

# ANNALI DI MICROBIOLOGIA

MEMORIE DI MICROBIOLOGIA GENERALE ED APPLICATA ALLA  
AGRICOLTURA ALLE INDUSTRIE FERMENTATIVE ED ALIMENTARI; DI  
ENZIMOLOGIA E CHIMICA DELLE FERMENTAZIONI NEI LORO RAPPORTI  
CON LA MICROBIOLOGIA E LA BATTERIOLOGIA INDUSTRIALE

A CURA DEI PROFESSORI

T. CASTELLI PERUGIA - V. PEGLION BOLOGNA - B. PEYRONEL TORINO  
S. RICCARDO NAPOLI - M. SACCHETTI BOLOGNA - O. VERONA FIRENZE

DIRETTA DA

C. ARNAUDI MILANO

FEBBRAIO 1943 - XXI  
VOL. III - FASC. I

ORGANO DELLA STAZIONE SPERIMENTALE  
DI BATTERIOLOGIA AGRARIA DI CREMA

DIREZIONE ED AMMINISTRAZIONE: MILANO VIA CELORIA 2

## NORME DI COLLABORAZIONE

Si accettano memorie originali italiane e straniere, purchè scritte in caratteri latini e dattilografate. Esse devono essere perfettamente corrette anche nella punteggiatura.

In ottemperanza alle disposizioni del Consiglio Nazionale delle Ricerche ogni articolo deve essere corredato da un breve riassunto (non più di dieci linee) in italiano. Lo stesso deve essere pure riportato in tedesco o inglese. Se l'Autore non ne fa l'invio in una delle due lingue verrà provveduto d'ufficio alla traduzione e la spesa relativa verrà addebitata ai signori autori.

Agli Autori dei lavori originali vengono concesse non più di 16 pagine di stampa; il numero di pagine in più sarà a carico dell'Autore al puro costo di stampa. Le modificazioni tipografiche che non siano semplici correzioni di errori di composizione saranno addebitate agli Autori al prezzo di costo.

I clichés, le tabelle e le tavole fuori testo sono a carico degli Autori.

Per gli estratti dei lavori gli Autori dovranno accordarsi direttamente con la Tipografia.

Per la bibliografia si prega si attenersi alle seguenti norme:

a) La bibliografia, col relativo numero di riferimento, deve essere scritta alla fine del lavoro; b) I numeri di riferimento bibliografico nel testo devono essere scritti tra parentesi; c) Le citazioni devono essere fatte nel seguente ordine: 1° Nome dell'Autore; 2° Titolo del lavoro; 3° Titolo del giornale abbreviato; 4° Anno; 5° Volume (in numero arabo, sottolineato); 6° N° delle pagine.

Il numero di chiamata nel testo di eventuali note a piè di pagina deve essere scritto in alto piccolo e con una parentesi di chiusura.

Per i numeri decimali adoperare virgole e mai punti, così nel testo come nelle tabelle. Adoperare sempre le seguenti abbreviazioni:

chilogrammo	= Kg	metro	= m	centim. quadr	= cmq	minuto se-	
ettogrammo	= hg	decimetro	= dm	millim. quadr	= mmq	condo	= sec
grammo	= g	centimetro	= cm				
decigrammo	= dg	millimetro	= mm	litro	= l	per cento	= %
centigrammo	= cg	micron	= $\mu$	centim. cubo	= cc	per mille	= ‰
milligrammo	= mg			ora	= h	normale	= N
millesimo di						decimo norm	= 0, IN
grammo	= $\gamma$	metro quadr	= mq	minuto primo	= min	ph, Ph ecc.	= pH

(tutti questi segni sempre senza punto)

Le formule chimiche devono essere scritte con gli indici in basso. Es.  $\text{CaCl}_2$

---

## SOMMARIO

C. A. - Precisazione	pag.	1
ISIDORO POLITI - MARIA RESTA - Intorno ai processi di maturazione e conservazione delle carni insaccate (Nota II).	»	3
ISIDORO POLITI - CESARINA COLLA - E. CORBERI - Intorno ai processi di maturazione delle carni insaccate (Nota III).	»	16
TOMMASO CASTELLI - Soja e tubercoli radicali	»	30
CLAUDIO ANTONIANI - Sul fenomeno di autoimpedimento fermentativo e sulle cause atte a rimuoverlo. Osservazioni su <i>Pseudosaccharomyces apiculatus</i>	»	50

---

Prezzo di Abbonamento per ogni volume (costituito di 6 fascicoli)  
ITALIA L. 50 - ESTERO L. 100 - UN FASCICOLO SEPARATO L. 10  
VOLUMI ARRETRATI ITALIA L. 100. - ESTERO L. 150 -

# BANCA COMMERCIALE ITALIANA

CAPITALE L. 700.000.000

RISERVA L. 170.000.000

BANCA DI INTERESSE NAZIONALE



## PRECISAZIONE

*Iniziando il III volume degli «Annali di Microbiologia», reputiamo utile una precisazione nel sottotitolo della Rivista.*

*Vogliamo riaffermare più esplicitamente che essa ospita anche memorie di Enzimologia e di Chimica delle fermentazioni, che riguardino ben s'intende però, temi strettamente legati alla Microbiologia ed alla Batteriologia industriale, quando costituiscano cioè degli sviluppi della Fisiologia microbica. In caso diverso infatti, quando trattino questioni prevalentemente di ordine chimico, Enzimologia e Chimica delle fermentazioni rientrano nella Biochimica, nella Chimica agraria e nella Chimica organica.*

*Gli «Annali di Microbiologia» debbono e vogliono rimanere una rivista di Microbiologia, ma poiché le attività microbiche si svolgono attraverso fenomeni enzimatici rilevabili con metodi chimici, è ovvio ed anzi augurabile, che lavori riguardanti questo capitolo abbiano ad essere ospitati con larghezza.*

*Del resto se per la Microbiologia generale e per quella medica il capitolo della fisiologia dei microbi, pur assumendo sempre maggiore rilievo, rimane tuttavia in sott'ordine rispetto agli altri, per la Microbiologia applicata alle fermentazioni, esso è importantissimo, se non fondamentale, poiché sono precisamente i prodotti del metabolismo microbico che hanno interesse pratico nello svolgimento delle fermentazioni.*

*Ciò non pertanto, i fenomeni fermentativi siano essi studiati nel terreno agrario o nelle trasformazioni tipiche delle industrie agricole ed alimentari od in quelle delle grandi industrie fermentative, sono sempre dominati dal fattore biologico, cioè dall'elemento microbico con le sue complesse caratteristiche morfologiche, culturale fisiologiche. Di guisa che la comprensione anche superficiale dei fenomeni fermentativi non è assolutamente possibile senza la perfetta conoscenza delle cause dei fenomeni stessi e cioè senza lo studio approfondito dei microrganismi o batteri. Studio questo che evidentemente non può essere compiuto che con la tecnica e la metodologia proprie della Microbiologia tecnica o Batteriologia industriale come ancora si voglia denominarla.*

*Questi concetti non sono ovvii come si può credere; anzi, essi debbono venire riaffermati essendo ancora abbastanza diffusa l'opinione che lo studio microbiologico delle fermentazioni sia di secondaria importanza rispetto a quello chimico ed infatti tale modo di vedere ha avuto anche riflessi nell'ordi-*

*namento degli studi universitari. Riflessi che sarebbe bene venissero opportunamente corretti.*

*Il cordiale appoggio di molti colleghi nel non facile compito che ci siamo assunto e le quarantacinque memorie pubblicate nei più di due volumi degli « Annali di Microbiologia », ci confortano nella fede che abbiamo avuto nel 1939 fondando questa Rivista, la cui vitalità è dimensione della promettente rinascita nel nostro Paese degli studi di Microbiologia applicata all'agricoltura e all'industria e della utilità di un organo specializzato che ne raccolga e ne diffonda i risultati della ricerca sperimentale.*

C. A.

# Intorno ai processi di maturazione e conservazione delle carni insaccate

## Nota II

OSSERVAZIONI E RICERCHE INTORNO ALLA MICROFLORA SCHIZOMICETICA  
SUPERFICIALE DEGLI INSACCATI NORMALI E DIFETTOSI (\*)

Prof. Isidoro Politi

Dott. Maria Resta

(Ricevuto il 10 febbraio 1943)

### *Premessa*

Le condizioni anormali nelle quali l'industria delle carni insaccate svolge la propria attività nel momento attuale, non sono certamente le più adatte per lo svolgimento di uno studio sistematico dei processi di stagionatura. L'importanza pratica però che possono avere anche le nozioni a carattere approssimativo intorno ai complessi processi che costituiscono la maturazione delle carni insaccate e la necessità di raccogliere elementi sperimentali che consentano almeno di inquadrare il problema, hanno indotto la S.A.L.B. a promuovere fin d'ora delle ricerche in questo campo. Del resto la povertà di elementi positivi che la nostra letteratura possiede intorno alle caratteristiche microbiologiche e biochimiche degli insaccati è risentita particolarmente oggidi tutte quelle volte che i tecnici sono chiamati a giudicare della commestibilità delle carni insaccate.

Recentemente Stazzi e Bertarelli (Rivista Italiana di Igiene n. 7 - 1942) richiamavano autorevolmente l'attenzione dei competenti sulla necessità che si abbia a raccogliere tutti i dati necessari perchè il giudizio che i sanitari sono chiamati a pronunciare sugli insaccati sia basato su criteri uniformi e tali da evitare valutazioni artificiose ed errate.

È indispensabile poter distinguere e classificare i casi di anormale maturazione ed i conseguenti difetti che svalutano il prodotto senza renderlo tuttavia pericoloso per la salute del consumatore, differenziandoli dai casi di vere e proprie putrefazioni più o meno estese che rendono l'insaccato inutilizzabile a scopo alimentare.

---

(\*) Le ricerche descritte in questa nota ed in quelle che seguiranno fanno parte di un sistematico piano di studi il cui indirizzo è stato tratteggiato dallo scrivente nella nota comparsa nel fascicolo II del vol. II di questi « Annali ». - Non ostante le difficoltà del momento, particolarmente gravi per la sperimentazione nel campo delle sostanze alimentari, ci è stato possibile continuare il nostro lavoro grazie al lungimirante appoggio della S.A.I.B.

E' ovvio che una completa raccolta di tali elementi sarà facilitata (si potrebbe dire resa possibile) soltanto da una buona conoscenza dell'andamento normale della maturazione sia nei riguardi degli agenti del processo sia delle caratteristiche biochimiche dei prodotti stagionati.

La nostra attenzione si è rivolta innanzi tutto ai campioni di insaccati che gli esperti della S.A.I.B. prelevavano da partite presentanti qualche difetto di stagionatura tale da svalutare il prodotto. Contemporaneamente si è raccolto materiale di studio da insaccati in corso di maturazione presso stabilimenti di produzione, fermando l'attenzione sulle irregolarità di maturazione più frequenti.

Sono state eseguite così varie osservazioni e ricerche sulla microflora superficiale degli insaccati normali ed anormati con l'intento di stabilire se la microflora si presenti quantitativamente e qualitativamente diversa nei due casi.

In questa relazione sono raccolti i dati di una parte delle ricerche fin'ora compiute. Non vi è infatti compreso lo studio, in corso di ultimazione, su alcuni eumiceti (muffe e lieviti) riscontrati sistematicamente sugli insaccati normali e quello di alcuni stipiti di schizomiceti che sembrano costantemente presenti negli stessi prodotti. Di tali ricerche sarà riferito prossimamente.

In una successiva nota saranno inoltre esposte le ricerche condotte sopra una partita di salami di piccola pezzatura, prodotti dalla S. A. Proprietari Salsamentari di Milano. Su tali insaccati vengono effettuate determinazioni chimiche e ricerche batteriologiche durante tutto il periodo di stagionatura; questo ebbe la durata di soli due mesi e perciò i rilievi compiuti hanno valore limitatamente alla stagionatura rapida.

## 1. - Salumi normali sani

Le ricerche sulla microflora che si sviluppa sugli insaccati nel corso della maturazione vennero iniziate con l'esame di un salame sano della Ditta Rovelli.

Dall'esame microscopico, con preparati a fresco, emerse dapprima che la vegetazione microbica superficiale del salame era costituita da grandi masse di schizomiceti dall'aspetto coccico, nonché da innumerevoli conidi ed elementi miceliari; si sono quindi allestite delle colture per diffusione in agar comune ed in agar malto, effettuando poi l'isolamento dei germi che per l'aspetto delle colonie apparivano come i più abbondantemente rappresentati nel materiale oggetto di indagine. Si ottennero così cinque ceppi, (\*) i quali vennero sottoposti alle ricerche di cui segue una sommaria descrizione:

---

(\*) I caratteri morfologici e culturali dei ceppi isolati non consentono la loro identificazione con i micrococchi noti. Per quanto alcuni di essi presentino assomiglianze con *Micr. luteus* (Schröter) Cohn, *Micr. aurantiacus* (Schröter) Cohn; *Micr. Varians* Migula, *Micr. flavescens* Henrici; *Micr. subcitreus* Migula; *Micr. Subgranulatus* Migula; *Micr. exavatus* Kern, tuttavia le diverse proprietà fisiologiche non permettono di riferirli a tali specie. In una ulteriore nota verrà precisata la posizione sistematica dei germi da noi isolati.

## CARATTERI MORFOLOGICI

(Da colture fresche su agar comune e malto, colorazione con Violetto di Genziana).

R2 cocchi pressochè sferici, diplo o a catena, di circa 0,40  $\mu$  di diametro.

Gram positivo.

R4 cocchi pressochè sferici, diplo e tetra, di grandezza variabile da 0,85 a 1.10  $\mu$ . Gram negativo.

R6 cocchi pressochè sferici, a masse di circa 0,85  $\mu$  di diametro. Gram negativo.

R7 cocchi pressochè sferici, a masse di 0,55  $\mu$  di diametro. Gram positivo.

R8 cocchi pressochè sferici, a masse di 0,55-0,85  $\mu$  di diametro. Gram positivo.

## CARATTERI CULTURALI E FISIOLGICI

La temperatura ottima di sviluppo è risultata di 20° C. per due ceppi, ossia per R6 ed R7, di 20-30° C. per R8, di 30° C. per R2 e R4. Crescono a 42° C. soltanto i ceppi R4 e R7.

Tutti i cinque ceppi crescono assai scarsamente in assenza d'aria (colture in brodo glucosato in apparecchio a 720 mm. di depressione). Pure nell'infissione in agar comune, lo sviluppo, abbondante in superficie, è assai lieve lungo l'infissione.

*Agar comune striscio.*

Tutti i ceppi presentano un abbondante sviluppo con formazione di patina lucida, di colore bianco (R2 e R8), bianco giallastro (R6), rosata (R7), giallo vivo (R4). più o meno intensamente mucosa, con bordi frastagliati, eccettuato R8 che si espande su tutta la superficie dell'agar.

*Patata alla Roux.*

Ad eccezione del ceppo R8, il quale presenta scarsa crescita, si ha uno sviluppo abbondante con formazione di patina simile a quella su agar comune; non si ha iscurimento della patata.

*Agar malto.*

Sviluppo scarsissimo di tutte le colture ad eccezione di R4 che dà patina spessa e gialla.

*Brodo comune.*

In tutti i casi si ha una buona crescita, con intorbidamento e abbondante sedimento.

*Brodo malto.*

Sviluppo generalmente scarso, o nullo (R8); più sensibile per R2 e R7.

*Latte*

Risulta inalterato con R2 e R4, mentre R6 dà coagulazione seguita da intensa digestione; R7 dà coagulazione e digestione del tipo di quelle degli acido-proteolitici; R8 coagulà con poca digestione.

### *Gelatina.*

Nelle infissioni in gelatina quasi tutte le colture danno fluidificazione: discreta per R4 - R6 - R7, buona per R8; solo R2 non fluidifica.

Si osserva una certa rispondenza tra fluidificazione della gelatina e coagulazione del latte, eccezione fatta per R4 che, pur essendo capace di fluidificare la gelatina, non modifica il latte.

### *Albumina e albumina addizionata di brodo comune.*

Scarsa è in complesso l'azione esercitata su ambo i terreni e generalmente analoga. Una notevole fluidificazione si è avuta solamente da parte del ceppo R4.

### *Acqua peptonizzata salata.*

Buona crescita di tutti i ceppi, con produzione di ammoniaca e indolo. In questo terreno è stato pure misurato il potere alcalinizzante dei vari germi: i più forti produttori di ammoniaca sono naturalmente i più attivi e portano la reazione a pH 8,6-8,8.

### *Acqua peptonata addizionata di nitrato potassico.*

Ad eccezione di R4 tutti i ceppi riducono i nitrati con formazione di nitriti.

### *Acqua peptonata addizionata di zuccheri (glucosio, saccarosio, lattosio).*

Nessun ceppo produce gas; alcuni acidificano lievemente; furono infatti osservate le seguenti variazioni del valore del pH (controllo sterile pH = 7):

R7 in glucosio pH = 5,3, in saccarosio pH = 5,6; R8 in glucosio pH = 5,7, in saccarosio pH = 5,9. L'acidificazione, come del resto lo sviluppo, è un po' maggiore in presenza di glucosio; meno evidente è l'influenza del saccarosio, mentre il lattosio non comporta alcuna variazione del pH rispetto alla prova di controllo (acqua peptonata senza zuccheri).

I più importanti caratteri dei germi precedentemente descritti (isolati dalla superficie di un salame normale) si possono così riassumere: cocchi; di cui tre ceppi Gram positivi e due Gram negativi, capaci di intenso sviluppo nei terreni a base di brodo di carne e per lo più di scarsa crescita in brodo e agar malto.

La temperatura ottima è compresa fra i 20 e i 30° C.

Dei cinque ceppi, tre coagulano per via enzimatica la caseina del latte; quattro ceppi fluidificano la gelatina; tutte e cinque fluidificano intensamente o debolmente, l'albumina d'uovo; producono ammoniaca e indolo, alcalinizzano notevolmente l'acqua peptonata (pH = 8,2-8,6) e riducono i nitrati.

In complesso esplicano una trascurabile o assai limitata azione fermentativa sugli zuccheri: infatti, mentre il lattosio non comporta alcuna differenza di crescita e nessuna produzione di acidi, solo lievi acidificazioni si possono avere dal glucosio e lievissime da saccarosio; ed è molto probabile che si tratti di acidi prodotti, almeno in parte, attraverso fenomeni ossidativi. Ciò s'accorda del resto con lo spiccato carattere di germi aerobi, comune ai cinque ceppi.

Particolarmente importante, ai fini delle nostre indagini, è l'osservazione che questi microorganismi sono dotati di notevole azione sulle sostanze proteiche, le quali vengono parzialmente degradate con produzione di ammoniaca e conseguente alcalinizzazione del substrato.

