

Le vitamine nelle biomasse per l'alimentazione animale

ALDO GAUDIANO, GUIDO BELLOMONTE e ELISABETTA SANZINI

Laboratorio degli Alimenti

INTRODUZIONE

Essendo noto che i lieviti sono, in generale, una buona fonte di vitamine del gruppo B, è apparso interessante determinare il contenuto vitaminico delle biomasse Liquipron e Toprina. Viene dapprima presentata una breve rassegna dei metodi analitici attualmente usati e dei risultati ottenuti da vari AA. sul contenuto vitaminico di lieviti diversi. Si è inoltre proceduto ad una valutazione sulla copertura del fabbisogno vitaminico in alcuni animali (vitello monogastrico, cavallo, suinetto, coniglio, gallina ovaiole e pollo da carne) nell'ipotesi di una dieta alimentare integrata, al 10 % e al 20 %, con le suddette biomasse.

METODI ANALITICI

Per le vitamine del gruppo B sono stati usati sia metodi chimici, ove disponibili con sufficiente grado di sensibilità e specificità (vitamine B₁, B₂, PP, colina), sia metodi microbiologici. Per le vitamine liposolubili sono stati impiegati metodi chimici. I metodi impiegati, sia chimici sia microbiologici, sono ampiamente descritti in letteratura [1-3] e saranno qui per tanto solo brevemente riassunti, salvo casi particolari.

Vitamina B₁. - Dopo idrolisi acida e digestione con diastasi, si separa la vitamina per cromatografia su Permutite T (Decalco attivato), si ossida con ferricianuro alcalino, si estrae con isobutanolo il tiocromo ottenuto e si procede alla determinazione fluorimetrica di questo (λ eccitazione, 365 nm; λ emissione, 435 nm).

Vitamina B₂. - Dopo idrolisi acida e digestione con diastasi, si eliminano molte sostanze interferenti per trattamento con KMnO₄ e poi H₂O₂. Si esegue quindi la misura fluorimetrica (λ eccitazione, 440 nm; λ emissione, 525 nm), che si ripete dopo trattamento con idrosolfito (prova in bianco).

Vitamina B₆. – Dopo idrolisi acida, neutralizzazione e diluizione, si fa incubare il campione, in parallelo con soluzioni standard, in presenza di un ceppo di lievito B₆-dipendente (*Saccharomyces carlsbergensis* 4228 ATCC 9080). Si procede poi alla misura turbidimetrica.

Vitamina B₁₂. – Dopo trattamento con cianuro, si diluisce e si procede come per la vitamina B₆, usando come microrganismo *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830.

Vitamina PP. – Dopo idrolisi acida, si determina l'acido nicotinico colorimetricamente (a 440 nm) impiegando la reazione con bromuro di cianogeno e acido solfanilico. In alternativa si può effettuare la determinazione microbiologica con *Lactobacillus arabinosus* (*L. plantarum*) 17-5 ATCC 8014.

Acido D-pantotenico. – Dopo digestione con papaina e diastasi, si diluisce e si procede come per la vitamina B₆, usando lo stesso microrganismo impiegato per la vitamina PP.

Biotina. – Si procede come per la vitamina B₆, usando lo stesso microrganismo impiegato per la vitamina PP.

Acido folico. – Dopo idrolisi ammoniacale, neutralizzazione e diluizione, si procede come per la vitamina B₆, usando come microrganismo lo *Streptococcus lactis* R (*S. faecalis* R) ATCC 8043.

Inositolo. – Si procede come per la vitamina B₆, usando come microrganismo il *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 = ATCC 9080.

Colina. – Dopo esauriente estrazione metanolica e idrolisi con Ba(OH)₂, si precipita come reineckato e si determina questo colorimetricamente (a 520 nm) in soluzione acetonica.

Vitamina e provitamine A. – Dopo saponificazione alcalina della frazione lipidica [4] e separazione cromatografica su allumina [5], si procede per i carotenoidi alla misura spettrofotometrica e per la vitamina A alla determinazione colorimetrica secondo il metodo di Carr-Price (ShCl₃ in cloroformio, misura a 610 nm).

Vitamine e provitamine D. – Dopo saponificazione alcalina della frazione lipidica [4], si separa la frazione sterolica mediante cromatografia su strato sottile (gel di silice 60 F₂₅₄, solvente benzene-acetone 95 : 5); si procede poi alla determinazione dei singoli componenti mediante gascromatografia previa silanizzazione [5] o mediante cromatografia liquida ad alta pressione [6].

Vitamina E. – Dopo saponificazione alcalina della frazione lipidica [4], separazione cromatografica su allumina [5] ed eventualmente su strato sottile (gel di silice 60 F₂₅₄, solvente cloroformio) [7], si procede alla determina-

zione colorimetrica (a 524 nm) secondo il metodo di Emmerie-Engel con FeCl_3 e α, α' -dipiridile. Si possono differenziare i tocoferoli dai tocotrienoli per il fatto che questi ultimi non danno la reazione di Emmerie-Engel dopo trattamento con acido solforico; l'identificazione dei singoli tocoferoli e tocotrienoli viene effettuata per via gascromatografica previa silanizzazione [8].

Vitamine K. - In mancanza di dati specifici in letteratura, si sono ricercate le vitamine K sviluppando un metodo per la loro determinazione. Le diverse tecniche di estrazione precedentemente descritte per altri microrganismi [9] non hanno dato risultati soddisfacenti. Buoni recuperi si sono invece ottenuti con la tecnica seguente: la biomassa viene lasciata per 10 minuti a temperatura ambiente dopo aver aggiunto una volta e mezza il suo peso in acqua, contenente 1 % di Triton X-100; si aggiunge quindi alcool etilico in quantità tale da ottenere un grado alcolico di 80°, lasciando il tutto 30 minuti a temperatura ambiente. Si filtra, si diluisce con acqua e si estrae con esano. Dopo concentrazione della soluzione esanica, se ne sottopone una aliquota a cromatografia su strato sottile (lastre di gel di silice 60 F₂₅₄, solvente cloroformio). L'osservazione a luce U.V. rivela come zone scure il fillochinone ($R_F = 0,69$) e i vari menachinoni ($R_F =$ fra 0,61 e 0,75), che si possono poi eluire con alcool e determinare mediante spettrofotometria U.V.

RISULTATI E DISCUSSIONE

È da premettere che, come segnalato da vari AA., il contenuto vitaminico dei lieviti varia non solo con la specie e il ceppo, ma anche con le condizioni colturali. Per esempio, Vulf e Dunez [10] analizzando molti lieviti hanno trovato un contenuto vitaminico complessivo più elevato in *Candida tropicalis* C-36. La *Torula utilis* mostrava invece un minor tenore in piridossina, pantotenato e folato; ed inoltre si hanno notevoli perdite come conseguenza dell'essiccamento: 62,6 % per la B₆, 57,8 % per il pantotenato e perdite minori per biotina e folato. Anche la riboflavina, vitamina notevolmente stabile al calore, viene parzialmente degradata dall'essiccamento [11].

Per quanto riguarda le condizioni colturali, Borukaeva [12] ha dimostrato che la resa in vitamine B₁ e B₆ e in pantotenato dipende dalla fonte di carbonio; per es. in *Candida lipolytica* la sostituzione del glucosio con paraffine fa diminuire piridossina e pantotenato, mentre fa aumentare la tiamina.

Alcuni valori rappresentativi dei dati quantitativi riportati in letteratura per la *Torula* e per il lievito di birra [13] sono raccolti in Tab. I.

Riportiamo inoltre qui di seguito i valori medi trovati da Popova [14] su 17 ceppi di *Candida* per alcune vitamine del gruppo B, espressi in mg/kg di sostanza secca: B₁, 10; B₆ 15,5; PP, 524; pantotenato, 496; inositolo, 2757.

TABELLA 1

Valori relativi al contenuto vitaminico di *Torula* e di lievito di birra (mg/kg)

VITAMINE	<i>Torula</i>	Lievito di birra
Tiamina	5,3	50 - 360
Riboflavina	45,0	36 - 42
Piridossina - HCl	33,4	25 - 100
Niacina	417,3	320 - 1000
Acido pantotenico	37,2	100
Biotina	2,3	5 - 18
Acido folico	21,5	15 - 80
PABA	17,0	9 - 102

Da: Mateles e Tannenbaum [13].

Per la vitamina B₁₂ è stato riportato [15], in *Candida pulcherrima*, un contenuto di 4,5 µg/kg di materiale sedimentato.

I lieviti contengono anche piccole quantità di vitamina E e un discreto quantitativo di provitamina D, che diventa attiva dopo irradiazione. La maggior parte dei lieviti non contiene vitamina A né β-carotene [13].

In Tab. 2 sono stati raccolti i dati quantitativi disponibili per campioni di Liquipron e di Toprina [16-19], integrati da alcuni valori da noi ottenuti. I nostri risultati sulle vitamine liposolubili confermano che esse sono praticamente assenti sia nel Liquipron che nella Toprina. La reazione di Carr-Price per la vitamina A è risultata negativa, la reazione di Emmerie-Engel per i tocoferoli è risultata debolmente positiva e la principale sostanza reattiva si è dimostrata essere un tocotrienolo, con tracce di α-tocoferolo e di α-tocotrienolo. Assenti sono risultate anche le vitamine K. Per quanto riguarda le provitamine A e D, sono risultate assenti le prime, mentre delle seconde è presente in discreta quantità l'ergosterolo (provitamina D₂): 370 mg/kg nel Liquipron, 70 mg/kg nella Toprina.

Come era da prevedere trattandosi di lieviti, le due biomasse mostrano un contenuto abbastanza rilevante di vitamine del gruppo B. Tuttavia i valori ottenuti da campioni diversi della stessa biomassa presentano talora (ad es., per la vitamina B₁₂) grosse differenze, riconducibili presumibilmente ad un processo fermentativo o estrattivo non ben standardizzato. Per tal motivo è difficile valutare se le differenze tra Liquipron e Toprina, che assumono un notevole rilievo per alcune vitamine quali la B₁, la B₆, l'acido pantotenico e l'acido folico, siano significative. Le nostre determinazioni di vitamina B₁ (Tab. 2), effettuate su campioni di cui non era noto il tempo di

TABELLA 2

Valori relativi al contenuto vitaminico di campioni di Liquipron e di Toprina
(mg/kg)

VITAMINE	Liquipron [16, 17]			Toprina [18, 19]		
	a	b	c	a	b	c
B ₁	28,3	38,7	12	5,00	2,9	1,1
B ₂	136,9	129,7	—	94,00	102	—
B ₆	10,4	14,5	—	29,00	30	—
PP	489,8	589,0	—	442,00	439	—
Acido pantotenico . .	312,3	334,7	—	48,00	33	—
Biotina	1,25	0,83	—	—	—	—
Acido folico	11,10	10,3	—	1,60	1,2	—
B ₁₂	0,0245	0,0023	—	0,0026	0,023	—
Colina	5827	6140	—	7150	6000	—
Inositolo	—	—	—	4120	2800	—
A	N.D. o tracce		—	tracce		—
D	tracce		—	N.D.		—
E	< 40		< 10	tracce		< 10
K	—		N.D.	—		N.D.
Provitamina D ₂ . . .	—		370	—		70

I valori delle colonne a e b sono desunti dai riferimenti bibliografici [16-19]. I valori della colonna c sono relativi a dati ottenuti dagli AA. N.D. = Non determinabile; risulta assente con i metodi impiegati.

immagazzinamento, sembrano indicare da un lato una differenza reale ma dall'altro una scarsa stabilità della vitamina nella biomassa, che pertanto si comporterebbe, da questo punto di vista, analogamente ad altri prodotti usati in mangimistica [20]. Nell'ambito delle notevoli oscillazioni sopra evidenziate, risulterebbe comunque un contenuto in vitamine del gruppo B dello stesso ordine di grandezza di quello trovato in altri lieviti, salvo un tenore più elevato in riboflavina e più basso in folato.

L'assenza, o quasi, di vitamine liposolubili appare correlabile alla loro scarsa stabilità al calore in presenza di ossigeno; il processo produttivo delle biomasse prevede infatti un trattamento di oltre un'ora a temperature intorno ai 100°.

È da segnalare la presenza di un certo quantitativo di ergosterolo (provitamina D₂), comunemente presente nei lieviti; i valori da noi misurati sono inferiori a quelli riportati per la Toprina [21], e ciò è dovuto, probabilmente, alla scarsa stabilità dell'ergosterolo all'aria e alla luce.

TABELLA 3

Copertura del fabbisogno vitaminico con mangimi contenenti 10 % e 20 % di Liquipron

VITAMINE	Vitello monogastrico		Cavallo		Sudnetto		Coniglio		Callina ovaiole		Pollo (broiler)
	10%	20%	10%	20%	10%	20%	10%	20%	10%	20%	
B ₁	-	±	-	-	-	+	+	+	+	+	+
B ₂	±	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+
B ₆	-	-	-	-	-	±	-	+	-	-	-
PP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acido pantotenico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Biotina	-	+	±	+	-	-	-	±	+	+	±
Acido folico	+	+	-	-	+	+	?	?	+	+	+
B ₁₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colina	+	+	+	+	-	-	-	±	-	-	-
A, D, E, K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ copre il fabbisogno.
 - non copre il fabbisogno.
 ± al limite della copertura.

TABELLA 4

Copertura del fabbisogno vitaminico con mangimi contenenti 10 % e 20 % di Toprina

VITAMINE	Vitello monogastrico		Cavallo		Suietto		Coniglio		Cattina ovaioia		Pollo (broiler)
	10 %	20 %	10 %	20 %	10 %	20 %	10 %	20 %	10 %	20 %	
B ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B ₂	±	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+
B ₆	-	±	-	-	+	+	+	+	-	+	-
PP	+	+	±	+	-	+	-	+	+	+	+
Acido pantotenico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Biotina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acido folico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B ₁₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colina	+	+	+	+	-	-	-	±	-	-	-
A, D, E, K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ copre il fabbisogno.
 - non copre il fabbisogno.
 ± al limite della copertura.

Per valutare la rilevanza nutrizionale del contenuto vitaminico delle biomasse, abbiamo calcolato se venisse coperto o meno, per le singole vitamine, il fabbisogno di alcune specie animali, nell'ipotesi di un'integrazione del mangime con il 10 % e il 20 % di Liquipron o di Toprina. Gli animali presi in considerazione sono stati il vitello monogastrico, il cavallo, il suinetto, il coniglio, la gallina ovaioia e il pollo da carne (*broiler*). Il contenuto vitaminico delle biomasse è desunta dai valori medi riportati in Tab. 2, mentre i fabbisogni sono quelli indicati dal *National Research Council* [22].

I dati ottenuti (Tabb. 3 e 4) indicano che l'integrazione coprirebbe, in genere, il fabbisogno di riboflavina anche alla concentrazione del 10 % di Liquipron o di Toprina. Per le altre vitamine del gruppo B il fabbisogno verrebbe coperto completamente o parzialmente a seconda della specie animale, del tipo di biomassa (Liquipron o Toprina), della percentuale di integrazione, dello stato di conservazione; per le vitamine liposolubili, praticamente assenti nelle biomasse, il fabbisogno non risulterebbe, ovviamente, mai coperto.

Si ringraziano il dott. L. Lelli e il sig. M. Mosca, che hanno validamente contribuito alla parte sperimentale.

BIBLIOGRAFIA

1. STROBECKER, R. & HENNING, H.M. 1965. *Vitamin Assay*. Verlag Chemie, Weinheim.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 1975. *Official Methods of Analysis*. A.O.A.C., Washington.
3. MINISTERO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE. 1975. *Metodi Ufficiali di Analisi degli Alimenti per Uso Zootecnico*. Supplemento n. 2. Roma.
4. BELL, J. & CHRISTIE, A.A. 1974. Gas-liquid chromatographic determination of vitamin D₂ in fortified full-cream dried milk. *Analyst*. **99**: 385-386.
5. BELLOMONTE, G., GAUDIANO, A., LAURINI, C., LELLI, L., CIVALLERI, S., GILARDI, G. & SANZINI, E. 1977. Determinazione simultanea e parallela delle vitamine A, D, E negli alimenti dietetici e integratori per mangimi. *Riv. Soc. It. Sci. Alim.* **6**: 83-89.
6. KNAPSTEIN, H., POCHET, P. SCHOLZ, H. 1979. Spezielle Probleme bei der Vitamin-D-Analytik in Fruttermitteln mit HPLC. *Fette Seifen Anserichmittel*. **81**: 121-126.
7. WHITTLE, K.J. & PENNOCK, J.F. 1967. The examination of thocopherols by two-dimensional thin-layer chromatography and subsequent colorimetric determination. *Analyst*. **92**: 423-430.
8. SLOVER, H.T., SHELLEY, L.M. & BURKS, T.I. 1967. Identification and estimation of tocopherols by gas-liquid chromatography. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **44**: 161-166.
9. BISHOP, D.H.L., PANDYA, K.P. & KING, H.K. 1962. Ubiquinone and vitamin K in bacteria. *Biochem. J.* **83**: 606-614.

