosfera di aria confinata (recipiente a chiusura idraulica).
- 3° Steli in atmosfera di anidride carbonica.
- 4° Steli in atmosfera di azoto.

5° Controllo, con steli finemente tagliuzzati ed accuratamente sistemati nel microsilo.

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

Al termine della conservazione si ebbero i seguenti risultati:

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

Nella prova 5° venne anche accertato uno sviluppo, intensissimo, dei batteri acidificanti.

I dati sovraesposti rivelano che mentre nella prova su steli tagliuzzati, e quindi non in condizioni di sterilità, si aveva una intensa produzione di acidi, nell'interno degli steli mantenuti integri e perciò senza la presenza di microrganismi, l'incremento di acidità era assai lieve. Soltanto nella prova con aria confinata si è verificata una leggera diminuzione del pH, mentre in tutte le altre prove il valore medesimo si è mantenuto immutato od ha subito dei leggeri aumenti. È evidente pertanto che nelle precedenti condizioni di esperienza lo svolgersi dei processi dovuti alle attività fisiologiche ed enzimatiche delle cellule vegetali, ha dato origine a quantità di acidi affatto esigue. Ne deriva che l'elevata acidità prodottasi nella prova di controllo è praticamente, nella sua totalità, di origine batterica.

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

Usando le dovute precauzioni, atte a conservare tale sterilità, le pianticelle vennero private delle radici, tagliate in 2-3 frammenti ed introdotte in provette sterili. Una parte del materiale così preparato venne seminato con cultura pura di batteri acidificanti dei vegetali.

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

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

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

Anche da questi dati è agevole rilevare che le piantine sterili non hanno subito variazioni apprezzabili nel grudo di acidità e nel contenuto zuccherino, mentre le piantine addizionate di batteri acidificanti soggiacciono invece ad una notevole acidificazione ed alla completa fermentazione degli zuccheri presenti.

Un'altra prova, indiretta questa, della prevalente origine microbica della acidità dell'insilato, viene fornita da Arnaudi e Politi confrontando la curva dello sviluppo quantitativo dei microbi presenti nell'insilato, con quella della acidità.

Nel corso di varie prove di fermentazione in microsili, è stato possibile agli autori di constatare come in brevissimo tempo la microflora acidificante, esigua agli inizi (1-20 mila germi per grammo), subisca una rapidissima moltiplicazione, che permette di raggiungere cifre spesse volte superiori ai 500 milioni per grammo. In pari tempo il foraggio subisce una intensa acidificazione e la completa fermentazione degli zuccheri solubili.

Sulla base dei dati sperimentali riportati, Arnaudi e Politi si ritengono autorizzati ad affermare che l'acidificazione dei foraggi insilati è dovuta, per la massima parte, ad azioni microbiche.

Ricerche sperimentali

A) Intorno all'influenza della temperatura sui processi di acidificazione

È noto che gli insilamenti autunnali danno di regola dei risultati migliori di quelli effettuati nella stagione estiva; questa diversità è senz'altro dovuta alle differenze di temperatura delle due stagioni, ma le ragioni più intime del diverso esito dei processi fermentativi non sono state ancora del tutto chiarite.

Sta di fatto che anche i foraggi insilati nel tardo autunno, e quindi con temperature basse ed in rapida e progressiva diminuzione verso lo zero, presentano, se ben conservati, dei gradi di acidità espressi da valori di pH prossimi e talvolta inferiori a 4. È evidente quindi che nelle predette condizioni i processi di acidificazione non sono impediti ma se mai semplicemente rallentati. Pertanto può essere posto il quesito se le basse temperature influiscono favorevolmente nel senso di paralizzare le attività microbiche in genere, oppure nel senso di inibire maggiormente lo sviluppo dei microrganismi che presiedono ai dannosi processi di degradazione delle sostanze azotate e di fermentazione butirrica.

Il quesito si ricollega a quello dell'origine degli acidi del silaggio, essendo evidente che per accettare la prima ipotesi è d'uopo ammettere che l'acidificazione dei foraggi insilati a bassa temperatura possa aver luogo attraverso processi di natura essenzialmente enzimatica.

Allo scopo di chiarire sotto questo aspetto l'interessante argomento, si sono compiute alcune ricerche dirette a dimostrare la capacità di sviluppo e di produzione di acidi di un gruppo di microrganismi acidificanti dei vegetali.

I singoli ceppi vennero insemenzati in provette di infuso di malto sterile (pH = 5,2) che vennero quindi mantenute a temperature di 37; 30; 18; 13 e 6,5° C.

I risultati dell'indagine, raccolti nella seguente tabella *a)* stanno ad indicare che tutti i microrganismi saggiati si sviluppano ed acidificano intensamente, sebbene con diversa rapidità, anche alla temperatura di 6,5° C. Ne deriva che le basse temperature a cui si effettuano gli insilamenti nel tardo autunno non impediscono lo sviluppo e le attività fermentative della microflora acidificante. Di conseguenza i migliori esiti degli insilamenti autunnali appaiono con ogni probabilità attribuibili al fatto che le più basse temperature rallentano e quindi concorrono ad inibire maggiormente gli agenti che presiedono alla demolizione delle sostanze azotate ed alla fermentazione butirrica. In altri termini le basse temperature concorrerebbero a creare nelle masse foraggere immerse nei sili condizioni di più spiccata elettività nei confronti della microflora acidificante.

Per una più completa documentazione della precedente conclusione è parso utile condurre alcune prove di fermentazione in microsili mantenuti alle temperature di 7, 12 e 44° C. Per ciascuna di queste temperature si allestirono 3 microsili i quali vennero aperti a tempi diversi, ossia dopo

Tab. a) - ATTIVITÀ FERMENTATIVA DEI BATTERI
ACIDIFICANTI DEI FORAGGI A DIFFERENTI TEMPERATURE.

Temperatura	pH dopo giorni	(Lact. pentoaceticus)				Lact. plantarum			Lactonostoc herbarum	Micrococcus pratenis	Lact. sili
		ceppo BF	ceppo LM	ceppo SP	ceppo I	ceppo 13 B	ceppo 14 B				
37	8	3.3	3.6	3.5	3.45	3.2	3.2	3.2	3.8	3.3	
	15	3.2	3.6	3.4	3.3	3.1	3.1	3.2	3.7	3.2	
	23	3	3.5	3.4	3.25	3.—	3.—	3.—	3.5	3.—	
30	8	3.6	3.5	3.8	3.4	3.4	3.1	3.2	3.5	3.3	
	15	3.5	3.3	3.7	3.3	3.3	3.1	3.2	3.4	3.2	
	23	3.2	3.3	3.7	3.15	3.—	3.—	3.—	3.25	3.—	
18	8	3.3	3.4	3.3	3.5	3.3	3.4	3.4	3.4	3.2	
	15	3.3	3.3	3.2	3.5	3.3	3.3	3.3	3.35	3.2	
	23	3.25	3.3	3.2	3.4	3.1	3.1	3.2	3.2	3.—	
13	8	3.5	4.—	4.—	3.8	3.6	3.4	3.8	4.—	3.5	
	15	3.3	3.95	3.95	3.6	3.4	3.2	3.7	3.9	3.3	
	23	3.2	3.75	3.75	3.5	3.—	3.1	3.6	3.6	3.2	
6,5	8	5.05	5.2	5.—	4.5	4.2	4.4	5.4	5.—	5.—	
	15	4.6	5.1	4.5	4.5	4.—	4.—	4.9	4.8	4.6	
	23	4.1	4.9	3.8	4.—	3.8	3.8	4.2	4.—	4.1	

Tab. b) - PROVE DI FERMENTAZIONE A DIFFERENTI TEMPERATURE.

% Foraggio umido	Erba verde iniziale (Umidità = 81,2%)	Microsili a 7° C.			Microsili a 12° C.			Microsili a 44° C.		
		Analisi dopo giorni			Analisi dopo giorni			Analisi dopo giorni		
		6	13	20	6	13	20	6	13	20
pH	6.35	4.91	5.02	4.7	4.35	4.2	4.62	4.45	4.57	
Acidità libera totale (come ac. lattico)	0.27	0.98	1.27	1.—	1.61	1.76	1.32	1.53	1.62	
Acidi volatili liberi e combin.										
ac. acetico	—	0.26	0.25	0.22	0.33	0.27	0.43	0.60	0.51	
ac. butirrico	—	ass.	ass.	ass.	ass.	ass.	0.07	0.03	0.13	
Zuccheri riduttori	1.31	tracce	ass.	ass.	ass.	ass.	ass.	ass.	ass.	
Azoto ammoniacale	—	0.0296	0.0346	0.0232	0.0281	0.0331	0.0459	0.0588	0.0514	
Cermi acidificanti per gr.	—	534.000.000	366.000.000	151.200.000	374.000.000	231.000.000	6.500.000	150.000	n. d.	

6, 12 e 20 giorni. I risultati delle determinazioni compiute sono raccolti nella Tab. b) dalla quale emergono le seguenti constatazioni:

— tanto a 12° C. che a 7° C. si ha un intenso sviluppo di microrganismi acidificanti, il cui numero si eleva a diverse centinaia di milioni per gr. e si mantiene tale per lungo tempo. A 44° C. invece, lo sviluppo della microflora acidificante è molto più rapido e quindi soggetto anche a successiva rapida diminuzione, per cui già al 6° giorno il numero dei germi risulta ridotto soltanto ad alcuni milioni per grammo.

— Dopo 6 giorni, gli zuccheri riduttori appaiono totalmente fermentati nelle prove a 44° C. ed a 12° C. mentre: sono presenti soltanto in tracce nei microsili mantenuti a 7° C. Analogamente gli acidi prodotti appaiono presenti in proporzioni maggiori nei microsili a 44° C. (nei quali si ha anche presenza di acido butirrico), che non in quelli a 12 ed a 7° C.

— Il contenuto in azoto ammoniacale sta infine ad indicare il più favorevole andamento della fermentazione alle più basse temperature.

B) Nuove ricerche sull'origine degli acidi

Allo scopo di recare un contributo sperimentale definitivo al dibattito quesito dell'origine degli acidi del silaggio, si sono compiute le ricerche di cui segue l'esposizione. Per mezzo di esse si volle dapprima chiarire il comportamento dei microrganismi acidificanti in presenza di soluzioni idrogliceriche acide. Dell'infuso di malto, contenente glicerina in ragione del 20 % in volume, distribuito in provette e sterilizzato in autoclave, venne addizionato di quantità variabili di acido solforico (0,1 N oppure 0,25 N) in modo da ottenere gradi di acidità espressi da valori del pH compresi fra 5 e 3. Si procedette quindi alla semina di tipici batteri acidificanti dei foraggi insilati, addizionando una goccia di cultura per ogni provetta da 10 cc. e si determinarono successivamente le variazioni di acidità, derivate dallo sviluppo microbico; i risultati ottenuti sono riportati nella Tab. c).

