

# Il contributo dell'Istituto Superiore di Sanità alla soluzione dei problemi igienico-sanitari connessi alla produzione ed utilizzazione in alimentazione animale dei lieviti coltivati su n-alcani (bioproteine)

VILMA ALBERANI, GIULIANO D'AGNOLO, GIANFRANCO DONELLI, AGOSTINO MACRÌ  
e VITTORIO SILANO

*Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## INDICE

<i>Introduzione</i> . . . . .	Pag. 348
<i>Sinossi cronologica delle attività tecnico-scientifiche e amministrative</i> . . . . .	» 350
<i>Aspetti scientifico-sanitari:</i>	
Tassonomia e patogenicità del genere <i>Candida</i> . . . . .	» 373
Acidi grassi con numero dispari di atomi di carbonio . . . . .	» 379
n- Alcani . . . . .	» 381
Impianti per la produzione delle biomasse . . . . .	» 384
Piano di sorveglianza medico-epidemiologica . . . . .	» 387
<i>Bibliografia</i> . . . . .	» 388
<i>Appendice I: Decreto ministeriale 14 novembre 1972</i> . . . . .	» 392
<i>Appendice II: Decreto ministeriale 2 febbraio 1974</i> . . . . .	» 394
<i>Appendice III: Decreto ministeriale 7 febbraio 1976</i> . . . . .	» 397
<i>Appendice IV: Piano sperimentale di massima per l'accertamento della patogenicità diretta delle Candidide</i> . . . . .	» 399
<i>Appendice V: Linee di ricerca sperimentali per l'esame delle cosiddette bioproteine (SCP) ai fini dell'ammissibilità nell'alimentazione animale</i> . . . . .	» 401
<i>Appendice VI: Decreto ministeriale 21 giugno 1977</i> . . . . .	» 404

<i>Appendice VII</i> : Risoluzione del sottogruppo oncogenesi e mutagenesi operante nell'ambito della Commissione Cimmino . . . . .	Pag. 406
<i>Appendice VIII</i> : Risoluzione del sottogruppo biochimico operante nell'ambito della Commissione Cimmino . . . . .	» 407
<i>Appendice IX</i> : Risoluzione della Commissione relatrice del Consiglio Superiore di Sanità elaborata nella riunione del 4 marzo 1978 . . . . .	» 408
<i>Appendice X</i> : Parere dell'Assemblea generale del Consiglio Superiore di Sanità del 28 giugno 1978 . . . . .	» 411
<i>Appendice XI</i> : Decreto ministeriale 26 novembre 1979 . . . . .	» 412

## INTRODUZIONE

Sembra opportuno premettere, al resoconto sommario dell'attività tecnico-scientifica svolta dall'Istituto superiore di sanità (ISS) per affrontare i problemi connessi con la produzione industriale di biomasse da lieviti coltivati su n-alcane, alcune brevi notazioni semantiche.

Sebbene infatti l'espressione *bioproteine* sia ormai di uso largamente diffuso e non sembri possibile al momento bandirla, non vi è dubbio che essa sia priva di significato almeno nel contesto in cui di norma viene usata: nessuno infatti, non altrimenti informato, potrebbe immaginare che con tale termine si vogliano indicare particolari biomasse da destinarsi all'alimentazione zootecnica. Ed inesatta è anche la stessa espressione inglese *single cell protein* (SCP), poiché suggestiva dell'erronea informazione secondo cui tratterebbesi di *proteine di organismi unicellulari* mentre è, come noto, la intera cellula microbica e non la sua sola frazione proteica ad essere destinata all'alimentazione animale. Sembra dunque che l'espressione *biomasse per l'alimentazione animale* sia quella che possa descrivere in modo più corretto e comprensibile la reale natura e la prevista destinazione di queste nuove fonti proteiche di carattere non convenzionale.

Lo studio dei problemi igienico-sanitari connessi con la produzione e l'impiego in alimentazione animale dei lieviti coltivati su n-alcane risale, per quanto concerne l'ISS, al 15 ottobre 1970, quando la Direzione generale per l'igiene degli alimenti e la nutrizione del Ministero della sanità inoltrava all'Istituto una prima specifica richiesta di informazioni tecnico-scientifiche. A quel tempo, sia l'Amministrazione sanitaria che il mondo accademico e scientifico avevano scarse conoscenze di quanto era stato sperimentato a livello industriale, prevalentemente in altri paesi, su tali fonti proteiche non convenzionali, principalmente a causa del carattere di segretezza con cui.

per ragioni brevettuali, le industrie interessate avevano trattato i risultati ottenuti. Tali carenze conoscitive erano ulteriormente aggravate dalla novità di tali prodotti e delle relative tecnologie, per cui non erano disponibili, né nel nostro paese né in altri, adeguati termini di confronto che potessero essere utilizzati dall'Amministrazione sanitaria per la pronta elaborazione di un modello di intervento. Inoltre, l'industria si era principalmente dedicata allo sviluppo delle tecnologie produttive ed all'acquisizione di dati relativi all'efficacia dei nuovi prodotti in alimentazione animale piuttosto che allo studio degli aspetti di rilevanza igienico-sanitaria.

A distanza di quasi nove anni dall'inizio della vicenda, è oggi possibile dare una puntuale indicazione dei più rilevanti aspetti, sotto il profilo igienico-sanitario, connessi alla problematica in questione:

1) la produzione industriale, prevista su vastissima scala (decine di migliaia di tonnellate annue), non era confrontabile per mole con alcuna altra produzione basata su microorganismi (ad es. produzioni di metaboliti, antibiotici, amminoacidi, ecc.);

2) i ceppi di microorganismi del genere *Candida*, di cui era prevista l'utilizzazione, non erano mai stati precedentemente studiati sotto il profilo delle possibili interazioni con l'uomo e l'ambiente. Le uniche informazioni disponibili erano relative all'isolamento da tessuti umani, in talune forme morbose, di ceppi appartenenti allo stesso genere;

3) la natura idrocarburica del substrato era del tutto insolita per la produzione di mangimi e tale da meritare attenta valutazione sotto il profilo igienico-sanitario anche per la possibile presenza di noti contaminanti aromatici, alcuni dei quali cancerogeni;

4) il previsto uso di rilevanti quantità di tali biomasse in alimentazione animale non consentiva l'applicazione in questo caso dei criteri convenzionalmente adottati per gli additivi ed imponeva, quindi, la necessità di definire nuovi criteri tossicologici sia per la valutazione delle biomasse che della produzione zootecnica ottenuta con l'impiego dei lieviti in questione. In particolare, vi era la necessità di verificare la possibile presenza nella produzione zootecnica di componenti indesiderabili e/o nocivi derivanti dai lieviti.

Benché tale serie di problemi e carenze conoscitive, che investono questioni di importanza fondamentale per la tutela della salute e dell'ambiente, abbia reso inizialmente difficoltoso ed incerto l'operato dell'Amministrazione sanitaria, essa è stata affrontata dall'ISS, ricorrendo ove necessario alla collaborazione di altri organismi competenti, attraverso molteplici interventi che hanno consentito alla fine un'adeguata razionalizzazione dell'intera materia ed il superamento delle incertezze iniziali.

La complessità e la durata pluriennale della vicenda, che ha visto il continuo intrecciarsi e sovrapporsi di interventi scientifici ed amministrativi da parte di diversi organi dell'Amministrazione sanitaria, oltretutto il coinvolgimento di numerosi operatori della comunità scientifica nazionale ed internazionale e di altre componenti sociali, hanno suggerito l'opportunità di utilizzare due diversi approcci per la descrizione dell'attività svolta dall'ISS nell'affrontare i problemi igienico-sanitari connessi alle biomasse in questione. Il primo approccio consiste nella cronistoria essenziale degli eventi rilevanti quale risulta agli scriventi. Il secondo riguarda la trattazione delle conoscenze scientifiche concernenti i diversi aspetti sanitari del problema e della loro evoluzione in relazione all'intenso lavoro di ricerca svolto da più parti ed al progressivo rendersi disponibili di nuove acquisizioni.

#### SINTESI CRONOLOGICA DELLE ATTIVITÀ TECNICO-SCIENTIFICHE E AMMINISTRATIVE

1971.

17 febbraio. - L'Italproteine S.p.A. (una società paritetica ANIC - British Petroleum) presenta domanda per l'ammissibilità in alimentazione animale del prodotto Toprina, costituito da lieviti del genere *Candida* cresciuti su n-alcani ed essiccati. Il brevetto per la produzione era stato messo a punto nei laboratori inglesi della BP.

La domanda per l'ammissibilità del Liquipron nell'alimentazione zootecnica fu invece presentata il 28 luglio 1971 dalla Ditta Liquichimica S.p.A. che aveva acquistato il brevetto dall'industria giapponese Kanegafuchi. Liquipron è il nome commerciale di una biomassa ottenuta, analogamente alla Toprina, dalla coltivazione di lieviti del genere *Candida* su n-alcani, la cui produzione industriale non era stata avviata in Giappone a causa della decisa opposizione di alcuni settori dell'opinione pubblica.

La diversità fra le due tecnologie proposte, consisteva principalmente nella natura del ceppo microbico da impiegarsi, nonché nelle caratteristiche funzionali degli impianti produttivi.

1972.

15 marzo. - Parere favorevole, circa l'ammissibilità in alimentazione animale del prodotto Toprina, di un gruppo di esperti istituito in seno alla Commissione tecnica prevista dalla legge 8 marzo 1968, n. 399 (*Gazzetta Ufficiale* n. 98 del 17 aprile 1968), sulla disciplina della preparazione dei mangimi.

**21 luglio.** - L'ISS esprime parere di massima favorevole all'ammissibilità del prodotto Toprina.

Tale parere viene dato in base allo studio della documentazione presentata dalla Ditta, contenente rapporti di istituti altamente qualificati come il CIVO - Centraal Institut voor Voeding Onderzoek (Istituto centrale per la nutrizione e le ricerche alimentari) e l'ILO - Institut voor Landbouwkunding Onderzoek van Biochemische Producten (Istituto per le ricerche agricole e delle produzioni biochimiche) entrambi sezioni del TNO - Toegestap Natuurwetenschappelijk Onderzoek (Organizzazione olandese per la ricerca applicata).

Il parere favorevole è subordinato alle seguenti condizioni:

- 1) definizione di limiti massimi delle sostanze indesiderabili;
- 2) esecuzione di una sperimentazione sulle specie animali per le quali si prevede l'utilizzazione della Toprina, nonché di una sperimentazione diretta e indiretta sui prodotti zootecnici ottenuti dagli animali così alimentati;
- 3) controllo alla produzione, al fine di verificare che il prodotto industriale mantenga le caratteristiche di quello ottenuto a livello di impianto pilota;
- 4) vendita del prodotto attraverso catene di distribuzione controllata

**3 agosto.** - La Commissione tecnica prevista dalla summenzionata legge 399, esprimendo parere favorevole sull'ammissibilità del prodotto Toprina, ravvisa la necessità che il prodotto proteico in argomento venga sottoposto ad una sperimentazione nazionale organizzata e diretta dall'ISS allo scopo di approfondire il problema della chemiobiocinesi, persistenza negli organi di residui idrocarburi, nonché di altre sostanze indesiderabili assunte dagli animali con il prodotto medesimo.

**12 agosto.** - Il Ministro per la sanità pro-tempore dà incarico all'ISS di intraprendere la sperimentazione sulla Toprina.

**22 settembre.** - Il Consiglio superiore di sanità (CSS) dà parere favorevole all'ammissibilità del prodotto Toprina ed allo schema di decreto predisposto per l'inclusione del prodotto stesso nell'elenco delle sostanze chimico-industriali consentite per l'alimentazione animale.

**14 novembre.** - Decreto del Ministro per la sanità, di concerto con il Ministro per l'agricoltura e foreste e con il Ministro per l'industria, commercio e artigianato (vedi *Appendice I*), relativo all'inclusione della Toprina nell'elenco di cui sopra. Il decreto fissa le norme di impiego e le caratteristiche

cui deve rispondere il prodotto Toprina (composizione in amminoacidi, livelli dei metalli pesanti, ecc.), riservando al Ministero della sanità il nulla osta per il suo impiego ed all'ISS il controllo sul prodotto finito, descritto come farina derivante « da lieviti essiccati del genere « *Candida* » (*lipolytica* e/o *tropicalis*) coltivati su n-paraffine... ». L'art. 2 dello stesso decreto prevede inoltre l'effettuazione a cura dell'Istituto di un controllo sulla « purezza dei ceppi (*Candida*) utilizzati nelle colture di produzione... ».

29 novembre. - Il Ministero della sanità chiede all'ISS un parere sull'ammissibilità del Liquipron in alimentazione zootecnica.

30 novembre. - La Liquichimica presenta una documentazione secondo la quale il ceppo di cui propone l'utilizzazione industriale per la produzione del Liquipron, appartarrebbe ad una nuova specie denominata *Candida novellus*.

1973.

21 maggio. - L'ISS comunica al Ministro per la sanità l'avvio, in ottemperanza a quanto disposto dal D.M. 14 novembre 1972, di un complesso piano di indagini analitiche e nutrizionali sulla Toprina allo scopo di approfondire fra l'altro lo studio degli idrocarburi paraffinici e policiclici, nonché degli acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio, e di completare alcune sperimentazioni zootecniche, in collaborazione con l'Istituto sperimentale per la zootecnia di Modena (prove su suini) e con l'Istituto sperimentale zootecnico di Tor Mancina a Roma (prove su bovini).

30 maggio. - La ditta Italproteine richiede l'elevazione dei livelli massimi consentiti di metalli pesanti nel prodotto Toprina, previsti dal D.M. 14 novembre 1972.

19 giugno. - L'ISS si pronuncia a favore della richiesta di aumento dei livelli massimi di metalli pesanti nella Toprina.

17 ottobre. - L'ISS richiede ulteriori dati sugli aspetti micologici, zootecnici, tossicologici e di composizione chimica del Liquipron, poiché nella documentazione fornita dalla Liquichimica essi risultano trattati in modo tale da non permettere la formulazione di un definitivo parere scientifico-sanitario.

17 novembre. - La Liquichimica trasmette all'ISS un rapporto intitolato *The strain* di K. Watanabe e H. Kawatani che ribadisce l'appartenenza del ceppo alla nuova specie *C. novellus*.

Il Gruppo di esperti, istituito in seno alla Commissione tecnica mangimi, esprime parere favorevole ai nuovi livelli di metalli pesanti richiesti per la Toprina proponendo al contempo altre modifiche al decreto 14 novembre 1972.

**19 novembre.** - Il CSS esprime il proprio avviso favorevole sui nuovi limiti di tolleranza per i metalli pesanti e raccomanda di limitare alla sola specie *Candida lipolytica* il tipo di lievito da impiegarsi per la produzione di Toprina.

Nella stessa seduta viene istituito il Gruppo di esperti sulle *bioproteine* composto dai proff. L. Bellani, E. Biocca, A. Corrias, F. Cotta-Ramusino, G. Gatti, E. Malizia, E. Paroli, F. Pocchiari, A. Tonolo, F. Valfrè.

**19 dicembre.** - La Commissione tecnica prevista dalla legge n. 399/1968 esprime parere favorevole sullo schema di decreto di modifica del D.M. 14 novembre 1972, predisposto sulla base delle raccomandazioni espresse dal CSS.

Riunione del Gruppo di esperti sulle *bioproteine*, nominato dal CSS, per discutere il problema della specie di *Candida* da impiegarsi per la produzione della Toprina. Alla riunione partecipano, oltre ai membri del Gruppo, anche i proff. Tiecco dell'ISS, Mattioli, Galeota e Lucentini della Direzione generale dei servizi veterinari del Ministero della sanità, e Shacklady, Fasella, Fagnani, Pascucci e Messina, quali delegati dell'Italproteine

Sulla base delle proposte della Commissione tecnica mangimi e delle raccomandazioni del CSS, si concorda sull'opportunità di limitare il tipo di lievito da impiegare per la produzione di Toprina alla sola specie *C. lipolytica*. Inoltre, in relazione alle preoccupazioni espresse dal prof. E. Biocca, la Direzione generale dei servizi veterinari del Ministero della sanità invita i rappresentanti dell'industria a far pervenire all'ISS il ceppo di *Candida* che verrà impiegato per la produzione.

1974.

**18 gennaio.** - Riunione del Gruppo di esperti sulle *bioproteine*, istituito dal CSS, in cui il Direttore dell'ISS propone l'elaborazione di un piano sperimentale per l'accertamento della patogenicità delle *Candide*.

**2 febbraio.** - Decreto di modifica (*Appendice II*) del D.M. 14 novembre 1972 che, tra l'altro, descrive la Toprina come « farine derivanti da lieviti essiccati di *Candida lipolytica* (Harrison) Diddens et Lodder... » ed eleva i livelli massimi dei metalli consentiti nel prodotto stesso.

15 febbraio. — La Direzione generale dei servizi veterinari del Ministero della sanità richiede all'Italproteine di depositare presso l'ISS un campione del ceppo di *C. lipolytica* utilizzato per la produzione della Toprina.

18 febbraio. — La Liquichimica trasmette due rapporti contenenti ulteriori documentazioni sul ceppo di *C. novellus*.

23 febbraio. — La Direzione generale dei servizi veterinari del Ministero della sanità, in riferimento alla problematica emersa nell'ambito del Gruppo di esperti sulle *bioproteine* relativamente alla eventuale patogenicità delle Candidae ed alla conseguente necessità di prevenire possibili inquinamenti ambientali massivi tali da minacciare la salute sia degli addetti alle lavorazioni che delle popolazioni circostanti gli impianti produttivi, chiede sia all'Italproteine che alla Liquichimica dati informativi circa le misure cautelative previste in tal senso.

4 marzo. — La Liquichimica comunica l'avvenuta realizzazione e l'entrata in funzione, entro il mese di aprile 1974, di un impianto pilota per la produzione di lieviti coltivati su n-paraffine, situato in località Robassomero (Torino), specificando che esso ha una capacità produttiva di 8 tonnellate mese di farina di lievito da destinarsi ad uso zootecnico sperimentale. Invia inoltre un rapporto sui sistemi antinquinamento e sui dispositivi di prevenzione e sicurezza sanitaria previsti per l'impianto di Saline di Montebello Ionico (Reggio Calabria).

7 marzo. — L'ISS dopo aver esaminato i due rapporti ricevuti dalla Liquichimica ribadisce che la specie *C. novellus*, cui apparterebbe il ceppo da usarsi per la produzione del Liquipron, non può essere accettata come nuova specie poiché non si è pervenuti alla sua definizione tassonomica utilizzando procedure consolidate a livello internazionale.

9 aprile. — L'Italproteine, in base a studi condotti su embrioni di pollo dal prof. Winner del Charing Cross Hospital di Londra, sottolinea la non patogenicità del ceppo di lievito impiegato. Fornisce inoltre alcuni dettagli sui previsti sistemi di controllo e di filtrazione degli effluenti gassosi, specificando altresì che gli effluenti liquidi di processo verranno riciclati e sterilizzati all'interno degli impianti. Comunica quindi di aver predisposto sia un controllo sul personale in corso di assunzione, onde valutarne l'eventuale sensibilità alle polveri ed ai lieviti proteici, sia un programma di sorveglianza medica continua per il personale che opererà negli impianti.

La Liquichimica presenta una relazione relativa all'impianto di Saline precisando di aver già portato a conoscenza di tale relazione l'apposita Com-

missione attivata dal Ministro per l'ambiente. Tale relazione descrive gli accorgimenti previsti ai fini della tutela dell'ambiente interno ed esterno all'impianto. La mancata presentazione di una dettagliata documentazione progettuale degli impianti viene motivata con il segreto brevettuale.

**11 aprile.** - La Liquichimica consegna all'ISS tre campioni del ceppo di lievito da impiegare nel processo di produzione del Liquipron, contrassegnati dalla dicitura *Candida novellus* ATCC 20275 IS.

**10 maggio.** - L'Italproteine comunica la propria indisponibilità alla consegna all'ISS del ceppo di *Candida* da impiegarsi per la produzione di Toprina, per motivi di segreto industriale.

**6 giugno.** - L'Italproteine trasmette i progetti di massima dello stabilimento di Sarroch (Cagliari), richiesti dall'Amministrazione sanitaria il 23 febbraio dello stesso anno, completi della descrizione degli impianti di trattamento degli effluenti solidi, liquidi ed aeriformi.

**10 giugno.** - La Liquichimica invia un rapporto del CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, Olanda) in cui si esclude che il ceppo di lievito da utilizzare per la produzione del Liquipron sia classificabile come *Candida tropicalis*.

**11 giugno.** - L'ISS comunica alla Liquichimica che le caratteristiche del ceppo di *C. novellus* ATCC 20275 IS sono conformi a quelle previste per la specie *C. tropicalis*, secondo le metodiche descritte da J. Lodder in *The Yeasts*, North-Holland, Amsterdam, 1970.

**26 giugno.** - La Liquichimica comunica che il CBS ha classificato il ceppo ATCC 20275 IS, precedentemente attribuito alla nuova specie *C. novellus*, come appartenente invece alla già nota specie *Candida sakei*.

**17 luglio.** - L'Italproteine, ripetutamente sollecitata a tal riguardo dall'Amministrazione sanitaria, consegna all'ISS il ceppo di *Candida* da impiegare per la produzione della Toprina, contrassegnato con la dicitura 246 BP.

**19 luglio.** - I proff. A. Tonolo e G. Serlupi Crescenzi dell'ISS visitano il CBS, per discutere con i proff. M. Y. Smith e D. Yarrow le metodologie di classificazione delle *Candide* adottate nei rispettivi laboratori.

1975.

**22 gennaio.** - Inizio dei lavori del Comitato di esperti CEE sulle *bio-proteine*. Per l'ISS partecipa il prof. V. Silano.

23 gennaio. – La Liquichimica invia un rapporto preparato dai proff. D. G. Ahearn (Georgia State University, Atlanta, USA), S. A. Meyer (American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA), D. Yarrow (CBS, Delft, Olanda), intitolato *The taxonomy of Candida novellus ATCC 20275, the strain used by Liquichimica Biosintesi to produce Liquipron*. Il rapporto afferma che il ceppo appartiene alla specie *Candida maltosa*, e può essere meglio distinto dalla specie *C. tropicalis* ricorrendo alle tecniche di ibridizzazione DNA-DNA.