10. VULF, L. & DUNCE, M. 1965. Results of determination of the vitamin B content in yeast produced in the Latvian SSR. *Uch. Zap. Latv. Gos. Univ.* 71: 171-179; da *Chem. Abstr.* 66: 84740 q.
11. WILEY, A.J., DUBEY, G.A., LEUCK, B.F. & HUGHES, L.P. 1950. Torula yeast grown on spent sulfite liquor. *Ind. Eng. Chem.* 42: 1830-1833.
12. BORUKAENA, M.R. 1967. Effect of carbon sources on thiamine, pantothenate, and pyridoxine content of three *Candida* species. *Mikrobiologiya*. 36: 422; da: *Chem. Abstr.* 67, 51393 w.
13. MATELES, R.I. & TANNENBAUM, S.R. (Ed.). 1968. *Single-Cell Protein*. The M.I.T. Press Cambridge, Mass. e Londra.
14. POPOVA, T.E. 1968. Synthesis of B-vitamins by *Candida* yeast strain growing on n-alkanes. *Prinkl. Biokhim. Mikrobiol.* 4: 103-107; da: *Chem. Abstr.* 68: 85198 x.
15. MOSIASHVILI, G.I. & OSIPOVA, S.A. Vitamin B₁₂ in yeasts. 1964. *Mikrobiologiya*. 33: 1027-1031; da: *Chem. Abstr.* 62: 6832 d.
16. MONDINO, A. 1976. In: *Information and Data on Safety of Liquipron*, book 2, pp. 270 e 315. Liquichimica Biosintesi S.p.A., Milano.
17. REINA, G. 1977. In: *Information and Data on Safety of Liquipron*, book 11 (addendum), p. 2923. Liquichimica Biosintesi S.p.A., Milano.
18. MORDENTI, A., CENNI, B., TOCCHINI, M., MONETTI, P.G. & PARISINI, P. 1977. *Zootecn. Nutriz. Anim.* 3: 99 e in: *Documentazione Sperimentale per l'Ammissibilità di « Toprina » nella Alimentazione Animale*, vol. 1. I.2.3.8. Italproteine S.p.A.
19. MARCHETTI, M. 1977. In: *Documentazione Sperimentale per l'Ammissibilità di « Toprina » nella Alimentazione Animale*, appendice, I.2.3.8. Italproteine S.p.A.
20. GAUDIANO, A. 1977. Stabilità delle vitamine negli integratori per mangimi. *Riv. Soc. It. Sci. Alim.* 6: 131-134.
22. JACQUOT, R., LE BARS, H., LEROY A.M. & SIMONNET, H. 1964. Données générales sur la nutrition et l'alimentation. Vol. III di *Nutrition Animale* (a cura di R. Jacquot, A.M. Leroy, H. Simonnet, F. Courvoisier, M. Weber e H. Le Bars). Baillière Ed., Parigi.
21. SNAMPROGETTI L. R. B. 1977. In: *Documentazione Sperimentale per l'Ammissibilità di « Toprina » nella Alimentazione Animale*, vol. 1 I.2.3.2. Italproteine S.p.A.

Metodo immunochimico per il riconoscimento e dosaggio di biomasse nei mangimi

VITTORIO SILANO

Laboratorio di Tossicologia

È stato preparato un siero specifico anti-Toprina contenente anticorpi precipitanti alcuni antigeni della Toprina.

La specificità di questo siero per la Toprina è stata dimostrata analizzando gli estratti ottenuti da numerosi microrganismi con il siero in questione mediante doppia immunodiffusione (Fig. 1).

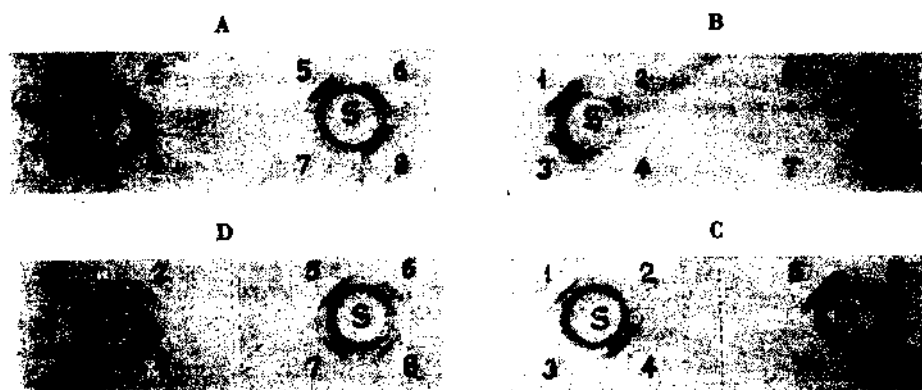


Fig. 1. — Analisi mediante doppia immunodiffusione con il siero anti-Toprina di estratti ottenuti da microrganismi diversi, da Toprina e da mangimi contenenti Toprina con NaCl 0,15 M.

Vetrino A. — 1, 3, 5, 8: antigene della Toprina (controllo); 2: Toprina Sassari; 4: Toprina Torino; 6: *Candida lipolytica* 5654; 7: *Candida lipolytica* 5657.

Vetrino B. — 1, 3, 6, 8: antigene della Toprina (controllo); 2: *Penicillium brevicompactum*; 4: *Bacterium coli*; 5: *Bacillus subtilis*; 7: *Streptomyces* sp.

Vetrino C. — 1, 4, 5, 8: antigene della Toprina (controllo); 2, 3: lievito di birra commerciale; 6, 8: miscela di *Penicillium brevicompactum*, *Bacterium coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* sp. e lievito di birra commerciale.

Vetrino D. — 1: mangime senza Toprina; 2: mangime contenente il 2,5 % di Toprina; 3, 6: mangime contenente il 5 % di Toprina; 4, 7: mangime contenente il 10 % di Toprina; 5: antigene della Toprina (controllo); 8: mangime contenente il 15 % di Toprina.

L'analisi in doppia immunodiffusione con il siero anti-Toprina consente il riconoscimento ed il dosaggio semi-quantitativo della Toprina presente nei mangimi fino a quantità pari al 2,5 % (Fig. 1). Questo dosaggio semi-quantitativo presenta notevole semplicità tecnica e limitato impiego di tempo da parte dell'operatore e si presta, quindi, ad analisi di « routine ».

La determinazione quantitativa della Toprina nei mangimi può essere, invece, effettuata con il siero anti-Toprina con la metodica di immunodiffusione radiale, in cui non si ottiene, come nella doppia immunodiffusione, un arco di reazione, ma un anello di precipitazione la cui area è direttamente proporzionale alla quantità di Toprina presente (Figg. 2 e 3).



Fig. 2. — Analisi mediante immunodiffusione radiale con il siero anti-Toprina di estratti ottenuti da mangimi contenenti Toprina con NaCl 0,15 M.

Da sinistra a destra: Toprina, mangime contenente il 20 %, 12 %, 10 % e lo 0 % di Toprina.

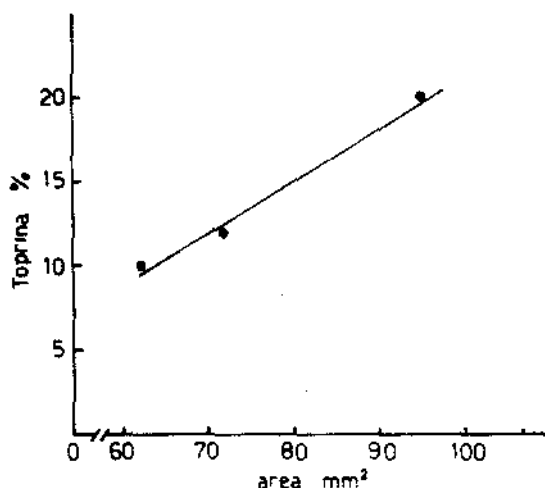


Fig. 3. — Dosaggio della Toprina nei mangimi. Aree degli anelli di precipitazione della Fig. 2 contro la percentuale di Toprina dei campioni corrispondenti.

Essendo stati i risultati di tale ricerca già pubblicati *in extenso* [1], questo lavoro propone il metodo in questione sotto forma di protocollo sperimentale unitamente alla trattazione di tutti i dettagli sperimentali critici.

1. - *Materiali*

- 1.1. - Macinello elettrico per caffè.
- 1.2. - Centrifuga da tavolo ed ultracentrifuga preparativa.
- 1.3. - Vetrini da microscopia 75×25 mm.
- 1.4. - Palloni tarati da 5 l.
- 1.5. - pHmetro.
- 1.6. - Becker da 50 ml.
- 1.7. - Frigorifero.
- 1.8. - Pennello.
- 1.9. - Stufa a secco termoregolabile.
- 1.10. - Pipette da 10, 5, 2 ed 1 ml.
- 1.11. - Foratappi 4 mm e 8 mm.
- 1.12. - Pipette Pasteur ricurve.
- 1.13. - Pompa a vuoto.
- 1.14. - Camera umida (o scatola di Petri).
- 1.15. - Cotone idrofilo.
- 1.16. - Vaschette di plastica di varie dimensioni per lavaggi.
- 1.17. - Vaschette di plastica di varie dimensioni per colorazioni o decolorazioni.
- 1.18. - Carta da filtro.
- 1.19. - Bunsen.
- 1.20. - Calibro (oppure, monoculare ingranditore con scala graduata incorporata, o microscopio da dissezione con obbiettivo 1x).
- 1.21. - Tavolo di livellamento.
- 1.22. - Sorgente luminosa incidente su fondo scuro.
- 1.23. - Microsiringhe da 100 e 25 μ l.
- 1.24. - Bagnomaria termoregolato.
- 1.25. - Carta millimetrata.
- 1.26. - Termometro.
- 1.27. - Liofilizzatore.

2. - *Reattivi*

- 2.1. - Cloruro di sodio.
- 2.2. - Cloruro di potassio.
- 2.3. - Agarose.
- 2.4. - Acqua distillata.
- 2.5. - Dietilbarbiturato sodico (Barbitone sodio).
- 2.6. - Acido cloridrico.
- 2.7. - Sodioazide.
- 2.8. - Detergente.
- 2.9. - Acido tannico.
- 2.10. - Bleu di Comassie.
- 2.11. - Alcool metilico.
- 2.12. - Acido acetico glaciale.
- 2.13. - Glicerina.
- 2.14. - Ammonio solfato.
- 2.15. - Adjuvante completo di Freund.
- 2.16. - Campioni di Toprina e di mangimi contenenti il 2, 5, 10 e 20 % di Toprina.

3. - *Preparazione del siero anti-Toprina*

3.1. - *Preparazione dell'antigene.*

L'antigene da iniettare ai conigli per la preparazione dell'immunsiero anti-Toprina viene estratto dalla Toprina sospendendo 10 g di biomassa in 100 ml di 0,15 M NaCl (2.1) per 3 ore sotto agitazione meccanica. La sospensione è, quindi, centrifugata per 30 min a 45.000 g (1.2) ed il supernatante addizionato con ammonio solfato (2.14) fino alla concentrazione di 4,0 M. Il precipitato così ottenuto, che costituisce l'antigene, viene ridisciolto in acqua, dializzato contro acqua distillata per 5 giorni a 4 °C e liofilizzato.

3.2. - *Immunizzazione dei conigli.*

A 10 conigli di razza Nuova Zelanda, di circa 3,5 kg di peso, vengono iniettati 0,5 ml ciascuno di una soluzione contenente 20 mg di antigene liofilo per ml, dopo opportuna emulsione con un eguale volume di adjuvante completo di Freund (2.15). Circa 0,3 ml della sospensione vengono iniettati nei polpastrelli delle zampe anteriori ed i restanti 0,7 ml vengono, invece,

iniettati per via intramuscolare. Dopo 21 giorni viene praticata una seconda iniezione di 2 ml di soluzione di antigene (40 mg totali di liofilo) per via endovenosa. Quindi, ad ogni coniglio viene iniettato per due volte, ogni dieci giorni, 1 ml di soluzione di antigene contenente 1 mg di liofilo per ml. Dopo 8 giorni circa, i conigli sono sottoposti a salasso dalla vena marginale dell'orecchio per il controllo del titolo anticorpale, e, quindi, definitivamente salassati. Il siero raccolto viene scaldato a 56 °C per 30 min per inattivare il complemento e conservato a — 30 °C.

4. — *Analisi di doppia immunodiffusione in « agarose »*

4.1. — *Preparazione dell'estratto del mangime.*

Sospendere 10 g di mangime in 100 ml di soluzione NaCl 0,15 M per 3 h a temperatura ambiente. Centrifugare la sospensione a 45.000 g per 30 min e liofilizzare il supernatante. Ridisciogliere il liofilo alla concentrazione di 10 mg/ml di acqua ed usare questa soluzione per l'analisi in immunodiffusione.

4.2. — *Preparazione della soluzione di « agarose ».*

4.2.1. — Duecento mg di agarose (2.3) vengono disciolti in 10 ml di acqua distillata scaldando con cautela su fiamma diretta di Bunsen (1.19).

4.2.2. — Duecento mg di barbiturato sodico (2.5) vengono disciolti in 4,5 ml di acqua distillata e mescolati con 5,5 ml di HCl 0,1 M (2.6).

4.2.3. — Si mescolano a caldo le soluzioni 4.2.1 e 4.2.2.

4.2.4. — Si aggiunge sodiazide (2.7) fino allo 0,1 %.

4.2.5. — Questa soluzione così ottenuta si usa a caldo.

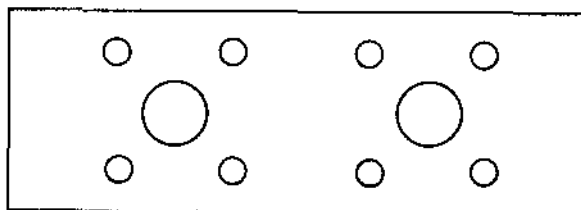
4.3. — *Preparazione dei vetrini di « agarose ».*

4.3.1. — Dei vetrini da microscopia (1.3) vengono lavati accuratamente con detergente (2.8), con acqua distillata e, quindi, asciugati con carta da filtro (1.18). I vetrini puliti ed asciutti vengono spalmati per mezzo di un pennello (1.8) con un sottile strato di « agarose » tamponato fuso (4.2). I vetrini così preparati sono, quindi, seccati in stufa (1.9) a 80 °C.

Su ogni vetrino precedentemente preparato e posto su un piano perfettamente orizzontale (1.21) si stratificano 2 ml di « agarosio » tamponato fuso (4.2) con pipetta da 10 ml (1.10) preventivamente riscaldata sotto getto di acqua calda (l'operazione deve essere eseguita con celerità, ma anche con accuratezza affinché si formi uno strato omogeneo di « agarose » ben distribuito fino ai bordi del vetrino). Si lascia gelificare per circa 30 min a tempe-

ratura ambiente, evitando accuratamente scosse o maneggiamenti dei preparati in via di gelificazione. Se il procedimento è stato eseguito bene si dovrà ottenere uno spessore omogeneo e trasparente di circa 2 mm di « agarose » gelificato. Qualsiasi malformazione dello strato di « agarose » gelificato (presenza di bolle di aria, ecc.) può influire negativamente sui risultati dell'analisi.

4.3.2. - Lo strato di « agarose » gelificato viene inciso con appositi foratappi del diametro di 4 mm e di 8 mm (1.11) secondo la disposizione riportata in figura:



L'« agarose » inciso viene, quindi, asportato mediante sottili pipette Pasteur ricurve (1.12) collegate ad una pompa a vuoto (1.13) in modo da determinare la formazione di pozzetti con bordi perfettamente regolari. La formazione di pozzetti irregolari può influire negativamente sui risultati della analisi.

4.4. - *Procedimento per l'analisi.*

4.4.1. - I pozzetti da 8 mm, accuratamente vuotati del liquido di condensa, vengono riempiti mediante apposita microsiringa (1.23) con 50 μ l di siero anti-Toprina (3) e quelli da 4 mm con 15 μ l di estratto del mangime (4.1).

Per consentire alle soluzioni di diffondere nello strato di « agarose », i vetrini vengono posti per 24 ore in posizione perfettamente orizzontale in camera umida (1.14). La camera umida può essere facilmente preparata con una grossa scatola di Petri rovesciata. I vetrini vengono depositi sul coperchio rovesciato della scatola di Petri con ai lati uno strato di cotone (1.15) imbevuto di una soluzione acquosa allo 0,1 % di sodioazide (2.7) su cui aderisce a tenuta l'altra metà della scatola di Petri.

4.4.2. - In presenza di Toprina nel mangime analizzato, nel punto di incontro delle due soluzioni che lentamente diffondono nello spessore di « agarose », si forma una sottile linea di precipitazione (complesso antigene/anticorpo), ben visibile alla osservazione dei preparati illuminati con luce incidente su fondo scuro (1.22). Ove nel mangime in esame siano presenti

rilevanti quantità di microrganismi diversi dalla *Toprina*, una debole linea di precipitazione molto vicina al pozzetto del siero può anche formarsi.

4.4.3. - I vetrini vengono, quindi, sottoposti ad una serie di lavaggi effettuati con tampone barbiturato sodico pH 8,2 con la seguente composizione:

Barbiturato sodico (2.5)	15 g
HCl 1 M (2.6)	23 ml
KCl (2.2)	34 g
Sodioazide (2.7)	5 g
Acqua distillata (2.4) fino a	5 l

cambiando la soluzione di lavaggio 3 volte al giorno, per due giorni, allo scopo di allontanare dalle maglie dell'agarose le proteine che non hanno reagito (un lavaggio incompleto dei vetrini rende impossibile l'osservazione delle bande di precipitazione dopo la colorazione).

4.4.4. - Si procede, quindi, al fissaggio delle reazioni di precipitazione immergendo per 5 min i vetrini in soluzione di acido tannico all'1 % in acqua distillata. I vetrini vengono immersi in acqua distillata per due o tre ore e, quindi, essiccati in stufa a secco a 37 °C (1.9).

4.4.5. - Quando l'« agarose » è ridotto ad una sottile pellicola completamente essicata, si procede alla colorazione, tenendo immersi i vetrini per 10 min in una soluzione di Bleu di Comassie (2.10) della seguente composizione:

Bleu di Comassie (2.10)	0,1 g .
Alcool metilico (2.11)	50 ml
Acido acetico glaciale (2.12)	10 ml
Acqua distillata	40 ml

La soluzione va preparata due volte al mese.

4.4.6. - Si procede, quindi, alla decolorazione dei preparati immergendoli nella soluzione decolorante della seguente composizione:

Alcool metilico (2.11)	50 ml
Acido acetico glaciale (2.12)	10 ml
Glicerina (2.13)	10 ml
Acqua distillata	30 ml

I lavaggi sono ripetuti fino ad ottenere delle linee di precipitazione colorate su fondo incolore. Si asciuga varie volte con carta da filtro e si lascia seccare a temperatura ambiente.

4.5. - Valutazione dei risultati.

I risultati dell'analisi sono valutati in base alla presenza (od assenza) della reazione di precipitazione specifica. Risultati di ordine semi-quantitativo possono essere ottenuti effettuando, contemporaneamente all'analisi dei campioni incogniti, anche campioni di definita e nota composizione percentuale di Toprina (2.16) (Fig. 2).

5. - Analisi di immunodiffusione radiale in « agarose »

5.1. - Preparazione degli estratti.

Si procede come al punto 4.1.

5.2. - Preparazione della soluzione di « agarose » tamponato.