Tab. c) - SVILUPPO DI ALCUNI BATTERI ACIDIFICANTI IN INFUSO DI MALTO ADDIZIONATO DI GLICERINA IN RAGIONE DEL 20%, A DIFFERENTI pH.

Controllo sterile pH dopo giorni		Ceppo MP Lact. pentoaceticus pH dopo giorni	Ceppo SP Lact. pentoaceticus pH dopo giorni		Ceppo 13 B Lact. plantarum pH dopo giorni	
5	10	5	5	10	5	10
4,75	4,7	3,58	3,56	3,44	3,25	3,22
4,23	4,28	3,47	3,53	3,42	3,22	3,18
3,95	4	3,48	3,56	3,44	3,17	3,11
3,72	3,74	3,52	3,52	3,45	3,11	3,09
3,56	3,58	3,54	3,45	3,45	3,06	3,01
3,36	3,38	3,4	3,31	3,3	3,03	3,0

In una seconda esperienza con il ceppo 13 B si ottennero i seguenti risultati:

		Controllo sterile	Ceppo 13 B
pH dopo 6 giorni	a)	3,31	3,18
	b)	3,10	3,10
pH dopo 10 giorni	a)	3,32	3,01
	b)	3,10	3,12

La determinazione del numero dei germi vivi presenti al 6° giorno diede un contenuto di 410.000.000 per gr. di liquido culturale.

Da codesti dati si deduce che, nonostante l'alta concentrazione della glicerina, tutti e tre i microrganismi saggiati sono stati capaci di moltiplicarsi e di produrre acidi anche con gradi di acidità iniziale espressi da $\text{pH} = 3,5$; si rileva inoltre che il ceppo 13 B è suscettibile di intenso sviluppo anche a concentrazioni idrogenioniche più elevate, cosicchè il limite del pH che consente la moltiplicazione di questo germe è compreso fra 3,1 e 3,2 mentre quello che può essere raggiunto per azione fermentativa è ancora più basso ($\text{pH} = 3$).

La constatata capacità di sviluppo e di azione fermentativa dei batteri acidificanti dei foraggi, in liquidi idroglicerici fortemente acidi, ha portato a indagare se nelle condizioni delle esperienze di Pralongo e Fabris lo sviluppo microbico fosse stato realmente impedito mediante la sommersione del foraggio in soluzione acquosa di glicerina al 20 % acidificata a $\text{pH} = 2$. È evidente infatti, come del resto si è fatto osservare altrove, che in seguito a reazione dell'acido della soluzione idroglicerica con i costituenti del foraggio, il pH del liquido si eleva considerevolmente. L'aumento dipende naturalmente dal rapporto fra le quantità di liquido e di foraggio poste a contatto, rapporto che però non è stato precisato dai predetti Autori.

È evidente però che i 50 gr. di mais impiegati per le singole esperienze si trovarono a contatto diretto con una quantità di soluzione idroglicerica acida alquanto inferiore a cc. 450: (500 cc. essendo il volume totale del recipiente). Da tale volume va sottratto infatti quello dei dischi che comprimevano il foraggio, e la parte del liquido che sovrastava i dischi medesimi. È ovvio quindi che il peso in grammi del foraggio corrispondesse sicuramente a ben più del 10 % del volume totale espresso in cc.

Pertanto, allo scopo di operare nelle presumibili condizioni dei citati Autori, si pensò di variare il rapporto foraggio: liquido, impiegando quantità di foraggio che corrispondessero al 20 %, al 15 % ed al 10 % del volume del recipiente.

Si impiegarono dei matracci da 250 cc. in cui si introdusse il foraggio (mais tagliuzzato), riempiendo poi completamente con soluzione idroglicerica al 20 % in volume previamente acidificata a $\text{pH} = 2 \pm 0,02$ mediante acido solforico, e chiudendo infine con tappo di vetro.

Per ogni prova si allestirono due matracci: uno di essi venne tenuto all'ambiente ($20-25^\circ \text{C.}$) e l'altro posto in frigorifero, a temperatura inferiore a 0°C. , onde evitare lo svolgersi di qualsiasi processo fermentativo e poter così controllare le variazioni del pH determinate da pure reazioni chimiche.

Le determinazioni compiute successivamente fornirono i seguenti risultati:

pH iniziale del mais = 5,35.

Matracci posti in frigorifero:

MAIS	pH dopo giorni		
	2	4	10
I 20 % del volume	4,4	4,44	4,45
II 15 % » »	4,-	4,1	4,11
III 10 % » »	3,3	3,37	3,4

Matracci tenuti a temperatura di 20-25° C.:

MAIS	Batteri acidificanti per g. di foraggio dopo giorni		
	4	6	11
I 20 % del volume	905.000.000	n. d.	n. d.
II 15 % » »	35.000.000	413.000.000	n. d.

Nella prova terza, in cui la quantità di mais posta a contatto con la soluzione idroglicerica acida corrispondeva al 10 %, non è stato possibile apprezzare il contenuto microbico per il fatto che le piastre vennero allestite con diluizioni molto forti, in modo cioè da poter conteggiare cariche batteriche di centinaia di milioni di germi per gr. Non essendosi sviluppate delle colonie, appare evidente che, entro i limiti di tempo dell'esperienza, l'alto grado di acidità non ebbe a consentire una moltiplicazione dell'ordine dei milioni ai pochi batteri acidificanti presenti all'inizio nel foraggio. Si osserva però che il grado di acidità stabilitosi in questa prova si avvicina al pH limite determinato colle precedenti ricerche per i batteri acidificanti in cultura pura, pH che per alcuni ceppi è risultato di 3,1-3,2.

Nelle prove I e II, in cui la quantità di foraggio era del 15 e del 20 %, si ebbe invece un abbondante sviluppo di microrganismi acidificanti. Ciò sta ad indicare che nelle prove medesime la soluzione idroglicerica acida non ebbe a creare condizioni di « asepsi funzionale » nei confronti della microflora tipica del silaggio.

Per tutte le ragioni sovra esposte e come in proposito già si è detto in precedenza, si può presumere che nelle esperienze di Pralongo e Fabris lo sviluppo dei microorganismi acidificanti non sia stato impedito, ma si siano avute condizioni analoghe a quelle delle nostre prove I e II.

Pertanto la deduzione che gli acidi prodottisi nel corso delle esperienze medesime siano l'origine autolitica ed enzimatica non appare completamente attendibile.

Le considerazioni critiche svolte a mano a mano nelle pagine che precedono dimostrano che il controverso quesito dell'origine degli acidi del silaggio non può essere definitivamente risolto se non attraverso esperienze rigorose che realizzino la fondamentale condizione di escludere sicuramente qualsiasi attività microbica, senza inibire in alcun modo le attività fisiologiche ed enzimatiche delle cellule vegetali. L'impiego di antisettici, cui sono ricorsi i vari sperimentatori, appare sotto questo aspetto poco efficace

giacché, per essere immune da obiezioni, esso implicherebbe un duplice controllo: dell'azione paralizzante esplicita sui microrganismi e della sua innocuità nei riguardi dei processi puramente enzimatici. Orbene, è ovvio che quest'ultimo controllo non è in alcun modo possibile dato che si tratta di processi enzimatici presunti.

Alla soluzione del problema è peraltro agevole pervenire qualora si possa disporre di tessuti vegetali sicuramente privi di germi. Essendo questa l'unica via che possa condurre a definitive e indiscutibili conclusioni, si è cercato di raggiungere lo scopo attraverso l'atterramento di pianticelle sterili per coltivazione assolutamente asettica. Dopo numerose prove preliminari, resesi necessarie per stabilire le condizioni di trattamento dei semi, al fine di sopprimere i germi presenti senza distruggerne il potere germinativo, si pervenne alla tecnica seguente:

I semi vennero trattati con soluzione di sublimato corrosivo ad 1 per mille per 20-40'; quindi, con precauzioni atte ad evitare inquinamenti, essi vennero lavati con acqua sterile, passati in germinatoi previamente sterilizzati e mantenuti poi a temperatura ambiente, attendendosi la loro germinazione. Allorché le radichette raggiunsero una lunghezza di 1-2 cm, i semi germinati vennero distribuiti, in numero di 8-10, entro piastre sterili in cui si era fatto solidificare dell'agar-malto, mantenendo poi in termostato a 30° C. per 2-3 giorni, al fine di controllare il risultato della sterilizzazione. Dopo di ciò i singoli semi germinati, sicuramente sterili, vennero introdotti in grossi provettoni di Roux, contenenti 10 cc. di liquido di Knopp, previamente sterilizzati in autoclave; si lasciarono poi crescere le piantine alla luce sino a raggiungere il massimo sviluppo consentito dalle dimensioni dei provettoni.

Sempre con le dovute precauzioni, atte a mantenere la sterilità, le pianticelle così ottenute vennero private delle radici, tagliate in frammenti ed introdotte in provette sterili.

In alcune delle provette si aggiunse una ansata di batteri acidificanti dei vegetali, ponendole quindi, unitamente alle provette non insemenate in atmosfera di azoto e mantenendole poi alla temperatura ambientale di 20-25° C. per 30 giorni.

Una parte delle pianticelle sterili venne utilizzata subito per le stesse determinazioni chimiche che si effettuarono su quelle conservate.

I risultati analitici furono i seguenti:

	Valori iniziali	Valori finali	
		Piantine sterili	Piantine sterili + batteri ac.
pH	5,8	6	4,15
Acidità cc. N/50 in 10 gr.	16,6	14,3	37
Zuccheri riduttori (dopo inversione)	tracce	4,9 ‰	assenza

Da questi dati si rileva che il contenuto zuccherino iniziale delle pianticelle era affatto esiguo; ciò nonostante, al termine della conservazione, si ebbe a riscontrare nelle pianticelle sterili la presenza di zuccheri in quantità relativamente notevole. D'altro lato è stato osservato che l'acidità del materiale non ebbe a subire alcun aumento, bensì una leggera diminuzione.