17 febbraio. – L'ISS riceve in fotocopia due pareri formulati rispettivamente dal prof. Onorato Verona (Istituto di microbiologia, Università di Pisa) e dal prof. Elio Baldacci (Istituto di Patologia vegetale, Università di Milano) su richiesta della Liquichimica, ambedue a sostegno delle conclusioni cui perviene il rapporto di Ahearn, Meyer e Yarrow.

24 marzo. – Incontro tra ricercatori dell'ISS e della Liquichimica per approfondire alcuni aspetti del succitato rapporto.

26 aprile. – Dopo aver preso in esame l'ulteriore documentazione prodotta dalla Liquichimica ed in particolare i dati ottenuti con le nuove metodiche di ibridizzazione DNA-DNA proposte, l'ISS ribadisce che, secondo le metodiche classiche del Lodder il ceppo Liquichimica deve essere classificato come appartenente alla specie *C. tropicalis*. I dati acquisiti con le nuove metodiche proposte non vengono ritenuti sufficientemente conclusivi data l'esiguità del numero di specie confrontate in base a tale nuovo criterio tassonomico.

29 aprile. – A conclusione del complesso piano di sperimentazione avviato nel maggio 1973 l'ISS presenta un rapporto dal titolo *Indagini analitiche e nutrizionali sulla Toprina (lieviti cresciuti su n-paraffine)* nel quale vengono forniti tra l'altro i risultati dell'analisi tassonomica effettuata sul ceppo 246 BP, che ne indicano l'appartenenza alla specie *C. lipolytica*. Tra i nuovi dati acquisiti vengono discussi in particolare quelli relativi alla riscontrata presenza di residui di n-alcanti ed acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio nelle carni degli animali trattati. Nel presentare tale rapporto viene richiesta la convocazione del CSS per il riesame dell'intera questione.

24 maggio. – La Direzione generale dei servizi di igiene pubblica del Ministero della sanità formula osservazioni di carattere generale sul progetto di massima degli impianti, ricevuto dall'Italproteine, riservandosi di esprimere un parere definitivo dopo aver preso visione del progetto esecutivo dettagliato dell'impianto stesso, ed una volta accertata la non patogenicità

del ceppo di lievito impiegato; per quanto concerne la tutela igienico-sanitaria dei lavoratori rileva l'opportunità di interessare il Ministero del lavoro e della previdenza sociale che ha la competenza primaria in materia. La Direzione stessa invita inoltre l'ISS a formulare eventuali osservazioni tecniche aggiuntive sulla stessa materia.

9 giugno. - La Direzione generale dei servizi veterinari del Ministero della sanità, facendo proprio il parere dell'ISS in merito al ceppo da impiegarsi per la produzione del Liquipron, comunica alla Liquichimica che: «soltanto se l'evoluzione delle conoscenze in materia porterà a scegliere nuovi metodi tassonomici rispetto agli altri, e se futuri studi potranno stabilire con ragionevole certezza che il ceppo in questione non è correlato a ceppi patogeni per l'uomo, potrà essere ripresa in esame la posizione sistematica di *C. novellus*».

18 giugno. - La Liquichimica trasmette all'ISS il ceppo originariamente denominato *C. novellus* ATCC 20275 IS, mediante plico (preparato e sigillato da notaio) contenente tre fiale di cellule liofilizzate, contrassegnate con la dicitura *Candida maltosa* ATCC 20275 IS, comunicando che altri due plichi analoghi sono stati depositati presso uno studio notarile. Viene altresì comunicato che si tratta di campioni dello stesso ceppo già consegnato all'Istituto in data 11 aprile 1975.

Il CSS si riunisce in Assemblea plenaria per discutere l'utilizzazione della Toprina in alimentazione zootecnica. Il Consiglio raccomanda che il significato biologico ed il comportamento nel tempo dei residui di n-alceni e di acidi grassi siano oggetto di ulteriore sperimentazione. Raccomanda inoltre che le ricerche di chimica analitica già effettuate siano integrate da ricerche biochimiche, citologiche, istologiche, metaboliche e da osservazioni epidemiologiche ed epizootologiche relative ad alimenti di uso comune a composizione sotto qualche aspetto comparabile. Infine, il Consiglio esprime parere che, in attesa dei risultati delle ulteriori indagini richieste, debba provvedersi alla sospensione cautelativa del D.M. 14 novembre 1972 per la parte che riguarda la commercializzazione e l'uso della Toprina, ed altresì limitarsi la produzione alle necessità della sperimentazione.

23 luglio. - L'ISS esprime il proprio parere sull'utilizzazione della Toprina in alimentazione animale. In particolare viene rilevata l'opportunità di svolgere ricerche per valutare gli effetti della prolungata ingestione di notevoli quantità di acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio in specie diverse di mammiferi non ruminanti e la necessità di evitare qualsiasi ulteriore aumento del livello delle paraffine nella catena alimentare. Secondo l'Istituto, la Toprina può essere addizionata ai mangimi nella misura in cui i residui di paraffine siano *non superiori* ai livelli delle corrispondenti paraffine

nei prodotti animali già comunemente utilizzati in alimentazione umana. Per poter stabilire quale sia la percentuale di Toprina tollerabile in base a questo criterio, l'ISS chiede che vengano effettuate le seguenti sperimentazioni:

1) indagini sperimentali su scala nazionale per accertare gli effettivi livelli di n-paraffine negli alimenti di origine animale (suini, vitelli, polli ed uova) normalmente consumati e per la cui produzione si prevede l'utilizzazione della Toprina;

2) ulteriori indagini zootecniche con polli, galline, vitelli e suini per accertare i livelli residui di paraffine negli animali trattati con le quantità di Toprina previste dal D.M. 2 febbraio 1974 e la dipendenza di tali livelli dalla quantità di Toprina presente nel mangime.

31 luglio. - Allo scopo di valutare i problemi connessi ai metodi classici di classificazione delle *Candidae* ed alla loro eventuale possibilità di integrazione con nuove metodiche tassonomiche quali quelle proposte per il ceppo ATCC 20275 IS, l'ISS convoca un Gruppo di studio composto, oltre che da ricercatori dell'Istituto e della Liquichimica, da numerosi esperti italiani e stranieri di riconosciuta competenza specifica. Ne fanno parte: F. Pocchiari (Istituto superiore di sanità, Presidente); D. G. Ahearn (Georgia State University, Atlanta, USA); S. A. Meyer (American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA); J. P. Von Der Walt (Microbiology Research Group-Council for Scientific and Industrial Research, Pretoria, Sud Africa); D. Yarrow (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, Olanda); G. Magni (Istituto di genetica, Università di Milano); A. Martini (Istituto di microbiologia agraria e tecnica, Università di Perugia); V. Scardovi (Istituto di microbiologia agraria e tecnica, Università di Bologna); O. Verona (Istituto di microbiologia agraria e tecnica, Università di Pisa); D. Zangrandi (Liquichimica); G. D'Agnolo, G. Donelli, C. Frontali Botti, V. Silano, A. Tonolo, L. Tuttobello, A. Zampieri (ISS).

Nel corso dei lavori viene comunicato l'avvenuto isolamento, nei laboratori dell'ISS diretti dal prof. A. Tonolo, di due sottoisolati rispettivamente a colonia liscia (CN2) e rugosa (CN3), a partire da colture del ceppo (CN1) originale consegnato dalla Liquichimica: il ceppo CN3, inoculato in animali da esperimento, non mostra alcuna patogenicità, come d'altronde il ceppo originale (CN1), mentre l'inoculazione del ceppo CN2 provoca la comparsa di effetti patogeni negli animali trattati. Il gruppo approfondisce tale problema e programma un supplemento di sperimentazione. A tal fine, il prof. Tonolo consegna agli esperti stranieri D. G. Ahearn, S. A. Meyer e D. Yarrow le seguenti colture: CN1 ceppo originale; CN2 sottoisolato da colonia liscia; CN3 sottoisolato da colonia rugosa; ceppo 5711 di *C. tropicalis* utilizzato come riferimento. A conclusione dei lavori il Gruppo sottoscrive, ad eccezione

del prof. Scardovi, un documento riassuntivo delle conclusioni cui perviene, qui riportato nella sua stesura originale:

1) *It is agreed that the differences in fermentation reaction rates do not qualify to differentiate ATCC 20275 from Candida tropicalis.*

2) *It is agreed that ATCC 20275 is different from Candida tropicalis on the basis of differences in the utilization of soluble starch.*

3) *It is agreed that in general there are differences in the habitat of Candida maltosa and Candida tropicalis.*

4) *It is agreed that on the basis of DNA-DNA homology the strain ATCC 20275 is distinct from the type strain of Candida tropicalis (ATCC 750) and can be considered identical with the type strain of Candida maltosa (ATCC 28140).*

5) *It is agreed that the starch utilizing culture obtained from the culture labelled ATCC 20275 recovered by Prof. Tonolo (i.e. culture CN2) could be either:*

a) *a contaminant or;*

b) *a mutant of the original strain.*

6) *To check these possibilities it is agreed that DNA-DNA hybridization between this starch-positive variant CN2 and Candida tropicalis, Candida maltosa and the culture ATCC 20275 be done.*

7) *It is agreed that as far as is known at the moment Candida maltosa is not pathogenic.*

8) *It is agreed that there is no available knowledge whether Candida maltosa might become pathogenic by mutation and it is recommended that this aspect be thoroughly investigated.*

9) *Should the culture CN2 prove to be a starch utilizing mutant of ATCC 20275 a detailed and fully documented investigation of its possible pathogenicity be carried out.*

10 settembre. - Il dr. D. Yarrow comunica all'Istituto che i ceppi CN1 e CN3 appartengono alla specie *C. maltosa* e che il ceppo CN2 appartiene alla specie *C. tropicalis*.

4 settembre. - Il dr. D. G. Ahearn comunica all'Istituto risultati identici a quelli ottenuti dal dr. Yarrow concludendo « *I can only speculate that C. tropicalis CN2 was introduced as a chance contaminant during routine handling of C. maltosa* ».

8 settembre. - Viene formalmente costituito, nell'ambito della Segreteria generale tecnica del Direttore, un gruppo di coordinamento tecnico-

scientifico delle attività dell'ISS relativamente alla problematica delle *bioproteine*. Ne fanno parte: V. Alberani, G. D'Agnolo, G. Donelli, G. L. Gatti, A. Macri, V. Silano, A. Zampieri.

*10 ottobre.* - La dr.ssa S. A. Meyer ottiene, mediante tecniche di ibridizzazione DNA-DNA, risultati circa la classificazione dei ceppi di *Candida* CN1, CN2 e CN3 sovrapponibili a quelli ottenuti da Yarrow e Ahearn mediante metodiche classiche.

*11 ottobre.* - Allo scopo di valutare attentamente i risultati ottenuti da Ahearn, Meyer e Yarrow, contenuti in un rapporto congiunto ricevuto in data 1 ottobre 1975, l'ISS convoca una riunione dei soli esperti italiani, alla quale partecipa anche il prof. V. Treccani degli Alfieri (Istituto di microbiologia agraria e tecnica, Università di Milano). Il gruppo di esperti propone l'esecuzione di prove con agenti mutageni sul ceppo ATCC 20275 IS per verificare se il sottoisolato CN2 sia un contaminante accidentale, come ipotizzato da Ahearn, o un mutante del ceppo originale stesso, concludendo che, indipendentemente dai risultati che verranno ottenuti, sarà comunque opportuno procedere ad effettuare adeguati test di patogenicità.

1976.

*12 gennaio.* - L'ISS convoca un Gruppo di esperti cui affidare il compito di definire un protocollo dettagliato di sperimentazione per l'accertamento della patogenicità diretta delle *Candide*. Ne fanno parte: F. Pocchiari (Istituto superiore di sanità, Presidente); F. Caprilli (Ospedale San Gallicano, Roma); L. Castagnari (Istituto di malattie infettive, Università di Ferrara); G. Fara (Istituto di igiene, Università di Milano); G. Gargani (Istituto di microbiologia, Università di Firenze); A. Mantovani e L. Morganti (Istituto di malattie infettive, profilassi e polizia veterinaria, Università di Bologna); V. Marinozzi (Istituto di anatomia e istologia patologica, Università di Roma); C. Collotti, G. D'Agnolo, G. Donelli, G. L. Gatti, A. Macri, E. Palliola, V. Silano, A. Tonolo, L. Tuttobello, A. Zampieri (ISS).

Il gruppo traccia le linee guida da seguire per l'elaborazione del suddetto protocollo.

*4 febbraio.* - L'ISS trasmette agli esperti del Gruppo per la patogenicità delle *Candide* un primo documento di lavoro, sollecitando specifici e dettagliati suggerimenti tecnico-scientifici.

*7 febbraio.* - Decreto ministeriale (*Appendice III*) di sospensione dell'efficacia del D.M. 14 novembre 1972, modificato con D.M. 2 febbraio 1974,

concernente l'inclusione del prodotto Toprina nell'elenco dei prodotti di origine chimico-industriale, fino all'esito delle ulteriori indagini predisposte.

*10 febbraio.* - Perviene all'ISS copia dei progetti degli impianti per la produzione del Liquipron nonché della documentazione sulla sperimentazione effettuata sul prodotto stesso.

*18 febbraio.* - Incontro con tecnici dell'Italproteine presso il Ministero della sanità allo scopo di esaminare in dettaglio i progetti degli impianti per la produzione di Toprina in riferimento ai problemi di tutela ambientale. A seguito di tale incontro la Direzione generale dei servizi di igiene pubblica del Ministero della sanità trasmette all'ISS copia dei suddetti progetti con richiesta di parere in merito alle misure adottate per la salvaguardia ambientale.

*25 febbraio.* - Si riunisce nuovamente il gruppo di esperti per la patogenicità delle Candide, cui partecipa anche E. Monaco (CNEN, Roma), al fine di una migliore definizione dei problemi affrontati nella riunione precedente.

*30 marzo.* - L'ISS invia agli esperti del gruppo di studio una bozza di protocollo per l'accertamento della patogenicità delle Candide, elaborata sulla scorta delle indicazioni emerse nelle due precedenti riunioni del Gruppo stesso, sollecitando eventuali osservazioni. Gli esperti esprimono parere favorevole alla bozza di protocollo elaborata dall'Istituto, proponendo nello stesso tempo alcune modifiche integrative. Nel corso di una visita all'ISS, il prof. Libero Ajello della Micology Division, Center for Disease Control, Atlanta, USA, esprime anch'egli parere favorevole su tale bozza di protocollo, suggerendo tuttavia alcuni emendamenti semplificativi.

*5 aprile.* - Si tiene presso l'ISS la prima di tre successive riunioni del Gruppo di esperti incaricato dal CSS di predisporre un apposito protocollo di ricerca per il prodotto Toprina. Fanno parte di questo gruppo: G. Ballarini (Clinica medica veterinaria, Università di Parma); L. Bellani (Direzione generale servizi veterinari, Ministero della sanità); E. Biocca (Istituto di parassitologia, Università di Roma); E. Paroli (Istituto di farmacologia, Università di Roma); F. Pocchiari (ISS); M. Proja (Direzione generale servizi igiene alimenti e nutrizione, Ministero della sanità); R. Zito (Istituto Regina Elena, Roma). Il gruppo perverrà, nel corso dell'ultima riunione (5 luglio 1976), alla definizione delle seguenti linee di ricerca:

- 1) cancerogenicità degli n-alcani;
- 2) determinazione dei livelli di n-alcani in tessuti ed organi di animali alimentati con Toprina;

3) rapporti fra n-alcani e fenomeni dismetabolici nell'uomo;

4) indagini epidemiologiche su eventuali effetti della presenza nella catena alimentare di n-alcani analoghi a quelli rinvenuti come residui nelle carni degli animali trattati con Toprina.

29 aprile. - Riunione del Protein-Calorie Advisory Group dell'ONU a Bruxelles in cui le preoccupazioni espresse dagli esperti italiani circa la possibile nocività degli n-alcani e degli acidi grassi dispari residui nelle carni vengono minimizzate e definite infondate, pur in assenza dei dati scientifici ritenuti necessari dal CSS per pervenire ad una valutazione di merito.

30 aprile. - La Liquichimica trasmette un rapporto dettagliato dal titolo: *Identity of a hydrocarbon assimilating yeast Candida novellus with Candida maltosa*, di T. Kaneko *et al.*, contenente dati sperimentali relativi ad ulteriori ricerche tassonomiche quali l'identificazione del coenzima Q e l'analisi NMR dei polisaccaridi di parete, che confermerebbero l'attribuzione del ceppo *C. novellus* ATCC 20275 IS alla specie *C. maltosa*.

1° giugno. - L'ISS trasmette al Ministero della sanità, nonché alle Ditte interessate, copia del *Piano sperimentale di massima per l'accertamento della patogenicità diretta delle Candide (Appendice IV)* suggerendo, al fine di dare concreta attuazione a tale piano, l'opportunità di avviare una collaborazione con l'Istituto di microbiologia dell'Università di Firenze.

1° luglio. - Inizia la sperimentazione sul ceppo di *Candida* della Liquichimica, che viene svolta in collaborazione tra l'ISS e l'Istituto di microbiologia dell'Università di Firenze, presso i Laboratori di quest'ultimo Istituto, diretti dal prof. G. Gargani.

9-10 luglio. - Il CSS approva il documento CEE per l'esame delle bioproteine ai fini dell'ammissibilità nell'alimentazione animale, dopo avervi apportato alcuni emendamenti.

14 luglio. - La Liquichimica, in riferimento a quanto previsto dal *Piano di massima per l'accertamento della patogenicità diretta delle Candide*, comunica all'ISS di aver programmato ricerche tendenti a verificare l'innocuità del ceppo ATCC 20275 IS su topi e conigli immunosoppressi e di averne affidato l'esecuzione ai proff. D. G. Ahearn e L. Ajello.

In tal senso indica la necessità di sottoporre il ceppo ad accertamenti di innocuità preventivi alla sua utilizzazione per la produzione industriale su larga scala.

30 luglio. — L'ISS fornisce al Ministero della sanità il proprio parere definitivo sulla questione della tassonomia del ceppo Liquichimica, basato anche sugli esperimenti condotti in collaborazione con l'Istituto di microbiologia della Università di Firenze. Secondo tale parere il ceppo da impiegarsi per la produzione del Liquipron è da considerarsi correlato, sia alla *C. tropicalis* che alla *C. saké*. L'Istituto rileva inoltre che il principale problema non è quello della classificazione del ceppo, bensì quello dell'accertamento della sua non patogenicità.

18 novembre. — Riunione del CSS in cui sono approvate le *Linee di ricerca sperimentali per l'esame delle cosiddette bioproteine (SCP) ai fini dell'ammissibilità nell'alimentazione animale (Appendice V)*.

6 dicembre. — A conclusione della sperimentazione sulla patogenicità del ceppo ATCC 20275 IS, condotta in collaborazione con l'ISS, il prof. G. Gargani trasmette una relazione dettagliata sui risultati conseguiti. Tali risultati, pur non dimostrativi di una patogenicità diretta del ceppo esaminato, indicano una persistenza delle *Candide* in esame nel rene dei topi trattati, sia normali che immunosoppressi.

28 dicembre. — La Liquichimica trasmette all'ISS una documentazione tecnica dettagliata sugli impianti produttivi completa dei disegni progettuali.

30 dicembre. — Il prof. E. Palliola del Laboratorio di veterinaria e il dr. L. Tuttobello del Laboratorio di chimica biologica dell'ISS, riassumendo i risultati della sperimentazione da loro eseguita sul ceppo ATCC 20275 IS, concludono che la valutazione dei risultati scaturiti dalle varie esperienze con *C. novellus* ATCC 20275 IS « per la persistenza nel tempo di microorganismi vivi negli organi, con la saltuaria presenza in forma pseudomiceliare, e per gli eventi mortali talvolta verificatisi, lascia nello sperimentatore un ragionevole dubbio sulla innocuità del ceppo in oggetto ».

1977.

10 gennaio. — L'ISS esprime il proprio parere in merito ai problemi igienico-sanitari connessi con l'utilizzazione su scala industriale del ceppo di *Candida* ATCC 20275 IS. Sottolineando che le sperimentazioni condotte, pur non fornendo evidenze di patogenicità diretta del ceppo esaminato, indicano l'esistenza di un significativo fattore di rischio per soggetti sensibili, conseguente alla sua eventuale diffusione negli ambienti di vita e di lavoro, l'Istituto rileva la necessità di:

a) prevenire la diffusione nell'ambiente di tali microorganismi, sia ai fini della tutela igienico-sanitaria della popolazione che in particolare dei lavoratori addetti agli impianti produttivi;

b) approntare, in caso di parziale attivazione a scopo sperimentale di detti impianti, un adeguato e specifico piano di sorveglianza igienico-sanitaria, tale da garantire i gruppi di popolazione particolarmente esposti.

*17 gennaio.* - La Direzione generale dei servizi di igiene pubblica del Ministero della sanità, nel concordare sulla necessità di predisporre un adeguato piano di sorveglianza sanitaria in caso di parziale attivazione a scopi sperimentali degli impianti industriali, precisa di non essere in possesso di alcun elemento conoscitivo circa un'eventuale autorizzazione (attribuita dalla stampa ad una iniziativa del Ministro per l'industria) ad una produzione sperimentale di 40.000 tonnellate/anno, sottolineando la propria competenza nei riguardi della valutazione del rapporto tra potenzialità produttiva e rischi correlati per l'ambiente e la popolazione.

*22 gennaio.* - L'ISS trasmette al Ministero della sanità i propri pareri di competenza circa gli aspetti igienico-sanitari connessi sia agli impianti industriali di Saline di Montebello Ionico per la produzione di Liquipron, che agli impianti di Sarroch per la produzione di Toprina. Gli aspetti più rilevanti di tali pareri sono quelli riguardanti la predisposizione di misure atte a:

- 1) evitare la diffusione di *Candida*, vive ed essiccate, nell'ambiente, sia attraverso gli effluenti liquidi che quelli gassosi;
- 2) ridurre al minimo consentito dalla tecnica odierna la concentrazione di polveri costituite da lieviti essiccati;
- 3) adeguare allo spirito della direttiva CEE 76/464 i trattamenti alghicidi previsti dai sistemi di raffreddamento a ciclo aperto degli impianti;
- 4) tutelare i lavoratori addetti agli impianti mediante la definizione e l'attuazione di un piano di sorveglianza medico-epidemiologica.