## 2. - Salumi alterati

Proseguendo le ricerche su salumi alterati, si sottopose a indagine un salame della ditta Rovelli con superficie cremosa puzzolente. Anche qui si procedette a un primo esame con preparati a fresco; quindi si allestirono delle piastre di agar comune e di agar malto, isolando successivamente tre cocchi dalle prime, un cocco, una muffa e un blastomicete dalle altre.

Ecco i risultati delle ricerche compiute sui cocchi:

### CARATTERI MORFOLOGICI

(Da colture fresche su agar comune e malto, colorazione con Violetto di Genziana).

- RC1 Cocchi pressochè sferici di circa 0,85  $\mu$  di diametro. Gram negativi.
- RC3 Cocchi pressochè sferici di circa 0,85  $\mu$  di diametro. Gram negativi.
- RC6 Cocchi pressochè sferici di circa 0,85  $\mu$  di diametro. Gram positivi.
- RC7 Cocchi a chicco di caffè di circa 1,10-1,25  $\mu$ . di diametro. Gram positivi.

### CARATTERI COLTURALI E FISIOLGICI

La temperatura ottima di sviluppo è di 20° C. per RC1, RC6, di 30° C. per gli altri. A 42° C. solo RC6 cresce leggermente.

Tutti i ceppi crescono scarsamente in assenza d'aria; nelle infissioni in agar comune si ha abbondante sviluppo superficiale e lievissima crescita lungo la linea d'inoculazione.

*Agar comune striscio.*

Presentano abbondante sviluppo sotto forma di patina mucosa, con margini frastagliati di colore bianco (RC6), oppure bianco giallastro (RC3). RC1 forma una patina bianca giallastra, rilevata umida, espansa su tutta la superficie dell'agar; RC7 cresce assai stentatamente formando piccole colonie staccate.

*Patata alla Roux.*

RC1 e RC3 si sviluppano scarsamente; invece RC7 forma un'abbondante patina continua, giallo rosata, lucida con solco centrale. RC6 presenta uno sviluppo simile a quello che si osserva su agar comune.

*Agar malto.*

Non cresce il ceppo RC3. Scarsissimo sviluppo dei ceppi RC6 e RC7; molto abbondante quello di RC1.

*Brodo comune.*

In tutti i casi si osserva una buona crescita con intorbidamento e abbondante sedimento; un po' più scarso RC1.

*Brodo malto.*

Sviluppo generalmente scarso o nullo (RC6 e RC7); più sensibile per RC3.

*Latte.*

RC1 e RC6 danno energica digestione non preceduta da coagulazione; mentre RC3 e RC7 lasciano il latte inalterato.

*Gelatina.*

Non fluidificano RC3 e RC7, fluidificano invece RC2 e RC6, debolmente il primo, con discreta intensità il secondo.

*Albumina e albumina più brodo comune.*

Molto scarsa è l'azione esercitata da questi ceppi: RC1, che come si è detto, è dotato di intenso potere caseolitico, lascia ambedue i terreni completamente inalterati. Viceversa RC7, inattivo verso la caseina, esplica un'azione discretamente intensa verso l'albumina.

*Acqua peptonizzata e salata.*

Buona crescita di tutti i ceppi con produzione di ammoniaca e di indolo. Il pH viene notevolmente elevato; fino a 8,2-8,8.

*Acqua peptonata addizionata di nitrato potassico.*

Tutti i quattro ceppi riducono il nitrato con formazione di nitrito.

*Acqua peptonata addizionata di zuccheri (glucosio, saccarosio, lattosio).*

Nessun ceppo dà sviluppo di gas; si sono osservate le seguenti lievi acidificazioni (pH iniziale circa 7): RC6 in presenza di glucosio pH = 5,5, di saccarosio pH = 5,6; RC7 in presenza di glucosio pH = 5,5 di saccarosio pH = 5,7.

L'acidificazione, al pari dello sviluppo, è un po' maggiore in presenza di glucosio e, sebbene in misura meno evidente, anche in presenza di saccarosio; il lattosio non comporta alcuna variazione del pH rispetto alla prova di controllo (acqua peptonata senza zucchero).

Al pari dei germi isolati dalla superficie di un salame sano, il gruppo dei quattro schizomioeti isolati dalla superficie cremosa puzzolente di un salame alterato, di cui si è data ora la descrizione, comprende esclusivamente dei cocchi di cui due ceppi sono Gram positivi e due Gram negativi; la temperatura ottima è pure compresa fra i 20 e i 30° C.

Alquanto simile a quello del precedente gruppo è parimenti il comportamento culturale e in particolar modo l'azione esercitata sugli zuccheri e sulle sostanze proteiche.

Anche questi microorganismi infatti appaiono capaci di nulla o scarsa azione fermentativa sugli zuccheri; inutilizzato sembra il lattosio e molto lieve la produzione di acidi da glucosio e saccarosio. Per contro si osserva che dei quattro ceppi, due peptonizzano la caseina senza previa coagulazione

e fluidificano la gelatina, e tre attaccano l'albumina d'uovo. Tutti quattro i ceppi producono inoltre ammoniaca ed indolo.

In complesso quindi non si possono stabilire importanti differenze tra i germi dei due gruppi precedentemente descritti; particolarmente per il fatto che essi presentano molta somiglianza nei riguardi della loro azione sulle sostanze azotate.

### 3. - Anomalia di stagionatura detta "Magolc"

Proseguendo le ricerche su salami della Ditta Citterio presentanti l'alterazione superficiale nota ai pratici col nome di « magolc », si isolarono quattro ceppi da un salume con budello di maiale e cinque da un salume con budello di cavallo. Però, dallo studio successivamente compiuto, di questi ultimi cinque ceppi, quattro risultarono praticamente identici, e di essi si descrive il solo C7, mentre il quinto ceppo risultò dotato di carattere affatto simile a quello del ceppo R4, isolato dal salume sano della Ditta Rovelli, già descritto in precedenza.

I rilievi compiuti sui quattro ceppi isolati dal salume con budello di maiale e sul ceppo C7 proveniente dal salume con budello di cavallo, fornirono i seguenti risultati:

#### CARATTERI MORFOLOGICI

Rilevati da colture di due tre giorni su agar comune. Preparati eseguiti con Violetto di Genziana.

1C Cocchi pressochè sferici, a masse. aventi diametro variabile da 0,55 a 0,85  $\mu$  Gram negativo.

2C Dall'esame microscopico, fatto anche dopo ripetuti isolamenti con piastre, si rileva la presenza di germi molto corti, quasi sferici, e di bastoncini di varia lunghezza.

Ecco alcune dimensioni notate: 0,40  $\times$  0,40  $\mu$   
0,40  $\times$  0,55  $\mu$   
0,55  $\times$  2,50  $\mu$

Gram negativo.

3C Cocchi pressochè sferici, a masse, del diametro di circa 0,85  $\mu$ . Gram negativo.

4C Come 2C - Dimensioni molto variabili: 0,55  $\times$  0,55  $\mu$  0,55  $\times$  1,67  $\mu$   
0,55  $\times$  1,30  $\mu$   
0,55  $\times$  2,10  $\mu$  0,40  $\times$  0,85  $\mu$

Tanto per 2C come per 4C si rileva che la larghezza dei microrganismi presenta una certa costanza mentre varia la lunghezza.

C7 Cocchi pressochè sferici, a masse, di diametro variabile da 0,85 a 1,25  $\mu$ . Gram positivo.

## CARATTERI CULTURALI E FISIOLÓGICI

La temperatura ottima di sviluppo è di 20-30° C.; solo per 3C è di 37° C. Solamente 1C e 4C crescono anche a 42° C.

Tutti i cinque ceppi qui descritti si sviluppano assai scarsamente in assenza d'aria (colture in brodo glucosato poste a 720 mm. di depressione) e lungo l'infissione in agar comune.

### *Agar comune striscio.*

Tutte queste colture presentano un aspetto molto simile, con patina bianco giallastra e lucida, a bordi ondulati. Solo 3C dopo alcuni giorni presenta una produzione di pigmento color arancio, che, dapprima localizzata in alcuni punti della patina bianca, finisce per ricoprirla quasi del tutto. I ceppi 3C e 4C si distinguono per un rilievo nella parte centrale della patina, mentre C7 presenta un solco. Solo 1C ha patina intensamente mucosa.

### *Patata alla Roux.*

1C - 2C - 4C e C7 producono un pigmento giallo rosato, mentre 3C diviene completamente arancio. La patata non viene iscurita e gli altri caratteri delle patine rimangono simili a quelli manifestati su agar comune.

### *Agar malto.*

Tutti i cinque ceppi vi crescono assai stentatamente: 4C leggermente di più.

### *Brodo comune.*

Intenso sviluppo con formazione di abbondante sedimento mucoso.

### *Brodo malto.*

Crescita in genere molto scarsa, discreta solo per 4C e per C7, che produce uno spesso velo superficiale.

### *Latte.*

I ceppi 1C e 3C danno coagulo compatto, mentre 1C e C7 non esercitano alcuna azione; 4C produce una leggera coagulazione e parziale digestione.

### *Gelatina.*

1C - 2C - 3C e C7 fluidificano completamente la gelatina; solamente 4C, pur sviluppandosi in superficie e lungo l'infissione, non ha potere fluidificante.

### *Albumina e albumina più brodo comune.*

Scarsa pare l'azione esercitata sulla sola albumina, poichè solamente 2C produce una buona fluidificazione.

Azioni più intense si hanno sull'albumina addizionata di brodo comune; infatti si ha fluidificazione completa per 2C e 3C, abbondante per le altre colture.

### *Acqua peptonizzata salata.*

Tutti i ceppi crescono bene in questo liquido producendo ammoniaca e indolo, con notevole alcalinizzazione dell'ambiente (pH 8,4).

I più attivi sono 2C - 1C e C7.

*Acqua peptonata più nitrato potassico.*

La riduzione dei nitrati a nitriti è compiuta più energicamente da 1C - 3C e C7, discretamente da 4C, non viene effettuata da 2C.

*Acqua peptonata più zuccheri (glucosio, saccarosio, lattosio).*

Non si ha sviluppo di gas, ma tutte le colture si sono dimostrate lievemente acidificanti in presenza di glucosio; 3C anche in presenza di saccarosio. Il ceppo più attivo risulta essere C7 con pH 5,2; seguono 3C e 4C con pH 5,3; 2C (pH 5,4) e 1C (pH 5,6).

Dal confronto con i due precedenti gruppi di microrganismi, emerge una notevole somiglianza dei caratteri culturali e fisiologici presentati dai microrganismi qui descritti.

Si nota tuttavia che questi comprendono non soltanto dei cocchi, ma anche delle forme a bastoncino (perchè tali sono da considerare i ceppi 2C e 4C). Rimarchevole è pure l'osservazione che il presente gruppo comprende germi dotati di potere fluidificante verso la gelatina e l'albumina un po' più intenso; ma è ovvio che si tratta sempre di differenze di ordine quantitativo, per cui non sembra logico ritenere che questi microrganismi siano nettamente diversi dai precedenti.

#### 4. - Salume Cecoslovacco con involucro di seta

Le ricerche sulla micrflora superficiale dei salumi comprendono infine l'esame di alcuni germi isolati da un salame Cecoslovacco con l'involucro di seta che si presentava rotto in più punti.

Per mezzo di strisci su piastre di agar comune e di agar malto venne compiuto l'isolamento di quattro schizomiceti e di una muffa. Lo studio di quest'ultima è ancora in corso; riportiamo quindi le osservazioni compiute.

#### CARATTERI MORFOLOGICI

(Da colture fresche su agar comune. colorazione con Violetto di Genziana).

S1	Cocchi	pressochè sferici	di circa 0,55 µ	di diametro.	Gram	positivi
S2	»	»	»	» 0,80 µ	»	»
S3	»	»	»	» 0,80 µ	»	»
S4	»	»	»	» 0,55 µ	»	»

#### CARATTERI CULTURALI E FISIOLGICI

La temperatura ottima di sviluppo è di 37-45° C per S1, di circa 37° C per S4, di circa 30° C per S2, di circa 20° C per S3. Eccettuato quest'ultimo, la crescita a 20° C è molto lenta. In condizioni di anaerobiosi (720 mm. di depressione) lo sviluppo è molto esiguo.

*Agar comune striscio.*

Si ha formazione di abbondante patina lucida, mucosa, pieghettata, con margine unito.

PRINCIPALI CARATTERI DEGLI SCHIZOMICETI ISOLATI DALLA SUPERFICIE DI SALUMI

	Esame microscopico	Gram.	Sviluppo in			latte	Fluidificazione			Produzione di		
			brodo comun.	brodo malto	agar malto		gelatina	alb.mina	alb. br. c.	NH <sub>3</sub>	Indolo	
SALUME NORMALE												
R2	Cocchi diplo e a catena 0.40 μ	+	+++	++	+	Inalt.	—	+	+	+++	+++	+++
R4	Cocchi diplo e tetra 0.80 μ	—	+++	+	+++	Inalt.	++	+++	++	+++	+++	+++
R6	Cocchi 0.85 μ	—	+++	+	+	Coag. dige.	++	+	+	++	++	++
R7	Cocchi a masse 0.55 μ	+	+++	+++	++	C.d.	++	+	+	++	++	++
R8	Cocchi a masse 0.55-0.85 μ	+	+++	—	+	C.c.	+++	+	+	+	+	+
SALUME CON SUPERFICIE CREMOSA PUZZOLENTE												
RC1	Cocchi 0.85 μ	—	++	+	++++	d.d.	+	—	—	+	+	+
RC3	Cocchi 0.85 μ	—	++	++	—	Inalt.	—	+	—	+	+	+
RC6	Cocchi 0.85 μ	+	+++	—	+	d.d.	++	+	++	+	+	+
RC7	Cocchi a chicco di caffè 1.20 μ	+	+++	—	++	Inalt.	—	++	++	+	+	+

1C	Cocchi a masse 0.55-0.85 µ	-	+++	+	+	++	+	+	+	+	+	+
2C	forme varie da cocco a bastoncino µ 0.40 µ 0.40 × 2,50	-	+++	+	+	Inalt.	+++	+	+++	+	+	+
3C	Cocchi µ 0.85	-	+++	+	+	C.c.	+	+	+++	+	+	+
4C	Come 2C µ 0.55 µ 0.55 × 1.67	-	+++	+++	++	leg. C. p.d.	-	-	+++	-	-	+

SALUME CON ALTERAZIONE DETTA MAGOLC (budello di cavallo)

C5	Cocchi µ 0.85	-	+++	+	+++	Inalt.	++	+++	+++	+	+	+
C7	Cocchi µ 1.20	+	+++	+++	+	Inalt.	+++	-	++	+	+	+

SALUME CECOSLOVACCO CON INVOLUCRO DI SETA

S1	Cocchi a masse µ 0.55	+	+++	+++	++	Inalt.	-	-	-	+	+	-
S2	Cocchi a masse µ 0.80	+	++	+	+	Inalt.	-	-	-	+	+	-
S3	Cocchi a masse µ 0.80	+	+++	+	+	Inalt.	-	-	-	+	+	-
S4	Cocchi a masse µ 0.55	+	+++	+	+	Inalt.	-	-	-	+	+	-

C. = Coagulazione  
c. = compatta  
d. = digestione  
d. = digestione parziale  
o.d. = digestione diretta  
leg. C. = leggera coagulazione

S1 dà una patina con bordi leggermente rilevati, S2 produce pigmento giallo-roseo a spicchi su patina bianca, S3 dà pigmento rosato, S4 gialliccio.

*Brodo comune.*

Si ha crescita abbondante con intorbidamento e sedimento: formazione anche di un velo e di anello superficiali in tutti i ceppi eccettuato S1.

*Agar malto e brodo malto.*

Crescita scarsissima, eccettuato S1 che ha discreto sviluppo in ambedue i terreni.

*Latte.*

Nessuno di questi ceppi coagula o peptonizza il latte.

*Gelatina.*

Non si ha alcuna fluidificazione: si verifica solamente crescita in superficie e lungo lo striscio.

*Acqua peptonata salata.*

Tutti i ceppi vi crescono discretamente: non si ha produzione di indolo, ma solo di ammoniaca. Il pH viene portato da tutte le colture a 8,2 (Controllo pH 7).

*Acqua peptonata addizionata di zuccheri (glucosio, saccarosio, lattosio).*

Non si ha alcuna formazione di gas; acidificazione notevole da parte di S1, che abbassa il pH da 7 a 4,8 in presenza di glucosio ed a pH 5 in presenza di saccarosio. S3 acidifica sino a pH 5,5 in presenza di glucosio; S2 e S4 non determinano alcuna acidificazione.

Da quanto precede si rileva che questo gruppo di microrganismi si differenzia piuttosto nettamente dai precedenti: infatti tutti i quattro ceppi non esercitano alcuna azione sul latte, non fluidificano la gelatina e non producono indolo. Uno di essi inoltre possiede uno spiccato potere acidificante da glucosio e da saccarosio (non da lattosio).

Infine si nota che questi ceppi richiedono temperature più elevate, poiché uno solo di essi ha l'ottimo a 20° C, mentre gli altri crescono bene a 30-37° C e perfino a 45° C; scarsamente a 20° C.

Tenendo presente che questi microrganismi costituivano la prevalente microflora di un salume nettamente diverso da quelli, sani o alterati, precedentemente descritti, non solo per la composizione dell'impasto, ma anche per il tipo dell'involucro, sembra logico ritenere che, fra le condizioni ed i fattori da cui dipende lo sviluppo della microflora superficiale, la natura dell'involucro abbia ad esplicare una notevole influenza pure sulle specie microbiche che acquistano il sopravvento. È evidente del resto che le stesse sostanze organiche costitutive dell'involucro concorrono ad alimentare la microflora in parola, e perciò le notevolissime differenze di composizione e di proprietà esistenti fra i comuni budelli e gli involucri di seta non possono non esplicare una spiccata influenza.

Aggiungasi inoltre che le proprietà fisiche dell'involucro di seta regolano in maniera del tutto diversa la traspirazione e il prosciugamento della pasta e pertanto concorrono a creare condizioni speciali allo sviluppo microbico.