Viceversa nell'esperienza in cui alle piantine vennero aggiunti dei batteri acidificanti si riscontrò una notevole presenza di acidi (pH = 4,15) e la assenza di zuccheri riduttori. È quindi affatto evidente che in assenza di microrganismi i tessuti vegetali non soggiacciono ad inacidimento e ciò sta a dimostrare in modo indiscutibile che ai processi di acidificazione dei foraggi insilati presiedono essenzialmente delle azioni microbiche; il concorso dei processi autolitici endocellulari è pertanto da ritenersi assai esiguo, se non proprio nullo, e facilmente mascherato dalle piccole quantità di sostanze basiche che traggono origine dai processi di proteolisi enzimatica il cui svolgersi è da tutti riconosciuto.

I risultati dell'indagine di cui si è detto in precedenza consentono infine di porre in evidenza un interessante processo di natura puramente autolitica, vale a dire la produzione enzimatica di zuccheri riduttori che vengono poi fermentati dai batteri acidificanti; è verosimile ammettere che codesto processo idrolitico sia alimentato da qualche carboidrato insolubile, mentre lo svolgersi di esso appare di notevole importanza in quanto concorre ad alimentare i processi di acidificazione batterica.

C) La microflora dei foraggi insilati e le trasformazioni da essa determinate

Dimostrato in modo definitivo che gli acidi del silaggio traggono origine quasi esclusivamente da azioni microbiche, riesce agevole tracciare un quadro riassuntivo delle principali trasformazioni cui soggiacciono i foraggi insilati.

Nei riguardi dei costituenti idrocarbonati si hanno fondamentalmente i seguenti fenomeni:

a) Processi di respirazione delle cellule vegetali, i quali hanno dapprima carattere tipicamente ossidativo, ma che in seguito all'esaurimento dell'ossigeno incluso nella massa foraggera procedono per qualche tempo secondo il noto schema della fermentazione alcolica.

b) Processi di idrolisi enzimatica di taluni carboidrati insolubili che si convertono in zuccheri riduttori.

c) Processi di acidificazione determinati essenzialmente da microrganismi.

Indubbiamente i microrganismi concorrono anche a determinare l'idrolisi di alcuni carboidrati insolubili, fermentandone in pari tempo i prodotti; queste attività decomponenti vengono però ad essere esplicate dopo l'esaurimento degli zuccheri solubili (e perciò direttamente fermentescibili).

Ne deriva che nel caso di foraggi ben provvisti di zuccheri essi non hanno verosimilmente che trascurabile importanza (ammesso, ben s'intende, che l'andamento della fermentazione sia favorevole). Di maggior portata essi appaiono invece nel caso di foraggi poco zuccherini ed in genere allorchè l'acidificazione fermentativa non risulta tale da paralizzare sufficientemente le attività microbiche. In casi del genere, accanto ad un'attività presumibilmente limitata dei tipici batteri acidificanti, si può avere una intensa partecipazione di microrganismi dotati di spiccate proprietà idrolitiche: più

precisamente di germi riferibili al gruppo dei fermenti butirrici, i quali sono capaci notoriamente di intaccare alcuni dei polisaccaridi complessi costituenti le pareti cellulari e quindi di determinare quella disgregazione dei tessuti vegetali che è frequente caratteristica dei foraggi mal conservati.

Per l'azione degli enzimi contenuti nelle cellule vegetali e per le attività microbiche, le sostanze azotate dei foraggi soggiacciono a processi di degradazione idrolitica dai quali traggono origine composti più semplici: peptoni, polipeptidi, aminoacidi. Questi ultimi possono subire a loro volta una ulteriore decomposizione dando luogo ad acidi e basi organiche diverse, ammoniacale ed altri composti. Lo svolgersi di questi fenomeni, è indubbiamente molto complesso; nè è agevole stabilire una netta distinzione fra quelli di natura autolitica e quelli dovuti ai microrganismi. La maggior parte degli Autori è però concorde nel ritenere che alla scissione puramente idrolitica presiedono in prevalenza gli enzimi contenuti nelle cellule vegetali. A reazioni essenzialmente autolitiche sarebbero pertanto dovute le trasformazioni proteiche che si svolgono negli insilati con esito ottimo. Viceversa le decomposizioni a carattere putrido che si svolgono con varia intensità negli insilamenti non perfetti sono da attribuire allo sviluppo di una microflora particolare di cui sarà detto nelle pagine che seguono.

Non è improbabile che parte delle divergenze di opinione esistenti fra gli studiosi del processo di conservazione dei foraggi insilati ed il diverso orientamento sperimentale delle ricerche relative, dipenda dalle scarse conoscenze possedute fino a poco tempo fa intorno alla natura degli agenti microbici della acidificazione.

Chi esamini la letteratura dell'argomento, s'avvede che fino a poco meno di dieci anni addietro i microrganismi acidificanti dei foraggi erano designati genericamente con la denominazione di *fermenti lattici*. È ben noto come con tale locuzione si intendessero fin dai tempi di Pasteur e Metchnikoff, particolarmente quei micròbi (batteri e cocchi) che fermentano il latte ed i suoi derivati, dando luogo ad acido lattico in misura corrispondente a circa il 98 % del lattosio fermentato, mentre la diffusione delle nostre conoscenze sulle loro proprietà è dovuta in particolare agli studiosi delle applicazioni dei fermenti lattici nella terapia delle intossicazioni intestinali. Pertanto, la locuzione generica di fermento lattico, si concreta per solito intorno alle specie: *B. bulgaricum*, *B. acidophilum*, *B. casei* ed altri streptococchi lattici.

I batteriologi che si sono occupati di microbiologia dei sili, non hanno dato fino a pochi anni fa, molti particolari intorno alle caratteristiche degli acidificanti riscontrati.

Nella sua memoria del 1905 il Gorini (6) comunicava di aver identificato le specie *Streptococcus lactis acidi* (*Strept. lacticus*) e *Bacillus lactis acidi* (*Bac. casei*), nonché un bacillo sporigeno del gruppo del *B. subtilis*, ad attività acido-presamigena cui il Gorini attribuiva molta importanza per i processi conservativi dei foraggi. Accanto a queste specie annotava pure il *B. coli* ed il *B. aërogenes*.

Il concetto di Gorini sugli acidificanti dei foraggi insilati, è chiara-

mente espresso dall'insegne studioso a pag. 6 della sua memoria del 1906: « Nel gruppo batteri acidificanti intendo comprendere tutte quelle specie batteriche che non fondono la gelatina animale e che acidificano il latte, dando un coagulo sodo ed intero (cioè privo di bolle di gas) senza ridisciogliere poi il coagulo. Essi corrispondono ai cosiddetti fermenti lattici ».

Anche gli altri autori si riferiscono in genere a queste specie di fermenti lattici tipici del latte e derivati poichè, pur usando per solito la locuzione generica di *fermenti lattici*, impiegano il latte sterile come mezzo nutritivo per gli isolamenti o per le culture massive. Un terreno quindi che è particolarmente adatto alle specie di fermenti lattici ora ricordati, ma assolutamente inadatto alle specie di acidificanti, la cui presenza nei foraggi insilati è stata rivelata da ricerche posteriori.

Che il concetto di « fermenti lattici » fosse inteso da quegli autori nel senso ora indicato, è dimostrato dal fatto che quando, riprendendo l'idea di Epstein, (che fu il primo a consigliare l'innesto di culture microbiche pure negli insilati di polpe di bietole), vollero tentare l'arricchimento della microflora acidificante degli insilati mediante l'aggiunta di culture, se non impiegarono direttamente culture di *B. casei* o specie analoghe, fecero uso come mezzo nutritivo del siero di latte o di altri derivati del medesimo i quali non potevano evidentemente consentire che lo sviluppo dei fermenti lattici, capaci di utilizzare il lattosio e cioè, dei comuni fermenti lattici del latte.

È ben vero che Gorini nel 1920, chiedendosi quali fossero i fermenti lattici da aggiungere all'insilato affermava che essi dovevano essere *adatti agli zuccheri dei vegetali ed avere altresì proprietà proteolitiche, per conseguire simultaneamente una trasformazione proficua degli albuminoidi in forma più assimilabile*, ma in tali esigenze fisiologiche è difficile poter identificare i micròbi acidificanti dei vegetali a noi noti attualmente e piuttosto pare di ravvisare in tali caratteristiche i *fermenti acidoproteolitici*, cui il Gorini attribuisce fondamentale importanza nella conservazione dei foraggi insilati, come appare anche da una sua recente pubblicazione (17).

Tale interpretazione può essere suffragata dal fatto che nelle sue esperienze di inoculazione (1912) nei foraggi, il Gorini stesso ha impiegato fermenti lattici ed acido-proteolitici, coltivati in siero di latte peptonizzato.

Il concetto che pare aver guidato il Gorini nel considerare la batteriologia del silaggio; è quello di favorire l'impiantarsi nel foraggio stesso di una microflora favorevole per il latte ed il caseificio, questo modo di vedere è chiaramente espresso nella sua memoria del 1906 mentre anche in quella del 1929 egli ribatte i suoi concetti sulla diffusione del *Bacillus acidificans presamigenes casei* nell'insilato ben riuscito e sulla opportunità di determinare degli arricchimenti di tale specie negli insilati.

Nei riguardi invece dell'insilamento delle polpe di bietole, la natura particolare dei batteri addificanti è apparsa assai presto agli studiosi, tanto è vero che fin dal 1913 Löhnis consigliava di usare come mezzo di innesto culturale del tritello di orzo, inumidito e spontaneamente acidificato, ambiente questo evidentemente molto adatto all'arricchimento delle specie microbiche capaci di fermentare energicamente il maltosio.

Il riconoscimento della particolare natura degli acidificanti riscontrati negli ortaggi fermentati e nelle polpe di bietola insilate, è avvenuto da tempo. Parallelamente è stata introdotta la pratica di innestare culture pure di *B. lact. Delbrückii*, di *B. cucumeris fermentati* e di specie analoghe.

Appare strano che la probabile analogia fra il chimismo della conservazione degli ortaggi fermentati e quello dei foraggi infossati, non sia stata subito rilevata in contrapposizione con il chimismo della fermentazione lattica del latte, che è stato invece l'ispiratore di tanti tentativi di regolazione della fermentazione lattica del foraggio.

Ancora recentemente Ruschmann e Bartram (1941-42) (19) hanno aggiunto infatti latte e siero in polvere al foraggio insilato, nell'intento di fornire un alimento stimolante ai micròbi acidificanti che questi autori considerano ancora come appartenenti ai comuni fermenti lattici del latte.

È fra il 1935 ed il 1940 che, indipendentemente fra loro, alcuni studiosi hanno precisato la natura degli acidificanti dei foraggi insilati.