*25/26 gennaio-7 febbraio.* - Si tengono due successive riunioni congiunte delle Sezioni I, II e V del CSS sulla protezione igienico-ambientale connessa alla produzione di bioproteine. Nel corso di tali riunioni vengono discussi e sostanzialmente recepiti i vari pareri espressi dall'ISS sull'intera materia. In particolare il Consiglio raccomanda che:

- a) l'eventuale autorizzazione all'attivazione sperimentale degli impianti abbia carattere di temporaneità; i livelli produttivi siano contenuti al massimo e comunque commisurati al numero di prove d'impianto strettamente necessario, da effettuarsi in ogni caso sotto la sorveglianza dell'ISS;
- b) siano attuati a carico delle industrie produttrici, preventivamente all'attivazione degli impianti, esami clinici e immunologici dei gruppi di popolazione esposti ed in particolare delle maestranze addette, secondo un

piano la cui elaborazione e realizzazione sia seguita da una apposita Commissione medico-epidemiologica.

*18 febbraio.* - La Direzione generale dei servizi di igiene pubblica del Ministero della sanità, in accordo con le raccomandazioni del CSS (di cui trasmette copia integrale) relativamente alla formazione di una specifica Commissione medico-epidemiologica, invita i Ministeri dell'industria e del lavoro, i Presidenti delle Giunte regionali della Calabria e della Sardegna e l'ISS a voler procedere alla designazione dei propri esperti. Incarica inoltre l'Istituto della sorveglianza su tutta la sperimentazione industriale, in collaborazione con i competenti organi locali, nonché del controllo e della valutazione, periodici e sistematici, dell'attuazione del piano di tutela igienico-sanitaria.

*16 marzo.* - Il dr. D. G. Ahearn trasmette all'ISS un *formal report* sugli studi sperimentali di patogenicità eseguiti secondo le linee indicate dal *Piano sperimentale di massima per l'accertamento della patogenicità diretta delle Candide*.

*31 marzo-1° aprile.* - Si tiene a Milano il simposio *Investigations on single cell proteins* organizzato dall'Istituto di ricerche farmacologiche « Mario Negri » in collaborazione con il Protein-Advisory Group (PAG) dell'ONU. In occasione di tale simposio viene tenuta una riunione del *PAG Working Group on Single-cell Proteins*, conclusosi con la stesura di un rapporto che ripropone alcune delle più rilevanti valutazioni igienico-sanitarie sollevate dall'ISS. Il rapporto infatti sottolinea, tra l'altro, la necessità di determinare *a priori* la non patogenicità dei microorganismi impiegati, di adottare adeguate misure di protezione ambientale, di sviluppare metodologie per la valutazione dei rischi di ipersensibilizzazione sia dei lavoratori addetti alla produzione sia degli eventuali consumatori dei prodotti finiti.

*6 aprile.* - L'ISS comunica al Ministro per la sanità la designazione dei proff. N. Frontali del Laboratorio di igiene del lavoro, G. Vicari del Laboratorio di biologia cellulare e immunologia e A. Zampieri del Laboratorio di epidemiologia e biostatistica, quali propri esperti nell'ambito della Commissione medico-epidemiologica.

*20 aprile.* - Presso la Direzione generale delle fonti di energia e industrie di base del Ministero dell'industria, si tiene una riunione interministeriale di coordinamento per l'esame dei problemi relativi alla produzione di bioproteine da n-alcani nonché all'attuazione dei piani di tutela igienico-sanitaria, cui sono chiamati a partecipare rappresentanti dell'ISS, delle Regioni interessate e delle Società Italproteine e Liquichimica.

22 aprile. - L'Italproteine, anche in riferimento a quanto discusso nel corso della riunione del 20 aprile presso il Ministero dell'industria ribadisce in una sua nota che: a) lo stabilimento di Sarroch risponde alle norme di legge in vigore; b) sono stati studiati alcuni miglioramenti tecnici degli impianti e sono in via di allestimento unità di controllo e metodi di determinazione delle immissioni nell'ambiente; c) sono in corso di attuazione esami di selezione preventiva del personale, di tipo clinico-immunologico, seguiti dall'istituzione per ogni lavoratore prescelto di una apposita cartella mirata. L'Italproteine sollecita inoltre l'autorizzazione alla riattivazione dei propri impianti limitatamente alla produzione sperimentale, nella misura già autorizzata dal Ministero dell'industria di 40.000 tonnellate/anno.

23 maggio. - L'Italproteine trasmette il piano di tutela igienico-sanitaria concernente lo stabilimento di Sarroch, sollecitando al contempo la formazione della Commissione medico-epidemiologica, raccomandata dal CSS.

14 giugno. - La Liquichimica trasmette la documentazione riassuntiva degli esperimenti compiuti sia con il prodotto Kaneptron che con il prodotto Liquipron, suddivisa in dieci volumi.

16 giugno. - Si tiene presso l'ISS un incontro tra esperti dello stesso Istituto e della Regione Calabria, nel corso del quale i rappresentanti regionali consegnano uno schema per il monitoraggio ed il controllo di  $SO_2$ , polveri e lieviti vitali, nonché uno studio sulle condizioni meteorologiche prevalenti nella zona di Saline di Montebello Ionico, ove sono ubicati gli impianti della Liquichimica.

20 giugno. - Viene consegnata all'Istituto una bozza di proposta di piano di controllo epidemiologico, predisposta dalla Regione Calabria, concernente l'insediamento industriale della Liquichimica.

21 giugno. - Viene effettuato, a cura di esperti dell'ISS, un sopralluogo agli impianti Italproteine di Sarroch per verificare il grado di realizzazione delle misure di salvaguardia ambientale annunciate in data 22 aprile 1977 con nota della Ditta stessa.

30 giugno. - L'Assessorato alla sanità della Regione Calabria comunica all'ISS che provvederà a periodici controlli dei parametri indici di inquinamento, relativi agli effluenti gassosi, liquidi e solidi, nella zona di ubicazione degli impianti produttivi della Liquichimica.

6 luglio. - Pubblicazione sulla Gazzetta Ufficiale del D.M. 21 giugno 1977 relativo a *Misure di tutela igienico-sanitaria ed ambientale connesse alla produzione di bioproteine (Appendice VI)*.

**19 luglio.** – Prima riunione della Commissione medico-epidemiologica proposta dal CSS e prevista dall'art. 2 del D.M. 21 giugno 1977. La Commissione risulta composta come segue: prof. A. Beretta-Anguissola (Presidente); proff. N. Frontali, G. Vicari, A. Zampieri (ISS); dr.ssa C. Celani (Ministero del lavoro e della previdenza sociale); ing. S. Razzano (Ministero dell'industria, del commercio e dell'artigianato); prof. L. Frezza (Medico provinciale, Reggio Calabria); prof. A. Spinazzola (Istituto di medicina del lavoro, Università di Cagliari); prof. D. Mura (Istituto zooprofilattico sperimentale, Sassari). Nel corso della riunione i rappresentanti dell'ISS presentano una bozza di piano di controllo clinico-immunologico, elaborata tenendo conto delle proposte formulate sia dalla Regione Calabria che dall'Italproteine.

**20 luglio.** – L'Italproteine invia all'ISS una documentazione riguardante le caratteristiche tecnico-funzionali delle nuove installazioni progettate ed in fase di realizzazione per l'adeguamento dei propri impianti alle prescrizioni dell'Autorità sanitaria.

**27-28 luglio.** – La Commissione medico-epidemiologica visita i presidi igienico-sanitari di Cagliari e Reggio Calabria specificamente previsti per l'attuazione a livello regionale dei piani di tutela ambientali.

**1° agosto.** – L'ISS trasmette agli organi centrali e regionali competenti, nonché alle industrie interessate, uno schema unificato di piano igienico-sanitario relativo ai controlli clinici e di laboratorio per gli addetti agli impianti produttivi.

**2 agosto.** – L'ISS trasmette agli organi centrali e regionali competenti, nonché alle industrie interessate, distinti e dettagliati pareri circa le modifiche da apportare agli impianti rispettivamente ubicati in Saline di Montebello Ionico e in Sarroch prima della loro attivazione, al fine di renderli compatibili con le esigenze di salvaguardia ambientale e igienico-sanitaria delle popolazioni circostanti e dei lavoratori addetti. L'Istituto esprime inoltre parere sui piani predisposti dall'Italproteine e dalla Liquichimica, per il rilevamento dei contaminanti emessi dai rispettivi impianti.

**16 settembre.** – La Liquichimica consegna due volumi aggiuntivi contenenti ulteriore documentazione circa gli esperimenti di tossicità effettuati su ratti e conigli.

**23 settembre.** – Riunione della Commissione medico-epidemiologica in cui viene approvata la scheda sanitaria definitiva da utilizzare per la sorveglianza clinico-immunologica delle maestranze addette alla produzione.

26 settembre-6 ottobre. - Nel corso di due successivi sopralluoghi agli stabilimenti di Sarroch, l'Ispettorato provinciale del lavoro di Cagliari verifica che l'Italproteine non ha ancora completato le modifiche tecnico-funzionali degli impianti necessarie per il loro adeguamento alle misure cautelative raccomandate dall'ISS e previste dal D.M. 21 giugno 1977.

17 ottobre. - La Commissione medico-epidemiologica affronta i problemi relativi ai controlli da effettuarsi sulle popolazioni residenti nelle aree circostanti gli impianti produttivi.

18 ottobre. - L'Italproteine trasmette all'ISS una versione in cinque volumi, rielaborata ed integrata, della documentazione complessiva riguardante la produzione di Toprina. Da notare che in tale nuova versione il ceppo di *C. lipolytica* da utilizzarsi per la produzione, viene indicato con le sigle G 162 e CBS 6331, nessuna delle quali corrisponde, almeno formalmente, alla sigla BP 269 con la quale è contrassegnato il ceppo depositato in precedenza dalla stessa Italproteine presso l'ISS. Dalla documentazione risulta che tale ceppo è stato sottoposto a prove di patogenicità dal prof. Gargani, dello Istituto di microbiologia dell'Università di Firenze, del quale viene acclusa una relazione preliminare che conclude affermando che i comportamenti della *C. lipolytica* e della *Candida utilis* sono sovrapponibili, con permanenza di un certo numero di elementi fungini vivi (in misura maggiore per la *C. utilis*) negli organi degli animali inoculati, almeno fino a 15 giorni dall'inoculazione, e scomparsa degli stessi fra i 15 e i 30 giorni.

5 novembre. - L'ISS esprime il proprio parere circa l'ammissibilità in alimentazione animale del Liquipron, dopo aver verificato la significatività e l'adeguatezza dell'intera documentazione presentata dalla Liquichimica in riferimento alle *Linee di ricerca sperimentali per l'esame delle cosiddette bioproteine (SCP) ai fini della ammissibilità nell'alimentazione animale* approvate dal CSS. Gli elementi essenziali di tale parere possono essere così delineati. Viene innanzitutto rilevata una variazione significativa nel contenuto di numerosi componenti, quali ad esempio oligoelementi, acidi grassi, n-alcani. ecc., tra lotti diversi di prodotto finito, sostanzialmente espressione di una non completa standardizzazione del processo produttivo. In particolare, per taluni lotti di Liquipron i livelli di alcuni oligoelementi (Cd, Se, Sb) sono superiori a quelli massimi previsti dal D.M. 2 febbraio 1974, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 74 del 20 marzo 1974. Preoccupazione desta, inoltre, il fatto che in alcuni lotti siano stati dosati livelli di 3,4-benzopirene non compatibili con quanto stabilito dal CSS nel parere formulato il 18 giugno 1975, secondo cui tale composto deve risultare assente all'analisi con un

metodo di sensibilità pari almeno ad 1 ppb. I dosaggi effettuati dall'Istituto su alcuni campioni indicano un contenuto di n-alcani pari a 0,35-0,38 % (cioè valori sensibilmente superiori a quelli dichiarati) e di 3,4-benzopirene pari a 1,0-1,2 ppb. Il contenuto di acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio del Liquipron è molto elevato e comparabile a quello della Toprina. Per quanto attiene alla presenza di contaminanti, viene altresì sottolineato il riscontro di enterobatteri nei campioni esaminati. Si osserva ancora che gli studi condotti sia su animali da esperimento (ratto, topo, scimmia) che su specie a reddito zootecnico (pollo, suino, visone e pesci), forniscono indicazioni di un difficile adattamento al consumo di diete contenenti la biomassa in questione, specie ad elevati livelli di integrazione; tale difficoltà si esprime in un temporaneo ridotto consumo dell'alimento ed in un conseguente minore incremento ponderale. Studi di tossicità sul ratto evidenziano che la somministrazione della biomassa provoca alcune modificazioni di parametri ematici, parte delle quali tende ad annullarsi con il prolungarsi del periodo di trattamento. Viene anche rilevato che in tali studi si sono osservate modificazioni nel peso di alcune ghiandole endocrine ed organi, nonchè fenomeni di tesaurosi calcica. In particolare, la diminuzione di peso delle gonadi ( $\sim 15\%$ ) e l'aumento di peso della prostata ( $\sim 25\%$ ) e dell'ipofisi ( $\sim 200\%$ ), appaiono costanti per presenza ed entità dopo 24 mesi di somministrazione. Studi a lungo termine effettuati sul pollo indicano che ad un livello pari al 50 % delle proteine della dieta, il Liquipron determina minore accrescimento corporeo a parità di ingestione di mangime. Essi inoltre confermano alcune delle transitorie variazioni nei parametri ematici e le alterazioni nel peso di alcune ghiandole ed organi. Per quanto riguarda i risultati relativi al dosaggio dei residui (n-paraffine, acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio, ecc.), e alle prove di teratogenesi e di tossicità di *relais* previste dal protocollo del CSS, si rileva la scarsità dei dati presentati. I risultati disponibili circa gli esperimenti di tossicità cronica indicano che in alcuni esigui gruppi di ratti, sacrificati prima della fine dell'esperimento, la frequenza dei tumori ipofisari e mammari è più elevata fra gli animali trattati con il Liquipron. Inoltre, sia nei maschi che nelle femmine trattati con la dose massima di Liquipron si sono riscontrati, sia pure con frequenza limitata, tipi di tumori assenti negli animali di controllo. Dato l'esiguo numero di animali esaminati, ed il carattere incompleto della sperimentazione, si sottolinea la necessità di acquisire i dati conclusivi relativi alla sperimentazione a 30 mesi. Per quanto riguarda la valutazione della sperimentazione di cocancerogenesi, si rileva la limitata significatività della documentazione prodotta a causa del fatto che i livelli di agenti cancerogeni utilizzati (DMBA e MC) sono superiori a quelli ottimali per evidenziare la presenza di agenti cocancerogeni. Per quanto riguarda gli esperimenti di mutagenesi, si rileva l'assenza di qualsiasi documentazione in merito.

9 novembre. – Assemblea generale del CSS convocata per esprimere un parere sull'ammissibilità in alimentazione zootecnica dei prodotti Toprina e Liquipron.

L'assemblea procede ad una discussione globale sia dell'intera documentazione disponibile sui due prodotti, sia dei vari pareri espressi dall'ISS sui diversi aspetti di interesse sanitario. Tale ampia disamina porta ad individuare, quali temi principali che necessitano un ulteriore approfondimento da realizzarsi come proposto dall'ISS anche con il contributo di specifici esperti di settore i due seguenti:

a) la valutazione delle sperimentazioni di oncogenesi effettuate sulle biomasse ed in particolare l'approfondimento dell'eventuale rischio oncogeno associato ai residui di n-alcanti presenti nei tessuti degli animali trattati:

b) la valutazione del significato biologico degli acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio presenti nei tessuti di animali trattati, in riferimento al consumo da parte dell'uomo di produzione zootecnica ottenuta mediante l'impiego di mangimi addizionati con le biomasse.

Al fine di realizzare il necessario approfondimento di tali aspetti, l'assemblea propone la costituzione di una apposita Commissione di studio operante nell'ambito del CSS. La presidenza di tale Commissione, successivamente nominata dal Ministro per la sanità, sarà conferita allo stesso Presidente del Consiglio superiore di sanità, prof. A. Cimmino. La Commissione verrà articolata in due sottogruppi: uno relativo agli aspetti di oncogenesi e mutagenesi composto dai proff. A. Cimmino (Presidente), A. Carere, G. Della Porta, S. Garattini, G. G. Giordano, D. Guerritore, N. Loprieno, C. Maltoni, F. Manzoli, G. Pontieri, G. Prodi, R. Zito; l'altro agli aspetti biochimico-metabolici riguardanti gli acidi grassi dispari, composto dai proff. A. Cimmino (Presidente), Castelli, S. Garattini, A. Mariani, M. Rossi Fanelli.

Per quanto riguarda il punto a) viene inoltre proposto ad esperti oncologi l'incarico di procedere ad un accurato esame collegiale dei reperti autoptici relativi agli animali sottoposti a sperimentazione, allo scopo di pervenire ad una interpretazione univoca dei risultati, con particolare riferimento alla natura dei fenomeni neoplastici riscontrati.

10 novembre. – La Commissione medico-epidemiologica completa l'elaborazione di una scheda sanitaria da impiegarsi per l'effettuazione di periodici controlli clinico-immunologici sulla popolazione esposta a materiali provenienti dalle industrie per la produzione di bioproteine.

25 novembre. – La Liquichimica consegna all'Istituto Superiore di Sanità la documentazione relativa alle prove di *tossicità di relais* eseguite.

1° dicembre. - La Direzione generale dei servizi di igiene pubblica del Ministero della sanità trasmette alle Amministrazioni centrali e regionali competenti ed alle industrie interessate copia della scheda sanitaria per la popolazione esposta, definita dalla Commissione medico-epidemiologica,

1978.

27-28 febbraio. - Vengono convocate rispettivamente la Commissione relatrice e l'Assemblea generale del CSS. La prima giornata dei lavori viene dedicata all'esame delle risoluzioni dei sottogruppi di esperti operanti nell'ambito della Commissione Cimmino. Il sottogruppo *oncogenesi e mutagenesi* aveva espresso unanimemente il parere che una eventuale autorizzazione alla produzione e all'uso delle biomasse in questione potesse essere concessa limitatamente ad alcune specie animali per un periodo non superiore a quattro anni, al termine del quale avrebbe dovuto essere comunque riesaminata l'intera materia (*Appendice VII*). Raccomandava in conseguenza di vincolare la concessione dell'eventuale autorizzazione alla realizzazione, da parte delle ditte interessate, di ulteriori ricerche di cancerogenesi, mutagenesi e tossicità, utilizzando secondo i casi le biomasse, le produzioni zootecniche e le classi di composti chimici presenti nelle biomasse stesse. Sottolineava infine che dovranno comunque essere adottate limitazioni e restrizioni d'uso atte a prevenire un'aumento dell'assunzione dietetica di n-alcani. Il sottogruppo *biochimica* aveva espresso unanimemente il parere che i livelli di acidi grassi dispari rinvenibili nelle carni e negli organi degli animali allevati con le biomasse in questione, ad eccezione delle mucche lattifere e delle galline ovaiole, non presentavano problemi degni di rilievo per la salute dell'uomo (*Appendice VIII*). In ogni caso il gruppo consigliava di adottare un congruo periodo di sospensione della somministrazione delle biomasse stesse prima della macellazione e di effettuare ulteriori ricerche sul significato biologico degli acidi grassi dispari. Tali pareri vengono estesamente discussi sia in sede di Commissione relatrice che in sede di Assemblea, ma non si perviene ad alcun parere definitivo.

4 marzo. - Viene riconvocata la Commissione relatrice del CSS per la stesura di una risoluzione conclusiva sulle *bioproteine* che tenga conto degli elementi emersi nelle precedenti discussioni del 27-28 febbraio. La Commissione relatrice facendo proprie nella sostanza le osservazioni dell'Istituto decide di proporre all'Assemblea del CSS di esprimere parere favorevole all'utilizzazione del Liquipron e della Toprina in alimentazione animale, subordinatamente all'indicazione di: a) definite specifiche tecniche e caratteristiche di qualità per tali prodotti; b) precise limitazioni e restrizioni d'uso

(si propone non più del 10 % del mangime somministrato per i volatili di allevamento, ad esclusione delle ovaiole e non più del 7 % per i suini: si raccomanda inoltre che l'utilizzazione delle biomasse in questione sia consentita per un periodo non superiore alla prima metà del ciclo produttivo di ciascuna specie animale); c) apposite norme di confezionamento ed etichettaggio; d) idonei controlli da effettuarsi sia a livello produttivo sia sull'osservanza delle norme indicate (*Appendice IX*).

22 marzo. - La Liquichimica, a completamento della propria documentazione, trasmette ufficialmente altri due volumi che, tra l'altro, contengono i risultati definitivi di uno studio di tossicità a lungo termine sul ratto.

5 maggio. - L'Istituto, in riferimento ad una richiesta in tal senso pervenuta in data 4 aprile, trasmette al Ministro per la sanità *pro tempore* una relazione riassuntiva dei problemi igienico-sanitari connessi con la produzione e la commercializzazione delle biomasse Liquepron e Toprina.

A parere dell'Istituto l'intenso lavoro svolto, ha da un lato consentito di impostare sul piano igienico-sanitario il problema *bioproteine* nel suo complesso in modo adeguato e scientificamente corretto, ed ha dall'altro posto le premesse indispensabili per l'emanazione di una serie di dovuti provvedimenti amministrativi idonei a tutelare la salute pubblica nella previsione di una successiva attivazione degli impianti produttivi. Tali provvedimenti hanno consentito più in particolare di minimizzare il rischio per l'ambiente e per la salute degli addetti agli impianti nonché delle eventuali popolazioni esposte. Resta invece ancora da definire sul piano amministrativo un provvedimento che risponda alle esigenze di tutela della salute dei consumatori di prodotti zootecnici ottenuti utilizzando le biomasse in questione. Tale provvedimento dovrebbe precisare: a) i ceppi di microrganismi consentiti; b) le caratteristiche analitiche delle biomasse; c) le specie animali, con particolare riguardo a quelle di rilevanza zootecnica, per le quali si autorizza l'uso delle biomasse, accompagnate dall'indicazione delle relative dosi e modalità di somministrazione; d) le norme di confezionamento e commercializzazione delle biomasse stesse; e) l'indicazione delle ulteriori ricerche necessarie per una revisione delle limitazioni e restrizioni d'uso di cui al punto c).