D'altra parte, le ricerche compiute sui salumi prodotti con i consueti budelli non hanno consentito di constatare delle differenze nette od impor-

tanti fra la microflora schizomicetica superficiale del salume sano e quella degli insaccati difettosi od alterati. In complesso si è visto trattarsi di microrganismi, per la massima parte cocchi, spiccatamente aerobici, capaci di azione decomponente sulle sostanze azotate; azione che risulta più o meno energica, sia in rapporto alla natura delle sostanze medesime, sia del punto di vista dell'intensità della ammonizzazione che ad essa consegue. A prescindere dall'eventuale e vario concorso di microrganismi non schizomicetici, e di questi è in corso e prosegue lo studio, appare quindi logico ritenere che l'insorgere di talune alterazioni alla superficie dei salumi, più che allo sviluppo di particolari schizomiceti, consista in un eccessivo, anormale sviluppo di quegli stessi germi che crescono normalmente pure nei salumi sani.

Parimenti sembra logico pensare che il tipo di alterazione sia in dipendenza delle condizioni proprie dei singoli casi (natura del budello, temperatura, umidità degli ambienti ecc.) essenzialmente nel senso che col variare di queste si ha non solo una diversa intensità di sviluppo microbico, ma anche lo svolgersi di processi biochimici qualitativamente e quantitativamente diversi.

### ZUSAMMENFASSUNG

Aus der Oberfläche von Wurstwaren in verschiedenem Konservierungszustand wurden zahlreiche Schizomyceten und Eumyceten isoliert, und die erhaltenen Stämme der Erforschung unterzogen. Was die schizomycetische Mikroflora betrifft, lässt sich der Versuch folgendermassen zusammenfassen:

Aus der Oberfläche einer normalen Wurst wurden 5 aërobe Kokkenformen (worunter 3 grampositive und 2 gramnegative) isoliert, die sich auf Bouillon-Nährböden üppig entwickelten und energische proteolytische Tätigkeit besaßen.

Aus einer übel riechenden rahmigen Wurstoberfläche wurden 4 die gleichen Merkmale wie obige besitzende Kokkenformen isoliert. Das gleiche gilt für 3 Kokkenformen die aus Wurstwaren isoliert wurden, welche eine oberflächliche « magolc » genannte Veränderung aufwiesen.

Aus einer aus der Tschechoslowakei stammenden Wurst mit Seidenhülle, wurden endlich 4 Kokkenformen isoliert die sich von den vorausgehenden im Temperatur-Optimum und namendich durch das Fehlen ausgesprochener proteolytischer Tätigkeiten unterschieden.

Die ausgeführten Beobachtungen berechtigten zu der Annahme dass die Natur der Wursthülle (Darm oder Seide) einen bedeutenden Einfluss auf die, die Oberhand gewinnende Bakterienart ausübe. Umgekehrt wurden zwischen der oberflächlichen Mikroflora gesunder Wurstwaren und jener der veränderten Wurstwaren keine bedeutende Unterschiede beobachtet. Abgesehen von der etwaigen verschiedenen Beteiligung der Eumyceten, wäre logischerweise anzunehmen dass das Auftreten einiger oberflächlichen Veränderungen wesentlich von der übermässigen Entwicklung der Schizomyceten abhängen, welche auch unter normalen Bedingungen wachsen können. Diese Befunde sind eine Folge von Faktoren oder Bedingungen welche für den günstigen Verlauf der Ablagerung mehr oder weniger geeignet sind.

# **Intorno ai processi di maturazione e conservazione delle carni insaccate**

## **Nota III**

RICERCHE SUL PROCESSO DI MATURAZIONE RAPIDA DEI SALUMI

**Prof. Isidoro Politi - Dott. Cesarina Colla  
Dott. Elisa Corberi**

*(Ricevuto il 10 febbraio 1943)*

Le ricerche che si espongono in questa nota vennero condotte sottoponendo ad esame batteriologico e chimico dei salumi di piccola pezzatura prodotti dalla Soc. An. Proprietari Salsamentari di Milano, prelevati ed analizzati in tempi diversi, durante tutto il periodo di stagionatura. Questa ebbe la durata di soli due mesi e perciò non corrisponde alle condizioni delle tipiche e più frequenti stagionature che, com'è noto, durano più a lungo. Perciò parte dei rilievi compiuti hanno valore limitatamente alla stagionatura rapida.

Gli esami batteriologici e chimici vennero effettuati da prima sulla pasta al momento dell'insacco e quindi su campioni prelevati dopo cinque, undici, diciassette, ventotto, quarantadue e cinquantotto giorni.

Per l'esame batteriologico si sono prelevate sterilmente piccole quantità di materiale in diversi punti della parte, centrale del salume, in modo cioè da ricavarne un campioncino medio. Compiuta questa operazione, la rimanente parte del salume venne destinata alle ricerche chimiche.

Del campioncino, prelevato e posto in scatola Petri sterile, previamente tarata, venne determinato il peso; quindi, dopo aver trasportato in un piccolo mortaio sterile, si procedette allo spapolamento con acqua distillata sterile, in guisa da ottenere una sospensione dei microrganismi presenti con diluizione nel rapporto di 1 : 10. Con successive diluizioni si allestirono quindi delle piastre di agar comune e di gelatina. Vennero anche insemenate delle provette di latte con diluizioni variabili 1 : 10 sino a 1 : 1.000.000.

I risultati di tali detenninazioni sono raccolti nella tavola I.

Per quanto concerne il contenuto batterico totale, emergono in primo luogo delle forti differenze fra i risultati forniti dalle piastre di agar comune e quelli delle piastre di gelatina; questi ultimi, essendo in ogni caso più elevati, stanno quindi ad esprimere con maggior approssimazione la carica batterica del materiale esaminato. Ciò premesso si osserva subito che la pasta al momento dell'insacco presentava un contenuto microbico relativamente elevato (superiore a 1.000.000 di germi per gr.); inoltre, circa la metà dei germi presenti era rappresentata da schizomiceti fluidificanti la gelatina.

Ciò nonostante nel corso della stagionatura si ebbero a riscontrare contenuti microbici di gran lunga maggiori; infatti il numero dei germi presenti risultò superiore a 100.000.000 per gr. di materiale umido al quinto giorno, raggiungendo i 300-400.000.000 verso la fine della stagionatura. Considerando però i germi fluidificanti la gelatina, si osserva agevolmente che essi dopo aver subito un notevole aumento iniziale (4.000.000 per gr. al quinto giorno), soggiacquero in seguito ad una rapida e notevole diminuzione numerica. Si osserva inoltre che l'aumento iniziale di questi germi è stato proporzionalmente molto meno intenso di quello dei microrganismi non fluidificanti.

Dal predetto andamento, sufficientemente regolare, si stacca l'ultimo campione esaminato; il quale, pur presentandosi in perfetto stato di conservazione, rivelò un contenuto microbico totale nettamente più elevato dei precedenti; la stessa osservazione vale anche nei riguardi dei germi fluidificanti la gelatina, i quali risultarono presenti nella cospicua proporzione di 2.600.000 per gr. Sembra lecito però ritenere che tale scostamento sia da attribuire essenzialmente alla inevitabile disformità iniziale dell'impasto con cui vennero prodotti i salumi della stessa partita; in altri termini lo scostamento medesimo è da ritenersi estraneo al normale andamento del processo di maturazione oggetto di studio. Il quale, per quanto si è detto, appare caratterizzato da una rapida moltiplicazione dei germi, fluidificanti o non, seguita da una diminuzione, parimenti rapida e notevole, dei soli microrganismi capaci di fluidificare la gelatina.

Dalle prove culturali in latte emerge infine che le specie palesemente attive in questo substrato erano assai scarsamente rappresentate; infatti nessuna modificazione del latte ebbe a verificarsi nella diluizione di 1 : 100.000, mentre in quella di 1:10.000 si riscontrò coagulazione, oppure coagulazione accompagnata da lieve peptonizzazione solo nelle analisi dopo cinque e ventotto giorni. Nelle rimanenti prove si ebbe pure coagulazione accompagnata o non da parziale peptonizzazione, ma in nessun caso da sviluppo di gas.

I salami prelevati al quarantaduesimo e al cinquantottesimo giorno vennero utilizzati, oltre che per la determinazione dei microrganismi presenti nell'interno, anche per il conteggio di quelli presenti nella porzione più esterna, immediatamente al di sotto del budello.

Con tecnica analoga alla precedente si allestirono piastre di agar comune di gelatina e di agar malto. I risultati ottenuti sono raccolti nella tab. II.

Da essi si rileva che, mentre i germi presenti erano in totale meno numerosi di quelli presenti nella parte intema dello stesso salame, il numero dei fluidificanti la gelatina era alquanto maggiore, (alcune decine di migliaia). Anche il numero dei microrganismi capaci di coagulare e peptonizzare il latte è risultato nettamente maggiore. Si può osservare infine che qui non si sono riscontrate le forti differenze fra il numero delle colonie cresciute rispettivamente in agar comune ed in gelatina, come invece era risultato per la parte interna dei salumi.

### *Natura della microflora.*

Nelle piastre di agar comune, allestite per la determinazione del contenuto microbico della parte interna, si è constatata la netta prevalenza di colonie rotondeggianti molto piccole (circa 0,5 mm. di diametro), bianche o giallognole; accanto a queste colonie, rappresentative della microflora più tipica ed abbondante del materiale esaminato, si poterono osservare, in numero più o meno ridotto, colonie di dimensioni maggiori parte delle quali di germi del tipo *subtilis-mesentericus*; questi ultimi si riscontrarono in discreto numero nelle analisi al momento dell'insacco e dei primi campioni, mentre in seguito non si ritrovarono più.

Analoghe osservazioni furono fatte per mezzo delle piastre di gelatina, ove si formarono in proporzioni ancora più elevate colonie piccolissime (diametro non superiore a mm. 0,5), non fluidificanti, ed in piccolo numero colonie fluidificanti di dimensioni molto maggiori.

Nelle piastre di agar comune, allestite per la determinazione dei microrganismi presenti nella porzione dell'insaccato immediatamente al di sotto del budello, accanto a colonie piccolissime, simili alle predette, ed incirca nelle stesse proporzioni si poterono osservare delle colonie biancastre o giallognole che crebbero sino a raggiungere un diametro di alcuni mm.; molto probabilmente gran parte di esse corrispondevano alle colonie fluidificanti sviluppatasi nelle piastre di gelatina, in proporzioni non molto discoste da quelle piccolissime non fluidificanti. Nelle piastre di agar malto si ebbe infine la formazione, quasi esclusiva ed in elevato numero, di colonie bianche lisce ed umide (quelle superficiali), del diametro medio di 6 - 7 mm., costituite da blastomiceti.

Da quanto precede emerge che la microflora sviluppatasi nella parte interna dei salami esaminati era costituita principalmente da germi formanti su agar comune ed in gelatina delle colonie piccolissime, puntiformi, non fluidificanti. Nella parte più esterna notevole fu anche lo sviluppo di schizomiceti fluidificanti e di blastomiceti (è evidente qui l'influenza dell'aria). Nel corso stesso delle indagini analitiche sopra descritte è parso quindi utile effettuare l'isolamento delle principali specie microbiche presenti.

Gli schizomiceti delle colonie puntiformi sono subito apparsi come germi bastonciniiformi asporigeni, dotati inizialmente di assai scarsa capacità di crescita nei comuni terreni colturali; in seguito a molti trapianti periodici su agar glucosato, il loro sviluppo risultò progressivamente meno scarso, cosicchè dopo diversi mesi esso è divenuto discretamente abbondante. Sembra logico quindi presumere che anche in seno agli insaccati le attività biochimiche di questi microrganismi debbano essere lievi. Ciò emerge chiaramente anche dalle determinazioni chimiche effettuate le quali posero in luce solo lievissime modificazioni nel contenuto in sostanze azotate estraibili con acqua ed in azoto ammoniacale.

Poichè i predetti germi erano presenti nella parte interna dei salumi in proporzioni particolarmente elevate anche al termine della stagionatura (alcune centinaia di milioni per gr.), e dato che lo stato di conservazione dei salumi era indubbiamente ottimo, è evidente che il solo contenuto batterico

*totale non può essere assunto come indice dello stato di conservazione.* E perciò, nel caso che gli accertamenti batteriologici mirino a stabilire la commedibilità o non degli insaccati, è d'uopo precisare anche la natura dei microrganismi presenti, ricercando quantitativamente gli schizomiceti proteolitici aerobi ed anaerobi e quelli del gruppo tifo-coli. Infatti i processi di alterazione delle carni insaccate sono caratterizzati, oltre che da enormi cariche batteriche, da intenso sviluppo di tali microrganismi, i quali costituiscono appunto i fondamentali agenti dei processi putrefattivi.

Dei numerosi ceppi isolati, dopo le eliminazioni suggerite da grandi somiglianze di caratteri emerse nel corso delle successive osservazioni, venne effettuato il rilievo dei fondamentali caratteri morfologici, culturali e fisiologici; si descrivono quindi i seguenti ceppi:

Ceppo 2; bastoncino isolato da piastra di gelatina, analisi del quinto giorno; piccola colonia biancastra.

Ceppo 8; bastoncino isolato da piastra di agar comune, analisi dell'undicesimo giorno; piccola colonia biancastra.

Germi pressochè identici ai due precedenti ceppi furono ottenuti con numerosi altri isolamenti, anche durante le successive analisi.

Ceppo 1; isolato da piastra di agar comune, analisi del quinto giorno; piccola colonia giallognola. E' un actinomicete; la presenza di germi simili ad esso non fu notata nelle analisi successive.

Ceppo 25; cocco isolato da piastra di agar comune, analisi del ventottesimo giorno; colonia bianca di mm. 1.5.

Ceppo 18; bastoncino isolato da piastra di agar comune, analisi del quarantaduesimo giorno della porzione sotto il budello; colonia bianco-giallastra di circa 5 mm.

Ceppo 12; lievito della vegetazione microbica superficiale, analisi del ventottesimo giorno; esso è eguale ai lieviti isolati dalla porzione sotto budello dei salumi analizzati dopo quarantadue e cinquantotto giorni.

Ceppi 10 e 11; ifomiceti superficiali isolati al ventottesimo giorno.

La descrizione dei ceppi 10, 11 e 12 verrà data in una successiva nota.

#### CEPPO 1.

*Caratteri morfologici.* Nelle colture su patata glicerinata si presenta sotto forma di lunghi filamenti con diramazioni secondarie; spessore ed andamento un po' irregolare, in media 0,5  $\mu$ ; la lunghezza varia da 20 a 100  $\mu$  circa; non ha tendenza a spezzettarsi ed a formare spore; si colora discretamente con la fuxina di Ziehl, non molto bene con il bleu di metilene e con l'eosina. Gram positivo, non acido-resistente.

*Caratteri culturali e fisiologici.* L'ottimo di temperatura è di 37° C; più lenta è la crescita a 30°, però cresce anche a 10-12°.

Nelle colture per striscio si osserva il seguente comportamento:

*Patata glicerinata.* Patina discretamente espansa, da prima di colore bianco, poi tendente al giallastro, spessa e finemente rugosa.

*Siero coagulato.* Patina da prima bianca, poi giallo marrone, lievemente rugosa; dopo qualche giorno si ha leggera fluidificazione.

*Agar glicerinato.* Crescita sotto forma di colonie rotondeggianti prevalentemente staccate, del diametro di alcuni mm.; dapprima di colore bianco, poi avorio, infine giallastro, particolarmente nella parte centrale. In superficie si notano fini rugosità radiali; l'aspetto è cereo; notevole è l'aderenza al terreno colturale.

*Agar comune.* Colonie molto simili a quelle su agar glicerinato ma un po' meno rigogliose; si nota una maggiore tendenza a confluire ed a formare patina.

*Infissione in agar comune.* Accrescimento scarsissimo, filiforme, solo nella parte alta. In superficie si ha formazione di colonia simile a quelle formatesi su agar glicerinato.

*Infissione in gelatina comune.* Sviluppo a forma di abete rovesciato, con lenta e scarsa fluidificazione superficiale.

*Brodo glicerinato.* Il brodo rimane limpido; sul fondo della provetta si formano piccole colonie, fiocose, rotondeggianti, compatte, di colore bianco, che non si dissolvono all'agitazione. Non forma pellicole superficiali.

*Brodo comune.* Come in brodo glicerinato.

*Latte.* Dopo 10 giorni coagulo mollissimo, indi leggera peptonizzazione che ha inizio dall'alto.

*Acqua peptonata.* Pressochè come in brodo glicerinato.

*Brodo ed agar malto.* Nessuno sviluppo.

Non produce acidi da glucosio, levulosio, maltosio, saccarosio, lattosio, xilosio, mannite, inulina. Produce indolo, riduce i nitrati, forma catalasi.

Nonostante lievi differenze, il ceppo può essere identificato con la specie *Actinomyces albedo-flavus* (Rossi Doria) Gasperini.

## CEPPO 2.

*Caratteri morfologici.* Da colture di due giorni su agar glucosato: bastoncini molto corti e sottili, per lo più di  $0,3 \times 0,8 \mu$  (si nota però qualche germe leggermente più grosso e di forma irregolare), disposti prevalentemente in catene di 8-10 elementi. Dopo 8 o più giorni si osservano forme involutive: cioè accanto a pochi bastoncini normali, se ne trovano altri più lunghi, più grossi e per lo più variamente curvi. Da colture di quarantotto ore in brodo comune le dimensioni sono di  $0,3-0,5 \times 0,5-1 \mu$ . Non sporifica. Si colora bene con il bleu di metilene e con la fuxina di Ziehl. Gram positivo, non acido-resistente.

*Caratteri colturali e fisiologici.* L'ottimo di temperatura è di 30° C, ma cresce bene a 23° e 37° C. Lento è lo sviluppo a 5-6° C; a 40° C stentato accrescimento di poche e piccole colonie staccate.

*Agar comune striscio.* Patina sottilissima incolora, trasparente, lievemente lucida, liscia e discretamente estesa.

*Agar comune infissione.* Lungo l'infissione accrescimento discreto di un sottile filamento; quasi nullo lo sviluppo in superficie.

*Brodo comune.* Discreto intorbidamento e lieve deposito pulvirulento; nessuna formazione di veli.

*Agar glucosato striscio.* Sviluppo lievemente più intenso che in agar comune.

*Agar glucosato infissione.* Come in agar comune.

*Brodo glucosato.* Come in brodo comune.

*Agar malto striscio.* Come su agar glucosato.

*Agar malto infissione.* Scarsissimo sviluppo.

*Brodo malto.* Come in brodo comune.

*Latte.* Non si osserva alcuna modificazione, nemmeno dopo 15 giorni.

*Infissione in gelatina.* Scarsa crescita uniforme lungo tutta la linea di inoculazione; nessuna fluidificazione.

*Patata alla Roux.* Non si osserva formazione d'i patina.

In acqua peptonata addizionata di zuccheri (pH = 7) si ha netta acidificazione (pH = 4,8-5) da glucosio, saccarosio, lattosio. La capacità di produrre acidi è risultata evidente anche nelle colture in brodo malto, ove, come si è detto, il germe cresce discretamente; si è avuto infatti un abbassamento del pH a 4,7.