In seguito agli scoraggianti risultati ottenuti con l'aggiunta di siero di latte al foraggio, Allen, Watson e Fergusson (20) riconoscevano nel 1937 come gli streptococchi lattici non abbiano che una trascurabile influenza sulla produzione di acido lattico ritenendo che lo *Streptobacterium plantarum* costituisca il maggiore responsabile della acidificazione.

Ad analoga conclusione erano giunti l'anno precedente Van Beynum e Pette, (21) in seguito ad esperienze nel corso delle quali avevano aggiunto diversi idrati di carbonio agli insilati, sicchè i comuni fermenti lattici del latte venivano riconosciuti soltanto come produttori occasionali di acidità nei foraggi.

Nel frattempo la scuola farmacologica di Eidelberga approfondiva lo studio della conservazione degli ortaggi per fermentazione acida (fermentazione che ha tanti punti di contatto con l'infossamento dei foraggi), mettendo in rilievo come anche nel corso di tale processo i fermenti lattici comuni non abbiano alcuna azione. Tale processo di acidificazione sarebbe dovuto invece al *B. acetylcholini*, specie che molto probabilmente è assai prossima al *Lact. plantarum* e della quale tratteremo più avanti.

Infine, nel 1936 Virtanen (22) segnalava la presenza di micròbi simili al *Lactobacillus pentoaceticus* nei foraggi insilati con acidi minerali, referto che era quasi contemporaneamente confermato da Cunningham e Smith (23).

Come appare dalle pubblicazioni degli autori ora ricordati, il riconoscimento della particolare natura degli acidificanti dei vegetali fermentati, cioè dei « produttori selvaggi di acido lattico », come Eichholtz e Keil (24) di Eidelberga li designano, è stato più o meno occasionale.

Apposite e sistematiche ricerche sono state compiute invece da Arnau di e Politi (25) dal 1936 in poi, allo scopo di accertarne la diffusione sulle piante foraggere, l'evoluzione negli insilati e precisarne le proprietà fisiologiche.

Procedendo all'isolamento dei microrganismi presenti nei foraggi verdi e trinciati, insilati in microsili sperimentali, nonchè, negli insilati Giglioli-Virtanen, allestiti da privati agricoltori ed impiegando diversi terreni culturali (agar al brodo comune glucosato, agar all'infuso di malto, agar al latte, agar al siero peptone, ecc.), Politi ha potuto differenziare la microflora pre-

CARATTERI FERMENTATIVI

CEPPI	Glucosio	Levulosio	Galattosio	Saccarosio	Maltosio	Lattosio	Arabinosio	Xilosio	Mannite	Destrina	Amido	Glicerina	Acido malico	Acido citrico
12 M	+	+	+	?	+	?	+	?	?	(+)	?	+	+	
CP	+	+	+	+	+	?	+	+	(+)	(+)	?	+	+	
13 T	+	+	+	+	(+)	+	+		+	(+)		+	+	+
6 B	+	+	+	(+)	+		(+)		(+)	(+)	?	~	+	
13 B	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	?	+	+	
12 B	+	+	+	?	+		+	(+)	(+)	(+)		+	+	
14 B	+	+	+	+	+	+	+		+	(+)	?	+	+	
SP	+	+	+	+	+	(+)	+	+	(+)	?		(+)	+	
MP	+	+	+	+	+		+	+	(+)	(+)	?	+		
4	+	+	+	+	+		+				?	~		
20	+	+	+	?	+		+				?	~		
14	+	+	+	(+)	+		(+)				?	~		

+ = Fermentazione decisamente positiva
 (+) = Fermentazione debole

? = Fermentazione dubbia
 — = Nessuna fermentazione

CARATTERI DIFFERENZIALI

CEPPI	Caratteri morfologici	Temperatura ottima	Produzione di gas	Produzione di acidi da					Latte coagulazione dopo giorni	Sviluppo in acqua peptonata	Sviluppo in gelatina
				saccarosio	lattosio	arabinosio	xilosio	mannite			
SP	Batteri		+	+	+	+	+	+	15-20	+	+
MP	Batteri	30-37	+	(+)	+	+	+	(+)	—	+	+
CP	Cocchi ovali a due a due o in catene		+	?	+	+	+	(+)	—	+	+
14 B	Batteri isolati o in catene . . .		—	+	+	+	—	+	7-10	+	+
13 B	» » » »	30-37	—	+	+	+	(+)	+	7-10	+	+
12 B	» » » »		—	?	+	+	(+)	(+)	—	+	+
6 B	» » » »		—	(+)	—	(+)	—	(+)	—	+	+
4	Batteri isolati o in catene . . .		—	+	+	+	—	—	—	—	—
20	Batteri isolati o in catene tal- volta in filamenti	30-37	—	?	+	+	—	—	—	—	+
14	Id.		—	(+)	(+)	—	—	—	—	—	—
12 M	Cocchi per lo più a due a due o a tetradi	30-37	—	?	+	+	?	?	—	+	+
13 T	Batteri per lo più in catene . . .	40-45	—	+	+	+	—	+	2-3	+	+

sente ed ha riscontrato ripetutamente e largamente, la presenza più o meno abbondante (in alcuni casi in misura assolutamente prevalente) di batteri asporigeni, grampositivi, non fluidificanti la gelatina, formanti colonie puntiformi, capaci di utilizzare: gluosio, saccarosio, levulosio, maltosio, arabinosio, (qualcuno anche lo xilosio) ed inattivi per la gran parte sul lattosio. Essi si sviluppano vigorosamente in infuso di erba, specie se preparato di recente; per la maggior parte non coagulano il latte o lo coagulano solamente dopo 15-20 giorni.

Questi caratteri generici sono in netto contrasto con quelli dei fermenti lattici del latte che hanno un comportamento incerto e variabile verso il saccarosio ed il maltosio, mentre sono tutti energici fermentatori del lattosio e danno rapida coagulazione del latte, con formazione di un coagulo sodo ed uniforme.

Riconosciuta questa netta differenza di comportamento rispetto ai comuni fermenti lattici Arnaudi e Politi ne fecero ricerca sistematica sulle principali foraggere in pieno campo ed in tutti i campioni di foraggi insilati a loro disposizione. Mentre Arnaudi (26) riscontrava la loro costante presenza in tutte le foraggere saggiate appena raccolte (37 campioni di leguminose e 14 di graminacee), conteggiando da 1200 a 23.000 batteri acidificanti per grammo di pianta verde, Politi (27) portava a termine uno studio comparativo, morfologico e fisiologico di 12 stipiti che avevano presentato qualche diversità di comportamento nel corso di un primo esame.

Alcune fra le più importanti osservazioni del Politi, sono riassunte nelle unite tabelle che riguardano la prima, il potere fermentativo dei singoli ceppi e la seconda, i caratteri differenziali.

Le ricerche compiute sui prodotti della fermentazione acida operata dai ceppi studiati, mirarono essenzialmente a determinare in modo approssimativo le quantità di acidi fissi e volatili prodotti nel corso della fermentazione del glucosio e del levulosio. A tal fine i singoli ceppi vennero seminati in 150 cc. di liquido sterile (acqua peptonata od acqua lievito al 2% di zucchero), di cui venne determinato l'esatto contenuto zuccherino iniziale. Dopo 6-7 giorni di incubazione a 37° C si determinarono gli zuccheri ancora presenti, quindi, per differenza, quelli fermentati e parallelamente gli acidi totali e volatili prodotti. I risultati ottenuti possono essere riassunti nel seguente modo:

I ceppi 14 B, 13 B, 12 B, 6 B, 14, 4, 13 T e 12 M, sia nella fermentazione del glucosio che in quella del levulosio, danno origine a quantità di acidi totali che, espresse come acido lattico, corrispondono ad oltre l'80-90% dello zucchero fermentato, mentre l'acidità volatile rappresenta una esigua frazione dell'acidità totale; questa risulta perciò costituita in misura nettamente prevalente da acidi fissi (acido lattico). I ceppi SP, MP e CP danno invece un rendimento in acidi che è alquanto inferiore a quello dei precedenti: nella fermentazione del glucosio l'acidità totale prodotta, espressa come acido lattico, rappresenta circa il 50 % dello zucchero fermentato; circa i due terzi di essa sono dati da acidi fissi ed un terzo da acidi volatili (acido acetico). Nella fermentazione del levulosio, l'acidità totale corrisponde invece a circa il 35 % dello zucchero fermentato e risulta costituita in porzioni pressochè equivalenti da acidi fissi e da acidi vo-

latili. È stato accertato inoltre che nella fermentazione del levulosio si ha la formazione di notevoli quantità di mannite.

Vanno infine ricordate le osservazioni di Arnaudi (25) circa le possibilità di attacco dello xilano che presentano alcuni fra i *fermenti lattici dei vegetali* (come egli li denomina, per distinguerli dai comuni fermenti lattici). Lo xilano verrebbe idrolizzato a xilosio, per quanto lentamente ed in modica misura.

Lo studio sistematico comparativo, eseguito dal Politi raffrontando anche i ceppi isolati con culture pure diagnosticate da istituti specializzati, ha consentito di concludere che alcuni di essi vanno classificati nelle specie: *Lactobacillus pentoaceticus* Fred, Peterson e Davemport e *Lactobacillus plantarum* Bergey et Al.

Gli altri non trovano una identificazione in specie note, per cui sono stati dal Politi descritti e denominati con i nomi:

Leuconostoc herbarum (ceppo CP).

Micrococcus pratensis (ceppo 12 M).

Lactobacillus sili (ceppo 13 T).

Notevole interesse presentano per il nostro argomento, come si è già accennato precedentemente, gli studi svolti dalla Scuola di Farmacologia di Eidelberga intorno alla conservazione degli ortaggi per fermentazione acida.

La diffusa usanza del popolo tedesco di impiegare il succo del Sauerkraut come purgante e le prime osservazioni di Gehlen (28), accertanti la presenza di acetilcolina nel succo stesso, hanno indotto Keil e Kritter (29) ad una serie di ricerche (condotte fra il 1935 ed il 1936) riguardanti i fenomeni biochimici che si svolgono nel corso della conservazione degli ortaggi per fermentazione acida. Essi giunsero alla conclusione che la azione purgativa del succo del Sauerkraut *non* può essere attribuita sicuramente al contenuto in colina stabilendo però, fatto per noi molto più importante, che il contenuto in acetilcolina è dovuto ad un batterio grampositivo, asporigeno, acidificante che si sviluppa bene fra i 25 ed i 35° C., ad un pH fra 4,5 e 6, che acidifica l'ambiente fino a pH 3,4 - 3,2 e presenta una certa tolleranza per il cloruro di sodio. I caratteri generali del microrganismo lo fanno apparire assai simile al *B. cucumeris fermentati* Henneberg, il quale, secondo i recenti studi di C. S. Pederson (30) è sinonimo del *Lactobacillus plantarum* Bergey et Al. e del *Lactobacillus pentosus* Fred, Peterson e Anderson.