Si sottolinea che, sulla base delle conoscenze fino ad oggi acquisite, sono da considerarsi disponibili soluzioni tecniche valide in riferimento ai precedenti punti a), b), d), e). Restano invece aperte alcune questioni relative al punto c), ed in particolare quelle correlate alla valutazione del rischio oncogeno, per la cui definizione l'ISS sensibilizzò il Ministro della sanità *pro tempore* che, accogliendo la richiesta, convocò l'apposita Commissione già ricordata. È parere dell'ISS che il documento finale (*Appendice VII*) del sottogruppo di esperti oncologi operante nell'ambito della suddetta Commissione, unitamente ad alcune specificazioni successivamente fornite dagli

stessi esperti in sede di CSS, configuri in modo chiaro le modalità di utilizzazione delle biomasse in alimentazione animale ritenute accettabili dagli stessi esperti e tali da poter soddisfare i quesiti posti in tal senso dall'Amministrazione. Tali modalità includono l'individuazione dei limiti temporali per la somministrazione dei prodotti e delle dosi massime da somministrare, anche allo scopo di impedire un aumento nell'assunzione di n-paraffine attraverso la dieta.

Pertanto, la notevole e costruttiva mole di lavoro svolta era stata almeno parzialmente recepita nel documento elaborato dalla Commissione relatrice (*Appendice IX*) del CSS riunitasi in data 4 marzo 1978.

A conclusione di quanto sopra esposto, l'ISS riteneva opportuno ribadire come l'attività fino ad allora svolta, nonostante le persistenti note carenze di tecnici qualificati in alcuni settori, avesse obbiettivamente reso già disponibili, anche attraverso i numerosi interventi effettuati nelle diverse sedi, adeguati elementi di valutazione igienico-sanitaria per una definizione sul piano amministrativo dei provvedimenti relativi alla problematica delle biomasse.

*28 giugno.* - Assemblea generale del CSS convocata per esprimere un parere definitivo sulla utilizzazione in alimentazione animale delle biomasse Liquipron e Toprina.

L'Assemblea generale conclude i propri lavori, eludendo sostanzialmente le proposte avanzate dalla Commissione relatrice in data 4 marzo 1978 e limitandosi ad esprimere parere favorevole all'utilizzazione delle biomasse per l'alimentazione dei soli animali da tiro, da affezione e da pelliccia (*Appendice X*).

1979.

*26 novembre.* - D.M. relativo a: *Soppressione della voce n. 67 relativa alla sostanza denominata Toprina dall'elenco dei prodotti di origine minerale e chimico-industriali di cui al decreto ministeriale 30 luglio 1969 e revoca del decreto ministeriale 14 novembre 1972, modificato dal decreto ministeriale 2 febbraio 1974, concernente l'inclusione della Toprina nell'elenco dei prodotti di origine minerale e chimico-industriali che possono essere impiegati nell'alimentazione degli animali.* (*Appendice XI*).

#### ASPETTI SCIENTIFICO-SANITARI

##### TASSONOMIA E PATOGENICITÀ DEL GENERE CANDIDA

Come è ben noto, la classificazione degli esseri viventi è basata sulla definizione e correlazione delle loro proprietà. Nel caso dei microorganismi i criteri tassonomici classici si basano sulle caratteristiche morfologiche e

di crescita e sulle proprietà biochimico-fisiologiche. Nei lieviti, ad esempio, le famiglie sono relativamente ben definite dalla riproduzione vegetativa, dalla forma delle spore, dalla presenza di micelio e dalla capacità di assimilare i nitrati; all'interno del genere, invece, la definizione di specie non risulta altrettanto semplice a causa della diversità di risultati ottenibili per taluni caratteri e della difficoltà di stabilire un ordine di priorità fra i vari caratteri utilizzabili. Anche in considerazione dell'inadeguata standardizzazione di alcune prove tassonomiche, ed in particolare di quelle di natura più qualitativa, si può giungere paradossalmente, privilegiando alcuni caratteri rispetto ad altri, a contrastanti definizioni di specie. È noto dalla letteratura che, nei microorganismi in genere, un singolo carattere, quale l'assenza di crescita su un determinato substrato, può non essere risolutivo per l'attribuzione di specie, ma essere espressione di differenze genotipiche, che danno origine a possibili alternative metaboliche quali la mancata sintesi di una permeasi specifica, la mancata sintesi dell'enzima necessario per metabolizzare il substrato, l'inibizione della sintesi dell'enzima specifico da parte del repressore. Anche allo scopo di superare tali limitazioni sono stati sviluppati negli ultimi anni nuovi criteri di classificazione. Tra questi si possono ricordare quelli basati sul grado di omologia genetica, sulle proprietà antigeniche, sulla natura dei polisaccaridi di membrana quale determinabile mediante analisi NMR, sull'analogia di sequenze amminoacidiche di specifici enzimi, ecc.

Nel periodo novembre 1972-aprile 1974 veniva sottoposta al parere dell'ISS la documentazione tecnica della Liquichimica, contenente, tra l'altro, la descrizione delle caratteristiche del ceppo che si intendeva utilizzare per la produzione del Liquipron. Secondo la Ditta il ceppo apparteneva ad una nuova specie di *Candida* (denominata *C. novellus*).

L'ISS tuttavia giudicò la documentazione prodotta un supporto non adeguato per dimostrare l'attribuzione di specie proposta. Solo in data 11 aprile 1974 la Liquichimica provvedeva a consegnare il ceppo in questione all'ISS allo scopo di consentire l'effettuazione dei test di classificazione, accettati internazionalmente, secondo le metodiche descritte da J. Lodder [1]. I risultati, ottenuti dal gruppo di ricercatori diretto dal prof. Tonolo, indicarono l'appartenenza del ceppo *C. novellus* alla specie *C. tropicalis*.

Essendo noto dalla letteratura che in alcuni stati patologici la *C. tropicalis* può essere isolata da reperti umani, i risultati ottenuti dall'ISS sollevavano fondati dubbi sulla sicurezza dell'utilizzazione industriale del ceppo *C. novellus*.

Successivamente la Liquichimica rinunciava a sostenere la tesi dell'appartenenza del ceppo ad una nuova specie e comunicava che, secondo il Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), il ceppo stesso dovesse essere considerato appartenente alla specie *C. sakei*. Persistendo le difformità di valu-

tazione in relazione alla classificazione in questione, la Liquichimica sollecitò il contributo di due istituzioni scientifiche di riconosciuto valore internazionale, l'American Type Culture Collection (ATCC) e la Georgia State University, in cui erano allo studio nuove metodiche tassonomiche.

Nel gennaio 1975 la Liquichimica presentò all'ISS un rapporto congiunto di ricercatori dei tre Istituti summenzionati. La relazione, intitolata *The taxonomy of Candida novellus ATCC 20275, the strain used by Liquichimica Biosintesi to produce Liquipron*, firmata da G. Ahearn, S. A. Meyer, D. Yarrow riferiva i risultati di saggi tassonomici sia di tipo classico [1] sia di nuova acquisizione, come la determinazione della composizione media in basi del DNA ed i saggi di ibridazione [2].

I risultati presentati possono essere così riassunti:

a) l'incapacità di assimilare amido solubile è un carattere comune di ceppi di *C. novellus*, *C. subtropicalis*, *C. maltosa* e *C. cloacae*, mentre la capacità di assimilarlo appare un carattere costante dei ceppi classificati tradizionalmente come *C. tropicalis*;

b) la temperatura massima di crescita dei ceppi di *C. novellus*, *C. subtropicalis*, *C. maltosa* e *C. cloacae*, compresa tra 38 °C e 42 °C, distingue questi ceppi da quelli classificati tradizionalmente come *C. saké*, che hanno temperature massime tra 28 °C e 34 °C, ma non dai ceppi di *C. tropicalis* (40-43 °C). Va notato che i ceppi *C. maltosa* ATCC 28140 e *C. cloacae* ATCC 20184 erano originariamente indicati come *C. saké*;

c) le prove serologiche indicano identità tra il ceppo *C. novellus* ed un ceppo di *C. subtropicalis* (CBS 6465), il cui antisiero riconosce a sua volta uno dei 2 o 3 antigeni identificati per 2 ceppi di *C. tropicalis*;

d) la composizione media in GC oscilla tra 38 e 41 % in 10 ceppi di *C. saké*, tra 35 e 36 % in tre ceppi di *C. tropicalis*, e tra 35 e 37 % in *C. subtropicalis* (2 ceppi), *C. maltosa*, *C. cloacae* e *C. novellus*. Questi dati evidenziano dunque una differenza tra i ceppi di *C. saké* e tutti gli altri ceppi saggiati, mentre non permettono di distinguere i ceppi di *C. tropicalis* dai restanti ceppi;

e) le differenze genetiche saggiate con prove di ibridazione DNADNA tra nove ceppi di *C. saké* e ciascuno degli altri ceppi citati sono notevoli, essendo infatti i livelli medi di omologia del 12 %. Va qui sottolineato che l'omologia genetica tra i ceppi di *C. saké* è stata saggiata solo in due ibridazioni (ATCC 14478/CBS 6717 e ATCC 14478/CBS 6716);

f) i ceppi denominati *C. novellus*, *C. maltosa*, *C. subtropicalis* e *C. cloacae* mostrano tra loro un'omologia genetica del 100 %; questi stessi ceppi mostrano in media un livello di ibridazione del 25 % con il ceppo di *C. tro-*

*picalis* ATCC 750, il quale a sua volta ibridizza al 90-100 % con altri due ceppi di *C. tropicalis*.

La relazione giunge alla conclusione che *C. novellus*, *C. subtropicalis*, *C. maltosa* e *C. cloacae* fanno parte di una stessa specie, per la quale viene proposta la denominazione *C. maltosa*, in base alla nomenclatura adottata per il ceppo, tra questi, registrato per primo.

È opportuno chiarire come la classificazione basata sull'omologia genetica, misurata con il metodo della ibridazione del DNA, può fornire indicazioni diverse da quelle basate sui test classici. Non sono infatti rari i casi descritti in letteratura in cui nell'ambito di una specie apparentemente ben definita dal punto di vista fenotipico, sono stati riscontrati due o più gruppi di omologia. Numerosissimi sono poi i casi di ceppi che, classificati fenotipicamente in un gruppo, hanno dimostrato di non possedere alcuna omologia con gli altri ceppi dello stesso raggruppamento (ne sono un esempio i casi descritti dal rapporto in esame, relativi ai ceppi di *C. cloacae* ATCC 20184 e di *C. maltosa* ATCC 28140 inizialmente identificati fenotipicamente come appartenenti alla specie *C. saké*, con cui hanno, secondo i dati riportati, livelli di omologie intorno al 10 %).

La relazione riporta che il DNA di *C. novellus* ibridizza meno del 30 % con quello di un ceppo di *C. tropicalis*, il quale a sua volta ibridizza al 90-100 % con altri due ceppi. Tale risultato appare criticabile per i seguenti aspetti: a) rappresentatività dal punto di vista genetico dei tre ceppi utilizzati, nei riguardi della specie *C. tropicalis*; b) univocità di specie della *C. tropicalis* dal punto di vista genetico; c) distribuzione dei ceppi patogeni nei nuovi raggruppamenti tassonomici ottenibili per omologia genetica. È ovvio che la risposta a questi interrogativi può venire solo da una lunga ed approfondita indagine lungo le stesse linee sperimentali intraprese nel rapporto in esame.

In conclusione, la relazione non aggiunge elementi distintivi tra *C. novellus* e la specie *C. tropicalis*, sia per quanto concerne i test fenotipici, che per l'analisi della composizione in basi del DNA. Il contenuto medio in GC distingue *C. novellus* dalla specie *C. saké*, ma non dalla specie *C. tropicalis*. D'altronde le prove di ibridazione non indicano significativa omologia genetica della *C. novellus* rispetto a *C. saké* (12 % circa) e rispetto ad un ceppo di *C. tropicalis* (intorno al 25 %).

Sebbene il ceppo *C. novellus* sia quindi scarsamente correlato dal punto di vista genetico con l'unico ceppo di *C. tropicalis* saggiato (ATCC 750), è evidente, per le considerazioni precedentemente svolte, che l'assegnazione di un ceppo ad una determinata specie mediante il ricorso a questa nuova metodica, sarà possibile solo quando la stessa sarà stata estesa ad un suffi-

ciente numero di ceppi e ne sarà stata comunque riconosciuta la validità come test tassonomico discriminante.

Alla luce di quanto sopra, è stata riesaminata completamente la metodologia tradizionale di classificazione delle *Candida*, valutando, in particolare, tutti i contributi scientifici elaborati successivamente alle chiavi analitiche proposte e contenute nell'edizione del 1970 del testo di riferimento *The Yeasts* [1].

Inoltre sono state applicate metodiche rigorosamente quantitative, basate su un'analisi numerica dei risultati e tendenti a ridurre per quanto possibile i margini di interpretazione soggettiva. In particolare si è utilizzato un procedimento di analisi numerica analogo a quello che ha permesso alla Campbell [3] di raggruppare in sole 78, ben 104 specie di *Candida* descritte in letteratura come specie differenti. Il metodo è stato applicato all'analisi di 53 caratteri fenotipici del ceppo ATCC 20275 IS, differenziali sotto il profilo della morfologia, delle caratteristiche colturali, dei test di assimilazione e fermentazione di substrati carboniosi ed azotati, ecc. Il numero dei caratteri esaminati corrisponde a quello di tutti i test tassonomici per i quali erano stati ottenuti, per il ceppo ATCC 20275 IS, dati sperimentali da quattro laboratori differenti. Tali dati erano stati ottenuti rispettivamente dai proff. A. Tonolo e L. Tuttobello dell'ISS, dal prof. Gargani dell'Istituto di microbiologia dell'Università di Firenze, dalla dr. S. A. Meyer *et al.*, dell'ATCC, dal dr. T. Kaneko *et al.* per conto della Kanegafuchi Chemical Industry. I risultati dei tests sopraccitati sono stati confrontati sia tra loro, sia con quelli ottenuti da Kaneko *et al.* e da Meyer *et al.* per i ceppi di riferimento di *C. subtropicalis* e di *C. maltosa* da loro utilizzati, sia con quelli descritti da Lodder per 10 specie del genere *Candida*; tali specie, comprese dalla Campbell in un unico *cluster*, presentano, quanto ai loro caratteri tassonomici secondo Lodder, un coefficiente di sovrapposizione con *C. tropicalis* e *C. maltosa* del 50 % o più. Dal raffronto tra i dati disponibili è emerso che dei 53 caratteri presi in considerazione solo 21 di essi risultavano discriminanti nell'ambito delle specie prese in esame. Si è proceduto, quindi, alla messa a punto di un programma di calcolo elettronico, che permettesse di ricavare, sulla base dei 21 caratteri il coefficiente di sovrapposizione delle specie esaminate rispetto ai dati ottenuti dall'ISS sul ceppo ATCC 20275 IS. È stato riscontrato un ottimo livello di coincidenza tra i dati dell'ISS e quelli relativi allo stesso ceppo ottenuti nei laboratori dell'Istituto di microbiologia dell'Università di Firenze, dell'ATCC e della Kanegafuchi, anche se il numero di test distintivi di cui sono stati comunicati i risultati da parte di questi laboratori è stato di 8/21 nel primo, di 16/21 nel secondo e di 17/21 nel terzo. Al di là di questa pur importante precisazione, il risultato più significativo di tale analisi è stato la dimostrazione dell'elevata correlazione del ceppo ATCC 20275 IS sia con la specie *C. tropicalis* (90 %) che con la specie *C. saké* (86 %).

Questi risultati portavano l'Istituto ad esprimere nei termini che seguono il proprio parere: « Sulla base dei metodi tassonomici e dei caratteri morfologici, colturali, fermentativi, assimilativi, ecc., contenuti nel testo *The Yeasts* [1] il ceppo *C. novellus* ATCC 20275 IS presenta, fra tutte le specie riportate dal summenzionato testo, un'elevata correlazione non solo con la specie *C. tropicalis*, come precedentemente indicato, ma anche con la specie *C. saké*. L'entità di tali correlazioni non è, tuttavia, sufficiente per consentire un'univoca attribuzione di specie per il ceppo in oggetto che presenta alcuni significativi caratteri differenziali rispetto alle due specie in questione. Si rileva, inoltre, che recentemente alcuni ceppi in precedenza attribuiti alle specie *C. saké* e *C. tropicalis* sono stati riclassificati [2, 4-7] sulla base dei metodi proposti dal Lodder [1] e di nuovi metodi tassonomici. Secondo alcuni Autori [2, 4-7], le specie *C. subtropicalis*, *C. cloacae* e *C. maltosa*, che per il Lodder sono specie sinonime della *C. saké*, potrebbero essere classificate in una nuova specie distinta dalla *C. saké* con denominazione *C. maltosa*; questi Autori, inoltre, affermano che a questa nuova specie è da attribuire il ceppo *C. novellus* ATCC 20275 IS. In merito a questa proposta di nuova specie e relativa attribuzione ad essa del ceppo in oggetto, si rileva che solo pochi ceppi di microorganismi sono stati sottoposti ad investigazione con i metodi tassonomici aggiuntivi recentemente proposti. I dati preliminari disponibili non sono pertanto sufficienti per stabilire nuovi raggruppamenti tassonomici che, peraltro, devono in ogni caso subire il vaglio degli organismi nazionali ed internazionali competenti».

Tali conclusioni dell'ISS sono state confermate nella sostanza dagli esperti internazionali. Infatti dalla relazione tenuta dalla dr. S. A. Meyer al Simposio PAG di Milano del 31 marzo 1977, emergeva che: (a) in base alle prove di omologia genetica, il ceppo ATCC 20275 IS ibridizza al 100 % con le specie di riferimento *C. subtropicalis* e *C. cloacae*; b) *C. saké* come definita da Lodder è un conglomerato di specie; c) molte *C. tropicalis*, classificate come tali in base al Lodder, non ibridizzano con la *C. tropicalis* di riferimento. Questi risultati portavano la dr. S. A. Meyer a proporre da un lato di raggruppare ATCC 20275 IS, *C. maltosa*, *C. cloacae* e *C. tropicalis*, nella specie *C. subtropicalis* e dall'altro a concludere che i test di omologia genetica non sono in grado di discriminare singole mutazioni, e quindi le loro eventuali espressioni fenotipiche rilevanti ai fini sanitari. A tale proposito si possono citare le osservazioni fatte dalla stessa Meyer che riscontrava un'analogia genetica del 100 % tra la ben nota specie patogena per l'uomo, *C. albicans* e la specie *C. clausenii*, che non risulta sia stata identificata come agente patogeno per l'uomo, ed inoltre che ceppi differenti di *C. tropicalis* presentavano livelli di omologia significativamente diversi tra loro.

Quanto sopra esposto costituì una valida conferma *a posteriori* a quella parte del parere finale dell'ISS ove si affermava « Si precisa, infine, che il

previsto uso del ceppo in oggetto per produzioni industriali su larga scala impone un approfondito studio sperimentale per l'accertamento dell'innocuità, dato che le caratteristiche di patogenicità non sono strettamente correlate a quelle tassonomiche». È appunto in questa ottica che l'ISS elaborò, con il contributo di qualificati esperti italiani e stranieri, una serie di linee guida per la sperimentazione sulla patogenicità delle Candide che confluirono nel piano sperimentale riportato in *Appendice IV*, in cui vengono altresì indicati definiti criteri di valutazione dei possibili risultati.

Al termine delle sperimentazioni eseguite in conformità a tale piano, l'ISS formulò il proprio parere in merito alla patogenicità dei ceppi di *Candida* dei quali era stata proposta l'utilizzazione a livello produttivo. Tale parere, concludendo per l'assenza di patogenicità diretta dei ceppi in questione, metteva altresì in evidenza la possibilità di fenomeni di sensibilizzazione allergica per i lavoratori addetti agli impianti produttivi ed in genere per le popolazioni esposte, come indicato dai risultati sperimentali complessivamente acquisiti.

#### ACIDI GRASSI CON NUMERO DISPARI DI ATOMI DI CARBONIO

Gli acidi grassi con numero dispari di atomi di carbonio sono presenti in quantità relativamente basse nei mammiferi, mentre i lipidi dei pesci sia marini che d'acqua dolce ne contengono dal 2 al 6 % del totale, con l'eccezione della triglia in cui si raggiungono valori del 15-30 % secondo le stagioni [8, 9]. In generale gli acidi grassi con numero dispari di atomi di carbonio presentano in natura la stessa distribuzione dei pari, con quantità più elevate per gli acidi grassi a 15 e 17 atomi di carbonio e con quelli a catena più lunga (a 19 e 21 atomi di carbonio) essenzialmente polinsaturi. È stato dimostrato che gli acidi  $C_{19}$  e  $C_{21}$  polinsaturi vengono convertiti a prostaglandine attive, con un'attività pari al 40 % di quella dell'acido arachidonico [10]. Sotto questo profilo  $C_{19}$  e  $C_{21}$  polinsaturi si comportano come l'acido linoleico e possono essere considerati essenziali.

Più diffuse degli acidi grassi dispari sono, nel regno animale, le aldeidi grasse  $C_{15}$  e  $C_{17}$ . Sebbene le interrelazioni metaboliche tra acidi grassi ed aldeidi non siano ancora state chiarite, è noto che frazioni particolate di lievito sintetizzano aldeidi libere a partire da acetato, uno dei prodotti di degradazione degli *n*-alcani [11]. Quantità elevate di aldeidi a numero dispari di atomi di carbonio sono state identificate nel latte bovino [12] e nel burro [13], derivanti in larga misura dai batteri del ruminante [14].

I dati riportati in letteratura sulla composizione lipidica di diverse specie di lievito indicano che gli acidi grassi variano da  $C_8$  a  $C_{24}$  e sono tutti a numero pari di atomi di carbonio [15]. Livelli notevoli di acidi grassi dispari nei lieviti si trovano solo quando questi ultimi vengono coltivati su *n*-alcani.