Non produce indolo, non riduce i nitrati, non dà ammoniaca nè catalasi. Nonostante la lieve differenza riguardante il colore della patina culturale su agar comune e l'azione sopra i nitrati, crediamo di poter identificare il ceppo 2° con la specie *Microbacterium lacticum* Orla Jensen.

#### CEPPO 8.

##### *Caratteri morfologici*

Da coltura di 48 ore su agar glucosato si presenta sotto forma di bastoncini di  $0,5 \times 1,0-2,0 \mu$  disposti per lo più a due a due o in corte catenelle di 3-4 individui. Da colture di 48 ore in brodo comune le dimensioni sono  $0,6-0,8 \times 1,5-2,5 \mu$ . Si colora bene con bleu di metilene e con fuxina di Ziehl; è Gram positivo, non acido resistente; non sporigeno.

##### *Caratteri culturali e fisiologici.*

L'ottimo di temperatura è di 30° C; si sviluppa bene e rapidamente anche a 23-37° C, lentamente a 5-6° C; non si sviluppa a 40° C.

*Agar comune striscio.* Patina bianca, molto sottile, lucida, lievemente granulosa, poco sviluppata lateralmente allo striscio.

*Agar comune infissione.* Lungo l'infissione discreto accrescimento microbico uniforme.

*Brodo comune.* Discreto intorbidamento con notevole deposito bianco pulvirulento; nessuna formazione di velo.

*Agar glucosato striscio ed infissione.* Sviluppo lievemente più intenso che su agar comune.

*Brodo glucosato.* Sviluppo discretamente intenso con intorbidamento e deposito.

*Agar malto striscio.* Come su agar comune.

*Agar malto in fissione.* Sviluppo molto scarso.

*Brodo malto.* Discretamente torbido e discreto deposito sul fondo.

*Latte.* Non si osserva alcuna modificazione neppure dopo 15 giorni.

*Gelatina infissione.* Lungo tutta l'infissione accrescimento uniforme dello spessore di circa 2 mm.; nessuna fluidificazione.

*Patata alla Roux.* Non si osserva formazione di patina.

In acqua peptonata addizionata di zuccheri (pH = 7) si ha netta acidi-

cazione da lattosio. La capacità di produrre acidi è risultata evidente anche determinando la variazione del grado di acidità in brodo malto ove, come si è detto, il germe cresce discretamente; si è avuto infatti un abbassamento del pH a 3,5. Non produce indolo non riduce i nitrati non dà ammoniaca; formazione di tracce di catalasi.

Il ceppo 8° presenta forse maggiori somiglianze ancora del ceppo 2° con la specie *Microbacterium lacticum* Orla Jensen, con il quale viene identificato.

#### CEPPO 25

##### *Caratteri morfologici.*

Cocchi a forma di chicco di caffè; da colture su agar glucosato di 48 ore diametro che varia da 0,3 a 0,5  $\mu$ ; da colture in brodo comune di 48 ore, diametro di 0,5-0,7  $\mu$ ; si presenta anche sotto forma di corte catenelle. Si colora bene con il bleu di metilene e con fuxina di Ziehl; è Gram positivo, non acido resistente.

##### *Caratteri culturali e fisiologici.*

L'ottimo di temperatura è di 30° C, ma si sviluppa molto rapidamente anche a 23° e 40° C; non cresce a 5-6° C.

*Agar comune striscio.* Patina di colore bianco avorio spessa, ben rilevata, liscia e lucida, discretamente espansa.

*Agar comune infissione.* Solo piccolo accrescimento nella parte superiore dell'infissione.

*Brodo comune.* Notevole intorbidamento e discreto sedimento biancastro.

*Agar glucosato striscio.* Patina come in agar comune ma lievemente più abbondante.

*Agar glucosato infissione.* Accrescimento discreto solo nella parte superiore dell'infissione.

*Brodo glucosato.* Notevole intorbidamento e discreto sedimento biancastro.

*Agar malto striscio.* Patina sottilissima biancastra.

*Agar malto infissione.* Sviluppo molto scarso.

*Brodo malto.* Discretamente torbido e piccolo sedimento bianco.

*Latte.* Non si osserva alcuna modificazione neppure dopo 15 giorni.

*Gelatina infissione.* Lungo l'infissione discreto accrescimento uniforme; nessuna fluidificazione.

*Patata alla Roux.* Patina discretamente estesa di colore dapprima bianco poi tendente al giallastro, lucida umida ed uniforme.

In acqua peptonata addizionata di zuccheri (pH = 7) si ha leggera acidificazione da glucosio e saccarosio (pH = 5,0 e 5,5). La capacità di produrre

acidi è apparsa evidente anche nelle colture in brodo malto, in cui il pH è sceso a 4,5. Non produce indolo, non riduce i nitrati; dà catalasi e tracce di ammoniaca.

Si ritiene di poter identificare il ceppo 25, con la specie *Micrococcus candidus* Cohn.

#### CEPPO 18.

##### *Caratteri morfologici.*

Bastoncino corto, ad estremità arrotondate, prevalentemente disposti in ordine sparso o a due a due; da agar comune di 48 ore dimensioni  $0,3 \div 0,5 \times 0,5 \div 1 \mu$  in brodo comune e brodo malto di 48 ore assume la forma di cocco-bastoncino, dimensioni  $0,5 \times 0,7 \mu$ . Si colora discretamente con il bleu di metilene; bene con la fuxina di Ziehl. Mobile. Gram negativo, non acido resistente. Non sporigeno.

*Agar comune striscio.* Patina bianca bene espansa a bordi lievemente ondulati, lucida ed uniforme.

*Agar comune infissione.* Abbondante ed uniforme accrescimento; l'agar viene spaccato in più punti per produzione di gas.

*Brodo comune.* Forte intorbidamento e abbondante deposito fioccoso di colore bianco; notevole produzione di gas; nessun velo.

*Agar glucosato striscio.* Come su agar comune ma crescita molto più rigogliosa.

*Agar glucosato infissione.* Come in agar comune, forte intorbidamento e abbondante deposito fioccoso di colore bianco; intensa produzione di gas; nessun velo.

*Agar malto striscio.* Patina abundantissima che invade tutto lo striscio di aspetto mucillaginoso e di colore bianco avorio lucida ed uniforme.

*Agar malto infissione.* Come in agar glucosato.

*Brodo malto.* Come in brodo glucosato.

*Latte.* Dopo 5-6 giorni si ha coagulo spaccato per lo sviluppo di gas.

*Gelatina infissione.* Lungo tutta l'infissione accrescimento sottile ed uniforme.

*Patata alla Roux.* Patina bianca, uniforme, lucida, non molto rilevata.

In acqua peptonata addizionata di zuccheri si nota acidificazione, con produzione di gas, da glucosio, levulosio, lattosio, maltosia, lieve da saccarosio e mannite; nessuna dall'inulina. Risulta evidente che il germe ha capacità di produrre acidi, poichè anche in brodo malto si è avuto un abbassamento del pH a 4,7.

Riduce i nitrati; non dà ammoniaca; produce catalasi e tracce di indolo. Reazione di Voges-Proskauer negativa. Si noti che il brodo comune (ed il relativo agar comune) è stato preparato con carne di cavallo.

Il ceppo 18 appartiene sicuramente al gruppo Coli-ærogenes e con ogni probabilità alla specie *Escherichia coli* (Migula) Castellani e Chalmers.

## I RISULTATI DELLE DETERMINAZIONI CHIMICHE

Le determinazioni analitiche vennero eseguite su campioni omogeneizzati il più possibile mediante triturazione. I metodi applicati furono i seguenti:

*Residuo secco* = Essiccamento in stufa a 105° per sei ore.

*Ceneri* = Per calcinazione del materiale, lisciviazione della massa e successivo incenerimento del residuo carbonioso.

*Azoto totale* = Metodo Kjeldhal.

*Grasso* = Estrazione con etere in apparecchio Soxhlet.

*Cloruro di sodio* = Metodo Charpentier-Volhard (Villavecchia).

*Estrattivi* = Gr. 25 di materiale vengono trattati con acqua in palloncino tarato da 250 cc. mantenendo poi per 12 ore in refrigerante; si filtra e nel filtrato si eseguiscano le seguenti determinazioni:

Sostanze estrattive totali: 20 cc. del filtrato vengono evaporati a bagno maria, in capsula di quarzo previamente tarata; si essicca quindi in stufa a 105° per 5 ore e si pesa. Mediante calcinazione si hanno quelle minerali e per differenza quelle organiche.

Azoto solubile totale: 5 cc. di liquido vengono decomposti con 5 cc. di acido fosfosolfurico in presenza di ossido di rame; si distilla in micro-Kjeldhal con eccesso di soda caustica, raccogliendo in 25 cc. di acido solforico N/50 e titolando poi con soda N/50.

Azoto solubile non precipitabile: 50 cc. di liquido vengono fatti bollire per qualche minuto, poi concentrati a bagno maria e portati a 25 cc.; si filtra e su 5 cc. si determina l'azoto con micro-Kjeldhal. Per differenza si ottiene l'azoto solubile precipitabile.

Azoto ammoniacale: 10 cc. di liquido vengono distillati in presenza di ossido di magnesio; si raccoglie in acido solforico N/50 e si titola con soda N/50.

I risultati ottenuti da queste determinazioni sono raccolti nella Tab. III.

Essi stanno ad indicare in primo luogo il decorso del processo di prosciugamento; in seguito ad esso, l'umidità dell'insaccato al termine del secondo mese è risultata infatti del 27,44 %.

Nei riguardi del cloruro di sodio si osserva che il contenuto di esso, riferito alla sostanza secca, è del 7,5 % circa, ossia corrispondente a quello che è da ritenersi un dato medio per i nostri salumi.

Per quanto concerne le variazioni p.d.w. con la stagionatura, tenendo conto degli inevitabili errori sperimentali, emergono le seguenti osservazioni:

La reazione espressa dal valore del pH, ebbe a variare leggermente, nel senso che si è verificato un lieve aumento di acidità, specialmente nella prima fase della maturazione.

Le sostanze estrattive subirono un lieve e perciò dubbio incremento; così pure le sostanze azotate solubili; però la frazione non precipitabile col calore sembra abbia subito un leggero ma evidente aumento a spese della frazione precipitabile.

TAB. I.  
 CONTENUTO MICROBICO NEL CORSO DELLA STAGIONATURA  
 PARTE INTERNA

Determinazioni mediante	Germi per gr. dopo giorni						
	0	5	11	17	28	42	58
Piastre di agar comune	45.000	88.000.000	170.000.000	116.000.000	24.900.000	27.600.000	142.000.000
Piastre di gelatina:							
germi non fluidificanti	740.000	105.000.000	202.000.000	340.000.000	380.000.000	294.000.000	580.000.000
» fluidificanti	600.000	4.000.000	600.000	700.000	300.000	130.000	2.600.000
» totali	1.340.000	109.000.000	202.600.000	340.700.000	380.300.000	294.130.000	582.600.000
» tot. per gr. sost. secca	2.690.000	196.000.000	335.500.000	518.000.000	570.000.000	412.000.000	803.000.000
Latte 1/100	c.	c. s.	c. p.	c.	c. (p.)	c.	c.
1/1000	c. s.	c. s.	c. s.	c.	c. p.	i.	c.
1/10.000	i.	c.	i.	i.	c. (p.)	i.	i.
1/100.000	i.	i.	i.	i.	i.	i.	i.

c = Coagulo compatto

c. s. = Coagulo con separazione di siero

p. = Peptonizzazione evidente

g. = Gas

i. = Latte immutato

Lieve ma netto incremento, specialmente nella prima fase, subì pure il contenuto in azoto ammoniacale; al termine della conservazione, esso non ebbe però a superare l'un per mille della sostanza secca.

Il leggero ma netto scostamento della quantità di ammoniaca presente nel campione di 58 giorni, posto in relazione con i dati batteriologici, conferma la già enunciata supposizione che esso sia estraneo al normale andamento del processo di maturazione, il che è confermato dal regolare stato di conservazione del campione.

Da quanto precede si possono trarre le seguenti indicazioni preliminari, che le successive indagini sono chiamate a confermare e ad integrare, estendendole ai vari tipi di insaccati:

TAB. II.  
CONTENUTO MICROBICO DELLA PORZIONE ESTERNA,  
AL DI SOTTO DEL BUDELLO

Determinazioni mediante	Germi per gr. dopo giorni	
	42	58
Piastre di agar comune	122.000.000	97.000.000
Piastre di gelatina:		
germi non fluidificanti	60.000.000	48.600.000
» fluidificanti	59.000.000	16.000.000
» totali	119.000.000	64.600.000
Piastre di agar malto	19.000.000	16.400.000
Latte 1/100	c. p.	c. p. (g?)
1/1000	c. p.	c.
1/10.000	c. p.	c. p.
1/100.000	c. p.	c. p.
1/1.000.000	i.	c.

TAB. III. COMPOSIZIONE DEI SALAMI NEL CORSO DELLA MATURAZIONE

Campione	Analisi dopo giorni	Umidità	Residuo secco	N. totale	Sostanze azotate	Grasso	Generi	NaCl	Sostanze estrattive			Azoto solubile			Azoto ammoniacale	pH
									Totalli	Minerali	Organiche	Totale	Non prec.	Precip.		
I	1	50.23	49.77	2.34	14.66	28.43	4.64	3.99	8.48	3.99	4.49	—	0.227	—	0.007	6.28
II	5	44.43	55.59						9.19	5.25	3.94	0.329	0.329	0.320	0.019	6.12
III	11	39.67	60.33						11.40	6.06	5.34	0.342	0.399	0.399	0.037	6.00
IV	17	34.22	65.78						12.02	5.90	6.12	0.401	0.379	0.045	6.00	
V	28	33.32	66.68						12.10	6.38	5.72	0.443	0.338	0.043	5.99	
VI	42	28.68	71.32						13.33	6.53	6.80	0.507	0.366	0.054	6.07	
VII	58	27.44	72.56	3.52	22.00	42.83	7.00	5.33	13.76	6.99	6.77	0.954	0.553	0.401	0.076	6.03

COMPOSIZIONE RIFERITA ALLA SOSTANZA SECCA

Campione	Analisi dopo giorni	Umidità	Residuo secco	N. totale	Sostanze azotate	Grasso	Generi	NaCl	Totalli	Minerali	Organiche	Totale	Non prec.	Precip.	Azoto ammoniacale	pH
I	1	—	—	4.71	29.43	57.13	9.53	8.01	17.03	8.02	9.01	—	0.457	—	0.014	—
II	5	—	—						16.55	9.45	7.10	1.17	0.593	0.575	0.034	—
III	11	—	—						18.91	10.04	8.87	1.23	0.567	0.661	0.062	—
IV	17	—	—						18.27	8.97	9.30	1.18	0.610	0.576	0.068	—
V	28	—	—						18.12	9.55	8.57	1.17	0.663	0.506	0.064	—
VI	42	—	—						18.69	9.15	9.54	1.22	0.711	0.513	0.077	—
VII	58	—	—	4.85	30.31	59.02	9.66	7.35	18.96	9.63	9.33	1.31	0.772	0.553	0.105	—

Il normale processo di stagionatura non appare accompagnato da speciali variazioni del valore del pH; nel caso studiato, si è avuto una leggera diminuzione di questo da 6,28 a circa 6.

Le variazioni relative alle sostanze estraibili con acqua sono trascurabili o molto lievi; tenui ma netti incrementi subiscono l'azoto non precipitabile col calore e l'azoto ammoniacale. Il tasso di quest'ultimo al termine della stagionatura studiata, è prossimo all'un per mille della sostanza secca, ovvero circa il 2 % dell'azoto totale dell'insaccato.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden bakteriologische und chemische Versuche an Wurstwaren mit geringer Dimension und rascher Reifung (2 Monate) angestellt, indem zu verschiedenen Zeiten, von der Zubereitung bis zur Ablagerung, Proben entnommen und analysiert wurden.

Die bakteriologische Untersuchung hat zu folgenden Feststellungen geführt: der Mikrobengehalt der Wurstmasse betrug anfänglich pro gr. über eine Million Keime und bestand ungefähr zur Hälfte aus Keimen welche Gelatine verflüssigen. In der Folge erlitt der Mikrobengehalt eine starke Zunahme, bis zu 300-400 Millionen pro gr. und erst gegen das Ende der Ablagerung, eine nur geringe Abnahme.

Auch die Zahl der Gelatine verflüssigenden Keime erlitt eine bedeutende, verhältnissmässig jedoch geringere Zunahme, um zum Schlusse stark abzunehmen. Die Mikroflora bestand hauptsächlich aus Keimen welche punktförmige, Gelatine nicht verflüssigende Kolonien bildeten, die sich auf den gewöhnlichen Nährböden nur spärlich entwickelten. Die Untersuchung einiger der isolierten Stämme, zeigte dass es sich um Bakterien handelte welche zu *Microbacterium lacticum* Orla Jensen gehörten, die im grossen ganzen, sehr schwache vegetative und biochemische Tätigkeiten an den Tag legten. Es wurden ferner isoliert: ein Actinomycet (*Actinomyces albido-flavus* (Rossi Doria) Gasperini; ein Kokkus: *Micrococcus candidus* Cohn und überdies ein Keim welcher der Art *Escherichia coli* (Migula) zuzuschreiben ist.

Im äusseren Teil, unter der Darmhülle, war die Entwicklung von die Gelatine verflüssigenden Schizomyceten viel üppiger als im mittleren Teil und es bestand ausserdem ein starkes Wachstum von Blastomyceten. Die Identifizierung dieser letzteren ist im Gange.

Bei Bestimmung des Keimgehaltes im Innern der Wurstwaren, kam es zu besseren Resultaten wenn als Nährboden Gelatine verwendet wurde.

Die chemischen Versuche haben zu folgende Feststellungen geführt: der Chlornatriumgehalt entsprach 7 % der Trockensubstanz; dieser Befund gilt für unsere Wurstwaren als normal.

Der Ablauf der Trocknung war rasch aber regelmässig; am Ende des zweiten Monats, betrug die Feuchtigkeit 27.44 %.

Der Säuregrad war etwas verschieden, mit einer kleinen Abnahme des pH.

Eine unmerkliche Zunahme erlitten die gesamten mit Wasser extrahierbaren Substanzen; ein gleiches gilt für die löslichen stickstoffhaltigen Substanzen. Gering, jedoch merklich, war die Zunahme der nicht aus-

fällbaren Fraktion, zu Kosten der präzipitierbaren Fraktion. Eine leichte, jedoch deutliche Zunahme, erlitt der ammoniakale Stickstoff, der aber am Ende der Ablagerung I p. 1000 der Trockensubstanz nicht überstieg.