Poichè l'acetilcolina non è stata trovata soltanto nel succo del Sauerkraut, dove si poteva supporre che si formasse durante la fermentazione acida per trasformazione della colina presente, ma anche nel succo di cetriolo — che non contiene colina prima della fermentazione acida — Keil e Kritter hanno pensato che essa rappresentasse un prodotto dei micròbi fermentanti. Tale ipotesi venne avvalorata dallo studio della fermentazione dei cetrioli, che ha dimostrato non soltanto l'insorgenza di acetilcolina dopo qualche tempo, ma anche che nel corso della conservazione non si hanno perdite in proteine. Soltanto allorquando le condizioni ambientali consentono lo sviluppo dei batteri della putrefazione, si ha la scom-

posizione delle proteine dei cetrioli e la contemporanea distruzione dell'acetilcolina.

Isolato in cultura pura il batterio acidificante, è stato constatato che esso è capace di dare acetilcolina tanto su succo di cetriolo sterilizzato, quanto su soluzioni zuccherine con sali inorganici e lattato di ammonio. Il microrganismo è stato considerato da Keil come una specie a se nonostante la grande somiglianza con il *B. cucumeris fermentati*, per cui è stato descritto sotto la denominazione di *B. acetylcholini*.

In seguito esso è stato ritrovato non soltanto in altri ortaggi fermentati ma anche in diversi foraggi conservati in modo analogo (mais, trifoglio, ecc.) cioè con modalità di insilaggio per fermentazione acida. Esso è stato quindi considerato da Eichholtz e Keil (31) quale agente della conservazione dei foraggi insilati verdi.

La produzione di acetilcolina da parte di micròbi è indubbiamente di notevole interesse, sicchè è stato logico che Keil e Partner (32) abbiano indagato se altri batteri o funghi fossero in grado di produrre acetilcolina. Il risultato conseguito è stato però assolutamente negativo. Vennero saggiati a tal fine l'*Oidium lactis*, il *Pen. glaucum*, vari lieviti, il *B. amylobacter*, il *B. coli*, il *B. prodigiosum*, il *B. violaceum*, lo *Staph. pyogenes* e lo *Strept. acidi lactici*.

In vista della notevole somiglianza che il *B. acetylcholini* presenta con il *Lact. plantarum*, abbiamo ritenuto interessante di vedere quale fosse il comportamento dei « fermenti lattici dei vegetali » nei riguardi della produzione di acetilcolina, in confronto con alcuni tipici rappresentanti dei fermenti lattici comuni del latte.

Quale metodo di ricerca abbiamo adottato, come gli studiosi della Scuola di Eidelberga, la determinazione fisiologica al chimografo, impiegando però come testo specifico anzicchè l'intestino tenue del ratto, il muscolo dorsale della sanguisuga, secondo il metodo di Juhener modificato da Minz.

Questo gruppo di esperienze non è ancora terminato: i risultati finora ottenuti ci consentono però alcuni rilievi di un certo interesse (*).

Da essi appare che anche il *Lact. plantarum* (ceppo 13 B) ed il *Lact. pentoaceticus* (ceppo SP) sono provvisti della facoltà di produrre acetilcolina. Risultati negativi sono stati ottenuti con il *B. bulgaricum* ed il *B. acidophilum*. Se questi risultati saranno ulteriormente confermati ed estensibili alle altre specie di fermenti lattici dei vegetali, costituiranno una nuova prova del fondamentale e diverso chimismo di questi micròbi viventi sopra i vegetali, rispetto a quello dei comuni fermenti lattici del latte.

Dalle nostre esperienze risulterebbe inoltre confermata l'osservazione di Keil e Kritter circa la formazione dell'acetilcolina, che sarebbe conseguenza di fenomeni di autolisi batterica, cioè della morte dei microrga-

*) Ringraziamo molto cordialmente il Prof. Filippo Uselli, direttore dell'Istituto di Fisiologia degli animali domestici della R. Università di Milano e la sua assistente Dott. Comi per l'ospitalità e il prezioso aiuto che ci hanno dato in queste ricerche, che saranno pubblicate in comune prossimamente.

nismi stessi. Le nostre grafiche segnalano infatti una maggiore presenza di colina quando, a parità di tutte le altre condizioni di esperienza (pH., temperatura, ecc.), anzicchè il liquido culturale viene cimentato sul muscolo della sanguisuga un liquido ottenuto sospendendo in egual volume di acqua la massa batterica, raccolta per centrifugazione, e lasciata per qualche ora a sè in guisa da favorire la lisi batterica.

La produzione di acetilcolina per lisi od autolisi batterica e non per attività enzimatiche sul substrato, era del resto già prevedibile dopo le ricordate osservazioni di Keil e collaboratori che l'hanno ritrovata anche in culture di *B. acetylcholini* sviluppate su liquido nutritivo costituito esclusivamente da zucchero, sali minerali e lattato d'ammonio.

La nuova conferma non è priva di interesse perchè consente di escludere che il *B. acetylcholini* ed i similari fermenti lattici dei vegetali possano esercitare, come è stato asserito da taluno, anche un'azione enzimatica sui composti azotati complessi ed avere quindi caratteri affini a quelli dei proteolitici.

I caratteri fisiologici dei fermenti lattici dei vegetali stanno ad indicare quali siano i prodotti che traggono origine, per l'attività della microflora acidificante, nel suo complesso, dai costituenti idrocarbonati dei foraggi insilati: acido lattico in forte prevalenza, piccole quantità di acido acetico e trascurabili quantità di altri prodotti. L'azione degli stessi microrganismi sulle sostanze azotate è invece affatto lieve; quasi del tutto privi di potere proteolitico, essi sono capaci infatti di assimilare quasi esclusivamente dei composti azotati relativamente semplici come i peptoni e gli aminoacidi. Pure le trasformazioni cui soggiacciono queste sostanze sono affatto lievi, dato che esse vengono essenzialmente assimilate e non fermentate. Alcune ricerche, all'uopo istituite con numerosi ceppi, hanno infatti dimostrato che i microrganismi medesimi non danno alcuna produzione di ammoniaca. Fatti crescere in un succo ottenuto per spremitura, neutralizzazione e sterilizzazione da un buon insilato, gli stessi microrganismi determinano anzi una lieve diminuzione dell'ammoniaca preesistente.

Per tutte queste ragioni è d'uopo concludere che i microrganismi acidificanti, all'infuori della fermentazione acida degli zuccheri, non concorrono, se non in misura trascurabile, alle trasformazioni che i foraggi subiscono con la conservazione nei sili; essi costituiscono la microflora tipica del silaggio normale, staccandosi nettamente dalle altre specie microbiche che si sviluppano abbondantemente soltanto quando non si ha una rapida e sufficientemente intensa acidificazione del foraggio.

MICROFLORA ANORMALE E DANNOSA

Delle numerosissime specie microbiche inizialmente presenti nei foraggi, solo un numero relativamente ristretto di esse può trovare condizioni che ne consentano un abbondante sviluppo. A determinare questa selezione concorrono diversi fattori e principalmente il rapido esaurimento dell'ossigeno presente, e quindi lo stabilirsi di condizioni decisamente anaerobiche, l'acidità propria del foraggio e quella prodotta dai microrganismi acidificanti. Non sempre però questa acidificazione fermentativa è tale, per rapi-

dità ed intensità, da escludere lo sviluppo di quei microrganismi che costituiscono nel loro complesso la microflora anormale del silaggio. Trattasi principalmente di batteri anaerobi sporigeni che vengono comunemente distinti nei due gruppi designati con i termini di fermenti butirrici e di proteolitici putrefacenti. Giova però ricordare che una differenza netta fra gli agenti della fermentazione butirrica propriamente detta, la quale si svolge a spese degli idrati di carbonio e quelli della fermentazione putrida delle sostanze azotate non può essere posta giacchè parecchi microrganismi sono capaci di agire tanto sugli zuccheri quanto sulle proteine, mentre assai ridotto è il numero di quelli che agiscono soltanto su queste ultime. Tuttavia la precedente distinzione può essere assunta nel senso di considerare distintamente i fermenti butirrici tipici, cioè i microrganismi riferibili alla specie collettiva *Clostridium butyricum* di Praznowski, da altri microrganismi più decisamente putridogeni. La distinzione medesima si rende poi particolarmente efficace per il fatto che i fermenti butirrici vengono spesso considerati come i principali responsabili delle alterazioni dei foraggi o come tipici e quasi soli rappresentanti della microflora silaria dannosa. Pertanto si è voluto indagare se questa opinione risponda al vero o se invece alla degradazione putrida anaerobica delle sostanze azotate presiedano microrganismi nettamente diversi dai fermenti butirrici veri e propri.

Da diversi foraggi insilati, mediante arricchimenti in latte sterile ed in altri terreni culturali, seguiti dall'allestimento di piastre anaerobiche, si sono isolati diversi batteri gasogeni, sporificanti, anaerobi obbligati che già ad un sommario esame apparivano come tipici fermenti butirrici. Alcuni degli stipiti così ottenuti furono oggetto di più completo studio dei loro caratteri fisiologici e fermentativi. I risultati della ricerca hanno posto in luce le seguenti caratteristiche fondamentali:

Nella fermentazione degli zuccheri in terreni tamponati con carbonato di calcio si ha formazione prevalente di acido butirrico ed in proporzioni minori di acido acetico; in terreni non tamponati, accanto ai predetti acidi si ha anche la produzione di alcool butilico.

Lo sviluppo in terreni privi di zuccheri è nullo o molto stentato; viceversa si ha crescita e fermentazione in terreni sintetici del tutto privi di azoto organico e contenenti dei sali di ammonio.

Fatti crescere nel succo di spremitura di foraggi insilati in buon stato di conservazione (addizionato o non di piccole quantità di glucosio e quindi neutralizzato e sterilizzato), non danno produzione di ammoniaca, sibiene una leggera diminuzione di quella preesistente.