L'incidenza nei lipidi di *Candida* di acidi grassi con lunghezza di catena corrispondente agli *n*-alcani presenti nel substrato suggerisce che gli *n*-alcani del substrato, dopo ossidazione in posizione terminale, sono incorporati direttamente nei lipidi. È interessante osservare che gli acidi grassi dispari saturi si trovano di preferenza nei trigliceridi, mentre gli acidi dispari insaturi si concentrano nei fosfolipidi. L'eccesso di acidi grassi dispari nei lipidi del Liquipron e della Toprina indica che il sistema endogeno di biosintesi degli acidi grassi pari deve essere parzialmente inattivo. Recentemente Gill e Ratledge [11] hanno infatti osservato che la sintesi *de novo* degli acidi grassi, in *Candida* coltivate su *n*-alcani, è completamente assente probabilmente a causa dell'inibizione della acetil-CoA carbossilasi. La presenza di un inibitore dell'acetil-CoA carbossilasi era suggerita dal fatto che aggiungendo estratti di *Candida*, coltivata su *n*-alcani, ad estratti di *Candida*, coltivate su glucosio, l'acetil-CoA carbossilasi di quest'ultima veniva totalmente inibita; l'attività di questo enzima veniva ripristinata per aggiunta di citrato, un noto attivatore allosterico [16]. I dati, ottenuti nella sperimentazione con le biomasse Liquipron e Toprina, non permettono tuttavia di verificare se tale eventuale inibitore venga assorbito dagli animali trattati e se possa in qualche modo alterare il metabolismo degli acidi grassi dei tessuti [17].

Nei tessuti degli animali alimentati con le biomasse, sono presenti gli stessi acidi grassi dispari contenuti nel mangime. Caratteristica comune dei campioni esaminati è l'assenza di acidi grassi dispari  $C_{19}$  e  $C_{21}$ , sia saturi che insaturi. Il mancato allungamento degli acidi  $C_{15}$  e  $C_{17}$ , presenti nelle biomasse, non si osserva con gli omologhi pari.

Il flusso degli acidi grassi, sia liberi che esterificati, dai siti di assorbimento intestinale ai loci recettori sulla cellula ed all'interno della stessa, è determinato da una sovrapposizione di meccanismi biochimici, neuronali e circolatori, così complessi da rendere difficile l'interpretazione delle differenze osservate nell'accumulo di acidi dispari da parte dei vari tessuti degli animali alimentati con biomasse. Ad esempio, mentre nel lardo, nel cuore e nel muscolo gli acidi grassi dispari saturi ed insaturi mantengono lo stesso rapporto osservato nel mangime (1:3), nel fegato tale rapporto si sposta a favore degli acidi grassi saturi (p. 649). Il minore accumulo di acidi grassi dispari, osservato nel cervello, dipende dal fatto che il trasferimento degli acidi grassi dal plasma al cervello è funzione sia della lunghezza di catena che del grado di insaturazione [18].

Il significato biochimico e funzionale del più elevato contenuto di tali acidi grassi nei tessuti degli animali trattati con biomasse da *n*-alcani è difficile da valutare. È noto che aumentando la temperatura di una miscela acido-acqua, le catene carboniose fondono in un intervallo di temperatura caratteristico (temperatura di transizione), dipendente dalla lunghezza di catena. Tale temperatura di transizione per un acido grasso

insaturo con un doppio legame *cis* è sempre più bassa di quella del suo isomero *trans*, ed entrambi hanno temperature di transizione inferiori a quella del loro omologo saturo. Lo stesso fenomeno si verifica per gli acidi grassi dispari; l'acido pentadecanoico, ad esempio, ha una temperatura di transizione di 8 °C inferiore a quella del suo omologo pari, il palmitico. In una miscela complessa di lipidi, perciò, ad ogni data temperatura, ogni lipide si troverà nella fase liquido-cristallina (fluida) o nella fase cristallina, assumendo la conformazione termodinamicamente più stabile, in dipendenza del punto di transizione dei suoi acidi grassi [19].

La distribuzione degli acidi grassi nei lipidi naturali è tale che, alle temperature vitali, i lipidi di membrana sono allo stato liquido-cristallino (fluidi). Anche se i principi generali della costruzione di tale mosaico fluido nelle membrane non sono noti, vi è evidenza che la sostituzione degli acidi grassi naturali con acidi a catena più lunga, che rendono la membrana più « cristallina», porta alla lisi delle cellule [20]. L'importanza degli acidi grassi presenti nei lipidi di membrana in relazione alle proprietà funzionali e strutturali delle membrane biologiche, come permabilità ed attività enzimatiche è stato recentemente sottolineato da numerosi ricercatori [21-25], che hanno correlato la presenza di una fase lipidica fluida con i processi mediati dalla membrana.

Nei tessuti degli animali alimentati con le biomasse Liquipron e Toprina, vi è un aumento del contenuto in acidi grassi dispari, proporzionale alla quantità di acidi grassi dispari somministrati con la dieta. Tuttavia le concentrazioni risultanti nei tessuti sono tali da non permettere di evidenziare alterazioni nella fluidità della membrana con i metodi chimico-fisici oggi disponibili. Con tali metodi (NMR, EPR, CD, ORD, ecc.) è infatti possibile dimostrare un'alterazione della fluidità della membrana solo quando gli acidi grassi dispari rappresentano almeno il 20 % degli acidi grassi totali. Per tale motivo sono state intraprese ricerche volte a chiarire alcuni degli aspetti menzionati (Serlupi e Salvati, p. 447).

#### N-ALCANI

Gli idrocarburi saturi, e fra questi gli n-alcani, sono di norma presenti in tracce nei tessuti dell'uomo [26] e di altri mammiferi [27]. Essi, possono aumentare notevolmente in presenza di lesioni epatiche e spleniche, meningiomi, arteriosclerosi ecc. [28, 29].

In assenza di evidenze sperimentali che mostrino la possibilità della biosintesi di idrocarburi saturi e, in particolare, di n-alcani nei tessuti dei mammiferi, si deve ritenere che i reperti di idrocarburi saturi dei mammiferi

e di altre specie animali abbiano origine alimentare (vegetali commestibili). Nel caso dell'uomo, poi, si deve tener conto di idrocarburi saturi di origine geologica (olio minerale) usati come additivi alimentari o a scopo terapeutico [30]. Gli idrocarburi delle piante sono in prevalenza costituiti da n-paraffine da  $C_{23}$  a  $C_{35}$  con prevalenza di  $C_{19}$ , mentre l'olio minerale contiene percentuali variabili (13-49 %) di idrocarburi lineari e ramificati, di cicloalcani (21-26 %) e cicloalcani policondensati [31-33].

Chiare evidenze sperimentali dimostrano che l'assorbimento degli idrocarburi saturi attraverso la mucosa intestinale dei mammiferi è limitato essenzialmente dalla scarsa emulsionabilità nell'intestino [34, 35]. Ove gli idrocarburi saturi siano stati adeguatamente emulsionati prima della somministrazione, essi possono essere assorbiti in misura pari all'olio di oliva [36]. In ogni caso, rilevanti assorbimenti di paraffine si verificano anche in assenza di tali emulsioni, ove le quantità ingerite siano molto elevate [37].

Gli n-alcani da  $C_6$  a  $C_{29}$  possono essere attivamente metabolizzati in numerosi animali superiori come il pollo, il ratto, il topo, la capra, il bovino, ecc. [38-43]. In questo rispetto vi sono rilevanti differenze di specie, come risulta dal fatto che i volatili di allevamento sembrano dotati, rispetto alle altre specie, di una maggiore capacità metabolizzante degli n-alcani. Di norma il prodotto dell'ossidazione è l'acido grasso con un egual numero di atomi di carbonio e l'alcool corrispondente è un intermedio della ossidazione. Il sistema ossidativo delle n-paraffine sembra localizzato, come quello di numerosi altri composti e farmaci, nei microsomi ed è dipendente dal NADPH e dall' $O_2$ . L'organo deputato al metabolismo delle paraffine è il fegato, ma è stato osservato che alcuni n-alcani possono essere metabolizzati anche in organi diversi come il rene, il polmone e l'intestino [44-48].

Nessuna attività biologica è stata associata ai reperti di idrocarburi saturi rinvenuti nei tessuti dell'uomo e degli altri mammiferi. Studi *ad hoc* suggeriscono che gli n-alcani possano inibire gli enzimi mobilizzanti i lipidi e, pertanto, aggravare i sintomi arteriosclerotici in conigli in cui l'arteriosclerosi era stata indotta sperimentalmente [29]. È, inoltre, noto come un prolungato uso di olio minerale come lassativo possa interferire con l'assorbimento delle vitamine liposolubili [34].

Massive somministrazioni di olio minerale per tempi brevi (150 ml/kg per 15 giorni) nel ratto causano una diminuzione della crescita del 25 % non correlata ad una diminuzione del cibo ingerito. I ratti trattati inoltre hanno mostrato diuresi, polidipsia, proteinuria, alcalinuria, oltre che eccitamento maniaco, diarrea, lesioni della pelle ed alopecia. Il tratto intestinale, come quello gastrico e numerosi altri organi sono risultati infiammati e hanno rivelato una perdita di acqua. Scarse sono state le evidenze di fenomeni degenerativi [49].

L'inoculazione di olio minerale nel peritoneo di topi BALB/c produce tumori delle cellule plasmatiche, mentre in topi DBA/2 si sono osservati reticulosarcomi ed infiltrazioni leucemiche nel fegato ed in altri organi [50, 51]. Alcuni di questi neoplasmi sono stati trapiantati con successo. Neoplasmi delle cellule plasmatiche, simili a quelli causati dall'olio minerale, sono seguiti all'iniezione intraperitoneale di pristano (2, 6, 10, 14-tetra metilpentadecano) altamente purificato in topi femmine del tipo BALB/c AnN [52]. Una maggiore incidenza di cancro gastrointestinale sarebbe stata evidenziabile in consumatori di paraffina liquida a scopi lassativi [30].

Gli n-alcani da  $C_{10}$  a  $C_{20}$  hanno mostrato [53, 54] capacità di potenziare l'attività di sostanze cancerogene a seguito di applicazioni cutanee [55-57], ed in particolare il dodecano è risultato essere cocancerogeno del benzo-(A)-pirene. Recentemente è stato anche dimostrato che l'attività cocancerogena è funzione della lunghezza di catena degli n-alcani, aumentando fino al  $C_{18}$  per poi restare costante fino al  $C_{20}$  [58]. Si è visto che il decano, il dodecano ed il tetradecano sono in grado di potenziare l'effetto cancerogeno in topi trattati con raggi ultravioletti [59]. Si è inoltre osservata un'aumentata incidenza di tumori cutanei, indicativa di un'attività promotrice degli n-alcani [33, 54], in topi trattati preventivamente con dimetilaminoazobenzene e successivamente con n-alcani. Per attività promotrice si intende infatti la capacità di una sostanza di indurre tumori in animali trattati in precedenza con piccole dosi, ritenute non efficaci, di sostanze cancerogene.

È molto probabile che l'accumulo degli idrocarburi saturi nei tessuti dell'uomo sia dannoso. Anche se al momento non esistono prove risolutive per dimostrare l'attività cancerogena nell'uomo di idrocarburi saturi ingeriti per via orale, i dati disponibili in letteratura sono sufficienti per suscitare una ragionevole preoccupazione in merito e per imporre la necessità di ulteriori sperimentazioni. La possibile dannosità dell'accumulo di idrocarburi saturi non è, comunque, esclusivamente correlata ad una eventuale attività cancerogena. Infatti, i livelli degli idrocarburi in questione aumentano significativamente in presenza di alcuni stati patologici, e non è possibile escludere che essi possano essere in qualche modo responsabili dell'aggravamento dei sintomi di tali patologie. Inoltre, possibili contaminanti degli alimenti, come ad esempio il piperonilbutossido, possono influenzare la distribuzione nei tessuti degli n-alcani [47]. Anche se i tessuti dispongono di sistemi metabolizzanti localizzati nella frazione microsomiale, è evidente che tali sistemi detossificanti non sono adeguati a prevenire l'accumulo delle paraffine nei tessuti. Ciò è chiaramente mostrato, fra l'altro, dal fatto che, secondo studi condotti negli USA [26], i depositi di idrocarburi saturi nei tessuti umani sono in rapido e continuo aumento fin dal 1940; tali depositi sono stati rinvenuti in circa il 70 % dei linfonodi della vena porta ed in circa il 50 % delle milze rimosse dopo autopsia od operazione. Una delle cause di

tale fenomeno è stata appunto individuata nelle quantità di olio minerale introdotte nella catena alimentare sotto forma di additivi. Recentemente è stata pubblicata un'ampia rassegna [60] sulla distribuzione in natura delle n-paraffine, nella quale viene anche discusso il ruolo biologico delle n-paraffine, nonché il loro metabolismo.

La normativa e la legislazione sanitaria dovrebbero quindi essere ispirate alla prevenzione degli accumuli di idrocarburi saturi nei tessuti dell'uomo. Tale prevenzione può essere conseguita soltanto limitando l'ingestione degli idrocarburi in questione alle quantità che possono essere metabolizzate e che non lascino, quindi, residui nei tessuti.

#### IMPIANTI PER LA PRODUZIONE DELLE BIOMASSE

Le caratteristiche tecnologiche degli impianti, la loro elevata capacità produttiva, la natura dei microorganismi impiegati hanno determinato notevoli difficoltà per la valutazione del probabile, eventuale, impatto ambientale conseguente all'attivazione degli impianti stessi. Ad esempio, pur essendo le concentrazioni di alcuni inquinanti (ad es. rame usato come algicida) negli scarichi liquidi compatibili con quelle massime tollerate dalla normativa vigente, le quantità totali di tali contaminanti sversati nell'ambiente erano tali da poter creare rischi per l'ambiente stesso. Esiste, d'altronde, in tal senso un preciso orientamento comunitario, già concretizzato in una Direttiva CEE del maggio 1976, volta a contenere non solo le concentrazioni di specifici inquinanti negli scarichi, ma anche le quantità totali degli stessi, sversate nell'unità di tempo, in relazione alla capacità del corpo recipiente. Alla luce di simili considerazioni si è quindi reso necessario procedere ad una analisi dettagliata delle caratteristiche progettuali degli impianti ed in particolare degli aspetti concernenti gli effluenti liquidi e gassosi, nonché i rifiuti solidi. Da tale analisi è emersa da un lato la necessità di apportare agli impianti produttivi, preliminarmente alla loro attivazione, una serie di modifiche tali da renderli idonei sotto il profilo igienico-sanitario, dall'altro di elaborare specifici piani per il rilevamento dei livelli di contaminanti emessi dagli impianti stessi in previsione di un funzionamento a pieno regime.

La valutazione igienico-sanitaria degli impianti, per quanto concerne le polveri di lievito emesse nelle varie fasi di lavorazione, non poteva basarsi sul limite di accettabilità per la concentrazione al suolo delle polveri, stabilito dal regolamento di applicazione (D.P.R. n. 322 del 19 aprile 1971) della legge n. 615 del 13 luglio 1966, poichè non vi erano evidenze che provassero l'inerzia biologica di tali polveri. Non essendo cioè disponibili informazioni

adeguate per consentire di fissare limiti di accettabilità per tali tipi di polveri, non era sufficiente conformarsi ai limiti previsti dalla legge menzionata ma bisognava contenere tali emissioni al massimo in relazione alla migliore, moderna, tecnologia industriale.

Sotto questo profilo gli impianti per la produzione del Liquipron e della Toprina differivano sostanzialmente. Infatti, mentre nel caso del ciclo produttivo del Liquipron si aveva a che fare con un impianto praticamente a circuito chiuso per quanto riguarda il rilascio di lieviti vivi ed essiccati nell'ambiente (circa 6 kg di lieviti essiccati rilasciati al giorno), nel caso della Toprina le caratteristiche degli impianti (essiccamento, macinazione, agglomerazione) erano tali da causare il rilascio di circa 600 kg al giorno di lieviti essiccati. Inoltre, per questi ultimi impianti, i sistemi di abbattimento previsti non erano idonei a prevenire il trascinarsi, da parte dell'aria esausta in uscita dai fermentatori, di aerosol contenenti lieviti vitali propri del ciclo produttivo: l'entità di lieviti vitali rilasciati nell'ambiente era difficilmente valutabile teoricamente, ed avrebbe potuto essere determinata soltanto attraverso un controllo in continuo sull'impianto funzionante a pieno regime. Nonostante che una attivazione di tali impianti per un tempo definito fosse stata autorizzata nel 1976 dal Ministro per l'industria a scopo sperimentale, non furono mai resi disponibili significativi dati quantitativi in merito. L'ISS richiese, pertanto, una modifica degli impianti tale da realizzare l'efficace collettazione delle emissioni suddette ed il loro convogliamento ad un idoneo impianto di incenerimento.

La possibilità di una indesiderabile immissione nell'atmosfera di aerosol contenenti microorganismi vitali ed idrocarburi era inoltre presente, sia nell'impianto Italproteine che in quello Liquichimica, a livello degli impianti a fanghi attivi per la depurazione delle acque di scarico e delle vasche di raccolta e accumulo di eventuali fermentazioni anomale; tali impianti, infatti, erano entrambi previsti a cielo aperto. In considerazione dell'obiettiva difficoltà di valutare a priori l'idoneità degli impianti a fanghi attivi per la depurazione dei microorganismi propri della fermentazione, in particolare nelle circostanze di smaltimento di eventuali fermentazioni anomale, furono suggerite dall'ISS modifiche degli impianti che consentissero di separare e distruggere la fase particolata presente negli effluenti e di inviare all'impianto di depurazione la sola fase liquida.

Preoccupazioni di ordine ambientale derivavano inoltre dai trattamenti chimici alghicidi delle acque marine, utilizzate per gli impianti di raffreddamento a cielo aperto dei fermentatori, data l'elevata portata di sversamento a mare degli impianti stessi (circa 60 m<sup>3</sup>/s). Tali trattamenti, infatti, portavano al rilascio nell'ambiente marino di elevate quantità di agenti chimici. Da un lato, il sistema alghicida basato sulla produzione elettrolitica di ioni rame (sistema Italproteine) comportava

sversamenti a mare che, pur rientrando nei limiti di accettabilità previsti sia dalla legge regionale n. 16 del 1° agosto 1973 che dalla legge n. 319 del 19 maggio 1976, avrebbero causato il rilascio di circa 3.000 kg/anno ioni di rame con effetti non trascurabili sull'ecosistema marino recipiente. Dall'altro, il trattamento algicida con ipoclorito (sistema Liquichimica), del quale non era peraltro stata resa nota la concentrazione di impiego, prevedeva lo sversamento di non certo irrilevanti quantità di cloro attivo, la cui pericolosità poteva essere potenziata dalla capacità di formare composti anche più tossici, per reazione, ad esempio, con i residui di idrocarburi rilasciati dagli impianti stessi nell'ambiente marino. Tali riserve, riguardanti in generale lo sversamento globale nell'ambiente di inquinanti chimici tossici, anche se a concentrazioni tollerate dalle leggi vigenti, valgono ovviamente per qualsiasi impianto industriale che utilizzi e restituisca all'ambiente masse liquide di rilevante entità, come è stato peraltro recentemente sancito dalla Direttiva 76/464/CEE del Consiglio CEE del 4 maggio 1976 (*Gazzetta ufficiale* CEE L 129 del 18 maggio 1976). Può essere sottolineata a tal proposito l'esistenza di sistemi alternativi antincrostazione, di tipo meccanico, capaci di garantire l'idoneo funzionamento di tali sistemi di raffreddamento.

Oltre a quelle relative ai possibili inquinamenti chimici, furono espresse dall'ISS preoccupazioni circa i consistenti problemi di inquinamento termico posti dagli impianti in esame, comparabili per entità a quelli da affrontare per il raffreddamento di una centrale termonucleare da 1.500 MW.

I problemi igienico-sanitari individuati in relazione alle caratteristiche degli impianti produttivi, al di là delle modifiche sopra indicate, erano tali da richiedere controlli specifici dei parametri indici di inquinamento relativi agli effluenti gassosi, liquidi e solidi. Su questi aspetti si è realizzata una fattiva collaborazione tra l'ISS, le Regioni Calabria e Sardegna e le Società industriali interessate. Ciò ha portato all'elaborazione di specifici piani di rilevamento dei contaminanti ambientali sia all'interno che all'esterno dei perimetri industriali interessati. I piani prevedevano il rilevamento dei livelli di lieviti essiccati e vitali nell'aria, nel suolo e nelle acque provenienti dagli impianti di depurazione, prima della loro immissione nel corpo idrico ricevente. La verifica dell'entità del rilascio nell'ambiente di microorganismi propri della fermentazione sia in forma di cellule vitali che di cellule essiccate (polveri) era elemento indispensabile per attuare il necessario piano di sorveglianza medico-epidemiologica sugli addetti agli impianti e sulle popolazioni residenti nelle immediate vicinanze degli impianti stessi. Appositi rilevamenti riguardavano inoltre il monitoraggio della temperatura delle acque marine antistanti gli impianti, al fine di determinare l'entità dell'inquinamento termico.

## PIANO DI SORVEGLIANZA MEDICO-EPIDEMIOLOGICA

L'esecuzione di tale piano, secondo il D.M. 21 giugno 1977 *Misure di tutela igienico-sanitaria ed ambientale connesse alla produzione di bioproteine* (Gazzetta ufficiale n. 182 del 6 luglio 1977), avrebbe dovuto essere attuata, a carico delle Ditte produttrici, in due fasi successive. La prima fase prevedeva opportuni esami clinici ed immunologici su gruppi di popolazione esposti ed in particolare sulle maestranze, da attuarsi preventivamente all'attivazione degli impianti. La seconda fase del piano consisteva in controlli periodici per gli addetti agli impianti ed in esami di controllo, da attuarsi in base a criteri statistico-epidemiologici, su gruppi di popolazione a rischio.

La valutazione dei risultati delle prove cliniche ed immunologiche era stata affidata ad una apposita Commissione di esperti, nominata dal Ministro per la sanità, che aveva approntato apposite cartelle cliniche-tipo, predisposte sotto forma di schede per l'elaborazione dei dati, in relazione ai controlli clinici e di laboratorio che sono qui di seguito sinteticamente riportati.