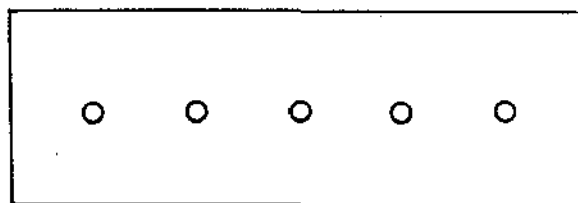
Si procede come al punto 4.2.

5.3. - Preparazione dei vetrini di « agarose ».

5.3.1. - Dei vetrini da microscopia (1.3) vengono lavati accuratamente con detergente (2.8), con acqua distillata e, quindi, asciugati con carta da filtro (1.18). I vetrini puliti ed asciutti vengono spalmati per mezzo di un pennello (1.8) con un sottile strato di « agarose » tamponato fuso (4.2). I vetrini così preparati sono quindi seccati in stufa (1.9) a 80 °C.

5.3.2. - Si pongono in un becker da 50 ml 0,8 ml di acqua distillata (2.4) e 0,2 ml di siero anti-Toprina (3) e si aggiungono, con pipetta da 5 ml (1.10), 2 ml di « agarose » tamponato fuso (4.2), portato, in bagno maria termoregolato (1.24) alla temperatura di 60 °C (si deve controllare la temperatura con termometro (1.26) immerso direttamente nell'« agarose » fuso). Si mescola accuratamente e si versa rapidamente la sospensione sul vetrino (5.3.1) posto su un piano perfettamente orizzontale (1.21) e si lascia gelificare a temperatura ambiente per almeno 30 min, evitando scosse e maneggiamenti dei preparati che potrebbero danneggiare l'uniforme gelificazione dello strato di « agarose ».

5.3.3. - Lo strato perfettamente piano e trasparente di « agarose » gelificato viene inciso con apposito foratappi del diametro di 3 mm secondo la disposizione riportata in figura:



L'« agarose » inciso viene, quindi, asportato mediante sottili pipette Pasteur ricurve (1.12) collegate ad una pompa a vuoto (1.13) in modo da avere la formazione di pozzetti con bordi perfettamente regolari.

La formazione di uno strato non uniforme di « agarose » o di pozzetti irregolari può influire negativamente sui risultati dell'analisi.

5.4. - *Procedimento per l'analisi.*

5.4.1. - I pozzetti vuoti (l'eventuale condensa acquosa formatasi all'interno dei pozzetti deve essere asportata con pipetta Pasteur collegata alla pompa da vuoto) vengono riempiti, usando apposite microsiringhe (1.23), con 12 μ l degli estratti di mangimi a contenuto noto di Toprina e del mangime in esame.

Per consentire alle soluzioni di diffondere nel gel, i vetrini vengono, quindi, posti in posizione perfettamente orizzontale in camera umida (1.14) per 24 ore.

5.4.2. - In presenza di Toprina nei campioni in esame, si forma intorno al pozzetto un cerchio di reazione che risulta ben visibile, anche dopo 12-14 ore, effettuando l'osservazione dei preparati a fresco con una sorgente luminosa incidente su fondo scuro (1.22).

Per una valutazione definitiva si lasciano stabilizzare le reazioni, mantenendo i vetrini in camera umida per 24 ore.

5.4.3. - Si procede come al punto 4.4.3.

5.4.4. - Si procede come al punto 4.4.4.

5.4.5. - Si procede come al punto 4.4.5.

5.4.6. - Si procede come al punto 4.4.6.

5.5. - *Valutazione dei risultati.*

Risultati di ordine quantitativo possono essere ottenuti effettuando, contemporaneamente alla analisi dei campioni incogniti, anche quelle di campioni a percentuale nota di Toprina (2.16). Si misurano con un calibro, oppure con adeguati strumenti ottici (1.20), i diametri ortogonali di ciascun anello di reazione (Fig. 2) e si calcola l'area degli anelli in questione in base al diametro medio. Si costruisce una retta di taratura su carta millimetrata (1.25) ponendo in ordinata la percentuale di Toprina ed in ascissa le aree dei cerchi di reazione dei campioni di riferimento (2.16). La retta di taratura deve essere opportunamente calibrata per il contenuto di Toprina che si deve determinare (Fig. 3).

Per mezzo di questa curva di taratura, calcolando le aree dei cerchi di reazione di mangimi a contenuto incognito di Toprina, è possibile risalire alla percentuale di Toprina presente. Se il campione in esame non contiene Toprina non si osserva alcun cerchio di reazione.

BIBLIOGRAFIA

1. PACE, W., DI MARZIO, G., MASTRANTONIO, P., MORISI, G. & SILANO, V. 1976. Detection and assay of single cell protein products in blends with animal feeds. *J. Sci. Food Agric.* **27**: 315-323.

Accertamento dell'uso delle biomasse da n-alcani nell'alimentazione animale mediante analisi della produzione zootecnica

LUIGI BONIFORTI, MASSIMO DE VINCENZI e VITTORIO SILANO

Laboratorio di Tossicologia

INTRODUZIONE

Il problema di accertare l'eventuale uso delle biomasse da n-alcani nell'alimentazione animale mediante analisi della produzione zootecnica si pose alcuni anni fa, quando fu ventilata la possibilità che le carni ed altre produzioni zootecniche importate da alcuni paesi europei fossero state ottenute con mangimi addizionati di tali biomasse. Tale problema poté essere affrontato grazie alle ricerche svolte indipendentemente presso l'Istituto Superiore di Sanità [1-3] e presso l'Istituto di Industrie Agrarie dell'Università di Milano [4-7]. Da tali ricerche erano, infatti, emersi chiaramente tre diversi metodi utilizzabili per svolgere una indagine conoscitiva su carni ed altri prodotti di importazione. Tali metodi erano basati su:

- a) determinazioni quali-quantitativa degli n-alcani fra C_{13} - C_{30} ;
- b) determinazioni quali-quantitativa degli acidi grassi con numero dispari di atomi di carbonio;
- c) misura del livello dell'isotopo del carbonio di massa 14.

DOSAGGIO DEGLI N-ALCANI

La presenza nei tessuti animali di n-paraffine fra C_{13} e C_{30} in rapporti comparabili alla Toprina è da considerarsi evidenza probante dell'uso di biomasse derivanti da n-alcani nell'ottenimento della produzione zootecnica in esame. Infatti, come risulta dalla Tab. 1, il tessuto adiposo dei suini trattati con Toprina (B, C) contiene quantità rilevanti di n-paraffine; tali paraffine sono assenti nei tessuti degli animali di controllo (A). Inoltre la composizione delle n-paraffine rinvenute nel tessuto adiposo è risultata praticamente identica a quella delle n-paraffine della Toprina (Tab. 2).

La specificità del reperto di n-alcani nel tessuto adiposo degli animali

TABELLA 1

Idrocarburi paraffinici (*) di tessuti di suini alimentati con diverse quantità di Toprina

T E S S U T O	p. p. ml.					
	A (**)		B (***)		C (****)	
	C ₁₄ -C ₁₈	C ₂₂ -C ₂₆	C ₁₄ -C ₁₈	C ₂₂ -C ₂₆	C ₁₄ -C ₁₈	C ₂₂ -C ₂₆
Adiposo	—	—	53,0	14,0	56,0	15,0
Cardiaco	—	—	1,3	0,4	1,6	0,4
Cerebrale	—	—	—	—	—	—
Epatico	—	—	—	—	—	—

(*) La determinazione degli idrocarburi da C₁₄ a C₂₁ e da C₂₄ in su non è stata effettuata a causa di interferenze dovute ad altri composti presenti anche negli organi degli animali di controllo. Ripresa da Alimenti e Coll. [1]

(**) Senza Toprina.

(***) 15 % Toprina.

(****) 30 % Toprina.

TABELLA 2

Composizione percentuale delle n-paraffine della Toprina *

P A R A F F I N A	%
C ₁₃ Tridecano	2,80
C ₁₄ Tetradecano	17,00
C ₁₅ Pentadecano	19,00
C ₁₆ Esadecano	16,00
C ₁₇ Eptadecano	8,60
C ₁₈ Ottadecano	1,60
C ₁₉ Nonadecano	0,80
C ₂₀ Eicosano	0,60
C ₂₁ Eneicosano	0,40
C ₂₂ Duocosano	0,01
C ₂₃ Tricosano	5,50
C ₂₄ Tetracosano	5,60
C ₂₅ Pentacosano	1,10
C ₂₆ Esacosano	3,50
C ₂₇ Nonacosano	8,50
C ₂₈ Triacontano	9,00

Ogni risultato è media di 3 determinazioni.

* Il dosaggio è stato effettuato con il metodo descritto da Di Muccio e Coll. (questo volume, pag. 525).

trattati è stata posta in discussione da Valfré e Coll.[8] a causa del ritrovamento di considerevoli livelli di n-alcani ed idrocarburi in genere nel grasso di suini e bovini di diversa provenienza e, comunque, non alimentati con biomasse da n-alcani. Tali reperti, comunque, non appaiono rilevanti in relazione al problema in esame in quanto la composizione di tali n-alcani è diversa da quella degli n-alcani della Toprina ed, in particolare, il tetradecano, pentadecano ed esadecano, molto abbondanti nel grasso dei suini alimentati con Toprina ($> 50\%$), sono presenti solo in tracce nel grasso di animali non trattati.

TABELLA 3

**Contenuto di n-alcani in carni
d'importazione ***

TIPO DI CARNE	Idrocarburi totali fra C_{14} e C_{16} (ppm)
Vitello (1)	6,97
Vitello (2)	4,66
Vitello (3)	5,60
Vitello (4)	3,41
Vitello (5)	9,70
Vitello (6)	10,10
Bovino	2,60
Suino (1)	4,49
Suino (2)	6,61
Suino (3)	2,41
Suino (4)	3,90
Suino (5)	7,40
Suino (6)	6,80
Suino (7)	5,30
Suino (8)	8,20
Suino (9)	8,50
Suino (10)	7,00
Suino (11)	8,20
Suino (12)	6,70
Suino (13)	9,10
Suino (14)	7,30
Pollo (1)	5,43
Pollo (2)	5,20
Pollo (3)	4,00
Pollo (4)	3,70

* Il dosaggio è stato effettuato con il metodo descritto da Di Muccio e Coll. (questo volume, pag 525)

TABELLA 4

Contenuto di n-alcani in carni d'importazione (ppm) *

	(**) C ₁₂	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₄	C ₁₆	X	C ₁₇	C ₁₈	C ₂₀
<i>Tessuto muscolare:</i>									
Vitello (1)	0,78	0,04	1,44	0,06	1,42	0,00	0,06	0,64	0,46
Vitello (2)	0,57	0,04	1,21	0,05	0,82	0,26	0,09	0,58	—
Vitello (3)	0,54	0,06	1,82	0,10	1,20	0,65	0,08	0,55	0,04
Vitello (4)	0,28	0,04	0,85	0,06	0,71	0,59	0,12	0,41	—
Vitello (5)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Vitello (6)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bovino	0,06	0,02	0,25	0,10	0,36	—	0,19	0,34	0,31
Suino (1)	0,65	0,02	1,48	0,10	0,91	0,44	0,16	0,55	—
Suino (3)	0,06	0,07	0,21	0,02	0,11	0,08	—	0,07	0,02
<i>Tessuto adiposo:</i>									
Suino (2)	0,20	0,05	0,57	0,05	1,94	—	0,07	1,92	0,08
Suino (4)	0,45	0,03	1,34	0,07	0,84	0,44	0,09	0,40	0,04

	C ₁₂₊₂	C ₁₂	C ₁₄	X	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	X	C ₂₀
<i>Tessuto muscolare:</i>										
Vitello (1) ..	0,42	0,31	0,07	0,31	—	0,11	—	—	—	0,22
Vitello (2) ..	0,24	—	—	0,09	0,20	—	0,07	0,10	0,34	—
Vitello (3) ..	0,19	0,30	0,07	—	—	—	—	—	—	—
Vitello (4) .	0,14	—	0,10	0,11	—	—	—	—	—	—
Vitello (5) .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Vitello (6) ..	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bovino . . .	0,28	0,11	0,14	—	0,09	0,08	0,08	0,11	0,08	—
Suino (1) . .	0,18	—	tr	—	—	—	—	—	—	—
Suino (3) . .	0,08	0,05	0,07	0,30	0,16	0,19	0,42	0,36	—	0,14
<i>Tessuto adiposo:</i>										
Suino (2) . .	1,1	0,06	0,46	0,07	—	—	—	0,04	—	—
Suino (4) . .	0,16	0,04	—	—	—	—	—	—	—	—

(*) Il dosaggio è stato effettuato con il metodo descritto da Di Muccio e Coll. (questo volume, pag. 525).
 (**) Indica il numero di atomi di carbonio presenti nell'n-alcane.

L'analisi delle paraffine è stata applicata dall'Istituto Superiore di Sanità ad una serie di campioni di carni di importazione (Tabb. 3 e 4); in tutti i campioni analizzati non furono trovati n-alcani che indicassero l'uso delle biomasse in questione nell'alimentazione degli animali esaminati.

DOSAGGIO DEGLI ACIDI GRASSI CON NUMERO DISPARI DI ATOMI DI CARBONIO

L'altro effetto chiaramente associato all'uso delle biomasse da n-alcani nell'alimentazione animale è una sostanziale alterazione nella produzione zootecnica della composizione degli acidi grassi, consistente in un aumento del contenuto percentuale totale degli acidi grassi con numero dispari di atomi di carbonio. Tale effetto posto finora in evidenza in diversi tessuti del suino e del ratto e nel latte di vacca, dipende in modo quasi direttamente proporzionale dal livello di Toprina nel mangime [1]. Gli acidi grassi con numero dispari di atomi di carbonio sono presenti in elevate percentuali

TABELLA 5

Composizione degli acidi grassi totali delle diete per suini

ACIDO GRASSO	%		
	A (*)	B (**)	C (***)
14 acido miristico	—	0,6	1,2
15 acido pentadecanoico	—	3,9	9,1
16 acido palmitico	13,4	10,6	9,0
16= acido palmitoleico	—	2,4	7,1
17 acido eptadecanoico	—	1,2	2,8
17= acido eptadecenoico	—	10,8	30,0
17== acido eptadecadienoico	—	5,5	16,1
18 acido stearico	4,5	2,7	0,7
18= acido oleico	26,0	19,0	8,0
18== acido linoleico	50,8	38,8	16,0
18=== acido linolenico	5,2	4,4	—
TOTALE ACIDI GRASSI DISPARI	—	21,4	58,0

Ogni risultato è media di 3 determinazioni. Ripresa da Alimenti e Coll. [1].

(*) Senza Toprina.

(**) 15 % Toprina.

(***) 30 % Toprina.

nella Tropina, mentre sono presenti solo in tracce nei mangimi e foraggi convenzionali (Tab. 5). Le composizioni percentuali degli acidi grassi totali del tessuto epatico, cardiaco, muscolare ed adiposo dei suini e del latte di vacche trattati con diverse dosi di Toprina nella dieta sono state determinate da Alimenti e Coll. [1]. I dati ottenuti mostrano nella produzione zootecnica ottenuta da animali alimentati con Toprina un rilevante incremento del contenuto degli acidi grassi pentadecanoico (C_{15}), eptadecanoico (C_{17}), eptadecenoico (C_{17-}) ed eptadecadienoico ($C_{17=}$), mentre il contenuto dell'acido linoleico (C_{18-}) diminuisce. Questi andamenti si osservano in modo sostanzialmente simile nei quattro tessuti e nei campioni di latte analizzati. Inoltre, le percentuali di specifici acidi grassi con numero dispari di atomi di carbonio aumenta con il contenuto di Toprina della dieta in modo simile alla percentuale totale degli acidi grassi dispari (Figg. 1 e 2).

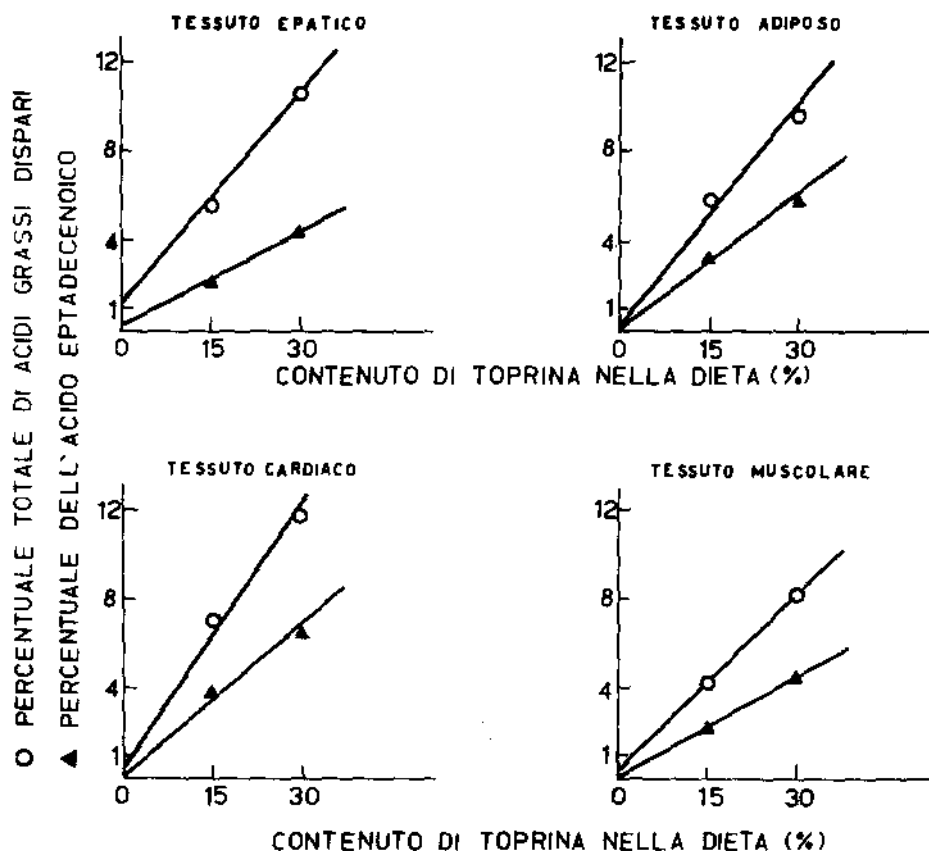


Fig. 1. — Percentuale (sul totale degli acidi grassi) degli acidi grassi con numero dispari di atomi di carbonio e dell'acido eptadecenoico in diversi tessuti di suini alimentati dallo svezzamento con mangimi contenenti diverse quantità di Toprina.