Codesti caratteri nel mentre autorizzano a riferire i germi studiati al gruppo dei fermenti butirrici tipici, ci consentono di affermare che i microrganismi medesimi non sono effettivamente responsabili delle degradazioni cui vanno soggette le sostanze azotate dei foraggi negli insilamenti con esito scadente. Il loro sviluppo dev'essere però considerato egualmente dannoso non soltanto per la natura dei prodotti delle loro attività fermentative e per il pericolo che essi costituiscono per il latte destinato al caseificio, ma anche per altri motivi; il gruppo dei fermenti butirrici comprende infatti dei germi capaci di fermentare l'acido lattico, e quindi di rendere possibile lo sviluppo di altri microrganismi dannosi, ed anche dei germi

capaci di intense azioni su alcuni carboidrati delle pareti cellulari dei vegetali che in tal modo vengono idrolizzati e fermentati.

Riconosciuto che i fermenti butirrici propriamente detti non presiedono direttamente ai processi di degradazione profonda delle sostanze azotate, si sono proseguite le indagini al fine di identificare gli agenti microbici responsabili delle alterazioni medesime. Mediante l'impiego di terreni elettivi opportuni, privi di zuccheri e ricchi di sostanze azotate, è stato possibile isolare da alcuni insilati dei microrganismi aventi i seguenti caratteri:

Anaerobi obbligati, sporigeni, alcuni Gram positivi ed altri Gram negativi; capaci di intenso sviluppo anche in terreni privi di zuccheri. Essi fluidificano la gelatina, decompongono integralmente e con grande rapidità la caseina del latte; producono gas, sebbene in limitata quantità, anche nei terreni non zuccherati; producono indolo, sostanze di odore fetido e cospicue quantità di ammoniaca; la produzione di quest'ultima è stata riscontrata anche in succo neutralizzato e sterilizzato, di foraggi insilati.

Glucosio, levulosio e maltosio vengono fermentati con produzione di gas e di acidi; inattaccati sono invece: galattosio, saccarosio, lattosio, arabinosio e xilosio.

La temperatura ottima è di circa 37° C., ma buon sviluppo si ha anche a 44° C., mentre a 20° C. la crescita è molto lenta.

L'acidità massima tollerata è espressa da pH variabili fra 5,2 e 5,8.

Dai predetti caratteri si deduce che i germi studiati sono dei tipici putrefacenti, dannosi per le decomposizioni provocate nei foraggi e con ogni probabilità anche per l'influenza che i prodotti del loro metabolismo possono esplicare sugli animali. La loro presenza negli insilati mediocri o scadenti non è stata ancora indagata con la necessaria ampiezza, dato che le indagini sono ancora in corso; tuttavia le osservazioni effettuate per mezzo di piastre aerobiche su numerosi foraggi ed in esperienze con microsili, ci inducono a ritenere che molto probabilmente i principali e più temibili agenti della fermentazione putrida del silaggio sono appunto microrganismi del tipo di quelli di cui si è detto, vale a dire dei batteri anaerobi sporigeni.

D) Le trasformazioni biochimiche dei foraggi insilati dal punto di vista quantitativo

Di grande interesse è la conoscenza delle trasformazioni cui soggiacciono i foraggi dal punto di vista delle variazioni di composizione e di valore alimentare che conseguono alla complessa fermentazione che si svolge nei sili. È necessario premettere che nella pratica, alle variazioni medesime, strettamente dipendenti dall'andamento dei processi fermentativi, si accompagna di regola anche la perdita delle sostanze contenute nei succhi eccedenti che si spremono dalla massa foraggera e la cui eliminazione si rende necessaria ai fini della buona conservazione. Pertanto, il totale delle perdite che si verificano nella conservazione in silo dei foraggi allo stato verde comprende in pratica due ordini di fenomeni che è d'uopo tenere ben distinti, in particolar modo per il fatto che le perdite connesse alla eliminazione dei succhi eccedenti variano a seconda dell'acquosità dei foraggi

ed anche per il fatto che esse possono essere almeno in parte ridotte, sia mediante un leggero appassimento dell'erba, sia mediante l'utilizzazione dei liquidi medesimi (ad esempio per la formazione di pastoni alimentari).

La determinazione delle trasformazioni quantitative che i costituenti dei foraggi subiscono per effetto dell'insilamento, vale a dire la compilazione di un bilancio basato sul confronto fra la composizione dell'erba e quella dell'insilato, incontra notevoli difficoltà sperimentali, poichè gli inevitabili errori che si commettono nel campionamento e nelle analisi si moltiplicano in proporzione della massa.

Se poi l'indagine deve essere condotta in modo da distinguere le perdite dovute ai processi fermentativi da quelle dovute all'eliminazione dei succhi eccedenti, le difficoltà sperimentali sono tali da rendere i risultati molto incerti se non proprio arbitrari, specialmente nel senso di attribuire alle fermentazioni delle perdite che in realtà sono dovute al disperdimento dei succhi. Per queste ragioni allo stato attuale delle nostre conoscenze non si hanno dati e conclusioni che dimostrino con sufficiente attendibilità quali siano le trasformazioni che effettivamente sono connesse ai processi di fermentazione.

Allo scopo di chiarire l'importante quesito, si è pensato di evitare le suaccennate difficoltà, realizzando in vitro condizioni opportune in modo da riprodurre con sufficiente approssimazione l'andamento fermentativo di quello che dovrebbe essere un silaggio normale ben riuscito. In questo senso si debbono quindi intendere i risultati dell'indagine compiuta. Come foraggio venne impiegata dell'erba di prato misto, la quale venne tagliuzzata, ben mescolata e schiacciata, in modo da essere più facilmente costipabile nei microsili; la fuoriuscita di succhi così prodottasi avrebbe poi favorito la moltiplicazione e l'attività della microflora acidificante. Col foraggio così preparato si allestirono le seguenti prove:

1) Per la determinazione diretta della perdita di sostanza organica, gr. 63,5 e gr. 125 di erba vennero introdotti rispettivamente in due Erlenmeyer da 250 cc. che vennero chiusi con tappo di gomma e valvola ad acido solforico. I due dispositivi furono quindi pesati e poi mantenuti in termostato a 30° C.

2) Per la determinazione delle trasformazioni fermentative si riempì un microsilo della capacità di 2000 cc. con gr. 1300 di erba; si applicò una chiusura idraulica e si pose in termostato a 30° C.

Contemporaneamente si essicarono gr. 1000 della stessa erba al fine di determinarne la composizione iniziale.

Le perdite di sostanza organica vennero seguite pesando periodicamente i microsili delle prove 1). La costanza di peso, raggiunta dopo circa 20 giorni, sta ad indicare che al termine dell'esperienza (45 giorni), il foraggio non era più sede di apprezzabili trasformazioni, per cui, se si fosse protratta la conservazione, non si sarebbero verificate ulteriori sensibili variazioni.

Aperto dopo 45 giorni il microsilo 2), si determinò esattamente il peso dell'erba fermentata; 100 gr. di questa vennero quindi impiegati per la determinazione del contenuto in acidi liberi totali, in acidi volatili liberi e combinati ed in azoto ammoniacale; 1000 gr. vennero fatti essiccare ed

utilizzati per le altre determinazioni chimiche; il rimanente servì per la determinazione del pH.

Le perdite di peso determinate mediante pesata diretta dei microsili dell'esperienza 1) risultarono le seguenti:

a) erba gr. 125; perdita di peso gr. 0,329 ossia 0,263 % dell'erba e 1,58 % della sostanza secca iniziale;

b) erba gr. 63,5; perdita di peso gr. 0,181 ossia 0,285 % dell'erba e 1,71 % della sostanza secca iniziale.

È interessante osservare che nel microsilo b) in cui venne introdotta una minor quantità di erba, si ebbe una perdita percentuale di peso un po' maggiore di quella avutasi nel microsilo a), evidentemente in conseguenza della maggior quantità di ossigeno rimasto ad alimentare i processi respiratori.

Dai risultati ottenuti si deduce agevolmente che per i comuni foraggi la quantità di sostanza organica che va perduta attraverso i processi di respirazione e di fermentazione, allorchè l'andamento di questi è caratterizzato dal rapido prevalere dei microrganismi acidificanti e dal tempestivo raggiungimento di un grado di acidità sufficientemente elevato, è contenuta entro limiti relativamente molto esigui, essendo espressa dallo sviluppo di sostanze gassose (anidride carbonica) in quantità corrispondenti ad 1,5 - 2% della sostanza secca dell'erba insilata. Sviluppi più abbondanti di anidride carbonica si possono però avere nel caso di foraggi che per il loro elevato contenuto zuccherino (mais e sorgo) soggiacciono ad intensi processi di fermentazione alcoolica ad opera di blastomiceti.

Tenendo conto anche della lieve perdita di peso verificatesi nel corso della fermentazione, i risultati analitici dell'esperienza 2) vennero riferiti a 1000 gr. di erba iniziate, di modo che le variazioni prodottesi nei singoli costituenti del foraggio, corrispondono alla differenza fra i contenuti iniziali e finali raccolti nella seguente tabella.

Lo stato di conservazione dell'erba è dimostrato dai seguenti dati:

pH	4,04
N Ammoniacale	0,031 % (7,1 % dell'azoto totale)
Acidità libera totale (come ac. lattico)	2,049 %
Acidi volatili liberi e comb.	
Ac. acetico	0,2844 %
Ac. butirrico	assente

Pertanto i risultati dell'indagine possono essere assunti come rappresentativi delle trasformazioni cui soggiacciono i costituenti dei foraggi negli insilamenti normali ben riusciti. Dal loro esame emergono i seguenti rilievi:

TRASFORMAZIONI FERMENTATIVE
DEI COSTITUENTI FORAGGERI

	Contenuti iniziali - gr.	Contenuti finali - gr.
Sostanza secca a 100° C.	166,8	163,7
Sostanze minerali	17,97	18,02
Fibra greggia (metodo Kjeldahl)	27,12	26,81
Fibra greggia (metodo König)	42,75	39,93
Estratto etereo	7,02	19,37
Estrattivi inazotati (per differenza)	71,94	59,57
Proteina pura (metodo Barnstein)	18,80	11,76
Proteina pura digeribile (metodo Stutzer)	14,14	6,58
Pentosani (metodo Tollens)	24,90	24,95
Zuccheri riduttori	10,56	assenza
Zuccheri riduttori dopo inversione	12,84	assenza
Acidità libera totale (come ac. lattico)	3,52	20,16
Acido acetico libero e combinato	n. d.	2,80

- la perdita di sostanza organica (1,9% di quella iniziale) è in perfetta concordanza con i dati desunti dall'esperienza I);

- praticamente immutati risultano, accanto alle sostanze minerali, i contenuti in proteina greggia ed in pentosani; leggermente diminuita la fibra greggia;

- notevole diminuzione si osserva invece per il contenuto in proteina pura e più ancora per quello in proteina pura digeribile;

- completa è stata la scomparsa degli zuccheri solubili e intensa la produzione di acidi, per la massima parte fissi.