Der Konservierungszustand der Wurstwaren war ausgezeichnet.

Da der Keimgehalt am Schlusse ganz besonders hoch war, jedoch aus unschädlichen Keimen bestand, so ist zu schliessen dass bei der Analyse zur Bestimmung der Essbarkeit der Wurstwaren im allgemeinen, die Bakterienladung nicht als Index des Konservierungszustandes gelten kann; es muss ausserdem die Natur der vorhandenen Mikroragnismen in Betracht gezogen werden.

## **Soja e tubercoli radicali**

**Prof. Tommaso Castelli - Dir. Inc.**

(Ricevuto il 15 Marzo 1943-XXI)

Prima di consigliare agli agricoltori di coltivare la soja, è necessario esaurire la fase sperimentale del problema, specialmente nei riguardi dello sviluppo dei tubercoli sulle radici della leguminosa stessa, condizione indispensabile questa, per il buon esito della coltura dal punto di vista economico-agrario (A. VIVENZA).

In diverse note precedenti ho trattato dell'impiego di colture microbiche per il trattamento del seme di leguminose ed in particolare della soja. Sono stati riferiti dapprima i risultati ottenuti per medica, trifoglio, soja e sulla in prove su vasi e su cassoni (1).

Successivamente, prendendo in considerazione esclusivamente la soja, si condussero indagini in rapporto alla cosiddetta assojatura del terreno e venne dimostrato che mentre le nostre terre non ospitano il *Bacillus radiccicola* specifico per detta leguminosa, dall'imbrattamento del seme di soja con della terra assojata, terra cioè dove la soja era sviluppata presentando le caratteristiche nodulazioni radicali, si ottenevano piante con radici provviste di tubercoli. (2)

Ricerche successive dimostrarono che la terra assojata lasciata all'aperto e quindi esposta ai rigori dei mesi estivi ed invernali ospita ancora vivo e capace di produrre tubercoli il *Bacillus radiccicola* per la soja. (3)

Ma per quanto l'uso della terra assojata rappresentasse un mezzo abbastanza semplice indagini di confronto dimostrarono chiaramente che i risultati che si ottengono dall'uso di colture pure di *Bacillus radiccicola* specifico per la soja erano nettamente superiori a quelli avuti con la terra assojata in quanto il numero dei tubercoli era notevolmente maggiore.

Stabiliti così i risultati in laboratorio feci gratuita offerta di materiale microbico a chi avesse voluto coltivare soja. (4)

Ho già riferito i risultati avuti dagli agricoltori durante le coltivazioni eseguite nel 1940 (5). Forse perchè la mia offerta venne formulata su riviste scientifiche la richiesta da parte degli agricoltori fu molto scarsa. Nel 1941 invece sia perchè la mia offerta venne riportata in giornali di divulgazione come, e principalmente forse, per l'interessamento della Direzione A.N.C.P.E.O. (Associazione Nazionale Coltivatori Piante Erbacee Oleaginose) la richiesta aumentò notevolmente e venne inviato materiale microbico per circa 70 Ha. di coltivazioni a soja.

In seguito ai buoni risultati ottenuti nelle coltivazioni eseguite nel 1941 in accordo con la Direzione Ancepo venne stabilito che tutta la semente di soja distribuita agli agricoltori che ne avessero fatto richiesta venisse trattata con il relativo materiale microbico preparato in questo laboratorio. Invero il lavoro che il laboratorio si accollò si presentò immediatamente non facile ma si rese successivamente gravoso per le difficoltà,

dato il periodo di emergenza di trovare tutto il necessario all'espletamento del servizio affidatogli. Pertanto nel 1942 è stato inviato materiale microbico per il trattamento di quasi 700 Ha. di coltivazioni a soja. Il servizio è stato svolto nella migliore maniera possibile ed i risultati ottenuti, che verranno ora in parte riferiti, ne rappresentano la dimostrazione evidente.



*Fig. 1. Piante di soja estirpate da una coltivazione dopo grano in terreno irriguo e con trattamento microbico della sementa. Si osservi l'enorme numero di tubercoli.*

Prima però di riferire i risultati ottenuti in laboratorio su cassoni come in pieno campo su estese superfici di terreno, voglio premettere alcune considerazioni di ordine prevalentemente microbiologico.

L'inoculazione dei terreni da coltivare a leguminose a mezzo di colture microbiche risale a qualche anno dopo le classiche ricerche di Hellriegel (6), Hellriegel e Willfarth (7) e del Beijerinck (8).

La prima nitragina fu preparata nel 1896 da Nobbe e Hiltner in seguito alle loro numerose ricerche condotte presso la Stazione Agraria di Tharandt (9).

Ma ai primi successi corrisposero successivamente risultati molto incerti e a volte completamente negativi.

Non buoni risultati pare siano stati ottenuti da preparati allestiti sotto forma di colture in gelatina da parte del Laboratorio di Botanica Agraria di Monaco. Molto poco attive si dimostrarono alcune nitragine preparate su gelatina, su substrato liquido e su terra messe in commercio da parte del Laboratorio di Kuhn, ed analoghi risultati sembra siano stati ottenuti con una nitragina preparata da Harrison e Barlow (10) nel 1906 e largamente sperimentata nel Canada. In un certo periodo i preparati si moltiplicarono in maniera veramente impressionante ed in verità occorre riconoscere che di tutti questi materiali ben pochi, o forse nessuno, corrispose allo scopo.

Basterà ricordare, onde dimostrare l'estrema scarsità sulle conoscenze che si possedevano intorno alla biologia del *Bacillus radicola* gli allestimenti eseguiti dal Moore (Nitrocultura) (11) e dal Bottomley (la Nitrobatterina) (12). In ambedue questi materiali la coltura del germe simbiote era stata fatta essiccare su batuffoli di cotone con o senza apporto di terra. Per usare il materiale era necessario porre questo batuffolo di cotone in un liquido preparato sciogliendo in acqua sali minerali e dello zucchero e lasciare la bottiglia in ambiente caldo.

Dopo 24-48 ore, cioè quando nel liquido si manifestava un evidente intorbidamento, il materiale era pronto per l'uso. Ora chiunque non sia completamente digiuno di microbiologia del terreno comprende subito che agendo in tale maniera, è vero che nella bottiglia si manifestava sviluppo microbico, ma è pur vero che in dette condizioni non si poteva sviluppare certamente il *Bacillus radicola*.

In verità occorre riconoscere che De Rossi fin dal 1906 aveva chiaramente mostrate le difficoltà che si incontravano nell'isolamento del microbio simbiote e pertanto risultava evidente che tutta una serie di microorganismi ritenuti capaci di produrre i tubercoli sulle radici delle leguminose non avessero nulla in comune col vero microbio tubercoligeno (13) (14) (15).

Non intendo riferire tutta la vastissima letteratura che esiste sull'argomento; chi vorrà trovare un quadro quasi completo dell'importante questione può consultare quanto è riportato nel trattato di Microbiologia di De Rossi (16) nella monografia dell'Omeliansky (17) in quella di Müller e Stapp (18) e nella relazione di De Rossi al IV Congresso Nazionale di Microbiologia (19).

Mi interessa qui invece dare rapidi cenni su quanto si è scritto a proposito del microbio capace di produrre i tubercoli nella soja.

Già Beijerinck segnalando il *Bacillus radicola* come responsabile della produzione dei tubercoli radicali aveva riferito l'esistenza di due diverse varietà, l'una propria delle leguminose come fava, veccia, trifoglio, cicercia ecc., la seconda del lupino, fagiolo, robinia.

Hiltner e Störmer (20) ammisero subito l'esistenza di due specie, e cioè un *Rhizobium*, accettando detto genere stabilito dal Frank (21), *radicola* che comprenderebbe i microbi isolabili dal maggior numero di leguminose ed un *Rhiz. Beijerincki* al quale si dovrebbero riportare i germi

isolabili dai tubercoli di *Lupinus*, *Ornithopus*, Soja e poche altre leguminose.

Kirchner (22) descrive come *Pseudomonas japonica* il microbio responsabile di produrre i tubercoli sulle radici della soja. Löhnis e Hansen (23) hanno indicato un Bac. radicolata proprio delle leguminose europee ed una *Pseudomonas japonica* propria delle leguminose americane ed asia-



Fig. 2. A sinistra pianta tolta da un appezzamento senza trattamento a destra pianta tolta da appezzamento trattato. Si osservi l'enorme differenza e la presenza di numerosi tubercoli nella pianta di destra.

tiche (Soja, Vigna, Lespedeza, Acacia, Genista, Desmodium, Cassia, ecc.).

Le ricerche di Sunk (24) hanno dimostrato come i microbi del primo gruppo hanno cigliatura peritrica mentre quelli del secondo, ivi compresa la soja, sarebbero monotrichi.

Per contro Wilson (25) avrebbe visto che anche il microbio della soja è peritrico.

Baldwin, Fred e Eckhandt (26) distinguono varie specie e tra queste *R. japonicum* che sarebbe monotrico. A questo riguardo ritengo oppor-tuno riferire che ho eseguito la colorazione delle ciglia su diversi stipti isolati da varie leguminose (medica, trifoglio, lupinella, sulla, meliloto) ri- scontrando per tutti cigliatura peritrica mentre le colture isolate dai tuber- coli di soja presentano un solo ciglio.

Nella V edizione del manuale di determinazioni batteriche Bergey (27) distingue 6 specie da riportare al genere *Rhizobium* e tra questi il *Rhiz. japonicum* con cellule giovani aventi un solo ciglio.

In rapporto a fatti di inoculazione incrociata non sussiste molto accordo, così vi sono molti che ritengono che il microbio isolato dai tuber- coli di soja sia attivo soltanto su detta pianta, mentre altri come Hansen e Tanner (28) affermano che Vigna e Soja hanno reciproca attività inocu- lativa.

Sears e Carrol (29) avrebbero osservato invece che mentre tutti gli sti- piti isolati da tubercoli di soja sarebbero attivi su vigna, non tutti gli sti- piti isolati da vigna sarebbero attivi su soja.

Infine Wright (30) indagando su numerose culture isolate da tuber- coli radicali di soja le ha distinte in due differenti tipi con notevoli diver- sità riguardanti i caratteri colturali, il comportamento sierologico e l'atti- vità azotofissatrice.

Io non ho condotto ampie indagini in proposito, ma posso affermare ad esempio che il microbio isolato da soja è sicuramente inattivo su *Ara- chis* e viceversa e su tutta una serie di leguminose italiane (medica, trifog- lio, sulla, lupinella, meliloto, mochi ecc.).

Logicamente l'inoculazione dei microbi direttamente nel terreno o sparsi sui semi al momento delle semina può avere effetto utile soltanto se il terreno presenta una natura fisico-Chimica ed una reazione confa- ciente sia alla pianta come al microorganismo.

Da quanto è stato esposto si deduce che alla mancata rispondenza dei materiali microbici consigliati per le leguminose hanno contribuito non poco le scarse e spesso contraddittorie conoscenze che si avevano sui mi- crobi produttori dei tubercoli.

Ma negli ultimi tempi la letteratura sull'argomento si è talmente arric- chita ed una serie molto vasta di indagini ha contribuito, se non a risolvere completamente, a chiarire molti punti. E sarebbe erroneo, se in base a risultati ottenuti molti anni fa (31) (32) (33), voler negar la buona rispon- denza di alcuni materiali preparati recentemente. Ed è fortemente dimo- strativo che proprio negli Stati Uniti d'America, ove detti preparati furono dapprima impiegati e generarono un forte discredito tra gli agricoltori, oggi la richiesta e l'applicazione di detti materiali, siano fatte su vasta scala. Negli Stati Uniti d'America la preparazione di detti materiali, affi- data alle Stazioni Sperimentali, ha corrisposto in pieno. Basterà ricordare come la Stazione del Wiscosin secondo quanto riferiscono Fred-Whiting- Hastings (34) abbia fornito materiale microbico per 8 Ha. nel 1916 e per 20.000 Ha. nel 1926. Anche in Inghilterra ed in Germania il largo im- piego di nitragine fornisce risultati soddisfacenti secondo quanto riferi- scono Thornton (35) e Nolte e Münzberg (36).

Mi piace qui ricordare quanto ebbi a scrivere al termine del mio lavoro sulla preparazione e l'impiego della nitragine, nel 1938: è desiderabile che anche in Italia, senza ricorrere alla produzione straniera si provveda alla preparazione di nitragine da parte di competenti istituzioni scientifiche che ne possano garantire la purezza, l'attività e l'adattabilità a ciascuna leguminosa.

Che i rapporti tra leguminosa e microbio simbiote siano diversi nelle varie piante e che essi non si fermino soltanto alla nutrizione azo-



Fig. 3. Cassone 1, con terra assojata; cassone 8 terra orto e trattamento con cultura sviluppata su liquido B, cassone 11 terra orto e semi senza trattamento.

tata, ma che questa rappresenti soltanto il fenomeno più appariscente, è evidente.

Senza voler qui fare una larga disamina di questioni fisiologiche si può accennare alla grande diversità esistente nei rapporti tra leguminosa e microbio simbiote in tre piante: sulla, soja e medica.

E' noto come nei terreni mai coltivati a sulla questa pianta non cresce se in qualche maniera non si provvede a portare nel terreno il microbio simbiote.

Esperienze su cassoni ed in pieno campo mi hanno dimostrato, confermando acquisizioni entrate nella pratica applicazione da tempo, che quando la sulla non trova nel terreno il microorganismo capace di produrre i tubercoli radicali, la pianta non cresce anche se vengono eseguite concimazioni in qualità e quantità le più acconce. Che la pratica dell'assullatura fornisca buoni risultati non è più il caso di discutere, ma che le colture microbiche di *Bacillus radicolica* specifico per la sulla rispondano egualmente e forse meglio, e presentino in confronto al trasporto di terra vantaggi notevoli, è un fatto anch'esso fuori discussione.

Esperienze condotte in Sardegna, con coltura microbiche da me allestite, da parte del Dott. Pinna hanno permesso di ottenere sviluppo rigoglioso di sullai in terreni ove da tempo era stata tentata, con esito totalmente negativo, la coltivazione della sulla.

La soja invece si comporta in maniera differente. Anche non trovando il microorganismo simbiote, ma in presenza di sufficienti quantità di azoto nel terreno, la soja riesce a svilupparsi, a crescere e a produrre anche bene. Questo fatto è stato da qualcuno considerato come un'utile prerogativa della soja, ma ritengo opportuno riportare quanto avvertiva Vivenza fin dal 1927: (37) « quando la soja cresce senza tubercoli essa non si comporta nei riguardi del bilancio della fertilità del terreno, come un'altra leguminosa, cioè come una cultura miglioratrice, si comporta invece come una pianta non leguminosa, cioè come coltura depauperante ». Faceva anche noto Vivenza, e tutti possono confermare la verità dell'asserto, che quando la soja vegeta senza presentare sulle radici i tubercoli si nota un impicciolimento sensibile della pianta e del seme.

Infine ci sono molte leguminose come medica e trifoglio che generalmente presentano scarso numero di tubercoli radicali. E' stato infatti da molti, e a quanto sembra con ottimi risultati, consigliata la concimazione azotata a medicai e trifogliai. Negli Stati Uniti d'America, in Germania ed anche in Francia si raccomanda vivamente l'inoculazione, con adatte colture, del seme di medica e di trifoglio, E' certo che l'osservazione costante della scarsità di tubercoli su piante di medica, specialmente se si prendono in considerazione prati di 2 o 3 anni, dovrebbe far pensare subito ai buoni risultati che si dovrebbero ottenere con l'inoculazione di adatte colture.

Indagini da me eseguite nel 1942 su medica e trifoglio, che hanno però bisogno di ulteriore conferma, sembrano dimostrare che l'inoculazione riesce molto utile in quanto si ottengono piante più sviluppate e con radici che presentano maggior numero di tubercoli.

Per la medica però vale quanto è stato detto per la soja, cioè, anche per essa, le simbiosi col *Bacillus radicicola* non è indispensabile. Pertanto se la medica non trova nel terreno il germe specifico, ma questo è fornito sufficientemente di composti azotati essa cresce e prospera bene. E' noto che molti autori sostengono essere dannosa l'azione di vari composti azotati e particolarmente dei nitrati sulla formazione dei tubercoli, Wilson (38), Hill (39), Strowd (40); e questo fatto è stato recentemente confermato, ed in maniera elegante dal Demolon e Dunez (41). Alla pari di quanto avviene nelle colture pure di *Bacillus radicicola*, ove piccole quantità di composti azotati ne influenzano favorevolmente lo sviluppo, mentre più forti quantità ne inibiscono completamente la crescita, è probabile che avvenga nel terreno dove forti quantità di principi azotati possono farsi risentire sfavorevolmente sulla produzione dei tubercoli.

Appare quindi quanto mai opportuna un'accurata ricerca rivolta a chiarire, per la medica ed altre leguminose foraggere, l'opportunità o meno dell'inoculazione coi relativi microbi specifici. Dette indagini non debbono essere limitate al laboratorio ma estese anche in pieno campo su vaste superfici di terreno onde possano stabilirsi dei confronti non soltanto da un punto di vista scientifico, ma anche da quello agronomico ed economico.

Dopo queste notizie vengo ad esporre alcuni risultati ottenuti da coltivatori di soja ai quali avevo inviato il materiale microbico e che hanno anche eseguito prove di confronto con sementa trattata e senza trattamento.

Dal Dott. P. Bonifacio di Ribera Agrigento.



Fig. 4. Piante di soja tolte da un campo sperimentale della Facoltà agraria di Perugia.  
Si osservi il grande numero di tubercoli radicali.

Le colture da voi inviate furono usate per alcune prove in piccolo. La siccità estrema non permise di avere raccolti notevoli però le piante inoculate si distinguevano per una maggiore vigoria, per un verde più intenso e per una maggiore produttività. I tubercoli radicali erano, nelle piante inoculate, visibilissimi.

Dalla Soc. An. Ledoga - Stabilimento di Darfo - mi viene riferito che in ogni caso abbiamo notato, pur senza aver tenuto distinto il raccolto,

che le parcelle da seme intriso nella coltura microbica hanno dato piante proporzionalmente più rigogliose.

Il Dr. Del Turco ha fatto eseguire diverse coltivazioni in Toscana, alcune riguardavano ettari di terreno. Al Dr. Del Turco avevo mandato nitragine allestite sia su agar, come su terreno liquido. Mi viene riferito che mentre le piante avute da seme trattato col materiale solido avevano radici che solo nel 50 % erano fornite di tubercoli, ma dove esistevano erano numerosissimi, le piante avute di seme trattato con nitragine liquide presentavano tutte i tubercoli radicali.