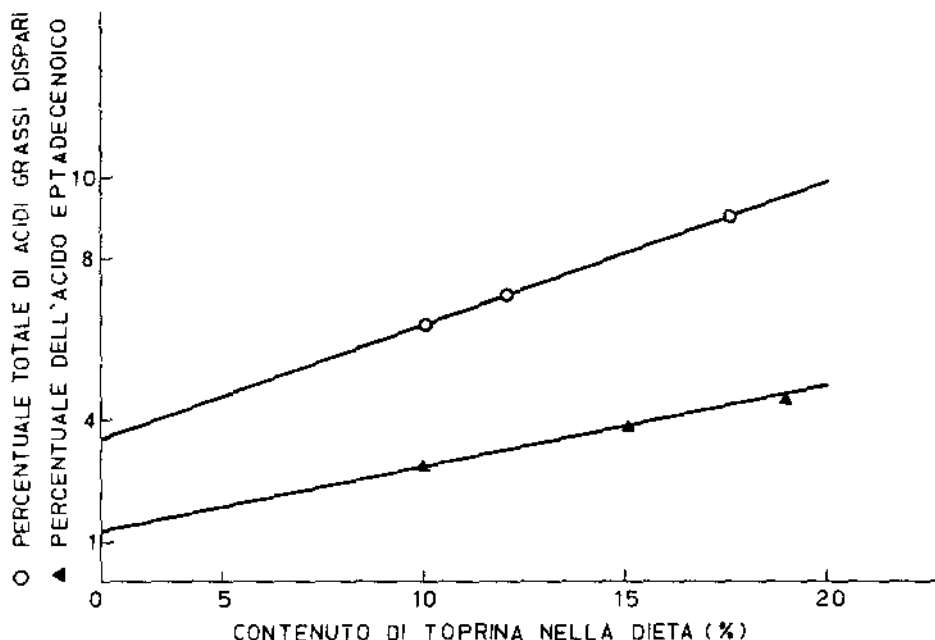


Fig. 2. — Percentuale (sul totale degli acidi grassi) degli acidi grassi con numero dispari di atomi di carbonio e dell'acido eptadecenoico nel latte di vacche alimentate con mangimi contenenti diverse quantità di Toprina.

DOSAGGIO DEL LIVELLO DELL'ISOTOPO DEL CARBONIO DI MASSA 14

Il terzo effetto associato all'uso delle biomasse da n-alcani in alimentazione animale è la diminuzione del livello del ^{14}C nelle produzioni zootecniche. Infatti, il carbonio delle biomasse in questione non ha radioattività di tipo ^{14}C , mentre le sostanze organiche hanno in genere lo stesso livello di ^{14}C dell'anidride carbonica atmosferica (18,5–19,5 dpm/g di carbonio). Pertanto, ove si proceda a combustione completa dei tessuti (ad es. carne, grasso, ecc.), alla trasformazione dell'anidride carbonica prodotta in carbonato di litio ed a determinazione mediante scintillazione liquida del livello di ^{14}C , è possibile stabilire se biomasse da n-alcani siano state utilizzate per l'alimentazione dell'animale produttore dei tessuti analizzati (Tabb. 6 e 7). Questo metodo implica un errore nella misura di alcuni dpm/g di carbonio, ma tale errore può essere considerevolmente ridotto adottando alternativamente una combustione rapida del tessuto mediante bomba calorimetrica (bomba e metodo di combustione in uso presso il Carbon Dating Laboratory del British Museum di Londra e normalmente usata nella datazione dei reperti archeologici). L'anidride carbonica formata viene, quindi, trasformata in benzolo via acetilene e sua trimerizzazione catalitica.

TABELLA 6

Livelli di ^{14}C (dpm/g di carbonio) in campioni di ratti alimentati con Toprina per 3 o 6 mesi

N. DIETA	3 Mesi		6 Mesi	
	Pelo	Muscolo	Peli	Muscolo
1 (senza Toprina *)	17,8 $\pm$ 0,8	17,2 $\pm$ 0,5	17,0 $\pm$ 0,3	16,8 $\pm$ 0,5
2 (Toprina 10 %)	14,4 $\pm$ 0,5	n.d.	14,2 $\pm$ 0,8	13,9 $\pm$ 0,8
3 (Toprina 20 %)	11,7 $\pm$ 0,8	11,9 $\pm$ 0,5	12,9 $\pm$ 0,3	12,0 $\pm$ 0,3
4 (Toprina 30 %)	6,5 $\pm$ 0,3	8,1 $\pm$ 0,5	8,4 $\pm$ 0,5	8,3 $\pm$ 0,3
5 (senza Toprina)	16,5 $\pm$ 0,5	n.d.	16,0 $\pm$ 0,2	16,0 $\pm$ 0,2

Ripresa da Volonterio e Coll. [7].

(*) Toprina (Dried yeast) Protein - Contenuto di proteine 61 % - Batch 1173 - BP Protein Limited.
n. d. = non determinato.

TABELLA 7

Livelli di ^{14}C (dpm/g di carbonio) in campioni di polli alimentati con biomasse da n-alcanti

Percentuale di proteine nei mangimi sostituite da biomasse da n-alcanti	Carne aggrastata	Grasso	Penne	Livelli di ^{14}C nei mangimi
0	19,2	19,5	19,0	19,3
50	12,1	16,1	10,7	15,0
75	9,2	14,9	7,6	11,2
100	7,0	7,2	7,1	6,9

Ripresa da Reamini [6].

CONCLUSIONE

I tre metodi descritti offrono garanzia di mettere in evidenza l'uso delle bioproteine in alimentazione animale ove congrue dosi delle stesse siano somministrate all'animale in modo continuativo fin dalla nascita. Tuttavia essi non sono privi di limitazioni. Esistono, infatti, dubbi sulla idoneità degli stessi qualora piccole quantità di bioproteine siano state addizionate ai mangimi. Non è, poi noto quale sia l'effetto delle modalità di somministrazione delle bioproteine a specie animali diverse sui risultati ottenibili con i tre

metodi ed, in particolare, se sia ancora rivelabile una somministrazione periodica limitata nel tempo o sospesa qualche tempo prima del sacrificio dell'animale.

BIBLIOGRAFIA

1. ALIMENTI e COLL., questo volume, p. 649.
2. BERNARDINI, M.P., BONIFORTI, L., CAVINA, G., FATTORI, I., GALLINELLA, B. & MARTILLOTTI, F. 1974. Alimentazione del bestiame con mangimi a base di proteine da n-paraffine (Toprina), *Atti delle Giornate di Studio promosse ed organizzate dalla Soc. Italiana delle Scienze Veterinarie*, Pisa 20-21 giugno, pp. 137-147.
3. BERNARDINI, M.P., BONIFORTI, L., MERLI, F. & MOSINI, V. 1975. Studio mediante gascromatografia e spettrometria di massa della composizione degli acidi grassi presenti nella Toprina (lieviti su n-paraffine), *Riv. Soc. Ital. Sc. Alim.* 10: 391-394.
4. RESMINI, P. & VOLONTERIO, G., 1972. Determinazione della CO₂ non biogenica nei fermentati alcolici. *Sci. Tecnol. Alim.* 2: 39-46.
5. RESMINI, P. & VOLONTERIO, G., 1973. Misura dei bassi livelli di radiocarbonio mediante scintillazione liquida. *Sci. Tecnol. Alim.* 3: 71-79.
6. RESMINI, P., 1973. A rapid method to determine the carbon from petroleum-SCP in foodstuffs and in animal. *Proceedings of Int. Symposium on Single Cell Protein*, 7-9 November 1973, Rome, 187-191.
7. VOLONTERIO, G., RESMINI, P., BAREI, S. & BAGLIONI, T., 1976. Applicazione del metodo radiochimico per l'accertamento da idrocarburi in ratti alimentati con Toprina. *Clin. Vet.* 99: 25-27.
8. VAFIRE, F., BOSI, G. & BELLEZZA P. 1977. Presenza di n-paraffine in mangimi e risvolti igienico sanitari. *Selez. Suinavicunicola*, 11: 3-15.

Problemi igienico-sanitari e metodologici relativi alle contaminazioni microbiche delle nuove fonti proteiche

GLAUCO PICCININNO

Laboratorio di Veterinaria

INTRODUZIONE

La microflora di un prodotto industriale alimentare è, in linea di massima, il risultato dell'azione di diversi parametri rappresentati essenzialmente da: 1) contaminazione microbica delle materie prime all'inizio della lavorazione; 2) tecnologie usate per la lavorazione e la produzione dei semilavorati; 3) tecnologie usate nelle successive fasi di finissaggio, confezionamento, imballaggio, ecc.; 4) condizioni di stoccaggio e di conservazione del prodotto finito. Si comprende pertanto lo stretto rapporto che viene ad instaurarsi fra l'azione di tali parametri e la conseguente *facies microbica* del prodotto finito al momento in cui viene consumato.

Onde chiarire, sia pure nelle linee generali, le problematiche di carattere igienico-sanitario sollevate dall'uso delle cosiddette bioproteine, in vista della loro utilizzazione zootecnica, riteniamo opportuno descrivere schematicamente i parametri che intervengono nella produzione delle biomasse in generale e di quelle da n-alcani in particolare e quindi compiere un'analisi delle possibilità di contaminazione presenti in ciascuna fase della produzione.

Verranno infine proposti specifici protocolli di analisi e di controllo microbiologico che hanno lo scopo di garantire l'innocuità del prodotto dal punto di vista igienico-sanitario, per quanto concerne le possibilità di contaminazione da batteri saprofiti o patogeni.

PROCESSI DI PRODUZIONE DELLE BIOMASSE

1. Considerazioni generali.

Per quanto concerne la produzione di biomasse sono stati messi a punto e brevettati numerosi processi utilizzando ceppi microbici diversi e svariati substrati e naturalmente tecnologie diverse.

Così, ad esempio, possono essere coltivate alghe unicellulari dei generi *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina* [1], batteri dei generi *Bacillus*, *Hydroge-*

nomonas, *Methanomonas*, *Pseudomonas* [1, 2], funghi filamentosi dei generi *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* [1, 3], ed infine lieviti dei generi *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Candida*.

Per quanto concerne i substrati, già in anni passati erano molto usate le melasse di barbabietola, di canna da zucchero e di granoturco, nonché polpa di barbabietola e di agrumi, scarti di patate, sieri di latte e, più recentemente, residui solidi cellulosici dei rifiuti urbani, escrementi animali di bovini e volatili, alcoli quali metanolo ed etanolo ed infine idrocarburi quali gasolio, petrolio greggio, metano e n-paraffine, sui quali si era maggiormente concentrata l'attenzione per una serie di motivazioni prevalentemente economiche.

L'associazione microrganismi-substrato è stata oggetto di numerosi brevetti di produzione, alcuni dei quali già operanti da tempo, altri ancora allo studio; ci limiteremo a citarne alcuni a scopo puramente esemplificativo [4]. La Amber-Labs ha sviluppato un processo SCP (Single Cell Protein) da siero di latte; la Bochetel Corp. intende sviluppare un processo SCP servendosi di batteri cellulosolitici coltivati su cellulosa; la Chevron ha sviluppato un processo servendosi di batteri e di n-paraffine; la General Electric sta sviluppando un processo SCP da residui dell'agricoltura (*feed lots*) utilizzando un micete; la Denver Research partecipa alla realizzazione di un impianto SCP in Guatemala utilizzando un fungo e residui di caffè; l'International Farm System ha in corso un processo di conversione in SCP di deiezioni animali; la Mitsubishi Gas Chem. sta lavorando alla realizzazione di un programma che utilizza il metanolo ed un bacillo; la Quaker Oaks Co. ha sviluppato un processo per la produzione delle SCP basato su residui di cellulosa e lignina; la St. Regis Paper Co. nel Wisconsin già opera in un impianto che utilizza liquidi solfitici delle cartiere come substrato ed una *Torula* come microrganismo.

Lo sviluppo di processi di produzione delle SCP utilizzando lieviti, e segnatamente *Candida*, coltivati su idrocarburi (gasolio, n-paraffine), in una con le problematiche e gli interrogativi posti dall'uso di substrati e ceppi microbici inconsueti hanno indotto le Autorità sanitarie a riflettere ed a proporre una serie di cautele operative, ma nel contempo hanno riproposto all'attenzione degli studiosi e degli operatori sanitari la «innocuità» di tutti quegli altri prodotti finora consumati tranquillamente dagli animali e dall'uomo, dando l'avvio ad un'operazione di revisione che tuttavia si prospetta molto lunga nel tempo.

2. Produzione di SCP da idrocarburi.

Considerati i limiti di utilizzazione del metano, soprattutto per la difficoltà di isolare e mantenere in coltura batteri adattabili a tale substrato, si

può dire che, allo stato attuale delle conoscenze, gli *n*-alcani o *n*-paraffine sono gli unici idrocarburi che si prestano per la produzione di SCP.

Esiste tuttavia anche un brevetto della BP utilizzando *Candida* coltivate su gasolio, ma questa tecnologia non è molto diffusa e non ha buone prospettive per il futuro, dato l'elevato inquinamento del prodotto finito che comporta metodi di purificazione complessi e costosi, i quali peraltro non garantiscono l'allontanamento di ogni traccia di substrato dal prodotto finito [4].

Il brevetto utilizzando *n*-paraffine della Kanegafuchi e l'altro della BP sono stati proposti rispettivamente dalla Liquichimica e dalla Italproteine, che hanno chiesto l'autorizzazione a produrre biomasse. Per tale motivo descriveremo entrambi i processi, ponendo in luce le relative problematiche igienico-sanitarie.

A) Produzione di SCP da *n*-paraffine (brevetto Kanegafuchi) [5].

a) Preparazione del substrato.

I componenti del substrato (*n*-paraffine, acqua, sali minerali, ecc.) vengono avviati al fermentatore in linee separate e in condizioni di sterilità.

b) Preparazione dell'inoculo e fermentazione.

La sezione fermentazione è costituita da 10 fermentatori che operano in coppie indipendenti. L'inoculo di *Candida novellus* ATTC 20275 IS, preparato in laboratorio in beute, viene immesso sterilmente in un *seed* (piccolo fermentatore) dove viene effettuata una prefermentazione in terreno tradizionale per aumentare il volume dell'inoculo. Successivamente la brodocoltura del *seed* viene immessa, attraverso tubature sterili, nel fermentatore vero e proprio.

Lo sviluppo microbico avviene in coltura sommersa, con agitazione ed aereazione, garantite la prima da un rotore ad eliche, la seconda da un compressore che insuffla aria dal basso nel fermentatore. Mentre al primo fermentatore viene inviata in continuo una corrente di acqua e sali minerali, una parte del brodo viene mandata al secondo fermentatore per l'esaurimento delle *n*-paraffine e degli altri nutrienti.

Tutte le operazioni sono condotte in condizioni di sterilità onde consentire di operare una fermentazione continua per periodi prolungati. Periodicamente vengono effettuati prelievi sterili di brodocoltura, attraverso tagli di vapore, per analisi di controllo sulla concentrazione delle paraffine, dei sali minerali e della biomassa, nonché controlli di purezza e di pH.

c) Concentrazione del prodotto ed essiccamento.

La brodocoltura, estratta in flusso continuo dal secondo fermentatore, viene concentrata prima di passare alla fase di essiccamento. Tale scopo viene raggiunto attraverso tre stadi successivi di centrifugazione (con due fasi di

lavaggio della biomassa) e quindi attraverso una filtrazione su filtri a tamburo rotante sotto vuoto.

La pasta così ottenuta viene avviata poi a tre essiccatori funzionanti in parallelo dai quali esce il prodotto finito finemente granulare con il 4,5 % circa di umidità. Tramite una linea di trasporto pneumatica il prodotto viene caricato nei silos intermedi per il controllo di qualità e successivamente inviato in silos finali.

d) *Sistema di depurazione scarichi liquidi.*

Le acque di scarico dell'impianto di produzione possono essere distinte in tre classi:

- 1) acque di processo: provenienti dagli impianti di fermentazione;
- 2) acque oleose: provenienti dal lavaggio dei serbatoi per n-paraffine e combustibili;
- 3) acque sanitarie: provenienti dai servizi igienici.

Il sistema di trattamento cui queste acque vengono sottoposte comprende tre fasi.

Le acque vengono dapprima disoleate, quindi subiscono un primo trattamento con sostanze flocculanti. I fanghi sedimentati sul fondo del bacino vengono inviati ad un sistema di smaltimento fanghi. Il secondo trattamento viene realizzato mediante un impianto a fanghi attivi che chiarifica ulteriormente l'acqua; questa infine viene sottoposta ad un terzo trattamento, che fissa i fosfati mediante calce.

e) *Sistema smaltimento fanghi.*

I fanghi provenienti dal trattamento primario e secondario vengono avviati ad un inceneritore dove vengono completamente ossidati a 500 °C. I fumi, prima di essere scaricati nell'atmosfera, vengono lavati onde evitare l'inquinamento atmosferico.

f) *Prevenzione dell'inquinamento atmosferico.*

Il problema dei gas combustibili viene risolto mediante la dispersione dei fumi a grande altezza attraverso un camino alto 170 metri. Per quanto riguarda l'emissione di polveri proteiche, costituite da lieviti vivi o morti, trascinate dai flussi di aria della fermentazione e dell'essiccamento, è presente un sistema di trattamento per incenerimento.

g) *Protezione e sicurezza del personale.*

Tutte le operazioni relative alla preparazione dei ceppi e degli inoculi sono eseguite in ambienti sterili. Il prodotto non viene in contatto con l'ambiente esterno fino alla fase di filtrazione. Particolare cura è stata rivolta al problema delle emissioni gassose e delle polveri proprie della lavorazione, sia che si tratti di microrganismi vivi o morti. Questo aspetto interessa non

solo gli operatori d'impianto ma tutte le persone che possano risultare esposte a queste emissioni.