## I. - Controlli preventivi per gli addetti agli impianti.

I. a. - *Esami immunologici*: Conteggio dei linfociti del sangue; conteggio dei linfociti T; conteggio dei linfociti B; prove di mitogenicità (PHA, ConA, fitolacca, antigeni); quadro elettroforetico e immunoelettroforetico del siero; dosaggio delle immunoglobuline IgG, IgA e IgM; titolo delle agglutinine naturali anti-A e anti-B; dosaggio delle immunoglobuline IgE; radio-allergo-sorbent-test (RAST), da effettuarsi solo nel caso che il dosaggio delle IgE risulti superiore alla norma; test cutanei miranti ad evidenziare una sensibilizzazione alla *Candida albicans*; ricerca di anticorpi precipitanti nel siero verso estratti di ceppi di *Candida* utilizzati.

I. b. - *Studio della funzionalità respiratoria*: Capacità di diffusione; curva flusso-volume; spirografia.

## II. - Controlli periodici per gli addetti agli impianti.

II. a. - *Esami immunologici (trimestrali)*: Dosaggio delle IgE nel siero; radio-allergo-sorbent-test (RAST), da effettuarsi solo nel caso che il valore delle IgE risulti superiore alla norma; ricerca di anticorpi precipitanti nel siero verso estratti di ceppi di *Candida* utilizzati.

II. b. - *Studio della funzionalità respiratoria (annuale)*: Capacità di diffusione; curva flusso-volume; spirografia.

II. c. - *Studio radiologico del torace (trimestrale)*.

III. - *Esami periodici su campioni di popolazione a rischio.*

Il piano prevede i controlli indicati ai punti I. b, II. a, II. b e II. c.

Si ringrazia la sig.na Anna Maria Lopomo per la costante e fattiva collaborazione prestata nell'archiviazione e nella preparazione del materiale documentario utilizzato per l'approntamento di questa nota.

## BIBLIOGRAFIA

1. LODDER, J. (Ed.). 1970. *The Yeasts*. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
2. MEYER, S. A., ANDERSON, K., BROWN, R. E., SMITH, M. TH., YARROW, D., MITCHELL, E. & AHEARN, D. G. 1975. Physiological and DNA characterization of *Candida maltosa*, a hydrocarbon-utilizing yeast. *Arch. Microbiol.* **104**: 225-231.
3. CAMPBELL, I. 1974. Methods of numerical taxonomy for various genera of yeast. *Adv. Appl. Microbiol.* **17**: 135-156.
4. NAKASE, T., FUKAZAWA, Y. & TSUCHIYA, T. 1972. A comparative study on two forms of *Candida tropicalis* (CAST.) Berkhout. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **18**: 349-363.
5. FUKAZAWA, Y., NAKASE, T., SHINODA, T., NISHIKAWA, A., KAGAYA, K. & TSUCHIYA, Y. 1975. Significance of cell wall structures on yeast classification: proton magnetic resonance and serological and deoxyribonucleic acid characterization of *Candida sake* and related species. *Int. J. Sistem. Bacteriol.* **25**: 304-314.
6. KANEKO, T., ISHII, K., KAWAHARADA, H., KAGOTANI, K. & WATANABE, K. 1976. Identity of a hydrocarbon assimilating yeast, *Candida novellus*, with *Candida maltosa*. Rapporto trasmesso dalla Liquichimica S.p.A.
7. AHEARN, D. G., MEYER, S. A. & YARROW, D. 1976. The taxonomy of *Candida novellus* ATCC 20275, the strain used by Liquichimica Biosintesi to produce Liquipron. Rapporto trasmesso dalla Liquichimica S.p.A.
8. CRUGER, E. H. JR., NELSON, R. W. & STANSBY, M. E. 1964. Fatty acid composition of oils from 21 species of marine fish, freshwater and shellfish. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **41**: 662-667.
9. IYENGAR, R. & SCHLENK, H. 1967. Wax esters of mullet (*Mugil cephalus*) Roe oil. *Biochemistry*, **6**: 396-402.
10. SCHLENK, H., SAND, D. M. & SEN, N. 1964. Conversion of C<sub>17</sub> polyenoic acids into more highly unsaturated acids by the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* **84**: 361-364.
11. GILL, C. O. & RATLEDGE, C. 1973. Regulation of the novo fatty acid biosynthesis in the n-alkane-utilizing yeast, *Candida* 107. *J. Gen. Microbiol.* **78**: 337-347.
12. PARKS, O. W., KEENEY, M. & SCHWARTZ, D. P. 1961. Bound aldehydes in butteroil. *J. Dairy Sci.* **44**: 1940.
13. SCHOOT, J. C. M., BEGEMANN, P. N. & RECOURT, J. H. 1961. Composition of aldehydes derived from some bovine lipids. *J. Lipid Res.* **2**: 142-147.
14. KATZ, I. & KEENEY, M. 1964. The isolation of fatty aldehydes from rumen-microbialipid. *Biochim. Biophys. Acta.* **84**: 128-132.
15. HUNTER, K. & ROSE, A. H. 1971. Yeast lipids and membranes. In: *The Yeasts*. Vol. 2. A. H. ROSE & J. S. HARRISON (Eds.). Academic Press, New York, pp. 211-270.
16. MOSS, J. & LANE, M. D. 1972. Acetyl-coenzyme A carboxylase. III. Further studies on the relation of catalytic activity to polymeric state. *J. Biol. Chem.* **247**: 4944-4951.
17. SEUBERT, W., LAMBERTS, I., KRAMER, R. & OHLY, B. 1968. On the mechanism of malonyl-CoA-independent fatty acid synthesis. I. The mechanism of elongation of long-chain fatty acids by acetyl-CoA. *Biochim. Biophys. Acta.* **164**: 498-517.

18. CARROLL, K. K. 1962. Levels of radioactivity in tissues and in expired carbon dioxide after administration of 1-C<sup>14</sup>-labelled palmitic acid, 2-C<sup>14</sup>-labelled uracil acid, or 2-C<sup>14</sup>-labelled nervonic acid to rats. *Can. J. Biochem. Physiol.* 40: 1229-1238.
19. JAIN, M. K. 1972. The bimolecular lipid membrane. In: *A System*. Van Nostrand Reinhold Co., New York.
20. McELHANNY, R. N. & TOURTELLOTTE, M. G. 1969. Mycoplasma membrane lipids: Variations in fatty acid composition. *Science*. 164: 433-434.
21. LINDEN, C. D., WRIGHT, K. L., Mc CONNELL, H. M. & FO, C. F. 1973. Lateral phase separations in membrane lipids and the mechanism of sugar transport in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 70: 2271-2275.
22. OVERATH, P., HILL, F. F. & LAMNER-HIRSCH, I. 1971. Biogenesis of *E. coli* membrane: Evidence for randomization of lipid phase. *Nature*. 234: 264-267.
23. MAVIS, R. D. & VASKLOS, P. R. 1972. The effect of phospholipid fatty acid composition on membranous enzymes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 247: 652-659.
24. TSURACOSHI N. & FOX C. F. 1973. Abortive assembly of the lactose transport system in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 12: 2816-2821.
25. TRAUBLE, H. & OVERATH, P. 1973. The structure of *E. coli* membranes studied by fluorescence measurements of lipid phase transitions. *Biochim. Biophys. Acta*. 307: 491-512.
26. ANONIMOUS. 1967. Mineral oils in human tissues. *Nut. Rev.* 25: 46-49.
27. NAGY, B., MODRELESKI, V. E. & SCOTT, W. M. 1969. Saturated hydrocarbons in bovine liver. *Biochem. J.* 114: 645-648.
28. GAERARDINI, F. & NAGY, B. 1966. Saturated hydrocarbons in human arterial tissues and plaques. *Arch. Biochem. Biophys.* 112: 245-247.
29. RAMSEY, R. B., AXEL, R. T., JAIN, J. & NICHOLAS, H. J. 1972. Saturated hydrocarbons in experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 15: 301-306.
30. BOYD, J. T. & DOLL, R. 1954. Gastrointestinal cancer and the use of liquid paraffin. *Brit. J. Cancer*. 8: 231-237.
31. NAGY, B. & NORDBY, H. E. 1972. Long chain hydrocarbon profiles of *Daucus* grapefruit, *Daucus* mandarin and their hybrids. *Lipids*. 7: 722-727.
32. LORENE, K. & MAGA, J. 1972. Triticale and wheat flour studies: composition of fatty acids, carbonyls, and hydrocarbons. *J. Agric. Food Chem.* 20: 769-772.
33. VALVERE, F., BOSI, G., BELLEZZA, P., OLIVIERI, O. & MOCA, S. 1979. Effect of feeding n-paraffin on animal tissue levels. In: *Single-cell protein-safety for animal and human feeding*. S. GARATTINI, S. PAGGIALUNGA & N. S. SCREENSHAW (Eds.). Pergamon Press, London, pp. 133-147.
34. HAMID EL MARADI, M. A. & CHANNON, H. J. 1933. The absorption of n-hexadecane from the alimentary tract of the rat. *Biochem. J.* 27: 1487-1494.
35. CHANNON, H. J. & DEVINE, J. 1934. The absorption of n-hexadecane from the alimentary tract of the cat. *Biochem. J.* 28: 467-471.

36. FRAZER, A. C., SCHULMAN, J. H. & STEWART, H. C. 1944. Emulsification of fat in the intestine of the rat and its relationship to absorption. *J. Physiol.* **103**: 306-316.
37. ALBRO, P. W., FISHBEN, L. 1970. Absorption of aliphatic hydrocarbon by rats. *Biochim. Biophys. Acta.* **219**: 437-440.
38. SQUIBB, R. L. & FRANKENFELD, J. N. 1972. The metabolizable energy of linear paraffin for the chick. *Poultry Sci.* **51**: 2056-2060.
39. KOLATTOKUDY, P. E. & HANKIN, L. 1966. Metabolism of a plant wax paraffin (n-Nonacosane) in the rat. *J. Nutr.* **90**: 167-174.
40. POPOVIC, M. 1970. The metabolism of paraffin in rats. *Fed. Eur. Biol. Soc.* **12**: 49-50.
41. TULLIEZ, J. & BORIES, G. 1975. Métabolisme des hydrocarbures paraffiniques et naphthéniques chez les animaux supérieurs I, II. *Ann. Nutr. Alim.* **29**: 201-221.
42. MCCARTHY, R. D. 1963. Mammalian metabolism of straight chain saturated hydrocarbons. *Biochim. Biophys. Acta.* **84**: 74-79.
43. TULLIEZ, J. E. & BORIES, G. F. 1979. Metabolic pathway of n-paraffin in mammals. In: *Single-cell protein- safety for animal and human feeding*. S. GARATTINI, S. PAGLIALUNGA & N. S. SCHIMSHAW (Eds.). Pergamon Press, London, pp. 160-165.
44. ICHIHARA, K., KUSONOSE, E. & MASAMICHI, K. 1969. Microsomal hydroxylation of decane. *Biochim. Biophys. Acta.* **176**: 713-719.
45. LU, A. Y. H., STROBEL, H. W. & COON, M. J. 1970. Properties of a solubilized form of the cytochrome P-450 containing mixed-function oxidase of liver microsomes. *Mol. Pharmacol.* **6**: 213-220.
46. COON, M. J., STROBEL, H. W., AUTOR, A. P., HEIDEMA, J. & DUPPEL, W. 1973. Functional components and mechanisms of action of the resolved liver microsomal enzyme system catalyzing fatty acid, hydrocarbon and drug hydroxylation. *Biochem. Soc. Symposia.* **34**: 45-54.
47. ALBRO, P. W. & FISHBEN, L. 1970. Short-term effects of piperonyl butoxide on the deposition of dietary hydrocarbon in rat tissues. *Life Sci.* **9** (Part II): 729-739.
48. MITCHELL, M. P. & HUBSCHER, G. 1968. Oxidation of n-hexadecane by subcellular preparations of guinea pig small intestine. *Europ. J. Biochem.* **7**: 90-95.
49. BOYD, E. M. 1975. The acute oral toxicity of mineral oil. In: *Toxicity of Pure Food*. CRC Press, Cleveland, pp. 97-102.
50. POTTER, M. & BOYCE, C. R. 1962. Induction of plasma cell neoplasia in BALB/c mice. *Nature.* **193**: 1086-1087.
51. RASK-NIELSEN, R. & ERBESEN, P. 1965. Reticular neoplasia induced in DBA and CBA mice by intraperitoneal injection of mineral oil. *J. Natl. Canc. Inst.* **35**: 83-94.
52. WARBER, N. L., MOORE, M. A. S. & METCALF, D. 1969. A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB/c mice. *J. Natl. Canc. Inst.* **43**: 963-982.
53. HORTON, A. W., DENMAN, D. T. & TROSSET, R. P. 1957. Cocarcinogenic effects of dodecane. *Canc. Res.* **17**: 758-763.

54. SICÈ, J. 1966. Tumor-promoting activity of n-alkanes and 1-alkanols. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 9: 70-74.
55. HORTON, A. W., DENMAN, D. T. & TROSSET, R. P. 1957. Carcinogenesis of the skin. II. The accelerating properties of aliphatic and related hydrocarbon. *Canc. Res.* 17: 758-761.
56. HORTON, A. W., VAN DREAL, P. A. & BINGHAM, E. L. 1966. Physicochemical mechanisms of acceleration of skin carcinogenesis. In: *Advances in Biology of Skin*. Vol. 7, Chap. X. W. MONTAGNA & R. L. DOBSON (Eds.). Pergamon Press, Oxford, pp. 165-181.
57. HUEPER, W. C. 1966. Recent results in cancer research. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 118-125 & 188-194.
58. HORTON, A. W., ESHLEMAN, D. N., SCHUFF, A. R. & PERMAN, W. H. 1976. Correlation of cocarcinogenic activity among n-alkanes with their physical effects on phospholipid micelles. *J. Natl. Canc. Inst.* 56: 387-391.
59. BINGHAM, E. L. & NORD, P. J. 1977. Cocarcinogenic effects of n-alkane and ultraviolet light on mice. *J. Natl. Canc. Inst.* 58: 1099-1101.
60. LESTER, D. E. 1979. Normal paraffins in living matter. Occurrence metabolism and pathology. *Prog. Fd. Nutr. Sci.* 3: 1-66.

**DECRETO MINISTERIALE 14 NOVEMBRE 1972**  
(Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 308 del 27 novembre 1972)

DECRETO MINISTERIALE 14 novembre 1972.

**Integrazione del decreto ministeriale 30 luglio 1969, concernente l'elenco dei prodotti di origine minerale e chimico-industriali che possono essere impiegati nella alimentazione degli animali.**

**IL MINISTRO PER LA SANITÀ**  
**DI CONCERTO CON**  
**IL MINISTRO PER L'AGRICOLTURA E LE FORESTE**

E

**IL MINISTRO PER L'INDUSTRIA, IL COMMERCIO E L'ARTIGIANATO**

Vista la legge 15 febbraio 1963, n. 281, modificata dalla legge 8 marzo 1968, n. 399, concernente la disciplina della preparazione e del commercio dei mangimi;

Visto il decreto ministeriale 30 luglio 1969 pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* del 13 agosto 1969, n. 209, concernente l'elenco dei prodotti di origine minerale e chimico-industriali che possono essere impiegati nell'alimentazione degli animali, modificato dal decreto ministeriale 25 febbraio 1970, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* del 17 marzo 1970, n. 69;

Considerata l'opportunità di consentire l'utilizzazione delle farine proteiche derivanti da lieviti coltivati su n-paraffine per l'alimentazione di alcune specie di animali allevati;

Considerata, altresì, l'opportunità di sottoporre la produzione, la distribuzione, la vendita e la somministrazione delle suddette farine a particolari cautele al fine di meglio accertarne la piena idoneità all'impiego per la nutrizione degli animali;

Sentito il parere della commissione tecnica, di cui all'art. 9 della citata legge 15 febbraio 1963, modificata dall'art. 8 della legge 8 marzo 1969, n. 399;

Sentito il parere del Consiglio superiore di sanità;

**DECRETA:**

**Art. 1.**

All'elenco dei prodotti di origine minerale e dei prodotti chimico-industriali, di cui al citato decreto ministeriale 30 luglio 1969 dopo la voce n. 66, è aggiunta quella n. 67 relativa alla sostanza denominata « Toprina » (lieviti coltivati su n-paraffine) con rispettivi requisiti e condizioni d'impiego indicati nell'allegato al presente decreto.

Al prodotto « Toprina » si applicano, altresì, le disposizioni di cui ai seguenti articoli.

**Art. 2.**

È stabilito un controllo sul prodotto « Toprina » da effettuarsi alla produzione nazionale a cura dell'Istituto superiore di sanità, ai fini degli accertamenti di tutte le caratteristiche sul secco e della purezza dei ceppi di « Candida » utilizzati nelle colture di produzione e di esercitare altri eventuali controlli.

**Art. 3.**

Il prodotto « Toprina », da utilizzare nella preparazione e confezione industriale delle miscele per il razionamento degli animali da parte di stabilimenti, è sottoposto alle disposizioni vigenti in materia di mangimifici. I predetti stabilimenti devono chiedere al Ministero della sanità il relativo nulla osta per l'impiego.

## Art. 4.

Agli organi del Ministero della sanità d'intesa con quelli del Ministero dell'agricoltura e delle foreste, e dell'industria, del commercio e dell'artigianato sono riservati tutti i controlli a livello di allevamenti che utilizzano le anzidette miscele.

Roma, addì 14 novembre 1972

*Il Ministro per la sanità*

GASPARI

*Il Ministro per l'agricoltura e le foreste*

NATALI

*Il Ministro per l'industria, il commercio e l'artigianato*

FERRI

## (A) Denominazione.

ALLEGATO

TOPRINA (lieviti coltivati su n-paraffine).

## (B) Descrizione e formula.

Farine derivanti da lieviti essiccati del genere « Candida » (lipolytica e/o tropicalis) coltivati su n-paraffine con lunghezze di catena comprese tra 10 e 30 atomi di carbonio.

Il substrato deve contenere non più di 50 p.p.m. di idrocarburi aromatici. Inoltre il substrato n-paraffinico, per quanto attiene alla purezza, all'identificazione ed ai limiti di tolleranza quantitativa degli idrocarburi policiclici quali il 3-4 benzopirene, l'1, 2, 5, 6 dibenzantracene e il 3-metilcolantrene, deve rispondere ai criteri fissati dal decreto ministeriale 20 febbraio 1968, (Gazzetta Ufficiale n. 89 del 5 aprile 1968).

## (C) Caratteristiche sul secco e condizioni d'impiego.

## 1. - Caratteristiche sul secco:

a) contenuto medio di aminoacidi in grammi per 16 g. di azoto: Alanina 6,85 - Arginina 5,10 - Ac. Aspartico 9,20 - Ac. Glutammico 14,05 - Cistina 1,10 - Glutina 5,10 - Istidina 2,10 - Isoleucina 5,05 - Leucina 7,40 - Lisina 7,40 - Metionina 1,80 - Fenilalanina 4,30 - Prolina 4,20 - Serina 4,40 - Treonina 4,85 - Triptofano 1,40 - Tirocina 3,60 - Valina 5,85;

b) n-paraffine residue per 100 g. di toprina ..... max 0,5 g

c) quantità ammesse nella Toprina in p.p.m. di:

antimonio .....	0,05
arsenico .....	0,01
cadmio .....	0,005
mercurio .....	0,01
piombo .....	0,7
selenio .....	0,039

d) presenza di una o più sostanze atte al riconoscimento qualitativo e quantitativo del prodotto

Toprina;

## 2. - Condizioni d'impiego.

Quantità ammesse:

a) non più del 10 % per polli di allevamento, polli da carne, galline ovaiole, galli e galline da riproduzione, non più del 7 % per:

scrofe e verri da riproduzione, suini lattinzoli, suini da ingrasso,

non più del 7 %, per:

vitelli da latte;

b) in ogni caso i mangimi che contengono Toprina devono essere addizionati con Metionina.

## (D) Da dichiarare.

1) sulle confezioni del prodotto Toprina:

a) i contenuti analitici percentuali ai sensi degli articoli 11 e 12 della legge 15 febbraio 1963, n. 281 modificati dagli articoli 10 e 11 della legge 8 marzo 1968, n. 399;

b) le condizioni d'impiego, di cui al presente allegato;

2) sulle confezioni dei mangimi composti e mangimi composti integrati, tra i componenti elencati in ordine decrescente di quantità presente, ai sensi degli articoli 14 e 16 della legge 8 febbraio 1963, n. 281, modificati dagli articoli 12 e 14 della legge 8 marzo 1968, n. 399, deve risultare, se presente, anche il prodotto Toprina, con l'indicazione, a fianco e tra parentesi, della percentuale aggiunta.

**DECRETO MINISTERIALE 2 FEBBRAIO 1974**  
(Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 74 del 20 marzo 1974)

DECRETO MINISTERIALE 2 febbraio 1974.

**Modificazioni al decreto ministeriale 14 novembre 1972, riguardante l'utilizzazione della farina proteica Toprina derivata da lieviti coltivati su n-paraffine.**

**IL MINISTRO PER LA SANITÀ**  
**DI CONCERTO CON**  
**IL MINISTRO PER L'AGRICOLTURA E LE FORESTE**  
**E**  
**IL MINISTRO PER L'INDUSTRIA, IL COMMERCIO E L'ARTIGIANATO**

Vista la legge 15 febbraio 1963, n. 281, modificata dalla legge 8 marzo 1968, n. 399, concernente la disciplina della preparazione e del commercio dei mangimi;

Visto il decreto ministeriale 30 luglio 1969, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* del 16 agosto 1969, n. 209, concernente l'elenco dei prodotti di origine minerale e chimico-industriali che possono essere impiegati nella alimentazione degli animali, modificato dal decreto ministeriale 25 febbraio 1970, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* del 17 marzo 1970, n. 69;

Visto il decreto ministeriale 14 novembre 1972, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 308 del 27 novembre 1972, riguardante alcune integrazioni al sopracitato decreto ministeriale 30 luglio 1969, con il quale si consentiva l'utilizzazione della farina proteica derivata da lieviti coltivati su n-paraffine, denominata Toprina per l'alimentazione di alcune specie animali allevate;

Considerata l'opportunità di apportare alcune modifiche ed integrazioni al sopracitato decreto ministeriale 14 novembre 1972, ed al suo allegato;

Sentito il parere della commissione tecnica di cui all'art. 9 della citata legge 15 febbraio 1963, n. 281, modificato dall'art. 8 della legge 8 marzo 1969, n. 399;

Sentito il parere del Consiglio superiore di sanità;

Decreta:

Art. 1.