Il prof. Marcille della Scuola Agronomica di Madrid, mi riferisce che dell'uso delle mie colture microbiche ha ottenuto buon esito.

Il Sig. Mario Bersellini ha coltivato nel Bresciano 4 più a soja di cui 3 con seme trattato. Mi viene riferito che il risultato dell'uso della nitragine è riuscito evidente nel volume della massa totale raccolta, tre più con nitragine ed un più senza, proporzione del raccolto 4 a 1. Meno evidente si è dimostrato nella produzione del seme, ma attribuisco ciò alla non felice scelta del terreno di sperimentazione, eccessivamente ricco.

Il Sig. Bersellini non mi ha riferito sulla presenza o meno dei tubercoli ma che i tubercoli nelle coltivazioni con seme trattato si sono formati, e in misura copiosa, si deduce dal fatto della diversa produzione di grano ottenuta quest'anno negli appezzamenti dove venne coltivata la soja con e senza trattamento microbico. In occasione di un mio viaggio nel Bresciano ho visitato l'Azienda Bersellini a S. Gorgio Montichiari e quell'agente rurale mi ha con molto calore descritte le notevoli differenze notate.

Dal Conte di Frassineto mi venne riferito:

1) Non vi è stata sensibile differenza di vegetazione tra le culture da semi trattati e non trattati.

2) Nel mese di agosto le radici di piante provenienti da semi non trattati non avevano tubercoli, mentre le altre ne avevano in abbondanza pur essendovi tra queste alcune senza tubercoli. Mi riferisce anche che il terreno era buono e normalmente concimato all'impianto ma non in copertura. I migliori risultati sono stati ottenuti con le varietà Cayuga e Mandarin che hanno prodotto circa 18 Ql ad Ha. La produzione elevata mi dimostra che il terreno doveva essere abbastanza fertile e ben concimato e pertanto le differenze non potevano essere molto dimostrative.

Il Sig. M. Volpi della Tenuta di Pomarance (Pisa) mi riferisce: abbiamo seminato la soja più che altro per erbaio facendo la mescolanza con del granturco. Siccome in parte il seme è stato trattato abbiamo riscontrato molti tubercoli e buona vegetazione quello cioè che non è avvenuto per la soja che non aveva ricevuto il trattamento.

Il perito agrario G. Guidotti dell'Ispettorato di Ascoli Piceno mi fa noto: ai primi di agosto riscontrai che mentre le piante da seme trattato presentavano vegetazione rigogliosa, abbondante produzione di baccelli e numerosi e grossi tubercoli, in quelle provenienti da semi normali le foglie cominciavano ad ingiallire, ultimata era la fioritura, nelle radici non si riscontrò alcun tubercolo.

Dalla fattoria Vagnotti di Camucia (Arezzo) sono state fatte interessanti prove di coltivazione di soja con e senza trattamento e variando le

concimazioni. Mi basta qui accennare a qualche punto che mi è stato riferito. Lo sviluppo dei tubercoli nelle radici fu abbondante nelle piante derivate da seme trattato. Due parcelle concimate ugualmente con perfosfato, calcio-cianamide e solfato potassico hanno ricevuto l'una seme trattato, l'altra semi normali, hanno prodotto nel primo caso Ql 14 ad Ha. e nel secondo Ql 9,27. Il Prof. Pepeu Caporeparto all'I.S.M. «S. Belfanti» ha coltivato la soja da qualche anno ottenendo risultati scoraggianti. Mi viene riferito: quest'anno, ed io credo di doverlo attribuire al Bac. Radicicola, tutte le piante pur trovandosi in condizioni non favorevoli causa la densità, maturarono perfettamente e precocemente ed il raccolto mi diede un quintale alla perticav milanese, dunque circa 15 Q.li ad Ha.

Nella tenuta di Casalina sono state coltivate a soja 2000 mq. di terreno che sono stati divisi in due parcelle da 1000 mq. Venne eseguita una normale concimazione fosfatica, ogni parcella ricevette Kg. 4.500 di seme; unica differenza tra le due parcelle fu che una ricevette seme trattato con colture microbiche. Le differenze furono molto notevoli ed al raccolto si ebbe:

parcella da seme normale K.. 74;  
parcella da seme trattato Kg. 115.

Nel Lazio il Geom. G. Sensi ha coltivato soja dopo grano in terreno irriguo. Ha provato le mie colture ed un prodotto tedesco di nome Radicin. Peccato che il Sensi abbia fatto prove in terreni di diversa natura ed abbia destinato il terreno più scarto alla sementa senza trattamento. Ecco i risultati ottenuti:

coltivazione non trattata produzione ad Ha.	Q.li 2,49
coltivazione con nitragine tedesca	» 6,76
coltivazione con nitragine Castelli	» 6,90

Mi si avverte che in diverse fasi della vegetazione vennero estirpate diverse piante con il seguente risultato: dalla coltivazione con seme non trattato piante senza tubercoli, da quelle con seme trattato, con materiale tedesco o Castelli, piante con tubercoli più o meno abbondanti e grossi.

Dal Sensi ho avuto la fotografia n. 1 che mostra piante con numerosissimi tubercoli radicali e quella n. 2 che fa vedere l'enorme differenza di sviluppo tra due piante prelevate, l'una da appezzamento senza trattamento - assenza completa di tubercoli radicali - l'altra da appezzamento trattato.

Non è mancato qualcuno che mi ha riferito che dall'uso del materiale microbico non ha avuto piante con tubercoli.

Con molta probabilità ciò si spiega col fatto che il materiale non è stato mantenuto come si è raccomandato, o il seme è stato trattato qualche giorno prima di eseguire la semina, o forse dopo avere eseguito il trattamento è stato esposto lungamente al sole.

Mi piace chiudere i risultati ottenuti nel 1941 con quanto mi riferisce il Dott. Savelli. Direttore della Stazione di Chimica Agraria di Forlì. Il Dott. Savelli da qualche anno usa le mie colture con ottimi risultati. Mi scrive quanto segue: ho eseguito la prova su soja bleu come coltura interca-

lare dopo il raccolto del gramo. Il risultato è stato lusinghiero. Le piante da seme trattato con materiale microbico hanno assunto uno sviluppo vegetativo notevole rispetto a quelle da seme non trattato, fatto che per l'eccezionale siccità dell'intero periodo vegetativo, non cadde infatti una goccia di pioggia dalla semina al raccolto, si è tradotto in un notevole dislivello produttivo di seme.

Poichè la conservazione del materiale microbico è facile, e facile è l'imbrattamento del seme ritengo praticamente possibile oltre che utile, la diffusione in grande del trattamento del seme con culture microbiche.

\*\*\*

I risultati riferiti ed altri resi noti direttamente alla Direzione dell'Ancepo, alcuni miei scritti su giornali agrari ed economici, alcuni articoli dovuti a Mario Bernardi (42), M. Marinucci (43), e F. Cortesi (44), i quali hanno avuto parole di incoraggiamento e di lode per la mia attività, hanno reso possibile che nell'annata 1942 tutte le coltivazioni di soja eseguite dagli agricoltori che avevano ricevuto la sementa dalla Federconsorzi, fossero trattate col materiale microbico.

Alla pari di quanto si fa da qualche anno in Germania ove gli agricoltori che richiedono seme di soja ricevono con esso il materiale microbico e le relative istruzioni per l'uso, similmente è avvenuto in Italia.

Nel 1942 è stato inviato materiale microbico e le relative istruzioni per l'uso per circa 700 ettari coltivati a soja. A questa vasta sperimentazione in pieno campo i cui risultati verranno in parte riferiti si è unita anche una ricerca di laboratorio rivolta ad escogitare, per la preparazione e l'allestimento del materiale microbico, procedimenti più semplici, meno costosi, ed autarchici.

In laboratorio sono state condotte indagini in vasi ed in cassoni adoperando due diversi tipi di terreno e precisamente una terra compatta prelevata dall'orto agrario della Facoltà ed una terra di bosco prelevata in un castagneto a Casalina.

L'indagine aveva come è stato già accennato uno scopo del tutto particolare e cioè è stata condotta in considerazione delle attuali condizioni di emergenza. Sono note le difficoltà che si riscontrano per procurarsi della vetreria e d'altronde l'agar se lo si riesce a trovare ha un prezzo elevatissimo.

Ho creduto opportuno ricercare un substrato liquido ove il Bacillus radicolica specifico per la soja presentasse un buon sviluppo. Senza stare a riferire gli innumerevoli liquidi preparati e le numerosissime prove eseguite sono riuscito ad ottenere due substrati liquidi di economica preparazione e di facile sterilizzazione; essi vengono indicati con B e DT.

Alla stregua di alcuni materiali microbici preparati negli Stati Uniti d'America ed allestiti, secondo riferiscono le case produttrici, facendo assorbire una coltura molto ricca sviluppata su substrato liquido da uno speciale terriccio umifero, ho anch'io creduto opportuno far assorbire da una terra finissima quasi colloidale e da un terriccio di bosco il microbio specifico della soja sviluppato sui terreni B e DT.

La buona rispondenza di materiali preparati in questa maniera avrebbe rappresentato un fatto d'importanza particolare nell'attuale momento

perché avrebbe permesso di non usare vetreria. Purtroppo i risultati ottenuti con questi terricci microbici non sono stati lusinghieri essi si sono invece dimostrati meno rispondenti dei materiali allestiti su agar o su terreno liquido. Le prove hanno dato uguali risultati sia nella terra argillosa compatta come sulla terra di bosco.

Nella seguente tabella si riportano le prove eseguite nei cassoni, i vari segni + stanno ad indicare la presenza più o meno abbondante di tubercoli sulle radici.

I	terra assojata pura	+++
II	terra orto + 1/10 di terra assojata	+++
III	terra orto + 1/20 di terra assojata	+++
IV	terra orto + 200 grammi di terra assojata	++
V	terra orto + 50 grammi di terra assojata	++
VI	terra orto e semi imbrattati di terra assojata	+++
VII	terra orto e semi trattati con agar coltura	++++
VIII	terra orto e semi trattati con coltura in liquid B	+++++
IX	terra orto e semi trattati con coltura in liquid DT	+++++
X	terra orto e semi trattati con terriccio microbico	+
XI	terra orto (controllo) semi senza alcun trattamento	-

Dai dati della tabella si può dedurre che la soja seminata in terra assojata vegeta con radici fornite di abbondanti tubercoli. Mescolando a della terra comune varie quantità di terra assojata, il numero dei tubercoli radicali aumenta col crescere della quantità di terra assojata adoperata.

Se si dispone di piccole quantità di terra assojata è preferibile confettare il seme con essa prima di affidarlo al terreno. Allo scopo, come è stato riferito in lavori precedenti, si ottengono buoni risultati per l'imbrattamento, bagnando prima il seme e poi rotolandolo sulla terra assojata resa molto fine.

Il trattamento con colture microbiche allestite in substrato agarizzato ha dimostrato ancora una volta la perfetta rispondenza. Il numero dei tubercoli radicali che in tal maniera si ottiene è sensibilmente maggiore di quello che si nota su piante di soja sviluppate su terra assojata e dove per tre anni consecutivi si coltiva soja.

I materiali allestiti su substrato liquido, sia con il B come il DT. hanno corrisposto forse meglio della coltura allestita su agar. Le piante ottenute da semi trattati con colture liquide presentano l'apparato radicale ricchissimo di tubercoli. Per contro i risultati ottenuti dall'uso di terriccio microbico, terriccio colloidale imbevuto con coltura sviluppata su substrato liquido e successivamente essiccato a temperatura ambiente, sono stati poco lusinghieri. In quasi tutte le piante si notavano tubercoli radicali ma essi erano in numero molto scarso.

A conferma di quanto è stato osservato in precedenza i semi posti su terreno ove la soja non era stata mai coltivata, hanno dato luogo a piante con radici del tutto prive di tubercoli.

La foto n. 3 mostra in maniera evidente la differenza che si è osservata anche nello sviluppo delle piante, cassone I terra assojata, cassone VIII terra orto e semi trattati con liquido B, cassone XI terra orto e semi senza alcun trattamento.

\*\*\*

Nella Tenuta di Casalina sono stati coltivati sia in pianura come in collina 10 Ha. a soja. Tutta la semente è stata trattata con materiale microbico allestito su agar. La semente è stata fornita dalla Fedecconsorzi; si trattava di soja gialla da riportare alla varietà Mandarin. Il seme presentava anche qualche granello nero e di colore diverso. La semente possedeva una scarsa capacità germinativa che non superava il 50 %. La semina venne eseguita verso il 20 aprile su terreno preparato per le colture da rinnovo. La concimazione fu la letamica in qualche località vennero date piccole quantità di perfosfato. La semina fu fatta a righe con distanza di 75 cm. tra e 50 cm. nelle righe mettendo in ogni postarella 5-6 semi.

La scarsa capacità germinativa si fece sentire non poco sull'esito della coltivazione e fin dall'inizio della vegetazione si notarono varie fallanze e in alcune postarelle non si sviluppò nemmeno una pianta.

Come cure culturali due zappature ed una scerbatura non eseguita da tutti i coloni.

Il raccolto venne eseguito a mano e venne iniziato verso la fine di agosto. Le produzioni ottenute sono riunite nel seguente specchietto ove accanto al vocabolo del podere ed alla sua giacitura sono riportate le superfici seminate a soja, le quantità di seme usato e il prodotto ottenuto.

Vocabolo del podere	giacitura	Superficie mq.	Quantità di seme Kg.	Prodotto ottenuto Q.li
Cascina 3°	Collina	3.400	25	3,48
Cascina 4°	Collina	3.000	25	2,40
Canneto 3°	Pianura	4.500	26	6,18
Fratra 1°	Pianura	8.000	40	7,70
Cascina 6°	Collina	10.000	57	7,35
Fratra 4°	Pianura	2.700	15	1,90
Fratra 5°	Pianura	3.200	15	2,84
Valle 1°	Pianura	3.000	15	2,85
Belvedere	Collina	9.000	50	3,72
S. Benedetto	Collina	10.000	60	8,22
Pozzali 1°	Collina	2.000	10	1,81
Pozzali 2°	Collina	5.500	25	4,70
Pozzali 3°	Collina	4.000	25	3,00
Pozzali 4°	Collina	5.000	25	3,36
S. Apollinare	Collina	30.000	150	34,66

Le produzioni ottenute non appaiono troppo elevate e ciò si deve riportare ad una serie di fatti che si possono riassumere: a) eccessiva distanza tra e nelle righe, b) scarsa germinabilità della semente adoperata, c) mancanza di una sufficiente concimazione fosfatica.

La scarsissima produzione del podere Belvedere è attribuita alla ingrata natura del terreno ed al forte ristagno d'acqua. In ogni modo la produzione media di quasi 10 Q.li ad Ha. è risultata molto soddisfacente dal

punto di vista economico. La coltivazione della soja è ora ben vista dagli agricoltori dell'azienda e pertanto quest'anno la superficie verrà più che raddoppiata. E' molto probabile che per una maggiore conoscenza della pianta come per usare quale semente il prodotto dell'azienda, e quindi con normale potere germinativo, i risultati saranno nettamente migliori.

Nell'azienda Colle di Guardia (Acquaviva Picena) sono stati coltivati a soja circa 4 ettari di collina. In ogni appezzamento a scopo di controllo, una piccola quantità di seme non ricevette il trattamento micmbico. L'andamento delle colture fu abbastanza buono ed il prodotto ottenuto, circa Q.li 8 ad Ha., è risultato soddisfacente. Ho avuto modo di visitare sia in fine di luglio come in agosto le dette coltivazioni ed ho notato il buon risultato del trattamento microbico che si può riassumere in una presenza di abbondantissimi tubercoli radicali ed in un maggiore sviluppo e maggiore produzione delle piante da seme trattato in confronto alle non trattate.

La coltura della soja ha favorevolmente impressionato sia il proprietario che il tecnico dell'azienda di Colle di Guardia e nella prossima primavera la superficie destinata a soja verrà triplicata.

Altre coltivazioni che ho avuto modo di visitare e dove sono stati ottenuti risultati molto buoni è quella di S. Venanzo in comune di Castignano (Ascoli Piceno). Su due appezzamenti in collina è stata coltivata soja su poco più di 1000 mq. adoperando due diverse varietà e precisamente la Mandarin e la Manciu. Il seme fu tutto trattato con materiale microbico. Lo sviluppo fu, malgrado la siccità, rigoglioso e notevole la produzione. Da poco più di 1000 mq. si ottennero 190 Kg. di seme. Estirpate alcune piantine dai due appezzamenti si notarono radici cariche di tubercoli radicali.

Quest'anno nell'azienda di S. Venanzo la soja verrà coltivata su superficie abbastanza estesa.

Il Dr. A. Arcangeli ha eseguito prove sperimentali di coltivazioni di soja su parcelle da 500 mq. ciascuna. Due delle parcelle riceverono semi trattati. Le parcelle non trattate hanno dato una produzione di Q.li 1,80 per Ha. quelle trattate di Q.li 3,80. Riporto integralmente quello che mi ha riferito il Dr. Arcangeli: Le prove sono state eseguite su terreno molto poco fertile, fortemente argilloso ed hanno subito le vicende di una stagione eccezionalmente avversa per eccessiva, prolungata ed ostinata siccità durante tutto il ciclo vegetativo. Benchè il raccolto sia stato scarsissimo a causa della siccità purtuttavia è innegabile l'enorme importanza del trattamento fisiologico che ha fatto più che raddoppiare il raccolto. Le piante non trattate non hanno mostrato formazione di tubercoli, quelle trattate invece hanno presentato numerosissimi tubercoli radicali che talvolta hanno raggiunto la grandezza di una nocciola.

Nella tenuta di Spante (Terni) di proprietà dei Conti Faina-Majo prossima al passo della Peglia a circa 700 metri di altitudine è stata coltivata soja su superficie abbastanza estesa di terreno. La sementa venne tutta trattata con materiale microbico. Mi è stata inviata una esauriente relazione sull'andamento delle coltivazioni. Per ciò che mi interessa direttamente riporto; i tubercoli sulle radici furono ben visibili ed abbondanti.

Il Dr. A. Sirri ha condotto piccole prove con quattro varietà di soja, Cayuga, Piave, Milano, ed Habaro. Ha allestito prove di confronto con seme

trattato ottenendo risultati vistosissimi e naturalmente a tutto vantaggio delle parcelle che riceveranno semi trattati.