B) Produzione di SCP da *n*-paraffine (brevetto Anic-BP) [6].

a) Preparazione del substrato.

I componenti del substrato (*n*-paraffina, acqua, sali minerali, acido fosforico, ammoniaca) vengono inviati al fermentatore in flussi separati e dopo essere stati sterilizzati.

b) Preparazione dell'inoculo e fermentazione.

L'inoculo di *Candida lipolytica* CBS, preparato in laboratorio in beute, subisce una prefermentazione in un *seed* e viene quindi immesso nel fermentatore attraverso tubature sterilizzate con vapore. Lo sviluppo dei lieviti avviene in coltura sommersa mediante aereazione ed agitazione.

Tutte le operazioni sono condotte in condizioni di sterilità onde consentire una fermentazione continua per periodi prolungati e periodicamente vengono effettuati prelievi per analisi di controllo.

c) Concentrazione del prodotto ed essiccamento.

Il flusso di brodocoltura nel fermentatore viene fatto passare in un separatore centrifugo allo scopo di ottenere una fase acquosa da riutilizzare ed una «crema» concentrata di lieviti. Quest'ultima viene pastorizzata in un serbatoio separato e poi avviata all'essiccamento. La polvere essiccata, con il 5-6 % di umidità residua, attraverso un sistema di trasporto viene scaricata dalla camera di essiccamento ai silos di stoccaggio. Da questi ultimi il prodotto viene prelevato per essere granulato o macinato e quindi insaccato.

Un rapido confronto fra le due tecnologie descritte non consente di cogliere differenze sostanziali e significative fra i due cicli di produzione, se si eccettuano quelle dovute al ceppo usato, al diverso trattamento termico dei due prodotti ed ai sistemi antinquinamento adottati.

PROBLEMI DI CONTAMINAZIONE MICROBIOLOGICA LEGATI ALLA TECNOLOGIA DI PRODUZIONE ED ALLA UTILIZZAZIONE ZOOTECNICA DELLE BIOMASSE

Tali problemi sono di due tipi: 1) possibile presenza nel prodotto finito di una microflora batterica qualitativamente e quantitativamente dannosa per la salute dell'animale; 2) presenza nel prodotto finito di cellule di lieviti, vitali o morte, in grado di esplicare una qualche azione sull'animale.

Un altro problema legato alla tecnologia produttiva è rappresentato dal ruolo delle polveri di lievito, che si liberano nell'ambiente durante la

lavorazione, e altresì di quelle che si liberano nelle operazioni di insaccamento e conservazione del prodotto finito. Infatti sono stati descritti fenomeni di allergia e di sensibilizzazione, rappresentati da asme ed alveoliti allergiche [7, 8], anche in presenza di cellule morte, sia nell'uomo che negli animali.

La conoscenza, sia pur sommaria, della tecnologia di produzione delle biomasse, della natura delle stesse e delle caratteristiche di conservabilità nel tempo ci consentono ora di prospettare con sufficiente approssimazione le caratteristiche accettabili ed i limiti per la microflora di questi prodotti, secondo i criteri accennati nell'introduzione.

È bene chiarire subito che, pur trattandosi di prodotti ottenuti con una tecnologia peculiare, le biomasse sono assimilabili alle farine e mangimi per uso zootecnico, particolarmente a quelle di origine animale; quindi, in prima approssimazione, possono valere per esse le indicazioni tecniche e le norme che regolano la microbiologia dei prodotti vegetali e animali per uso zootecnico. In particolare, la notevole esperienza acquisita sulla microflora generale e specifica delle farine, specialmente animali, e sulle implicazioni di ordine igienico-sanitario da queste sollevate possono servire di guida per valutazioni analoghe sulle biomasse. Questo già è stato fatto da organizzazioni internazionali consultive e tecniche [9, 10] e ad esse faremo prevalente riferimento nel prosieguo della trattazione.

Le fermentazioni industriali, e quindi anche la produzione di biomasse su n-alcane, debbono essere condotte in condizioni di sterilità, sotto pena di veder rapidamente contaminata tutta la massa di terreno culturale; i problemi di carattere igienico e forse anche sanitario insorgono o possono insorgere alla fine della fermentazione, quando cessa la lavorazione in condizioni di sterilità. A conforto di quanto stiamo dicendo è opportuno citare due ampie ricerche effettuate alcuni anni orsono sulle farine animali da Quevedo in Perù [11] e da Redaelli in Italia [12].

L'uomo, gli animali, le macchine e l'ambiente vengono a costituire un unico «ecosistema» nel quale si instaurano complessi cicli difficilmente controllabili, una volta che si sia verificata una qualche contaminazione accidentale attraverso una o più delle molteplici vie presenti nel ciclo, se non si interviene oculatamente con opportune operazioni di pulizia e decontaminazione.

Anche negli impianti per la produzione di biomasse, fatta eccezione per la fase di fermentazione, di norma sterile, esistono possibilità di contaminazione a vari livelli:

- 1) nella fase di filtrazione e centrifugazione;
- 2) nella fase di essiccamento, nella quale tempi di esposizione e temperature di trattamento non garantiscono condizioni igienico-sanitarie del prodotto essiccato:

- 3) nella fase di insilaggio, dove il prodotto sosta per tempi più o meno lunghi, consentendo presumibilmente una lenta moltiplicazione microbica [13];
- 4) nella fase di riempimento dei sacchi, dove può svolgere un ruolo importante la polvere di lievito presente nell'aria e a terra [11, 12];
- 5) nella fase di stoccaggio e conservazione dei sacchi stessi;
- 6) nella fase di trasporto.

In tutte queste fasi, l'uomo, i roditori, gli uccelli, le mosche, se presenti, possono agire come vettori attivi o passivi di contaminazione, in aggiunta alla dispersione delle polveri.

Per quanto riguarda la diffusione all'esterno delle eventuali contaminazioni ambientali, gli impianti di depurazione degli scarichi aeriformi e liquidi previsti dalle industrie del settore sembrano, in linea di massima, sufficienti a garantire la decontaminazione microbica degli stessi, nella fattispecie, delle acque di rifiuto industriali, oleose e sanitarie, nonché delle polveri presenti nell'aria, fatte salve le riserve espresse dall'Istituto Superiore di Sanità.

SIGNIFICATO ED IMPORTANZA DELLE DIVERSE CLASSI DI MICRORGANISMI PRESENTI NELLE FARINE PER USO ZOOTECNICO, AI FINI DI UNA LORO VALUTAZIONE IGIENICO-SANITARIA

Anche per questo aspetto della problematica faremo riferimento prevalente all'esperienza acquisita nei riguardi delle farine animali e dei prodotti disidratati in generale, in quanto il processo di essiccamento e la conseguente riduzione notevole dell'acqua libera portano alla selezione di una microflora abbastanza confrontabile e sovrapponibile nei diversi tipi di prodotti, indipendentemente dalla natura dei prodotti stessi.

Mossel [14], in una trattazione generale sull'argomento, afferma che, malgrado l'opinione diffusa che i prodotti disidratati non presentino particolari problemi igienico-sanitari, possono verificarsi, sia pur raramente, contaminazioni che, favorite da particolari condizioni ambientali, determinano alterazioni dei prodotti ed episodi tossinfettivi o chiaramente tossici.

Fra i microrganismi di più frequente reperto vi sono indubbiamente le *Bacillaceae* e fra queste anche specie tossigene quali *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*, sui quali ritorneremo fra breve.

Anche le *Enterobacteriaceae*, comprese *Salmonella* ed *Escherichia coli*, enteropatogeni, si ritrovano frequentemente nei prodotti essiccati, anche se sottoposti a trattamenti termici elevati.

Le *Enterobacteriaceae* possono sopravvivere per lunghi periodi ed anche moltiplicarsi nelle farine animali [13], diffondendo spesso la contaminazione al mangime completo. La presenza di Stafilococchi e di enterotossine può apparire inaspettata, tuttavia essa è stata segnalata in qualche occasione

anche in farine animali [15, 16]. *Staphylococcus aureus*, se presente in piccola quantità per contaminazione prevalentemente di origine umana, può moltiplicarsi soprattutto durante le operazioni tecnologiche di concentrazione, per le notevoli condizioni di anaerobiosi e di progressiva riduzione dell'a. (*activity water*) [17]. Durante il successivo processo di essiccamento ad alta temperatura le cellule batteriche vengono uccise mentre le enterotossine termostabili non risentono del trattamento termico [18-20]. Tali risultanze sperimentali, ottenute per il latte, possono tranquillamente essere estese alle farine animali e alle SCP, per l'affinità delle condizioni tecnologiche di lavorazione.

Infine, anche le micotossine (aflatossine in particolare) possono essere riscontrate frequentemente nei prodotti essiccati, per lo sviluppo di funghi tossigeni nel prodotto ancora umido. Anche nel prodotto secco tuttavia possono instaurarsi contaminazioni fungine per migrazione di vapor d'acqua verso le parti più fredde del prodotto chiuso nel suo contenitore e conseguente aumento locale dell'a. [21, 22] e germinazione delle spore fungine più xerofile.

In aggiunta a queste categorie di microrganismi, presenti in misura diversa nelle differenti categorie di prodotti disidratati, Mossel ritiene non improbabile la possibilità di produzione di enterotossine di diversa origine, segnatamente da Streptococchi di gruppo D, notoriamente resistenti a condizioni chimico-fisiche particolarmente sfavorevoli, e da *Clostridium perfringens*.

Dopo queste considerazioni generali, tratteremo ora brevemente del significato e dell'importanza delle diverse classi di microrganismi testè descritti, presenti nei prodotti essiccati, mettendoli in relazione anche, laddove possibile, con i parametri di cui si è detto in apertura, particolarmente la tecnologia di lavorazione e le condizioni di conservazione (temperatura ed umidità). Ciò allo scopo precipuo di consentire una valutazione igienico-sanitaria dei prodotti citati e, per estensione, delle farine SCP, dalla quale potrà scaturire successivamente una indicazione sui protocolli di analisi più opportuni, anche sulla base delle risultanze sperimentali (per la verità poco numerose, per quanto riguarda le SCP).

Carica batterica mesofila aerobia.

Essa rappresenta il numero totale di microrganismi presenti nel prodotto in esame, in grado di svilupparsi in presenza di ossigeno ed a temperature intorno ai 30-37 °C. Pur non rappresentando *tutti* i microrganismi realmente presenti nel prodotto, la carica batterica mesofila assume tuttavia un significato importante in molti casi per le seguenti ragioni:

1) un'alta carica batterica sta ad indicare la utilizzazione di materie prime scadenti oppure una scadente igiene nel corso della lavorazione o una

temperatura di conservazione inadatta. È logico sospettare in tali condizioni anche la possibilità di sviluppo di batteri patogeni mesofili;

2) vari microrganismi, generalmente considerati apatogeni, come streptococchi fecali, enterobatteri, ecc. possono essere causa di episodi tossinfettivi quando il loro numero superi determinati valori;

3) la presenza di alte cariche batteriche in un prodotto testimonia spesso anche lo stato di conservazione di questo, dato che valori compresi tra 10^6 e 10^8 determinano l'inizio dei fenomeni di alterazione.

Nel caso di prodotti essiccati in generale e quindi anche delle farine animali e delle SCP, il terzo punto ha un significato molto limitato; tuttavia, nel suo insieme, la carica batterica assume un significato igienico importante nei riguardi della lavorazione e della conservazione del prodotto, come già sottolineato poc'anzi, e come tale va riguardata anche ai fini di una valutazione delle biomasse. Vedremo a tale proposito nel successivo paragrafo quali siano i limiti di accettabilità proposti per questi prodotti.

Dato che le tecnologie di produzione sono parzialmente a cielo scoperto, c'è da attendersi, per quanto concerne la carica microbica aerobica, una prevalenza di forme bacillacee, come già puntualizzato da Mossel [14] per i prodotti disidratati in genere, per la origine aerea di tali microrganismi e per la ben nota resistenza delle spore. In tale evenienza non è da escludere la presenza anche di *Bacillus subtilis* e di *Bacillus cereus*. A proposito di quest'ultimo, è ormai da tempo accertata la sua enterotossicità per l'uomo [23-25] se presente a concentrazioni superiori a 10^6 cellule/g.

Enterobacteriaceae.

Dato il loro habitat intestinale (uomo ed animali), questi microrganismi sono stati considerati in passato come indicatori di contaminazione fecale e pertanto potevano far sospettare anche la presenza di microrganismi di origine ugualmente fecale, quali le Salmonelle [26-29].

Oggi tuttavia questa considerazione ha perso parte del suo valore sia per la possibilità di avvalersi di tecniche sufficientemente specifiche e sicure per la ricerca delle Salmonelle, sia perché è stato dimostrato che prodotti alimentari con basse cariche di coliformi o addirittura privi di questi, possono risultare contaminati da Salmonelle per vie diverse da quella fecale diretta. Inoltre, molti enterobatteri, diversamente da *Escherichia coli*, non hanno origine fecale, come *Citrobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella* (con poche eccezioni), *Erwinia*, *Serratia*, ecc.; quindi la loro eventuale presenza in prodotti alimentari assume un diverso significato igienico.

Attualmente pertanto, accanto al primitivo significato di indicatori di contaminazione fecale, rimasto valido per *Escherichia coli* e per poche altre

specie ad habitat intestinale, gli enterobatteri sono venuti assumendo un significato più tecnologico di indicatori di un processo di lavorazione igienicamente poco appropriato e di un conseguente trattamento termico, laddove esso esiste, insufficiente, essendo gli enterobatteri in generale uccisi alla temperatura di circa 60 °C.

La presenza di enterobatteri nelle farine animali, ampiamente documentata [11, 13, 15, 16, 30, 31], assume significato ed importanza in relazione soprattutto alla possibile presenza di enteropatogeni responsabili di sindromi infettive diverse negli animali e nell'uomo (diarree neonatali dei suinetti da *E. coli*, sindromi diarroiche da *Salmonella*, ecc.). Il ruolo delle farine e dei mangimi per uso zootecnico nella diffusione delle *Salmonelle* è troppo noto perché metta conto di parlarne in maniera diffusa; si rimanda perciò alla vastissima bibliografia sull'argomento [12, 13, 15, 31, 33, 35-42]. Anche le SCP da n-alcanti possono andare incontro ad eventuali contaminazioni da *Salmonelle*, di origine fecale o non fecale, a seconda delle circostanze ambientali, dell'igiene personale e generale, delle condizioni di lavorazione, della presenza o meno di microfauna nell'ambiente, ecc. La tappa obbligata dell'essiccamento non sembra escludere tale evenienza, sia perché potrebbe non risentire del trattamento termico, sia perché potrebbe verificarsi a valle dello stesso. A tale proposito ricordiamo ancora una volta il ruolo determinante che possono avere le polveri di lievito nel mantenere e diffondere una eventuale piccola contaminazione e la possibilità concreta di lenta moltiplicazione dei microrganismi nelle fasi di insilaggio e di successivo stoccaggio.

Stafilococchi patogeni.

La presenza di *Stafilococchi aurei* in un prodotto alimentare indica una contaminazione da parte dell'uomo attraverso infezioni cutanee (o anche cute sana), tosse e starnuti, e naturalmente anche l'uso di processi termici inadeguati, qualora la contaminazione sia a monte del processo medesimo.

Per quanto concerne le farine per uso zootecnico in generale, la presenza e l'importanza degli *Stafilococchi* è stata segnalata diverse volte [14-17]. L'importanza sanitaria di tali microrganismi è legata all'esistenza di particolari ceppi di *Staphylococcus aureus* enterotossici, i quali elaborano, fra le altre tossine tipiche di questa specie, anche una enterotossina attiva per via orale [43-47].

Anche le biomasse da n-alcanti, durante le fasi di lavorazione successive alla fermentazione, possono subire contaminazioni accidentali da *stafilococchi* patogeni; tuttavia il pericolo concreto di tossinfezioni conseguente all'ingestione di farine contaminate da *Stafilococchi* è piuttosto remoto, stante la necessaria presenza di alte cariche di tali microrganismi per la produzione di quantità discrete di enterotossina in grado di esplicare un'azione tossica.

Streptococchi di gruppo D o enterococchi.

Anche gli enterococchi sono stati considerati per molto tempo come germi test di contaminazione fecale, essendo normalmente presenti nell'intestino dell'uomo e degli animali. Tuttavia esiste una scarsa relazione fra presenza di enterococchi ed *Escherichia coli* [48, 49]; i primi, proprio a causa della loro particolare resistenza a condizioni chimico-fisiche sfavorevoli, mal si prestano infatti come indicatori della presenza di specie patogene di origine fecale, in quanto queste ultime non sopravvivono di regola alle suddette condizioni sfavorevoli. Per tale motivo, gli enterococchi sono venuti assumendo negli ultimi anni un significato di indicatori di processi di lavorazione poco appropriati, sopravvivendo essi in ogni caso anche a trattamenti tecnologici molto drastici, quali essiccamento, congelamento, salagione, ecc. [48]. In prodotti disidratati essi potrebbero in qualche caso moltiplicarsi e raggiungere soglie oltre le quali diventano tossigeni, come più volte segnalato per l'uomo [49, 50].

Tuttavia, per le SCP, le risultanze sperimentali acquisite finora sembrano conferire agli streptococchi di gruppo D un'importanza limitata, verosimilmente a motivo delle scarse possibilità di contaminazione fecale di questi prodotti.

Clostridium perfringens.

Esiste una vasta letteratura documentante la possibilità, da parte di questa specie batterica, di dar luogo a sindromi diarroiche negli animali e nell'uomo [51-53]. Ciò è dovuto in parte all'esistenza di ceppi altamente termoresistenti (30-60 min a 100 °C), anche se vi sono in letteratura episodi tossinfettivi dovuti a ceppi termosensibili. Il microorganismo in questione elabora numerose tossine ad azione differente, fra cui sembra assumere particolare importanza la tossina alfa ad attività lecitinasica. Diversi lavori segnalano la presenza di *Clostridium perfringens* nelle farine animali [16]. Al contrario, per le SCP le risultanze sperimentali acquisite finora sembrano conferire a questo microorganismo un'importanza molto limitata.