Sembrano legittime pertanto le seguenti considerazioni:

Le trasformazioni fermentative cui soggiacciono le sostanze azotate in un silaggio normale consistono essenzialmente in processi di idrolisi che non determinano variazioni nel contenuto totale di azoto del foraggio; si ha invece una notevole formazione di composti più semplici a spese della proteina pura; nella nostra esperienza si è avuta infatti una diminuzione di questa nella proporzione del 37,4% del contenuto iniziale. D'altra parte si osserva che la proteina digeribile subisce una diminuzione proporzionalmente maggiore; è evidente quindi che l'idrolisi avviene essenzialmente a spese della frazione proteica digeribile, cosicché il coefficiente di digeribilità della proteina rimasta inattaccata risulta conseguentemente minore di quello della proteina iniziale.

In complesso quindi sembra verosimile ritenere che per effetto dei processi fermentativi propri dei buoni insilamenti, i foraggi non subiscono

che lievi diminuzioni del valore proteico. Perdite considerevoli derivano invece dai processi degradativi che comportano la demolizione profonda delle sostanze azotate. Lo svolgersi di questi processi rientra però in quella che giustamente può dirsi la patologia del silaggio.

Considerando le trasformazioni relative ai costituenti idrocarbonati dei foraggi emerge che alla scomparsa degli zuccheri solubili corrisponde la formazione di acidi organici in quantità superiore a quella degli zuccheri medesimi. Tenendo presente che una frazione di queste sostanze viene consumata attraverso ai processi di respirazione delle cellule vegetali e che il rendimento in acidi delle fermentazioni batteriche non è mai del 100%, è evidente che una parte dell'acidità degli insilati deriva da carboidrati insolubili. Questa constatazione analitica è del resto in perfetto accordo con le risultanze delle ricerche compiute per mezzo di pianticelle sterili, ricerche che hanno consentito appunto di dimostrare la formazione di zuccheri riduttori per via puramente enzimatica. Si è pure avuto occasione di dire che ai fenomeni di cui è cenno possono concorrere anche i microrganismi.

Le variazioni osservabili nei confronti dell'estratto etereo e degli estrattivi inazotati complessivi non consentono rilievi degni di nota soprattutto per il fatto che si tratta di dati greggi (da notare che nell'estratto etereo dell'erba fermentata risultano compresi degli estrattivi inazotati e particolarmente degli acidi organici). Notevole invece è che i pentosani non hanno subito apprezzabili variazioni, il che sta ad indicare che nei buoni insilamenti queste sostanze non vengono praticamente intaccate; è probabile però che esse lo siano in condizioni meno favorevoli.

Nei riguardi della fibra greggia si osserva infine una lieve diminuzione (6,6% del contenuto iniziale); non è però possibile affermare se la variazione medesima sia imputabile ad errore analitico oppure se sia da porsi in relazione con i processi di idrolisi, enzimatica o microbica, di cui si è detto in precedenza.

CONCLUSIONI RIASSUNTIVE E DEDUZIONI PRATICHE

Avendo delimitato le nostre indagini agli insilamenti per fermentazione acida naturale, anche le deduzioni che di volta in volta sono state messe in rilievo e quelle che vogliamo qui riassumere si intendono relative a questo sistema di conservazione dei foraggi. Degli altri due sistemi vantaggiosamente applicati in pratica, vale a dire il sistema Cremasco, fondato sulla riduzione dell'umidità al di sotto del 50 % ed il sistema Giglioli-Virtanen, fondato sulla acidificazione con acidi minerali, ci limitiamo qui a rammentare che nel primo di essi si hanno processi di natura prevalentemente autolitica ed enzimatica, ai quali conseguono una lieve acidificazione ed una limitata idrolisi delle sostanze azotate. Nel sistema Giglioli-Virtanen invece il complesso delle trasformazioni qualitative e quantitative dei foraggi dipende strettamente dal verificarsi o meno della condizione fondamentale che l'acidificazione iniziale della massa insilata corrisponda a valori di pH compresi fra 3 e 4 e che l'acidificazione stessa sia affatto uniforme. I processi enzimatici e microbici che si svolgono nei foraggi insilati con questo sistema sono però in sostanza quegli stessi che

hanno luogo negli insilamenti per fermentazione naturale, salvo la loro intensità più o meno attenuata.

Le deduzioni che si possono trarre dalle indagini esposte nelle pagine che precedono e che in parte sono state di volta in volta messe in rilievo riguardano da un lato le trasformazioni fermentative e le variazioni di valore alimentare cui soggiacciono i foraggi insilati e dall'altro quella che dovrebbe essere la miglior tecnica del silaggio.

Dal primo punto di vista riesce agevole addivenire alle seguenti conclusioni:

Le trasformazioni fermentative che si verificano negli insilamenti con esito ottimo dei comuni foraggi di prato comportano delle perdite di sostanze organiche molto esigue; esse si possono valutare in ragione di circa il 2% della sostanza secca.

— Gli zuccheri solubili subiscono per azioni essenzialmente batteriche una totale fermentazione acida dalla quale traggono origine acido lattico in forte prevalenza ed acido acetico in limitate proporzioni; parimenti fermentati risultano gli zuccheri che si formano da carboidrati complessi attraverso processi autolitici e in alcuni casi anche attraverso azioni microbiche. Una parte degli zuccheri sfugge però alla fermentazione acida in quanto viene consumata attraverso ai processi respiratori delle cellule vegetali, processi che hanno dapprima carattere ossidativo e quindi proseguono per qualche tempo con l'andamento della fermentazione alcoolica.

— Praticamente immutati rimangono i pentosani e la fibra greggia.

— Le sostanze azotate soggiacciono a parziale idrolisi di natura autolitica, cosicchè si ha una notevole diminuzione della proteina pura e pari aumento delle sostanze azotate non proteiche; la formazione di ammoniaca può essere assai lieve, di modo che il valore proteico dei foraggi non risulta in complesso diminuito se non in proporzioni modiche. Non è fuori luogo osservare che, allo stato attuale delle cose, i risultati che si ottengono nella generalità dei casi pratici si scostano alquanto da quelli che corrispondono alla condizione di ottimo che sta alla base delle precedenti deduzioni. Ne deriva che grandi vantaggi potranno essere realizzati attraverso l'applicazione di una tecnica razionale e perfetta.

A base di questa vanno poste le seguenti indicazioni, che al pari delle precedenti conclusioni, emergono dalla conoscenza dei processi fermentativi che si svolgono nei sili:

— I processi di acidificazione batterica devono essere convenientemente assecondati, in modo che il loro svolgersi sia il più possibile rapido e che il foraggio acquisisca un'acidità sufficiente a preservarlo dalle alterazioni dovute ai fermenti butirrici e putrefacenti.

Altre condizioni fondamentali sono:

— l'esclusione dell'aria, quale causa di riscaldamento dei foraggi, di consumo di una parte degli zuccheri (che conseguentemente sfugge ai processi di acidificazione), di alterazioni per lo sviluppo di microrganismi aerobi;

— l'uniformità della fermentazione nelle varie parti del silo. Ad una fermentazione disforme consegue infatti il propagarsi delle alterazioni nelle parti sane della massa.

— Il miglior esito della conservazione è più facilmente conseguibile allorchè l'insilamento viene effettuato con temperature relativamente basse (insilamenti autunnali nell'Italia settentrionale).

I mezzi pratici che consentono di realizzare le predette condizioni comprendono: la disintegrazione meccanica dei foraggi, il loro accurato assestamento, il rapido riempimento del silo (possibilmente in un giorno solo), la perfetta esclusione dell'aria, l'energica compressione della massa, l'eliminazione dei succhi eccedenti. Nel caso di foraggi poco zuccherini, infine, la mescolanza con foraggi ad elevato contenuto di zuccheri oppure l'aggiunta di melasso. Va poi da sè che i sili adottati debbono essere adatti alle condizioni dei singoli casi, in particolar modo come capacità.

Alle perdite dovute ai processi fermentativi, di cui più sopra si è posto in evidenza la limitata entità, si sommano in pratica quelle conseguenti alla eliminazione dei succhi eccedenti. Nel caso di foraggi molto acquosi, queste perdite risultano piuttosto rilevanti, anche se si tratta di insilamenti con esito ottimo. Di notevole interesse pratico appaiono pertanto gli accorgimenti atti ad evitare il disperdimento delle sostanze contenute nei detti succhi: mescolanza dei foraggi con pula o materiali pagliosi che devono però essere finemente disintegrati in modo da non accrescere la porosità della massa; raccolta dei succhi nei pozzetti dei sili e loro impiego nella preparazione di pastoni alimentari.

Si può prospettare infine l'impiego di paglie ridotte quasi in farine per costituire un primo strato assorbente sul fondo del silo ed un altro al di sopra della massa insilata; entrambi di conveniente spessore, in modo che il foraggio compresso ceda ad essi una parte rilevante dei succhi. Si otterranno così dei pastoni che, mescolati con altri mangimi, potranno servire all'alimentazione degli animali da lavoro.

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden die in der Literatur niedergelegten Vorkenntnisse zur Frage der Herkunft der Säuren im Silofutter angeführt. Besonders hervorgehoben werden die experimentellen Untersuchungen von Babcock und Russell (1902), Lamb (1917), Curin (1932), Pratolongo und Fabris (1939), Arnaudi und Politi (1939), deren wichtigste Ergebnisse ausführlich besprochen werden.

Es wird folgendes festgestellt:

a) Die säurebildenden Keime, welche in dem grün ensilierten Futter enthalten sind, gehören zu den Arten *Lactobacillus plantarum* Bergey, *Lactobacillus pentoaceticus* Fred, Peterson und Davempfort, *Leuconostoc herbarum* Politi, *Lactobacillus sili* Politi., *Micrococcus pratensis* Politi.

Diese Gruppe von Mikroorganismen welche von Arnaudi (1935) «Milchfermente der Pflanzen» genannt worden sind, unterscheidet sich deutlich von der Gruppe der Milchfermente der Milch und der Käseprodukte, indem sie Laktose wenig oder gar nicht vergärt, die Milch nicht gerinnt, aber Glykose, Saccharose, Lävulose, Maltose und Arabinose vergärt (einige unter diesen Mikroben sind auch imstande Xylose zu vergären); sie hydrolysieren

überdies mehr oder weniger intensiv Xylan. Einige darunter besitzen Merkmale die denjenigen des *B. acetylcholini* von Keil sehr ähnlich sind, indem sie — besonders in alten Kulturen — zur Acetylcholinbildung befähigt sind. Die gleiche Acetylcholinbildung kann auch mittels einer zur Bakterienlysis führende Wirkung hervorgerufen werden.

b) Die Gruppe der «Milchfermente der Pflanzen» besitzt eine besondere Resistenz gegen Glycerin (normal oder mit Mineraläuren angesäuert). In der Tat vermehren sich diese Keime in den Nährlösungen auf normale Weise auch bei Gegenwart von 25 % Glycerin, während bei Anwesenheit von 35-40 % Glycerin einige Stämme noch imstande sind sich, nach acht-tägiger Inkubationszeit, zu vermehren und das Milieu anzusäuern.