Non mi dilungo sugli esperimenti condotti dal Sirri perchè essi, come mi è stato scritto compariranno sul Giornale di Agricoltura, voglio soltanto riportare la tabellina dei risultati:

varietà	Parcelle non trattate prodotto per Ha.	Parcelle trattate prodotto per Ha.
Cayuga	16,60	22,80
Piave	22,80	29,80
Milano	26,30	41,21
Habaro	27,20	42,10

Il Dr. Martignoni di Genova coltiva da più anni estese superfici a soja, nel 1942 ha trattato con materiale microbico il seme necessario per un ettaro. Ho avuto modo di visitare l'azienda Agraria del Martignoni a Novi Ligure. Il Martignoni mi riferisce che le piante provenienti da seme trattato presentavano generalmente i tubercoli radicali, che si è convinto dell'utilità del trattamento microbico e che negli anni venturi praticherà il trattamento a tutto il seme di soja.

Il Conte di Frassineto ha eseguito prove su 52 varietà di soja, mi riferisce che non ha riscontrato una marcata differenza tra le piante di soja provenienti da semi trattati e non trattati. In quelle provenienti da semi trattati vi era forse un maggior numero di tubercoli radicali. I terreni dove sono stati condotti gli esperimenti del Conte di Frassineto erano abbastanza fertili; la varietà Cayuga che si è dimostrata una delle più produttive ha fornito 14 Q.li ad Ha.

Il Consorzio Agricolo Seme Bietole Indigeno di Rovigo ha eseguito molte e vaste coltivazioni di soja, il laboratorio ha inviato ad esso materiale microbico su substrato solido e liquido per 40 Ha. Mi si riferisce che dall'uso delle colture, secondo le istruzioni ricevute, soltanto il 10 % delle piante presentavano i desiderati noduli. Ma mi si dice che ciò è dipeso dal fatto della scarsa adesione del liquido ai semi di soja che sono lisci. Il materiale microbico da me inviato è stato anche fatto assorbire da della terra e dopo 6-7 giorni con tale terra, opportunamente messa in acqua, è stata imbrattata la sementa in tali condizioni la formazione dei tubercoli si ottenne su circa il 95 % delle piante.

Quanto mi è stato comunicato mi sembra in parte strano, è probabile che la cultura su mezzo liquido possa aderire poco, ma ciò non può avvenire per il disgregato dell'agarcultura che riesce fortemente collosa. Mi si comunica anche che la resa, in notevoli parcelle di confronto, fu, per seme non batterizzato di Kg. 44, e per la stessa estensione, stessa natura del terreno, identici trattamenti, fu di Kg. 46,9 per seme batterizzato con diluizioni vostre colture, mentre arrivò a Kg. 54,5 coi semi batterizzati con la terra trattata come sopra. Queste indagini su estese superficie di terreno dimostrano chiaramente, in quelle date condizioni di esperimento, che il rendimento

della soja è maggiore per quanto più forte è il numero dei tubercoli sulle radici.

Il Prof. E. Baldacci del Laboratorio Crittogamico di Pavia ha fatto delle prove su quattro varietà di soja. Mi viene riferito che l'attecchimento del microorganismo è stato assoluto per tutte le piante che all'estirpazione si sono mostrate ben cariche di noduli batterici.

Desidero chiudere questa enumerazione con quanto mi riferisce il Prof. E. Parisi dell'Istituto di Industrie Agrarie di Milano al quale avevo inviato materiale microbico per due quintali di seme di soja. Della lettera riporto quello che può interessare: ho sperimentato su larga scala le vostre colture con risultati brillanti nei terreni poveri e con risultati meno appariscenti nei terreni fertili. In ogni caso le radici delle piante si coprono di tubercoli che poi arricchiscono il terreno di azoto.

\*\*\*

Le numerose indagini eseguite nel 1941 e 1942 sia in laboratorio come in piccoli appezzamenti e maggiormente su vaste estensioni di terreno dimostrano la grande utilità del trattamento microbico. Se in qualche caso, per non aver bene seguito le istruzioni per l'uso, del resto semplicissime, non è stato ottenuto buon risultato di ciò non si può far colpa a chi ha preparato il materiale microbico. Per quanto semplici possano essere le istruzioni per l'uso, l'agricoltore non deve dimenticare l'estrema delicatezza del materiale microbico. Viene raccomandato che le bottiglie fino al momento dell'uso vengano tenute riparate specialmente dalla luce solare, che la semina venga eseguita poco dopo il trattamento microbico e che la semente trattata non deve rimanere esposta al sole. Se non si ha cura di operare un'accurata disgregazione del materiale agarizzato e se la sospensione microbica ottenuta non viene accuratamente sparsa e mescolata alla semente, onde tutti i semi abbiano ad esserne bagnati, è logico che i risultati non possono essere buoni.

La distribuzione del materiale microbico a mezzo dei Consorzi Agrari ha dato luogo ad alcune manchevolezze che è sperabile non abbiano a ripetersi.

Prima di chiudere questo lavoro non posso non ricordare la sperimentazione utilissima, specialmente a riguardo delle varietà che vanno conducendo vari studiosi italiani e specialmente il Prof. E. Parisi:

Definite le esigenze e le caratteristiche delle varietà potranno darsi utili consigli agli agricoltori a riguardo della coltivazione della soja e cioè sia dell'epoca di semina come della quantità di seme da affidare per ogni ettaro coltivato, alla distanza tra e nelle righe, alle norme culturali, ecc.

In Italia non sono mancate serie ricerche sulla soja ed è doveroso in proposito ricordare i nomi di Mattei (45) Bottari (46) Vivenza (47), Pantanelli (48) ed altri.

Le ragioni per le quali la coltivazione della soja non si è ancora diffusa in Italia sono molteplici.

Innanzitutto l'opera deleteria di sperimentatori poco accurati i quali hanno agito spesso affidando al terreno un pugno di soja prelevato in una stiva di un piroscavo proveniente dall'estremo oriente ove molto facilmente

a varietà da foraggio erano mescolate varietà da granella e varietà precocissime a varietà tardive. Non bisogna dimenticare che le nostre coltivazioni di soja, meno che in casi del tutto sporadici, hanno vegetato in assenza completa di tubercoli e questo fatto porta ad una diminuzione sensibile del prodotto come ha osservato da tempo Vivenza e dimostrato Pantanelli.

Non ultimo tra i fattori che hanno impedito il diffondersi delle coltivazioni di soja in Italia va ricercato nel bassissimo e non remunerativo prezzo del prodotto. Qualche anno fa quando un quintale di grano si poteva acquistare a 120 lire ed un quintale di granoturco a 90 lire per un quintale di soja non venivano offerte 90 lire. Era logico che, a queste condizioni, gli agricoltori non potevano economicamente coltivare soja.

Ma venuta a mancare la soja dall'estremo oriente l'Europa richiede questo seme per l'alimentazione dell'uomo e degli animali e per i più vari usi industriali. La Germania sta coltivando estese superfici a soja, anche in Ungheria, Romania, e Bulgaria le superfici destinate a soja sono molto vaste. Nella Croazia, nella Spagna, nella Svizzera, e in Francia la coltivazione della soja si va estendendo (49). Come e quando la soja si è diffusa o si vada diffondendo rapidamente negli Stati Uniti d'America mi basta citare un esempio: nello Stato dell'Illinois attualmente la superficie destinata a soja è più grande di quella di tutte le altre leguminose sommate assieme (50).

E in Italia? Da qualche anno anche in Italia c'è un certo risveglio e sono lieto che a ciò possa aver contribuito anche il mio modesto lavoro. In molte zone d'Italia la coltivazione della soja è oggi utilissima dal punto di vista tecnico e conveniente da quello economico. La soja allorchè vegeta con tubercoli non solo produce di più ma è pianta fortemente miglioratrice in quanto induce quantità notevoli di azoto nel terreno. La soja è pianta che necessita di poco lavoro e quanto sia importante questo fatto, specie nel momento attuale, è facile ad immaginare.

Attualmente l'agricoltore può trovare delle partite di soja sufficientemente pure, ha modo di eseguire con poca spesa il facile trattamento microbico della semente, può avere tutta una serie di consigli a riguardo del seme che affida al terreno. L'agricoltore non deve dimenticare che molte varietà di soja hanno una spiccata resistenza alla siccità e pertanto in molti terreni, e particolarmente in quelli di collina e relativamente siccitosi, la soja può utilmente sostituire il granoturco o altre leguminose da granella.

È molto probabile che non solamente nell'attuale periodo bellico ma anche per un certo, e forse lungo periodo dopo la guerra vittoriosa, vi sia in Europa ed in Italia una forte richiesta di soja per alimentazione e per le industrie.

#### RIASSUNTO

Viene riferita una vasta indagine condotta sia in laboratorio come in pieno campo su estese superfici di terreno a proposito del trattamento microbico della semente di soja con adatte colture tubercoligene.

Viene dimostrata la grande utilità di tale trattamento che si può riassumere in una maggiore produzione di seme e nell'induzione di notevoli quantità di azoto nel terreno.

Accennate le varie cause che hanno finora ostacolato la coltivazione della soja in Italia si mostra l'importanza che detta coltivazione ha, non solo nell'attuale momento, specialmente nei terreni di collina e relativamente siccitosi.

### ZUSAMMENFASSUNG

Verf. berichtet über ausgedehnte Versuche, teils im Laboratorium teils im freien Felde auf weiten Flächen Erdboden, welche in Bezug auf die mikrobielle Behandlung der Sojabohnen mit passenden Knöllchenkulturen ausgeführt worden sind.

Es wird der grosse Vorteil dieser Behandlung hervorgehoben, welcher folgender Weise zusammengefasst werden kann: reichlichere Samenerzeugung und Induktion bemerkenswerter Mengen Stickstoff im Erdboden.

Die verschiedenen Gründe welche die Sojabebauung in Italien bis jetzt gehindert haben, werden besprochen und es wird die Bedeutung nachgewiesen, welche diese Bebauung (nicht nur in der jetzigen Zeit), besonders für die hügelichen und mässig dünnen Erdböden haben kann.

### BIBLIOGRAFIA

- (1) *Castelli* - Ricerche sulla preparazione e l'impiego delle nitragine. - Nuovi Annali dell'Agricoltura 1938.
- (2) *Castelli* - Ricerche sull'assojatura del terreno. Italia Agricola, A. 76, n. 1, 1939.
- (3) *Castelli* - Ancora sull'assojatura del terreno. - Vol. Giubil. Prof. O. Polimanti 1939.
- (4) *Castelli* - Ulteriori ricerche sulla produzione dei tubercoli radicali della soja. - Italia Agricola, A. 77, n. 4. 1940.
- (5) *Castelli* - Considerazioni sulla coltivazione della soja. - Annali di Microbiologia, A. 1, Fasc. 4, 1941.
- (6) *Hellriegel* - Welche Sticstoffquellen der Pflanze su Gebote? - Ta geblatt der 59 Deutsch Naturforsch. u Aertze Berlin 1886.
- (7) *Hellriegel e Willfarth* - Untersuchungen über Sticstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. - Zeit des Vereins der Deutsch. Zucherind. 1888.
- (8) *Bejerinck* - Die Bakterien der Papillionaceenknöllchen Botan. Zeit. 1888.
- (9) *Nobbe e Hiltner* - Die Bondenimpfung für Leguminosen mit reikultivierten Bacterien. - Farbiwwerke. vorm Meister Lucius und Bruning in Hochst. 1897.
- (10) *Harrison e Barlow* - Legume bacteria seed inoculation by Canada farmens in 1906-1907. - Ontario Depart. of Agricult. Toronto Bull. 164. 1908.
- (11) *Moore* - Soil inoculation for legume. - Washington. 1905.
- (12) *Bottomley* - Seed and soil inoculation for legume - London 1907.

- (13) *De Rossi* - Sui microrganismi produttori dei tubercoli radicali delle leguminose. - Ann. d'Igiene Sperim. Vol. XVI. 1906.
- (14) *De Rossi* - Studi sul microrganismo produttore dei tubercoli delle leguminose. Nota 1. Ann. di Botanica, Vol. VII, n. 4, 1909.
- (15) *De Rossi* - Studi sul microrganismo produttore dei tubercoli delle leguminose. Nota 2. - Ann. di Botanica, Vol. VII, n. 4, 1909.
- (16) *De Rossi* - Microbiologia Agraria e Tecnica. U.T.E.T.- Torino 1927. (17) *Omeliansky* - Monograf. Russ/ Acad. Scien. Petrograd, 1923.
- (18) *Müller e Stapp*. - Arb. Biol. Reichsanst. - Mand. u. Forstw. 1925 (XIV).
- (19) *De Rossi* - I microbi del terreno e la fissazione dell'azoto atmosferico. - Atti IV Congr. Nazion. di Microbiologia, 1932.
- (20) *Hiltner e Stormer* - Arb. aus. d. Biolog. Abdt. f. Land. u. Forstw. a. k. Gesund Leitsamte. 1903 (III).
- (21) *Frank* - Landwirtsch Jahrb. 1890 (XIX).
- (22) *Kirchner* - Cohn's Beitrag zur Biologie der Pflanzen 1895 (VII).
- (23) *Löhnis e Hansen* - Journal Agricult. Research. 1921 (XX).
- (24) *Sunk* - Notes on the Flagellation of the Nodule Bacteria of Leguminose - Journal of Bacteriology, Vol. VI., n. 1, 1921.
- (25) *Wilson* - Cornell Agricultural Exp. Station Bull. 3 8, 1917.
- (26) *Eckhardt-Baldwin e Fred* - Studies on the Root-Nodule Organism of Lupinus. - Journal of Bacteriology, Vol. XXI, n. 4, 1931.
- (27) *Bergey* - Manual of Determinative Bacteriology - V edizione. William and Wilkins Company - Baltimora, 1939.
- (28) *Hansen e Tanner* - The nodule bacteria of the leguminose With special reference to the mechanism of inoculation. - Cent. f. Bakt. 2 Abt. LXXXI, 1931.
- (29) *Sears e Carrol* - Cross inoculation with Cowpea and Soybeans Nodule Bacteria. - Soil Science, Vol. XIV, 1927.
- (30) *Wright* - The Nodule Bacteria of Soybeans: Bacteriology of Strains, Soil Science, Vol. XX, 1925.
- (31) *Perotti* - Il problema dell'azoto - Boll. Soc. degli Agricoltori Italiani. 1909.
- (32) *Rossi* - L'inoculazione del terreno agrario con culture microbiche. - Annali di Tecnica Agraria. Anno 1, n. 3, 1929.
- (33) *Verona* - Attivazione fisiologica od inoculazione di microorganismi attivi nel terreno coltivabile. - Italia Agricola, Anno 68, n. 4, 1931.
- (34) *Fred-Whiting-Hastings* - Univ. of Wiscosin Agricult. Exp. Stat. Res. Bull. 72, 1926.
- (35) *Thornton* - Journal of Agricult. Science (XIX) 1929.
- (36) *Nolte e Munzberg* - Mitt. d. Dtsch. Landw. Gesellsch. 1930.
- (37) *Vivenza* - La coltivazione della soja in Italia e nelle sue colonie. - Atti Soc. Ital. Congresso Scienze, 1927.

- (38) *Wilson* - New York Cornell Agricolt. Exp. Stat. Bull. 386, 1917.
- (39) *Hill* - Journal Agricult. R'esearch. (XII), 1918.
- (40) *Strowd*. - The Relation of Nitrate to Nodule production. Soil. Science Vol. 10, 1920.
- (41) *Demolon e Dunez* - Ricerche sulla coltura delle leguminose - Annales Agronomiques, Vol. IV, Fasc. 3, 1940.
- (42) *Bernardi* - La soja leguminosa di attualità - La soja pianta di attualità - Boll. Dell'Agricoltura, anno 76, n. 2-17, 1942.
- (43) *Marinucci* - Le piante oleaginose per le necessità nazionali. - Giornale di agricoltura, Anno 51, n. 34, 1941.
- (44) *Cortesi* - Una pianta miracolosa: la soja- Sapere, 15 gennaio 1942.
- (45) *Mattei* - La soja ed i suoi prodotti - Boll. R. Giardino Coloniale di Palermo, Vol. V, 1919.
- (46) *Bottari* - La soja - Lattes e C., Editori, Torino, 1923.
- (47) *Vivenza* - Opera citata.
- (48) *Pantanelli* - Le nostre esperienze sulla soja - Stazione Agraria di Bari, 1935.
- (49) La soja à travers le monde - Revue Internationale du soja, Vol. 2, n. 13. 1942.
- (50) La soja. Effetto della coltura della soja sulla produttività del terreno. - Recensione in: Concimi e Concimazioni, Vol. VII, n. VI, 1942.
-

# **Sul fenomeno di autoimpedimento fermentativo e sulle cause atte a rimuoverlo. Osservazioni su *Pseudosaccharomyces apiculatus***

**Claudio Antoniani**

(Ricevuto il 3 Aprile 1943 - XXI)

Ho indicato col nome di *autoimpedimento fermentativo* (1) l'interessante e tutt'ora inspiegato fenomeno per effetto del quale l'attività fermentativa di alcuni lieviti alcolici, dopo essersi iniziata con tutti i caratteri di una fermentazione normale, si arresta precocemente, malgrado cioè la persistente presenza di zucchero fermentescibile. Il fatto del pronto e normale inizio della fermentazione dimostra che il fattore ostacolante non preesiste nel mosto, ma che è nel corso e per effetto della fermentazione stessa che questo fattore si genera: la designazione di *autoimpedimento* è quindi pienamente giustificata. Quali le cause del fenomeno?

Tra i lieviti alcolici per cui si verifica l'autoimpedimento figura lo *Pseudosacch. apiculatus*. Il De Rossi (2) ritiene che il precoce arresto della fermentazione di questo lievito dipenda dall'azione che su di esso esercitano i prodotti del suo ricambio materiale. L'alcol e lo stesso acido carbonico ostacolano fortemente la moltiplicazione di *Pseudosacch. apiculatus*, esso produce inoltre, come è noto, quantità notevoli di acidi volatili; nel formarsi e nel relativo accumulo di questi prodotti risiederebbe perciò la causa dell'estinguersi precoce della fermentazione. Questo concetto ha però subito nel tempo una restrizione, tanto che nel campo tecnico è convinzione diffusa che l'alcol etilico sia il principale fattore limitante della fermentazione del lievito apiculato, basata, questa convinzione, sul fatto che nella fermentazione vinaria lo *Pseudosacch. apiculatus* inizia praticamente da solo la fermentazione, mentre trascorsi i primi stadi, quando il tenore alcolico raggiunge o di poco supera il 4 - 4,5 %, la sua attività si arresta per essere rimpiazzata da quella dei tipici saccaromiceti.