STANDARDS BATTERIOLOGICI E PROTOCOLLI DI ANALISI
SUGGERITI PER LE FARINE ANIMALI E PER LE SCP

I criteri per l'esame batteriologico delle farine di carne e di pesce per uso zootecnico sono stati elaborati anni orsono dall'I.S.S. e pubblicati nei « Metodi Ufficiali di analisi degli alimenti per uso zootecnico » a cura del Ministero dell'Agricoltura.

In breve, essi indicano le modalità di prelievo e di analisi per la ricerca dei germi saprofiti (coliformi, *E. coli*, enterococchi, clostridi solfito-riduttori)

e dei germi patogeni (bacilli carbonchiosi, Salmonelle, Shigelle ed Arizona), nonché le prove biochimiche per la successiva identificazione.

Per quanto concerne le SCP, a livello nazionale non esistono protocolli di analisi, mentre a livello internazionale esiste una « Guideline » del PAG (Protein Advisory Group), Gruppo di lavoro creato dalla FAO-OMS-UNICEF, allo scopo di valutare l'uso di nuove fonti proteiche non convenzionali [9]. Tale documento sugli aspetti nutrizionali ed igienico-sanitari delle nuove fonti proteiche per uso zootecnico contiene l'indicazione delle classi di microrganismi che debbono essere ricercati ed i limiti di accettabilità proposti (Tab. 1). Nello stesso anno (1974) è stato approntato un documento della I.U.P.A.C. (International Union of Pure and Applied Chemistry) [10] il quale porta, come il precedente, un elenco dei microrganismi che debbono essere ricercati ed i limiti di accettabilità proposti per le SCP (Tab. 2).

Come appare chiaramente da un confronto fra le due tabelle, le classi di microrganismi ed i limiti proposti per ciascuna classe da parte delle due Istituzioni coincidono.

Il già citato documento della I.U.P.A.C. contiene anche i metodi di analisi raccomandati, parte dei quali sono stati proposti dalla A.O.A.C. [54, 55] e parte sono desunti dalla letteratura, che descriviamo e commentiamo brevemente qui di seguito.

TABELLA 1

**Protocolli di analisi e limiti di accettabilità proposti
dal PAG per le SCP**

MICROORGANISMI	Limiti proposti/ grammo
Carica batterica aerobia	$< 10^5$
Lieviti e muffe	$< 10^3$
Enterobacteriacee	< 10
Salmonella	< 1 in 50 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1
Clostridi totali.	$< 10^3$
<i>Cl. perfringens</i>	$< 10^2$
Streptococchi di gruppo D	$< 10^4$

TABELLA 2

**Protocolli di analisi e limiti di accettabilità proposti
dalla I.U.P.A.C. per le SCP**

MICROORGANISMI	Limiti proposti/ grammo
Carica batterica aerobia	$< 10^5$
Lieviti e muffe	$< 10^3$
Enterobacteriacee	< 10
Salmonella	< 1 in 50 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1
Clostridi totali.	$< 10^3$
<i>Cl. perfringens</i>	$< 10^2$
Streptococchi di gruppo D	$< 10^4$

1. Campionamento e prelievo

Valgono i criteri seguiti per le farine ad uso zootecnico in generale.

Il campionamento varia a seconda dell'entità della partita. Se si tratta di piccole partite prelevare dal 5 % almeno dei contenitori; se la partita è rappresentata da un numero notevole di contenitori, effettuare i prelievi dallo 0,2-0,5 % di essi.

Il prelievo va eseguito servendosi di attrezzi sterili (cucchiai, sonde metalliche ecc.). Si consiglia per la praticità l'uso di un sacchetto di plastica tenuto sul pugno della mano a mo' di guanto, da rovesciare all'interno della massa del prodotto dopo aver effettuato il prelievo. Da ognuno dei contenitori prelevare in più punti, affinché il campione risulti rappresentativo e porre in un unico recipiente di vetro a bocca larga e con tappo smerigliato. Tale recipiente deve essere conservato a temperature inferiori a 10 °C ed in luogo asciutto.

2. Esami di laboratorio

La prima operazione da eseguire, preliminare a tutte le altre, consiste nel diluire con un diluente opportuno il campione, dopo averne pesata una aliquota. Trattasi di un'operazione molto importante, spesso sottovalutata, che, se mal eseguita, può compromettere a volte tutta l'analisi.

È ben nota in letteratura la necessità di rivivificazione della microflora, qualora si debba analizzare un alimento che sia stato sottoposto a trattamenti tecnologici drastici, quali essiccamento, pasteurizzazione, salagione, ecc.,

perché la microflora microbica si trova in uno stato di *dormancy* e, se seminata direttamente in terreni colturali selettivi, può in molti casi non svilupparsi affatto o in misura ridotta. La necessità di rivivificazione è naturalmente più sentita per i microrganismi presenti in piccole quantità, come salmonelle ed enterobatteri, ma torna ugualmente utile per tutta la microflora in generale. In particolare, per le farine ed i prodotti essiccati in genere, lo stato di *dormancy* è dovuto al basso valore di a_w di cui risentono soprattutto i microrganismi Gram negativi [56-58].

Per quanto riguarda la scelta del diluente, la scuola di Buttiaux [59] consiglia una soluzione fisiologica con 1 % di triptone e 8 % di NaCl.

Negri e Coll. [60] invece consigliano:

1) per alimenti facilmente dispersibili in acqua: soluzione fisiologica a pH 7,0;

2) per alimenti ricchi di proteine: soluzione di fosfato bipotassico al 2 % a pH 7,4;

3) per alimenti a composizione mista, con significativa presenza di lipidi: soluzione di trifosfato sodico al 2 % a pH 7,4.

Per le farine SCP sembra quindi opportuna la scelta del terzo diluente, con il quale viene allestita una sospensione iniziale 1 : 10 in beuta.

Al fine di ottenere una sospensione omogenea, si consiglia di agitare per 30 min su shaker a temperatura ambiente e di lasciar quindi riposare per 1 ora. Qualora il prodotto tendesse a sedimentare, sarà opportuno modificare il rapporto di diluizione peso/volume aggiungendo 10 g a 100 ml anziché 10 g a 90 ml; in tale evenienza, dopo agitazione si lascerà riposare la sospensione per 1 ora a temperatura ambiente e si avrà cura di raccogliere solo il sopranatante della stessa.

Partendo dalla sospensione 1 : 10 così allestita, si effettuano diluizioni scalari in base 10 con lo stesso diluente o con soluzione fisiologica in provette o provettoni.

A) Carica batterica mesofila aerobia.

Le norme I.U.P.A.C. consigliano la semina di 0,1 ml di una sospensione 1 : 100 del prodotto (dil. 10^{-3}) in *trypticase soy agar*, secondo quanto prescritto dall'A.O.A.C. [54] per gli alimenti in generale. Tuttavia la successiva edizione di tale testo [55] consiglia di seminare una serie di piastre Petri contenenti *tryptone-glucose-yeast agar* con 1 ml delle varie diluizioni.

Quest'ultima tecnica ci sembra più valida, anzi suggeriamo di migliorarla duplicando ciascuna diluizione seminata. Per quanto concerne i terreni, i due consigliati sono entrambi validi ed equivalenti. In relazione allo standard di carica batterica consigliato ($\max = 10^5$) è sufficiente seminare le prime 4 diluizioni del prodotto compresa la iniziale.

Le piastre, dopo solidificazione dell'agar, vengono incubate a 30 °C per 48-72 ore e quindi si contano le colonie formatesi su ciascuna piastra, trascurando le piastre con un numero di colonie inferiore a 30 e superiore a 300.

Al posto della semplice media aritmetica, spesso usata, sarebbe opportuno l'uso di una media « ponderata » la cui formula [60-62] è la seguente:

$$m = \frac{\Sigma c_1 + \Sigma c_2}{\frac{n_1 + n_2}{a}}$$

dove Σc_1 = colonie totali di tutte le piastre (n_1) alla diluizione minore (d_1)
 Σc_2 = colonie totali di tutte le piastre (n_2) alla successiva diluizione
 (a = fattore di diluizione = 10).

Il valore numerico così ottenuto è semplicemente un « valore medio ». Per essere più esatti e rispondenti alla realtà del campione, occorre calcolare la « varianza di campionamento » che è data dalla formula:

$$\text{varianza (x)} = \frac{X}{\frac{n_1 + n_2}{a}} \cdot d_1$$

dove X = valore medio numerico ottenuto e gli altri simboli hanno i significati già indicati in precedenza. La radice quadrata di tale valore è la « deviazione standard » che indicheremo con $\sqrt{(x)}$.

Perciò, con una probabilità del 95 %, il numero di germi « reale » sarà compreso nell'intervallo fiduciale $X \pm 1,96 \cdot \sqrt{(x)}$.

dove X = valore medio numerico

$\sqrt{(x)}$ = deviazione standard.

La carica batterica sarà quindi espressa da due valori che rappresentano l'intervallo fiduciale entro il quale è compreso il valore « reale ».

Una volta effettuata la numerazione delle colonie, si presentano tuttavia spesso difficoltà di interpretazione, specie quando esistono degli standards ufficiali proposti ai quali ci si deve attenere. Se, ad es. il regolamento prevede un limite di carica batterica di 100.000/g e i risultati analitici danno un valore di 102.000, come si dovrà comportare l'analista per il giudizio?

Tale problema non è specifico per i prodotti SCP né soltanto per la carica batterica, ma è dibattuto da anni per tutte le analisi quantitative che si debbono attenere ad uno standard, come sopra detto.

Il parametro della carica batterica, a differenza di molti limiti di natura chimica, non può essere rigido, essendo legato a complessi fenomeni biologici la cui progressione è esponenziale.

Sotto un certo profilo, meglio rispondente alla dinamica delle variazioni quantitative di una popolazione batterica, sarebbe più valido accettare valori compresi fra due limiti; tale criterio peraltro offre margini troppo elevati di variabilità, per cui potrebbe venir meno la funzione di «deterrente» del concetto di carica batterica limite [60].

Tali discussioni sono state sollevate anche in sede CEE e sono state prese in considerazione alcune formulazioni intese a rendere meno rigida ma pur sempre obiettiva l'interpretazione dei dati analitici relativi alla carica batterica.

La seguente formulazione [60] allo stato attuale sembra la più rispondente alle esigenze sopra riportate:

1) l'analisi deve essere eseguita su più campioni ed il risultato finale espresso calcolando la media geometrica dei risultati parziali;

2) il prodotto risulta idoneo se almeno il 50 % dei campioni esaminati è compreso nei limiti di carica batterica prefissati per il prodotto stesso.

B) Muffe e Lieviti.

Le norme I.U.P.A.C. raccomandano di seminare 1 ml di sospensione 1 : 10 in *oxytetracycline-glucose-yeast extract agar* (OGY) e di incubare per 5 gg a 22 °C, secondo il metodo proposto da Mossel e Coll. [63]. Tale terreno è in grado di inibire completamente lo sviluppo delle bacillacee.

Il controllo di muffe e lieviti riveste particolare importanza in quanto testimonia della eventuale presenza di cellule vitali di *Candida* sfuggite al trattamento termico.

C) *Enterobacteriaceae*.

Le norme I.U.P.A.C. consigliano di seminare 1 g di materiale in 100 ml di *glucose-brilliant green-bile broth* con campanella di Durham, lasciare per 2 ore la beuta a 20 °C per la rivivificazione e quindi incubare per 24 ore a 30 °C, secondo il metodo descritto da Mossel e Coll. [64]. Lo sviluppo e la produzione di gas in tali condizioni indicano la presenza di enterobatteri in 1 g di materiale.

Date le basse contaminazioni da enterobatteri presenti di regola nelle farine SCP, tale tecnica semplificata potrebbe anche essere sufficiente; tuttavia, per una migliore valutazione quantitativa, noi vorremmo suggerire un trasferimento di questa tecnica in provetta, con l'applicazione del Most Probable Number (M.P.N.). In pratica, si seminano con 1 ml delle varie diluizioni 3 o 5 serie di provette contenenti lo stesso terreno di cui sopra con campanella di Durham e si incubano a 30 °C per 24 ore. Lo sviluppo e la produzione di gas sono presuntive della presenza di enterobatteri.

La sostituzione del lattosio con il glucosio [65] sia in questo terreno che in quello solido che citeremo tra breve, consente di evidenziare «tutti» gli enterobatteri e non soltanto i coliformi lattosio positivi rapidi.

Una eventuale ricerca specifica di *E. coli*, cui si annette il peculiare significato di contaminante fecale, può essere eseguita facoltativamente, seguendo il procedimento di Mackenzie e Taylor [66] il quale consiste nel seminare, dalle provette risultate positive nella precedente coltura, 1 o 2 gocce in *brilliant green bile broth* (BGB) e in *acqua peptonata* (preferibilmente con tryptone) ed incubare in bagno-maria a $44^{\circ}\text{C} \pm 0,2$ per 24-48 ore. La crescita e la produzione di gas in BGB e la crescita e produzione di indolo in acqua peptonata confermano la presenza di *E. coli* nella diluizione in esame.

I titoli per enterobatteri e per *E. coli* rispettivamente si calcolano facendo uso delle tavole M.P.N.

Accanto a, o in sostituzione di questa titolazione in terreno liquido delle enterobacteriacee, suggeriamo ancora un conteggio in *violet red - bile agar* + glucosio (V.R.B.G.) mediante semina di 1 ml delle prime diluizioni in piastre Petri (in doppio) e lettura delle colonie rosso violacee dopo incubazione a 30°C per 24 ore [65]. Tali colonie sono costituite da enterobatteri fermentanti il glucosio e/o lattosio con acidificazione del mezzo; in tali condizioni, i sali biliari ed il rosso neutro contenuti nel terreno precipitano nello stroma della colonia dando luogo alla formazione di colonie rosso-violette. Il terreno è scarsamente selettivo, per cui, dopo 24 ore di incubazione, possono svilupparsi microrganismi Gram negativi non appartenenti alle enterobacteriacee, i quali formano ugualmente colonie rosse per fermentazione del glucosio e/o lattosio; queste ultime tuttavia sono di regola più piccole, quasi puntiformi e non debbono essere prese in considerazione nel conteggio.

Il conteggio delle colonie di enterobatteri sottostà ovviamente agli stessi criteri indicati poc'anzi per la carica batterica mesofila.

D) *Salmonelle*.

Tali microrganismi sono fra i pochi per i quali si sia tentato a livello internazionale di giungere ad una standardizzazione ed unificazione delle numerose metodiche esistenti per l'isolamento. Questo traguardo è stato in linea di massima raggiunto con un enorme lavoro portato avanti da 11 Paesi europei, fra cui l'Italia, fra il 1967 ed il 1974.

In proposito le norme I.U.P.A.C. fanno espresso riferimento a tale metodica standard [67-69].

Essa prevede un «prearricchimento» (non consigliato dalla I.U.P.A.C.) in *acqua peptonata tamponata* (50 g di prodotto in 500 ml di terreno) per 24 ore, seguito da un «arricchimento» in *Müller Kauffmann broth base* addizionato dell'1,9 % di una soluzione iodo-iodurata (200 g di iodio e 250 g di

ioduro di potassio/litro di acqua distillata) e dell'1 % di una soluzione acquosa sterile di verde brillante allo 0,1 %.

La semina in Muller Kauffmann va fatta nello stesso rapporto di 1 : 10, in beute contenenti 100 ml di terreno; dopo la semina le beute vengono tenute in bagno-maria a 45 °C per 15 min e quindi incubate a 43 °C per 15-18 ore.

Trascorso tale tempo, si semina un'ansata di brodocoltura su piastra di 14 cm di diametro contenente *brilliant green agar* di Kauffmann preparato secondo la formula messa a punto dalla Oxoid. Su tale terreno le colonie di *Salmonella* crescono rigogliose, grandi, traslucide, con intenso alone di viraggio al rosso brillante per alcalinizzazione del mezzo. I coliformi lattosio positivi, quando crescono, formano colonie gialle per acidificazione, il *Proteus* può sviluppare talvolta formando colonie piccole, gracili, con viraggio al giallo, più spesso alcalinizzanti, a seconda della specie.

Le colonie sospette di appartenere al genere *Salmonella* vengono prelevate con ago e seminate su terreno di *Kligler* o su *T.S.I.* e, sulle agarcolture che confermano la diagnosi di *Salmonella* (*butte* gialla, *slant* rosso, H_2S +, presenza di gas) si eseguono i vari test biochimici di identificazione che verranno descritti in altra parte.

Ai test biochimici possono seguire, se necessario, le prove diagnostiche sierologiche con sieri polivalenti e monovalenti, per la identificazione del sierotipo.

E) *Staphylococcus aureus*.

Le norme I.U.P.A.C. raccomandano di seminare 1 g di prodotto in 100 ml di terreno di *Giolitti e Cantoni* [70] ed incubare a 37 °C in condizioni anaerobiche per 24-48 ore. Dai provettoni in cui si ha annerimento, per riduzione del tellurito, si semina con ansa su *egg yolk-tellurite-glicine-pyruvate agar* secondo la metodica descritta da Baird-Parker [71]. Su tale terreno le colonie di stafilococchi crescono grandi, nere e con alone chiaro dovuto ad attività lecitinasica sull'uovo.

Anche in questo caso la metodica suggerita è chiaramente semiquantitativa, nel senso che consente soltanto di accertare la presenza o l'assenza di stafilococchi patogeni in 1 g di prodotto.

Per una migliore valutazione quantitativa noi suggeriamo la semina nello stesso terreno di arricchimento di quantità scalari del prodotto e il successivo isolamento e conferma su terreno di Baird-Parker. Contemporaneamente può essere tentata una semina diretta su Baird-Parker di 0,1 ml delle prime diluizioni del prodotto, per spatolamento.

F) *Clostridi solfito-riduttori*.

Le norme I.U.P.A.C. consigliano la semina di 1 ml di una sospensione 1 : 10 del prodotto in *sulphite-iron-polymyxin agar* [72, 73], incubando in

anaerobiosi a 32 °C per 48 ore. La riduzione del solfito sodico in presenza di sali di ferro da parte dei clostridi determina lo sviluppo di colonie nere nello spessore del terreno e in superficie.

A questa metodica, piuttosto semplificata, noi suggeriamo alcune modifiche: 1) semina delle prime tre diluizioni decimali del prodotto e 2) trattamento delle stesse a 80 °C per 10 min prima della semina, stante l'esistenza di microrganismi solfito-riduttori non sporigeni, anaerobi facoltativi ed obbligati.