Der *Lact. plantarum* und der *Lact. pentoaceticus* vermehren sich regelmässig in Nährlösungen mit 20 % Glycerin, bei einem pH von 5 zu 3, und bewerkstelligen eine weitere Ansäuerung des Nährmittels. Diese Ergebnisse zeigen dass die Versuche jener Forscher welche glaubten die Hemmung mikrobieller Prozesse zu erreichen indem sie dem Futter angesäuertes oder nicht angesäuertes Glycerin zusetzten, nicht beweisend sind, da in der Tat, solche experimentelle Bedingungen nicht imstande sind die Hemmung der Vermehrungs- und Gärungstätigkeiten zu verwirklichen.

Experimente über die Konservierung von Maispflanzen in angesäuerten Glycerinlösungen haben die Anwesenheit mehrerer hundert Millionen Pflanzen-Milchfermente pro Gramm Futter nachgewiesen.

c) Wenn sterile Pflanzen auf diese Weise konserviert werden, so geben sie keine Ansäuerung.

Maissamen wurden 20-40' mit 1/1000igen HgCl₂ behandelt, mit sterilem H₂O gewaschen und hernach auf ihre Sterilität geprüft; aus diesen Samen konnten sicher sterile Maispflänzchen erhalten werden. Diese Pflanzen wurden steril zerschnitten und in sterile Töpfe gebracht. Ein Teil derselben blieb unbehandelt, die anderen wurden mit einer Kultur Milchfermente der Pflanzen geimpft. Alle Töpfe wurden bei 20-25° C. gehalten. Die nach 30 Tagen ausgeführten Proben ergaben folgende Resultate:

Ausgangswerte		Werte am Ende der Probe	
		Sterile Pflanzen	Sterile Pflanzen + säurebildende Keime
pH	5.8	6	4.15
Azidität cmc N/50 pro 10 gr.	16.6	14.3	37
Reduzierende Zuekerarten (nach der Impfung)	Spuren	4.9 ‰	fehlen

Diese Resultate beweisen dass die ensilierten Pflanzen mit Hilfe mutmasslicher endozellulärer Enzyme keine oder nur eine spärliche Ansäue-

zung zu geben vermögen und das der normale Ansäuerungsprozess, der Wirkung säurebildender Keime zuzuschreiben ist.

Aus diesen Resultaten geht hingegen hervor, dass kleine Mengen reduzierender Zuckerarten aus den unlöslichen Kohlenhydraten stammen können, dank der Wirkung der endozellulären Enzyme.

d) Es wird hervorgehoben dass bei den für das Silofutter schädlichen Mikroben, neben den Buttersäurebildner auch den sporenbildenden, fäulnis-erregenden Anaërobiern grosse Aufmerksamkeit geschenkt werden soll, da dieselben besonders auf die Proteinkörper und hingegen wenig auf Zuckerarten einwirken; einige von diesen letzteren (Galaktose, Saccharose, Laktose, Arabinose, Xylose) werden überhaupt nicht angegriffen.

e) Die quantitativen Verluste an organischen Substanzen sind bei gut ausgeführten Ensilierungen sehr gering. Mikroensilierungsproben haben Verluste an organischer Substanz gegeben die im ganzen auf 19 der Ausgangssubstanz beschränkt geblieben sind.

Der Gehalt an rohen Proteinen und Pentosanen bleibt praktisch unverändert; die rohen Fasern sind etwas vermindert. Bedeutender ist die Abnahme an reinem und verdaulichem Protein, während ein gänzlicher Verlust an löslichen Zuckern stattfindet der mit einer intensiven Bildung von grösstenteils fixen Säuren einhergeht.

Es werden zuletzt einige übersichtliche Betrachtungen gemacht und praktische Folgerungen gezogen und überdies die wesentlichsten Massnahmen gegeben um bei Einsilierung von Grünfutter eine vollkommene Konservierung zu erzielen.

BIBLIOGRAFIA

(1) *Politi I.* - Teoria e pratica del silaggio. « Casa ed. Dante Alighieri », 1942.

(2) *Griffith A. B.* - On the microbes involved in the ensilage of green fodder. « Chem. News », vol. 70, n. 1828; 1894.

(3) *Wollny H. A.* - Die Zersetzung der organischen Stoffe und die Humusbildungen. Heidelberg, 1897.

(4) *Fry G.* - The theory and practice of sweet ensilage. « Agric. Press. Co. », London, 1885.

(5) *Babcock S. M.* e *Russell H. L.* - Die bei der Herstellung von Grünfutter (silage) wirkenden Ursachen. « Zentr. f. Bakteriologie, II Abt. », Bd. 9: 3/4, 81. 1902.

(6) *Gorini C.* - Ricerche batteriologiche sui foraggi conservati nei silos. « Annuario della Istituzione A. Ponti » annessa alla Facoltà d'Agraria di Milano. Dal vol. V (1904) al vol. XII (1915).

(7) *Lamb A. R.* - The relative influence of microorganisms and plant enzymes on the fermentation of corn silage. « Jour. of Agric. Research », volume VIII, n. 10, 1917.

(8) *Virtanen A. J.* - Le procédé A.I.V. en théorie et en pratique. « Revue Int. d'Agriculture », anno 27, pag. 394, 1936.

- (9) *Hansen S. H.* - Oversikt aver ensileringsprosessens biokjemiske forlop « Norge Landbrukshoiskole », 25 Ber., 1929.
- (10) *Curin B.* - O puvodu kyseliny mléčné v silázi. « Sbornik Vykumnych ussavn zemedelskych C.S.R. », Praga, 1932.
- (11) *Pratolongo U. e Fabris A.* - Il processo normale di acidificazione biochimica dei foraggi infossati. « Annuali Laboratorio di Ricerche sulle fermentazioni L. Spallanzani », 1939.
- (12) *Pratolongo U.* - L'infossamento dei foraggi: I fondamenti. « L'Italia Agricola », anno 76, n. 9-10, 1939.
- (13) *Fabris A.* - Ricerche biochimiche sui foraggi insilati. III) L'influenza del tenore acqueo e della temperatura sull'indirizzo delle fermentazioni e sull'esito dell'infossamento. « Annali di Tecnica Agraria », anno XIII, fasc. III, 1941.
- (14) *Arnaudi C. e Politi I.* - Quelques observations à propos des procès d'acidification des fourrages ensilés. « Boll. Sez. It. Soc. Inter. di Microbiologia », 1939, 11, pag. 217.
- (15) *Politi I.* - I processi di acidificazione dei foraggi insilati. « Annali di Microbiologia ». Milano, vol. I, pag. 15, 1940.
- (16) *Giglioli I.* - Igiene antimicrobica. Napoli, 1887. (Vedi pure: Insilamento chimico, non bacterico, ecc., « Minerva Agraria », n. 17-20, 1918.
- (17) *Gorini C.* - Ricerche batteriologiche sui foraggi conservati nei silos. « Anuario Istituzione A. Ponti », relazione II, 1906 e relazioni seguenti nello stesso annuario; per la bibliografia completa dei lavori del Gorini vedi:
 - Nuovi contributi alla mia dottrina microbiologica dell'insilamento lattico. « Rend. Istituto Lomb. di Scienze e Lettere », vol. LXXIV, fasc. II, 1940-41.
- (18) *Esten W. N. e Mason C. J.* - Silage Fermentation. « Conn. Storrs Agr. Exp. Stat. », Bull. 70, vol. XXVII, pag. 204, 1912.
- (19) *Ruschmann G. e Bartram H.* - Die Einsäuerung jungen, eiweissreichen Grünfutters mit Trockenmolke. « Zentr. f. Bakteriologie », II Abt, Band 103, 12/14, 1941.
 - e *Rinckleben* - « Zentr. f. Bakteriologie », II. Abt. Band. 105, 5/6, 1942
- (20) *Allen L., Watson S. e Fergusson W.* - The effect of the addition of various materials and bacterial cultures to grass silage, ecc. « The Journal of Agric. Science », vol. XXVII, 1937.
- (21) *Van Beynum J. e Pette. J. W.* - Bacterologische onderzoekingen over ensilieering metoovolving van zure wei ondermelk of suiker. « Rijkslandbouwproefstation te Hoorn », 1936.
- (22) *Virtanen A. J.* - « II Congresso Inter. di Microbiologia », Londra, 1936.
- (23) *Cunningham A. e Smith A. M.* - The characteristic of Lactobacilli isolated from samples of A.I.V. Silage. « Comunicazione alla Società di Batteriologia di Edinburgo », 1936.

- (24) *Eichholtz F. e Keil W.* - Ueber die chemischen und biologischen Vorgänge bei der Silage. « Chemiker-Zeitung », n. 102, 21, Dezember, 1935.
- (25) *Arnaudi C.* - Ricerche sui microrganismi acidificanti dei foraggi insilati. « Atti R. Acc. dei Lincei » « Rend. Sc. Fis. Mat. e Nat. », 1938, vol. 28, n. 5-6.
- (26) *Arnaudi C.* - La funzione dei microrganismi nella conservazione dei foraggi insilati. « Atti della Reale Accademia dei Georgofili », 1939.
- (27) *Politi I.* - Ricerche sui fermenti lattici. « Annali di Microbiologia », vol. I, fasc. II, Milano, 1940.
- (28) *Gehlen W.* « Arch. für exper. Path. », 166, 703, 1933.
- (29) *Keil W. e Ritter H.* - Zur Chemie und Pharmakologie vergorener Nahrungsmittel I. « Arch. f. Exper. Pathol. u. Pharmakologie », Bd. 175, 1934.
- (30) *Pederson C. S.* - « Journal of Bacteriology », 31, pag 217, 1936; 35, pag. 95, 1938.
- (31) *Eichholtz F. e W. Keil* - Vedi (24).
- (32) *Keil e Pörtner* - Untersuchung verschiedener Bakterien über die Fähigkeit zur Bildung von Acetylcholin. « Bioch. Zeitschrift », 280, 61, 1935.