L'ammettere che l'alcol etilico, per il fatto di un suo modesto accumulo nella misura del 4-5% in volume, possa essere la causa dell'arresto della fermentazione di un lievito alcolico, non è, dal punto di vista enzimologico, cosa di poco momento. Essa equivale infatti, in sostanza, a dire che nello *Pseudosacch. apiculatus* esiste un sistema zimasiaco costituzionalmente diverso da quello dei tipici saccaromiceti; possibilità, questa, che non vo-

gliamo nè possiamo escludere, dato che non è dimostrato che il tipo di sistema zimastico del *Sacch. cerevisiae* (l'unico sino ad ora completamente indagato) abbia valore di sistema zimastico universale, ma che prima di essere accettata con tutte le sue prevedibili conseguenze di carattere enzimologico generale, esige ben più larga documentazione. Valeva quindi la pena di prendere in esame il fenomeno di autoimpedimento fermentativo dello *Pseudosacch. apiculatus* da un punto di vista più strettamente chimico-enzimologico di quanto non fosse stato fatto sino ad ora. Ed ecco un primo gruppo di risultati della sperimentazione, intrapresa.

Se la fermentazione dello *Pseudosacch. apiculatus* anzichè su mosto d'uva naturale, e quindi acido, (pH 3-3,5) si fa svolgere su mosto leggermente alcalinizzato mediante aggiunta di un eccesso di  $\text{CaCO}_3$ , la quantità di alcol che può essere prodotta da questo lievito aumenta considerevolmente. Operando su mosto col 18 % circa di zucchero si può giungere ad un tenore in alcol del 9 % in volume; mentre sullo stesso mosto non addizionato di  $\text{CaO}_3$  il tenore in alcol è appena del 6,4 %. L'aggiunta di  $\text{CaO}_3$  è quindi in grado di *sbloccare parzialmente la fermentazione dall'autoimpedimento che normalmente la limita*. Ma questo non è tutto. Contemporaneamente all'aumento della quantità di zucchero fermentato e della quantità di alcol prodotto si nota altresì un innalzamento del rendimento fermentativo. Mentre infatti nella fermentazione sul mosto naturale, acido, la resa in alcol rispetto allo zucchero fermentato è sempre nettamente inferiore al teorico, nella fermentazione in presenza di  $\text{CaCO}_3$  essa aumenta, raggiungendo praticamente il valore che si calcola in base alla equazione classica della fermentazione.

Nelle condizioni suddette lo sbloccamento fermentativo è soltanto parziale. Circa 2/3 soltanto dello zucchero presente nel mosto vengono fermentati. Se però anzichè su mosto semplicemente addizionato di  $\text{CaCO}_3$  la fermentazione si fa decorrere su mosto il quale sia prima neutralizzato con KOH e poi addizionato di un eccesso di  $\text{CaCO}_3$  (col quale trattamento si raggiunge lo scopo di tamponare meglio la reazione debolmente alcalina del mosto stesso) lo sbloccamento fermentativo diventa pressochè totale. Operando su mosto col 21,45 % di zucchero fermentescibile si ottiene la fermentazione di g. 20,55 di zucchero e un tenore alcolico del 10 % in volume. Contemporaneamente, cioè, il rendimento si riabbassa rispetto al teorico.

Queste due constatazioni sperimentali sono oltremodo interessanti. Risulta da esse come lo *Pseudosacch. apiculatus* possa, in opportune condizioni di substrato, produrre quantità di alcol assai cospicue, che giungono almeno sino al 10 % in volume. Dal che scaturiscono due importanti conseguenze: la prima che contrariamente a quanto generalmente si crede, l'alcol non è tra i fattori limitanti della fermentazione di questo lievito apiculato; la seconda che il precoce arresto della fermentazione non può essere imputato alla presenza nello *Pseudosacch. apiculatus* di un sistema zimastico incompleto o comunque diverso da quello dei tipici saccaromiceti.

Il fatto che in mosto acido la fermentazione si arresti a un certo stadio, mentre in presenza di  $\text{CaCO}_3$  essa va considerevolmente oltre, potrebbe far pensare all'intervento di un'azione neutralizzante, o fors'anche precipi-

tante, esercitantesi su qualche prodotto acido della fermentazione, prodotto che sarebbe pertanto la causa dell'autoimpedimento. Ma è evidente la insufficienza di questa interpretazione. Perché mai, infatti, lo sbloccamento è allora soltanto parziale? Perché l'allontanamento o la neutralizzazione del prodotto o dei prodotti acidi impedenti, non raggiunge l'effetto di sciogliere per intero dal suo vincolo l'azione fermentativa? Dei due casi, l'uno: o questi prodotti di natura acida non sono i soli fattori dell'impedimento, oppure le cause di questo vanno per interno cercate altrove.

Ma vediamo come vanno le cose sul mosto neutralizzato dapprima con KOH e poi addizionato di un eccesso di  $\text{CaCO}_3$ . La fermentazione, come s'è detto, va in queste condizioni assai oltre che non in presenza di solo  $\text{CaCO}_3$ . Ma che cosa c'è di mutato nell'una rispetto all'altra di queste due condizioni di fermentazione?

Sia nell'una che nell'altra l'azione neutralizzante o precipitante attribuibile al  $\text{CaCO}_3$  è in grado di esplicarsi, non è quindi in quest'azione che è da ricercarsi il fattore differenziante, questo non può che risiedere *nel valore della concentrazione idrogenionica*. Mentre infatti in presenza di solo  $\text{CaCO}_3$  il pH del substrato è scarsamente stabilizzato così che per effetto dell'acidità di fermentazione (acido carbonico compreso) esso si abbassa considerevolmente, nel mosto addizionato di  $\text{CaCO}_3$  previa neutralizzazione, il tamponamento essendo assai più efficace, questa discesa del pH non si verifica che in più ristretti limiti. E' quindi il fattore pH del substrato che entra in giuoco quale determinante dell'impedimento e, rispettivamente, dello sbloccamento fermentativo. Ma è evidente che il pH non può entrare in giuoco come fattore diretto; che cioè la causa del precoce arresto della fermentazione dello *Pseudosacch. apiculatus* non può risiedere in un valore critico della concentrazione in joni H del substrato. Se così fosse, come spiegare che nel mosto naturale (pH = 3 : 3,5) la fermentazione si inizia normalmente? Il pH agisce evidentemente come fattore indiretto; cioè come determinante di particolari indirizzi di fermentazione dello *Pseudosacch. apiculatus*. Secondo quale meccanismo?

Si potrebbe pensare che nel mosto naturale (acido) il processo di fermentazione alcolica dello *Pseudosacch. apiculatus* segua un indirizzo diverso da quello normale; che esso proceda cioè, ad esempio, attraverso un chimismo intermedio differente da quello che è proprio della fermentazione alcolica dei tipici saccaromiceti. In altri termini che la fermentazione dello *Pseudosacch. apiculatus* in mosto d'uva naturale sia una *fermentazione deviata* a indirizzo ossidativo che in quanto tale essa porti al graduale accumulo di qualche prodotto di natura acida, che a un certo punto blocca l'ulteriore avanzamento della fermentazione. Questa supposizione non ci sembra però fondata. Il sistema zimasi dei lieviti alcolici agisce, come è noto, con fisionomia normale su substrato acido, ed è con l'alcalinizzazione che si ottiene il deviazione verso quel tipo di fermentazione ossidativa che è la terza fermentazione di Neuberg. Saremmo qui per la prima volta di fronte a un caso di deviazione ossidativa della fermentazione alcolica in ambiente acido e pel solo fatto di un valore abnormemente elevato della concentrazione in joni H. Ammissione piuttosto azzardata e che tra l'altro implicherebbe sempre la conclusione che nello *Pseudosacch. apiculatus* sia

presente un sistema zimatico diverso da quello paradigmatico del *Sacch. cerevisiae*.

L'influenza della concentrazione in joni H sull'orientamento fermentativo dello *Pseudosacch. apiculatus* deve essere altrimenti intesa. Se partiamo dal fatto, da tempo sperimentalmente accertato, che lo *Pseudosacch. apiculatus* è particolarmente sensibile all'azione degli acidi, e che esso gode altresì della facoltà di attaccare e demolire gli acidi organici del mosto d'uv, facoltà questa che può appunto fisiologicamente intendersi come un meccanismo di difesa dall'acidità eccessiva, è logico ammettere che nel mosto d'uva naturale (acido) lo *Pseudosacch. apiculatus* dia luogo a due distinti processi di fermentazione: l'uno dovuto al suo normale sistema zimatico e che porta alla fermentazione alcolica dello zimozucchero, l'altro di carattere ossidativo e dovuto ad altre attività enzimatiche, gravante solo in piccola parte sullo zucchero (\*) ed essenzialmente sugli acidi organici del mosto. Questo secondo processo rappresenta per il lievito apiculato una difesa contro l'acidità eccessiva del mosto e il suo manifestarsi non ha nulla a che vedere con l'attività zimastica; esso è però tale da interferire, coi suoi prodotti, sull'andamento del processo di fermentazione alcolica. E' ad esso che si deve la formazione del prodotto, o dei prodotti, che a un certo punto determinano l'arresto dell'attività zimastica. La fermentazione alcolica dello *Pseudosacch. apiculatus* non si arresta precocemente perchè uno dei suoi prodotti accessori finali o intermedi la blocca lungo il suo decorso, ma si arresta perchè bloccata dal prodotto o dai prodotti di un altro processo fermentativo che si svolge collateralmente ad essa.

Nel mosto addizionato di  $\text{CaCO}_3$ , il processo fermentativo collaterale non ha più luogo, in quanto non più fisiologicamente necessario, oppure si svolge più lento, o forse anche secondo un diverso indirizzo; se ne ha, comunque, come conseguenza, che l'attività zimastica non è più ostacolata, e che lo zucchero fermenta in maggior copia mentre si accresce anche il rendimento fermentativo. Ciò avviene però soltanto sino a che persista un certo grado di alcalinità; poichè non appena l'acidità di fermentazione è tale da riabbassare il pH oltre un certo limite, il processo fermentativo collaterale riprende e il fenomeno di impedimento della fermentazione alcolica si rimanifesta. Si spiega con ciò come in presenza di  $\text{CaCO}_3$  lo sbloccamento sia soltanto parziale.

Nel mosto neutralizzato con KOH e successivamente addizionato di  $\text{CaCO}_3$ , il tamponamento è più energico, l'acidità di fermentazione non riesce che verso gli ultimi stadi fermentativi a riabbassare il pH al disotto del limite critico e in conseguenza di ciò lo sbloccamento fermentativo è pressochè totale. Il fatto che in queste condizioni il rendimento della fermentazione alcolica sia molto inferiore al teorico trova la sua evidente spiegazione in un parziale intervento della terza forma di fermentazione di Neuberg, in relazione all'alcalinità del substrato.

---

(\*) Che questo processo ossidativo collaterale oltre che sugli acidi organici del mosto gravi sullo zucchero è in accordo col fatto del minor rendimento in alcol che in queste condizioni si osserva.

I fatti da me osservati sino ad ora nei riguardi del fenomeno di auto-impedimento fermentativo dello *Pseudosacch. apiculatus* si lasciano logicamente inquadrare nella interpretazione di cui sopra. L'indagine ulteriore, già in corso, dimostrerà sino a che punto essa si accordi col complesso di manifestazioni che costellano il fenomeno principale. Sin da ora resta ad ogni modo accertato che l'alcol etilico non è tra i fattori limitanti dell'attività fermentativa dello *Pseudosacch. apiculatus*. Costatazione, questa, di assai notevole significato sia perchè dimostra infondata un'opinione diffusa e che teoricamente avrebbe dovuto portare al sovvertimento di molti radicati concetti di zimologia, sia perchè riapre, dal punto di vista zimotecnico, il problema dei limiti entro cui racchiudere la cooperazione fermentativa dello *Pseudosacch. apiculatus* nella fermentazione abituale del mosto d'uva. Dimostrato, come ora è dimostrato, che l'alcol non è di per sè fattore inibente dell'attività fermentativa di questo lievito, non si può escludere che, in associazione con altri lieviti capaci di rimuovere il fattore o i fattori di impedimento, esso possa mantenersi attivo anche sino agli ultimi stadi della fermentazione.

## ESPERIENZE E RISULTATI

Le esperienze vennero in parte compiute su mosto d'uva bianca contenente il 17,90 % di zucchero, espresso come invertito, e con una acidità totale, espressa come acido tartarico, pari al 9,25 per mille; in parte su mosto a maggior tenore in zucchero (21,45 %) ottenuto per concentrazione del primo.

In tutte le esperienze la fermentazione si svolse a 20°C.

Ciascun gruppo di risultati (zucchero-alcol) si riferisce a esperienze singole condotte in beute della capacità di circa 300 cc. contenenti ciascuna cc. 150 di mosto sterile che veniva successivamente seminato con un'ansata di lievito (\*). A tempi diversi dall'inizio della fermentazione una delle prove veniva interrotta per l'analisi eseguita, quest'ultima, secondo i metodi consueti: zucchero col Fehling, alcol per distillazione. Il carbonato di calcio veniva sterilizzato sia prima che dopo l'aggiunta al mosto.

## RIASSUNTO

Si dimostra che il precoce arresto della fermentazione dello *Pseudosaccharomyces apiculatus* (fenomeno che viene definito come *autoimpedimento fermentativo*) non è direttamente imputabile all'azione paralizzante o depressiva dell'alcol etilico. In condizioni opportune di substrato il detto lievito può dare, per quanto sino ad ora accertato, sino al 10% di alcol in volume:

---

(\*) Di coltura pura (*Pseudosaccharomyces apiculatus* - stipse 5 dell'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica della R. Università di Perugia), cortesemente fornito dal Collega Prof. Castelli che ringraziamo.

ANDAMENTO DELLA FERMENTAZIONE CON PSEUDOSACCH. APICULATUS IN DIVERSI SUBSTRATI

Substrato: mosto d'uva naturale zucchero 17,90 %			Substrato: mosto d'uva + CaCO <sub>3</sub> zucchero 17,90 %			Substrato: mosto d'uva + KOH + CaCO <sub>3</sub> zucchero 21,45 %		
Tempo dall'inizio della fermentazione	alcol % in volume		Tempo dall'inizio della fermentazione	alcol % in volume		Tempo dall'inizio della fermentazione	alcol % in volume	
	calco- lato	trovato		calco- lato	trovato		calco- lato	trovato
30 ore	4,20	2,70	48 ore	5,10	3,30	48 ore	1,95	1,25
3 giorni	5,40	3,45	4 giorni	9,15	5,90	7 giorni	6,70	4,30
10 giorni	8,55	5,50	7 giorni	11,65	7,50	20 giorni	11,10	7,05
15 giorni	12,05	7,75	10 giorni	13,75	8,85	45 giorni	20,55	13,20
20 giorni	11,90	7,50	15 giorni	14,05	9,05			10,00

## ZUSAMMENFASSUNG

Es wird bewiesen dass die frühzeitige Hemmung der Gärung des *Pseudosaccharomyces apiculatus* (Erscheinung, welche als selbständiges Gärungshindernis definiert wird) nicht direkt der lähmenden oder hindernden Wirkung des Aethylalkohols zuzuschreiben ist. Bei zweckmässigen Bedingungen des Substrates, ist dieser Gärstoff, nach den bisherigen Feststellungen imstande bis 10 % Alkohol zu bilden.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) *C. Antoniani* - Sul fenomeno di autoimpedimento fermentativo e sulle cause atte a rimuoverlo. Osservazioni sul genere Hansenula. (Boll. Soc. Ital. di Biol. Sperim., in corso, di pubblicazione).  
- Idem, idem. Osservazioni su *Pseudosaccharomyces apiculatus*. (Ibidem).
- (2) *G. De Rossi* - Microbiologia Agraria e Tecnica, pag. 472 (1927).

---

Direttore responsabile Prof. CARLO ARNAUDI

I.G.I. - Industria Grafica Italiana S. A. - Milano, Via M. Melloni, 17 - Tel. 21935

**BANCO DI SICILIA**  
ISTITUTO DI DIRITTO PUBBLICO

**122 SEDI E AGENZIE**

L'ISTITUTO RACCOGLIE  
DEPOSITI A RISPARMIO  
E IN C/C FRUTTIFERO  
E COMPIE TUTTE LE  
OPERAZIONI DI BANCA

OLTRE MEZZO MILIARDO  
DI FONDI PATRIMONIALI

**BANCO DI ROMA**  
BANCA DI INTERESSE NAZIONALE

SOCIETÀ PER AZIONI

CAPITALE E RISERVA LIT. 364.000.000

ANNO DI FONDAZIONE 1880

SEDE SOCIALE E DIREZIONE CENTRALE IN  
ROMA

*214 FILIALI*

TUTTE LE OPERAZIONI DI BANCA

*“Con sette canne  
si veste una donna,,*

LA

# SNIA VISCOSA

dalle piantagioni di  
canna di Torviscosa  
trae la cellulosa no-  
bile per la produzione  
del raion e del fiocco

*i due tessuti della nuova moda italiana*

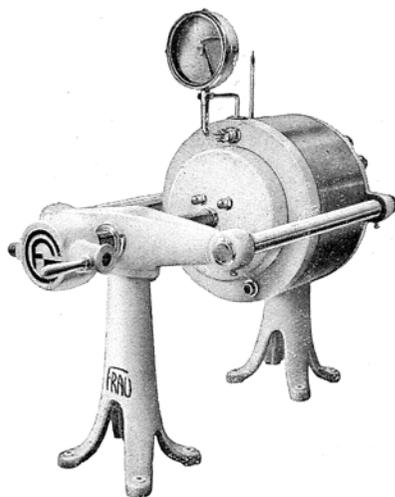
---

SNIA VISCOSA - Via Cernaia 8, MILANO

PASTORIZZATORE  
STRATIFICATORE  
RECUPERATORE  
REFRIGERANTE PER LATTE

**F R A U**

THIENE



COSTRUZIONE DI TUTTE LE MACCHINE PER  
L'INDUSTRIA ED IL TRATTAMENTO IGIENICO  
DEL LATTE

# Bestiame sano e robusto

---

Le normali razioni alimentari per  
il bestiame devono essere in ogni  
caso integrate con

## FOSFATO DI CALCIO PRECIPITATO

il sale minerale che concorre alla  
formazione ed all'irrobustimento  
delle ossa ed, in genere, a miglio-  
rare tutto l'organismo animale. Gli al-  
levatori di bestiame devono richie-  
dere il

## FOSFATO DI CALCIO PRECIPITATO

direttamente, prontamente e total-  
mente assimilabile, speciale prepa-  
rato della

“MONTECATINI”

---

SOC. GENERALE PER L'INDUSTRIA MINERARIA E CHIMICA

MILANO - Via Principe Umberto n. 18