L'art. 2 del decreto ministeriale 14 novembre 1972, citato nelle premesse, è sostituito dal seguente:

« È stabilito un controllo sul prodotto Toprina, da effettuarsi alla produzione nazionale a cura dell'Istituto superiore di sanità, ai fini degli accertamenti di tutte le caratteristiche sul secco e della purezza dei ceppi di *Candida lipolytica* (Harrison) Diddens et Lodder, utilizzati nelle colture di produzione, e di esercitare gli altri controlli di innocuità. In particolare i processi di fermentazione dovranno essere esenti da germi patogeni.

Inoltre dovranno essere adottate misure atte a garantire che l'aria e l'acqua utilizzate dagli impianti di produzione non siano contaminate. Parimenti dovranno essere realizzati efficienti dispositivi atti a prevenire l'inquinamento ambientale da parte degli effluenti di detti impianti.

## Art. 2.

L'allegato al decreto ministeriale 14 novembre 1972, indicato nella premessa è sostituito dal seguente:

## (A) Denominazione.

TOPRINA (lieviti coltivati su n-paraffine).

## (B) Descrizione e formula.

Farine derivanti da lieviti essiccati di *Candida lipolytica* (Harrison) Diddens et Lodder, coltivati su un substrato di n-paraffine con lunghezza di catena compresa tra 10 e 30 atomi di carbonio.

Il substrato deve contenere non più di 50 ppm di idrocarburi aromatici. Inoltre, il substrato n-paraffinico, per quanto attiene alla purezza, all'identificazione ed ai limiti di tolleranza quantitativa degli idrocarburi policiclici, quali 3-4 benzopirene, 1, 2, 5, 6 dibenzantracene e il 3-metilcolantrene, deve rispondere ai criteri fissati dal decreto ministeriale 21 marzo 1973 (supplemento ordinario alla *Gazzetta Ufficiale* del 29 aprile 1973, n. 104).

## (C) Caratteristiche sul secco e condizioni d'impiego.

## 1. Carica microbica:

assenza di agenti patogeni. Il prodotto non deve contenere più di 100.000 microrganismi non patogeni per grammo.

## 2. - Caratteristiche sul secco:

a) contenuto medio di aminoacidi proteici in grammi per 16 g. di azoto: Alanina 6,8 - Arginina 5,1 - Ac. Aspartico 9,2 - Ac. Glutammico 11,0 - Cistina 1,1 - Glicina 5,1 - Istidina 2,1 - Isoleucina 5,0 - Leucina 7,4 - Lisina 7,4 - Metionina 1,8 - Fenilalanina 4,3 - Prolina 4,2 - Serina 1,4 - Treonina 4,8 - Triptofano 1,4 - Tirocina 3,6 - Valina 5,8;

b) n-paraffine residue per 100 gr. di Toprina - max 0,5 g;

c) quantità ammesse nella Toprina in ppm di:

antimonio .....	0,1
arsenico .....	1,0
cadmio .....	0,2
mercurio .....	0,1
piombo .....	2,0
selenio .....	0,2

## 3. - Condizioni d'impiego:

## Quantità ammessa:

a) non più del 10 per cento per:

polli e galline,

non più del 7 per cento per:

suini,

non più del 7 per cento per:

vitelli da latte;

b) in ogni caso, i mangimi che contengono Toprina devono essere addizionati con Metionina.

## (D) Da dichiarare.

## 1. - Sulle confezioni del prodotto Toprina:

a) i contenuti analitici percentuali ai sensi degli articoli 11 e 12 della legge 15 febbraio 1963, n. 281, modificati dagli articoli 10 e 11 della legge 8 marzo 1968, n. 399;

b) le condizioni d'impiego di cui al presente allegato.

2. - Sulle confezioni dei mangimi composti e mangimi composti integrati, tra i componenti elencati a ordine decrescente di quantità presente, ai sensi degli articoli 11 e 16 della legge 8 febbraio 1963, n. 281, modificati dagli articoli 12 e 11 della legge 8 marzo 1968, n. 399, deve risultare, se presente, anche il prodotto Toprina con l'indicazione, a fianco e tra parentesi, della percentuale aggiunta.

## Art. 3.

Il presente decreto entra in vigore il giorno stesso della sua pubblicazione nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, addì 2 febbraio 1974

*Il Ministro per la sanità*

GUI

*Il Ministro per l'agricoltura e le foreste*

FERRARI-AGGRADI

*Il Ministro per l'industria, il commercio e l'artigianato*

DE MITA

## APPENDICE III

DECRETO MINISTERIALE 7 FEBBRAIO 1976  
(Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 62 dell'8 marzo 1976)

DECRETO MINISTERIALE 7 febbraio 1976.

Sospensione dell'efficacia del decreto ministeriale 14 novembre 1972, modificato dal decreto ministeriale 2 febbraio 1974, concernente l'inclusione del prodotto Toprina nell'elenco dei prodotti di origine chimico-industriale che possono essere impiegati nell'alimentazione zootecnica.

IL MINISTRO PER LA SANITÀ  
DI CONCERTO CON  
IL MINISTRO PER L'AGRICOLTURA E LE FORESTE  
E  
IL MINISTRO PER L'INDUSTRIA, IL COMMERCIO E L'ARTIGIANATO

Visto il decreto ministeriale 14 novembre 1972, modificato dal decreto ministeriale 2 febbraio 1974, concernente l'inclusione del prodotto denominato Toprina nell'elenco dei prodotti d'origine chimico-industriale che possono essere impiegati nell'alimentazione zootecnica;

Visti i risultati delle ricerche effettuate dall'Istituto superiore di sanità, che hanno evidenziato la presenza di residui di acidi grassi a catena dispari di atomi di carbonio, e di n-paraffine nelle carni degli animali alimentati con Toprina;

Sentito il Consiglio superiore di sanità, il quale, in data 18 giugno 1975, ha espresso il parere che sia necessario integrare la sperimentazione già iniziata con ulteriori ricerche da estendersi anche in altri settori e che, in attesa dell'esito di tali ricerche, debba essere provveduto alla sospensione cautelativa dei soprarichiamati decreti ministeriali per la parte che riguarda la commercializzazione e l'uso della Toprina, e quindi la produzione dovrà essere limitata alle necessità della sperimentazione;

Sentito l'Istituto superiore di sanità, il quale ha espresso il parere che l'aumento del tenore di acidi grassi a catena dispari di atomi di carbonio nei tessuti di animali alimentati col prodotto Toprina non desta preoccupazione, mentre sono da evitare ulteriori aumenti del livello delle paraffine nella catena alimentare in attesa di acquisire tutti i dati indispensabili alla valutazione della intera problematica posta dal significato biologico delle paraffine stesse;

Sentita la commissione tecnica di cui all'art. 9 della legge 15 febbraio 1963, n. 281, modificata dall'art. 8 della legge 8 marzo 1968, n. 399, la quale, pur ritenendo che gli elementi emersi dalle ricerche effettuate dall'Istituto superiore di sanità, valutate anche alla luce delle considerazioni espresse al riguardo dagli esperti della commissione stessa, non sembrano dare motivo di dover modificare il proprio parere favorevole espresso in precedenza sulla utilizzazione in alimentazione animale del prodotto « Toprina », ha espresso l'avviso che siano sospesi, in via cautelativa, la commercializzazione e l'uso in alimentazione animale del suddetto prodotto, in attesa dei risultati delle ricerche suggerite dal Consiglio superiore della sanità nella riunione del 18 giugno 1975;

Ritenuto opportuno, in attesa di acquisire i risultati delle ulteriori ricerche di cui sopra, di uniformarsi al parere del Consiglio superiore di sanità, della predetta commissione tecnica e degli organi tecnici sopra citati e, pertanto, di dover sospendere l'efficacia del sopracitato decreto ministeriale 14 novembre 1972, e successiva modificazione; ciò tenuto anche conto

che detto decreto ministeriale non ha avuto pratica attuazione, non essendo stati rilasciati i nulla osta per l'impiego, previsti dall'art. 3 del decreto ministeriale medesimo;

Ritenuto, inoltre, che le ricerche devono essere svolte sulla base delle conclusioni cui è pervenuto l'Istituto superiore di sanità;

Ritenuto, infine, che è opportuno provvedere con separato provvedimento alla determinazione di un progetto di ricerca che assicuri l'acquisizione di tutti i dati indispensabili alla valutazione dell'intera problematica posta dal significato biologico delle paraffine;

Vista la legge 13 marzo 1958, n. 296;

Vista il testo unico delle leggi sanitarie, approvato con regio decreto 27 luglio 1931, n. 1265;

Vista la legge 30 aprile 1962, n. 283, modificata dalla legge 26 febbraio 1963, n. 441;

Vista la legge 15 febbraio 1963, n. 281, modificata dalla legge 8 marzo 1968, n. 399;

Decreta:

Art. 1.

È sospesa, con effetto immediato, l'efficacia del decreto ministeriale 14 novembre 1972, modificato dal decreto ministeriale 2 febbraio 1974, concernente la inclusione del prodotto Toprina nell'elenco di prodotti di origine chimico-industriale che possono essere impiegati nell'alimentazione zootecnica, fino all'esito delle indagini che saranno svolte secondo criteri e modalità che il Ministro per la sanità stabilirà con separato provvedimento.

Art. 2.

È consentita la produzione della Toprina, limitatamente alle necessità della sperimentazione, esclusa ogni forma di commercializzazione ed impiego.

Roma, addì 7 febbraio 1976

*Il Ministro per la sanità*

GULLOTTI

*Il Ministro per l'agricoltura e le foreste*

MARCONA

*Il Ministro per l'industria, il commercio e l'artigianato*

DONAT-CATTIN

## APPENDICE IV

## PIANO SPERIMENTALE DI MASSIMA PER L'ACCERTAMENTO DELLA PATOGENICITÀ DIRETTA DELLE CANDIDE

1. - Nella sperimentazione sulla patogenicità diretta dei ceppi di *Candida* da utilizzarsi per produzioni industriali, si devono impiegare in parallelo, oltre ai ceppi in esame, ceppi di *Candida albicans* isolati di recente dalla clinica e ceppi di *Candida utilis* di accertata classificazione. Fra i ceppi disponibili di *Candida albicans* dovrà essere scelto un ceppo di virulenza tale che, a seguito di somministrazione endovenosa nella cavia di 1 ml di sospensione cellulare ( $10^7$  cellule/ml), causi la morte dell'animale non prima di 72 ore. Tutti questi ceppi e quelli proposti per la sperimentazione saranno tipizzati di concerto con l'Istituto Superiore di Sanità dal prof. G. Gargani, dell'Istituto di Microbiologia dell'Università di Firenze.

2. - Tutti i ceppi dovranno essere coltivati in condizioni ottimali in coltura liquida aerea con controllo sia della entità dell'inoculo che della curva di crescita mediante conta in piastra e conta in camera di Thoma. I campioni da somministrare agli animali dovranno essere prelevati a 2/3 della fase esponenziale della loro curva di crescita.

3. - Gli animali da esperimento dovranno essere mantenuti in gabbie idonee tali da non consentire l'accumulo di deiezioni. Le gabbie debbono essere munite di griglia con cassetto raccogliatore contenente materiale assorbente sterilizzato in autoclave.

Gli animali dovranno essere alimentati con diete standards prive di sostanze capaci di interferire con gli esperimenti in corso.

4. - La sperimentazione dovrà essere effettuata su tutte le seguenti specie animali: a) coniglio (circa 1,5 kg di peso); b) topo (circa 20 gr di peso); c) cavia (circa 250 gr di peso); d) pulcino (circa 15 giorni di età). La via di somministrazione sarà endovena; eventualmente e per il solo topo, essa potrà essere intraperitoneale. Per quanto riguarda le dosi da somministrare, sarà necessario determinare preventivamente la  $DL_{50}$  dei ceppi patogeni di riferimento per ogni specie animale sopraelencata, quindi, inoculare in parallelo ad ogni specie le tre seguenti dosi:

I) un numero di cellule pari alla rispettiva  $DL_{50}$ ;

II) un numero di cellule pari a 10 volte la rispettiva  $DL_{50}$ ;

III) un numero di cellule pari a 50 volte la rispettiva  $DL_{50}$ .

5. - Gli animali saranno sacrificati 5, 12, 21 e 30 giorni dopo la somministrazione di *Candida*.

6. - Ove animali trattati, ad eccezione di quelli inoculati con *Candida albicans*, morissero entro quattro giorni dall'inizio del trattamento, si dovranno sacrificare ed esaminare anche animali trattati con tutte le specie di *Candida* in esperimento, compresi quelli di controllo.

7. - Sugli animali morti o sacrificati verranno eseguiti: a) l'autopsia; b) l'esame colturale e l'esame istologico del rene, cuore, fegato, milza, polmone, cervello e surreni; c) l'esame colturale quantitativo del rene e del fegato.

7 a. - Dopo 0, 5, 12, 30 giorni dalla somministrazione di *Candida* e comunque prima dell'abbattimento, oltre alle consuete osservazioni cliniche, dovranno essere determinati i seguenti parametri fisiologici: azotemia, glicemia, creatininemia, formula leucocitaria, conta dei globuli bianchi, conta dei globuli rossi.

8. - Dovranno essere impiegati non meno di tre esemplari di ciascuna specie animale per ogni ceppo di *Candida* esaminato e per ogni tempo indicato al punto 5.

9. - Si ritiene patogena qualsiasi *Candida* che, somministrata in una qualsiasi delle condizioni sperimentali previste ai punti precedenti, provochi, anche in una sola specie animale, uno dei seguenti fenomeni: morte per candidosi, diffusione negli organi in forma M: diffusione negli organi in forma Y con reazioni locali dimostrabili istopatologicamente.

10. - Se anche in assenza delle note di patogenicità di cui al punto 9, il ceppo in esame risultasse isolabile dagli organi degli animali trattati, a tempi dalla inoculazione significativamente superiori a quelli dei ceppi di *Candida* non patogeni utilizzati come controlli, gli esami istologici dovranno essere estesi a tutti gli altri organi ed apparati non indicati al punto 7.

11. - Qualora non si osservassero le manifestazioni indicate ai punti 9 e 10, si dovrà procedere ad una sperimentazione su coniglio mediante inoculazione per via intradermica di 0,1 ml di sospensioni contenenti  $10^8$ ,  $10^7$ , e  $10^6$  cellule/ml dei ceppi di *Candida* di cui al punto 1.

12. - Si ritiene patogena qualsiasi *Candida* che, nelle condizioni sperimentali di cui al punto 11, provochi, dopo 24 ore, un alone infiammatorio cutaneo di diametro superiore a 10-15 mm e, dopo 48 ore, necrosi del tessuto, purché analoghi fenomeni non si manifestino negli animali trattati in identiche condizioni sperimentali con ceppi di *Candida* non patogeni di controllo.

13. - Qualora non si osservassero le manifestazioni indicate al punto 12, la sperimentazione dovrà essere ripetuta con tutte le *Candide* di cui al punto 1, secondo le modalità indicate dal punto 2 al punto 8, su coniglio, topo, e pulcino *specificity-pathogen-free* (*Candida-free*) trattati separatamente con dosi idonee di aureomicina e di cortisonici.

14. - Si ritiene patogena qualsiasi *Candida* che, nelle condizioni sperimentali di cui al punto 13, provochi anche uno solo dei fenomeni descritti al punto 9, purché analoghi fenomeni non si manifestino negli animali trattati in identiche condizioni sperimentali con i ceppi di *Candida* non patogeni di controllo.

15. - Qualora non si osservassero le manifestazioni indicate al punto 14, la sperimentazione dovrà essere ripetuta con tutte le *Candide* di cui al punto 1, secondo le modalità indicate dal punto 2 al punto 8, su ceppi *germ-free* di coniglio, topo e pulcino.

16. - Si ritiene patogena qualsiasi *Candida* che, nelle condizioni sperimentali di cui al punto 15, provochi anche uno solo dei fenomeni descritti al punto 9, purché analoghi fenomeni non si manifestino con ceppi di *Candida* non patogeni di controllo.

17. - Qualora non si osservassero le manifestazioni indicate al punto 16, tutti i ceppi di *Candida* di cui al punto 1, dovranno essere inoculati in colture di linee cellulari stabili umane in dosi idonee eguali a quelle dei ceppi patogeni di riferimento.

18. - Si ritiene patogena qualsiasi *Candida* che, nelle condizioni sperimentali indicate al punto 17, esibisca una velocità di filamentazione di entità comparabile a quella dei ceppi di *Candida* patogeni di controllo.

## APPENDICE V

LINEE DI RICERCA SPERIMENTALI PER L'ESAME DELLE COSIDDETTE  
BIOPROTEINE (SCP) AI FINI DELL'AMMISSIBILITÀ NELL'ALIMENTAZIONE  
ANIMALE

1. - *Tassonomia.*I.1. - *Caratteristiche generali attinenti alla fabbricazione del prodotto:*

I.1.1. - (Tassonomia) proprietà biologiche del microorganismo e descrizione dei test che garantiscono la costanza e purezza dei ceppi coltivati.

2. - *Sostanze.*

I.1.2. - Caratteristiche chimiche del substrato e di tutte le sostanze utilizzate nel processo.

I.1.3. - Descrizione delle procedure usate durante il processo di produzione (fermentazione, estrazione, concentrazione, disidratazione, ecc.) e dei mezzi di controllo utilizzati nel corso della produzione allo scopo di ottenere le necessarie garanzie sanitarie ed, in particolare, per garantire l'assenza di microrganismi patogeni e la costanza della flora microbica e del prodotto ottenuto. (Testo concordato riunione CEE 23 novembre 1975).

I.2. - *Caratteristiche del prodotto:*

I.2.1. - Morfologia macro e microscopica.

I.2.2. - Proprietà fisiche e chimico fisiche.

I.2.3. - Composizione chimica:

I.2.3.1. - Composizione chimica centesimale secondo le norme previste per i mangimi.

I.2.3.2. - Lipidi.

I.2.3.3. - Idrocarburi aromatici (con particolare riferimento a 3,6 benzopirene - 3 metilcolantrene - 1,2,5,6 dibenzoutracene).

I.2.3.4. - Identità e tenore dei principali glucidi.

3. - *Lipidi.*

1. - Gliceridi.

2. - Fosfolipidi.

3. - Steroli ed altri componenti della insaponificabile.

4. - Acidi grassi liberi.

I. - *Sostanze azotate.*

## I.2.3.5. - Azoto proteico:

- Azoto ammoniacale;
- Azoto da amine e nitrosamine.
- da nitriti e nitrati;
- da urea.
- Acidi nucleici;

## I.2.3.6. - Identità e percentuale degli aminoacidi:

- Basi puriniche e pirimidiniche.

## I.2.3.7. - Macro e oligoelementi (di interesse nutrizionale e tossicologico).

## I.2.3.8. - Vitamine lipo e idrosolubili.

## I.3. - Inquinamenti di origine microbica, micologica (es. Aflatossine) e chimica (es. Fito-farmaci).

I.4. - *Comportamento e stabilità del prodotto in funzione delle condizioni di magazzinaggio.*I.5. - *Metodo di identificazione.*

Metodo di identificazione di un componente specifico del prodotto in miscela di mangimi ed eventuale dosaggio.

II. - *Studi di tossicità.*

Il numero di animali per specie nel gruppo testimone e nel gruppo trattato deve essere sufficiente per garantire un adeguato trattamento statistico dei risultati.

II.1. - *Prove di tossicità a breve e a medio termine sul roditore.*II.1.2. - *Prove di teratogenesi sul ratto ed eventualmente su altre specie per le quali l'uso del prodotto è preconizzato.*II.2.2. - *Prove di tossicità a lungo termine sul roditore compresa la determinazione dei residui (come III.2).*II.3. - *Prove di cancerogenesi.*II.4. - *Prove di riproduzione in generazioni successive del ratto.*II.5. - *Prove di mutagenesi (almeno i test in vitro ed i test in vivo).*III.1. - *Prove di tollerabilità per le specie animali per cui il prodotto è preconizzato (dosi e durata di trattamento devono essere rapportate alle modalità previste per*

(l'impiego pratico) queste prove includono ad esempio: informazioni sull'aspetto generale, il comportamento, il peso corporeo e degli organi, la mortalità, la patologia compresa l'istopatologia, l'ematologia, la biochimica del sangue e delle urine.

III.2. - Determinazione di residui e di eventuale accumulo di sostanze estranee a livello di tessuti ed organi scelti in funzione della composizione chimica del prodotto, del substrato e degli eventuali solventi.

IV. - *Valore nutritivo del prodotto* (nel ratto e nelle specie animali per le quali il prodotto è preconizzato).

IV.1. - Digeribilità dei principi alimentari.

IV.2. - Parametri di valutazione sulla qualità delle proteine (per i non ruminanti) UPN (utilizzo proteica netta) (nei ratti e nelle specie animali nelle quali il prodotto è preconizzato) lisina disponibile.

IV.3. - Ricerca di eventuali effetti negativi nutrizionali e metabolici con l'impiego del prodotto entro un ampio margine di dosi.

V. - *Valutazioni ai fini della sanità.*

V.1. - Ricerca di eventuali residui nei prodotti finali consumati dall'uomo, es. carni, uova, latte e valutazione del loro significato biologico.

V.2. - Effetti dell'incorporazione del prodotto nella dieta animale sulla composizione delle produzioni animali e sulle caratteristiche organolettiche e tecnologiche dei prodotti di origine animale destinati all'alimentazione umana.

V.3. - Tossicità di «Relais» su: ratto o topo (ed eventualmente altre specie animali).

V.4. - Eventuali prove di accettabilità da parte dell'uomo delle carni ed altri prodotti ottenuti da animali alimentati con SCP.

VI. - Eventuali ricerche particolari a seconda dell'origine del prodotto: incluse quelle miranti a proteggere l'ambiente di lavoro e a definire la pericolosità per l'equilibrio ecologico.