Le condizioni di anaerobiosi possono essere realizzate o coltivando in alto strato in provettone (metodo di Wilson-Blair) oppure, più modernamente, in piccoli recipienti individuali per anaerobiosi (metodo di Mossel con bustine contenenti polvere riducente, piastre di Brewer, ecc.) o in apparecchi per anaerobiosi per colture multiple (sistema Gaspak).

G) *Clostridium perfringens*.

Le norme I.U.P.A.C. consigliano la stessa tecnica di cui sopra, usando come terreno *sulphite-iron-cycloserine agar* ed incubando a 46 °C per 48 ore, secondo il metodo proposto da Mossel e Coll. [74]. La sostituzione della polimixina con cicloserina e la temperatura più alta, secondo Mossel, consentono una maggiore selettività nei confronti di *Clostridium perfringens* il quale nel terreno solido sopra citato cresce in coltura pura sotto forma di grandi colonie nere.

H) *Streptococchi di gruppo D*.

Le norme I.U.P.A.C. consigliano di seminare per spatolamento 0,1 ml della diluizione 1 : 10 del prodotto su *aesculin-iron-azide-bile salt agar* e di incubare a 37 °C per 24-48 ore secondo la metodica indicata da Buck [75]. A tale riguardo è opportuno far presente tuttavia che la metodica di cui sopra viene utilizzata dall'Autore per l'isolamento di enterococchi da acque di mare e fa uso di terreni liquidi del tipo di Rothe e Litsky (*AD broth* e *EVA broth*) [76], con un conteggio del tipo MPN. Il terreno a base di esculina, sali di ferro, sodio azide e sali biliari è invece chiaramente un terreno solido sul quale si effettua un conteggio per semina superficiale e per il quale non sono applicabili i criteri MPN.

Per tali considerazioni ed anche per il fatto che le stesse norme I.U.P.A.C. danno un limite di 10^4 per gli enterococchi nelle farine SCP, sarebbe opportuno, a nostro avviso, seminare su piastra almeno le prime tre diluizioni del prodotto, utilizzando o il terreno solido sopra citato (Terreno di Edwards modificato) o i terreni liquidi del tipo *AD broth* e *EVA broth*; nel primo caso si effettuerà il conteggio con i criteri indicati a proposito della carica batterica aerobica, nel secondo caso utilizzando le tavole MPN.

Sul terreno di Edwards modificato le colonie di enterococchi crescono piccole, puntiformi e nere per idrolisi dell'esculina e, malgrado la sufficiente caratterizzazione morfologica, richiedono una conferma che può essere effettuata con le prove biochimiche più oltre indicate. Lo stesso dicasi per il conteggio effettuato in terreni liquidi, per il quale una prima conferma è data dalla crescita in *EVA broth* (*ethyl violet azide broth*) con intorbidamento ed un caratteristico sedimento violetto, seguita da isolamento e caratterizzazione biochimica, come sopra detto, data l'esistenza in tali terreni di false positività [77].

3. Prove biochimiche consigliate per l'identificazione generica e specifica dei microrganismi presenti nelle SCP

A) Carica batterica aerobia mesofila.

Ci si limita a registrare il valore numerico della carica senza procedere a prove di identificazione.

B) Muffe e Lieviti.

In caso di cariche microbiche eccedenti i limiti prefissati per tali microrganismi, è consigliabile procedere all'identificazione dei lieviti isolati, al fine di accertare l'eventuale presenza di *Candida* appartenenti al ceppo coltivato, sfuggite al trattamento termico.

C) *Enterobacteriaceae*.

Nei casi in cui si proceda alla determinazione del titolo per *E. coli*, dopo la prova di Mackenzie occorre eseguire; a) prove di appartenenza alla famiglia *Enterobacteriaceae* e b) prova di identificazione di *E. coli*.

a) Prove di appartenenza alla famiglia *Enterobacteriaceae*.

La prova di Mackenzie, anche se ben condotta, resta pur sempre una prova presuntiva, cui devono far seguito prove di conferma per *Enterobacteriaceae*, che sono le seguenti:

1) *Ossidasi* (reazione di Kovacs). Immergere delle striscioline di carta Whatman n. 1 in una soluzione acquosa 1 % di p-amino-dimetil-anilina ossalato e farle asciugare rapidamente. Strisciarvi quindi sopra con ago o ansa la coltura in agar di 24 ore del germe in esame. La comparsa di una colorazione bruno-violetta è indice di reazione positiva.

Le *Enterobacteriaceae* sono ossidasi negative.

2) *Fermentazione del glucosio*. Seminare la coltura in esame per infissione in due provette di terreno di Hugh e Leifson con glucosio. In una di esse versare dell'olio di paraffina ed incubare quindi per 24-48 ore.

Le *Enterobacteriaceae* danno viraggio al giallo in entrambe le provette.

3) *Riduzione del nitrato*. Seminare con ansa il germe in esame in *agar nitrato* ed incubare a 30 °C per 24 ore. Versare quindi sulla superficie del terreno alcune gocce dei seguenti reattivi (reattivo di Griess):

- a) acido sulfanilico allo 0,8 % in acido acetico N:5;
- b) alfa naftilammina allo 0,5 % in acido acetico N:5.

La comparsa di una colorazione rosso sangue è indice di riduzione del nitrato a nitrito. Le *Enterobacteriaceae* danno reazione positiva. In caso di reazione negativa, è opportuno controllare se non vi sia stata una riduzione del nitrito ad NH_3 . Ciò può essere fatto aggiungendo della polvere di zinco riducente. Se è presente nitrato esso viene ridotto a nitrito, che in presenza del reattivo di Griess si colora immediatamente in rosso; se non è presente nitrito, perché completamente ridotto ad NH_3 , la reazione permane negativa, ed il ceppo in esame è da considerare positivo.

b) *Prove di identificazione di E. coli*.

1) *Produzione di indolo*. Sulla brodocoltura positiva ottenuta nella prova di Mackenzie (sviluppo in acqua peptonata a 44 °C) si stratificano alcuni ml del reattivo di Ehrlich, modificato da Kovacs, agitando. In caso di reazione positiva si ha la comparsa di un anello superficiale rosso ciliegia, in caso negativo l'anello si colora in giallo. *E. coli* è indolo positivo, raramente indolo negativo.

2) *Prova del rosso metile*. Seminare un'ansata del germe in esame in terreno MR-VP (terreno di Clarck e Lubs) ed incubare a 30 °C per 4 gg. Aggiungere quindi alla brodocoltura 1-2 gocce di una soluzione alcoolica di rosso metile allo 0,25 %. La comparsa di una intensa colorazione rossa è indice di positività della prova, in caso contrario si ha colorazione gialla.

E. coli è rosso metil positivo.

3) *Produzione di acetil-metil-carbinolo*. Aggiungere ad 1 ml della brodocoltura precedente 0,6 ml di una soluzione alcoolica di alfa naftolo 5 % e 0,2 ml di una soluzione acquosa di NaOH al 40 % (reattivo di Barritt). Agitare energicamente per qualche minuto. In caso di positività si ha una colorazione rosso magenta.

E. coli è negativo per questa reazione (reazione di Voges-Proskauer).

4) *Utilizzazione del citrato*. Seminare con ago il germe in esame con rigo centrale su *Simmons citrate agar*, avendo cura di non asportare con l'ago tracce di terreno colturale, ed incubare a 30 °C per 1-10 gg. Il viraggio del terreno a bleu oltremare è indice di positività.

E. coli è citrato negativo.

D) *Salmonella*.

Le colonie sospette cresciute su BGA vengono trapiantate con ago in terreno di Kligler o T.S.I. e, in caso di conferma della diagnosi, si procede, come già detto, ad alcune prove biochimiche, per una più esatta identificazione. Nella diagnostica corrente, secondo la nostra esperienza, è sufficiente effettuare tre prove: ossidasi, APP e beta-galattosidasi:

1) *Ossidasi*. Già descritta per *E. coli*.

2) *Prova dell'APP*. È una prova rapida che consente di evidenziare l'acido fenilpiruvico formatosi per deaminazione ossidativa ad opera di germi del genere *Proteus*.

Da un'agarcoltura di 24 ore del germe in esame o anche dal Kligler sospendere una ricca ansata in 0,5 ml di soluzione acquosa sterile di fenilalanina allo 0,4 % [78] ed incubare per 15 minuti a 30 °C.

Quindi versare nella provettina due gocce del seguente reattivo:

Soluzione semisatura di allume ferrico	ml	50
Solfato di ammonio	g	20
Acido solforico al 10 %	ml	10

La reazione positiva è data dalla rapida comparsa di una intensa colorazione verde bandiera.

Le *Salmonelle* sono APP negative.

3) *Prova della beta-galattosidasi*. Sospendere una ricca ansata da agar o da Kligler in 0,25 ml di sol. fisiologica ed aggiungere quindi una goccia di toluolo; agitare, lasciare per qualche minuto a 37 °C ed aggiungere 0,25 ml di reattivo ONPG (orto-nitrofenil-beta-galattopiranoside). Incubare a 30-37 °C fino a 5-6 ore. La reazione positiva, che testimonia la presenza di beta-galattosidasi, compare di regola entro 20 min nei ceppi lattosio positivi rapidi, entro qualche ora nei ceppi lattosio positivi lenti, ed è rappresentata da una colorazione gialla più o meno intensa.

Le *Salmonelle* sono beta-galattosidasi negative, con qualche eccezione.

La soluzione di ONPG si prepara sciogliendo 80 mg di reattivo ONPG in polvere in 15 ml di H₂O scaldata a 50 °C ed aggiungendo 5 ml di una soluzione tampone di NaH₂PO₄·H₂O (6,9 g di sale in 45 ml di H₂O - Portare il pH a 7 con circa 3 ml di lisciva di soda).

Sia il tampone che la soluzione completa di ONPG si conservano a 4 °C in frigorifero.

Tuttavia, in deroga a quanto detto finora, in qualche caso può essere necessario allestire un maggior numero di prove biochimiche, per una più esatta conoscenza del biotipo, soprattutto se si è in presenza di subgeneri di *Salmonella* rari e di difficile classificazione.

In tali casi suggeriamo di ricorrere ai metodi miniaturizzati API con i quali è possibile eseguire in breve tempo una galleria di oltre 20 prove biochimiche, che elenchiamo semplicemente per conoscenza del lettore: ONPG o beta-galattosidasi (già descritta) — Arginina deaminasi — Lisina decarbossilasi — Ornitina decarbossilasi — Simmons citrato (già descritto) — idrogeno solforato — Ureasi — APP (già descritto) — Indolo (già descritto) — Rosso metile (già descritto) — Voges-Proskauer (già descritto) — Gelatina — Fermentazione di glucosio, mannite, inosite, sorbite, ramnosio, saccarosio — Mobilità — Malonato — Test O-F (ossidazione-fermentazione del glucosio).

Una volta definito biochimicamente, il ceppo viene assoggettato a prove sierologiche con sieri antisalmonella polivalenti e monovalenti, seguendo il ben noto schema di Kauffmann-White, allo scopo di definire il sierotipo.

E) *Staphylococcus aureus*.

Le colonie grandi, nere, con alone chiaro, cresciute sul terreno di Baird-Parker, nella grande maggioranza dei casi sono costituite da Stafilococchi patogeni coagulasi positivi. Tuttavia è opportuno confermare tale diagnosi mediante le due prove biochimiche della *coagulasi* e della *DNAasi*. La diagnosi differenziale con il genere *Micrococcus* può essere eseguita con la semina del germe isolato in *terreno V.L.* (Viande-Levure) per anaerobi e in *terreno di Mossel alla mannite e cristalvioletto* per il test di ossidazione/fermentazione. La crescita in entrambi i terreni ed il viraggio al giallo nel secondo di essi conferma la diagnosi di *Staphylococcus*.

F) *Clostridi totali*.

Vengono registrati numericamente con i criteri indicati per la carica batterica aerobia, senza procedere ad identificazione.

Clostridium perfringens. — La selettività del terreno nonché la temperatura di incubazione assicurano, secondo Mossel, la crescita esclusiva di tale specie batterica, che può essere contata con i criteri già indicati, senza necessità di ricorrere ad una conferma biochimica.

G) *Streptococchi di gruppo D*.

La morfologia delle colonie ed il reperto microscopico di cocci Gram positivi disposti in lunghe catene è già sufficiente per porre la diagnosi di *Streptococcus*. La successiva diagnosi di gruppo può essere fatta mediante alcune prove biochimiche che descriviamo brevemente:

1) *Sviluppo a 10 °C - 37 °C - 45 °C*. Seminare in brodo ed incubare alle temperature indicate per 24-48 ore, fatta eccezione per la temperatura di 10 °C per la quale occorrono fino a 10 gg.

Gli Streptococchi fecali (di gruppo D) crescono a tutte e tre le temperature.

2) *Termoresistenza a 60 °C per 30 min.* Trattare una brodocoltura a 60 °C per 30 min e seminare quindi 1 goccia in brodo, incubando a 37 °C per 24-48 ore.

Gli Streptococchi fecali sopravvivono al trattamento.

3) *Sviluppo a pH 9,6.* Seminare in brodo a pH 9,6 ed incubare per 3 gg. Gli Streptococchi fecali si sviluppano a tale pH.

4) *Crescita in presenza di tellurito di potassio.* Seminare la coltura in un brodo contenente tellurito di potassio 1 : 2500 ed incubare a 37 °C per 48-72 ore.

Gli Streptococchi fecali si sviluppano e determinano annerimento per riduzione del tellurito a tellurio metallico.

APPENDICE

TERRENI DI CULTURA USATI PER NUMERAZIONE, ARRICCHIMENTO, ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA DEI MICRORGANISMI DESCRITTI NEL TESTO

Descriveremo in questa appendice i principali terreni di coltura citati nel testo, indicandone la composizione per litro nonché il nome commerciale e la Ditta produttrice, qualora si tratti di prodotti disidratati. Per le modalità di preparazione e sterilizzazione si rimanda alle istruzioni della Casa produttrice. L'ordine seguito sarà quello di citazione nel testo.

1. - *Trypticase soy agar.*

È un terreno solido che si presta bene per l'isolamento e la coltura di numerosi microrganismi anche particolarmente esigenti [79, 80].

Trypticase	g	15
Phytone	»	5
Sodio cloruro	g	5
Agar	»	15
Acqua distillata	»	1.000

BBL 11043.

2. - *Tryptone glucose yeast agar (Plate count agar) [81].*

Tryptone	g	5
Estratto di lievito	»	2,5

Destrosio	»	1
Agar	»	15
Acqua distillata	»	1.000

Oxoid CM 183.

3. - *Glucose yeast extract agar* (con OTC).

Estratto di lievito	g	5
Glucosio	»	20
Agar	»	16
Acqua distillata	»	1.000

Al momento dell'uso, fondere 100 ml di terreno, raffreddare a 50 °C ed aggiungere 10 ml di una soluzione di OTC (ossitetraciclina) contenente 1 mg/ml.

4. - *Glucose brilliant green bile broth*.

Peptone	g	10
Glucosio	»	10
Bile di bue essiccata	»	20
Verde brillante	»	0,0133
Acqua distillata	»	1.000

5. - *Lactose brilliant green bile broth*.

Peptone	g	10
Lattosio	»	10
Bile di bue	»	20
Verde brillante	»	0,0133
Acqua distillata	»	1.000

Oxoid CM 132.

6. - *Acqua peptonata* (Peptone water).

Peptone	g	10
Sodio cloruro	»	5
Acqua distillata	»	1.000

Oxoid CM 9.

7. - *Violet red bile agar* (con glucosio).

È un terreno solido che consente la crescita selettiva ed il conteggio dei microrganismi coliformi nella versione originale e di tutti gli enterobatteri nella modificazione di Mossel [65] con l'aggiunta dell'1 % di glucosio (VRBG).

Estratto di lievito	g	3
Peptone	»	7
Sali biliari	»	1,5

Lattosio	»	10
Sodio cloruro	»	5
Agar	»	15
Rosso neutro	»	0,030
Cristalvioletto	»	0,002
Acqua distillata	»	1.000

BBL 11807.

8. - *Acqua peptonata tamponata.*

Peptone	g	10
Sodio cloruro	»	5
Fosfato bisodico . 12 H ₂ O	»	9
Fosfato monopotassico	»	1,5
Acqua distillata	»	1.000

9. - *Müller Kauffmann broth base.*

Tryptone	g	7
Peptone di soia	»	2,3
Sodio cloruro	»	2,3
Calcio carbonato	»	2,5
Sodio tiosolfato	»	40,7
Bile di bue	»	4,75
Acqua distillata	»	1.000

Oxoid CM 343.

10. - *Brilliant green agar.*

Estratto Lab Lemco	g	5
Peptone	»	10
Estratto di lievito	»	3
Fosfato bisodico	»	1
Fosfato monosodico	»	0,6
Lattosio	»	10
Saccarosio	»	10
Rosso fenolo	»	0,09
Verde brillante	»	0,0047
Agar	g	12
Acqua distillata	»	1.000

Oxoid CM 329.

11. - *Terreno di Kligler (Kligler iron agar).*

È un terreno differenziale che consente la diagnosi presuntiva di genere nell'ambito degli enterobatteri, particolarmente tra coliformi, protei e salmonelle.

Peptone	g	20
Lattosio	»	10
Destrosio	»	1
Sodio cloruro	»	5
Citrato ferrico ammonico	»	0,5
Sodio tiosolfato	»	0,5
Agar	»	15
Rosso fenolo	»	0,025
Acqua distillata	»	1.000

Si fa solidificare in provetta in modo tale da ottenere un fondo alto almeno 3 cm. La semina della colonia viene effettuata per infissione nel fondo (*butte*) e per rigo centrale nella parte inclinata (*tranche* o *slant*).

La presenza di un sale di ferro e di un sale di zolfo consente di rivelare tracce di idrogeno solforato sotto forma di solfuro ferroso di colore nero, mentre il viraggio al giallo della sola *butte* testimonia la presenza di un germe lattosio negativo o lento fermentatore.

BBL 11317.

11bis. - *Triple sugar iron agar* (T.S.I.).