DECRETO MINISTERIALE 21 GIUGNO 1977  
(Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 182 del 6 luglio 1977)

DECRETO MINISTERIALE 21 giugno 1977.

**Misure di tutela igienico-sanitaria ed ambientale connesse alla produzione di bioproteine**

IL MINISTRO PER LA SANITÀ  
DI CONCERTO CON  
IL MINISTRO  
PER IL LAVORO E LA PREVIDENZA SOCIALE  
E  
IL MINISTRO PER L'INDUSTRIA, IL COMMERCIO E L'ARTIGIANATO

Viste le relazioni tecniche dell'Istituto superiore di sanità con le quali viene espresso il parere che sia da prevenire la diffusione nell'ambiente dei ceppi *Candida* impiegati nella produzione dei prodotti Liquipron e Toprina, sia ai fini della tutela igienico-sanitaria della popolazione in genere che dei lavoratori addetti agli impianti industriali in particolare, approntando, in caso di parziale attivazione per scopi di sperimentazione industriale degli impianti che prevedono l'utilizzazione dei ceppi in oggetto, un adeguato e specifico piano di sorveglianza igienico-sanitaria:

Visto il parere al riguardo espresso dal Consiglio superiore di sanità in data 7 febbraio 1977;

Ritenuto opportuno di uniformarsi al parere del suddetto Consiglio:

Vista la legge 13 marzo 1958, n. 296;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 14 gennaio 1972, n. 4;

Decreta:

Art. 1.

L'esercizio degli impianti e delle attrezzature per la produzione delle farine proteiche ottenute da lieviti *Candida*, limitatamente alle necessità della sperimentazione industriale, è subordinato all'adozione delle misure di tutela igienico-sanitaria di cui agli articoli seguenti.

L'eventuale autorizzazione all'attivazione degli impianti agli scopi predetti deve avere carattere di temporaneità ed i livelli produttivi devono essere contenuti al massimo.

Nei decreti di concessione saranno indicate la durata della concessione stessa e la potenzialità massima alla quale potranno funzionare gli impianti e che, comunque, dovranno essere commisurate al numero delle prove d'impianto strettamente necessarie.

Art. 2.

Le industrie produttrici eseguiranno a proprio carico, preventivamente all'attivazione degli impianti, opportuni esami clinici ed immunologici dei gruppi di popolazione esposti ed in particolare degli addetti agli impianti.

Sono da prevedersi successivamente controlli periodici per le maestranze mentre la popolazione esposta a rischio sarà sottoposta ad esami di controllo, secondo criteri epidemiologici e statistici.

I risultati dei predetti esami saranno messi a disposizione degli organismi sanitari competenti.

Un'apposita commissione di esperti, nominata dal Ministro per la sanità, sarà incaricata di valutare i risultati delle prove cliniche ed immunologiche suggerite al riguardo dal Consiglio superiore di sanità nel parere espresso in data 7 febbraio 1977.

#### Art. 3.

Ai fini della tutela igienico-sanitaria ed ambientale, il livello dei contaminanti biologici, contenuti nelle emissioni liquide e gassose e nei rifiuti solidi, dovrà essere contenuto entro i più bassi livelli consentiti dalla tecnica e comunque entro i limiti accettabili sotto il profilo della tutela della sanità pubblica.

Saranno predisposti, preventivamente all'attivazione degli impianti, ed a carico delle industrie, idonei sistemi di controllo atti a valutare l'entità delle eventuale diffusione nell'ambiente interno ed esterno allo stabilimento di microrganismi propri della fermentazione sia in forma vitale che essiccata.

I risultati dei predetti controlli saranno messi a disposizione degli organismi sanitari competenti.

#### Art. 4.

Preventivamente all'attivazione, gli impianti industriali devono essere eventualmente modificati, ai fini del perseguimento degli obiettivi di cui all'art. 3, e sottoposti al controllo dell'Istituto superiore di sanità, unitamente ai sistemi atti a valutare il livello dei contaminanti emessi.

La vigilanza relativa a quanto disposto nei precedenti articoli 2 e 3 sarà esercitata dalle competenti autorità sanitarie regionali, in collaborazione con l'Istituto superiore di sanità per quanto concerne la salvaguardia delle condizioni ambientali nonché la tutela sanitaria dei gruppi di popolazione esposti, ed in collaborazione con i competenti organi del Ministero del lavoro e della previdenza sociale per quanto concerne la tutela dei lavoratori addetti agli impianti.

#### Art. 5.

È fatto espresso divieto alle industrie produttrici di commercializzare e comunque di impiegare le farine proteiche risultanti dalla sperimentazione industriale di cui al precedente art. 1.

La sorveglianza su quanto disposto dal precedente comma, oltre agli organi competenti al riguardo, è affidata alla guardia di finanza ed ai nuclei anti-s sofisticazione dell'Arma dei carabinieri.

#### Art. 6.

I presidenti delle giunte regionali competenti per territorio sono incaricati della esecuzione delle norme previste nel presente decreto.

Roma, addì 21 giugno 1977.

*Il Ministro per la sanità*

DAL FALCO

*Il Ministro per il lavoro e la previdenza sociale*

ANSELMI

*Il Ministro per l'industria, il commercio e l'artigianato*

DONAT-CATTIN

RISOLUZIONE DEL SOTTOGRUPPO ONCOGENESI E MUTAGENESI OPERANTE  
NELL'AMBITO DELLA COMMISSIONE CIMMINO

Il gruppo di esperti di oncogenesi e mutagenesi operante nell'ambito della Commissione Cimmino, dopo aver preso in esame le documentazioni di cancerogenesi e mutagenesi prodotte dalla ditta Liquichimica S.p.A. e dalla Italproteine S.p.A. sulle biomasse denominate rispettivamente Liquipron e Toprina, rileva che nonostante le carenze presenti in alcune delle sperimentazioni effettuate, dai dati disponibili non emerge alcuna indicazione di un'azione cancerogena delle biomasse in questione in termini di aumentata incidenza di tumori solidi. In alcune condizioni sperimentali limitatamente al ratto si è osservata una fluttuazione nei vari gruppi trattati dalla incidenza di linforeticolopatie proliferative la cui significatività e portata sono di difficile interpretazione stante le caratteristiche delle sperimentazioni svolte. Le sperimentazioni di mutagenesi finora effettuate sono limitate a due soli tests (*Salmonella* e *dominanti letali*) e non hanno messo in evidenza attività mutagena. Pur considerando i limiti delle sperimentazioni svolte, il gruppo di esperti ritiene che una eventuale autorizzazione alla produzione ed all'uso in alimentazione animale delle biomasse in questione possa essere concessa per un periodo non superiore ai quattro anni limitatamente ad alcune specie animali con modalità che prevedano quantità massime di impiego ed idonee sospensioni del trattamento prima della macellazione. Le limitazioni e restrizioni di uso dovranno comunque impedire un aumento della assunzione dietetica degli n-alcani presenti nelle biomasse.

L'autorizzazione in questione dovrà essere subordinata all'impegno di realizzare da parte delle ditte summenzionate ulteriori ricerche di cancerogenesi e di tossicità cronica sulle biomasse di produzione industriale, sulle produzioni zootecniche ottenute con l'uso di tali biomasse e su n-alcani. È inoltre necessario procedere ad ulteriori e più estesi saggi di mutagenesi, sia *in vitro* che *in vivo*, su diversi sistemi genetici e con metodologie più specifiche. Inoltre, in considerazione della eterogeneità delle biomasse in questione, è opportuno estendere la sperimentazione di mutagenesi a diverse classi di composti chimici presenti nelle biomasse. Si ritiene altresì opportuno sottoporre a continuo controllo mediante tests di mutagenesi le future produzioni industriali. Tali ricerche, che secondo le previsioni richiederanno un periodo di quattro anni dall'inizio della produzione, dovranno essere effettuate in modi concordati con l'Istituto Superiore di Sanità e sotto la sorveglianza dello stesso. Alla scadenza dell'autorizzazione si dovrà procedere al riesame dell'intera materia e, sulla base delle nuove conoscenze acquisite, valutare l'idoneità delle restrizioni di uso indicate ed, eventualmente, rimuoverle od adottarne di più severe.

## APPENDICE VIII

## RISOLUZIONE DEL SOTTOGRUPPO BIOCHIMICA OPERANTE NELL'AMBITO DELLA COMMISSIONE CIMMINO

Per quanto riguarda il problema degli acidi grassi dispari, la letteratura consultata è, per alcuni aspetti, come quello della diffusione in natura e dell'esistenza di vie metaboliche, abbastanza tranquillizzante.

In generale i risultati degli studi effettuati fanno ritenere che i lipidi contenuti nelle biomasse possono, nei limiti di impiego previsti in mangimistica, essere efficientemente utilizzati e metabolizzati dall'animale.

I livelli di acidi grassi dispari che possono ritrovarsi nelle carni e negli organi degli animali allevati con questi mangimi non presentano a tutt'oggi problemi degni di rilievo nei riguardi della sicurezza e della salute dell'uomo che utilizza tali prodotti a scopo alimentare.

Ciò anche perchè esiste la possibilità di ridurre sensibilmente le concentrazioni finali di tali acidi grassi nei tessuti, riportando l'animale, per un congruo periodo precedente la mattazione, ad una alimentazione con una dieta priva di biomasse.

Diverso il caso dell'utilizzo di queste nell'alimentazione delle mucche lattifere e delle galline ovaiole che, per l'intrinseca caratteristica delle produzioni, non consentono sospensioni cautelative del trattamento con biomasse. Pertanto si raccomanda di non autorizzare al momento, l'utilizzazione delle biomasse in questione per l'alimentazione delle mucche lattifere e delle galline ovaiole.

In ogni caso la Commissione ritiene opportune ulteriori e più ampie ricerche sul significato biologico degli acidi grassi dispari presenti nelle biomasse, ed in particolare sul metabolismo cerebrale nel periodo perinatale e sulle modificazioni biochimiche e metaboliche conseguenti ad un carico inusuale di acidi grassi dispari.

RISOLUZIONE DELLA COMMISSIONE RELATRICE DEL CONSIGLIO SUPERIORE  
DI SANITÀ ELABORATA NELLA RIUNIONE DEL 4 MARZO 1978.

Dopo aver preso in esame le risoluzioni approvate dai sottogruppi «oncogenesi e mutagenesi» e «biochimica» operanti nell'ambito della Commissione Ciuffino, la Commissione relatrice esprime parere favorevole alla ammissibilità in alimentazione animale delle farine proteiche denominate Liquipron e Toprina (lieviti coltivati su n-alcani), purchè l'autorizzazione in tal senso sia concessa secondo le limitazioni e restrizioni di uso più avanti indicate e le disposizioni e specifiche tecniche, di cui ai paragrafi seguenti. Le ricerche sugli n-alcani e acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio presentano rilevanza ed interesse che vanno ben al di là delle biomasse in questione essendo tali composti già presenti sia pure in limitata quantità nella catena alimentare umana. Qualsiasi eventuale autorizzazione dovrà, inoltre, essere subordinata all'impegno da parte delle Ditte produttrici di realizzare ulteriori ricerche di cancerogenesi e di tossicità cronica sulle biomasse di produzione industriale, sulle produzioni zootecniche ottenute con l'uso di tali biomasse e sugli n-alcani. È inoltre necessario procedere ad ulteriori e più estesi saggi di mutagenesi *in vitro* ed *in vivo* su diversi sistemi genetici e con metodologie specifiche. Inoltre, in considerazione della eterogeneità delle biomasse in questione, è opportuno estendere la sperimentazione di mutagenesi a diverse classi di composti chimici presenti nelle biomasse. Si ritiene anche opportuno sottoporre a continuo controllo mediante tests di mutagenesi le future produzioni industriali. Dovranno essere altresì condotte ricerche tendenti a chiarire il significato biologico degli acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio, in particolare sul metabolismo del tessuto nervoso nel periodo perinatale e sulle modificazioni biochimiche e metaboliche conseguenti ad un carico dietetico inusuale di acidi grassi dispari di atomi di carbonio. Le anzidette ricerche, che secondo le previsioni possono fornire risultati utili entro un periodo di quattro anni dall'inizio della produzione industriale, dovranno essere effettuate in modi concordati con l'Istituto Superiore di Sanità e sotto la sorveglianza dello stesso. Alla scadenza di tale periodo si dovrà procedere all'esame della intera materia e, sulla base delle nuove conoscenze acquisite, valutare l'idoneità delle limitazioni e restrizioni di uso e delle disposizioni e specifiche tecniche appresso indicate.

Il presente parere favorevole si intende limitato ai soli prodotti denominati Liquipron e Toprina cioè alle farine derivanti da lieviti essiccati rispettivamente dei ceppi di *Candida* ATCC 20275 IS e CBS 6331 (HP/G 162) conformi ai ceppi da depositarsi in triplice campione presso l'Istituto Superiore di Sanità entro trenta giorni dall'entrata in vigore del decreto di autorizzazione, coltivati su un substrato di n-alcani con lunghezza di catena tra 10 e 30 atomi di carbonio. Il substrato deve contenere non più di 50 ppm di idrocarburi aromatici. Per quanto attiene alla sua purezza e all'identificazione ed ai limiti di tolleranza quantitativa degli idrocarburi policiclici aromatici, il substrato deve corrispondere ai criteri fissati dal D.M. 21 marzo 1973 (supplemento ordinario della *Gazzetta Ufficiale* del 20 aprile 1973, n. 104).

Le caratteristiche dei prodotti Liquipron e Toprina sul secco dovranno essere le seguenti:

1. - *Carica microbica:*

secondo i limiti e le metodologie previsti, per l'esame batteriologico delle farine di carne e di pesce per uso zootecnico, dal D.M. 9 novembre 1971 (*Gazzetta Ufficiale* n. 308 del 6 dicembre 1971), in attuazione della legge 15 febbraio 1963.

2. - *Identità e composizione dei prodotti:*

2.a. - n-alcani residui . . . . .	max. 0,5 %
2.b. - metalli pesanti . . . . .	
antimonio . . . . .	max. 0,1 p.p.m.
arsenico . . . . .	max. 1,0 p.p.m.
cadmio . . . . .	max. 0,2 p.p.m.
mercurio . . . . .	max. 0,1 p.p.m.
piombo . . . . .	max. 2,0 p.p.m.
selenio . . . . .	max. 0,2 p.p.m.
2.c. - Idrocarburi policiclici aromatici:	
3,4-benzopirene . . . . .	assente (*)

2.d. - Le altre caratteristiche chimiche e quelle immunologiche dei prodotti dovranno essere conformi a quelle dei campioni da depositarsi presso l'Istituto Superiore di Sanità entro tre mesi dall'inizio della produzione industriale ed in ogni caso non significativamente difformi da quelle dei campioni già utilizzati per le sperimentazioni tossicologico-nutrizionali.

3. - *Limitazioni e restrizioni di uso:*

Le quantità massime di uso e le specie animali per la cui alimentazione è consentito l'uso dell'una o dell'altra delle farine proteiche sono:

- a) animali da pelliccia, da tiro e da affezione, per una quantità non superiore al 10 % del mangime somministrato;
- b) volatili di allevamenti ad esclusione delle ovaiole, per una quantità non superiore al 10 % del mangime somministrato;
- c) suini per una quantità non superiore al 7 % del mangime somministrato al fine di evitare fra l'altro l'aumento degli n-alcani nella dieta.

In ogni caso la utilizzazione delle farine sarà limitata per le specie di cui ai precedenti punti b) e c) ad un periodo non superiore alla prima metà del ciclo produttivo di ciascuna specie animale e dovrà essere prevista una idonea integrazione delle farine con metionina. La sorveglianza della corretta applicazione delle norme di impiego è affidata al Direttore Sanitario dell'allevamento.

4. - *Contrassegni delle confezioni:*

sulle confezioni dei prodotti Liquipron e Toprina saranno dichiarati:

- i contenuti analitici percentuali ai sensi degli articoli 11 e 12 della legge 15 febbraio 1963, n. 281, modificati dagli articoli 10 e 11 della legge-8 marzo 1968, n. 399;
- le condizioni di impiego di cui al punto 3.

Sulle confezioni dei mangimi composti e mangimi composti integrati, tra i componenti elencati in ordine decrescente di quantità presente, ai sensi degli articoli 14 e 16 della legge 8 febbraio 1968, n. 281, modificati dagli articoli 12 e 14 della legge 8 marzo 1968 n. 399, devono risultare, se presenti, anche il prodotto Liquipron o Toprina con l'indicazione, a fianco e tra parentesi, della percentuale aggiunta.

(\*) La sensibilità del metodo di analisi dovrà essere pari ad almeno 1 ppb.

La Commissione relatrice raccomanda, inoltre, che sia stabilito un controllo sul prodotto Liquipron e su quello Toprina da effettuarsi alla produzione industriale a cura dell'Autorità Regionale competente sotto la sorveglianza dell'Istituto Superiore di Sanità, ai fini di accertamenti di tutte le caratteristiche sul secco e della purezza dei ceppi di *Candida* utilizzati nelle colture di produzione, nonché di esercitare altri eventuali controlli. Entro un anno dall'autorizzazione all'uso, dovrà altresì essere programmato ed effettuato un controllo su scala nazionale dei mangimi allo scopo di verificare l'osservanza dei limiti massimi di integrazione consentiti.

La Commissione relatrice propone al Consiglio Superiore di Sanità di esprimere, inoltre, parere favorevole all'esercizio degli impianti e delle attrezzature per la produzione industriale delle farine proteiche denominate Liquipron e Toprina, purchè l'autorizzazione in tal senso sia concessa subordinatamente all'adozione delle misure di tutela igienico-sanitaria di cui agli articoli 2, 3 e 4 del D.M. 21 giugno 1977, n. 182.

## APPENDICE X

PARERE DELL'ASSEMBLEA GENERALE DEL CONSIGLIO SUPERIORE  
DI SANITÀ DEL 28 GIUGNO 1978CONSIGLIO SUPERIORE DI SANITÀ  
SESSIONE XXXVI  
ASSEMBLEA GENERALE  
*Seduta del 28 giugno 1978*IL CONSIGLIO SUPERIORE DI SANITÀ  
ASSEMBLEA GENERALE

Udita la relazione della Commissione relatrice riunitasi il giorno 13 giugno 1978

## ESPRIME PARERE

favorevole (voti a favore n. 29; contrari n. 15; astenuti n. 8) all'ammissibilità di bioproteine nell'alimentazione di animali le cui carni o i cui prodotti non siano comunque destinati all'alimentazione dell'uomo (cani, gatti, animali da pelliccia, animali degli zoo, animali da laboratorio)

## ESPRIME PARERE

non favorevole (voti contrari n. 21; favorevoli n. 16; astenuti n. 15) circa l'ammissibilità di bioproteine nell'alimentazione di volatili da allevamento anche se limitatamente alle specie per le quali nei dossier sperimentali esaminati dagli esperti si è dimostrata l'assenza di n-alcani o di quantità di n-alcani non superiore a quella contestualmente dimostrata nelle specie di volatili controllo degli esperimenti.

Si prende atto che le specie di volatili per le quali esiste la documentazione sperimentale sono i polli (broilers, primi 65 giorni di vita) e i tacchini.

## DECRETO MINISTERIALE 26 NOVEMBRE 1979

DECRETO MINISTERIALE 26 novembre 1979.

**Soppressione della voce n. 67 relativa alla sostanza denominata « Toprina » dall'elenco dei prodotti di origine minerale e chimico-industriali di cui al decreto ministeriale 30 luglio 1969 e revoca del decreto ministeriale 14 novembre 1972, modificato dal decreto ministeriale 2 febbraio 1974, concernente l'inclusione della « Toprina » nell'elenco dei prodotti di origine minerale e chimico-industriali che possono essere impiegati nell'alimentazione degli animali.**

## II. MINISTRO DELLA SANITÀ

DI CONCERTO CON

IL MINISTRO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE

E

IL MINISTRO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

Visto il decreto ministeriale 14 novembre 1972, modificato dal decreto ministeriale 2 febbraio 1974, concernente l'inclusione del prodotto denominato « Toprina » nell'elenco dei prodotti di origine minerale e chimico-industriali che possono essere impiegati nell'alimentazione degli animali;

Sentita la commissione tecnica di cui all'art. 9 della legge 15 febbraio 1963, n. 281, modificato dall'art. 8 della legge 8 marzo 1968, n. 399;

Visto il parere del Consiglio superiore di sanità che nella seduta del 28 giugno 1978, ha espresso parere favorevole alla ammissibilità delle bioproteine nella alimentazione di animali ma alla condizione che le carni ed i prodotti provenienti da detti animali non siano comunque destinati all'alimentazione dell'uomo;

Ritenuto necessario uniformarsi al suddetto parere del Consiglio superiore di sanità e pertanto eliminare dall'elenco dei prodotti di origine minerale e chimico-industriali di cui al decreto ministeriale 30 luglio 1969, la voce n. 67 relativa alla sostanza denominata « Toprina » (lieviti coltivati su n-paraffine);

Vista la legge 15 febbraio 1963, n. 281, modificata dalla legge 8 marzo 1968, n. 399, concernente la disciplina della preparazione e del commercio dei mangimi;

Visto il decreto ministeriale 30 luglio 1969, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* del 16 agosto 1969, n. 209, concernente l'elenco dei prodotti di origine minerale e chimico-industriali che possono essere impiegati nella alimentazione degli animali, modificato dal decreto ministeriale 25 febbraio 1970, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* del 17 marzo 1970, n. 69;

Decreta:

Art. 1.

Nell'elenco dei prodotti di origine minerale e chimico-industriali di cui al decreto ministeriale 30 luglio 1969, e successive modifiche, è soppressa la voce n. 67, relativa alla sostanza denominata « Toprina » (lieviti coltivati su n-paraffine).

## Art. 2.

È revocato il decreto ministeriale 14 novembre 1972, modificato dal decreto ministeriale 2 febbraio 1974, concernente la inclusione del prodotto « Toprina » nell'elenco dei prodotti di origine minerale e chimico-industriali che possono essere impiegati nell'alimentazione zootecnica.

Roma, addì 26 novembre 1979.

*Il Ministro della sanità*

ALTISSIMO

*Il Ministro dell'agricoltura e delle foreste*

MARCONA

*Il Ministro dell'industria, del commercio e dell'artigianato*

BISAGLIA