Rappresenta una delle varianti del terreno di Kligler con l'aggiunta di saccarosio (10 g/l) che consente la diagnosi anche dei germi lattosio negativi o lenti fermentatori.

BBL 11749.

12. - *Terreno di Giolitti e Cantoni* (*Staphylococcus enrichment broth base*).

Peptone	g	10
Estratto di lievito	»	6,5
Mannitolo	»	5
Glicina	»	10
Fosfato bipotassico	»	5
Litio cloruro	»	5
Sodio piruvato	»	10
Acqua distillata	»	1.000

Ad 1 l di terreno pronto per l'uso aggiungere 20 ml di una soluzione acquosa sterile di potassio tellurito 1 %.

Merck 7892.

13. - *Baird-Parker agar base*.

Trypticase	g	10
Estratto di carne	»	5
Estratto di lievito	»	1
Litio cloruro	»	5

Agar	»	20
Acqua distillata	»	1.000

17. - *Azide dextrose broth* (AD).

Peptone	g	15
Estratto di carne	»	4,5
Destrosio	»	7,5
Sodio cloruro	»	7,5
Sodio azide	»	0,2
Acqua distillata	»	1.000

BBL 11000.

18. - *Ethyl violet azide broth* (EVA).

Peptone	g	20
Destrosio	»	5
Sodio cloruro	»	5
Fosfato bipotassico	»	2,7
Fosfato monopotassico	»	2,7
Sodio azide	»	0,4
Etilvioletto	»	0,83
Acqua distillata	»	1.000

BBL 11226.

19. - *Terreno di Hugh e Leifson*.

Peptone	g	2
Sodio cloruro	»	5
Fosfato bipotassico	»	0,3
Bleu di bromotimolo	»	0,03
Agar	»	3
Acqua distillata	»	1.000

Al momento dell'uso fondere il terreno in provetta ed aggiungere 1 ml di una soluzione al 10 % di glucosio od altro zucchero, far solidificare e quindi seminare per infissione.

20. - *Agar nitrato* (nitrate agar).

Estratto di carne	g	3
Peptone	»	5
Potassio nitrato	»	1
Agar	»	12
Acqua distillata	»	1.000

Difco B 106.

21. - *Terreno MR-VP. (Methyl red - Voges Proskauer).*

Peptone	g	7
Destrosio	»	5
Fosfato bipotassico	»	5
Acqua distillata	»	1.000

Difco B 16.

22. - *Simmons citrate agar.*

Magnesio solfato	g	0,2
Fosfato ammonico	»	1
Fosfato bipotassico	»	1
Sodio citrato	»	2
Sodio cloruro	»	5
Agar	»	15
Bleu di bromotimolo	»	0,08
Acqua distillata	»	1.000

Difco B 91.

23. - *DNAse test agar.*

Desoxyribonucleic acid	g	2
Trypticase	»	15
Phytone	»	5
Sodio cloruro	»	5
Agar	»	15
Acqua distillata	»	1.000

Dopo sviluppo delle colture, la superficie delle piastre viene bagnata con acido cloridrico N o con soluzione acquosa 0,1 % di bleu di toluidina. Le colture DNAsi positive presentano una zona chiara intorno alla stria di semina, se trattate con acido cloridrico, o una zona di colore rosa brillante se trattate con toluidina.

24. - *Terreno V.L. (Viande-Levure).*

Tryptone	g	10
Sodio cloruro	»	5
Estratto di carne	»	3
Estratto di lievito	»	5
Cisteina cloridrato	»	0,4
Agar	»	8
Acqua distillata	»	1.000

25. - *Terreno di Mossel alla mannite.*

Tryptone	g	10
Estratto di lievito	»	1,5

Mannitolo	g	10
Bromocresolporpora	»	0.015
Sodio cloruro	»	5
Agar	»	15
Acqua distillata	»	1.000

Distribuire i terreni 24 e 25 in provettine sottili di 8 × 180 mm fino a circa 2/3 dell'altezza.

BIBLIOGRAFIA

1. VIVIANI, R. 1975. Fonti non convenzionali di proteine e di amminoacidi essenziali. In: *Atti Corso regionale di aggiornamento*. Bologna.
2. SENEZ, J.C. 1972. In: *Proceedings of Symposium of Aix en Provence*. Academic Press, London.
3. SPICER, A. 1970. In: *3rd International Congress of Food Science and Technology*. Washington D.C.
4. BELLANI, L., PATRIZI, R. & SCHIAVO, A. 1977. Le nuove fonti di proteine non convenzionali per l'alimentazione zootecnica. *Sel. Vet.* **18**: 265-348.
5. Liquichimica Biosintesi S.p.A., Book, n. 9.
6. Documentazione presentata dalla Ditta.
7. SCHAFER, J. & HEWITT, J. 1960. Valeur du test cutané dans l'allergie par *Candida albicans*. *Pathol. Biol.* **8**: 323.
8. TASCHDJIAN, C.L. et al. 1964. Antibody formation in systemic candidiasis. *Sabouraudia*, **3**: 129.
9. P.A.C. 1974. *Guideline on Nutritional and Safety Aspects of Novel Protein Sources for Animal Feeding*. Report, n. 15.
10. I.U.P.A.C. 1974. *Proposed Guideline for Testing of Single-cell Proteins Destined as Major Protein Source for Animal Feed*. Report n. 12.
11. QUEVEDO, F. 1965. Les *enterobacteriaceae* dans la farine de poisson. *Ann. Inst. Past. Lille*, **16**: 157-162.
12. REDAELLI, G., BELLANI, G. & GUALLINI, L. 1965. Sull'origine e sul meccanismo delle contaminazioni da salmonelle nelle farine animali per uso zootecnico. *Arch. Vet. Ital.* **16**: 453-470.
13. GRAY, D.F., HARLEY, O.C. & NOBLE, J.L. 1960. The ecology and control of *Salmonella* contamination in bonemeal. *Austr. Vet. J.* **36**: 246-252.
14. MOSSEL, D.A.A. 1974. The significance of microorganisms in dried foods. In: *International Symposium on Food Microbiology*. Milano.
15. CAVRINI, C. & BONANI, V. 1959. Ricerche batteriologiche su farine animali importate. *Cl. Vet.* **82**: 305-310.
16. REDAELLI, G. & GIOLITTI, G. 1960. Osservazioni sulle qualità igieniche delle farine animali ad uso zootecnico. In: *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* **14**: 674-677.
17. MOSSEL, D.A.A. & HARREWIJN, G.A. 1970. *Voedingsmidd Technol.* **1**: 391.

18. DENNY, C.B., RAN P.L. & BOHRER, C.W. 1966. *J. Food Sci.* **31**: 762.
19. DENNY, C.B., HUMBER J.Y. & BOHRER, C.W. 1971. Effect of toxin concentration on the heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A in beef bouillon and in phosphate buffer. *Appl. Microbiol.* **21**: 1064.
20. FUNG, D.Y., STEINBERG, D.H., MILLER, R.D., KURANTNICK M.J. & MURPHY, T.F. 1973. Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxins B and C. *Appl. Microbiol.* **26**: 938.
21. HAZEU, W. & HUECK, H.J. 1966. In: *Proceedings of Symposium of Microbiological Deterioration in the Tropics*. Soc. Chem. Ind. Monographs Ser. **23**. London.
22. HEISS, R. 1957. *Verpack Rundschau Techn. Wiss. Beil.* **8**: 17.
23. HAUGE, S. 1950. *Nordisk Hyg. Tidskrift*. **31**: 189.
24. HAUGE, S. 1955. *J. Appl. Bacteriol.* **18**: 591.
25. PISU, I. & STAZZI, A. 1952. Sulle tossine del *Bacillus cereus*. *Nuovi Ann. Ig. Microbiol.* **3**: 56-58.
26. BUTTIAUX, R. & MOSSÉL D.A.A. 1961. The significance of various organisms of fecal origin in foods and drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* **24**: 353.
27. Am. Publ. Health Ass. (A.P.H.A.). 1966. *Recommended Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 2nd Ed. New York.
28. LEWIS, K.H. & ANGELOTTI, R. 1964. Examination of foods for enteropathogenic and indicator bacteria. *U.S. Publ. Health Service*. Publ. n. 1142.
29. GELDREICH, E.E. 1966. Sanitary significance of fecal coliforms in the environment. *U.S. Dept. Int. Fed. Water Poll. Control Admin.* Washington D.C. Publ. W.P. 20-3.
30. RIBEIRO, A.M. 1970. La resistance des Salmonella dans les farines de poisson. *Ann. Inst. Past. Lille*. **21**: 255-262.
31. NELLI, A., SOCCI, A., MARCA, G. & BERTOLDINI, G. 1970. Ulteriori indagini sulla qualità igienica di farine animali per uso zootecnico. In: *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* **24**: 631-633.
32. ALRED, J.N., WALKER, J.W., BEAL, V.C. & GERMAINE, F.W. 1967. A survey to determine the salmonella contamination rate in livestock and poultry feeds. *J.A.V.M.A.* **151**: 1857-1860.
33. ANDREANI, E. & SECCHIARI, P. 1970. Sulla presenza di salmonelle in animali domestici e selvatici ed in alimenti ad uso zootecnico. *Ann. Fac. Med. Vet. Pisa*. **23**: 60-73.
34. BOYER, C.I., BRUNER D.W. & BROWN, J.A. 1958. Salmonella organisms isolated from poultry feeds. *Ar. Dis.* **2**: 396-401.
35. COMES, R., CARMENI, A., LAZZARA, A. & INTONAZZO, V. 1971. Presenza di salmonelle in alimenti del commercio ed in mangimi per zootecnia. *Ann. San. Pubbl.* **32**: 707-712.
36. DE OLIVEIRA, J.J.A. 1957. Salmonella: Leur isolement dans les farines destinées à l'alimentation des animaux. *Bull. O.I.E.* **48**: 336-345.
37. D'ESPOSITO, L., IZZI, R., RIVELLINI, P. & DE ANSERIS, P. 1968. Indagini microbiologiche sulle farine di origine animale provenienti dall'estero. *Rass. Med. Sper.* **15**: Suppl. 1 1-14.
38. HIRSCH, W. & SAPIRO-HIRSCH, R. 1958. The role of certain animal feeding stuffs, especially bonemeal, in the epidemiology of Salmonellosis. *Harefuah*. **54**: 57-59.

39. QUESADA, A., IZZI, R. & MAGGIO, V. 1960. Sulla presenza di germi del genere *Salmonella* nelle farine di pesce impiegate per la confezione dei mangimi. In: *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* **14**: 757-762.
40. JAKOBS, J., GUINÉE, P.A.M., KAMPELMACHER, E.H. & VAN KREULEN, A. 1963. Studies on the incidence of *Salmonella* in imported fish meal. *Zbl. Vet. Med.* **10**: 542-550.
41. TIECCO, G. 1966. Le farine carnee, i latti in polvere e le farine vegetali quali fonti di infezione per i giovani animali. *Nuovo Progr. Vet.* **21**: 1088-1092.
42. VAN DER SCHAAF, A., VAN ZIJL H.J.M. & HAGENS, F.M. 1962. Diermeel en salmonellosis (Meal of animal origin and salmonellosis) *Tijdschr. Diergeneesk.* **87**: 211-221.
43. BERGDOLL, M.S. 1963. The nature and detection of staphylococcal enterotoxin. In: *Microbiological quality of foods*. Academic Press. New York.
44. BERGDOLL, M.S., WEISS, K.F. & MUSTER, M.J. 1967. The production of staphylococcal enterotoxin by a coagulase-negative microorganism. *Bacteriol. Proc.* **67**: 12.
45. CASMAN, E.P. & BENNETT, R.W. 1965. Detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Appl. Microbiol.* **13**: 181.
46. CASMAN, E.P. 1966. Staphylococcal food poisoning. In: *94th Annual Meeting A.P.H.A.* S. Francisco, California.
47. CASMAN, E.P., BENNETT, R.W., DORSEY, A.E. & ISSA, J.A. 1967. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *J. Bacteriol.* **94**: 1875.
48. NIVEN, C.F. Jr. 1963. Microbial indexes of food quality: fecal streptococci. In: *Microbial quality of foods*. Academic Press. N.Y.
49. HARTMAN, P.A., REINHOLD, G.W. & SARASWAT, D.C. 1965. Indicator organisms; a review: Role of enterococci in food poisoning. *J. Milk Food Technol.* **28**: 344.
50. BUCHBINDER, L., OSLER, A.G. & STEFFEN, G.I. 1948. Studies in enterococcal food poisoning. I. The isolation of enterococci from foods implicated in several outbreaks of food poisoning. *Publ. Health Repts.* **63**: 109.
51. HOBBS, B.C. 1965. *Clostridium welchi* as a food poisoning organism. *J. Appl. Bacteriol.* **28**: 74.
52. HALL, H.E., ANGELOTTI, R., LEWIS, K.H. & FOTER, M.J. 1963. Characteristics of *Clostridium perfringens* strains associated with food and food-borne diseases. *J. Bacteriol.* **85**: 1094.
53. HAUSCHILD, A.H.W. & THATCHER, F.S. 1967. Experimental food poisoning with heat-susceptible *Clostridium perfringens* type A. *J. Food Sci.* **32**: 467.
54. A.O.A.C. 1970. *Official Methods of Analysis* XI Ed. A.O.A.C. Inc.
55. A.O.A.C. 1975. *Official Methods of Analysis* XII Ed. A.O.A.C. Inc.
56. MC. DADE, J.J. & HALL, L.B. 1964. Survival of gram negative bacteria in the environment. *Am. J. Hyg.* **80**: 192.
57. HESS, G.F. 1965. Effect of oxygen on aerosolized *Serratia marcescens*. *Appl. Microbiol.* **13**: 781.
58. MOSSEL, D.A.A., JONGERUS, E. & KOOPMAN, M.J. 1965. Sur la nécessité d'une revivification préalable pour le dénombrement des entérobacteriaceae dans les aliments déshydratés, irradiés ou non. *Ann. Inst. Past. Lille.* **16**: 119-125.

59. BUTTIAUX, R. 1972. Analyse microbiologique des potages deshydratés. *Ann. Nutr. Alim.* 26: 1-21.
60. NEGRI, R. & DE FELIP, G. 1974. Indici di qualità microbiologica degli alimenti disidratati. In *International Symposium of Food Microbiology*. Milano.
61. CAVALLI SFORZA, L. 1977. *Analisi Statistica per Medici e Biologi*. Boringhieri, Torino.
62. FARMILOE, F.J., CORNFORD, S.J., COPPOCK, J.B.M. & INGRAM, M. 1954. *J. Sci. Food Agric.* 5: 292.
63. MOSSEL, D.A.A., KLEYNEN SEMMELING, A.M.C., VINCENTIE, H.M., BEERENS, H. & CATSARAS, M. 1970. Oxytetracycline glucose yeast extract agar for selective enumeration of moulds and yeasts in foods and clinical material. *J. Appl. Bacteriol.* 33: 454-457.
64. MOSSEL, D.A.A. 1970. Rapid detection of subletally impaired cells enterobacteriaceae in dried foods. *Appl. Microbiol.* 20: 273.
65. MOSSEL, D.A.A., MENDERINK W.H.J. & SCHOLTZ, H.H. 1962. Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* 84: 381.
66. MACKENZIE, E.F.W., & WINDLE TAYLOR, E. 1948. Recent experiences in the rapid identification of *Bacterium coli* type 1. *J. Gen. Microbiol.* 2: 197-204.
67. EDEL, W. & KAMPFELMACHER, E.H. (with a working group). 1968. Comparative studies on Salmonella isolation in eight european laboratories. *Bull. W.H.O.* 39: 487-491.
68. EDEL, W. & KAMPFELMACHER, E.H. (with a working group). 1969. Salmonella isolation in nine european laboratories using a standardized technique. *Bull. W.H.O.* 41: 297-306.
69. EDEL, W. & KAMPFELMACHER, E.H. (with a working group). 1973. Comparative studies on the isolation of «subletally injured» salmonellae in nine european laboratories. *Bull. W.H.O.* 48: 167-174.
70. GIOLITTI, G. & CANTONI, C. 1966. A medium for the isolation of staphylococci from food-stuffs. *J. Appl. Bacteriol.* 29: 395-398.
71. BAIRD-PARKER, A.C. 1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci. *J. Appl. Bacteriol.* 25: 12.
72. MOSSEL, D.A.A. & DE WAART, J. 1968. The enumeration of Clostridia in foods and feeds. *Ann. Inst. Past. Lille.* 19: 13.
73. MARSHALL, R.S., STENBERGEN, J.F.S. & MC CLUNG, I.S. 1965. Rapid technique for the enumeration of *Clostridium Perfringens*. *Appl. Microbiol.* 13: 559-563.
74. MOSSEL, D.A.A. & POW, H. 1973. Studies on the suitability of sulphite cycloserine agar for the enumeration of *Clostridium perfringens* in food and water. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A.* 223: 559-561.
75. BUCK, J.D. 1972. Selective detection of enterococci in marine waters. *Am. J. Pub. Health.* 62: 419-421.
76. LITSKY, W., MALLMANN, W. & FIFIELD, C.W. 1955. Comparison of the Most Probable Numbers of *Escherichia coli* and enterococci in river waters. *Am. J. Publ. Health.* 45: 1049-1953.
77. BUCK, J.D. 1969. Occurrence of false positive Most Probable Number Test for fecal streptococci in marine waters. *Appl. Microbiol.* 18: 562-565.

78. TIECCO, G. & PICCININNO, G. 1964. Micrometodo per la identificazione rapida di *Proteus-Providencia*. In: *Atti Soc. It. Sci. Vet.* **18**: 576.
79. MC CULLOUGH, N.B. 1949. Laboratory test in the diagnosis of Brucellosis. *Am. J. Publ. Health.* **39**: 866-869.
80. ALFORD, J.A., WIESE, E.E. & GUNTER, J.J. 1955. Heat resistance in *Corynebacterium* and the relationship of this genus to *Microbacterium*. *J. Bacteriol.* **69**: 516-518.
81. Am. Pub. Health Ass. (A.P.H.A.) *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 11th Ed. APHA Inc. New York.
82. ISENBERG, H.D., GOLDBERG, D. & SAMPSON, J. 1970. Laboratory studies with a selective enterococcus medium. *Appl. Microbiol.* **20**: 433.